

Особенности взаимодействия piRNA с mRNA гена *FGF2*

Иващенко А.^{1, 2*}, Пыркова А.^{1, 2}, Акимниязова А.¹, Керимов Т.¹, Ершов И.¹, Султанбеков С.¹

¹ КазНУ им. Аль-Фараби, Алматы, Казахстан

² ТОО «Центр биоинформатики и наномедицины», Алматы, Казахстан

* a.iavashchenko@gmail.com

Ключевые слова: ген; *FGF2*; mRNA; piRNA; человек

Мотивация и цель: Семейство генов факторов роста фибробластов (*FGF*) состоит из 23 генов. Многие из них, в том числе *FGF2*, участвуют в развитии различных заболеваний. Поэтому представляется важным выяснить, могут ли piRNA участвовать в регуляции экспрессии этих генов [1]. Нами установлено, что mRNA некоторых генов семейства *FGF* не связываются с piRNA, в то время как mRNA гена *FGF2* взаимодействовала со многими piRNA и важно выявить особенности их связывания.

Методы и алгоритмы: Программа MirTarget определяет начало сайтов связывания piRNA и mRNA; локализацию сайтов связывания в 5'UTR, CDS и 3'UTR; свободная энергия гибридизации (ΔG , кДж/моль), величина $\Delta G/\Delta G_m$ (%), где ΔG_m равна свободной энергии связывания piRNA с полностью комплементарной нуклеотидной последовательностью и схемой взаимодействия нуклеотидов piRNA-mRNA. Выборочно были отобраны сайты связывания piRNA-mRNA со значением $\Delta G/\Delta G_m$, равным 90 % и более. Положение сайтов связывания указано от первого нуклеотида в 5'UTR mRNA. Взаимодействие нуклеотидов между piRNA и mRNA генов-мишеней не только в аденине и урациле (A-U), гуанине и цитозине (G-C), но и между A-C и G-U.

Результаты: Установлено, что из одного миллиона piRNA (piR-10 to piR-999999) с mRNA гена *FGF2* связывались piRNA только в 3'UTR имеющей длину 6652 nt. С mRNA гена *FGF2* связывались 219 piRNA начиная с piR-34640 до piR-950352. Из них piR-70255, piR-197381, piR-197597, piR-200742, piR-207197, piR-293655, piR-325736, piR-417654, piR-436961, piR-520416 и piR-919763 имели длину 34 нт. Для piR-618251 длиной 31 нуклеотид приведена схема взаимодействия с 3'UTR mRNA гена *FGF2* (рис.1) начиная с позиции 2910 нт. piR-618251 взаимодействовала с mRNA за счет образования 28 канонических пар A-U, G-C и трех неканонических пар A-C и G-U. Величина свободной энергии связывания равная -161 kJ/mol составляла 94 % от $\Delta G/\Delta G_m$ – максимальной свободной энергии связывания piR-618251 с mRNA.

Все сайты связывания piRNA располагались в 3'UTR участке mRNA с 2836 до 3134 нт, то есть длиной 298 нт. Распределение сайтов связывания piRNA в этом участке было с отчетливым максимумом в центре участка. Были выявлены piRNA начало сайтов связывания которых совпадали, и они образовывали группы piRNA от двух piRNA до 21 piRNA имеющих начало сайтов связывания в одной позиции. В сайтах связывания с началом с 2888 и с 2889 нт связывались по пять piRNA. В сайтах с началом связывания с 2892, 2893, 2897 и 2898 нт связывались по шесть piRNA. На рис. 2 показано как 21 piRNA могут связываться с mRNA гена *FGF2* в

позиции 2910 нт. Число неканонических пар связывания (G-U и A-C) изменялось от одной до четырех пар, что соответствует величине $\Delta G/\Delta G_m$ более 90 %.

