

ISSN 2218–2268

Министерство образования и науки Российской Федерации
Российская академия образования
Южный научный центр Российской академии наук
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
“ЮЖНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ”
Южное отделение Российской академии образования
Учебно-научно-исследовательский институт биомедицинских информационных технологий
«Южного федерального университета»
Ассоциация центров биомедицинских информационных технологий вузов России

ВАЛЕОЛОГИЯ

№ 1

2015

2015 № 1

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ВАЛЕОЛОГИЯ



Учредитель
УНИИ валеологии ЮФУ

Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе
по надзору и сфере связи,
информационных технологий
и массовых коммуникаций

(Регистрационное
свидетельство
ПИ № 77-1486)

Основан в 1996 году
Выходит 4 раза в год

Очередной номер журнала
можно приобрести в редакции

Главный редактор
кандидат биологических наук
Е. К. Айдаркин

Зам. главного редактора
доктор биологических
наук, профессор
О. Г. Чораян

Ответственный секретарь
кандидат биологических наук
В. В. Хренкова

Редакционная группа
Л. Н. Иваницкая,
В. И. Литвиненко,
Н. Н. Однораленко

Адрес редакции
344090, г. Ростов-на-Дону,
пр. Стачки, 194/1
Тел. (863) 247-36-78
e-mail: lnivanitskaya@sfsedu.ru

Подписано в печать 24.03.2015
Формат 60×84 1/8.
Усл. печ. л. 13,5. Тираж 105 экз.
Уч. изд. л. 12,0. Заказ № 4337.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

- АЙДАРКИН Евгений Константинович** – главный редактор, к.б.н., профессор, Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону
АПАНАСЕНКО Геннадий Леонидович – д.м.н., профессор, Киевская медицинская академия последипломного образования, г. Киев
БЕЛЯЕВ Василий Степанович – академик РАЕН, заслуженный работник физической культуры РФ, д.б.н., профессор, Педагогический институт физической культуры ГОУ МПГУ, г. Москва
КАЗИН Эдуард Михайлович – академик МАНВШ, заслуженный деятель науки РФ, д.б.н., профессор, Кемеровский государственный университет, г. Кемерово
КИРОЙ Валерий Николаевич – член-корреспондент МАНВШ, д.б.н., профессор, Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону
КОЛБАНОВ Владимир Васильевич – академик АПСН, д.м.н., профессор, Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург
ЛЕБЕДЕВ Юрий Александрович – д.ф.н., академик РАО, профессор, Нижегородский архитектурно-строительный университет, г. Нижний Новгород

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

- ЧОРАЯН Ованес Григорьевич** – председатель редакционного совета, заслуженный деятель науки РФ, академик РАЕН, д.б.н., профессор, Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону
АЙДАРКИН Евгений Константинович – зам. председателя редакционного совета, к.б.н., профессор, Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону
АНТОНЕНКО Наталья Григорьевна – секретарь редакционного совета, директор Издательско-полиграфического комплекса КИБИ МЕДИА ЦЕНТРА, Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону
КАЗНАЧЕВ Влаиль Петрович – академик РАМН, академик РАЕН, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник УРАМН «Научный центр клинической и экспериментальной медицины Сибирского отделения РАМН», г. Новосибирск
ЛИЦУК Владимир Александрович – академик АМТН, академик МАКН, д.б.н., профессор, председатель Проблемных комиссий «Фундаментальные основы индивидуального и общественного здоровья» и «Медицинская и биологическая информатика» РАМН, Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н.Бакулева РАМН, г. Москва
МАТИШОВ Геннадий Григорьевич – академик РАН, д.г.н., профессор, директор Мурманского морского биологического института, председатель Южного научного центра РАН, г. Ростов-на-Дону
СОКОЛОВ Эдуард Михайлович – академик МАИ, заслуженный деятель науки и техники РФ, д.т.н., профессор, Тульский государственный технический университет, г. Тула
ШЛЕНОВ Юрий Викторович – д.э.н., профессор, Российский государственный университет инновационных технологий и предпринимательства, г. Москва
ШКУРАТ Татьяна Павловна – д.б.н., профессор, директор НИИ биологии, Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону

© Южный федеральный университет, 2015.
© УНИИ биомедицинских информационных технологий ЮФУ, 2015.

