

УДК 577.21

Бари А.А., Атамбаева Ш.А., Оразова С.Б., Бакенова Д.Т., Иващенко А.Т.

МикроРНК ПРИ СТРЕССЕ У РАСТЕНИЙ

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

Рассмотрены данные об участии микроРНК в ответе растений на стрессовые факторы. Отмечается важная роль микроРНК в регуляции развития растений и в ответной реакции на различные виды стресса.

В процессе эволюции растения выработали множество защитных реакций на стрессовые воздействия. Большое разнообразие стрессовых факторов (засоление, засуха, температура, тяжелые металлы, органические соединения и т.д.) действующих на растения привело к выработке как универсальных, так и специфических защитных механизмов к этим стрессам. Нужно учитывать, что адаптация к одному из стрессовых факторов может приводить в некоторых случаях к увеличению устойчивости только к одному фактору, а в других случаях растительный организм становится устойчивым одновременно и к другим факторам среды. Механизмы реакций растений на внешние воздействия подвергались естественному отбору и поэтому молекулярно-генетические процессы адаптации растительной клетки часто однотипны и рациональны. Разнообразные стрессовые факторы могут действовать длительное время или сравнительно кратковременно, но оказывать сильное влияние. В первом случае в большей степени проявляются специфические механизмы устойчивости, а во втором – неспецифические.

Несмотря на интенсивное изучение молекулярно-генетических механизмов адаптации растений к стрессу остаются еще мало изученные проблемы реакции растений на конкретный абиотический и биотический стресс [1-4]. Дальнейшее выяснение молекулярно-генетических механизмов ответа растений на разные типы стресса будет способствовать получению новых устойчивых форм сельскохозяйственных растений традиционными и нетрадиционными методами селекции.

В реакции растений на стресс принимают участие, как правило, несколько ферментов и даже метаболических процессов, что подразумевает изменение экспрессии многих генов. В последние годы было установлено, что в регуляции экспрессии генов участвуют малые РНК (miRNA) которые проявляют свое действие в посттранскрипционном этапе экспрессии генов [5-7]. Необходимо отметить, что термин miRNA (микроРНК) не отражает их настоящий размер 5,7-7,6 нм, однако, он широко употребляется в научной литературе. Число обнаруженных miRNA постоянно увеличивается в результате крупномасштабного секвенирования полных геномов модельных и сельскохозяйственных растений. miRNA растений имеют длину в среднем 21 нуклеотид и процессируются из 70 - 500 нуклеотидных транскриптов межгенных участков [8]. Иногда несколько генов miRNA расположены близко друг к другу и транскрибируются в виде одной pri-miRNA из которой вырезаются незрелые pre-miRNA. Дальнейшее разрезание pre-miRNA приводит к образованию дуплекса miRNA/miRNA*. Затем miRNA включается в комплекс RISC (RNA-induced silencing complex) который связывается с матричной РНК (mRNA) [9]. После образования комплементарного комплекса miRNA с mRNA происходит расщепление mRNA, либо подавление ее трансляции.

Во многих работах была показана важная роль miRNA в реакции растений на биотический и абиотический стресс [10-18]. В таблице приведены сведения об участии в реакции растений на стресс. Jones-Rhoades и Bartel выявили связь экспрессии miR395 с активностью супероксиддисмутазы и АТФ-сульфуриказы, которые участвуют в реакции *Arabidopsis thaliana* на сульфатный стресс [10]. Уровень miR395 увеличивался в ответ на снижение концентрации сульфата, что приводило к снижению активности АТФ-сульфуриказы за счет подавления трансляции соответствующей mRNA путем связывания с ней miR395. В последующей работе было подтверждено участие miR395 в реакции растений на сульфатный стресс [11]. Так, в условиях ограничения сульфата экспрессия miR395 существенно повышается. Мишенью miR395 являются два семейства генов АТФ-сульфуриказы и сульфат транспортера 2, которые включаются в сульфатный метаболизм. Их транскрипты сильно подавляются miR395, которая повышено экспрессируется в трансгенном *Arabidopsis thaliana*, который сверх-аккумулирует сульфат в проростках, но не в корнях. Этот мутант аккумулирует в 2 раза больше сульфата в проростках, чем дикий тип. Подавление экспрессии гена *APS4* есть результат сверх экспрессии miR395 в трансгенных растениях. Распределение сульфата от старых к новым листьям ухудшается в растениях повышено экспрессирующих miR395.