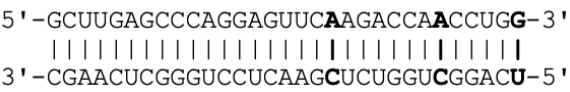


Рис. 1. Схема взаимодействия piR-618251 с mRNA гена *FGF2*. Жирным шрифтом выделены неканонические пары нуклеотидов

5'-GCUUGAGCCCAGGAGUUC AA GACCA ACC UGG-3'	mRNA <i>FGF2</i>
3'-CGAACUCGGGUCCUCAAG CC UCUGGU CGG ACU-5'	piR-618251
3'-CGA GC UCG AG UCU U CAAGUUCUGGU CGG AC-5'	piR-723102
3'-CGA GU UC AA GUCCUCAAGUUCUGGU CGG A-5'	piR-591009
3'-CGAACU UG AGUCCUCAAG CC UCUGGU CGG A-5'	piR-635311
3'-CGAACUC AGG UCCUCAAGUUCUGGU CAG -5'	piR-414978
3'-CGAA UUC AA GUCCUCAAGUUCUGGU CG -5'	piR-811352
3'-CGAACUC AA GU U CUCAAGUUCUGGU C -5'	piR-42935
3'-CGAA UUC AG UCCUCAAGUUCUGGU U -5'	piR-51132
3'-CGAACUCGGGUCCUCAAGU UU UGGU U -5'	piR-114311
3'-CGAACUCGGGUCCUCAAGU CC UGGU C -5'	piR-613002
3'-CGAACUC AGG UCCU U AAG CC UCUGGU C -5'	piR-711504
3'- UGG ACUCGG ACC CUCAAGUUCUGGU-5'	piR-283642
3'-CGAACUC AG UCCUCAAGUUCU AGU -5'	piR-411668
3'-CGAACUC AA GU U CUCAAGUUCUGGU-5'	piR-534739
3'-CGAACUC AG UCCUCAAGUUCUGGU-5'	piR-555444
3'-CG GAC UCG AG UCC CA AGUUCUGGU-5'	piR-593416
3'-CGAACUC AG UCCUCAAGUUCU AAU -5'	piR-708359
3'-CG GAC UCGGGUCCUCAAG CUU UGGU-5'	piR-814823
3'-CGAACUC AGG UCCUCAAGUUC CGA -5'	piR-87465
3'-CGAA UUU GGGUCCUCAAGUUCUGG-5'	piR-230717
3'-CGAACUC AA GUCCU U AAGUUCUGG-5'	piR-441972

Рис. 2. Нуклеотидные последовательности piRNA связывающихся с позиции 2910 нт кластера сайтов связывания в mRNA гена *FGF2*. Жирным шрифтом выделены нуклеотиды неканонических пар

Весь участок mRNA длиной 273 нт фактически является одним кластером сайтов связывания 219 piRNA. Полученные результаты свидетельствует о конкуренции этих piRNA за связывание с mRNA гена *FGF2*. С учетом свободной энергии взаимодействия и концентрации piRNA можно предсказывать какой эффект будет наблюдаться для каждой piRNA. Кроме piRNA из данной группы нужно учитывать и другие piRNA которые тоже конкурентно могут связываться с mRNA если их сайты связывания перекрываются с сайтами связывания piRNA этой группы и других групп piRNA. В настоящее время трудно интерпретировать зачем столько piRNA вовлечены в контроль экспрессии одного гена. При этом сайты связывания

этих piRNA расположены компактно в небольшом участке mRNA. Учитывая, что данный пример не является единственным, и наблюдается для других ассоциаций miRNA и piRNA с mRNA [2–6], то обнаруженные явления требуют дальнейшего исследования.

Выводы: piRNA могут подавлять трансляцию mRNA гена *FGF2* путем образования канонических и неканонических пар нуклеотидов.

Features of the interaction of piRNA with mRNA of the *FGF2* gene

Ivashchenko A.^{1, 2*}, Pyrkova A.^{1, 2}, Akimniyazova A.¹, Kerimov T.¹, Yershov I.¹, Sultanbekov S.¹

¹ al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

² Center for Bioinformatics and Nanomedicine, Almaty, Kazakhstan

* a.iavashchenko@gmail.com

Key words: gene; *FGF2*; mRNA; piRNA; human

Motivation and aim: The fibroblast growth factor (*FGF*) gene family consists of 23 genes. Many of them, including *FGF2*, are involved in the development of various diseases. Therefore, it seems important to find out whether piRNAs can participate in the regulation of the expression of these genes [1]. We found that the mRNA of some genes of the *FGF* family does not bind to piRNA, while the mRNA of the *FGF2* gene interacted with many piRNA and it is important to identify the features of their binding.

