

УДК 577.21

А.А. Бари*, А.Т. Иващенко, И.В. Пинский,
А.И. Сагайдак, С.Б. Оразова

НИИ проблем биологии и биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан

*e-mail: assyl.bari@gmail.com

**Взаимодействие miRNA с mRNA генов
транскрипционных факторов семейства MYB арабидопсиса**

Установлены сайты связывания 40 miRNA с mRNA генов семейства MYB арабидопсиса. Для miR828 и miR858 имеется 14 и 13 генов-мишеней, соответственно. Мишенями miR5021 и miR5658 являются 16 и 20 генов семейства MYB, соответственно. В их mRNA выявлены множественные сайты связывания, начала которых локализованы последовательно через 1-3 нуклеотида. Семейства miR159 и miR319 имеют общие сайты связывания в mRNA шести генах MYB. 26 miRNA имеют по одному сайту связывания в mRNA 23 генов MYB. Все сайты связывания miRNA локализованы в белок кодирующей области mRNA генов-мишеней. Нуклеотидные последовательности сайтов связывания каждой miRNA гомологичны и кодируют гомологичные олигопептиды.

Ключевые слова: miRNA, mRNA, MYB, сайт связывания, арабидопсис.

А.А. Бари, А.Т. Иващенко, И.В. Пинский, А.И. Сагайдак, С.Б. Оразова

Арабидопсис miRNA-дарымен MYB транскрипция факторлары тұқымдас гендерінің әрекеттесуі

Арабидопсис 40 miRNA-ның MYB тұқымдас гендерінің mRNA-дарымен байланысу сайттары анықталған. miR828 және miR858 үшін 14 және 13 гендер нысаналары болып табылады. 16 және 20 MYB гендері miR5021 және miR5658-дің нысаналары ретінде анықталған. Олардың mRNA-дарында басталуы біртіндеп 1-3 нуклеотидтен кейін орналасқан көптік байланысу сайттары айқындалған. miR159 және miR319 тұқымдастарының алты MYB гендер mRNA-дарында ортақ байланысу сайттары табылған. 26 miRNA 23 MYB гендер mRNA-дарымен бір сайт арқылы байланысады. Барлық байланысу сайттары нысана mRNA-дардың ақуыз кодтайтын аймағында орналасқан. Әрбір miRNA байланысу сайтының нуклеотидтік тізбектері гомологикалы болып табылады және гомологикалы олигопептидтерді кодтайды.

Түйін сөздер: miRNA, mRNA, MYB, байланысу сайты, арабидопсис.

A. A. Bari, A. T. Ivashchenko, I. V. Pinsky, A. I. Sagaidak, S. B. Orazova

Interaction of miRNAs with mRNAs of MYB transcription factors gene family in Arabidopsis

The binding sites for 40 miRNAs in mRNAs of MYB gene family in Arabidopsis were identified. miR828 and miR858 target 14 and 13 genes respectively. 16 and 20 MYB family genes were targets for miR5021 and miR5658 respectively. Multiple binding sites with starts located sequentially in 1-3 nucleotides in mRNAs of miR5021 and miR5658 targets were revealed. miR159 and miR319 families had common binding sites in six MYB mRNAs. 26 miRNAs had one binding site in the mRNAs of 23 MYB genes. All miRNA binding sites were located in the protein coding sequence of target mRNAs. The nucleotide sequence of each miRNA binding site were homologous and encoded homologous oligopeptides.

Keywords: miRNA, mRNA, MYB, binding site, arabidopsis.

В геноме арабидопсиса имеется около 2500 транскрипционных факторов, которые участвуют в регуляции экспрессии более 26 тысяч белок-кодирующих генов [1,2]. Самое большое семейство транскрипционных факторов MYB оказывает влияние на развитие, метаболизм и

ответ на биотический и абиотический стресс растений [3-8]. Установление регулирующей роли miRNA в экспрессии генов открыло новые возможности управлять процессами продуктивности и устойчивости растений [9-11]. Однако, в настоящее время имеется мало сведений о свя-

зи miRNA с экспрессией генов семейства MYB растений [12-14]. В настоящей работе поставлена задача выявить miRNA, которые могут связываться с mRNA генов семейства MYB арабидопсиса и регулировать их экспрессию. *Arabidopsis thaliana* является модельным объектом растений и в его геноме установлены многие связи между miRNA и их генами-мишенями. Это будет способствовать установлению взаимодействий miRNA с mRNA генов семейства транскрипционных факторов MYB сельскохозяйственных растений.