Участие miR399 в реакции растений на уровень фосфата в среде показано на *Arabidopsis thaliana* [12, 13]. Низкие уровни фосфата индуцировали сильное увеличение уровня miR399, тогда как экспрессия mRNA гена-мишени *UBC24* была уменьшена прежде всего в корнях растений находящихся в среде с низкой концентрацией фосфата. Показано, что miR399 связывалась с 5'UTR mRNA гена *UBC24*. Связь экспрессии miR399 и mRNA гена *UBC24* в зависимости от концентрации фосфата в среде показана еще в одной работе этих авторов [14]. Недавно показано участие miR399 и других miRNA в реакции *Solanum lycopersicum* на изменение концентрации фосфата в среде [15]. В корнях *S. lycopersicum* miR158, miR862-3p, miR319, miR394 и miR399 дифференциально экспрессировались при избытке фосфата и дефиците фосфата.

Таблица - miRNA растений, участвующие в ответной реакции на абиотический стресс

Стресс	МикроРНК	Вид растения	Ген-мишень
Сульфат	miR395	<i>Arabidopsis, Panicum, Brachypodium</i>	АТФ сульфурилазы (<i>APS1, APS3, APS4</i>); сульфатный транс-портер (<i>AST68</i>)
Холод, дегидратация, солевой стресс, абсцизовая кислота	miR393, miR389a, miR319c, miR417	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AFB3, TIR1; AtMYB104, ATMYB33; ATNIC1, PDR10</i>
Тяжелые металлы (Cu, Cd)	miR393, miR171	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AFB3, TIR1; ATS6A.2, SCL6</i>
Низкий фосфат	miR399	<i>Arabidopsis, Panicum</i>	Ингибитор транспорта фосфата (<i>TIR1</i>)
Окислительный стресс	miR398, miR398a-c,	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Супероксиддисмутаза (<i>CSD1, CSD2</i>)
Абсцизовая кислота, солевой стресс	miR398, miR402	<i>Populus tremula, Arabidopsis</i>	<i>ATNHX4, PDE317, DML3</i>
Засуха, скрученный лист	miR165, miR166	<i>Triticum aestivum</i>	<i>PHB, PHV, REV</i>
Дегидратация, абсцизовая кислота	miR159	<i>Craterostigma plantagineum</i>	
Засуха, осмотический и солевой стресс	miR-169g, miR-169n(o)	<i>Oryza sativa</i>	Транскрипционные факторы.
Засуха, абсцизовая кислота	miR-169	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
Абиотический стресс	miR159, miR169, miR172	<i>Larix leptolepis</i>	Транскрипционные факторы (<i>SCL, MYB, NF-YA</i>)
Холодовой стресс	miR-167, miR-319	<i>Oryza sativa</i>	Ретинол-дегидрогеназа, протенкиназа. Транскрипционные факторы, протеиназы.
Тепловой стресс	miR156, miR163, miR169, miR172, miR398, miR399	<i>Arabidopsis thaliana Erysiphe graminis</i>	<i>SPL11, SPL10, SPL6, SPL3. TPS3, RGR, GLN2, TRNL.2. ATHAP2C, EMB2220,</i> Транскрипционные факторы.
Солевой и щелочной стресс	miR396	<i>Oryza sativa</i>	<i>AtGRF2</i> , белки теплового шока, регуляторы, факторы, регулирующие рост.
Водный дефицит	miR169, miR408, miR398	<i>Medicago truncatula</i>	Цитохром оксидаза (<i>COX5b</i>)

