

doi 10.18699/vjgb-24-91

Компьютерный анализ показывает отличия митохондриальных микроРНК от остальных микроРНК

П.С. Ворожейкин¹ , И.И. Титов^{1, 2, 3}¹ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия³ Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия pavel.vorozheykin@gmail.com


Аннотация. Одним из подклассов микроРНК с до сих пор неизвестными специальными функциями являются митомиРы (mitomiRs) – митохондриальные микроРНК, которые в основном происходят из ядерной ДНК и импортируются в митохондрии, при этом изменение уровня их экспрессии ассоциировано с рядом заболеваний. Для выявления характерных особенностей митохондриальных микроРНК, отличающих их от остальных микроРНК, мы провели классификацию этих последовательностей с помощью метода случайного леса. Проведенный анализ впервые выявил достоверные различия между митомиРами и микроРНК по следующим характеристикам (по убыванию степени их важности в классификации): митомиРы имеют достоверно больший эволюционный возраст (низкий индекс филостратиграфического возраста, PAI), большее количество мишеней и ассоциаций с болезнями, в том числе митохондриальными (двусторонний точный тест Фишера, средние p -значения $1.82 \times 10^{-89}/1.13 \times 10^{-96}$ для всех мРНК/болезней и $6.01 \times 10^{-22}/1.09 \times 10^{-9}$ для митохондриальных); принадлежат к классу «циркулирующих» (среднее p -значение 1.20×10^{-56}). Обнаруженные различия между митомиРами и остальными микроРНК могут помочь раскрыть способ доставки микроРНК в митохондрии, свидетельствуют об эволюционной консервативности и важности митомиРов в регулировании функций и метаболизма митохондрий, а в целом говорят о том, что митомиРы не являются случайными микроРНК. Информация о 1312 экспериментально подтвержденных последовательностях митомиРов для трех организмов (*Homo sapiens*, *Mus musculus* и *Rattus norvegicus*) собрана в базе mitomiRdb (<https://mitomiRdb.org>).

Ключевые слова: митомиР; митохондрия; микроРНК; эволюция; база данных.

Для цитирования: Ворожейкин П.С., Титов И.И. Компьютерный анализ показывает отличия митохондриальных микроРНК от остальных микроРНК. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(8):834-842. doi 10.18699/vjgb-24-91

Финансирование. Исследование выполнено за счет средств бюджетного проекта № FWNR-2022-0020.

Computer analysis shows differences between mitochondrial miRNAs and other miRNAs

P.S. Vorozheykin¹ , I.I. Titov^{1, 2, 3}¹ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia² Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia³ Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia pavel.vorozheykin@gmail.com

Abstract. A subclass of miRNAs with as yet unknown specific functions is mitomiRs – mitochondrial miRNAs that are mainly derived from nuclear DNA and are imported into mitochondria; moreover, changes in the expression levels of mitomiRs are associated with some diseases. To identify the most pronounced characteristics of mitochondrial miRNAs that distinguish them from other miRNAs, we classified mitomiR sequences using the Random Forest algorithm. The analysis revealed, for the first time, a significant difference between mitomiRs and other microRNAs by the following criteria (in descending order of importance in the classification): mitomiRs are evolutionarily older (have a lower phylostratigraphic age index, PAI); have more targets and disease associations, including mitochondrial ones (two-sided Fisher's exact test, average p -values $1.82 \times 10^{-89}/1.13 \times 10^{-96}$ for all mRNA/diseases and $6.01 \times 10^{-22}/1.09 \times 10^{-9}$ for mitochondria, respectively); and are in the class of "circulating" miRNAs (average p -value 1.20×10^{-56}). The identified differences between mitomiRs and other miRNAs may help uncover the mode of miRNA delivery into mitochondria, indicate the evolutionary conservation and importance of mitomiRs in the regulation of mitochondrial function and metabolism, and generally show that mitomiRs are not randomly encountered

miRNAs. Information on 1,312 experimentally validated mitomiR sequences for three organisms (*Homo sapiens*, *Mus musculus* and *Rattus norvegicus*) is collected in the mitomiRdb database (<https://mitomiRdb.org>).

Key words: mitomiR; mitochondria; miRNA; evolution; database.

For citation: Vorozheykin P.S., Titov I.I. Computer analysis shows differences between mitochondrial miRNAs and other miRNAs. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(8):834-842. doi 10.18699/vjgb-24-91

Введение

Митохондрии участвуют в обширных двунаправленных межклеточных взаимодействиях, регулируя как свой собственный протеом, так и общую клеточную приспособленность и здоровье организма. На сегодняшний день хорошо известно, что основные пути биогенеза микроРНК начинаются в ядре и заканчиваются в цитоплазме (Bartel, 2018; Salim et al., 2022; Zięta et al., 2023). Однако есть наблюдения, что эти малые некодирующие РНК присутствуют в органеллах, в том числе в митохондриях (Lung et al., 2006; Kren et al., 2009). Во многих случаях обнаруженные митохондриальные микроРНК (так называемые митомирны, mitomiRs) более представлены в митохондриях по сравнению с цитоплазмой. Все это предполагает наличие механизмов транспортировки ядерных микроРНК в митохондрии или существование собственного процесса созревания микроРНК непосредственно внутри самих митохондрий.

В пользу существования механизмов транспортировки свидетельствует обнаружение так называемых циркулирующих микроРНК (Pozniak et al., 2022). Несколько фактов говорят в пользу альтернативы: во-первых, в митохондриях обнаружены белковые комплексы (AGO2 и Dicer), участвующие в каноническом пути биогенеза микроРНК (Bandiera et al., 2011; Wang W.-X. et al., 2015); во-вторых, экспрессия митохондриальных генов может регулироваться с помощью митохондриальных микроРНК, и такая регуляция может проявляться в митохондриально-ассоциированных болезнях (Li et al., 2012; Tomasetti et al., 2014; Zhang et al., 2014; Lin, Chu, 2021; Erturk et al., 2022; Gohel, Singh, 2022), а состав miRISC-комплекса (комплекса молчания генов, индуцируемого микроРНК) различается на разных стадиях развития организма. Перечисленное допускает возможность присутствия специфичного происхождения и биогенеза митомиров, а также выполнение пока неизвестных функций внутри митохондрий, что делает митохондриальные микроРНК новым подклассом микроРНК, важным для научных исследований. Однако специальные функции и особые пути биогенеза митомиров до сих пор не установлены, и поэтому остается открытым вопрос, не являются ли митомирны обычными микроРНК, которые наблюдались в митохондриях по случайным причинам.

