

УДК 577.218

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ miR-5p И miR-3p С мРНК ОРТОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ

© 2019 г. О. Ю. Юрикова^а, Д. Е. Айсина^а, Р. Е. Ниязова^а, Ш. А. Агамбаева^а,
S. Labeit^б, А. Т. Ивашенко^{а, *}^аНаучно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии, аль-Фараби
Казахский национальный университет, Алматы, 050040 Казахстан^бInstitute for Anaesthesiology and Intensive Operative Care Medical Faculty Mannheim, Mannheim, 68135 Germany

*e-mail: a_ivashchenko@mail.ru

Поступила в редакцию 07.11.2018 г.

После доработки 21.02.2019 г.

Принята к публикации 21.02.2019 г.

МиРНК (miR) регулируют экспрессию многих генов и участвуют в развитии ряда заболеваний. Изучены miR, частично или полностью комплементарные 5'- и 3'-нетранслируемым последовательностям (UTR) и кодирующим последовательностям мРНК генов-мишеней. Программа MirTarget, используемая в работе, позволяет обнаруживать сайты связывания (СС) miR в полной нуклеотидной последовательности мРНК и определять характеристики взаимодействия miR с мРНК. В кодирующих последовательностях мРНК гена *RTL1* человека и животных выявлены пять пар СС, полностью комплементарных miR-127-5p и miR-127-3p, miR-136-5p и miR-136-3p, miR-431-5p и miR-431-3p, miR-432-5p и miR-432-3p, miR-433-5p и miR-433-3p. СС, полностью комплементарные miR-6720-5p и miR-6720-3p, обнаружены в кодирующих последовательностях гена *FOXF2*; miR-3187-5p, miR-3187-3p – в кодирующей области гена *PLPPR3*; miR-4665-5p, miR-4665-3p – в 5'-UTR гена *KIAA2026*; miR-135a-5p, miR-135a-3p – в 3'-UTR гена *GLYCTK*; miR-7106-5p, miR-7106-3p – в 3'-UTR гена *CCDC42B*. СС miR-5p и miR-3p, ассоциированных с геном *RTL1*, найдены в мРНК 32 генов-мишеней человека. СС miR-5p и miR-3p, ассоциированных с генами *FOXF2*, *PLPPR3*, *KIAA2026*, *GLYCTK* и *CCDC42B*, найдены в мРНК 27 генов-мишеней, вовлеченных в развитие ряда заболеваний. Нуклеотидные последовательности miR-5p, miR-3p и СС сохраняются в течение десятков миллионов лет дивергенции видов животных. Определены характеристики связывания miR-3120-3p и miR-3120-5p, miR-196b-3p и miR-196b-5p, miR-125a-3p и miR-125a-5p, let-7e-3p и let-7e-5p, miR-99b-3p с полностью комплементарными им СС в некодирующих генах *DMN3OS*, *HOXA10-AS*, *SPACA6P-AS*.

Ключевые слова: miR, мРНК, сайт связывания, биоинформатика, ортологичный ген**DOI:** 10.1134/S0026898419040189

ВВЕДЕНИЕ

МиРНК (miR), подавляющие экспрессию генов на посттрансляционном уровне [1], состоят из 17–27 н., имеют длину от 5 до 9 нм и наноразмерные пропорции. Сайты связывания (СС) miR в 5'-UTR и кодирующих последовательностях (CDS) мРНК еще недостаточно изучены. В связи с этим разработана программа MirTarget, позволяющая поводить поиск СС во всей нуклеотидной последовательности мРНК. Показано, что мРНК содержат СС miR в 5'-UTR, CDS и 3'-UTR [2–5].

В качестве основных объектов исследования был выбран ген *RTL1* и несколько других генов, которые проявляют уникальные свойства при взаимодействии с miR. Ген *RTL1* участвует во многих важных биологических процессах. Делеция гена *Rtl1* у мыши приводит к развитию таких нарушений, как ожирение, блефарофимоз, дис-

плазия скелета, изменение липидного обмена и гипоплазия плаценты. Примечательно, что ген *Rtl1*, регулирующий развитие плаценты, кодирует по меньшей мере семь miR, а уровень его экспрессии контролируется механизмом РНК-интерференции [6–8].

Нуклеотидные последовательности некоторых miR полностью комплементарны своим мРНК-мишеням [9, 10]. Такие miR и их мишени представляют особую важность для изучения эволюции взаимодействия miR с мРНК. Обнаружено, что семь miR комплементарно связываются с мРНК гена *RTL1* [11]. Эти miR могут подавлять экспрессию гена *RTL1*, действуя, возможно, как siРНК. Кроме того, ген *RTL1*, miR-136, miR-127 и другие miR экспрессируются в плаценте [12].

Необходимо выяснить особенности взаимодействий между этими miR и мРНК гена *RTL1* и установить, существуют ли другие гены-мишени

miR, ассоциированных с геном *RTL1*. Гены *RTL1* и miR-127-5p, miR-127-3p, miR-135a-5p, miR-135a-3p, miR-136-5p, miR-136-3p, miR-431-5p, miR-431-3p, miR-432-5p, miR-432-3p, miR-433-5p и miR-433-3p кодируются в одном локусе антипараллельных цепей ДНК, и поэтому мы называем их miR, ассоциированными с геном *RTL1* [11, 12]. Необходимо изучить характеристики взаимодействия пар miR-5p и miR-3p (miR-5p/miR-3p) с 5'-UTR, CDS и 3'-UTR мРНК других генов. Важно определить, представлены ли в геноме человека другие гены, кодирующие miR, способные ингибировать экспрессию ассоциированных генов. Присутствие таких СС в мРНК ортологичных генов служит доказательством регуляции экспрессии генов miR на ранних этапах эволюции животных. Наличие такой регуляции может служить основанием для использования модельных животных при изучении экспрессии генов с помощью miR.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Нуклеотидные последовательности мРНК генов человека и ортологичных генов получены из базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) [13]. Значения RPKM (Reads Per Kilobase Million) для *FOXF2*, *PLPPR3*, *KIAA2026*, *GLYCTK* и *CCDC42B* взяты из Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>). Список видов животных приведен в табл. 1S (см. приложение на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2019/4/sup-r_Yurikova_rus.pdf). Нуклеотидные последовательности miR человека и животных получены из базы данных miRBase (<http://mirbase.org>). Последовательности miR-127-5p, miR-127-3p, miR-136-5p, miR-136-3p, miR-431-5p, miR-431-3p, miR-432-5p, miR-432-3p, miR-433-5p и miR-433-3p, идентичные у человека и животных, приведены в табл. 2S приложения. Нуклеотидные последовательности miR-135a-3p и miR-135a-5p идентичны у *Homo sapiens* и животных (табл. 3S приложения). У некоторых видов животных miR еще не выявлены, поэтому мы использовали miR человека.