- Ответственность за содержание публикаций несут авторы;
- Мнение редакционной коллегии может не совпадать с точкой зрения авторов публикаций;
- Рукописи авторам не возвращаются;
- При перепечатке или воспроизведении иным способом ссылка на журнал «ВАЛЕОЛОГИЯ» обязательна.

УДК 575.2

ИЗУЧЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ МОТИВОВ, ГОМОЛОГИЧНЫХ ЗРЕЛЫМ МИКРО-РНК, В МЕЖГЕННЫХ ПРОСТРАНСТВАХ ВОКРУГ ГЕНОВ BRCA, NF И TP53

Е.В. МАШКИНА

e-mail: lenmash@mail.ru

Южный федеральный университет.

Проведено биоинформационное исследование межгенных участков генома человека, расположенных вокруг генов-супрессоров опухолей – BRCA1, BRCA2, NF1, NF2 и TP53. В результате выявлено, что данный участок содержит 264 последовательности длиной 19–23 нуклеотида, гомологичных 153 последовательностям зрелых ми-РНК по данным miRBase 21. При этом наиболее часто встречались последовательности семейства miR-1273, что может указывать на их функциональную значимость, а также на эволюционную роль.

Ключевые слова: канцерогенез, репарация ДНК, микро-РНК, межгенные участки, биоинформатика.

LOCALIZATION OF MOTIFS, HOMOLOGOUS TO MATURE MI-RNA SEQUENCES, IN BRCA, NF AND TP53 GENE SURROUNDINGS

E.V. MASHKINA

E.V. Mashkina, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia.

Previous findings showed the possible connection between mi-RNA genes localization and target gene regulation processes. Current paper represents the results of bioinformatic analysis of BRCA1, BRCA2, NF1, NF2 and TP53 gene surroundings. Studied intergene spaces contain 264 motifs, which are homologous to 153 mature mi-RNA sequences from miRBase 21. Mi-RNAs of miR-1273 family were the most frequent motifs in studied genome sequence, that can show their functional and evolutionary value.

Keywords: cancerogenesis, DNA repair, micro-RNA, intergenic space, bioinformatics.

Микро-РНК (ми-РНК) играют важную роль в регуляции генных сетей ингибирования экспрессии мРНК мишеней. Существует растущий интерес к участию микро-РНК в важных клеточных функциях и биологических процессах, к выявлению взаимосвязи между микро-РНК и их мишенями, в том числе и в процессе канцерогенеза. Показано, что каждый тип опухолей человека обладает уникальным набором экспрессируемых микро-РНК и опухольспецифические микро-РНК присутствуют за пределами новообразования, в различных биологических жидкостях больного, где они беспрецедентно стабильны и могут определяться в следовых концентрациях с помощью ПЦР-технологий [Witwer, 2014; Wen, 2014; Kato, 2014]. Выявлена ключевая роль микро-РНК в нарушении баланса пролиферации, дифференцировки и программированной клеточной смерти при развитии различных заболеваний, в том числе онкологической патологии. На сегодняшний день в базах данных идентифицировано более 35 тысяч микро-РНК.