Материалы и методы

Нуклеотидные последовательности генов MYB *A.thaliana* были получены из Genbank. Нуклеотидные последовательности miRNA генов *A.thaliana* были заимствованы из miRBase. Свободную энергию (ΔG , kJ/mol) связывания miRNA, величину $\Delta G/\Delta G_m$ (%), позицию и схемы потенциальных сайтов связывания рассчитывали программой MirTarget. ΔG_m для miRNA определяли как свободную энергию связывания miRNA с полностью комплементарной ей нуклеотидной последовательностью. Относительная величина свободной энергии (величина $\Delta G/\Delta G_m$) использовалась в качестве сравнительного критерия степени взаимодействия miRNA с mRNA. Диаграммы варибельности аминокис-

лотной последовательностей построены с использованием WebLogo.

Результаты и их обсуждение

Для выявления miRNA, мишенями которых являются гены семейства транскрипционных факторов MYB, нами был проведен поиск сайтов связывания 337 miRNA *A.thaliana* в mRNA 144 генов MYB. В результате этого поиска было выявлено, что при критерии отбора $\Delta G/\Delta G_m$ более 85% гены семейства MYB являются мишенями 40 miRNA. Все обнаруженные сайты связывания miRNA локализованы в белок кодирующей области mRNA генов-мишеней.

Для miR828 имеется 14 генов-мишеней с величиной $\Delta G/\Delta G_m$ более 85% (таблица 1). Нуклеотидные последовательности сайтов связывания miR828 в этих mRNA гомологичны и соответственно кодируют олигопептиды, гомологичные WNTHLKK. На рисунке 1 приведены участки 14 белков MYB, содержащие эти гептапептиды. В гомологичных гептапептидах после гистидина в 11 белках имеется лейцин, в двух изолейцин и в одном метионин. Перед последним консервативным лизином примерно поровну встречаются лизин и серин. Высокая величина $\Delta G/\Delta G_m$ обусловлена тем, что в сайтах связывания происходят замены $A \leftrightarrow G$, слабо влияющие на величину ΔG .

Таблица 1 – Характеристики сайтов связывания ath-miR828 с mRNA генов MYB *A.thaliana*

Ген	Позиция сайта, н.	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Ген	Позиция сайта, н.	$\Delta G/\Delta G_m$, %
AT1G56650	310	90.2	AT4G21440	322	88.2
AT1G66370	310	92.2	AT4G22680	322	86.3
AT1G66380	310	88.2	AT5G10280	322	86.3
AT3G27920	328	88.2	AT5G16770	322	86.3
AT3G28910	322	86.3	AT5G40330	322	88.2
AT3G47600	322	88.2	AT5G52600	321	94.1
AT4G17785	325	86.3	AT5G65230	322	90.2

Семейство ath-miR858 состоит из ath-miR858a и ath-miR858b, отличающихся двумя нуклеотидами на концах последовательности. Поэтому сайты связывания их идентичны, либо отличаются на один нуклеотид. В таблице 2 приведены характеристики связывания miR858 с mRNA генов MYB. Все сайты располагаются в белок кодирующей части мРНК мишени (ри-

сунк 1). Нуклеотиды этих сайтов связывания гомологичны и кодируют гомологичные гептапептиды. На рисунке 1 приведена диаграмма, из которой видно, что эти сайты кодируют консервативный пентапептид. Впереди и после него аминокислоты пролин и глутаминовая кислота менее консервативны, поскольку miR858a и miR858b отличаются концевыми нуклеотидами.