СС miR в 5'-UTR, CDS и 3'-UTR мРНК нескольких генов предсказаны с помощью программы MirTarget [14]. Эта программа определяет следующие характеристики связывания: а) начало связывания miR с мРНК; б) локализацию СС miR в 5'-UTR, CDS и 3'-UTR мРНК; в) свободную энергию взаимодействия (ΔG , кДж/моль), оцениваемую для всей нуклеотидной последовательности miR; г) схемы взаимодействия между нуклеотидами miR и мРНК. Отношение $\Delta G/\Delta G_m$ (%) определяли для каждого сайта, где ΔG_m — свободная энергия связывания miR с полностью комплементарной ей нуклеотидной последовательностью. Отбирали только СС miR с отношениями $\Delta G/\Delta G_m$ 90% или более. Программа определяет положение СС в мРНК, начиная с первого

нуклеотида 5'-UTR мРНК. Программа MirTarget учитывает водородные связи между аденином (А) и урацилом (У), гуанином (Г) и цитозином (С), Г и У, А и С. Расстояние между А и С равно 1.04 нм, между Г и С, А и У — 1.03 нм, а между Г и У — 1.02 нм [15, 16]. Следовательно, из всех возможных пар нуклеотидов только G-C, A-U, G-U и A-C способствуют образованию двухцепочечной структуры РНК без нарушения стэкинг-взаимодействий. Число водородных связей при взаимодействии G-C, A-U, G-U и A-C равно 3, 2, 1 и 1 соответственно. Программа MirTarget не работает непосредственно с базами данных miRBase или NCBI. Поиск генов-мишеней известных miR, представленных в miRBase, в выборке из приведенных в специальный формат 17508 генов, взятых из NCBI, доступен по запросу на mirtarget8@gmail.com.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С помощью программы MirTarget определены СС 2565 miR с мРНК 17508 генов человека. Выявлено несколько десятков генов, в 5'-UTR, CDS или 3'-UTR мРНК которых содержались СС, комплементарные miR. Из 17508 белоккодирующих генов, только шесть служили мишенями для miR-5p/miR-3p. Мишенями этих miR были также три некодирующих гена.

Сайты связывания miR-5p и miR-3p в мРНК RTL1

мРНК генов *RTL1*, *FOXF2*, *PLPPR3*, *KIAA2026*, *GLYCTK* и *CCDC42B* человека и ассоциированных miR-5p/miR-3p транскрибируются с противоположных комплементарных цепей ДНК [12, 17]. Их транскрипция и дальнейший процессинг пре-мРНК и при-miR происходят независимо друг от друга. Следовательно, концентрации мРНК, miR-5p/miR-3p могут значительно различаться, что отразится на вероятности их взаимодействия.

Мы установили, что CDS мРНК гена *RTL1* содержит пять пар СС miR-5p/miR-3p. Представлены характеристики полностью комплементарного взаимодействия этих miR и мРНК генов *RTL1*, *CCDC42B*, *FOXF2*, *GLYCTK*, *KIAA2026*, *PLPPR3* (табл. 1). Семь из этих 10 miR в мРНК *RTL1* были идентифицированы ранее [11, 18]. Ген *RTL1* — единственный из 17508 генов человека, содержит пять пар СС, полностью комплементарных miR-5p/miR-3p в CDS.

Один из способов определения статистической значимости СС miR в мРНК — подтверждение присутствия таких сайтов в мРНК ортологичных генов. Мы предположили, что ортологичные miR гомологичны miR человека, и использовали hsa-miR для обнаружения СС в мРНК ортологичных генов, у которых не найдены соответствующие miR. Многие miR высококонсервативны в

ходе эволюции. СС miR-127-3p и miR-127-5p обнаружены в мРНК ортологичных генов 42 видов животных (табл. 4S (см. приложение на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2019/4/supp_Yurikova_rus.pdf). СС miR-127-3p и miR-127-5p кодируют, соответственно, олигопептиды QPSSDGS и SEPSELQ во всех белках RTL1 этих видов (табл. 4S). Нуклеотидные последовательности СС miR-127-3p и miR-127-5p комплементарны этим miR, значение $\Delta G/\Delta G_m$ равно 100%, а значения ΔG равны -121 и -119 кДж/моль соответственно (табл. 1). Олигопептиды QPSSDGS и SEPSELQ, кодируемые СС miR-127-3p и miR-127-5p, и аминокислотные остатки между ними идентичны в белках всех видов. Вариабельность аминокислотных остатков вне олигопептидов указывает, что за время дивергенции видов *Ailuropoda melanoleuca* и *H. sapiens* консервативные олигопептиды QPSSDGS и SEPSELQ остаются функционально более важными, чем фланкирующие олигопептиды.

Нуклеотидные последовательности miR-136-3p и miR-136-5p комплементарны мРНК гена *RTL1* 39 видов, $\Delta G/\Delta G_m$ равна 100%, а значения ΔG составляют -113 и -115 кДж/моль соответственно (табл. 1). Олигопептиды DSFETMM и PSSKQME, кодируемые СС miR-136-3p и miR-136-5p, идентичны в белках RTL1 всех видов (табл. 4S). Диаграмма Logo показывает вариабельность аминокислотных остатков белка RTL1, расположенных между DSFETMM и PSSKQME, и в областях, фланкирующих эти олигопептиды (табл. 4S).

miR-431-3p и miR-431-5p имеют комплементарные СС в мРНК *RTL1*, т.е. $\Delta G/\Delta G_m$ равна 100%, а значения ΔG равны -121 и -115 кДж/моль соответственно (табл. 1). СС miR-431-3p и miR-431-5p кодируют консервативные олигопептиды EALQDDL и HDGLQD во всех белках RTL1 34 видов животных (табл. 4S).

Нуклеотидные последовательности СС miR-432-3p и miR-432-5p комплементарны мРНК 38 ви-

Таблица 1. Характеристики взаимодействий miR-5p/miR-3p с мРНК генов *RTL1*, *CCDC42B*, *FOXF2*, *GLYCTK*, *KIAA2026*, *PLPPR3* человека

Ген	miR	Начало сайта, н.	ΔG , кДж/моль	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Длина, н.
<i>RTL1</i>	miR-127-3p	1791	-121	100	22
То же	miR-127-5p	1825	-119	100	22
»	miR-136-3p	76	-113	100	22
»	miR-136-5p	109	-115	100	23
»	miR-431-3p	3757	-121	100	22
»	miR-431-5p	3801	-115	100	21
»	miR-432-3p	283	-115	100	21
»	miR-432-5p	329	-123	100	23
»	miR-433-3p	2877	-119	100	22
»	miR-433-5p	2929	-115	100	22
»	miR-1296-5p	3992	-113	91	22
»	miR-762	3405	-127	94	22
<i>CCDC42B</i>	miR-7106-3p	1350*	-127	100	23
<i>CCDC42B</i>	miR-7106-5p	1390*	-113	100	20
<i>FOXF2</i>	miR-6720-3p	491	-134	100	22
<i>FOXF2</i>	miR-6720-5p	526	-123	100	23
<i>GLYCTK</i>	miR-135a-3p	2773*	-121	100	22
<i>GLYCTK</i>	miR-135a-5p	2811*	-113	100	23
<i>KIAA2026</i>	miR-4665-3p	107**	-159	100	26
<i>KIAA2026</i>	miR-4665-5p	146**	-136	100	23
<i>PLPPR3</i>	miR-3187-3p	1229	-117	100	20
<i>PLPPR3</i>	miR-3187-5p	1263	-132	100	23
<i>PPP2CA</i>	miR-3661	462	-123	100	22
То же	miR-3960	125**	-113	90	20
»	miR-4459	126**	-115	90	22

Примечания. *3'-UTR, **5'-UTR, без * – CDS.

дов животных (табл. 4S). Таким образом, $\Delta G/\Delta G_m$ равна 100%, а значения ΔG составляют -115 и -123 кДж/моль соответственно (табл. 1). Соответствующие СС кодируют консервативные олигопептиды DMEEPSS и PPNDLLQ во всех белках RTL1 этих видов (табл. 4S). Между олигопептидами DMEEPSS и PPNDLLQ белка RTL1 и в областях, фланкирующих эти олигопептиды, расположены вариабельные аминокислотные остатки.

Нуклеотидные последовательности СС miR-433-3p и miR-433-5p комплементарны мРНК 40 видов животных (табл. 4S). $\Delta G/\Delta G_m$ равна 100%, а значения ΔG составляют -119 и -115 кДж/моль (табл. 1). Эти сайты кодируют олигопептиды HTEEPIMI и NNDRLTV (табл. 4S).