Гены микро-РНК расположены в межгенных участках или в участках с антисмысловой ориентацией к аннотированным генам, в интронах и экзонах генов. Микро-РНК, расположенные в межгенном пространстве, локализованы на различном расстоянии от известных белок-кодирующих генов и у них есть свой независимый транскрипт. Остальные микро-РНК у животных расположены в интронах. Большинство интронных микро-РНК не имеют своего промотора и вырезаются из интронов, также как многие snoRNA. Существует небольшая группа микро-РНК, которая расположена в экзонах. Такое расположение микро-РНК в геноме обеспечивает удобный механизм координации экспрессии микро-РНК и белков. Между интронной микро-РНК и мРНК экзона может сохраняться взаимосвязь при наличии сайтов связывания микро-РНК. Было подтверждено сохранение такой связи между miR-7 и мРНК hnRNP K гена, в интроне которого кодируется микро-РНК [Aravin, 2003]. С этой точки зрения изучение структуры некодирующей части генома является

ся весьма актуальным, так как позволяет выявить возможные новые микро-РНК регуляторы активности генов.

Целью данной работы явилось изучение локализации мотивов, гомологичных зрелым микро-РНК, в межгенных пространствах вокруг генов, вовлеченных в процессы репарации ДНК в клетке: BRCA 1, BRCA2, NF1, NF2 и TP53.

Объект и методы исследования

Объектом исследования служили нуклеотидные последовательности межгенных участков генома человека, расположенные вокруг генов-супрессоров опухолей – BRCA1, BRCA2, NF1, NF2 и TP53.

Координаты и длина исследуемых межгенных пространств вокруг генов супрессоров опухолей представлены в табл. 1.

Таблица 1

Координаты и длина исследованных межгенных последовательностей вокруг генов супрессоров опухолей

Название гена	NCBI ID	Расположение	Хромосома	Координаты межгенного пространства		Длина межгенного пространства
				Начало	Конец	
BRCA1	672	после гена	17	43032040	43044294	12254
BRCA2	675	перед геном	13	32311953	32315479	3526
BRCA2	675	после гена	13	32399671	32400722	1051
NF1	4763	перед геном	17	31034377	31045487	11110
NF1	4763	после гена	17	31377676	31391623	13947
NF2	4771	перед геном	22	29581336	29603555	22219
NF2	4771	после гена	22	29698599	29720089	21490
TP53	7157	перед геном	17	7687549	7705201	17652
TP53	7157	после гена	17	7657770	7668401	10631

Нуклеотидные последовательности были получены из базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) посредством E-utilities API, предназначенного для автоматизированного получения данных из баз данных NCBI.

В нуклеотидных последовательностях производился поиск мотивов соответствующих известным микроРНК. Последовательности микро РНК были взяты из базы данных miRBase (<http://mirbase.org/>). На момент проведения нашего исследования database miRNA содержала 28645 последовательности предшественников микро-РНК, 35828 последовательностей зрелых микро-РНК, обнаруженных у представителей 223 видов.

Поиск мотивов осуществлялся с помощью биоинформационного пакета MEME Suite [Bailey et al, 2009], включающего в себя широкий набор инструментов для поиска мотивов. Далее, полученные результаты были отфильтрованы и сгруппированы по генам, вокруг которых производился поиск мотивов, и по наиболее часто встречающимся типам микро-РНК.

Величина гомологии последовательности рассчитывалась как процент схожести найденного в нуклеотидной последовательности фрагмента с консенсусной последовательностью мотива микро-РНК. Результаты были отфильтрованы по гомологии, для дальнейшей обработки были отобраны последовательности со степенью сходства 85 % и выше.

Коэффициент плотности распределения микро-РНК рассчитывали как отношение суммы длин найденных фрагментов микро-РНК к общей длине фланкирующей ген последовательности.

