

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ MIRNA С CDS MRNA ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РАЗВИТИИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО**О.Ю. Юрикова, Ш.А. Атамбаева, А.Т. Иващенко***НИИ проблем биологии и биотехнологии, КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан*

Рак легкого является наиболее распространенным видом рака во всем мире. Согласно информации базы данных GLOBOCAN в 2018 году зарегистрировано 1,76 миллионов смертей от рака легкого [1]. По гистологическому строению различают два основных типа рака легкого: мелкоклеточный рак легкого и немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ). На НМРЛ приходится 85 % всех случаев рака легкого [2]. В 2015 г. ВОЗ была опубликована классификация рака легкого, в которую были внесены изменения, связанные с молекулярной патологией рака легкого [3]. Актуальным является установление молекулярных механизмов регуляции экспрессии генов при патологии для ранней диагностики и эффективного лечения заболеваний. Изучение роли miRNA в патогенезе НМРЛ имеет большие перспективы. Анализ экспрессии этих miRNA может быть использован для ранней диагностики НМРЛ, прогнозирования эффективности различных стратегий лечения и в персонализированной терапии [4]. Установлено, что miRNA связываются с mRNA в 3'-нетранслируемых областях (3'UTR), 5'-нетранслируемых областях (5'UTR) и белок-кодирующих последовательностях (CDS) [5,6]. Целью данной работы был поиск miRNA, имеющих сайты связывания в CDS mRNA генов, участвующих в развитии НМРЛ. На основе *in silico* анализа предложены эффективные ассоциации miRNA и генов, вовлечённых в НМРЛ.

МЕТОДЫ

Была создана база данных нуклеотидных последовательностей 115 генов, участвующих в НМРЛ. С помощью программы MirTarget в CDS мРНК исследуемых генов были предсказаны сайты связывания (СС) для 2565 miRNA из miRBase и 3701 miRNA из Londin et al. [7]. Программа MirTarget, определяет следующие характеристики: а) начало СС miRNA с mRNA; б) локализация СС miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA; в) свободная энергия взаимодействия, которая оценивается для всей нуклеотидной последовательности miRNA (ΔG , кДж/моль); г) схемы взаимодействий нуклеотидов между miRNA и mRNA. Для каждого СС установлено отношение $\Delta G/\Delta G_m$ (%) где ΔG_m равна свободной энергии связывания miRNA с ее полностью комплементарной нуклеотидной последовательностью [8]. Из всех предсказанных СС miRNA, были отобраны только СС с величиной $\Delta G/\Delta G_m$ равной 86 % и более.

Сайты связывания одной miRNA и одной mRNA были обнаружены в CDS mRNA нескольких генов. По одному СС было выявлено между mRNA следующих генов и miRNA: *ACLY* и ID00494.5p-miR; *ALDH3B2* и ID01862.5p-miR; *ASNS* и miR-4279; *BAK1* и miR-324-3p; *CASP9* и miR- и 4747-3p; *CAV2* и ID01062.3p-miR; *CD163* и miR-4742-3p; *CDK6* и miR-1238-3p; *DLC1* и miR-34c-3p; *EHD1* и ID02783.5p-miR; *EIF4A2* и miR-5195-3p; *EN1* и ID00857.5p-miR; *GJA1* и ID02369.5p-miR; *IGF1R* и miR-1273a; *LIMK* и ID01216.3p-miR; *MLH1* и miR-6813-5p; *P4HB* и miR-3677-5p; *PIK3CB* и miR-4684-5p; *PLD1* и ID01759.3p-miR; *PRKCA* и ID01588.3p-miR; *PSCA* и ID01047.3p-miR; *PTPRZ1* и miR-6514-3p; *TAGLN* и ID02593.5p-miR; *TRIM22* и ID01052.3p-miR; *USP4* и ID02666.5p-miR. $\Delta G/\Delta G_m$ 16 из 25 выявленных одиночных СС равна 90 % и выше.

Кластеры сайтов связывания miRNA с mRNA генов, участвующих в НМРЛ. Несколько СС miRNA в mRNA некоторых генов расположены с наложением нуклеотидных последовательностей и образуют кластеры. Для кластеров рассчитана степень компактизации, которая равна отношению суммы длин всех СС miRNA в кластере к длине кластера в mRNA. Для гена *ADAM23* выявлен кластер из СС четырех miRNA с 334 по 363 нуклеотидов (нт) со степенью компактизации 2,9. Из данного кластера наивысшая величина энергии взаимодействия между mRNA и ID03064.3p-miR равна -136 кДж/моль и ID02769.5p-miR равна -129 кДж/моль. В mRNA *BRD4* обнаружены 14 СС miRNA, из которых ID01641.3p-miR и ID00296.3p-miR; miR-6872-3p и miR-3615 образуют кластеры с 3082 по 3108 нт и с 3983 по 4015 нт, соответственно. Свободная энергия взаимодействия ID01641.3p-miR и ID00296.3p-miR первого кластера с mRNA *BRD4* равна -132 кДж/моль и -136 кДж/моль. С mRNA *CCND1* связываются пять miRNA, СС четырех из них образуют кластер с 1018 по 1048 нт со степенью компактизации 3,0. Свободная энергия взаимодействия miRNA в кластере менее -120 кДж/моль. В mRNA *CHD4* найдены пять СС двух miRNA – 4 СС для ID00529.5p-miR и один СС для ID00777.3p-miR организованные в кластер с 648 по 677 нт. Наибольшее число СС miRNA в CDS mRNA генов, участвующих в развитии НМРЛ предсказано для генов

