

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МИКРО РНК В ИНТРОНАХ И ОКРЕСТНОСТЯХ ГЕНОВ *CGA*, *FSHB*, *LHB*, *TSHB* У МЛЕКОПИТАЮЩИХ С ФОРМИРОВАНИЕМ РАЗЛИЧНОГО ЧИСЛА ДОМИНИРУЮЩИХ ФОЛЛИКУЛОВ

Шкурат Т.П.¹, Романов Д.Е.¹, Пономарева Н.С.¹, Бахтадзе Г.Б.¹,
Лянгасова О.В.¹, Тимофеева С.В.¹, Батталов Д.¹, Панич А.Е.,¹ Капранов Ф.²

¹*Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, 344090, Россия*

²*St.Laurent Institute, Woburn, Massachusetts 01801, USA.*

Репродуктивная функция человека зависит от комплексных, но строго предопределенных гипоталамо-гипофизарно-гонадных взаимодействий. Фолликулогенез рассматривается как постоянный процесс иерархии фолликулов, при котором одновременно происходит рост и созревание одних фолликулов и атрезия других. Почему в каждом менструальном цикле женщины в развитие вступают в среднем около 30 фолликулов, а продолжает свое развитие только один - доминирующий фолликул, в то время как у других млекопитающих число доминирующих фолликулов в одном цикле может быть намного больше десяти? При этом как число одновременно созревающих доминантных фолликулов, так и число детенышей в помете эволюционно закрепленный признак, относящийся к стойким морфо-физиологическим характеристикам вида. Например, у мыши одновременно овулирует более 8 фолликулов, начиная с 2-х месячного возраста животного, а у человека один с 12 лет. Учитывая, что гены основные которые регулируют время и число созревающих фолликулов - альфа цепь гонадотропного гормона (*CGA*), фолликулостимулирующий гормон (*FSHB*), лютеинизирующий гормон (*LHB*) и тиреотропный гормон (*TSHB*). практически одинаковы у всех млекопитающих, а такие значительные различия могут найти отражения в системе

регуляции этих генов. Ранее было показано, что некодирующие белок участки ДНК транскрибируются и разные типы РНК принимают активное участие в регуляции активности генов, клеточной дифференцировке, апоптозе и других процессах (ENCODE,2012; Li J., Zhang Z. 2013; de Hoon M.,2015). Некодирующие последовательности имеют огромный потенциал для продвижения нашего полного понимания биологических процессов при нормальном развитии человека и при различных заболеваниях (Капранов Р. е.а., 2010; St Laurent G. et al., 2012; Chang T. C. et al. 2015). Однако, многие закономерности функционирования и распределения регуляторных некодирующих белок последовательностей ДНК в геномах эукариот еще не найдены. Одним из важных регуляторных элементов транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов является микро РНК, которая в значительном количестве, как правило, локализована в интронах и межгенных пространствах генома. МикроРНК транскрибируется вместе с геном-мишенью и регулирует его экспрессию. Целью данного исследования было изучение особенностей распространения микроРНК вокруг генов гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси у млекопитающих с разным числом доминирующих фолликулов. Распространенность микро РНК рассматривали в геномах следующих животных с одним доминирующим фолликулом - Homo sapiens, Ovis aries, Bos taurus, Gorilla gorilla, Macaca mulatta, Pan troglodytes Pongo abelii, Ovis aries. Животных с двумя и более числом доминирующих фолликул - Canis lupus, Mus musculus, Oryctolagus cuniculus, Sus scrofa, Rattus norvegicus.

Материалы и методы

В геномах животных исследовали локализацию микроРНК в интронах и цис-регуляторных районах генов - альфа цепи гонадотропного гормона (CGA), фолликулостимулирующего гормона (FSHB), лютеинизирующего гормона (LHB) и тиреотропного гормона (TSHB). Все последовательности были извлечены из базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) помощью набора скриптов

разработанного нами набора IFITCH. Последовательности микроРНК для поиска гомологов были взяты из базы данных miRBase (<http://mirbase.org/>). Биоинформационный анализ осуществлялся с помощью GLAM2 и разработанного нами программного обеспечения Mscanner (Shkurat e.a.,2015). Результаты первоначального поиска GLAM2 фильтровали с получением только тех последовательностей в которых степень гомологии к нуклеотидов была больше 85 %, как для пре-микро РНК, так и для зрелой микро РНК. В таблице 1 показана длина в п.н. окрестностей и генов альфа цепи гонадотропного гормона (*CGA*), фолликулостимулирующего гормона (*FSHB*), лютеинизирующего гормона (*LHB*) и тиреотропного гормона (*TSHB*).

Таблица 1.