С целью определения факторов, специфичных для этого нового класса микроРНК, нами выполнен анализ микроРНК с помощью метода случайного леса, в рамках которого выявлены критерии, играющие наибольшую роль в классификации митомиров (по убыванию степени их важности в классификации): индекс филостратиграфического возраста (PAI) микроРНК, наличие у микроРНК мишеней и принадлежность микроРНК к классу «циркулирующих». На основе полученных данных сделаны вы-

воды о возрасте митомиров, их возможном появлении в митохондриях и об их значимости для функционирования организма.

Анализируемые митомирны собраны в базу данных mitomiRdb (<https://mitomiRdb.org>), в которой объединены вручную выверенные экспериментально подтвержденные митохондриальные микроРНК. В базе представлена информация о митомирах для трех млекопитающих: *Homo sapiens*, *Mus musculus* и *Rattus norvegicus*. Всего аннотировано 1312 последовательностей со сведениями об их идентификаторах, нуклеотидных последовательностях, вторичных структурах предшественников. Также в базу включены ссылки на публикации с подтверждающими экспериментами и отражены экспериментально установленные связи этого класса малых некодирующих РНК с мРНК и болезнями (в том числе с митохондриальными). Все данные представлены в свободном доступе и могут быть загружены для дальнейшей автоматизированной компьютерной обработки.

Материалы и методы

В работе используются последовательности микроРНК из базы данных miRBase (<https://miRBase.org>, релизы с 10 по 22.1) (Kozomara et al., 2019). В последнем релизе базы аннотированы 48 885 последовательностей микроРНК для 285 организмов. Общее количество микроРНК для трех рассматриваемых организмов (*H. sapiens*, *M. musculus* и *R. norvegicus*) составляет 5398 последовательностей, из них 2274 отмечены создателями базы как микроРНК с высокой степенью достоверности (микроРНК, картированные ряды которых соответствуют шаблону при процессинге пре-миРНК комплексами Drosha/Dicer в классическом пути биогенеза).

Для изучения связи митомиров с мРНК используется база экспериментально установленных мишеней микроРНК miRTarBase (<https://mirtarbase.cuhk.edu.cn>, релиз 8.0) (Huang et al., 2020) – собранная вручную по научным статьям база взаимодействий микроРНК-мишень с экспериментальными доказательствами прямых взаимодействий. Общее количество записей о взаимодействиях микроРНК и мРНК для человека, мыши и крысы составляет 553 118, из которых 13 311 записей соответствуют убедительным («сильным») экспериментам, а остальные 539 807 записей отмечены как имеющие «слабые» подтверждения.

Набор экспериментально подтвержденных связей микроРНК с заболеваниями получен из базы данных RNADisease (<http://www.rnadisease.org>, релиз 4.0, раздел Experimental Data, записи с информацией о микроРНК-ассоциированных заболеваниях) (Chen et al., 2022). Каждая такая связь получена путем ручного отбора данных из публикаций, с особым вниманием к экспериментальному

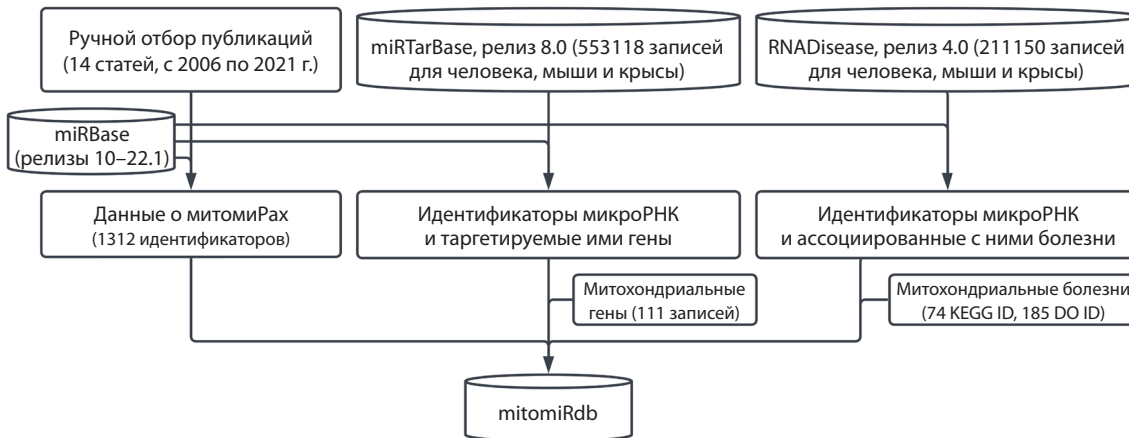


Рис. 1. Общая схема процесса формирования базы данных mitomiRdb.

доказательству роли микроРНК в регулировании и патогенезе болезней и к анализу комплементарного связывания мРНК, принимающих участие в течении болезни, с микроРНК. Общее количество записей в базе по трем рассматриваемым организмам (человек, мышь и крыса) составляет 211 150.

