

5. Hausser J., Syed A.P., Bilen B., Zavolan M. Analysis of CDS-located miRNA target sites suggests that they can effectively inhibit translation // *Genome Res.* - 2013. - Vol. 23. - No. 4. - P. 604-615.
6. Wang H., Zhu Y. *et al.* miRNA-29c suppresses lung cancer cell adhesion to extracellular matrix and metastasis by targeting integrin $\beta 1$ and matrix metalloproteinase2. - No. MMP2 // *PLoS One.* - 2013. - Vol. 8. - No. 8 :e70192.
7. Zhong S, Li W, Chen Z, Xu J, Zhao J. miR-222 and miR-29a contribute to the drug-resistance of breast cancer cells // *Gene.* - 2013. - Vol. 531 - No. 1. - P. 8-14.
8. Shi Y., Wang C.Z. *et al.* Screening of differentially expressed microRNAs in borderline and malignant gastrointestinal stromal tumors // *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* - 2013. - Vol. 42. - No. 1. - P. 20-25.
9. Finoux A.L., Chartrand P. Oncogenic and tumour suppressor microRNAs // *Med Sci.* - No. Paris. - 2008. - Vol. 24. - No. 12. - P. 1049-1054.
10. Leontis N.B., Stombaugh J., Westhof E. The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices // *Nucleic Acids Res.* - 2002. - Vol. 30. - P. 3497-3531.
11. Hu R., Liu W. *et al.* A Runx2/miR-3960/miR-2861 regulatory feedback loop during mouse osteoblast differentiation // *J. Biol. Chem.* - 2011. - Vol. 286. - No. 14. - P. 12328-12339.
12. Chatterjee S., Sivakamasundari Vol. *et al.* Making no bones about it: Transcription factors in vertebrate skeletogenesis and disease. *Trends Dev. Biol.* - 2012. - Vol. 6. - P. 45-52.
13. Lian J.B., Stein G.S. *et al.* MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat. Rev. Endocrinol.* - 2012. - Vol. 8. - No. 4. - P. 212-227.

УДК 577.21

И.В. Пинский*, А.И. Сагайдак, С.Б. Оразова, А.Ю. Пыркова, А.Т. Иващенко
Институт проблем биологии и биотехнологии, КазНУ им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан
*e-mail: ilya.pinskyi@mail.ru

Связывание microRNA с mRNA генов рост-регулирующих транскрипционных факторов некоторых сельскохозяйственных растений

Установлено связывание семейства miR396 с mRNA рост-регулирующих транскрипционных факторов (GRF) *Glycine max*, *Medicago truncatula*, *Solanum lycopersicum*, *Sorghum bicolor* и *Vitis vinifera*. Определены сайты связывания miR396 с mRNA, вычислена свободная энергия их взаимодействия, составлены схемы связывания нуклеотидов miR396 с mRNA. В mRNA генов *GRF* всех изученных растений сайты связывания находятся в белок-кодирующей части и кодируют олигопептиды RSRKPVE или RSRKHVE. Полученные данные свидетельствуют, что экспрессия генов *GRF* в разных растениях регулируется с помощью семейства miR396.

Ключевые слова: miRNA, mRNA, транскрипционный фактор, растения.

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

Кейбір ауылшаруашылық өсімдіктердің өсуін реттейтін транскрипциялық факторлар гендердің mRNA мен microRNA байланысуы

Glycine max, *Medicago truncatula*, *Solanum lycopersicum*, *Sorghum bicolor* және *Vitis vinifera* өсімдіктердің өсуін реттейтін транскрипциялық факторлар гендердің mRNA мен miR396 тұқымдасымен байланысуы анықталды. miR396 және mRNA-мен байланысу сайттары анықталды, олардың эрекеттесуінің бос қуаты есептелінді, нуклеотидтердің байланысу сызбанұсқасы құрастырылған. Зерттелген өсімдіктердің *GRF* гендердің mRNA-ында байланысу сайттары белок-кодтайтын бөлігінде орналасқан және RSRKPVE немесе RSRKHVE олигопептидтерді кодтайды. Қорыта айтқанда, әр түрлі өсімдіктерде *GRF* гендердің экспрессиясы miR396 тұқымдасы арқылы реттелінеді.

Түйін сөздер: miRNA, mRNA, транскрипциялық фактор, өсімдіктер

I.V. Pinskyi, A.I. Sagaydak, S.B. Orazova, A.Ju. Pyrkova, A.T. Ivashchenko

Связывание microRNA с mRNA генов рост-регулирующих транскрипционных факторов некоторых сельскохозяйственных растений

It was determined binding sites of the family miR396 with mRNA of growth-regulating transcription factor (GRF) of *Glycine max*, *Medicago truncatula*, *Solanum lycopersicum*, *Sorghum bicolor* and *Vitis vinifera*. Defined binding sites miR396 with mRNA, calculated the free energy of their interaction, schemes of miR396 with mRNA nucleotide binding. Binding sites are found in protein-coding parts and encode RSRKPVE or RSRKHVE oligopeptides in mRNA of all the plants *GRF* genes. These data suggest that the expression of genes *GRF* in different plants is controlled by the family miR396.