Результаты исследования

В ходе исследования был проанализирован участок ДНК длиной более 100000 нуклеотидов, расположенный в окружении генов BRCA1, BRCA2, NF1, NF2 и TP53. Данный участок содержит 264 последовательности длиной 19–23 нуклеотида, гомологичных 153 последовательностям зрелых ми-РНК по данным miRBase 21. Степень гомологии последовательностей варьи-

рвала от 0,86 до 1. Большинство последовательностей было представлено в единичной копии, но некоторые – в количестве от двух до десяти копий. На протяжении всего исследуемого отрезка наиболее часто встречались последо-

вательности семейства miR-1273. Наибольшая плотность распределения мотивов ми-РНК по участку наблюдалась в окружении гена TP53, наименьшая – вокруг гена NF1. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Распределение мотивов, гомологичных зрелым микро-РНК, в окружении генов-супрессоров опухолей

Ген	Длина межгенного пространства	Количество обнаруженных зрелых ми-РНК с гомологией >0,85*	Преобладающий мотив	Плотность распределения ми-РНК по участку генома
BRCA1	12254	34 / 25	miR-1273, miR-466	0.0028
BRCA2	4577	11 / 9	miR-5096	0.0024
NF1	25057	45 / 30	miR-1273	0.0016
NF2	43709	91 / 48	miR-1273	0.0021
TP53	28283	83 / 41	miR-1273	0.0029

* В числителе показано общее число найденных мотивов. В знаменателе – число соответствующих им последовательностей ми-РНК по данным miRBase 21.

Рассматривая участок перед геном BRCA1, следует отметить, что большинство последовательностей ми-РНК картировались в области, расположенной от 13 до 5 т.п.н. до начала гена. За 4 т.п.н. до начала гена последовательности ми-РНК не обнаруживались. Большинство последовательностей было представлено в единичной копии, некоторые (9 ми-РНК) – в двух копиях. На протяжении всего исследуемого отрезка наиболее часто встречались последовательности семейства miR-1273 (5копий) и miR-466 (6 копий).

На участке 3526 п.н. перед геном BRCA2 большинство последовательностей ми-РНК картировались в области, расположенной от 3 до 1 т.п.н. до начала гена. За 700 п.н. до начала гена последовательности ми-РНК не обнаруживались. Коэффициент плотности распределения последовательностей по участку генома составил 0,0028. Большинство последовательностей было представлено в единичной копии, некоторые (hsa-miR-5096 и hsa-miR-619) – в двух копиях.

В межгенных пространствах перед геном NF1 (11110 п.н.) мотивы ми-РНК картировались в области, расположенной от 11 до 6 т.п.н. до начала гена. За 1 т.п.н. до начала гена последовательности ми-РНК не обнаруживались. Коэффициент плотности распределения последовательностей по участку генома составил 0,0021. Большинство ми-РНК в области 13947 п.н. после гена NF1 картировались на расстоянии 3–8 т.п.н. от конца гена. Коэффициент плотности распре-

деления последовательностей по участку генома составил 0,0015.

В ходе исследования гена NF2 было проанализировано два участка ДНК суммарной длиной 43709 нуклеотидов, расположенных перед и после гена NF2. Данный участок содержал 91 последовательность длиной 19–23 нуклеотида, гомологичные 48 последовательностям зрелых ми-РНК по данным miRBase 21. Степень гомологии последовательностей варьировала от 0,86 до 1. Коэффициент плотности распределения последовательностей по участку генома составил 0,0021. Большинство последовательностей было представлено в единичной копии, некоторые (7 ми-РНК) – в двух копиях, четыре (hsa-mir-1285-1, mmu-mir-706, mmu-mir-709, mmu-mir-7669) – в трех копиях, восемь последовательностей – в четырех копиях (cgr-mir-1285, hsa-mir-1273f, hsa-mir-1273g, hsa-mir-5095, hsa-mir-5096, hsa-mir-619, ppy-mir-1273e, ssc-mir-1285) и одна последовательность (hsa-mir-5585) – в пяти копиях.