Для поиска локализации митомиРов в митохондриальных геномах и формирования списка митохондриальных генов использовались следующие эталонные последовательности мтДНК: *H. sapiens* (NC_012920.1), *M. musculus* (NC_005089.1) и *R. norvegicus* (NC_001665.2) (Sayers et al., 2022). Также для изучения эволюции сайтов связывания микроРНК let-7a-5p были взяты митохондриальные геномы приматов: *Gorilla gorilla* (NC_001645.1), *Pan paniscus* (NC_001644.1), *Pongo pygmaeus* (NC_001646.1), *Pan troglodytes* (NC_001643.1) и *Symphalangus syndactylus* (NC_014047.1) (Sayers et al., 2022).

В расчете индекса филогенетического возраста (phylostratigraphic age index, PAI) применяются таксономические группы, полученные с NCBI-сервера (https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/taxonomy/new_taxdump, данные на 12.07.2022) (Sayers et al., 2022). Для каждой последовательности микроРНК из 285 организмов вычислены все гомологичные микроРНК и тем самым определено распространение схожих микроРНК по организмам. Две микроРНК считаются гомологичными, если расстояние Хэмминга для их глобально выровненных нуклеотидных последовательностей составляет менее 10% от длины полученного выравнивания. Параметры выравнивания: вес замены (совпадения) 5.0, вес замены (несовпадения) –4.0, вес для первой вставки/удаления –10.0, вес для последующих вставок/удалений –0.5. Чтобы рассчитать величину PAI каждой микроРНК, был задействован набор организмов, в которых обнаружены гомологи этой микроРНК. Для отобранных организмов устанавливается наиболее общий таксон согласно таксономическим группам. Порядковый номер этого наиболее общего таксона и будет значением PAI (нумерация с нуля) (Mustafin et al., 2019).

DO- и KEGG-идентификаторы, а также названия заболеваний получены из проекта «Онтология болезней» (Schriml et al., 2022) и Киотской энциклопедии генов и геномов (Kanehisa et al., 2017). С помощью этой информа-

ции был сформирован список митохондриально-ассоциированных заболеваний: в качестве таковых взяты названия и идентификаторы заболеваний, входящих в супергруппу (и ее подгруппы) KEGG H01427 (Mitochondrial disease), и заболевания, в названиях которых упоминаются митохондрии. Общее количество полученных заболеваний – 74 записи KEGG и 185 записей DO (данные представлены в Приложении 1)¹.

Информация о циркулирующих (circulating) микроРНК человека, мыши и крысы взята из баз данных miRandola (релиз 02.2017, 606 микроРНК) и plasmIR (релиз от 17.06.2021, 251 микроРНК) (Russo et al., 2018; Tastsoglou et al., 2021). Этому классу внеклеточных микроРНК характерно присутствие в отслеживаемых количествах в кровеносной системе и других жидкостях организма. Объединенное количество циркулирующих микроРНК из двух баз – 628 шт. (590 микроРНК человека, 18 – мыши, 20 – крысы).

Схематическое описание процесса получения информации о митомиРах, а также процесса формирования связей митомиРов с мишенями и заболеваниями представлено на рис. 1. На первом этапе были отобраны статьи, в которых исследовались локализованные в митохондриях микроРНК и/или упоминается термин «митомиР/mitomiR». Из этих публикаций выбраны 14 (с 2006 по 2021 г.), в которых экспериментально подтверждено присутствие микроРНК в митохондриях трех млекопитающих (*H. sapiens*, *M. musculus*, *R. norvegicus*) для разных типов клеток и тканей (Lung et al., 2006; Kren et al., 2009; Bian et al., 2010; Bandiera et al., 2011; Barrey et al., 2011; Mercer et al., 2011; Das et al., 2012; Sripada et al., 2012; Dasgupta et al., 2015; Jagannathan et al., 2015; Wang W.-X. et al., 2015; Wang X. et al., 2017; Fan et al., 2019; Zheng et al., 2021). В указанных работах микроРНК (митомиРы) идентифицируются по их названию (например, hsa-miR-1), которое с течением времени может изменяться в базе miRBase. На основании истории аннотаций miRBase для каждого названия микроРНК определен соответствующий ему уникальный идентификатор (MIMAT-идентификатор) в базе miRBase, который позволяет однозначно идентифициро-

¹ Приложения 1–4 см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx27.xlsx>

вать последовательность микроРНК (и митомиРа) как в прошлых, так и в будущих релизах базы.

В процессе сопоставления данных мы обнаружили, что некоторые ранее аннотированные митомиРа исключены из базы miRBase в более поздних релизах. Чтобы получить более полную информацию, мы расширили нашу выборку митомиРа, добавив в нее 40 исключенных микроРНК и их 41 предшественника из ранних аннотаций в базе miRBase (Приложение 2). В результате собраны идентификаторы, нуклеотидные последовательности, вторичные структуры предшественников и другая информация о 1312 митомиРах.

Для изучения характеристик рассматриваемых митохондриально-ассоциированных микроРНК дополнительно сформирована выборка из 4126 последовательностей так называемых не-митомиРа, которая включает в себя все микроРНК человека, мыши и крысы из базы данных miRBase (релиз 22.1), за исключением идентифицированных выше митомиРа.

На втором этапе, используя историю аннотаций микроРНК в базе miRBase, для названий микроРНК в каждой записи баз miRTarBase и RNADisease мы установили соответствующий уникальный идентификатор базы miRBase, позволяющий в дальнейшем однозначно ассоциировать микроРНК с таргетируемыми мРНК и заболеваниями. У некоторых записей не удалось определить такой идентификатор из-за некорректности данных в базах (например, названия микроРНК hsa-miR-b5539, hsa-miRPlus-C1100 отсутствуют в базе miRBase) или из-за неполноты приведенных данных (например, запись в базе содержит название предшественника микроРНК hsa-let-7a-1, по которому невозможно однозначно определить последовательность микроРНК из микроРНК-дуплекса). Исключив из рассмотрения такие записи, в итоге мы получили информацию о надежных связях между собранными митомиРа и мРНК/заболеваниями.