Таблица 2 – Характеристики связывания ath-miR858a,b в нескольких сайтах связывания с mRNA генов MYB *A.thaliana*

Ген	Позиция сайта, н.	$\Delta G/\Delta G_{mb}$, %	Ген	Позиция сайта, н.	$\Delta G/\Delta G_{mb}$, %
AT1G06180	289	88.2-88.5	AT5G23000	292	86.3-86.5
AT1G34670	289	86.3-86.5	AT5G35550	295	90.2-90.4
AT1G66230	289	86.3-86.5	AT5G49330	374	86.3-86.5
AT2G26950	300	86.3-86.5	AT5G56110	289	86.5
AT2G47460	289	86.3-86.5	AT5G60890	289	86.3
AT3G08500	343	88.2-88.5	AT5G67300	348	86.5
AT3G49690	292	86.3-86.5			

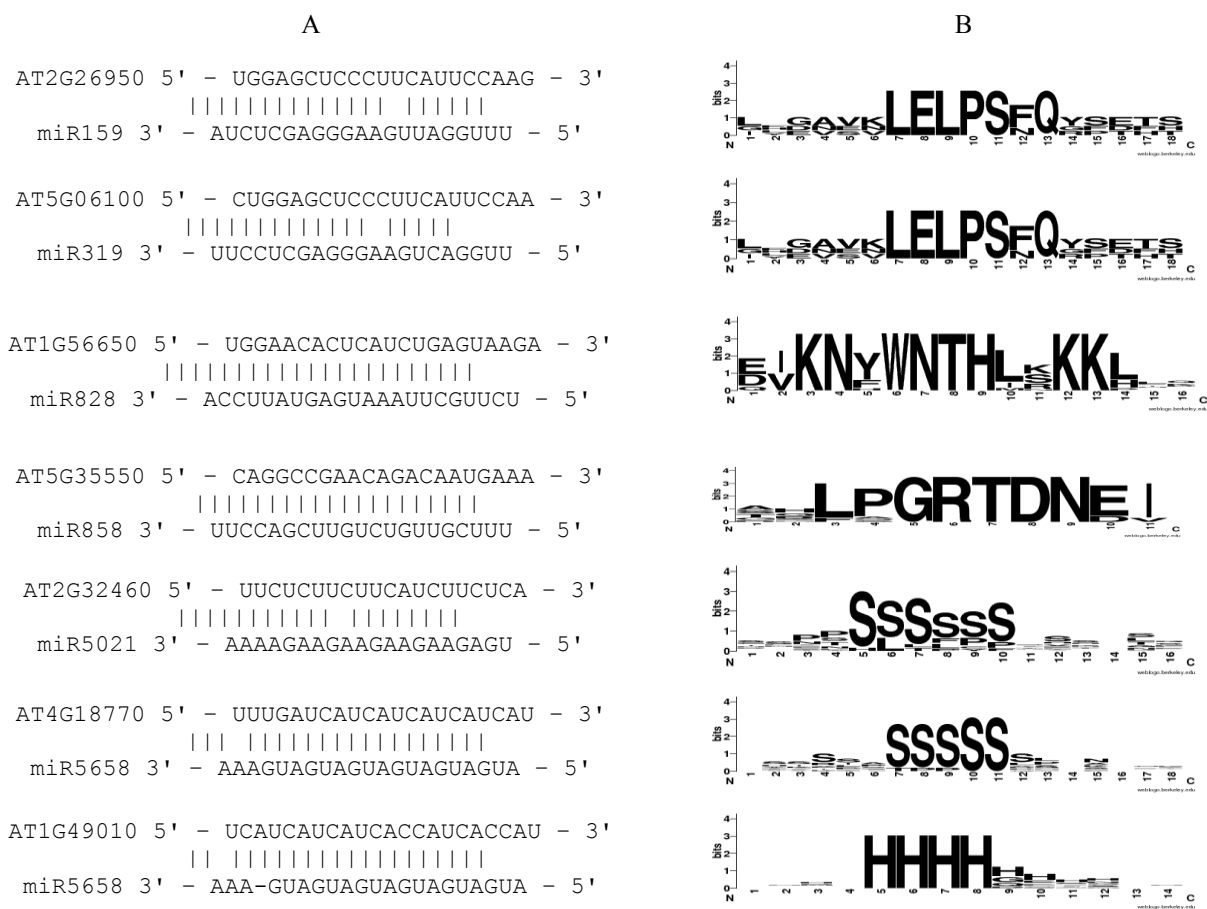


Рисунок 1 – Схемы сайтов связывания miRNA (A) и вариабельность аминокислотных последовательностей сайтов связывания miRNA в mRNA генов MYB *A.thaliana* (B)

Сайты связывания семейства miR156 выявлены в mRNA генов AT3G06490 и AT5G17800. miRNA семейства miR159 и miR319 имели общие гены-мишени: AT2G26290, AT2G32460, AT3G11440, AT5G06100 и AT5G55020. Все сайты связывания кодировали гептапептиды, гомологичные LELPSFQ (рисунок 1).