Перед геном NF2 большинство последовательностей ми-РНК картировалось в области, расположенной от 2 до 15 т.п.н. до начала гена. За 1 т.п.н. до начала гена последовательности ми-РНК не обнаруживались. Коэффициент плотности распределения последовательностей по участку генома составил 0,0023. Большинство ми-РНК в области 21490 п.н. после гена NF2 картировались на расстоянии 2–14 т.п.н. от конца гена. Коэффициент плотности

распределения последовательностей по участку генома составил 0,0017. Большинство последовательностей было представлено в единичной копии, некоторые (7 ми-РНК) – в двух копиях, четыре (hsa-mir-1285-1, mmu-mir-706, mmu-mir-709, mmu-mir-7669) – в трех копиях, восемь последовательностей – в четырех копиях (cgr-mir-1285, hsa-mir-1273f, hsa-mir-1273g, hsa-mir-5095, hsa-mir-5096, hsa-mir-619, ppy-mir-1273e, ssc-mir-1285) и одна последовательность (hsa-mir-5585) – в пяти копиях.

В ходе исследования был проанализирован участок ДНК длиной 28283 нуклеотида, расположенный перед и после гена TP53. Данный участок содержит 83 мотива, гомологичных 41 последовательностям зрелых ми-РНК по данным miRBase 21. Степень гомологии последовательностей варьировала от 0,86 до 1. Коэффициент плотности распределения последовательностей по участку генома составил 0,0029. Большинство последовательностей было представлено в единичной копии, некоторые (7 ми-РНК) – в двух копиях, 2 ми-РНК – в трех копиях, 9 ми-РНК – в четырех копиях и одна – в пяти копиях.

Рассматривая участок перед геном TP53 (17652 п.н.), следует отметить, что большинство последовательностей ми-РНК картировались в области, расположенной от 5 до 14 т.п.н. до начала гена. Коэффициент плотности распределения последовательностей по участку генома составил 0,0025. Большинство ми-РНК в области 10631 п.н. после гена TP53 картировались на расстоянии 2–8 т.п.н. от конца гена. Коэффициент плотности распределения последовательностей по участку генома составил 0,0035.

Частота локализации зрелых ми-РНК в межгенных пространствах вокруг изученных генов на каждую 1000 нуклеотидов представлена на рисунке.

Обсуждение результатов исследования

Биоинформационный анализ показал, что в межгенных пространствах генома локализовано большое количество мотивов, гомологичных зрелым микро-РНК. Их количество и тип варьирует в зависимости от длины участка и от того, к какому гену прилегает данный участок. Наиболее часто в некодирующих участках вокруг изученных генов-супрессоров опухолей локализованы мотивы, гомологичные микро-РНК семейства

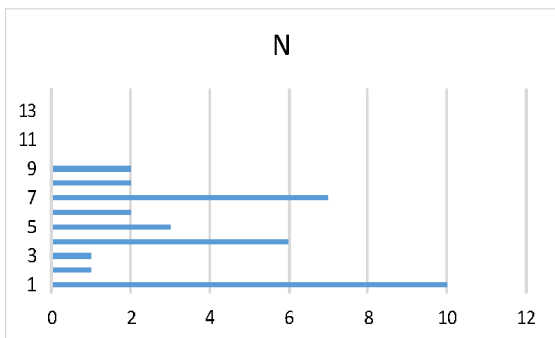
miR-1273. По данным литературы известно, что ми-РНК семейства miR-1273 регулируют от 33 до 1074 таргетных генов. В состав семейства входят miR-1273a, miR-1273c, miR-1273d, miR-1273e, miR-1273f, miR-1273g-3p, miR-1273g-5p, miR-1273h-3p и miR-1273h-5p. Некоторые из этих ми-РНК (miR-1273e, miR-1273f и miR-1273g-3p) имеют сайты связывания в более чем 400 генах и получили название «уникальные» ми-РНК, или umi-RNA. Сайты связывания с таргетными генами достаточно консервативны и располагаются в 5' и 3' некодирующих регионах м-РНК, а также и в кодирующих доменах м-РНК. Некоторые гены содержат до 5 сайтов связывания с ми-РНК семейства miR-1273 [Ivashchenko, 2014].