При действии фосфата miR158, miR319 и miR399 были отзывчивы в корнях и листьях. Установлено, что miR395, miR779.1, miR840 и miR867 в листьях специфически отвечали на фосфат. Тогда как miR398 в листьях и miR399 в корнях и листьях индуцировались. Кроме этого, miR158 в корнях, так же как miR837-3p в листьях были отзывчивы как к фосфату, так и к микоризной колонизации. И наоборот, miR862-3p в корнях была отзывчива к фосфату, но не микоризному симбиозу. Экспрессия miR319 и miR394 в корнях, и miR158, miR169g*, miR172, miR172b*, miR319, miR771 и miR775 в листьях повышалась и понижалась при фосфатном дефиците, соответственно.

В нескольких работах выявлено участие в реакции растений на тяжелые металлы. Показано, что miR398 в *A. thaliana* имеет мишенью два гена супероксиддисмутаза (*CSD1* и *CSD2*) путем расщепления или ингибирования трансляции их мРНК [16]. В работе анализировали транскриптом мутантов связанных с продукцией miR398 и нашли, что mRNA кодирующие шаперон для супероксиддисмутаза, который доставляет медь к *CSD1* и *CSD2* в различные клеточные компартменты. Установлено расщепление сайтов в mRNA супероксиддисмутаза. Показано, что белок и уровень mRNA тесно связаны с количеством miR398, экспрессия которой сама зависит от содержания меди в среде. Авторы создали трансгенные растения резистентные к расщеплению mRNA супероксиддисмутаза посредством miR398 и продемонстрировали, что как mRNA супероксиддисмутаза, так и белок аккумулируются в этих растениях, когда уровень miR398 повышен или лимитирована медь.

Показано участие miR398 в регуляции гомеостаза меди и кадмия [17]. Установлено, что miR393 и miR171 тоже играют важную роль в регуляторной сети реакций на медный и кадмиевый стресс.

В реакции растений на действие тяжелых металлов практически всегда участвует miR398 [18, 19]. На растениях арабидопсиса, риса, тополя и табака показано участие и других miRNA (miR399, miR408, miR156, miR164 и miR168) в ответе на действие тяжелых металлов [20].

Для Казахстана засуха является одним из основных стрессовых факторов при возделывании многих сельскохозяйственных культур. Поэтому представляется важным выяснить участие miRNA в регуляции экспрессии белок-кодирующих генов определяющих засухоустойчивость. В нескольких работах изучено изменение экспрессии miRNA в растениях в условиях засухи или обезвоживания [21-25].

Растения *Phaseolus vulgaris* реагировали на засуху изменением экспрессии miRNA. Выявлены консервативные и специфические для фасоли miRNA, реагирующие на засуху. [21]. В проростках риса тоже выявлены miRNAs отвечающие на условия дегидратации [22]. Известно, что скрученный лист в некоторых растениях является признаком засухоустойчивости. Показано, что этот признак связан с экспрессией miR166 в растениях кукурузы [23]. При прорастании семян и росте проростков *A. thaliana* в условиях стресса дегидратацией установлена ответная реакция в экспрессии miR417 [24]. Изменение экспрессии miR417 происходило во всех органах, включая стебель, корень, листья и цветки. В растениях *A. thaliana* выявлены miR156, miR163, miR169, miR172, miR398 and miR399 отвечающие на изменения температуры среды [25]. В этой работе определен профиль экспрессии еще 120 уникальных miRNA при температурном стрессе.

Приведенные в таблице данные свидетельствуют об участии различных miRNA в ответе растений на стресс. В ряде случаев установлены гены-мишени для miRNA, однако, требуется дальнейшее исследование роли miRNA в реакции растений на абиотический стресс.