Methods and algorithms: MirTarget program defines the beginning of piRNA and mRNA binding sites; localization of binding sites in the 5'UTR, CDS and 3'UTR; free energy of hybridization (ΔG , kJ/mol), the $\Delta G/\Delta G_m$ (%) value, where ΔG_m equals the free binding energy of piRNAs with fully complementary nucleotide sequence and scheme of piRNA-mRNA nucleotides interaction. There were selectively taken the piRNAs-mRNAs binding sites with $\Delta G/\Delta G_m$ value is equal to 90 % and more. Position of binding sites indicated from the first nucleotide in 5'UTR of mRNA. The interaction of nucleotides between piRNAs and mRNAs of target genes not only in adenine and uracil (A-U), guanine and cytosine (G-C), but between A-C and G-U.

Results: It was found that out of one million piRNA (piR-10 to piR-999999) the mRNA of *FGF2* gene was bound by piRNA only in the 3'UTR, which is 6652 nt in length. 219 piRNAs, starting from piR-34640 to piR-950352, were associated with *FGF2* gene mRNA. Of these, piR-70255, piR-197381, piR-197597, piR-200742, piR-207197, piR-293655, piR-325736, piR-417654, piR-436961, piR-520416 and piR-919763 had a length 34 nt. For piR-618251, 31 nucleotides long, a diagram of interaction with the 3'UTR mRNA of the *FGF2* gene is shown (Fig. 1) starting from position 2910 nt. piR-618251 interacted with mRNA through the formation of 28 canonical A-U, G-C pairs and three non-canonical A-C and G-U pairs. The free energy of binding equal to – 161 kJ/mol was 94 % of $\Delta G/\Delta G_m$ – the maximum free energy of binding of piR-618251 to mRNA.

All piRNA binding sites were located in the 3'UTR region of mRNA from 2836 nt to 3134 nt, i.e., 298 nt in length. The distribution of piRNA binding sites in this region was with a distinct maximum in the center of the region. piRNAs whose binding site origins

coincided were identified, and they formed piRNA groups from two piRNAs to 21 piRNAs with binding site origins in the same position. At the binding sites starting at 2888 nt and at 2889 nt, five piRNAs were bound. At the binding sites at 2892 nt, at 2893 nt, at 2897 nt, and at 2898 nt, six piRNAs were bound. Figure 2 shows how 21 piRNAs can bind to the FGF2 gene mRNA at position 2910 nt. The number of non-canonical binding pairs (G-U and A-C) varied from one to four pairs, which corresponds to a $\Delta G/\Delta G_m$ value of more than 90 %.

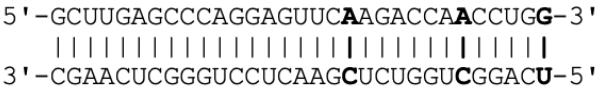


Fig. 1. Scheme of interaction of piR-618251 with mRNA of *FGF2* gene. Non-canonical nucleotide pairs are highlighted in bold