Нуклеотидные последовательности между СС пяти пар miR-5p/miR-3p кодируют олигопептиды различных белков RTL1 у животных разных видов. Все СС пяти пар miR в гене *RTL1* распределены приблизительно равномерно по длине мРНК. Диаграмма Logo показывает консервативность олигопептидов, кодируемых СС пар miR-3p и miR-5p. Аминокислоты вне этих олигопептидов и между ними характеризуются вариабельностью (табл. 4S). Следовательно, СС miR-5p/miR-3p в мРНК *RTL1* эволюционно древние и сохраняются в течение десятков миллионов лет, что указывает на функциональную важность как их нуклеотидных последовательностей, так и кодируемых ими олигопептидов.

В дополнение к 10 miR, ассоциированным с геном *RTL1*, miR-1296-5p и miR-762 могут связываться с мРНК *RTL1*. СС miR-1296-5p и miR-762 расположены в CDS и кодируют олигопептиды EQAARAL и ARPQQR в белке *RTL1*. СС этих miR обнаружены в мРНК генов-ортологов *RTL1* только у гоминидов и обезьян. Свободная энергия взаимодействия miR-762 с мРНК гена *RTL1* составляет -127 кДж/моль и превышает свободную энергию взаимодействия каждой из 10 miR, ассоциированных с геном *RTL1* (табл. 1). При сопоставимых концентрациях каждая из 12 miR может подавлять синтез белка *RTL1*, поскольку их СС не перекрываются и распределены по всей длине мРНК. Поскольку 10 miR могут экспрессироваться с антисмысловой цепи ДНК *RTL1* независимо от транскрипции и процессинга мРНК *RTL1*, вполне вероятным представляется предположение о равной возможности связывания 12 miR с мРНК. Экспериментально показано, что метилирование ДНК отрицательно коррелирует с экспрессией гена *RTL1*, но положительно — с экспрессией miR-136 в плаценте человека [12]. Т.е. изменения в экспрессии гена и miR-136 соответствуют предполагаемой взаимосвязи miR с геном-мишенью. В качестве аналогичного примера мы проверили экспериментально установленную связь между miR-3661 и геном-мишенью *PPP2CA*

[17]. Программа MirTarget подтвердила полную комплементарность их взаимодействия в CDS и выявила более двух альтернативных miR, которые могут связываться в 5'-UTR мРНК гена *PPP2CA*. Количественные характеристики взаимодействия мРНК гена с miR-3661, miR-3960 и miR-4459 приведены в табл. 1 и указывают на их сходство.

Необходимо было установить, существуют ли другие гены-мишени miR, ассоциированных с геном *RTL1*. Наши результаты показали, что miR, ассоциированные с *RTL1*, имеют более 30 генов-мишеней (табл. 2), которые участвуют в развитии онкологических, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и других заболеваний [19–25]. Следовательно, miR-5p/miR-3p не только подавляют экспрессию ассоциированного гена *RTL1*, но и могут регулировать трансляцию мРНК генов, вовлеченных в развитие различных заболеваний, что указывает на высокую биологическую значимость miR, ассоциированных с *RTL1*.

Свободная энергия взаимодействия miR-127-5p и miR-127-3p варьирует в диапазоне от -108 до -113 кДж/моль (табл. 2), что составляет 91–93% свободной энергии взаимодействия этих miR с мРНК гена *RTL1* (табл. 1). Эти результаты позволяют предположить, что 10 miR, ассоциированных с геном *RTL1*, участвуют в важных процессах в норме и при патологии. miR-3p и miR-5p могут иметь различное количество генов-мишеней. Например, miR-432-3p и miR-432-5p имеют 13 и четыре гена-мишени соответственно (табл. 2). Однако важно, чтобы обе miR обладали одинаковой консервативностью нуклеотидных последовательностей. Ассоциированные с геном *RTL1* miR связываются с CDS мРНК, а их СС кодируют олигопептиды, приведенные в Дополнительном файле 4. Значения свободной энергии взаимодействия пяти пар miR-5p/miR-3p с мРНК гена *RTL1* примерно равны (табл. 1). Свободная энергия взаимодействия этих пар miR-5p/miR-3p с мРНК других генов (табл. 2) варьирует от -102 до -117 кДж/моль.

СС в мРНК ортологичных генов мы определяли с использованием hsa-miR, предполагая существование гомологии между miR ортологичных генов и miR человека (табл. 2S). Как правило, многие miR эволюционно высококонсервативны (табл. 2S и 3S) [26]. Следовательно, все млекопитающие, включая лабораторных животных, таких как крысы, мыши и собаки, могут служить модельными объектами для изучения взаимодействия miR с мРНК *RTL1* человека.

Взаимодействие miR-6720-5p и miR-6720-3p с мРНК *FOXF2*

В результате анализа 17508 генов человека мы выявили (помимо *RTL1*) пять мРНК, которые со-

Таблица 2. Характеристики взаимодействия miR с мРНК их генов-мишеней

miR	Ген-мишень	Начало сайта, н.	ΔG , кДж/моль	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Заболевание или функция гена	PMID
miR-127-3p	<i>BDP1</i>	673	-113	93	Транскрипция	11040218
miR-127-3p	<i>EIF3B</i>	438	-110	91	Трансляция	8995410
miR-127-5p	<i>CPNE2</i>	1915	-108	91	Кальций-опосредованные процессы	9430674
miR-127-5p	<i>RNF181</i>	144**	-110	93	Опухолевый супрессор	21391225
miR-127-5p	<i>URM1</i>	3950*	-108	91	Цитокинез	19017811
miR-136-3p	<i>TAF4</i>	2475	-102	91	Нейродегенеративные заболевания	10973244
miR-136-3p	<i>TTN</i>	71469	-102	91	Кардиомиопатия	11846417
miR-136-5p	<i>CAP1</i>	1454	-102	89	Клеточная пролиферация	27432289
miR-136-5p	<i>CLDN15</i>	37**	-104	91	Опухолевая инвазия	19420749
miR-136-5p	<i>ENAH</i>	6968*	-102	89	Опухолевая инвазия	26112005
miR-431-3p	<i>AKAP17A</i>	696	-110	91	Протеинкиназа	16982639
miR-431-3p	<i>BCL11A</i>	1433	-110	91	Лейкоз	26707798
miR-431-3p	<i>COG6</i>	856	-117	96	Нарушения гликозилирования	20605848
miR-431-5p	<i>SPTB</i>	1546	-104	91	Анемия	9005995
miR-432-3p	<i>CCDC135</i>	2050	-104	91	Пептидаза	22983010
То же	<i>CDK5RAP2</i>	5810	-106	93	Болезнь Альцгеймера	21297427
»	<i>CPNE2</i>	943	-108	94	Кальций-опосредованные процессы	9430674
»	<i>CYP2A6</i>	450	-106	93	Онкогенез	16176798
»	<i>FHDC1</i>	2139	-104	91	Формирование комплекса Гольджи	26564798
»	<i>FOXB1</i>	108**	-106	93	Транскрипционный фактор	28725186
»	<i>IL2RB</i>	1013	-106	93	Рак молочной железы	14680494
»	<i>KCTD19</i>	1849	-104	91	Калиевый канал	26350515
»	<i>PPP1R26</i>	942	-106	93	Онкогенез	26442585
»	<i>PRKCSH</i>	1491	-104	91	Поликистоз печени	11047756
»	<i>RBP3</i>	252	-104	91	Ретинол-связывающий белок	2542268
»	<i>SH2D5</i>	2222*	-104	91	Синаптическая пластичность	28103696
»	<i>SLC22A12</i>	2172	-104	91	Регуляция уровня солей мочевиной кислоты в крови	12024214
miR-432-5p	<i>CD177</i>	1058	-110	90	Активация нейтрофилов	17580308
То же	<i>EPB41L1</i>	339	-110	90	Опухолевый супрессор	26575790
»	<i>HTN1</i>	4801	-110	90	Кардиопротектор	20036673
»	<i>PRSS57</i>	373	-113	91	Нейтрофильный ответ	26172376
»	<i>RBP7</i>	329	-110	96	Метаболизм витамина А	12177003

Примечание: *3'-UTR, **5'-UTR, без * – CDS.