Для miR5021 найдены сайты связывания в mRNA генов AT1G56160, AT2G32460, AT3G12820, AT4G18770, AT5G25560 и AT5G62470. Сайты связывания miR5021 кодировали гексапептид SSSSSS (рисунок 1).

miR5658 имела сайты связывания в mRNA генов AT1G79180, AT2G32460, AT3G12820,

AT3G13890, AT4G18770, AT4G25560, AT5G26660 и AT5G62470, которые кодировали консервативный пептид SSSSS. mRNA одиннадцати других генов связывали miR5658 в сайтах, кодирующих олигопептиды, гомологичные ННННН. То есть, высоко гомологичные нуклеотиды в сайтах связывания miR5658 кодирова-

ли олигопептиды в разных рамках считывания. mRNA пяти генов, кодировавших олигосерин, были мишенями для miR5021 и miR5658 (рисунок 1). Для miR5021 и miR5658 выявлены множественные сайты связывания, начала которых локализованы последовательно через 1-3 нуклеотида.

Таблица 3 – Характеристики связывания miRNA в одном сайте mRNA генов MYB *A.thaliana*

Ген	miRNA	Позиция сайта, н.	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Ген	miRNA	Позиция сайта, н.	$\Delta G/\Delta G_m$, %
AT1G08810	ath-miR172a	585	86	AT5G61420	ath-miR5640	792	89.8
AT5G16770	ath-miR1888	1417	85.1	AT5G62470	ath-miR5641	758	85.4
AT3G55730	ath-miR2934-3p	871	88	AT4G32730	ath-miR5650	1307	87.5
AT5G12870	ath-miR391	219	87	AT4G17785	ath-miR5656	890	86
AT5G06110	ath-miR415	1419	86	AT4G32730	ath-miR775	389	86
AT5G01200	ath-miR4243	450	85.4	AT3G09370	ath-miR830	24	85.4
AT3G52250	ath-miR426	3345	85.7	AT4G18770	ath-miR835-5p	61	87.5
AT2G02820	ath-miR447c-3p	447	88.9	AT5G17800	ath-miR838	825	85.7
AT3G13890	ath-miR5016	804	86	AT5G16600	ath-miR854a	1697	85.2
AT5G52260	ath-miR5020b	81	86.3	AT5G65790	ath-miR855	709	88.5
AT5G16770	ath-miR5633	745	87.8	AT1G68320	ath-miR870	649	89.8
AT3G62610	ath-miR5634	465	88.2	AT5G06110	ath-miR415	1419	86.0
AT5G54230	ath-miR5638a	878	85.7	AT3G52250	ath-miR5648-3p	779	86.0

В таблице 3 приведены характеристики связывания miRNA в одном сайте mRNA генов MYB. Для изученных нами ранее семейств транскрипционных факторов *SPL* и *GRF* в качестве мишеней miRNA было характерно наличие одного сайта связывания miRNA, который характеризовался почти полной комплементарностью нуклеотидных последовательностей miRNA и mRNA мишени [15,16]. При рассмотрении генов семейства транскрипционных факторов MYB были выявлены особенности: 1) некоторые гены-мишени MYB имеют более одного сайта связывания

miRNA, начала которых расположены последовательно через 1-3 нуклеотида, что повышает вероятность контроля процесса трансляции; 2) в отличие от генов *SPL* и *GRF*, не все гены семейства MYB являются мишенями miRNA; 3) нуклеотиды сайтов связывания miRNA кодировали олигопептиды MYB в разных рамках считывания.

Полученные результаты показывают, что miRNA могут регулировать экспрессию большинства генов MYB и тем самым оказывать влияние на признаки продуктивности и устойчивости растений.