Keywords: miRNA, mRNA, a transcription factor, plants.

microRNA (miRNA) растений играют важную роль в регуляции экспрессии генов определяющих процессы роста и развития [1-5]. Установлено прямое действие некоторых miRNA на экспрессию генов рост-регулирующих транскрипционных факторов (GRF) и других генов растений [6-14]. Увеличение концентрации miR396 приводит к подавлению транскрипционных факторов, а снижение экспрессии miR396 повышает уровень экспрессии генов *GRF* [15]. Предсказание miRNA, действующих на гены мишени растений, является сложной задачей и требуется разработка новых программ, поскольку существующие предсказывают много ложно-положительных сайтов связывания miRNA с mRNA. Применение программы предсказания генов мишеней miRNA позволяет с высокой точностью определять сайты связывания их с mRNA [16]. В геномах сельскохозяйственных растений имеется более 10 тысяч генов транскрипционных факторов, и для многих не изучено действие miRNA на их экспрессию. Поэтому представляется важным установить miRNA, которые связываются с mRNA генов семейства транскрипционных рост-регулирующих факторов, играющих ключевую роль в процессах роста и развития растений.

Материалы и методы

Нуклеотидные последовательности *GRF* генов *Glycine max* (Gma), *Medicago truncatula* (Mtr), *Solanum lycopersicum* (Sly), *Sorghum bicolor* (Sbi) и *Vitis vinifera* (Vvi) получены из [Genbank](#). Нуклеотидные последовательности miRNA геномов изученных растений заимствованы из miRBase. Свободную энергию (ΔG) связывания miRNA, величину $\Delta G/\Delta G_m$ (%), позицию и схемы потенциальных сайтов связывания рассчитывали программой MirTarget, разработанной в нашей лаборатории. ΔG_m для miRNA определяли как свободную энергию связывания miRNA с ее полностью комплементарной нуклеотидной последовательностью. Величина $\Delta G/\Delta G_m$ использовалась в качестве сравнительного критерия степени взаимодействия miRNA и mRNA.

Результаты и их обсуждение

Геномы полностью секвенированных сельскохозяйственных растений еще недостаточно аннотированы, в частности у многих из них установлены не все miRNA [16].

Таблица 1 - Относительная свободная энергия взаимодействия семейства miR396 с miRNA генов *GRF* винограда, люцерны, сорго, томата и сои.

Гены	miRNA	$\Delta G/\Delta G_m$, %
Vvi000913, Vvi001038, Vvi006461, Vvi017355, Vvi032173, Vvi036239, Vvi037877, Vvi040456, Vvi044157	vvi-miR396a-d	94,0-96,1
Vvi002405, Vvi020113, Vvi035036	vvi-miR396a-d	90,2-95,8
Vvi002507, Vvi004254, Vvi006110, Vvi018177, Vvi022350, Vvi042923	vvi-miR396a-d	92,2-96,0
Mtr003954, Mtr019402, Mtr028218, Mtr028986	mtr-miR396a-5p,b	92,0-96,1
Sbi007115, Sbi009008, Sbi023539, Sbi031583	sbi-miR396a-e	92,0-96,3
Sbi010080, Sbi018012, Sbi019465,	sbi-miR396a-e	92,0-96,4
Sbi025078	sbi-miR396a-e	87,0-92,2
Sly011359, Sly013222	osa-miR396a-i	83,3-100
Sly014377	osa-miR396a-i	83,0-96,1
Gma001682, Gma011587, Gma021030, Gma021805, Gma033196, Gma035899, Gma045435	gma-miR396a-c,h,i	91,8-92,5
Gma005521, Gma011182, Gma013188, Gma018091, Gma019479, Gma022734, Gma024536, Gma025321, Gma042617, Gma042774, Gma046226	gma-miR396a-c,h,i	92,0-96,2

Выявленные ортологичные miRNA обладают высокой гомологией нуклеотидных последовательностей, несмотря на многие миллионы лет прошедших после дивергенции изучаемых в настоящей работе растений. В частности, нуклеотидные последовательности miR396a

арабидопсиса и риса идентичны. Это свойство miRNA позволяет находить гены мишени для предполагаемых miRNA с большой вероятностью.

В геноме *V. vinifera* имеется 18 генов *GRF*. mRNA всех этих генов эффективно связывалась с vvi-miR396a-d (таблица 1). По степени родства гены *GRF V. vinifera* распределялись на три группы, в каждой из которых был специфический интервал изменения величины $\Delta G/\Delta G_m$.

mtg-miR396a-5p,b связывались с mRNA трех генов *GRF M. truncatula* с величиной $\Delta G/\Delta G_m$ в интервале от 92,0% до 96,1% (таблица 1). То есть, экспрессия всех генов *GRF M. truncatula* может подавляться очень эффективно с помощью двух miRNA семейства miR396.