E2F3 и *MLL2*. Организация СС в mRNA этих генов различная – в *E2F3* СС расположены в кластерах, тогда как в *MLL2* выявлены СС без наложения нуклеотидных последовательностей. В CDS *E2F3* выявлены СС 42 miRNA, образующих четыре кластера. Взаимодействие одной miRNA из кластера с mRNA *E2F3* ограничивает доступность этого участка для связывания других miRNA этого кластера. Первый кластер из четырех одиночных СС с 371 по 416 нт имеет степень компактизации 2,0. С наибольшей свободной энергией в кластере взаимодействует ID02294.5p-miR. Второй кластер составлен из 75 СС 32 miRNA с 448 по 492 нт со степенью компактизации 37,7. Свободная энергия взаимодействия 13 miRNA с mRNA *E2F3* в этом кластере равна -125 кДж/моль и более. Некоторые miRNA этого кластера имеют больше одного СС. Так, для ID02294.5p-miR обнаружено два СС; для ID01804.3p-miR, ID02229.3p-miR, ID01879.5p-miR и ID0206 4.5p-miR – по три СС; для ID00296.3p-miR, ID03151.3p-miR, ID01377.3p-miR и ID03367.5p-miR – четыре СС; для ID01702.3p-miR, ID00457.3p-miR и ID01873.3p-miR – пять, для ID00061.3p-miR – семь СС. Третий и четвертый кластеры содержат по три СС miRNA в положении с 530 по 583 и с 691 по 718 нт, соответственно. В CDS *MLL2* обнаружено 40 СС для 22 miRNA. СС 21 miRNA одиночные, miR-1322 содержит отдельно расположенные полисайты в mRNA *MLL2* с ΔG равной $-87 \div -89$ кДж/моль. Значение свободной энергии взаимодействия одиночных СС выше, чем у полисайтов. Нуклеотидные последовательности всех одиночных СС в mRNA *MLL2* не наложены друг на друга, за исключением miR-4675 и ID01562.3p-miR, которые образуют кластер с 12225 по 12259 нт. В mRNA *EGR1* обнаружен кластер из 14 СС семи miRNA с 455 по 529 нт со степенью компактизации 4,1. С наибольшей энергией с mRNA *EGR1* взаимодействуют ID02585.5p-miR (-125 кДж/моль) и ID03387.3p-miR (-127 кДж/моль). Значение ΔG ниже для полисайтов по сравнению с одиночными СС. Так, в кластере выявлены пять и четыре полисайта для ID01310.3p-miR и miR-1322 с ΔG $-113 \div -117$ кДж/моль и $-89 \div -91$ кДж/моль соответственно. Тогда как значение ΔG для одиночных сайтов в mRNA *EGR1* выше -121 кДж/моль. С CDS mRNA *GPC3* связываются 14 miRNA, 13 из них взаимодействуют с образованием кластера СС с 258 по 299 нт. Кластер составлен преимущественно из одиночных СС со степенью компактизации – 7,5. Шесть из 13 miRNA в кластере связываются с mRNA с высоким значением ΔG : ID01804.3p-miR (-129 кДж/моль), ID01323.3p-miR (-127 кДж/моль), ID01041.5p-miR (-127 кДж/моль), ID00296.3p-miR (-138 кДж/моль), ID01702.3p-miR (-136 кДж/моль), ID01641.3p-miR (-134 кДж/моль). СС ID00564.5p-miR, ID01739.3p-miR и miR-4459 расположены в кластере в mRNA гена *KRT5* с 1896 по 1919 нт. В mRNA *MTA1* находятся 2 кластера из одиночных СС трех miRNA (ID01524.3p-miR, ID03238.3p-miR, miR-6716-3p) с 406 по 459 нт. и двух miRNA (ID01702.3p-miR, ID01652.3p-miR) с 2271 по 2300 нт. Наивысшее значение ΔG среди всех miRNA, взаимодействующих с mRNA *MTA1* установлено для ID01702.3p-miR (-134 кДж/моль). В CDS mRNA гена *RXRБ* выявлены 11 СС, восемь из которых – одиночные СС и три полисайта ID01310.3p-miR. Шесть из девяти miRNA связываются с mRNA *RXRБ* с наложением нуклеотидных последовательностей, образуя кластер с 353 по 389 нт и степенью компактизации 5,1. Найдено десять miRNA, связывающихся с CDS mRNA гена *SHOX2*. СС восьми из десяти miRNA образуют кластер с 304 по 368 нт. За исключением одного одиночного СС для ID03387.3p-miR, кластер составлен из полисайтов семи miRNA – ID01282.3p-miR (3 полисайта), ID03332.3p-miR (2 СС), ID03445.3p-miR (5 СС), ID01859.5p-miR (6 СС), ID01310.3p-miR (4 СС), ID00811.3p-miR (5 СС), ID03345.5p-miR (2 СС). Наивысшее значение ΔG равно $-129 \div -132$ кДж/моль у СС ID03332.3p-miR. Следовательно, при равных концентрациях восьми miRNA кластера, наиболее вероятно взаимодействие между mRNA *SHOX2* и ID03332.3p-miR. В CDS mRNA гена *SIH2* найдено шесть одиночных СС, составляющих два кластера. Первый кластер состоит из СС двух miRNA с 383 по 422 нт, второй кластер из четырех СС с 466 по 495 нт. Из шести СС, три с высокой энергией взаимодействия: ID01106.5p-miR (-129 кДж/моль), ID02251.5p-miR (-125 кДж/моль) и ID02611.3p-miR (-129 кДж/моль). Кластеры, составленные из СС двух miRNA найдены в mRNA генов *B3GNT3* (ID01774.5p-miR и miR-4763-3p – 303 и 308 нт); *BCL3* (ID00107.3p-miR и ID02112.3p-miR); *BRD4* (2 кластера: ID01641.3p-miR и ID00296.3p-miR; miR-6872-3p и miR-3615); *CBLB* (ID01787.3p-miR и miR-4459); *CHD4* (ID00529.5p-miR и ID00777.3p-miR); *RP5* (ID01547.3p-miR и miR-4651); *MCM4* (ID00622.3p-miR и ID00491.5p-miR); *MLL2* (miR-4675 и ID01562.3p-miR); *PTPRN* (miR-6825-5p и miR-920; ID03231.5p-miR и ID00645.5p-miR); *RAF1* (miR-6808-5p и ID03405.3p-miR).

