

УДК 577

Кисляк Сергій Володимирович

старший викладач кафедри біомедичної кібернетики
Національного технічного університету України
«Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сікорського»

Приходько Олексій Олександрович

студент кафедри біомедичної кібернетики
Національного технічного університету України
«Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сікорського»

Кисляк Сергей Владимирович

старший преподаватель кафедры биомедицинской кибернетики
Национального технического университета Украины
«Киевский политехнический институт им. Игоря Сикорского»

Приходько Алексей Александрович

студент кафедры биомедицинской кибернетики
Национального технического университета Украины
«Киевский политехнический институт им. Игоря Сикорского»

Kyslyak Sergii Volodymyrovych

senior lecturer of the department of biomedical cybernetics
National Technical University of Ukraine
"Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute"

Prykhodko Oleksii Oleksandrovych

student of the department of biomedical cybernetics
National Technical University of Ukraine
"Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute"

**СИСТЕМА МОДЕЛЮВАННЯ ПОСТТРАНСКРИПЦІЙНОЇ
РЕГУЛЯЦІЇ ГЕНІВ**

**СИСТЕМА МОДЕЛИРОВАНИЯ ПОСТТРАНСКРИПЦИОННОЙ
РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОВ**

SYSTEM OF POST-TRANSCRIPTIONAL GENE GERULATION MODELING

Анотація. Проаналізовано найпопулярніші сервіси для передбачення miRNA мішеней. Розроблено програмний алгоритм роботи з сервісами. Досліджено головні фактори, що впливають на ефективність зв'язування між miRNA та мішенню. Розроблено сервіс для передбачення miRNA для заданої користувачем групи генів. Створені фільтри для результатів передбачення.

Ключові слова: miRNA, target site, регуляція генів, сервіс для передбачення мішеней, інгібування транскрипції.

Аннотация. Проанализировано самые популярные сервисы для предсказания miRNA мишеней. Разработано программный алгоритм для работы с этими сервисами. Исследованы главные факторы, что влияют на эффективность связывания между miRNA и мишенью. Разработан сервис для предсказания miRNA для заданной пользователем группы генов. Созданы фильтра для результатов предсказания.

Ключевые слова: микроРНК, мишень, регуляция генов, сервисы для предсказания мишеней, ингибирование транскрипции.

Summary. The most popular services for miRNA target prediction were analyzed. A program interface developed for working with target prediction services. Main factors which affect the efficiency of the link between miRNA and target, were reviewed. Service developed to predict miRNA for a user input based group of genes. Filters created for prediction results.

Keywords: miRNA, target site, gene regulation, service for target prediction, inhibition of transcription.

Постановка проблеми. Одним із механізмів регуляції експресії генів є регуляція на посттранскрипційному рівні за допомогою мікроРНК. Ці РНК є дуже маленькими (22-40 нуклеотидів), проте їх роль в регуляції

діяльності клітини дуже велика. Порушення синтезу може призвести до генетичних хвороб чи навіть раку[1]. З іншого боку, розуміння цього процесу може бути ключем до створення ліків від цих недугів. На даний момент у людини знайдено 2588 мікроРНК. Очевидно, що така кількість послідовностей є надто великою для одночасного експериментального підтвердження їх функціональності, адже вимагає наявності великої кількості часу та коштів. Саме тому актуальним є створення біоінформатичних інструментів, розроблених для передбачення сайтів зв'язування мікроРНК з геном-мішенню.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. miRNA – малі некодуєчі послідовності (22-25 нуклеотидів) які мають великий вплив на експресію генів[1]. На даний момент ведеться багато досліджень як функціональних особливостей, так і можливих можливого застосування miRNA. Одна з потенційних сфер – діагностування хвороби, вчасності раку[2]. Наразі існують дослідження, що підтверджують діагностичну цінність miRNA як тканинного маркеру, так і маркеру крові при діагностуванні раку нирок[3] так і раку молочної залози[4]. miRNA також мають вплив на розвиток тканин та органів організму. Зміна експресії miRNA протягом розвитку серця може призвести захворювань, таких як кардіоміопатія[5] та інших патологічних захворювань. На розвиток нервової системи miRNA також мають вплив[6]. Деякі дослідження виявили, що зміна або порушення в експресії miRNA може призвести до шизофренії, біполярного афективного розладу, сильній депресії та інших[7][8].