держат CC пар miR-3p и miR-5p, полученных из одной пре-miR. CC пар miR-3p и miR-5p обнаружены в 5'-UTR, 3'-UTR и CDS мРНК генов *FOXF2*, *PLPPR3*, *KIAA2026*, *GLYCTK* и *CCDC42B*.

CC miR-6720-3p и miR-6720-5p найдены в CDS мРНК *FOXF2*. Свободная энергия взаимодей-

ствия miR-6720-5p и miR-6720-3p с мРНК *FOXF2* человека составляет -134 и -123 кДж/моль соответственно (табл. 1). CC miR-6720-3p и miR-6720-5p кодируют три пары олигопептидов, консервативных в каждой из трех групп мРНК 34 видов животных (табл. 5S). Данные, представленные

ные в дополнительном файле 5, показывают, что аминокислотные остатки, входящие в состав олигопептидов IYQFLQAR и RGAYQGWK белка FOXF2 консервативны у 15 видов животных. В другой группе животных CC miR-6720-3p и miR-6720-5p кодируют олигопептиды IYQFLQSR и RGSYQGWK (табл. 5S, B). У животных третьей группы CC miR-6720-3p и miR-6720-5p кодируют олигопептиды IYQSLQAR и RGAYQGWK (табл. 5S, C). Таким образом, взаимодействие между miR и мРНК 34 генов возникло более 10 миллионов лет назад и сохранялось при дивергенции исследуемых видов животных. Нуклеотидные последовательности, локализованные между CC miR-6720-3p и miR-6720-5p, кодируют как консервативный тетрапептид FPF, так и прилегающий олигопептид NSVRHNLNLSNECF.

Определены характеристики CC miR-6720-5p и miR-6720-3p в семи мРНК генов-мишеней, связанных с канцерогенезом молочной железы, толстой кишки, поджелудочной железы и щитовидной железы. CC этих miR расположены только в CDS, а свободная энергия связывания составляет от -110 до -121 кДж/моль (табл. 3).

Взаимодействие miR-3187-5p и miR-3187-3p с мРНК PLPPR3

CC miR-3187-5p и miR-3187-3p обнаружены в CDS мРНК PLPPR3. Энергия взаимодействия miR-3187-5p длиной 23 н. и miR-3187-3p длиной 20 н. с мРНК составляет -132 и -117 кДж/моль соответственно. Олигопептиды, кодируемые CC miR-3187-5p и miR-3187-3p, консервативны в мРНК PLPPR3 37 видов животных (табл. 6S). Ор-

Таблица 3. Характеристики взаимодействия miR-5p/miR-3p (ассоциированных с генами *CCDC42B*, *FOXF2*, *GLYCTK*, *KIAA2026*, *PLPPR3*) с мРНК генов-мишеней

miR (ассоциированный ген)	Ген-мишень	Начало сайта, н.	Участок мРНК	ΔG , кДж/моль	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Длина, н.
miR-7106-5p(<i>CCDC42B</i>)	<i>DDX20</i>	304	5'-UTR	-104	92	20
То же	<i>KIRREL</i>	314	5'-UTR	-104	92	20
»	<i>MAML1</i>	4045	3'-UTR	-106	94	20
»	<i>MAPKAPK2</i>	2892	3'-UTR	-104	92	20
»	<i>MAPT</i>	1007	CDS	-106	94	20
»	<i>SBK1</i>	2495	3'-UTR	-106	94	20
»	<i>TEAD2</i>	1460	3'-UTR	-104	92	20
miR-7106-3p(<i>CCDC42B</i>)	<i>FAM213B</i>	86	CDS	-115	90	23
miR-7106-3p(<i>CCDC42B</i>)	<i>FANCG</i>	831	CDS	-115	90	23
miR-7106-3p(<i>CCDC42B</i>)	<i>GMEB2</i>	2965	3'-UTR	-115	90	23
miR-6720-5p(<i>FOXF2</i>)	<i>CPAMD8</i>	148	CDS	-121	90	23
miR-6720-5p(<i>FOXF2</i>)	<i>FOXF1</i>	298	То же	-121	90	23
miR-6720-3p(<i>FOXF2</i>)	<i>ACTN2</i>	958	»	-110	90	22
То же	<i>B3GHT1</i>	176	»	-110	90	22
»	<i>EVPL</i>	2656	»	-113	91	22
»	<i>SLC25A29</i>	568	»	-115	93	22
»	<i>ZNF653</i>	1821	»	-110	90	22
miR-135a-5p (<i>GLYCTK</i>)	<i>FHL5</i>	2659	3'-UTR	-104	92	23
miR-135a-3p(<i>GLYCTK</i>)	<i>ILDR1</i>	1688	CDS	-110	91	22
miR-4665-5p(<i>KIAA2026</i>)	<i>EFEMP1</i>	266	5'-UTR	-123	91	23
miR-4665-5p(<i>KIAA2026</i>)	<i>ZFP36L2</i>	1610	CDS	-123	91	23
miR-3187-5p(<i>PLPPR3</i>)	<i>ITGA1</i>	57	CDS	-119	90	23
miR-3187-5p(<i>PLPPR3</i>)	<i>OGDH</i>	3408	3'-UTR	-125	95	23
miR-3187-5p (<i>PLPPR3</i>)	<i>PELO</i>	419	5'-UTR	-119	90	23
miR-3187-3p(<i>PLPPR3</i>)	<i>CNGB1</i>	1717	CDS	-106	91	20
miR-3187-3p(<i>PLPPR3</i>)	<i>DENND4B</i>	3667	CDS	-108	93	20
miR-3187-3p(<i>PLPPR3</i>)	<i>SMARCA4</i>	684	CDS	-108	93	20

тологические белки PLPPR3 содержат последовательности PRSPMAK и TFSHTLPR, кодируемые СС miR-3187-5р и miR-3187-3р. Однако аминокислоты, фланкирующие эти последовательности, были вариabельными (табл. 6S, С). Шесть СС miR-3187-5р и miR-3187-3р, ассоциированных с геном *PLPPR3*, обнаружены в генах-мишенях, участвующих в развитии рака молочной железы, желудка, яичника, колоректального рака, sporadic аденомы гипофиза (табл. 3). СС miR расположены в 5'-UTR, 3'-UTR и CDS, свободная энергия их взаимодействия с мРНК изменялась от -106 до -125 кДж/моль.

Взаимодействие miR-4665-5р и miR-4665-3р с мРНК KIAA2026

СС miR-4665-5р и miR-4665-3р обнаружены в 5'-UTR мРНК KIAA2026 (табл. 4). Энергия взаимодействия miR-4665-3р (26 н.) с мРНК гена KIAA2026 у *H. sapiens*, *Pan troglodytes* и *Pan paniscus* составляет -159 кДж/моль, а у miR-4665-5р (23 н.) -136 кДж/моль (табл. 4).

Энергия взаимодействия miR-4665-3р с мРНК гена KIAA2026 *Gorilla gorilla*, *Chlorocebus sabaues*, *Macaca fascicularis*, *M. mulatta*, *Nomascus leucogenus*, *Papio anubis* и *Rhinopithecus roxellana* составляет -155 кДж/моль благодаря взаимодействию неканонических пар U и G, A и С. miR-4665-5р. Свободные энергии взаимодействия с мРНК гена KIAA2026 *C. sabaues* и *Rattus norvegicus* составляют -132 и -127 кДж/моль, соответственно, так как

неканонические пары U-G и A-C также взаимодействуют между собой. miR-4665-5р связывается в 5'-UTR и CDS мРНК *EFEMP1* и *ZFP36L2*, ассоциированных с развитием рака молочной и поджелудочной железы. Они имеют СС с одинаковой степенью комплементарности, равной 91%, и одинаковой свободной энергией взаимодействия, равной -123 кДж/моль (табл. 3).

