

УДК 577.21

Р.Е. Ниязова*, А.Т. Иващенко, О.А. Берилло, А.Ю. Пыркова, Ш.А. Атамбаева
 Национальная нанотехнологическая лаборатория
 Казахский Национальный университет имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан
 *e-mail: raiguln@mail.ru

Особенности сайтов связывания miR-3960, miR-3620-5p и miR-8072-5p с mRNA генов человека

Проведен поиск сайтов связывания 2037 miRNA в mRNA 12175 генов человека. Выявлена miR-3960, имеющая более тысячи сайтов связывания с высоким сродством к mRNA 333 генов. 565 сайтов связывания расположены в 5'UTR и 515 – в CDS. Нуклеотидные последовательности, выявленных в CDS участков, начала которых расположены через 1-3 нуклеотида, кодируют полиаланин или полипролин. miR-8072 имеет более 80 сайтов связывания в 5'UTR и CDS, которые состоят из высоко гомологичных нуклеотидных последовательностей. Сайты связывания с miR-3620 расположены преимущественно в 5'UTR и CDS. В mRNA многих генов начало нескольких сайтов связывания последовательно расположены через 5 нуклеотидов. Большинство генов-мишеней изученных miRNA кодируют транскрипционные факторы. Обсуждается биологическая роль miRNA.

Ключевые слова: miRNA, mRNA, нуклеотиды, сайты связывания, гены-мишени.

Р.Е. Ниязова, А.Т. Иващенко, О.А. Берилло, А.Ю. Пыркова, Ш.А. Атамбаева miR-3960, miR-3620-5p және miR-8072-5p-ның адам гендерінің mRNA-мен байланысу сайттарының ерекшеліктері

12175 адам гендерінің mRNA-да 2037 miRNA-дың байланысу сайттарына іздестіру жүргізілді. 333 гендердің mRNA-мен байланысу қабілеті жоғары, мыңнан көп сайттары бар, miR-3960 табылған. 565 байланысу сайттар 5'UTR және 515 CDS-те орналасқан. Полиаланин мен полипролинді кодтайтын, басталу нүктелері 1-3 нуклеотидтен кейін орналасқан нуклеотидтік тізбектер CDS-та анықталған. miR-8072-ның 80 астам байланысу сайттары 5'UTR мен CDS анықталған, олар жоғары гомологиялық нуклеотидтік тізбектерден тұрады. miR-3620ның байланысу сайттары негізінен 5'UTR мен CDS, және көп гендердің mRNA-да кейбір байланысу сайттардың басталу нүктелері 5 нуклеотидтен кейін орналасқан. Зерттелген miRNA көп нысана гендері транскрипциялық факторларды кодтайды. miR биологиялық ролі қарастырылған.

Түйін сөздер: miRNA, mRNA, нуклеотидтер, байланысу сайттар, нысана гендер.

R.Y. Niyazova, A.T. Ivashchenko, O.A. Berillo, A.Y. Pyrkova, S.A. Atambayeva Features of miR-3960, miR-3620-5p and miR-8072-5p binding sites in mRNAs of human genes

We searched the binding sites of 2037 miRNAs in mRNAs of 12175 human genes. It was identified miR-3960, which has more than a thousands of binding sites with high affinity to the mRNAs of 333 genes. 565 binding sites are located in the 5'UTRs and 515 in CDSs. Nucleotide sequences were identified in the CDS with their starting points located through 1-3 nucleotides, and these oligonucleotides encode polyalanine or polyproline. miR-8072 has 80 binding sites in the 5'UTRs and CDSs, which consist of a highly homologous nucleotide sequences. Binding sites for miR-3620 are primarily located in the 5'UTRs and CDSs of many genes with their starting points of binding sites are located through 5 nucleotides. Most of the studied target genes encode transcription factors. We discuss the biological role of miRNAs.

Keywords: miRNA, mRNA, nucleotides, binding sites, target genes.