Наконец, имея в наличии набор ассоциаций митомиР-мРНК и митомиР-заболевание, мы зафиксировали связи митомиРа с известными митохондриальными генами и заболеваниями. В базе mitomiRdb отмечена информация о связях обнаруженных митомиРа со 111 известными митохондриальными генами, кодирующими рРНК, тРНК и белки, для трех рассматриваемых митохондриальных ДНК человека, мыши и крысы. Каждая запись базы данных RNADisease содержит название заболевания и один или несколько идентификаторов заболевания: идентификатор DO (Schriml et al., 2022), идентификатор MeSH (Sayers et al., 2022) и идентификатор KEGG (Kanehisa et al., 2017; Schriml et al., 2022). Для каждой последовательности митомиРа мы дополнительно отразили ее связь (или отсутствие связи) с подготовленным общим списком заболеваний, а также отдельно с митохондриальными болезнями (Приложение 3).

Чтобы определить и ранжировать наиболее выраженные характеристики митомиРа в сравнении со всеми остальными микроРНК, мы провели анализ микроРНК с помощью метода случайного леса (алгоритма машинного обучения Random Forest) (Breiman, 2001). В качестве критериев классификации выбраны четыре бинарных и один числовой. Бинарные критерии: 1) является ли после-

довательность «циркулирующей» микроРНК; 2) является ли микроРНК «достоверной» согласно критериям базы miRBase; 3) есть ли у микроРНК мишени; 4) ассоциирована ли микроРНК с заболеваниями. Числовой критерий – значение величины PAI микроРНК.

Метод случайного леса применяется 100 раз на выборках микроРНК, подготовленных специальным образом: каждая выборка состоит из всех последовательностей митомиРа и не-митомиРа, из которых удалены микроРНК из семейств гомологичных последовательностей за исключением одного (случайно выбранного) представителя. В каждом тесте метода в качестве проверочной выборки выступает случайно сгенерированная подвыборка (1/3 от общего числа последовательностей), оставшаяся часть используется для обучения модели. Статистические оценки и уровни значимости критериев усредняются по всем тестам.

Результаты

Статистика. Мы собрали информацию о 1312 митохондриальных микроРНК (митомиРах) млекопитающих *Homo sapiens*, *Mus musculus* и *Rattus norvegicus*. В аннотированные митомиРа были добавлены те последовательности, которые к настоящему времени исключены из базы miRBase по разным причинам: например, микроРНК hsa-miR-1974, hsa-miR-1977 и hsa-miR-1978 располагаются в области митохондриальных тРНК; характер ридов из экспериментов RNAseq для микроРНК hsa-miR-6723-5p не соответствует правилам аннотации, принятым в miRBase; микроРНК mmu-miR-2145 представляет собой фрагмент 5S рРНК; и другие записи, предположительно представляющие собой транскрипционный шум или имеющие признаки неканонических путей биогенеза созревания. Около 66.6 % (874 шт.) обнаруженных митомиРа являются микроРНК человека, все остальные принадлежат мыши (30.6 %, 401 шт.) и крысе (2.8 %, 37 шт.).

Сравнивая нуклеотидные последовательности и названия митомиРа попарно друг с другом, мы обнаружили 16 (из 37 возможных по минимальному числу митомиРа в *R. norvegicus*) консервативных митомиРа, т. е. тех, которые наблюдаются в митохондриях каждого из трех рассмотренных организмов. 30.6 % всех митомиРа описаны более чем в одной из рассматриваемых статей, что может свидетельствовать об их более высокой достоверности в качестве митохондриальных. Только девять последовательностей митомиРа (hsa-miR-1973, hsa-miR-1974, hsa-miR-1977, hsa-miR-1978, hsa-miR-4461, hsa-miR-4463, hsa-miR-4284, hsa-miR-4485-3p, mmu-miR-805) полностью картированы на митохондриальную ДНК (три – на тРНК и рРНК, два – на белок-кодирующие области, один – на D-петлю), из них лишь пять (hsa-miR-1973, hsa-miR-1974, hsa-miR-1977, hsa-miR-1978, hsa-miR-4485-3p) дополнительно подтверждены RT-PCR/RT-qPCR/qRT-PCR экспериментами или наблюдаются в митохондриях в превалирующем количестве по сравнению с цитоплазмой.

Критерии. Анализ характеристик митомиРа в сравнении с остальными микроРНК не дает возможности однозначно классифицировать этот класс ни по одному из критериев (рис. 2, а). Классификация митомиРа с помощью алгоритма случайного леса (Random Forest) по-

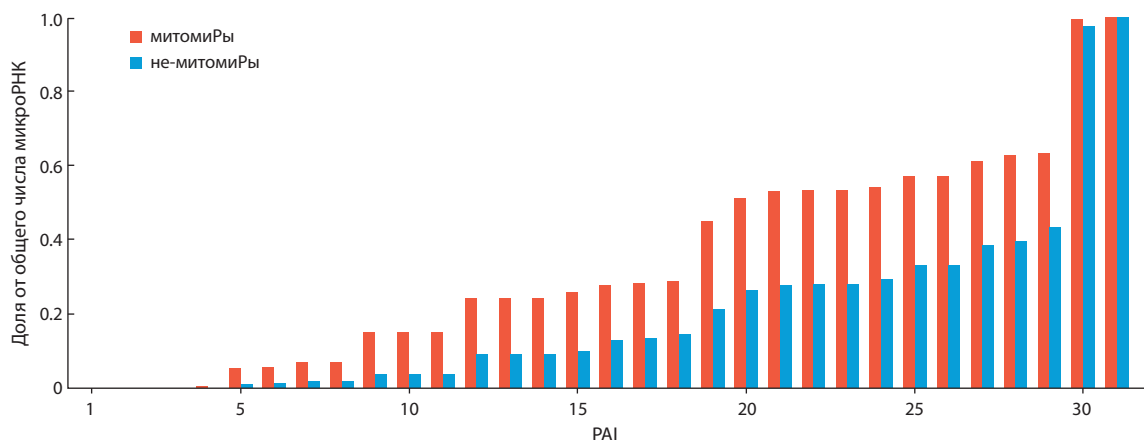


Рис. 3. Кумулятивное распределение последовательностей митомиРов и не-митомиРов по значениям PAI. Доля митомиРов с PAI < 16 превышает соответствующую долю остальных микроРНК с уровнем значимости $1.10 \times 10^{-41} \pm 5.97 \times 10^{-41}$.