Литература

- 1 Косулина Л.Г., Луценко Э.К., Аксенова В.А. Физиология устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды. Ростов-на-Дону, 1993. 240с.
- 2 Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: Гилем, 2001. 160 с.
- 3 Schutzendubel A., Polle A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal - induced oxidative stress and protection by // *Journal of Experimental Botany*, 2002, V.53, P.1351-1365.
- 4 Yordanov I., Velikova V., Tsonev T. Plant responses to drought and stress tolerance // *Bulg. J. Plant Physiol.*, 2003, P.187-206.
- 5 Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function // *Cell*, 2004, V.118, P.281-297.
- 6 Phillips J.P., Dalmy T., Bartels D. The role of small RNAs in abiotic stress // *FEBS Letters*, 2007, V.581, P.3592-3597.
- 7 Vionnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs // *Cell*, 2009, V.136, P.669-687.
- 8 Hirsch J., Lefort V., Vankerssaver M. et al. Characterization of 43 non-protein coding mRNA genes in *Arabidopsis*, including the mir162-derived transcripts // *Plant Physiol.* 2006, V.140, P.1192-1204.
- 9 Hutvagner G., McLachlan J., Pasquinell A.E. et al. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 2001, V.293, P.834-838.
- 10 Jones-Rhoades M.W., Bartel D.P. Computational identification of plant microRNAs and their target, including a stress-induced miRNA // *Molec. Cell*, 2004, V.14, P.787-799.
- 11 Liang G., Yang F., Yu D. MicroRNA395 mediates regulation of sulfate accumulation and allocation in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Journ.*, 2010, V.62, P.1046-1057.
- 12 Fujii H., Chiou T.J., Lin S.I., Aung K., Zhu J.K. A miRNA involved in phosphate-starvation responses in *Arabidopsis* // *Curr. Biol.*, 2005, V.15, P.2038-2043.
- 13 Chiou T.J., Aung K., Lin S.I., Wu C.C., Chiang S.F., Su C.L. Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis* // *Plant Cell*, 2006, V.18, P.412-421.
- 14 Aung K., Lin S.I., Wu C.C., Huang Y.T., Su C.L., Chiou T.J. *Pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene // *Plant Physiol.*, 2006, V.141, P.100-1011.
- 15 Gu M., Xu K., Chen A., Zhu Y., Tang G., Xu G.. Expression analysis suggests potential roles of microRNAs for phosphate and arbuscular mycorrhizal signaling in *Solanum lycopersicum* // *Physiol. Plant.*, 2010, V.138, P.226-237.
- 16 Beauchclair L., Yu A., Bouche N. microRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in *Arabidopsis* // *Plant J.*, 2010, V.62, P.454-462.
- 17 Ding Y.F., Zhu C. The role of microRNAs in copper and cadmium homeostasis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009, V.386, P.6-10.
- 18 Jagadeeswaran G., Saini A., Sunkar R. Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in *Arabidopsis* // *Planta*, 2009, V.229, P.1009-1014.
- 19 Jeong D.H., German M.A., Rymarquis L.A., Thatcher S.R., Green P.J. Abiotic stress-associated miRNAs: detection and functional analysis // *Methods Mol. Biol.*, 2010, V.592, P.203-230.
- 20 Jia X., Mendu V., Tang G. An array platform for identification of stress-responsive microRNAs in plants // *Methods Mol. Biol.*, 2010, V.639, P.253-69.

21 Arenas-Huertero C., Perez B., Rabanal F. et al. Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. *Plant Molec. Biol.*, 2009, V.70, P.385-401.

22 Jian X., Zhang L., Li G. et al. Identification of novel stress-regulated microRNAs from *Oryza sativa* L. // *Genomics*, 2010, V.95, P.47-55.

23 Juarez M.T., Kui J.S., Thomas J., Heller B.A., Timmermans M.S. microRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity // *Nature*, 2004, V.428, P.84-88.

24 Jung H.J., Kang H. Expression and functional analyses of microRNA417 in *Arabidopsis thaliana* under stress conditions // *Plant Physiol. Biochem.*, 2007, V.45, P.805-811.

25 Lee H., Yoo S.L., Lee J.H. et al., Genetic framework for flowering-time regulation by ambient temperature-responsive miRNAs in *Arabidopsis* // *Nucl. Acids Res.*, 2010, V.38, P.3081-3093.