Активно розвиваються і вдосконалюються алгоритми передбачення мішеней. В червні 2015 році вийшла нова версія TargetScan7.0, яка реалізувала всі останні дослідження в області передбачення мішеней[9].

Виділення не вирішених раніше частин загальної проблеми. сервіси для передбачення мішеней в mRNA, такі як TargetScan, microRNA.org, mirWalk, miRanda надають можливість користувачу знайти

всі miRNA, які регулюють ген. Проте якщо користувачу треба знайти miRNA, які можуть впливати на певну групу генів, то для вирішення такої задачі ці сервіси не надають інструменту.

Мета статті. Головною метою цієї роботи було створити інструмент, який може знаходити всі miRNA, які регулюють певну групу генів та виводить достовірний результат в зручній для користувача формі з можливостями фільтрування даних. Для досягнення мети використовувались сервіси TargetScan, mirWalk, mirna.org.

Виклад основного матеріалу. МікроРНК – це ендегенні некодуючі РНК, що в середньому складаються з 21-25 нуклеотидів та відіграють важливу роль у клітинних процесах шляхом посттранскрипційної регуляції експресії генів [1].

На сьогодні відомо, що miRNA контролюють проліферацію, клітинну смерть, метаболізм ліпідів, відповідь на стрес, імунні відповіді, диференціацію клітин-попередників крові у ссавців, розвиток листя та квітів у рослин [1]. Вважається, що експресія щонайменше 50% людських генів регулюється miRNA[10]. Загалом, на сьогодні розшифровано послідовності для 35828 молекул мікроРНК у 223 видів організмів, серед яких 2588 належать людині [12].

Для пригнічення експресії генів до початку трансляції, miRNA комплементарно зв’язується з мРНК за допомогою ділянки з 2 по 8 нуклеотид на своєму 5’-кінці. Дана ділянка називається «seed region» та є ключовою для впізнавання сайтів-мішеней на мРНК. Існує дві точки зору, коли саме відбувається цей процес: на етапі ініціації трансляції або одразу після [11]. Якщо інгібування відбувається на етапі ініціації трансляції (рис. 1), то RISC (RNA induced silencing complex) перешкоджає приєднанню трансляційного апарату до мРНК [11]. Інгібування трансляції після того, як вона вже почалася, призводить до деградації білкового продукту та від’єднанні рибосомальних комплексів від мРНК. (рис. 1) [11].