Минимальное значение PAI, равное 4, соответствует четырем митомиРам (*hsa-miR-99a-5p*, *mmu-miR-99a-5p*, *hsa-miR-100-5p*, *mmu-miR-100-5p*) и двум не-митомиРам (*gno-miR-99a-5p*, *gno-miR-100-5p*) из широко распространенного семейства микроРНК *mir-10*.

Характеристики, по которым наблюдаются достоверные различия между микроРНК и митомиРами

Характеристика	митомиРы	Остальные микроРНК	<i>p</i> -значение по 100 тестам
Общее число	1312	4126	–
Доля микроРНК, которые таргетируют мРНК (miRTarBase)	0.94	0.60	$1.82 \times 10^{-89} \pm 7.73 \times 10^{-89}$
Доля микроРНК, которые таргетируют митохондриальные мРНК (miRTarBase)	0.05	0.0002	$1.20 \times 10^{-56} \pm 7.44 \times 10^{-56}$
Доля микроРНК, которые ассоциированы с болезнями (RNAisease)	0.99	0.77	$1.13 \times 10^{-96} \pm 3.89 \times 10^{-96}$
Доля микроРНК, которые ассоциированы с митохондриальными болезнями (RNAisease)	0.03	0.002	$1.09 \times 10^{-9} \pm 2.14 \times 10^{-9}$
Доля микроРНК, которые являются циркулирующими	0.29	0.06	$1.20 \times 10^{-56} \pm 7.44 \times 10^{-56}$
Доля микроРНК с PAI < 16	0.26	0.01	$1.10 \times 10^{-41} \pm 5.97 \times 10^{-41}$

Примечание. Оценка значимости различия характеристик проводилась при усреднении по 100 реализациям при случайном выборе одной последовательности из гомологичных.

только о белок-кодирующих митохондриальных генах и не содержит об РНК-кодирующих. Установлено, что всего 65 митомиРов таргетируют митохондриальные мРНК, а 1247 – нет. При этом последовательности всех таргетирующих митомиРов не картируются на митохондриальную ДНК, т.е. эти митомиРы – внешние по отношению к митохондриям. МитомиРы таргетируют 12 митохондриальных мРНК: *ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND4L*, *ND5*, *ND6*, *COX1*, *COX2*, *COX3*, *CYTB*, *ATP6*. Наибольшее количество митомиРов (>15) нацелено только на две мРНК человека (*ATP6*, *COX1*), наименьшее количество митомиРов (<5) связано с мРНК человека *ND3/ND4L* и мРНК мыши и крысы *COX1*. В то же время всего один не-митомиР *hsa-miR-15a-3p* из 4126 не-митомиРов таргетирует митохондриальную мРНК *ND4L*. Двусторонний точный тест Фишера (среднее *p*-значение $6.01 \times 10^{-22} \pm 2.30 \times 10^{-21}$) демонстрирует статистически достоверную связь между видом микроРНК (митомиР/не-митомиР) и ассоциацией с митохондриальными мРНК.

Значимость критерия ассоциации митомиРов с классом «циркулирующих» микроРНК может отражать особый

способ транспортировки митомиРов в митохондрии. Сравнение выборок митомиРов и не-митомиРов (см. рис. 2, а) показывает, что среди циркулирующих микроРНК митомиРы более представлены, чем не-митомиРы (всего 377 митомиРов против 251 не-митомиРа). Точный тест Фишера на наборах микроРНК, «очищенных» от гомологичных последовательностей, демонстрирует среднее *p*-значение $1.20 \times 10^{-56} \pm 7.44 \times 10^{-56}$.

Хотя ассоциация с заболеваниями демонстрирует более низкую значимость критерия для классификации, чем упомянутые выше (из-за обнаруженного сходства с критерием наличия мишеней, см. таблицу и Приложение 4), этот критерий может быть важным для общего понимания функций митомиРов. Для каждой последовательности митомиРа и не-митомиРа мы установили связь (или отсутствие связи) с заболеваниями, в том числе митохондриальными. Используя данные базы RNAisease мы обнаружили всего 36 (из 1312) митомиРов, связанных с митохондриальными заболеваниями (по их названиям или идентификаторам). С другой стороны, только 9 (из 4126) не-митомиРов имеют такую же ассоциацию, возможно, обусловленную таргети-

рованием не-митомиРами ядерных мРНК с митохондриальной локализацией продукта. В обоих случаях выявлены ассоциации с группой заболеваний “Mitochondrial disease” и с MNGIE-синдромом (см. Приложение 3). Двусторонний точный тест Фишера (средние p -значения $1.13 \times 10^{-96} \pm 3.89 \times 10^{-96} / 1.09 \times 10^{-9} \pm 2.14 \times 10^{-9}$ для всех и для митохондриальных заболеваний соответственно) показывает, что митомиРы более тесно связаны с заболеваниями, чем не-митомиРы. Ассоциации с митохондриальными мРНК и болезнями могут свидетельствовать о важной роли митомиРов в активности митохондрий.