Взаимодействие miR-135a-5р и miR-135a-3р с мРНК GLYCTK

СС miR-135a-5р и miR-135a-3р обнаружены в 3'-UTR мРНК GLYCTK (табл. 5). Свободные энергии взаимодействия miR-135a-5р (23 н.) и miR-135a-3р (22 н.) с мРНК составляют -113 и -121 кДж/моль соответственно (табл. 5). Консервативность нуклеотидных последовательностей СС miR-135a-5р и miR-135a-3р предполагает, что взаимодействие между ними и их геном-мишенью *GLYCTK* возникло и сохранялось в ходе эволюции. Определены характеристики СС miR-135a-3р и miR-135a-5р. Свободная энергия взаимодействия miR-135a-3р, ассоциированного с геном *GLYCTK*, с CDS мРНК гена *ILDRI*, вовлеченного в развитие лимфомы, равна -110 кДж/моль (табл. 3).

Взаимодействие miR-7106-5р и miR-7106-3р с мРНК CCDC42B

СС miR-7106-5р и miR-7106-3р найдены в 3'-UTR мРНК CCDC42B (табл. 6). Свободная

Таблица 4. Схемы взаимодействий miR-4665-3р и miR-4665-5р с 5'-UTR мРНК генов, ортологичных KIAA2026

Объект, характеристики связывания	miR-4665-3р	
<i>Hsa, Ptr, Ppa</i> : -159 кДж/моль, 100%, 26 н.	мРНК	5' -GGCGGGGGCUACGCGCCGCGGCCGAG- 3'
	miR	3' -CCGCCCGCAUGCGCGCGCCGGGCUC- 5'
<i>Ggo</i> : -155 кДж/моль, 97%, 26 н.	мРНК	5' -GGUGGGGGCUACGCGCCGCGGCCGAG- 3'
	miR	3' -CCGCCCGCAUGCGCGCGCCGGGCUC- 5'
<i>Csa, Mfa, Mml, Nle, Pan, Rro</i> : -155 кДж/моль, 97%, 26 н.	мРНК	5' -GGCAAGGGGCUACGCGCCGCGGCCGAG- 3'
	miR	3' -CCGCCCGCAUGCGCGCGCCGGGCUC- 5'
		miR-4665-5р
<i>Hsa, Ptr, Ppa, Ggo, Mfa, Mml, Mne, Nle, Pan, Rbi, Rro</i> : -136 кДж/моль, 100%, 23 н.	мРНК	5' -GCUCGCGCUCACGCGUCSSSAG- 3'
	miR	3' -CGAGCGCGAGUGCGCAGGGGGUC- 5'
<i>Csa</i> : -132 кДж/моль, 97%, 23 н.	мРНК	5' -GCUCGCGCUCACGCGUCSSSAG- 3'
	miR	3' -CGAGCGCGAGUGCGCAGGGGGUC- 5'
<i>Rno</i> : -127 кДж/моль, 94%, 23 н.	мРНК	5' -GCCCGCGCUCACGCGUCSSSAG- 3'
	miR	3' -CGAGCGCGAGUGCGCAGGGGGUC- 5'

Примечание. Жирным шрифтом обозначен нуклеотид неканонических пар U и G, A и C.

энергия взаимодействия miR-7106-3p длиной 23 н. с мРНК гена *CCDC42B* *H. sapiens*, *M. mulatta*, *R. bieti* и *R. roxellana* равна –127 кДж/моль, а свободная энергия взаимодействия miR-7106-5p длиной 20 н. с мРНК гена *CCDC42B* *H. sapiens*, *M. mulatta*, *R. bieti*, *R. roxellana* и *Alteromonas naphthalenivorans* составляет –113 кДж/моль (табл. 6).

Свободная энергия взаимодействия miR-7106-3p с мРНК гена *CCDC42B* *Pongo abelii* и *A. naphthalenivorans* составляет –125 и –121 кДж/моль соответственно. Свободная энергия взаимодействия miR-7106-5p с мРНК гена *CCDC42B* *P. abelii* составляет –108 кДж/моль. Обнаружены 10 СС miR-7106-5p и miR-7106-3p, ассоциированных с геном *CCDC42B*, в 5'-UTR, 3'-UTR и CDS мРНК генов-кандидатов рака молочной железы, толстой кишки, плоскоклеточного рака пищевода, поджелудочной железы, рака предстательной железы, яичников, шейки матки, желудка, нейробластомы, остеосаркомы, колоректального рака, гепатоцеллюлярной карциномы. Эти miR взаи-

модействовали с мРНК со свободной энергией от –104 до –115 кДж/моль (табл. 3).

Таким образом, показано, что miR, ассоциированные с генами *CCDC42B*, *FOXF2*, *GLYCK*, *KIAA2026* и *PLPPR3*, влияют на различные гены-мишени, которые участвуют патогенезу различных онкологических заболеваний. Примечательно, что все нуклеотиды miR и их СС взаимодействовали без образования “пузырей” (табл. 4–6). Взаимодействия нуклеотидов, соединенных водородными связями, дополнительно стабилизировались стэкинг-взаимодействиями всех нуклеотидов. Среднее и стандартное отклонение свободной энергии взаимодействий СС пар miR-5p/miR-3p в мРНК генов *FOXF2*, *PLPPR3*, *KIAA2026*, *GLYCK* и *CCDC42B* варьировало от –144 ± –11 кДж/моль в 5'-UTR, –137 ± –13 кДж/моль в CDS и –118 ± –6 кДж/моль в 3'-UTR. Следовательно, связывание miR в начале мРНК будет более эффективно ингибировать трансляцию, что уменьшит потерю энергии в случае прекращения трансляции.

Таблица 5. Схемы взаимодействий miR-135a-3p и miR-135a-5p с 3'-UTR мРНК генов, ортологичных *GLYCK*

Объект, характеристики связывания	miR-135a-3p	
<i>Hsa, Ggo, Ppa, Mmu, Ptr, Rno:</i> –121 кДж/моль, 100%, 22 н.	мРНК	5' –CGCCACGGCUCCAAUCCCUAUA–3'
	miR	3' –GCGGUGCCGAGGUUAGGGGAUAU–5'
miR-135a-5p		
<i>Hsa, Ggo, Ppa, Mmu, Ptr, Rno:</i> –113 кДж/моль, 100%, 23 н.	мРНК	5' –UCACAUAGGAUAUAAAAGCCAUA–3'
	miR	3' –AGUGUAUCCUUAUUUUUCGGUAU–5'

Таблица 6. Схемы взаимодействия miR-7106-3p и miR-7106-5p с 3'-UTR мРНК генов, ортологичных *CCDC42B*

Объект, характеристики связывания	miR-7106-3p	
<i>Hsa, Mml, Rbi, Rro:</i> –127 кДж/моль, 100%, 23 н.	мРНК	5' –CUGGGACAGGGGAUUCAGGGAGCU–3'
	miR	3' –GACCCUGUCCC UAAGUCCCUCGA–5'
<i>Pab:</i> –125 кДж/моль, 98%, 23 н.	мРНК	5' –CCGGGACAGGGGAUUCAGGGAGCU–3'
	miR	3' – G ACCCUGUCCC UAAGUCCCUCGA–5'
<i>Ana:</i> –121 кДж/моль, 95%, 23 н.	мРНК	5' –CCGGGACAGGGGAUUCAGGGAGUU–3'
	miR	3' – G ACCCUGUCCC UAAGUCCCUC G A–5'
miR-7106-5p		
<i>Hsa, Mml, Rbi, Rro, Ana:</i> –113 кДж/моль, 100%, 20 н.	мРНК	5' –CCCAAGAUCUUUCCUCUCCA–3'
	miR	3' –GGGUUCUAGGGGAGGAGGGU–5'
<i>Pab:</i> –108 кДж/моль, 96%, 20 н.	мРНК	5' –CCCAAGAUCUUUCCUC U CA–3'
	miR	3' –GGGUUCUAGGGGAGGAG G GU–5'

Примечание. Жирным шрифтом обозначен нуклеотид неканонических пар U и G, A и C.