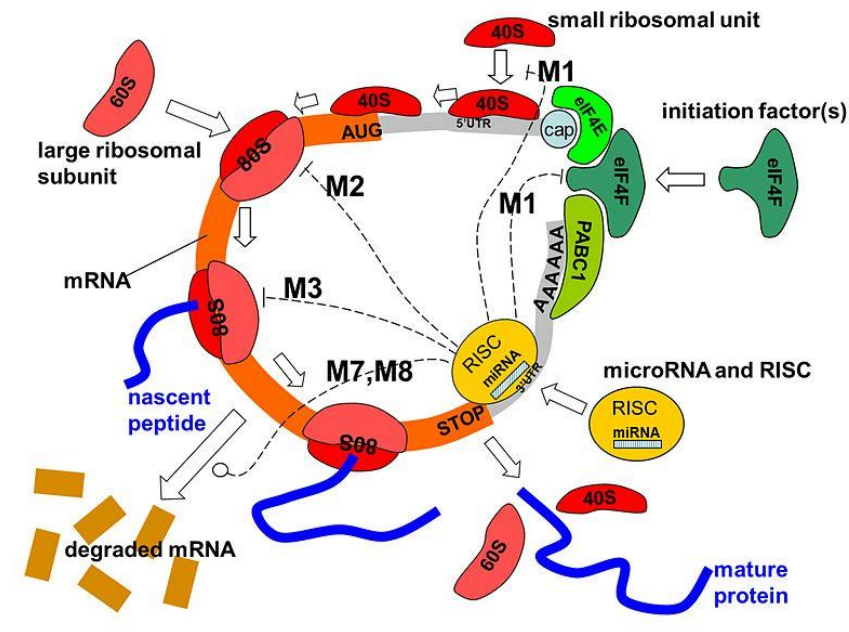
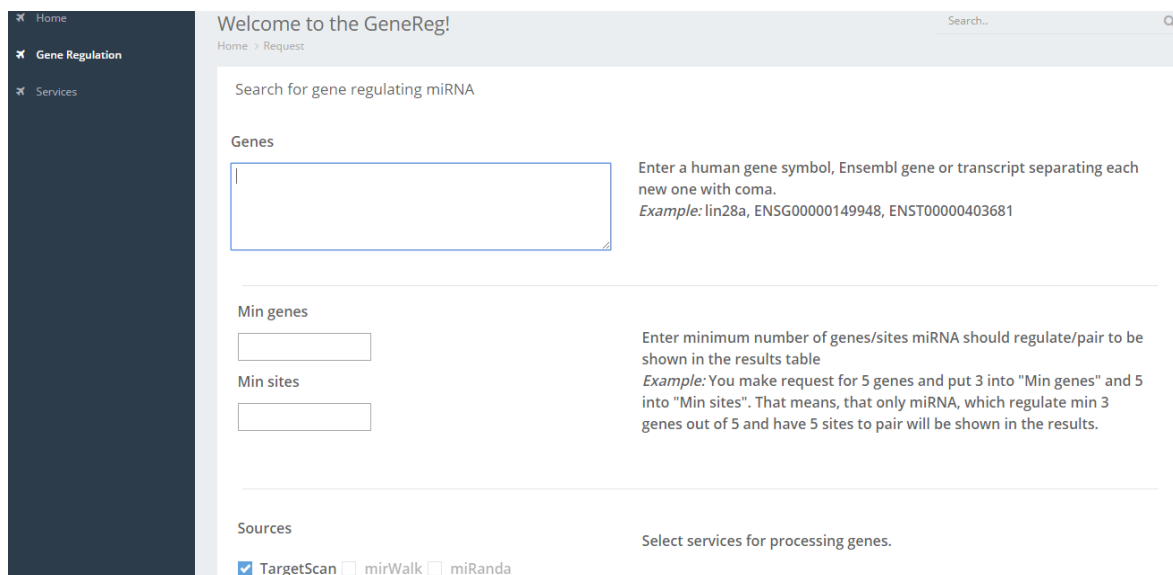


Рис 1. Механізм мікроРНК-опосередкованої регуляції генів

Під час роботи з miRNA, як правило, використовуються алгоритми, які дозволяють передбачити, з якими mRNA дана miRNA буде взаємодіяти або підібрати декілька miRNA до конкретної матричної. До найкращих біоінформатичних інструментів, використаних для даного аналізу, належать TargetScan, miRanda, PicTar, MirWalk, MirDB, PITA [13], [14], [15], [16], [17], [18].

Всі алгоритми різні, проте мають спільні кроки. Так, в основі кожного лежить локальне вирівнювання – процес, під час якого порівнюються фрагменти послідовностей. Вирівнювання дозволяє знайти ті нуклеотиди 3'НТП mRNA, до яких приєднується «seed region» miRNA. Окрім того, більшість алгоритмів враховують термодинамічну модель miRNA – mRNA дуплексу (кількість вільної енергії), на яку впливає вторинна структура РНК (наприклад, наявність чи відсутність шпильок)[19][20].