Тұжырым

Стресс факторларына өсімдіктердің жауабында қатысатын микроРНК туралы мәліметтер қарастырылған. Стрестің әр түрлі түрлеріне жауап реакцияларда және өсімдіктердің дамуының реттелуінде микроРНК-ның маңызды рөлі көрсетілген.

Summary

It is considered a data by microRNA participation in the answer of plants to stress factors. It is marked the important role mRNA in regulation of development of plants and in response to various kinds of stress.

УДК 577.21

Берилло О.А., Исабекова А.С., Хайленко В.А., Атамбаева Ш.А., Иващенко А.Т.

СВОЙСТВА ИНТРОННЫХ miRNA ЧЕЛОВЕКА И ОСОБЕННОСТИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С mRNA

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

Установлены сайты взаимодействия 686 интронных miRNA с mRNA 51 генов кодирующих интронные miRNA. Выявлены особенности взаимодействия изученных miRNA с 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA каждого гена. Установлена значительная гетерогенность функциональных участков mRNA по плотности расположения этих сайтов и по числу сайтов связывания с miRNA. Выявлены miRNA отличающиеся высокой селективностью к mRNA определенных генов.

В 2001 году было показано, что miRNA (микроРНК) принадлежат к большому классу малых белок-некодирующих РНК. Многие miRNA имеют высокую степень эволюционного консерватизма структуры и выявлены у различных организмов [1]. Основная часть miRNA имеет интронное и межгенное происхождение. Транскрипция miRNA часто связана с экспрессией многих генов, которые кодируют белки и ncRNAs [2]. Около 37% интронных miRNA экспрессируются из интронов белок-кодирующих генов [3].

miRNA могут участвовать в онкогенезе. Некоторые miRNA ведут себя как супрессоры опухолей, то есть подавляют неконтролируемую пролиферацию клеток. Разная степень экспрессии miRNA была обнаружена у больных людей раком поджелудочной железы [2], молочной железы [4-6], рака толстой кишки [7-10], печени [11-12], аденокарциномой поджелудочной железы [13], и в других солидных опухолях относительно здоровых людей [14]. Определены некоторые miRNA, которые вовлечены в процесс метастазирования [15-16].

В настоящей работе изучены свойства интронных miRNA человека и особенности их взаимодействия с mRNA (матричная РНК) в 5'UTR (5'-нетранслируемая часть мРНК), CDS (белок-кодирующая нуклеотидная последовательность) и 3'UTR (3'-нетранслируемая часть мРНК). В качестве мишеней для интронных miRNA (in-miRNA) выбраны mRNA генов, которые кодируют интронные miRNA. По литературным данным, эти гены играют важную роль при развитии различных онкологических заболеваний. Большинство работ по изучению miRNA проводилось с целью выявления взаимодействия отдельных miRNA с конкретными mRNA, а также их взаимосвязанной экспрессии. Цель работы заключается в выявлении особенностей и закономерностей взаимодействия между 686 интронными miRNA и 51 mRNA генов кодирующих miRNA. Представляется важным установить интронные miRNA, регулирующие трансляцию mRNA генов кодирующих эти miRNA.

Материалы и методы

В качестве материала использованы нуклеотидные последовательности mRNA генов, содержащих в интронах miRNA, заимствованные из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), *Homo sapiens* Genome build 37.2. Нуклеотидные последовательности miRNA и их pre-miRNA получены из базы данных miRBase (<http://www.mirbase.org>).

Для поиска интронных miRNA была разработана программа miRNA Finder 2.2 (<http://sites.google.com/site/malaheene/software/mirna-finder>). Для расчета величины свободной энергии гибридизации (ΔG) использовали программу RNAHybrid 2.1 (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/mahybrid/>). Поиск сайтов связывания miRNA проводили по всей нуклеотидной последовательности mRNA. Сайты взаимодействия miRNA с mRNA определяли на основании величины ΔG и ее стандартного отклонения.