Пары miRNA с СС в нескольких генах. Были выявлены пары miRNA, которые связываются с mRNA нескольких генов. Так, СС для ассоциаций miR-3960, ID00296.3p-miR, ID01702.3p-miR, ID01041.5p-miR, ID03367.5p-miR, ID00522.5p-miR, ID01804.3p-miR, ID02187.5p-miR, ID03151.3p-miR выявлены в mRNA генов *E2F3* и *GPC3*. СС пары ID01641.3p-miR, ID00296.3p-miR также обнаружены в mRNA гена *BRD4*. Пара ID03332.3p-miR и ID01310.3p-miR имеет СС в mRNA генов *E2F3*, *RXRБ* и *SHOX2*. В mRNA *EGR1*, *SHOX2* найдены СС для ID03445.3p-miR, ID01859.5p-miR, ID03387.3p-miR. ID01106.5p-miR, ID02611.3p-miR связываются с CDS mRNA генов *E2F3* и *SIH2*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таблица 1 Характеристики сайтов связывания miRNA в mRNA генов, ассоциированных с НМРЛ со значением ΔG более -125 кДж/моль

Ген	miRNA	Начало СС (нт)	ΔG (кДж/моль)	$\Delta G/\Delta G_m$ (%)	Длина miRNA (нт)
ADAM23; 0,6	ID03064.3p-miR	334	-136	89	24
	ID02769.5p-miR	337	-129	94	22
	ID02260.5p-miR	383	-125	89	22
ARVCF; 6,5	ID02381.3p-miR	2051	-125	88	24
B3GNT3; 0,3	ID01774.5p-miR	303	-132	91	23
	miR-4763-3p	308	-132	93	24
BRD4; 12,8	ID01641.3p-miR	3082	-132	89	24
	ID00296.3p-miR	3083	-136	86	25
CDH5; 51	ID01428.3p-miR	2034	-127	88	24
E2F3; 3,9	ID02294.5p-miR	391	-129	88	24
	ID01895.5p-miR	448	-132	89	24
	ID01641.3p-miR	450	-129	87	24
	ID00296.3p-miR (4)	450 ÷ 462	-136 ÷ -140	86 ÷ 89	25
	ID01702.3p-miR (5)	450 ÷ 465	-132 ÷ -138	87 ÷ 92	24
	ID01041.5p-miR	452	-127	87	24
	ID00061.3p-miR (7)	452 ÷ 470	-119 ÷ -140	86 ÷ 95	22
	ID02294.5p-miR	452, 461	-127 ÷ -132	87 ÷ 90	24
	ID01804.3p-miR (3)	453 ÷ 462	-129	88	23
	ID01778.3p-miR	460	-129	87	24
	ID01879.5p-miR (3)	460 ÷ 466	-119 ÷ -125	87 ÷ 92	22
	ID02064.5p-miR (3)	460 ÷ 466	-125 ÷ -138	87 ÷ 96	23
	ID01106.5p-miR	465	-132	89	24
	ID02084.3p-miR	466	-132	87	24
	ID02538.3p-miR	468	-129	97	22
	ID01986.5p-miR	468	-125	87	24
	ID01574.5p-miR	553	-127	90	23
	ID01206.3p-miR	560	-125	88	23
	ID03332.3p-miR	691	-136	91	24
	ID02611.3p-miR	696	-134	97	22
	ID02344.3p-miR	414	-125	87	24
	ID03387.3p-miR	467	-127	90	24
EGR1; 148,2	ID02585.5p-miR	470	-125	87	24
GPC3; 79,3	ID01804.3p-miR	264, 268	-129	88	23
	ID01323.3p-miR	267	-127	94	22
	ID01041.5p-miR	271	-127	87	24
	ID00296.3p-miR	274	-138	88	25
	ID01702.3p-miR	274	-136	90	24
	ID01641.3p-miR	274	-134	90	24
MLL2; 8,6	ID01491.3p-miR	3300	-125	91	23
MTA1; 18,1	ID01702.3p-miR	2271	-134	89	24
POLE; 3,6	ID01291.3p-miR	1483	-125	87	24
PTPRN; 0	ID03231.5p-miR	2238	-129	91	24
RXRB; 24,5	ID03332.3p-miR	361	-129	87	24
	ID02761.3p-miR	361	-129	87	24
	ID02692.3p-miR	363	-129	92	23