З метою розв'язку задачі пошуку всіх miRNA, що впливають на певну групу генів, був створений сервіс GeneReg[21]. Інтерфейс сервісу зображений на рис.2



The screenshot shows the GeneReg! web interface. On the left is a dark sidebar with navigation links: Home, Gene Regulation, and Services. The main content area is titled "Welcome to the GeneReg!" and "Home > Request". It features a search bar for "gene regulating miRNA". Below this are three input fields: "Genes", "Min genes", and "Min sites". To the right of each field is explanatory text and an example. The "Genes" field is accompanied by the text: "Enter a human gene symbol, Ensembl gene or transcript separating each new one with coma. Example: lin28a, ENSG00000149948, ENST00000403681". The "Min genes" field is accompanied by: "Enter minimum number of genes/sites miRNA should regulate/pair to be shown in the results table. Example: You make request for 5 genes and put 3 into 'Min genes' and 5 into 'Min sites'. That means, that only miRNA, which regulate min 3 genes out of 5 and have 5 sites to pair will be shown in the results." The "Min sites" field is accompanied by: "Enter minimum number of sites miRNA should regulate/pair to be shown in the results table. Example: You make request for 5 genes and put 3 into 'Min genes' and 5 into 'Min sites'. That means, that only miRNA, which regulate min 3 genes out of 5 and have 5 sites to pair will be shown in the results." At the bottom, there is a "Sources" section with the text "Select services for processing genes." and three checkboxes: TargetScan (checked), mirWalk, and miRanda.

Рис 2. Інтерфейс сервісу GeneReg

В перше поле “Genes” користувач вводить групу генів, для якої треба зробити пошук miRNA. Можна вводити символічне позначення гену, Ensembl gene чи transcript ID.

В поле “Min genes” вводиться мінімальна кількість генів, яку кожна ж miRNA повинна регулювати, а в поле “Min sites” мінімальна кількість ділянок зв’язування. Це надає користувачу можливість фільтрувати результат і задавати специфічність і чутливість пошуку.

Сервіс може використовувати наступні інструменти пошуку мішеней TargetScan, MirWalk, miRanda. Для підвищення достовірності результатів можна використовувати одночасно декілька алгоритмів пошуку. В такому випадку результати по кожному з сервісів, які вибрав користувач, будуть порівняні між собою, і у відповіді будуть представлені тільки ті miRNA, на які вказали декілька сервісів.

Приклад розв’язку задачі пошуку miRNA, що регулюють групу генів. Покажемо на прикладі, як працює сервіс і які задачі за допомогою нього можна вирішити. За біологічний процес візьмемо клатрин-опосередкований ендоцитоз – процес, завдяки якому відбувається постачання до клітини поживних речовин, транспорт патогенів, антигенів, факторів росту та рецепторів. Візьмемо дев’ять головних генів клатрин-

опосередкованого ендоцитозу – *eps15*, *dnm2*, *itsn2*, *fcho2*, *ap2b1*, *snx9*, *dnm3*, *hspa8*, *epn2*. Заповнимо вхідні дані, як вказано на рис 3.

The screenshot shows the GeneReg! web interface. At the top, it says "Welcome to the GeneReg!" with a search bar on the right. Below that, there's a section "Search for gene regulating miRNA". Under "Genes", a text box contains the list: *eps15*, *dnm2*, *itsn2*, *fcho2*, *ap2b1*, *snx9*, *dnm3*, *hspa8*, *epn2*. To the right of this box, there's an instruction: "Enter a human gene symbol, Ensembl gene or transcript separating each new one with coma. Example: lin28a, ENSG00000149948, ENST00000403681". Below the "Genes" section, there are two input fields: "Min genes" with the value "6" and "Min sites" with the value "5". To the right of these fields, there's an instruction: "Enter minimum number of genes/sites miRNA should regulate/pair to be shown in the results table. Example: You make request for 5 genes and put 3 into 'Min genes' and 5 into 'Min sites'. That means, that only miRNA, which regulate min 3 genes out of 5 and have 5 sites to pair will be shown in the results." At the bottom, there's a "Sources" section with checkboxes for "TargetScan" (checked), "mirWalk", and "miRanda". To the right of this section, it says "Select services for processing genes."