*Взаимодействие miR-5p/miR-3p
с некодирующими генами*

Показано, что некодирующие белок гены *DMN3OS*, *HOXA10-AS* и *SPACA6P-AS* служат мишенями для miR-5p/miR-3p, кодируемых антипараллельной ДНК (антисмысловой) [12]. В табл. 7 представлены характеристики связывания нуклеотидных последовательностей РНК *DMN3OS*, *HOXA10-AS* и *SPACA6P-AS* (длинные некодирующие РНК, днРНК) с соответствующими miR-5p/miR-3p. В дополнение к miR-3120-3p и miR-3120-5p с днРНК гена *DMN3OS* могут связываться такие miR, как miR-4506 и miR-6764-3p, предсказанные с помощью анализа 2565 miR из miRBase программой MirTarget. СС miR-3120-3p и miR-3120-5p в днРНК гена *DMN3OS* разделены участком из 18 н., длина которого соответствует длине участков между СС в гене, кодирующем белок *RTL1*. Свободная энергия взаимодействия miR-196b-3p и miR-196b-5p с днРНК гена *HOXA10-AS* составляет –121 и –115 кДж/моль соответственно. miR-3620-5p и miR-3960 взаимодействуют с днРНК гена *HOXA10-AS* с одинаковой свободной энергией (табл. 7). Т.е., miR-3620-5p и miR-3960 могут одновременно с miR-196b-3p и miR-196b-5p связываться с днРНК гена *HOXA10-AS*. Расстояние между СС miR-196b-3p и miR-196b-5p в днРНК гена *HOXA10-AS* составляет 14 н. днРНК гена *SPACA6P-AS* может связывать три пары miR-5p/miR-3p [12]. Характеристики такого взаимодействия приведены в табл. 7.

Свободная энергия взаимодействия парных miR-125a-3p и miR-125a-5p с днРНК гена *SPACA6P-AS* выше, чем у пар let-7e-5p и let-7e-3p, поэтому эти miR могут более эффективно связываться с днРНК *SPACA6P-AS*. Из 2565 miR, представленных в базе данных miRBase, программа MirTarget предсказала возможность эффективного связывания miR-1273g-3p и miR-1285-5p, miR-6741-3p и miR-1224-3p с днРНК *SPACA6P-AS*. Расстояние между СС miR-125a-3p и miR-125a-5p в днРНК гена *SPACA6P-AS* составляло 15 н., а между СС let-7e-5p и let-7e-3p – 24 н. Расстояния между СС четырех пар miR-5p/miR-3p указывают на их сравнимость с расстояниями между miR-5p и miR-3p в большинстве пре-miR. Следовательно, существует сходство во взаимодействии некодирующих и кодирующих генов с miR.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Впервые биоинформатические методы были использованы для идентификации СС пар miR-5p/miR-3p в мРНК генов-мишеней. Обнаружено, что из 17508 генов человека только белоккодирующие гены *RTL1*, *FOXF2*, *PLPPR3*, *KIAA2026*, *GLYCK* и *CCDC42B* служат мишенями для ассоциированных с ними miR. Ген *RTL1* уникален тем, что ассоциированная и ним miR содержит 10 СС, полностью комплементарных пяти парам miR-5p/miR-3p. Нуклеотидные последовательности miR, ассоциированных с другими пятью генами, также полностью комплементарны СС в мРНК

Таблица 7. Характеристики взаимодействий miR-5p/miR-3p с днРНК некодирующих генов *DMN3OS*, *HOXA10-AS*, *SPACA6P-AS*

Ген	miR	Начало сайта, н.	ΔG , кДж/моль	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Длина, н.
<i>DMN3OS</i>	miR-3120-3p	5958	–113	100	21
То же	miR-3120-5p	5996	–115	100	21
»	miR-4506	3149	–100	94	20
»	miR-6764-3p	450	–100	90	21
<i>HOXA10-AS</i>	miR-196b-3p	282	–121	100	22
То же	miR-196b-5p	317	–115	100	22
»	miR-3960-3p	380	–115	92	20
»	miR-3620-5p	447	–121	92	22
<i>SPACA6P-AS</i>	miR-99b-3p	780	–123	100	22
То же	miR-125a-3p	130	–121	100	22
»	miR-125a-5p	166	–127	100	24
»	let-7e-3p	598	–119	100	22
»	let-7e-5p	643	–113	100	22
»	miR-1273g-3p	2086	–113	96	21
»	miR-1285-5p	3597	–106	94	21
»	miR-6741-3p	724	–115	93	22
»	miR-1224-3p	1365	–108	91	21

генов *FOXF2*, *PLPPR3*, *KIAA2026*, *GLYCTK* и *CCDC42B*. Показано, что наряду с изученными белоккодирующими генами *RTL1*, *CCDC42B*, *FOXF2*, *GLYCTK*, *KIAA2026*, *PLPPR3*, некодирующие белок гены *DMN3OS*, *HOXA10-AS* и *SPACA6P-AS* служат мишенями miR-5p/miR-3p, кодируемых антипараллельной ДНК.

Установлено, что miR-127 подавляет экспрессию ассоциированного гена *RTL1*, возможно, действуя как малая интерферирующая РНК [27]. Маловероятно, что их биологическая роль заключается исключительно в деградации мРНК многих генов-мишеней. Нами обнаружены 10 miR, которые вряд ли будут подавлять синтез белка *RTL1*. Среди 2565 miR только miR-1296-5p и miR-772 могут связываться с мРНК *RTL1*. Мы предположили, что CC пар miR-5p/miR-3p возникли в предшественнике (пре-miR), чтобы усилить зависимость экспрессии мРНК-мишени от miR. Кроме того, статистическая значимость этой зависимости увеличивается, когда происходят мутации в CC miR-5p/miR-3p. Биологическая роль *RTL1* активно изучается [6–8, 28]. Эта роль весьма значительна, поскольку *RTL1* – это единственный известный ген человека, который взаимодействует с пятью парами miR-5p/miR-3p. Нами показано, что пары miR-5p/miR-3p комплементарны CC в CDS мРНК. Аналогичные результаты получены для miR растений [29]. Эти CC в мРНК комплементарны нуклеотидной последовательности соответствующей пре-miR. Аналогичные результаты получены нами для некоторых miR, связывающихся с 3'-UTR мРНК [9].

Полная комплементарность взаимодействия между miR и мРНК соответствует взаимодействию малых интерферирующих РНК с мРНК, но не все они приводят к разрушению мРНК. Косвенно это утверждение подтверждается существованием более 200 генов, мРНК которых содержат комплементарные CC miR-619-5p [9]. В этом случае miR-619-5p должна подавлять экспрессию генов путем деградации мРНК; однако биологическое значение этого феномена трудно объяснить. *RTL1* это ассоциированный ген для пяти пар miR-5p/miR-3p. miR-127-5p и miR-127-3p, miR-136-5p и miR-136-3p, miR-431-5p и miR-431-3p, miR-432-5p, miR-432-3p, miR-433-5p и miR-433-3p и ген *RTL1* расположены на антипараллельных цепях ДНК и транскрибируются независимо [11]. Спаренные полностью комплементарные CC miR-5p/miR-3p в генах соответствуют пре-miR, кодируемой противоположной цепью ДНК. Повышенный уровень консервативности полностью спаренных CC miR-5p/miR-3p по сравнению с окружающими районами объясняется особенностями профиля консервативности пре-miR.