Литература

- 1 Mitsuda N. and Ohme-Takagi M. Functional Analysis of Transcription Factors in Arabidopsis // Plant Cell Physiol. – 2009. – Vol. 50. – P. 1232-1248.
- 2 Riano-Pachon D.M., Ruzicic S., Dreyer I. and Mueller-Roeber B. PlnTFDB: an integrative plant transcription factor database // BMC Bioinformatics. 2007. – Vol. 8. – P. 42.
- 3 Dubos C., Stracke R., Grotewold E., Weisshaar B., Martin C., Lepiniec L. MYB transcription factors in Arabidopsis // Trends in Plant Science. – 2010. – Vol. 15. – P. 573–581.
- 4 Zhang Y., Liang W., Shi J., Xu J., Zhang D. MYB56 Encoding a R2R3 MYB Transcription Factor Regulates Seed Size in Arabidopsis thaliana // Journal of Integrative Plant Biology. – 2013. – Vol. 55. – P. 1166-1178.
- 5 Li Y., Sawada Y., Hirai A., Sato M., Kuwahara A., Yan X., Hirai M.Y. Novel insights into the function of Arabidopsis R2R3-MYB transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis // Plant Cell Physiol. – 2013. – Vol. 54. – P. 1335-1344.

- 6 Liu S., Wang X., Li E., Douglas C.J., Chen J., Wang S. R2R3 MYB transcription factor PtrMYB192 regulates flowering time in *Arabidopsis* by activating FLOWERING LOCUS C // *Journal of Plant Biology*. – 2013. – Vol. 56. – P. 243-250.
- 7 Wang, R.-K., Cao, Z.-H. and Hao, Y.-J. Overexpression of a R2R3 MYB gene MdSIMYB1 increases tolerance to multiple stresses in transgenic tobacco and apples // *Physiologia Plantarum*. – 2014. – Vol. 150. – P. 76–87.
- 8 Seo P.J., Park C.M. MYB96-mediated abscisic acid signals induce pathogen resistance response by promoting salicylic acid biosynthesis in *Arabidopsis* // *New Phytol.* – 2010. – Vol. 186. – P. 471–483
- 9 Xia R., Zhu H., An Y.-G., Beers E.P., Liu Z. Apple miRNAs and tasiRNAs with novel regulatory networks // *Genome Biol.* – 2012. – Vol.13. – P. 47.
- 10 Zhou M., Luo H. MicroRNA-mediated gene regulation: potential applications for plant genetic engineering // *Plant Mol Biol.* – 2013. – Vol. 83. – P. 59-75.
- 11 Fu C., Sunkar R., Zhou C., Shen H., Zhang J.-Y., Matts J., Wolf J., Mann D.G.J., Stewart C.N., Tang Y., Wang Z.Y. Overexpression of miR156 in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) results in various morphological alterations and leads to improved biomass production // *Plant Biotechnol. J.* – 2012. – Vol. 10. – P. 443–452.
- 12 Schommer C., Bresso E., Spinelli S.V., Palatnik J.F. MicroRNAs in Plant Development and Stress Responses. – Signaling and Communication in Plants 15. – H.: Springer, 2012. – 296 p.
- 13 Allen R.S., Li J., Alonso-Peral M.M., White R., Gubler F. and Millar A.A. MicroR159 regulation of most conserved targets in *Arabidopsis* has negligible phenotypic effects // *Silence*. – 2010. – Vol. 1. – P. 18.
- 14 Katiyar A., Smita S., Lenka S.K., Rajwanshi R., Chinnusamy V., Bansal K.C. Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and *Arabidopsis* // *BMC Genomics*. – 2012. – Vol. 13. – P. 1471–2164.
- 15 Bari A.A., Orazova S.B., Ivashchenko A.T. miR156- and miR171-Binding Sites in the Protein-Coding Sequence of Some Plant Genes // *BioMed Res. Int.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 1-7.
- 16 Сагайдак А.И., Пинский И.В., Иващенко А.Т., Ренье М., Бари А.А. Связывание miRNA с mRNA генов рост-регулирующих транскрипционных факторов арабидопсиса, риса и кукурузы // *Вестник. Серия биологическая*. – 2013. – Т.3, №59. – С. 289-292.