5'-GCUUGAGCCCAGGAGUUC AAGACCAACCUGG -3'	mRNA <i>FGF2</i>
3'-CGAACUCGGGUCCUCAAG CUCUGGUCGGACU -5'	piR-618251
3'-CGA GCUCGAGUCU CAAGUUCUGGU CGGAC -5'	piR-723102
3'-CGA GUUCAAGUCCUCAAGUUCUGGU CGGA-5'	piR-591009
3'-CGAACU UGAGUCCUCAAGCUCUGGU CGGA-5'	piR-635311
3'-CGAACUC AGGUCCUCAAGUUCUGGU CA G -5'	piR-414978
3'-CGAA UUCAGUCCUCAAGUUCUGGU CG-5'	piR-811352
3'-CGAACUC AAGUUCUCAAGUUCUGGU C-5'	piR-42935
3'-CGAA UUCAGUCCUCAAGUUCUGGUU -5'	piR-51132
3'-CGAACUCGGGUCCUCAAGU UUGGUU -5'	piR-114311
3'-CGAACUCGGGUCCUCAAGU CCUGGU C-5'	piR-613002
3'-CGAACUC AGGUCCUUAAGCUCUGGU C-5'	piR-711504
3'- UGGACUCGGACCCUCAAGUUCUGGU -5'	piR-283642
3'-CGAACUC AGUCCUCAAGUUCUAGU -5'	piR-411668
3'-CGAACUC AAGUUCUCAAGUUCUGGU -5'	piR-534739
3'-CGAACUC AGUCCUCAAGUUCUGGU -5'	piR-555444
3'-CG GACUCGAGUCCCAAGUUCUGGU -5'	piR-593416
3'-CGAACUC AGUCCUCAAGUUCUAAU -5'	piR-708359
3'-CG GACUCGGGUCCUCAAGCUUUGGU -5'	piR-814823
3'-CGAACUC AGGUCCUCAAGUUCCGA -5'	piR-87465
3'-CGAA UUUGGUCCUCAAGUUCUGG -5'	piR-230717
3'-CGAACUC AAGUCCUUAAGUUCUGG -5'	piR-441972

Fig. 2. Nucleotide sequences of piRNA binding from position 2910 nt of the binding site cluster in the mRNA of *FGF2* gene. Nucleotides of non-canonical pairs are highlighted in bold

The entire 273-nt region of mRNA is actually one cluster of 219 piRNA binding sites. The results obtained indicate that these piRNAs compete for binding to the *FGF2* gene mRNA. Considering the free energy of interaction and the concentration of piRNA, it is possible to predict what effect will be observed for each piRNA. In addition to piRNA from this group, it is necessary to consider other piRNAs that can also competitively

bind to mRNA if their binding sites overlap with the binding sites of piRNAs of this group and other piRNA groups. At present, it is difficult to interpret why so many piRNAs are involved in controlling the expression of a single gene. Moreover, the binding sites for these piRNAs are located compactly in a small region of mRNA. Considering that this example is not the only one and is observed for other associations of miRNA and piRNA with mRNA [2-6], the detected phenomena require further study. *Conclusion:* piRNAs can suppress the translation of *FGF2* gene mRNA by forming canonical and non-canonical nucleotide pairs.

Список литературы/References

1. Wang J., Shi Y., Zhou H. et al. piRBase: integrating piRNA annotation in all aspects. *Nucleic Acids Res.* 2021;50:265-272. doi 10.1093/nar/gkab1012
2. Rakhmetullina A., Akimniyazova A., Niyazova T., Pyrkova A., Ivashchenko A., Zielenkiewicz P. Endogenous piRNAs Can Interact with the Omicron Variant of the SARS-CoV-2 Genome. *Curr Issues Mol Biol.* 2023;45(4):2950-2964
3. Kamenova S., Sharapkhanova A., Akimniyazova A., Pyrkova A., Ivashchenko A. piRNA and miRNA Can Suppress the Expression of Multiple Sclerosis Candidate Genes. *Nanomaterials.* 2023;13(1):22
4. Akimniyazova A., Niyazova T., Yurikova O., Zhanuzakov M., Ivashchenko A. piRNAs may regulate expression of candidate genes of esophageal adenocarcinoma. *Front Genet.* 2022;13:1069637
5. Akimniyazova A., Yurikova O., Pyrkova A., Ryskulova A.-G., Ivashchenko A. In Silico Study of piRNA Interactions with the SARS-CoV-2 Genome. *Int J Mol Sci.* 2022;23(17):9919
6. Rakhmetullina_A., Akimniyazova A., Niyazova T., Pyrkova A., Tauassarova_M., Ivashchenko A., Zielenkiewicz P. Interactions of piRNAs with the mRNA of Candidate Genes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Curr Issues Mol Biol.* 2023;45(7):6140-6153. doi 10.3390/cimb45070387