Эволюция нуклеотидных последовательностей в miR и мРНК протекает совместно (табл. 2S,

3S). Таким образом, если miR существует, то существуют и соответствующие CC в мРНК. Высокая консервативность CC miR в генах *RTL1*, *FOXF2*, *PLPPR3*, *KIAA2026*, *GLYCTK* и *CCDC42B*, которая сохраняется в течение десятков миллионов лет эволюции изучаемых видов, подтверждает, что опосредованная miR регуляция экспрессии этих генов появилась на ранних этапах эволюции животных.

Показано, что *FOXF2*, *PLPPR3*, *KIAA2026*, *GLYCTK* и *CCDC42B* играют важную роль в развитии рака молочной железы [30, 31]. Уровень экспрессии генов *FOXF2*, *PLPPR3*, *KIAA2026*, *GLYCTK* и *CCDC42B* в молочной железе варьирует от 0.1 до 5.5 RPKM. Forkhead box F2 (*FOXF2*) функционирует как фактор транскрипции и играет решающую роль в программировании органогенеза и регуляции эпителиально-мезенхимального перехода (EMT) и пролиферации клеток. Данные недавних исследований выявили участие *FOXF2* в патогенезе рака молочной железы [32]. Снижение экспрессии мРНК *FOXF2* связано с ранним началом метастазирования и плохим прогнозом при раке молочной железы [33]. Изучение гена *RTL1* представляет большой интерес, поскольку 10 ассоциированных с ним miR регулируют экспрессию 32 генов (табл. 2), участвующих в развитии сердечно-сосудистых, онкологических, нейродегенеративных и других заболеваний человека. Следовательно, важно знать, у каких экспериментальных животных экспрессия генов *RTL1*, *FOXF2*, *PLPPR3*, *KIAA2026*, *GLYCTK*, *CCDC42B* регулируется с помощью miR, т.е. эти животные могут служить модельными объектами. Полученные результаты указывают на возможность использования животных для анализа влияния miR *RTL1*. Программа MirTarget позволяет анализировать взаимодействие miR с мРНК ортологичных генов и определять возможность взаимодействия между miR и мРНК генов человека и их ортологов. Полученные результаты показывают, что в качестве адекватных модельных объектов для изучения miR, ассоциированных с генами *RTL1*, *FOXF2*, *PLPPR3*, *KIAA2026*, *GLYCTK*, *CCDC42B*, могут использоваться мыши и крысы. В большинстве работ изучены только некоторые из 10 miR, ассоциированных с *RTL1*, часто без указания, являются ли они miR-5p/miR-3p [20–24]. Важно контролировать экспрессию всех miR, ассоциированных с генами. Наши результаты показывают, что пары miR-5p/miR-3p могут регулировать экспрессию многих генов и участвовать таким образом в развитии многих заболеваний (табл. 2 и 3). При разработке методов диагностики заболеваний с использованием miR, ассоциированных с генами *RTL1*, *FOXF2*, *PLPPR3*, *KIAA2026*, *GLYCTK* и *CCDC42B*, необходимо учитывать экспрессию miR. Такой контроль будет отражать роль этих участников в патологических процессах. мРНК

генов *RTL1*, *FOXF2*, *PLPPR3*, *KIAA2026*, *GLYCTK* и *CCDC42B* имеют полностью комплементарные СС пар miR-5p/miR-3p, консервативных на протяжении десятков миллионов лет дивергенции исследуемых видов. Определены количественные характеристики взаимодействий miR-5p/miR-3p в 5'-UTR, CDS и 3'-UTR мРНК генов-мишеней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определены характеристики связывания пяти пар miR-5p/miR-3p с мРНК гена *RTL1*, а также взаимодействия пяти пар miR-5p/miR-3p с ассоциированными мРНК генов *FOXF2*, *PLPPR3*, *KIAA2026*, *GLYCTK* и *CCDC42B*. днРНК некодирующих генов *DMN3OS*, *HOXA10-AS*, *SPACA6P-AS* имеют СС ассоциированных пар miR-5p/miR-3p. СС miR, ассоциированных с генами *RTL1*, *FOXF2*, *PLPPR3*, *KIAA2026*, *GLYCTK* и *CCDC42B*, найдены в мРНК генов, участвующих в развитии различных заболеваний. Показана консервативность miR и соответствующих СС в ортологичных генах-мишенях. Определены характеристики взаимодействия miR-5p/miR-3p с днРНК генов *DMN3OS*, *HOXA10-AS* и *SPACA6P-AS*. Эти результаты показывают, что некодирующие гены сохраняют некоторые свойства кодирующих.

Мы благодарим студентов А. Акимниязова и Д. Байжигитова за помощь в сборе данных.

Это исследование поддержано грантом (AP05132460) Министерства образования и науки Республики Казахстан, НИИ проблем биологии и биотехнологии, КазНУ им. Аль-Фараби.

ВКЛАД АВТОРОВ

Ивашенко Анатолий и Зигфрид Лабейт разработали исследование, подготовили рукопись и дали окончательное согласие на публикацию.

Ниязова Райгуль и Атамбаева Шара разработали исследование и составили рукопись.

Юрикова Оксана получила данные по гену *RTL1* для анализа, редактировала рукопись.

Айсина Дана получила данные по генам *FOXF2*, *PLPPR3*, *KIAA2026*, *GLYCTK* и *CCDC42B* для анализа, редактировала рукопись. Юрикова О. и Айсина Д. внесли существенный вклад в сбор, обработку и интерпретацию данных.

Все авторы были вовлечены в последующие этапы рецензирования, прочитали и одобрили окончательную рукопись.

В работе не использовали биоматериалов от животных и человека в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bartel D.P. (2018) Metazoan microRNAs. *Cell*. **173**, 20–51.
2. Lytle J.R., Yario T.A., Steitz J.A. (2007) Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 9667–9672.
3. Tay Y., Zhang J., Thomson A.M., Lim B., Rigoutsos I. (2008) MicroRNAs to *Nanog*, *Oct4* and *Sox2* coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*. **455**, 1124–1128.
4. Zhou X., Duan X., Qian J., Li F. (2009) Abundant conserved microRNA target sites in the 5'-untranslated region and coding sequence. *Genetica*. **137**, 159–164.
5. Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R., Atambayeva S. (2014) MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes. *Bioinformatics*. **10**, 423–427.
6. Kumamoto S., Takahashi N., Nomura K., Fujiwara M., Kijioka M., Uno Y., Matsuda Y., Sotomaru Y., Kono T. (2017) Overexpression of microRNAs from the Gtl2-Rian locus contributes to postnatal death in mice. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 3653–3662.
7. Ito M., Sferruzzi-Perri A.N., Edwards C.A., Adalsteinsson B.T., Allen S.E., Loo T.H., Kitazawa M., Kaneko-Ishino T., Ishino F., Stewart C.L., Ferguson-Smith A.C. (2015) A trans-homologue interaction between reciprocally imprinted miR-127 and Rtl1 regulates placenta development. *Development*. **142**, 2425–2430.
8. Sekita Y., Wagatsuma H., Nakamura K., Ono R., Kagami M., Wakisaka N., Hino T., Suzuki-Migishima R., Kohda T., Ogura A., Ogata T., Yokoyama M., Kaneko-Ishino T., Ishino F. (2008) Role of retrotransposon-derived imprinted gene, Rtl1, in the fetomaternal interface of mouse placenta. *Nat. Genet.* **40**, 243–248.
9. Atambayeva Sh., Niyazova R., Ivashchenko A., Pyrkova A., Pinsky I., Akimniyazova A., Labeit S. (2017) The binding sites of miR-619-5p in the mRNAs of human and orthologous genes. *BMC Genomics*. **18**, 428.
10. Zeng Y., Yi R., Cullen B.R. (2003) MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 9779–9784.
11. Davis E., Caiment F., Tordoir X., Cavaillé J., Ferguson-Smith A., Cockett N., Georges M., Charlier C. (2005) RNAi-mediated allelic trans-interaction at the imprinted Rtl1/Peg11 locus. *Curr. Biol.* **15**, 743–749.
12. Belot M.P., Nadéri K., Mille C., Boëlle P.Y., Benachi A., Bougnères P., Fradin D. (2017) Role of DNA methylation at the placental *RTL1* gene locus in type 1 diabetes. *Pediatr. Diabetes*. **18**, 178–187.
13. National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
14. Ivashchenko A.T., Pyrkova A.Y., Niyazova R.Y., Alybayeva A., Baskakov K. (2016) Prediction of miRNA binding sites in mRNA. *Bioinformatics*. **12**, 237–240.
15. Kool E.T. (2001) Hydrogen bonding, base stacking, and steric effects in DNA replication. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Structure*. **30**, 1–22.