В исследовательских работах показано, что в раковых опухолях органов малого таза у женщин-носителей мутаций BRCA1 и BRCA2, наблюдается пятикратное увеличение экспрессии hsa-miR-1273g-3p [Reitsma, 2013]. Существует взаимосвязь между экспрессией TP53 и miR-1273a при повреждении ДНК в клетках [Hattori, 2014].

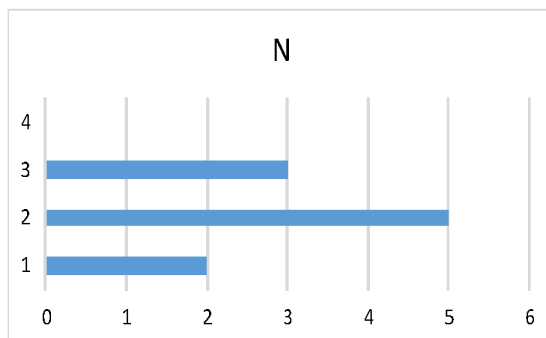
Таким образом, существуют подтверждения таргетных взаимодействий микро-РНК, обнаруженных в межгенных пространствах, с генами, прилегающими к данным регионам. С другой стороны, высокая распространенность мотивов miR-1273 как в кодирующих [Ivashchenko et al, 2014], так и в некодирующих участках генома, может свидетельствовать об их участии в неспецифических процессах регуляции активности генов, а также об их значимости в процессе эволюции генома.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации «Разработка полногеномных молекулярных карт для выявления новых терапевтических мишеней» номер проекта RFMEFI57814X0003, на оборудовании ЦКП «Высокие технологии ЮФУ», грант №RFMEFI59414X0002 «Развитие центра коллективного пользования научным оборудованием «Высокие технологии» ЮФУ для эффективного участия в реализации междисциплинарных проектов по исследованию механизмов управления клеточными функциями для решения фундаментальных и прикладных задач в области биологии и медицины, в том числе регенеративной медицины».

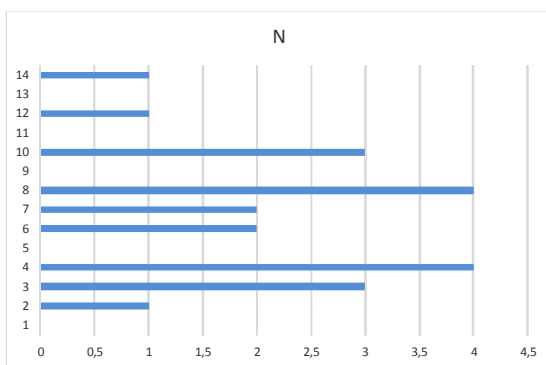
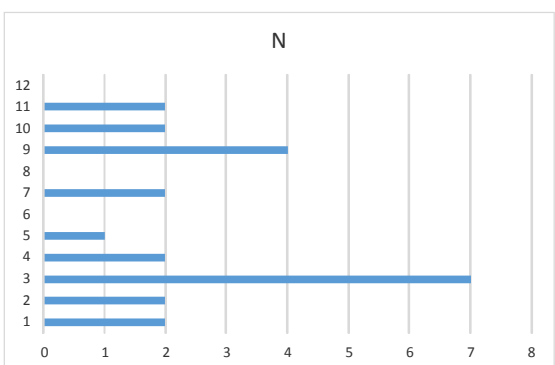
Участок перед геном BRCA1