Рис 3. Введення даних для проведення пошуку

Щоб miRNA попала в результуючу виборку, вона повинна регулювати мінімум 6 генів, та мати 10 сайтів зв'язування. Як сервіс пошуку мішеней буде використаний TargetScan. Графічне представлення результатів запросу відображені на рис. 4. Табличне представлення – на рис. 5.

З результатів видно що, на задану групу генів впливають наступні miRNA:

hsa-miR-3163: 7 генів (*eps15 ap2b1 snx9 itsn2 fcho2 epn2 dnm3*), 17 сайтів;

hsa-miR-4668-5p: 6 генів (*eps15 ap2b1 snx9 itsn2 fcho2 dnm3*), 14 сайтів;

hsa-miR-3658: 6 генів (*eps15 hspa8 ap2b1 snx9 epn2 dnm3*), 10 сайтів;

hsa-miR-340-5p: 6 генів (*eps15 hspa8 snx9 fcho2 epn2 dnm3*), 13 сайтів;

hsa-miR-548c-3p: 6 генів (eps15 ap2b1 snx9 fcho2 epn2 dnm3), 28 сайтів;

hsa-miR-205-3p: 6 генів (eps15 ap2b1 itsn2 fcho2 epn2 dnm3) 11 сайтів;

hsa-miR-4659b-3p: 6 генів (eps15 ap2b1 snx9 fcho2 epn2 dnm3) 10 сайтів;

hsa-miR-524-5p: 6 генів (eps15 ap2b1 snx9 fcho2 epn2 dnm3), 15 сайтів;

hsa-miR-5692a: 6 генів (eps15 snx9 itsn2 fcho2 epn2 dnm3), 16 сайтів;

hsa-miR-374b-3p: 6 генів (eps15 ap2b1 itsn2 fcho2 epn2 dnm3), 10 сайтів;

hsa-miR-520d-5p: 6 генів (eps15 ap2b1 snx9 fcho2 epn2 dnm3), 15 сайтів;

hsa-miR-4659a-3p: 6 генів (eps15 ap2b1 snx9 fcho2 epn2 dnm3), 10 сайтів;