Длина в п.н. генов *CGA*, *FSHB*, *LHB*, *TSHB* и их окрестностей (межгенное пространство до гена, после гена, интроны и экзоны гена у различных млекопитающих

Вид млекопитающего	CGA	FSHB	LHB	TSHB
Виды животных с одним доминирующим фолликулом				
<i>Homo sapiens</i>	105017	306072	2322	52641
<i>Bos taurus</i>	140103	129663	6115	77492
<i>Macaca mulatta</i>	107053	182574	1932	28339
<i>Gorilla gorilla</i>	106670	319308	-	52535
<i>Pan troglodytes</i>	111105	311556	1787	53594
<i>Pongo abelii</i>	113653	323744	-	29958
<i>Ovis aries</i>	105186	131798	6576	41600
Виды млекопитающих с двумя и более доминирующими фолликулами				
<i>Sus scrofa</i>	123266	157565	4801	50278
<i>Oryctolagus c.</i>	105889	161692	1413	78572
<i>Rattus norvegicus</i>	24363	299614	3775	72001

Шкурат Т. П., Романов Д. Е., Пономарева Н. С., Бахтадзе Г. Б., Лянгасова О. В., Тимофеева С. В., Батталов Д. В., Панич А. Е., Капранов Ф., Распространенность микро РНК в интронах и окрестностях генов *CGA*, *FSHB*, *LHB*, *TSHB* у млекопитающих с формированием различного числа доминирующих фолликулов // «Живые и биокосные системы». – 2015. – № 14; URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-14/article-13>

Mus musculus	25867	66405	1405	46189
Canis lupus	128897	151836	7094	45626

Результаты исследований

В результате биоинформационного анализа на участках с общей длиной более 4 миллионов пар нуклеотидов было обнаружено 5967 совпадений с последовательностями зрелых микроРНК, зарегистрированных в базе данных miRBase. Зрелые микроРНК (шпильки) обнаружены у всех исследуемых животных. В цис-регуляторных районах гена *CGA* у животных с формированием одного доминантного фолликула расположено от 167 до 262 зрелых микроРНК, что практически в два раза больше по сравнению с группой животных имеющих два и более одновременно созревающих фолликулов (n=68-130). В гене *FSHB* у животных с формированием одного доминантного фолликула расположено от 267 до 367 зрелых микроРНК, что существенно превышает эти значения в группе животных с большим числом доминантных фолликулов (n=99-217). У всех животных вокруг гена *LHB* локализовано от 1 до 9 молекул микроРНК, а вокруг гена *TSHB* от 11 до 219, при этом не обнаружено зависимости их количества от числа созревания доминирующих фолликулов (таблица 2).

Таблица 2.

Число локализованных микро РНК вокруг генов гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси некоторых млекопитающих

	CGA	FSHB	LHB	TSHB
Виды животных с одним доминирующим фолликулом				
<i>Ovis aries</i>	212	90	13	53
<i>Bos taurus</i>	242	95	5	75
<i>Macaca mulatta</i>	157	267	2	84
<i>Gorilla gorilla</i>	238	361	-	77

Homo sapiens	262	365	2	85
Pan troglodytes	218	347	3	94
Pongo abelii	260	567	-	129
Виды млекопитающих с двумя и более доминирующими фолликулами				
Sus scrofa	139	99	4	39
Canis lupus	66	114	9	11
Oryctolagus cun.	97	173	2	79
Rattus norvegicus	68	217	6	212
Mus musculus	164	105	1	59

Обнаружена высокая корреляция числа микро РНК и показателями репродуктивной системы (таблица 3). Расчет коэффициентов корреляции позволил установить зависимости между числом найденных зрелых микроРНК в окрестностях генов *CGA* и *FSHB* и показателями репродуктивной системы.

Число локализованных молекул микроРНК вокруг гена *CGA* у всех исследуемых животных положительно коррелировалось с продолжительностью беременности $r=0,89$; весом при рождении $r=0,86$; интервалом между родами $r=0,79$ и с продолжительностью жизни вида $r=0,7$. Отрицательная корреляция обнаружена с продолжительностью овуляции(эструса) $r=-0,83$; количеством детенышей в выводке $r=-0,82$; количеством выводков в год $r=-0,74$.

Число локализованных молекул микроРНК вокруг гена *FSHB* положительно коррелировалось с возрастом начала половой зрелости у самок $r=0,77$; интервалом между родами, $r=0,87$; количеством выводков в год $r=0,74$, продолжительностью жизни $r=0,79$; продолжительностью цикла $r=0,678$.

Коэффициенты корреляции между числом микро РНК в окрестностях генов *CGA*, *FSHB*, *LHB*, *TSHB* и морфо- физиологическими показателями репродуктивной системы вида

Физиологический показатель	<i>CGA</i>	<i>FSHB</i>	<i>LHB</i>	<i>TSHB</i>
вес (самки) г	0,382	-0,246	0,090	-0,126
продолжительность жизни (лет)	0,708	0,792	-0,191	-0,019
половая зрелость у самок	0,687	0,765	-0,302	0,098
тип цикла	0,480	0,392	-0,251	0,542
продолжительность цикла (дни)	0,566	0,678	-0,123	-0,271
количество выводков в год	-0,743	-0,527	-0,255	0,129
Количество детенышей в выводке	-0,827	-0,491	0,006	0,193
продолжительность овуляции (эструса)	-0,830	-0,532	0,128	0,121
Беременность (дни)	0,890	0,567	-0,066	-0,018
вес при рождении (г)	0,860	0,440	0,314	-0,239
интервал между родами (дни)	0,789	0,867	0,066	0,676

Наибольшее число корреляционных зависимостей между показателями репродуктивной системы и числом локализованных микро РНК в межгенном пространстве обнаружено с геном *CGA*. Ген *CGA* кодирует альфа цепь для четырех гормонов – фолликулостимулирующего (FSH), лютеинизирующего гормона (LH), тиреотропного TSH и хорионического гонадотропина (CG). Рассмотрим подробно типы микро РНК локализованные вокруг этого гена. Вокруг гена *CGA* у приматов локализуется более 200 микро РНК. В таблице 4 представлены наиболее часто встречаемые молекулы.