Данные. База mitomiRdb (<https://mitomiRdb.org>) предоставляет пользовательский веб-интерфейс для доступа к данным митомиРов и выполнения поиска информации. mitomiRdb включает следующие сведения (в соответствии с базой miRBase): уникальный идентификатор (MIMAT), название, нуклеотидную последовательность и организм наблюдения микроРНК в митохондриях. Кроме того, для записи отображается флаг достоверности митомиРа в случае, если он ассоциирован с митохондриальными мРНК/заболеваниями или картирован на митохондриальный геном. В качестве дополнительной информации представлена вторичная структура предшественников микроРНК, ссылки на подтверждающие публикации, список ассоциированных болезней и мРНК. Для «достоверных» митомиРов приведен список ассоциированных митохондриальных мРНК/заболеваний и отмечен комментарием факт присутствия последовательности митомиРа в мтДНК. Все размещенные на сайте данные доступны для скачивания в формате SQLite для дальнейшей компьютерной обработки (doi.org/10.6084/m9.figshare.22592380).

Обсуждение

К настоящему времени в митохондриях обнаружено большое число микроРНК. При этом до сих пор неизвестно, обусловлено ли присутствие микроРНК в митохондриях выполняемыми ими функциями или же наблюдались случайные микроРНК. В первом случае такие митохондриальные микроРНК могут иметь особенности своего биогенеза и регуляции экспрессии генов, в частности митохондриальных. В рамках данной работы мы проанализировали характеристики микроРНК с целью определения факторов, отличающих митомиРы от остальных микроРНК, и подтверждения факта неслучайности наблюдения этого класса микроРНК.

Самым значимым для митомиРов оказалось значение индекса филогенетического возраста – величины, характеризующей эволюционный возраст последовательности. Меньшие значения PAI у митомиРов свидетельствуют о том, что в среднем митомиРы более старые и, как большинство старых микроРНК, чаще задействованы в большем числе важных регуляторных процессов, в том числе включающих участие митохондрий.

Выявлена также значимая связь митомиРов с мРНК (включая митохондриальные) на основе информации об экспериментально установленных взаимодействиях микроРНК с мишенями. Это может свидетельствовать о неслучайности наблюдения митомиРов внутри митохондрий и о важности митомиРов для функционирования организма и митохондрий в частности. Взаимодействие

микроРНК-мРНК не обязательно влечет за собой молчание генов. Около половины экспериментально идентифицированных взаимодействий микроРНК-мРНК приходятся на те, в которых отсутствует непрерывная комплементарность нуклеотидов в сид-регионе (позиции 2–5) микроРНК (Grosswendt et al., 2014) и которые наиболее важны для ассоциации с мишенью (Chandradoss et al., 2015; Salomon et al., 2015). Неканонические сайты связывания, хотя и идентифицируются CLIP-методами, не всегда влияют на экспрессию генов (Agarwal et al., 2015). Полезным свидетельством функциональности сайта будет его эволюционное сохранение. Чтобы проверить предложенный аргумент на одном примере митомиРа, мы выбрали единственный сайт связывания, для которого экспериментальные предсказания соответствуют компьютерному (Khorsandi et al., 2018). Сайт находится в позиции 13418–13439 гена *mt-ND5* мтДНК человека, недалеко от нее (1081 п. н. от начала *ND5*) у других приматов и связывает микроРНК *hsa-let-7a*. Этот сайт возникает у человека благодаря синонимичной замене C>T в позиции, которая соответствует второму нуклеотиду сид-региона микроРНК *let-7a*. Между тем в рассматриваемой позиции наблюдается обратный SNP T>C (*rs386829181*, частота аллеля 7×10^{-4}) (Sherry, 2001), который тесно связан с краиниальными менигиомами у китайских пациентов.

Следующим фактором, выделяющим митомиРы среди остальных микроРНК, является их принадлежность к классу циркулирующих. Циркулирующие микроРНК относятся к классу внеклеточных РНК, наблюдаемых в достаточных количествах в разных жидкостях организма. Важность данного фактора для классификации митомиРов может свидетельствовать о возможном сходстве между механизмами свободного перемещения микроРНК из клетки и транспортировкой митомиРов внутрь митохондрий.

Хотя критерий, основанный на связи митомиРов с болезнями, выглядит менее важным для классификации вследствие совпадения ассоциаций как митомиРов, так и остальных микроРНК с мишенями и болезнями (см. Приложение 4), статистические критерии показывают значимую связь между болезнями и митомиРаами, что может говорить о важной роли митомиРов в регулировании процессов организма и митохондрий в частности.

Наименее важный из рассмотренных факторов определения митомиРов – критерий «достоверности» (согласно авторам базы miRBase). Это может указывать на наличие у митомиРов неизвестного пути созревания, при котором формируется дуплекс микроРНК-микроРНК с неканоническими свисающими концами, в отличие от канонических двунауклеотидных (которые используются в качестве одного из критериев «достоверности») при редактировании предшественника микроРНК комплексами Drosha и Dicer.

Несмотря на присутствие митохондрий во всех типах клеток исследуемых млекопитающих, вклад факторов тканеспецифичности и уровня экспрессии микроРНК в различиях митомиРов и не-митомиРов пока невозможно оценить ввиду того, что существующие экспериментальные наблюдения митомиРов охватывают незначительное количество тканей и содержат недостаточно информации об экспрессии митомиРов.

Заключение

В рамках работы выделены следующие характеристики митохондриальных микроРНК, которые отличают их от остальных микроРНК, по убыванию степени их важности: индекс филогенетического возраста (PAI), наличие у микроРНК мишеней и принадлежность микроРНК к классу «циркулирующих». Выявленные характеристики могут помочь пролить свет на особенности происхождения, процессинга и функции митомиров.

Все экспериментально исследованные митомиров собраны в базе данных mitomiRdb (<https://mitomiRdb.org>). Представленная база данных может быть полезна для более полного изучения микроРНК и их подкласса – митомиров.