С каждым годом число публикаций посвященных изучению свойств miRNA увеличивается [1]. Полученные данные убедительно свидетельствуют об участии miRNA во всех ключевых процессах, протекающих в организме эукариот. Данные о сравнительной экспрессии в клетках генов mRNA, rRNA, tRNA, snRNA, scaRNA, геномные повторы и т.д. показывают, что транскрипты miRNA составляют более 50% от всего числа перечисленных видов RNA [2]. Такое доминирование экспрессии miRNA пока не находит объяснения в рамках существующих предположений о роли этих молекул. Поэтому, установление ключевых свойств miRNA и их значения при взаимодействии с mRNA будет способствовать пониманию биологической роли пост-транскрипционной регуляции экспрессии генов посредством miRNA.

Считается, что сайты связывания miRNA с mRNA находятся исключительно в 3'UTR [3]. Однако установлено, что сайты связывания некоторых miRNA находятся в 5'UTR и CDS [4, 5]. miRNA регулируют экспрессию генов, участвующих в онкогенезе [6-9]. Изменения концентрации miRNA наблюдается при развитии рака легкого [6], молочной железы [7], органов желудочно-кишечного тракта [8] и др. Многие miRNA проявили себя как онкогены или онкосупрессоры [9]. При этих

заболеваниях выявлены изменения концентрации miRNA, но их гены-мишени остаются недостаточно изученными. Выбранные нами гены участвуют в развитии различных патологий и число этих генов в последнее время постоянно увеличивается. Поэтому необходимо выявить особенности связывания miR-3960, miR-3620 и miR-8072 с mRNA генов, участвующих в развитии различных заболеваний человека.

Материалы и методы

mRNA последовательности генов человека взяты из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) при использовании скрипта Lextractor002 (<http://sites.google.com/site/malaheenee/software>), написанного в нашей лаборатории. Нуклеотидные последовательности miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 и miR-5585 взяты из базы данных miRBase (<http://miRbase.org>). Поиск генов-мишеней для miRNA проводили с помощью программы miRTarget, написанной в нашей лаборатории. Эта программа определяет: начало сайтов связывания miRNA с mRNA; расположение сайтов в 5'UTR, в CDS и в 3'UTR mRNA; свободную энергию гибридизации (ΔG , kJ/mole) и схемы взаимодействия нуклеотидов miRNA с mRNA. Рассчитано отношение $\Delta G/\Delta G_m$ (%), где ΔG_m равно свободной энергии связывания miRNA с полностью комплементарной нуклеотидной последовательностью. Сайты связывания miRNA с mRNA отобраны с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ равным более 90%. Позиция сайтов связывания указана от первого нуклеотида mRNA. Учитываются связи не только между аденином (A) и урацилом (U), гуанином (G) и цитозином (C), G-U, но и взаимодействия между A и C посредством одной водородной связи