16. Leontis N.B., Stombaugh J., Westhof E. (2002) The non-Watson–Crick base pairs and their associated isostericity matrices. *Nucl. Acids Res.* **30**, 3497–3531.
17. Wang J., Li Z., Liu B., Chen G., Shao N., Ying X., Wang Y. (2016) Systematic study of cis-antisense miRNAs in animal species reveals miR-3661 to target *PPP2CA* in human cells. *RNA*. **22**, 87–95.
18. Li S.C., Chan W.C., Hu L.Y., Lai C.H., Hsu C.N., Lin W.C. (2010) Identification of homologous microRNAs in 56 animal genomes. *Genomics*. **96**, 1–9.
19. Shi N., Deng L., Chen W., Zhang X., Luo R., Jin T., Ma Y., Du C., Lin Z., Jiang K., Guo J., Yang X., Xia Q. (2017) Is microRNA-127 a novel biomarker for acute pancreatitis with lung injury? *Dis. Markers*. **2017**, 1204295.
20. Shi L., Wang Y., Lu Z., Zhang H., Zhuang N., Wang B., Song Z., Chen G., Huang C., Xu D., Zhang Y., Zhang W., Gao Y. (2017) MiR-127 promotes EMT and stem-like traits in lung cancer through a feed-forward regulatory loop. *Oncogene*. **36**, 1631–1643.
21. Ying H., Kang Y., Zhang H., Zhao D., Xia J., Lu Z., Wang H., Xu F., Shi L. (2015) MiR-127 modulates macrophage polarization and promotes lung inflammation and injury by activating the JNK pathway. *J. Immunol.* **194**, 1239–1251.
22. Huang C., Xiao X., Chintagari N.R., Breshears M., Wang Y., Liu L. (2014) MicroRNA and mRNA expression profiling in rat acute respiratory distress syndrome. *BMC Med. Genomics*. **7**, 46.
23. Ito M., Sferruzzi-Perri A.N., Edwards C.A., Adalsteinsson B.T., Allen S.E., Loo T.H., Kitazawa M., Kaneko-Ishino T., Ishino F., Stewart C.L., Ferguson-Smith A.C. (2015) A trans-homologue interaction between reciprocally imprinted miR-127 and Rtl1 regulates placenta development. *Development*. **142**, 2425–2430.
24. Bhaskaran M., Wang Y., Zhang H., Weng T., Baviskar P., Guo Y., Gou D., Liu L. (2009) MicroRNA-127 modulates fetal lung development. *Physiol. Genomics*. **37**, 268–278.
25. Xie T., Liang J., Liu N., Wang Q., Li Y., Noble P.W., Jiang D. (2012) MicroRNA-127 inhibits lung inflammation by targeting IgG Fcγ receptor I. *J. Immunol.* **188**, 2437–2444.
26. Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R., Atambayeva S. (2014) The properties of binding sites of miR-619-5p, miR-5095, miR-5096, and miR-5585-3p in the mRNAs of human genes. *BioMed. Res. Int.* **2014**, 1–8.
27. Girardot M., Cavaillé J., Feil R. (2012) Small regulatory RNAs controlled by genomic imprinting and their contribution to human disease. *Epigenetics*. **7**, 1341–1348.
28. Fan G., Ye D., Zhu S., et al. (2017) RTL1 promotes melanoma proliferation by regulating Wnt/β-catenin signalling. *Oncotarget*. **8**, 106026–106037.
29. Bari A., Orazova S., Ivashchenko A. (2013) miR156- and miR171-binding sites in the protein-coding sequences of several plant genes. *Biomed. Res. Int.* **2013**, 307145.
30. Lo P.K. (2017) The controversial role of forkhead box F2 (FOXF2) transcription factor in breast cancer. *PRAS Open*. **1**, 9.
31. Lo P.K., Lee J.S., Liang X., Sukumar S. (2016) The dual role of FOXF2 in regulation of DNA replication and the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression. *Cell Signal*. **28**, 1502–1519.
32. Wang Q.S., Kong P.Z., Li X.Q., Yang F., Feng Y.M. (2015) FOXF2 deficiency promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res.* **17**, 30.
33. Kong P.Z., Yang F., Li L., Li X.Q., Feng Y.M. (2013) Decreased FOXF2 mRNA expression indicates early-onset metastasis and poor prognosis for breast cancer patients with histological grade II tumor. *PLoS One*. **8**, e61591.

THE INTERACTION OF miR-5p AND miR-3p WITH THE mRNAs OF ORTHOLOGOUS GENES

O. Yu. Yurikova¹, D. E. Aisina¹, R. E. Niyazova¹, Sh. A. Atambayeva¹,
S. Labeit², and A.T. Ivashchenko^{1,*}

¹Scientific Research Institute of Biology and Biotechnology Problems, al-Farabi Kazakh National University, Almaty, 050040 Kazakhstan

²Institute for Anaesthesiology and Intensive Care Medical Faculty Mannheim, Mannheim, 68135 Germany

*e-mail: a_ivashchenko@mail.ru

miRs regulate expression of many genes and are involved in the development of diseases. We have compared miRs partly or fully complementary to the 5'UTR, CDS and 3'UTR of mRNAs of target genes. The MirTarget software allowed us to discover miR binding sites (BS) in the entire nucleotide sequence of their cognizant mRNAs and to determine the characteristics of the interactions of miRs with mRNAs. In the coding regions (CDS) of human and animal mRNAs of *RTL1* gene, we identified five pairs of fully complementary BS for miR-127-5p and miR-127-3p, miR-136-5p and miR-136-3p, miR-431-5p and miR-431-3p, miR-432-5p and miR-432-3p, and miR-433-5p and miR-433-3p. The fully complementary BS for miR-6720-5 and miR-6720-3p were identified in the CDS of the *FOXF2* gene; BS for miR-3187-5p and miR-3187-3p were found in the CDS of the *PLPPR3* gene; BS for miR-4665-5p and miR-4665-3p were found in the 5'UTR of the *KIAA2026* gene; BS for miR-135a-5p and miR-135a-3p were found in the 3'UTR of the *GLYCTK* gene;

BS for miR-7106-5p and miR-7106-3p were found in the 3'UTR of the *CCDC42B* gene. The miR-5p and miR-3p associated with the *RTL1* gene have BS in the mRNAs of 32 additional target human genes. The miR-5p and miR-3p associated with the *FOXF2*, *PLPPR3*, *KIAA2026*, *GLYCTK* and *CCDC42B* genes have BS in the mRNAs of 27 target genes, involved in development of several diseases. Nucleotide sequences of miR-5p, miR-3p and their BS in mRNAs are conserved over tens of millions of years since divergence of the studied animal species. Binding characteristics of miR-3120-3p and miR-3120-5p, miR-196b-3p and miR-196b-5p, miR-125a-3p and miR-125a-5p, let-7e-3p and let-7e-5p, miR-99b-3p in fully complementary BS of non-coding *DMN3OS*, *HOXA10-AS*, *SPACA6P-AS* genes have been established.

Keywords: miR, mRNA, binding site, bioinformatics, orthologous gene