Список литературы / References

- Agarwal V., Bell G.W., Nam J.-W., Bartel D.P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*. 2015;4:e05005. doi 10.7554/eLife.05005
- Bandiera S., Rüberg S., Girard M., Cagnard N., Hanein S., Chrétien D., Munnich A., Lyonnet S., Henrion-Caude A. Nuclear outsourcing of RNA interference components to human mitochondria. *PLoS One*. 2011;6(6):e20746. doi 10.1371/journal.pone.0020746
- Barrey E., Saint-Auret G., Bonnamy B., Damas D., Boyer O., Gidrol X. Pre-microRNA and mature microRNA in human mitochondria. *PLoS One*. 2011;6(5):e20220. doi 10.1371/journal.pone.0020220
- Bartel D.P. Metazoan microRNAs. *Cell*. 2018;173(1):20-51. doi 10.1016/j.cell.2018.03.006
- Bian Z., Li L.-M., Tang R., Hou D.-X., Chen X., Zhang C.-Y., Zen K. Identification of mouse liver mitochondria-associated miRNAs and their potential biological functions. *Cell Res*. 2010;20(9):1076-1078. doi 10.1038/cr.2010.119
- Breiman L. Random forests. *Mach. Learn.* 2001;45(1):5-32. doi 10.1023/A:1010933404324
- Chandradoss S.D., Schirle N.T., Szczepaniak M., MacRae I.J., Joo C. A dynamic search process underlies microRNA targeting. *Cell*. 2015;162(1):96-107. doi 10.1016/j.cell.2015.06.032
- Chen J., Lin J., Hu Y., Ye M., Yao L., Wu L., Zhang W., Wang M., Deng T., Guo F., Huang Y., Zhu B., Wang D. RNADisease v4.0: an updated resource of RNA-associated diseases, providing RNA-disease analysis, enrichment and prediction. *Nucleic Acids Res*. 2022;51(D1):D1397-D1404. doi 10.1093/nar/gkac814
- Das S., Ferlito M., Kent O.A., Fox-Talbot K., Wang R., Liu D., Raghavachari N., Yang Y., Wheelan S.J., Murphy E., Steenberg C. Nuclear miRNA regulates the mitochondrial genome in the heart. *Circ. Res*. 2012;110(12):1596-1603. doi 10.1161/CIRCRESAHA.112.267732
- Dasgupta N., Peng Y., Tan Z., Cirao G., Wang D., Li R. miRNAs in mtDNA-less cell mitochondria. *Cell Death Discov*. 2015;1(1):15004. doi 10.1038/cddiscovery.2015.4
- Erturk E., Enes Onur O., Akgun O., Tuna G., Yildiz Y., Ari F. Mitochondrial miRNAs (mitomiRs): their potential roles in breast and other cancers. *Mitochondrion*. 2022;66:74-81. doi 10.1016/j.mito.2022.08.002
- Fan S., Tian T., Chen W., Lv X., Lei X., Zhang H., Sun S., Cai L., Pan G., He L., Ou Z., Lin X., Wang X., Perez M.F., Tu Z., Ferrone S., Tannous B.A., Li J. Mitochondrial miRNA determines chemoresistance by reprogramming metabolism and regulating mitochondrial transcription. *Cancer Res*. 2019;79(6):1069-1084. doi 10.1158/0008-5472.CAN-18-2505
- Gohel D., Singh R. Different platforms for mitomiRs in mitochondria: emerging facets in regulation of mitochondrial functions. *Mitochondrion*. 2022;66:67-73. doi 10.1016/j.mito.2022.08.003
- Grimson A., Srivastava M., Fahey B., Woodcroft B.J., Chiang H.R., King N., Degan B.M., Rokhsar D.S., Bartel D.P. Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature*. 2008;455(7217):1193-1197. doi 10.1038/nature07415
- Grosswendt S., Filipchuk A., Manzano M., Klironomos F., Schilling M., Herzog M., Gottwein E., Rajewsky N. Unambiguous identification of miRNA: target site interactions by different types of ligation reactions. *Mol. Cell*. 2014;54(6):1042-1054. doi 10.1016/j.molcel.2014.03.049
- Huang H.-Y., Lin Y.-C.-D., Li J., Huang K.-Y., Shrestha S., Hong H.-C., Tang Y., Chen Y.-G., Jin C.-N., Yu Y., Xu J.-T., Li Y.-M., Cai X.-X., Zhou Z.-Y., Chen X.-H., Pei Y.-Y., Hu L., Su J.-J., Cui S.-D., Wang F., Xie Y.-Y., Ding S.-Y., Luo M.-F., Chou C.-H., Chang N.-W., Chen K.-W., Cheng Y.-H., Wan X.-H., Hsu W.-L., Lee T.-Y., Wei F.-X., Huang H.-D. miRTarBase 2020: updates to the experimentally validated microRNA-target interaction database. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D148-D154. doi 10.1093/nar/gkz896
- Jagannathan R., Thapa D., Nichols C.E., Shepherd D.L., Stricker J.C., Croston T.L., Baseler W.A., Lewis S.E., Martinez I., Hollander J.M. Translational regulation of the mitochondrial genome following redistribution of mitochondrial microRNA in the diabetic heart. *Circ. Cardiovasc. Genet*. 2015;8(6):785-802. doi 10.1161/CIRCGENETICS.115.001067
- Kanehisa M., Furumichi M., Tanabe M., Sato Y., Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(D1):D353-D361. doi 10.1093/nar/gkw1092
- Khorsandi S.E., Salehi S., Cortes M., Vilca-Melendez H., Menon K., Srinivasan P., Prachalias A., Jassem W., Heaton N. An in silico argument for mitochondrial microRNA as a determinant of primary non function in liver transplantation. *Sci. Rep*. 2018;8(1):3105. doi 10.1038/s41598-018-21091-9
- Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D155-D162. doi 10.1093/nar/gky1141
- Kren B.T., Wong P.Y.-P., Sarver A., Zhang X., Zeng Y., Steer C.J. MicroRNAs identified in highly purified liver-derived mitochondria may play a role in apoptosis. *RNA Biol*. 2009;6(1):65-72. doi 10.4161/rna.6.1.7534
- Li P., Jiao J., Gao G., Prabhakar B.S. Control of mitochondrial activity by miRNAs. *J. Cell. Biochem*. 2012;113(4):1104-1110. doi 10.1002/jcb.24004
- Lin H.-Y., Chu P.-Y. Advances in understanding mitochondrial microRNAs (mitomiRs) on the pathogenesis of triple-negative breast cancer (TNBC). *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2021;2021:5517777. doi 10.1155/2021/5517777
- Lung B., Zemann A., Madej M.J., Schuelke M., Tschritz S., Ruf S., Bock R., Hüttenhofer A. Identification of small non-coding RNAs from mitochondria and chloroplasts. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(14):3842-3852. doi 10.1093/nar/gkl448
- Mercer T.R., Neph S., Dinger M.E., Crawford J., Smith M.A., Shearwood A.-M.J., Haugen E., Bracken C.P., Rackham O., Stamatoyannopoulos J.A., Filipovska A., Mattick J.S. The human mitochondrial transcriptome. *Cell*. 2011;146(4):645-658. doi 10.1016/j.cell.2011.06.051
- Mustafin Z.S., Zamyatin V.I., Konstantinov D.K., Doroshkov A.V., Lashin S.A., Afonnikov D.A. Phylostratigraphic analysis shows the earliest origination of the abiotic stress associated genes in *A. thaliana*. *Genes*. 2019;10(12):963. doi 10.3390/genes10120963
- Pozniak T., Shcharbin D., Bryszewska M. Circulating microRNAs in medicine. *Int. J. Mol. Sci*. 2022;23(7):3996. doi 10.3390/ijms23073996
- Russo F., Di Bella S., Vannini F., Berti G., Scoyni F., Cook H.V., Santos A., Nigita G., Bonnici V., Laganà A., Geraci F., Pulvirenti A., Giugno R., De Masi F., Belling K., Jensen L.J., Brunak S., Pellegrini M., Ferro A. miRandola 2017: a curated knowledge base of non-invasive biomarkers. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D354-D359. doi 10.1093/nar/gkx854
- Salim U., Kumar A., Kulshreshtha R., Vivekanandan P. Biogenesis, characterization, and functions of mirtrons. *WIREs RNA*. 2022;13(1):e1680. doi 10.1002/wrna.1680