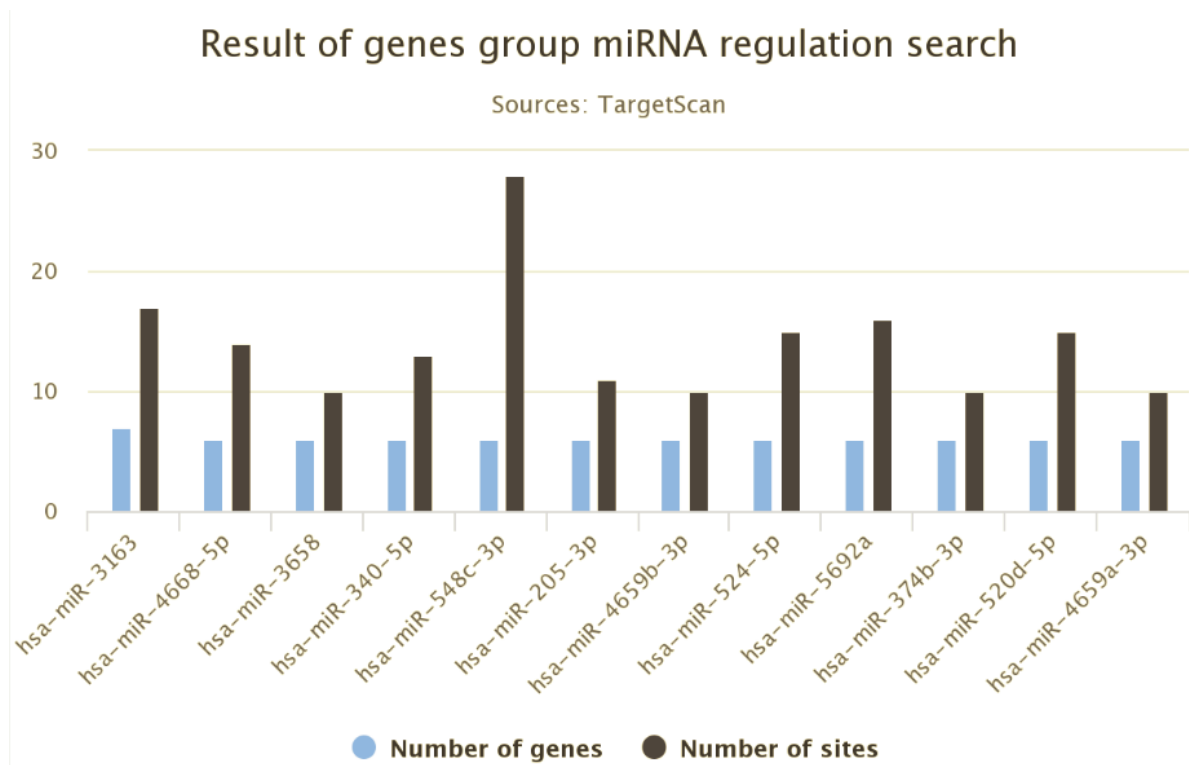


Рис. 4. Графічне представлення результату

The results of search are represented in the table.

hsa-miR-3163	Genes: 7	Sites: 17
<ul style="list-style-type: none"> • eps15 • ap2b1 • snx9 • itsn2 • fcho2 • epn2 • dnm3 		
hsa-miR-4668-5p	Genes: 6	Sites: 14
hsa-miR-3658	Genes: 6	Sites: 10
hsa-miR-340-5p	Genes: 6	Sites: 13
hsa-miR-548c-3p	Genes: 6	Sites: 28
hsa-miR-205-3p	Genes: 6	Sites: 11
hsa-miR-4659b-3p	Genes: 6	Sites: 10
hsa-miR-524-5p	Genes: 6	Sites: 15
hsa-miR-5692a	Genes: 6	Sites: 16
hsa-miR-374b-3p	Genes: 6	Sites: 10
hsa-miR-520d-5p	Genes: 6	Sites: 15
hsa-miR-4659a-3p	Genes: 6	Sites: 10

Рис. 5. Табличне представлення результату

Всього було знайдено 12 miRNA, що регулюють більше 6 генів та мають мінімум 10 сайтів зв'язування. Якщо зменшити мінімальну кількість генів чи сайтів, то в результат потрапить більше miRNA. Таким чином користувач може сам визначати чутливість пошуку.

Висновки і перспективи розвитку. Було створено інструмент, який дозволяє провести пошук miRNA, що впливають на групу генів, використовуючи сервіси пошуку мішеней. Даний інструмент може бути використаний для швидкого пошуку регуляторних miRNA для біологічного процесу. Також даний сервіс може бути використаний для пошуку достовірних miRNA, бо може працювати з декількома популярними алгоритмами пошуку мішеней, таких як TargetScan, mirWalk, miRanda. Ще одна перевага даного сервісу – зручне подання інформації як в графічному, так і в табличному вигляді. Користувач також може зберегти результати в зручному для нього форматі (.pdf, .jpeg, .png, .svg).