Результаты и их обсуждение

Характеристика miR-3960, miR-3620-5p и miR-8072-5p. В работе рассчитывали степень связывания 2037 hsa-miRNA с mRNA 12175 генов человека. MiR-3960, miR-3620-5p и miR-8072-5p имели упорядоченно расположенные сайты связывания преимущественно в 5'UTR и CDS. miR-3960, miR-3620-5p и miR-8072-5p имеют длину 20, 22 и 20 н. и GC-содержание, равное 95,5%, 81,6% и 80,0%, соответственно. Максимальная свободная энергия связывания их с mRNA равна -125,3 kJ/mole, -131,6 kJ/mole и -118,8 kJ/mole, соответственно. Эти характеристики имеют важное значение для выбора их в качестве регуляторов экспрессии генов путем связывания их с mRNA. При длине 20 н., полное комплементарное взаимодействие miRNA с mRNA достигается вероятнее, чем при длине 22 н. В тоже время, величина свободной энергии их взаимодействия выше или сравнима с таковой для miRNA большей длины, но с более низким GC-содержанием. Например, изученные нами уникальные umiRNA miR-5095 и miR-5096 имеют длину 21 н., GC-содержание равное 61,9% и 52,4%. Свободная энергия их взаимодействия с mRNA равна -116,8 kJ/mole и -112,5 kJ/mole, соответственно. Уникальные umiRNA miR-619-5p и miR-5585-3p имеют длину 22 н., GC-содержание 51,9% и 50,0% и свободная энергия их взаимодействия с mRNA равна -121,8 kJ/mole и -116,8 kJ/mole, соответственно. Известно, что GC-содержание, в среднем, в 5'UTR и CDS выше, чем в 3'UTR [10]. Поддерживать постоянным нуклеотидный состав сайта связывания с высоким GC-содержанием в 3'UTR сложнее, поскольку при образовании 2D- и 3D-структур mRNA необходимо иметь комплементарный участок такой же длины для образования устойчивой структуры mRNA. Высокое GC-содержание сайта связывания miRNA способствует его экспонированию на поверхности 3D-структуры mRNA за счет более гидрофильных нуклеотидов G и C по сравнению с A и T, соответственно. То есть, вероятность связывания 5'UTR и CDS участков mRNA с miRNA, имеющими высокое GC-содержание будет выше.

Другим способом повышения вероятности связывания miRNA с mRNA является увеличение числа сайтов связывания в mRNA. Этот способ отчетливо реализован природой на примере miR-3960 и miR-3620-5p, которые имеют множественные сайты связывания в 5'UTR и CDS. В этих участках трудно поддерживать несколько самостоятельных сайтов связывания miRNA и поэтому лучше увеличить вероятность связывания miRNA путем объединения нескольких сайтов связывания. В составе miR-3960 и miR-8072-5p есть по 16 пуринов, в miR-3620-5p – 13 пуринов, которые в комплексе с mRNA обуславливают большую величину энергии стэкинг-взаимодействий в miRNA по сравнению с таковой сайта связывания в mRNA. Нами обнаружено, что miR-3960 имеет 1100 сайтов связывания в mRNA 375 генов, среди которых 20 расположены в 3'UTR, 565 – в 5'UTR и 515 – в CDS. В mRNA гена *AFF2* обнаружены 21 сайт связывания, *RHOT1* – 20, *KIF3B* – 17, *NDRG3*, *DAZAP1*, *BCL2L11* – 16 сайтов связывания в 5'UTRs. В mRNA гена *BTBD2* – 14 сайтов связывания в

5. Hausser J., Syed A.P., Bilen B., Zavolan M. Analysis of CDS-located miRNA target sites suggests that they can effectively inhibit translation // *Genome Res.* - 2013. - Vol. 23. - No. 4. - P. 604-615.
6. Wang H., Zhu Y. *et al.* miRNA-29c suppresses lung cancer cell adhesion to extracellular matrix and metastasis by targeting integrin $\beta 1$ and matrix metalloproteinase2. - No. MMP2 // *PLoS One.* - 2013. - Vol. 8. - No. 8 :e70192.
7. Zhong S, Li W, Chen Z, Xu J, Zhao J. miR-222 and miR-29a contribute to the drug-resistance of breast cancer cells // *Gene.* - 2013. - Vol. 531 - No. 1. - P. 8-14.
8. Shi Y., Wang C.Z. *et al.* Screening of differentially expressed microRNAs in borderline and malignant gastrointestinal stromal tumors // *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* - 2013. - Vol. 42. - No. 1. - P. 20-25.
9. Finoux A.L., Chartrand P. Oncogenic and tumour suppressor microRNAs // *Med Sci.* - No. Paris. - 2008. - Vol. 24. - No. 12. - P. 1049-1054.
10. Leontis N.B., Stombaugh J., Westhof E. The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices // *Nucleic Acids Res.* - 2002. - Vol. 30. - P. 3497-3531.
11. Hu R., Liu W. *et al.* A Runx2/miR-3960/miR-2861 regulatory feedback loop during mouse osteoblast differentiation // *J. Biol. Chem.* - 2011. - Vol. 286. - No. 14. - P. 12328-12339.
12. Chatterjee S., Sivakamasundari Vol. *et al.* Making no bones about it: Transcription factors in vertebrate skeletogenesis and disease. *Trends Dev. Biol.* - 2012. - Vol. 6. - P. 45-52.
13. Lian J.B., Stein G.S. *et al.* MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat. Rev. Endocrinol.* - 2012. - Vol. 8. - No. 4. - P. 212-227.