- Salomon W.E., Jolly S.M., Moore M.J., Zamore P.D., Serebrov V. Single-molecule imaging reveals that Argonaute reshapes the binding properties of its nucleic acid guides. *Cell*. 2015;162(1):84-95. doi 10.1016/j.cell.2015.06.029
- Sayers E.W., Bolton E.E., Brister J.R., Canese K., Chan J., Co-meau D.C., Connor R., Funk K., Kelly C., Kim S., Madej T., Marchler-Bauer A., Lanczycki C., Lathrop S., Lu Z., Thibaud-Nissen F., Murphy T., Phan L., Skripchenko Y., Tse T., Wang J., Williams R., Trawick B.W., Pruitt K.D., Sherry S.T. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(D1):D20-D26. doi 10.1093/nar/gkab1112
- Schriml L.M., Munro J.B., Schor M., Olley D., McCracken C., Felix V., Baron J.A., Jackson R., Bello S.M., Bearer C., Lichenstein R., Bissardi K., Dialo N.C., Giglio M., Greene C. The Human Disease Ontology 2022 update. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(D1):D1255-D1261. doi 10.1093/nar/gkab1063
- Sherry S.T. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(1):308-311. doi 10.1093/nar/29.1.308
- Sripada L., Tomar D., Prajapati P., Singh Rochika, Singh A.K., Singh Rajesh. Systematic analysis of small RNAs associated with human mitochondria by deep sequencing: detailed analysis of mitochondrial associated miRNA. *PLoS One*. 2012;7(9):e44873. doi 10.1371/journal.pone.0044873
- Tastoglou S., Miliotis M., Kavakiotis I., Alexiou A., Gkotsi E.C., Lambropoulou A., Lygnos V., Kotsira V., Maroulis V., Zisis D., Skoufos G., Hatzigeorgiou A.G. PlasmidR: a manual collection of circulating microRNAs of prognostic and diagnostic value. *Cancers*. 2021; 13(15):3680. doi 10.3390/cancers13153680
- Tomasetti M., Santarelli L., Neuzil J., Dong L. MicroRNA regulation of cancer metabolism: role in tumour suppression. *Mitochondrion*. 2014;19:29-38. doi 10.1016/j.mito.2014.06.004
- Wang W.-X., Visavadiya N.P., Pandya J.D., Nelson P.T., Sullivan P.G., Springer J.E. Mitochondria-associated microRNAs in rat hippocampus following traumatic brain injury. *Exp. Neurol*. 2015;265:84-93. doi 10.1016/j.expneurol.2014.12.018
- Wang X., Song C., Zhou X., Han X., Li J., Wang Z., Shang H., Liu Y., Cao H. Mitochondria associated microRNA expression profiling of heart failure. *BioMed Res. Int*. 2017;2017:4042509. doi 10.1155/2017/4042509
- Zhang X., Zuo X., Yang B., Li Z., Xue Y., Zhou Y., Huang J., Zhao X., Zhou J., Yan Y., Zhang H., Guo P., Sun H., Guo L., Zhang Y., Fu X.-D. MicroRNA directly enhances mitochondrial translation during muscle differentiation. *Cell*. 2014;158(3):607-619. doi 10.1016/j.cell.2014.05.047
- Zheng H., Liu J., Yu J., McAlinden A. Expression profiling of mitochondria-associated microRNAs during osteogenic differentiation of human MSCs. *Bone*. 2021;151:116058. doi 10.1016/j.bone.2021.116058
- Ziętara K.J., Lejman J., Wojciechowska K., Lejman M. The importance of selected dysregulated microRNAs in diagnosis and prognosis of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Cancers*. 2023;15(2):428. doi 10.3390/cancers15020428

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 18.09.2024. После доработки 06.11.2024. Принята к публикации 07.11.2024.