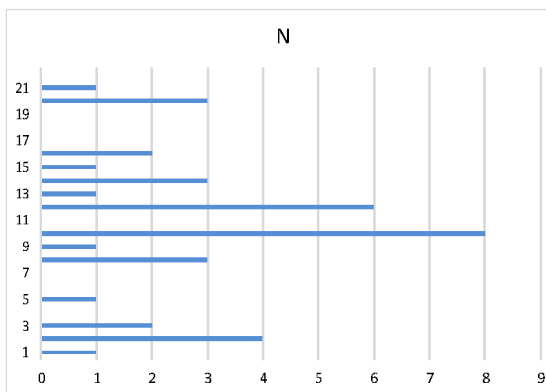
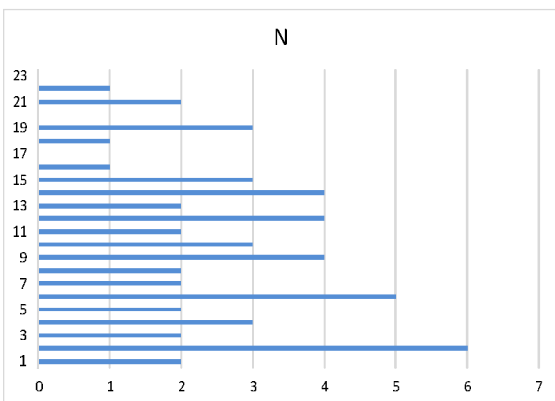
Участок после гена BRCA2



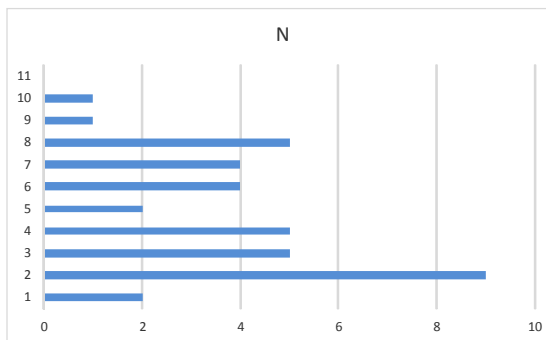
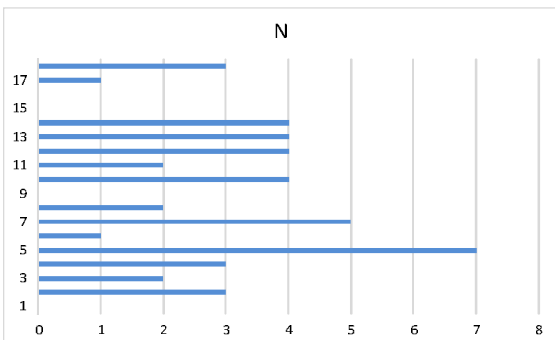
NF1



NF2



TP53



Частота локализации зрелых ми-РНК в межгенных пространствах вокруг изученных генов на каждую 1000 нуклеотидов. По оси ординат количество нуклеотидов в 1000 п.о. По оси абсцис – количество копий микро РНК на каждые 1000 п.о.

Литература

Aravin AA [et al]. The Small RNA Profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell*. 2003; 5(2):337–50. PMID: 12919683.

Bailey TL. et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(Web Server issue):W202–8. PMID: 19458158.

Hattori H [et al]. p53 shapes genome-wide and cell type-specific changes in microRNA expression during the human DNA damage response. *Cell Cycle*. 2014; 13(16):2572–86. PMID: 25486198.

Ivashchenko A [et al]. Binding Sites of miR-1273 Family on the mRNA of Target Genes. *Biomed Res Int*. 2014;2014:620530. PMID: 25243165.

Kato M. Cardio-miRNAs and onco-miRNAs: circulating miRNA-based diagnostics for non-cancerous and cancerous diseases // *Front Cell Dev Biol*. 2014;2:61 PMID: 25364765.

Reitsma W. Pelvic high-grade serous carcinoma in women with a BRCA1/2 mutation. *Carcinogenesis and early diagnosis*. Thesis, University of Groningen, the Netherlands, 2013.

Wen X, Deng FM., Wang J. MicroRNAs as predictive biomarkers and therapeutic targets in prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol*. 2014;2(3):219–30 PMID:25374924.

Witwer KW. Circulating MicroRNA Biomarker Studies: Pitfalls and Potential Solutions. *Clin Chem*. 2014. pii: clinchem.2014.221341. [Epub ahead of print]. PMID: 25391989.