Количество молекул mir-566; mir-1268; hsa-mir-3929; hsa-mir-1273e; hsa-mir-5096 локализованных вокруг гена CGA у приматов

	mir-566			mir-1268		hsa-mir-1273e	hsa-mir-3929	hsa-mir-5096
	ptr-mir-566	ppy-mir-566	hsa-mir-566	hsa-mir-1268a	ppy-mir-1268			
Gorilla gorilla	1	1	1	1	6	1	3	5
Homo sapiens	0	0	1	3	6	1	2	6
Macaca mulatta	3	3	3	5	6	1	1	8
Pan troglodytes	1	1	1	3	6	2	3	8
Pongo abelii	1	6	1	3	6	2	3	8

Как видно из таблицы у всех исследуемых приматов в межгенном пространстве и интронах мы обнаруживали хотя бы одну копию зрелого гена *hsa-mir-566*. Ранее было показано, что в интронах приматов локализуется мотивы гомологичных последовательностей шпильки *hsa-mir-566* или *hsa-mir-619*. Процент встречаемости *hsa-mir-566* от общего числа всех типов микроРНК локализованных в интронах генов человека составлял 45.34% (Hill A. E., Sorscher E. 2012). Высокая копияность генов *hsa-mir-5096* и *hsa-mir-1268* была нами обнаружена ранее, при анализе распространенности микро РНК у приматов вокруг генов оси соматотропина - *GHI*, *GHRH*, *SST*, и *IGF1* (Shkurat T. et al., 2015). Более вероятно, что специфическое значения для времени и числа созревания фолликулов будут иметь гены микро РНК *hsa-mir-3929*; *hsa-mir-1273e*; а также другие, которые встречались однократно, и роль которых в регуляции фолликулогенеза необходимо будет подтвердить в дальнейшем экспериментально.

Открытия в течении последнего десятилетия показывают, что РНК работает не только как функциональный посланник между ДНК и белком, но также участвует

в регуляции и организации генома, в регуляции экспрессии генов, и ее роль увеличивается с усложнением (увеличением сложности) организма (Hill A. E. et., 2005) . Показана важная роль РНК в эпигенетических процессах, которые контролируют дифференциацию и развитие. Эти открытия показывают, что РНК, кажется, играет центральную роль в эволюции и онтогенезе человека (Оловников, 2007; 2009) . Очевидно и микроРНК выполняют важную регуляторную роль в процессе фолликулогенеза.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Высокие технологии» ЮФУ при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, проект RFMEF159414X0002.

Список используемой литературы

1. Оловников А. М. Роль парагенома в развитии организмов //Онтогенез. – 2007. – Т. 38. – №. 2. – С. 136-158.
2. Оловников А. М. Биологическая эволюция на основе неслучайной изменчивости, регулируемой организмом //Биохимия. – 2009. – Т. 74. – №. 12. – С. 1722-1728.
3. Chang T. C. et al. Genome-wide annotation of microRNA primary transcript structures reveals novel regulatory mechanisms //Genome research. – 2015.
4. Hill A. E., Sorscher E. J. Massive microRNA sequence conservation and prevalence in human and chimpanzee introns //genome. – 2012. – Т. 3079. – №. 32884. – С. 698069.
5. Kapranov P. et al. The majority of total nuclear-encoded non-ribosomal RNA in a human cell is 'dark matter'un-annotated RNA //BMC biology. – 2010. – Т. 8. – №. 1. – С. 149.

6. de Hoon M., Shin J. W., Carninci P. Paradigm shifts in genomics through the FANTOM projects //Mammalian Genome. – 2015. – Т. 26. – №. 9-10. – С. 391-402.
7. St Laurent G. et al. Intronic RNAs constitute the major fraction of the non-coding RNA in mammalian cells //BMC genomics. – 2012. – Т. 13. – №. 1. – С. 504.
8. Li J., Zhang Z. miRNA regulatory variation in human evolution //Trends in Genetics. – 2013. – Т. 29. – №. 2. – С. 116-124.
9. Shkurat, T., Romanov, D., Pshenichnyy, E., Ponomareva, N., Alexsandrova, A., Bakhtadze, G., & Lomteva, S. (2015). Prevalence of miRNAs in Introns and Cis-Regulatory Regions of Genes of the Somatotropic Axis in Mammals. //American Journal of Applied Sciences. – 2015. – Т. 12. – №. 1. – С. 1.