SHOX2; 0,1	ID03332.3p-miR	310, 332	-129 ÷ -132	87 ÷ 89	24
	ID03345.5p-miR	323, 344	-123 ÷ -127	87 ÷ 90	24
SIAH2; 10	ID01106.5p-miR	398	-129	87	24
	ID02251.5p-miR	471	-125	92	22
	ID02611.3p-miR	473	-129	94	22
TARBP1; 6	ID00098.5p-miR	225	-127	90	23
	ID02908.3p-miR	393	-125	92	22
	ID03163.3p-miR	521	-127	88	24
	ID03387.3p-miR	861	-125	88	24
ZEB2; 12	ID02585.5p-miR	3768	-127	88	24

Помимо перечисленных выше ассоциаций одной miRNA с одним геном в качестве маркеров НМРЛ предлагается использовать ассоциации генов-мишеней, содержащие кластеры СС и соответствующие miRNA. Из числа одиночных СС и полисайтов наиболее значимыми для дальнейшего использования в диагностике и терапии являются СС с высокими значениями свободной энергии взаимодействия от -125 кДж/моль и выше (Таблица 1). Наличие кластеров сайтов связывания miRNA в mRNA генов позволяет предположить, что miRNA могут конкурировать за связывание с mRNA. Поэтому для прогнозирования вероятности связывания miRNA с участком mRNA, содержащим кластер СС, необходимо оценить концентрации всех miRNA и уровень экспрессии их генов-мишеней. Чем больше степень компактизации кластера, тем выше конкуренция между мРНК за связывание с mRNA.

ЛИТЕРАТУРА

- Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Mathers, C.; Parkin, D.M.; Pineros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods // *Int. J. Cancer* 2019; 144: 1941–1953.
- Zappa C, Mousa SA: Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances // *Transl Lung Cancer Res* 2016; 5: 288–300.
- Inamura K. Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification // *Front Oncol.* 2017; 7: 193.
- Florez M, Szpechcinski A, Chorostowska-Wynimko J. miRNAs as Biomarkers and Therapeutic Targets in Non-Small Cell Lung Cancer: Current Perspectives // *Target Oncol.* 2017
- Lytle J.R., Yario T.A., Steitz J.A. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5'UTR as in the 3' UTR // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 2007; 104(23): 9667–9672. DOI:10.1073/pnas.0703820104.
- Tay Y., Zhang J., Thomson A.M., Lim B., Rigoutsos I. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation // *Nature.* 2008; 455: 1124–1128. DOI:10.1038/nature07299
- Londin E, Loher P, Telonis AG, Quann K, Clark P, Jing Y, et al. Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate – and tissue-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 2015; 112(10): E1106–1115
- Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R., Atambayeva S. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes // *Bioinformatics.* 2014; 10(7): 423–427. doi : 10.6026/97320630010423