Сервіс можна покращити наступним чином:

- підвищення швидкодії запитів завдяки асинхронності при роботі з різними сервісами;
- створення особистого кабінету користувача, де можна буде зберігати результати запитів;
- додавання посилань для кожної miRNA на її характеристику в mirBase;
- інтеграція з іншими популярними сервісами для пошуку мішеней.

Список літератури

1. Bartel D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function / Cell. - 2004. - Vol. 116 - P. 281–297.
2. Faruq O. microRNA: Diagnostic Perspective / Front Med (Lausanne). – 2015.
3. Строй О.О. Цінність мікро-РНК-508-3р у діагностиці раку нирки / Строй О.О., Банира О.Б., Досенко В.Є., Строй Д.О, Шуляк О.В. // Український медичний часопис. – 2012. - №6(92).
4. Поспехова Н.І. Експресійний аналіз мікроРНК для діагностики і прогнозу раку молочної залози / Поспехова Н.І., Поярков С.В., Зенит-Журавльова Є.Г., Шубін П.В., Карпукін А.В., Каткова А.В., Хайленко В.А. // Злоякісні пухлини – 2012. – Том 2, №2
5. Thum T. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure / Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, Doevendans PA, Mummery CL, Borlak J, Haverich A, Gross C, Engelhardt S, Ertl G, Bauersachs J. // Circulation – 2007. - 116(3):258-67.
6. Amin ND Loss of motoneuron-specific microRNA-218 causes systemic neuromuscular failure. / Amin ND, Bai G, Klug JR, Bonanomi D, Pankratz MT, Gifford WD, Hinckley CA, Sternfeld MJ,

- Driscoll SP, Dominguez B, Lee KF, Jin X, Pfaff SL. // *Science* – 2015. - 18;350(6267):1525-9.
7. Hommers LG Heterogeneity and individuality: microRNAs in mental disorders. / Hommers LG, Domschke K, Deckert J. // *J Neural Transm (Vienna)*. – 2015. – Jan; 122(1):79-97. doi: 10.1007/s00702-014-1338-4. Epub 2014 Nov 14.
8. Beveridge NJ. Schizophrenia is associated with an increase in cortical microRNA biogenesis. / Beveridge NJ, Gardiner E, Carroll AP, Tooney PA, Cairns MJ. // *Mol Psychiatry*. – 2010. – 15(12):1176-89.
9. Agarwal V. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs / Agarwal V., W Bell G., Nam, JW, P Bartel D. // *eLife*. – 2015.
10. Liu N-K. MicroRNA in central nervous system trauma and degenerative disorders / Nai-Kui Liu, Xiao-Ming Xu // *Physiological Genomics*. - 2011. - Vol. 43, № 10 - P. 571-580.
11. Stefani G. Small non-coding RNAs in animal development / Giovanni Stefani, Frank J. Slack.
12. miRBase: [Электронный ресурс]. – Режим доступа <http://www.mirbase.org/>
13. MiRanda: [Электронный ресурс]. – Режим доступа <http://www.microrna.org/>
14. MirDB: [Электронный ресурс]. – Режим доступа <http://mirdb.org/miRDB/>
15. MirPath [Электронный ресурс]. – Режим доступа <http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>
16. MirWalk: [Электронный ресурс]. – Режим доступа <http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>
17. PicTar: [Электронный ресурс]. – Режим доступа <http://pictar.mdc-berlin.de/>
18. PITA: [Электронный ресурс]. – Режим доступа <http://genie.weizmann.ac.il/>

19. Edris B. A comparison of the Oligomap and TargetScan algorithms for miRNA target analysis / BIOC 218 Final Project.
20. Witkos T. M. Practical Aspects of microRNA Target Prediction / T.M Witkos, E Koscianska, W.J Krzyzosiak // Curr Mol Med. - 2011. - Vol. 11(2) - P. 93–109.
21. GeneReg: [Электронный ресурс]. – Режим доступа <http://dierme.pythonanywhere.com/>