УДК 577.21

И.В. Пинский*, А.И. Сагайдак, С.Б. Оразова, А.Ю. Пыркова, А.Т. Иващенко
Институт проблем биологии и биотехнологии, КазНУ им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан
*e-mail: ilya.pinskyi@mail.ru

Связывание microRNA с mRNA генов рост-регулирующих транскрипционных факторов некоторых сельскохозяйственных растений

Установлено связывание семейства miR396 с mRNA рост-регулирующих транскрипционных факторов (GRF) *Glycine max*, *Medicago truncatula*, *Solanum lycopersicum*, *Sorghum bicolor* и *Vitis vinifera*. Определены сайты связывания miR396 с mRNA, вычислена свободная энергия их взаимодействия, составлены схемы связывания нуклеотидов miR396 с mRNA. В mRNA генов *GRF* всех изученных растений сайты связывания находятся в белок-кодирующей части и кодируют олигопептиды RSRKPVE или RSRKHVE. Полученные данные свидетельствуют, что экспрессия генов *GRF* в разных растениях регулируется с помощью семейства miR396.

Ключевые слова: miRNA, mRNA, транскрипционный фактор, растения.

И.В. Пинский, А.И. Сагайдак, С.Б. Оразова, А.Ю. Пыркова, А.Т. Иващенко

Кейбір ауылшаруашылық өсімдіктердің өсуін реттейтін транскрипциялық факторлар гендердің mRNA мен microRNA байланысуы

Glycine max, *Medicago truncatula*, *Solanum lycopersicum*, *Sorghum bicolor* және *Vitis vinifera* өсімдіктердің өсуін реттейтін транскрипциялық факторлар гендердің mRNA мен miR396 тұқымдасымен байланысуы анықталды. miR396 және mRNA-мен байланысу сайттары анықталды, олардың эрекеттесуінің бос қуаты есептелінді, нуклеотидтердің байланысу сызбанұсқасы құрастырылған. Зерттелген өсімдіктердің *GRF* гендердің mRNA-ында байланысу сайттары белок-кодтайтын бөлігінде орналасқан және RSRKPVE немесе RSRKHVE олигопептидтерді кодтайды. Қорыта айтқанда, әр түрлі өсімдіктерде *GRF* гендердің экспрессиясы miR396 тұқымдасы арқылы реттелінеді.

Түйін сөздер: miRNA, mRNA, транскрипциялық фактор, өсімдіктер

I.V. Pinskyi, A.I. Sagaydak, S.B. Orazova, A.Ju. Pyrkova, A.T. Ivashchenko

Связывание microRNA с mRNA генов рост-регулирующих транскрипционных факторов некоторых сельскохозяйственных растений

It was determined binding sites of the family miR396 with mRNA of growth-regulating transcription factor (GRF) of *Glycine max*, *Medicago truncatula*, *Solanum lycopersicum*, *Sorghum bicolor* and *Vitis vinifera*. Defined binding sites miR396 with mRNA, calculated the free energy of their interaction, schemes of miR396 with mRNA nucleotide binding. Binding sites are found in protein-coding parts and encode RSRKPVE or RSRKHVE oligopeptides in mRNA of all the plants *GRF* genes. These data suggest that the expression of genes *GRF* in different plants is controlled by the family miR396.

Keywords: miRNA, mRNA, a transcription factor, plants.