Восемь генов *GRF S. bicolor* распределялись в три группы по степени связывания с sbi-miR396a-e (таблица 1). Величина $\Delta G/\Delta G_m$ взаимодействия семейства osa-miR396a-i с mRNA двух групп генов *GRF S. bicolor* изменялась практически в одинаковой степени, а с mRNA гена Sbi025078 в интервале от 87,0% до 92,2%. mRNA гена Sbi025078 не связывалась sbi-miR396a-e с величиной $\Delta G/\Delta G_m$ более 80%.

Таблица 2 - Аминокислотные последовательности, кодируемые сайтами связывания miR396 с генами различных растений.

Ген и олигопептид	Ген и олигопептид
<i>Glycine max</i>	<i>Medicago truncatula</i>
Gma045435 HRGKN RSRKPVE VLKTT	Mtr028218 IRRRY RSRKPVE SSSSS
Gma033196 NRGRH RSRKPVE GQSGH	Mtr003954 HRGRP RSRKPVE LHTNN
Gma011587 HRGKN RSRKPVE VLKST	Mtr028986 HRGRN RSRKPVE LPTPT
Gma001682 NRGRH RSRKPVE GQLGH	Mtr019402 HRGRN RSRKPVE LVVSS
Gma024536 HRGRN RSRKPVE VSSAT	<i>Sorghum bicolor</i>
Gma021030 HRGKN RSRKPVE VLKTT	Sbi019465 HRGR RSRKPVE AAAVT
Gma022734 HRGRP RSRKPVE VNTNS	Sbi023539 NRNRH RSRKPVE NQPKK
Gma035899 NRGRH RSRKPVE GQSGH	Sbi018012 HRGKS RSRKPVE VTSPA
Gma046226 HRGKN RSRKPVE VLKTT	Sbi009008 HRGKN RSRKPVE MSLAT
Gma013188 HRGRN RSRKPVE VSSAI	Sbi031583 HRGRN RSRKPVE TQLVP
Gma021805 NRGRH RSRKPVE GQSGH	Sbi010080 HRGRN RSRKPVE APLVP
Gma025321 HRGRN RSRKPVE SQTMT	Sbi007115 HRGRN RSRKPVE SKTAS
Gma005521 HRGRN RSRKPVE SQTMT	Sbi025078 NRGRH RSRKHVE GQPGH
Gma018091 HRGRN RSRKPVE SQTMT	<i>Vitis vinifera</i>
Gma042617 HRGRN RSRKPVE SQTMT	Vvi022350 MNRGRH RSRKPVE GQTGH
Gma019479 HRGRN RSRKPVE QREGS	Vvi020113 MHRGR RSRKHVE ASQLG
Gma042774 HRGRN RSRKPVE LPTPT	Vvi036239 MHRGKN RSRKPVE ATSSY
Gma011182 HRGRN RSRKPVE LPTPT	Vvi040456 MHRGRP RSRKPVE VHADV
<i>Hordeum vulgare</i>	Vvi000913 MHRGRN RSRKPVE VMTTPS
Hvu003170 HRGRN RSRKPVE TQLVA	Vvi018177 INRGRH RSRKPVE GQTGH
Hvu008248 HRGKN RSRKPVE PMSSS	Vvi006110 INRGRH RSRKPVE GQTGH
Hvu011812 NHGR RSRKHVE GRKMT	Vvi017355 MHRGKN RSRKPVE VISAT
<i>Solanum lycopersicum</i>	Vvi002405 MHRGR RSRKHVE ASQLG
Sly013222 HRGRN RSRKPVE IMTNN	Vvi044157 MHRGRN RSRKPVE IPTPA
Sly011359 HRGR RSRKPVE IPTPA	Vvi004254 INRGRH RSRKPVE GQTGH
Sly014377 HRGRN RSRKHVE SQSTA	Vvi042923 INRGRH RSRKPVE GQTGH
<i>Triticum aestivum</i>	Vvi006461 MHRGRN RSRKPVE VMTTPS
Tae005214 HRGKN RSRKPVE PMSSA	Vvi032173 THKGRP RSRKPVE LHSEL
Tae003589 HRGRN RSRKPVE TQLVP	Vvi001038 MHRGRN RSRKPVE SQTTT
Tae007720 HRGR RSRKPVE AAAAT	Vvi037877 MHRGRN RSRKPVE SQTTT

В геноме томата еще не установлены miRNA семейства miR396 и поэтому мы использовали miRNA семейства miR396 риса, состоящего из девяти miRNA (osa-miR396a-i). В настоящее время известно только три гена *GRF* в геноме *S. lycopersicum* (таблица 1).

Величина $\Delta G/\Delta G_m$ взаимодействия mRNA двух генов с osa-miR396a-i с изменялась в интервале от 83,3% до 100%. С mRNA гена Sly014377 семейство osa-miR396a-i связывалось с величиной $\Delta G/\Delta G_m$ от 83,0% до 96,1%.

В геноме *G. max* известно 18 генов рост-регулирующих факторов (таблица 1). Эти гены распределялись в две группы и gma-miR396a-c,h,i связывались с их mRNA с величиной от 91,8 - 92,5% и 91,0 - 96,2%, соответственно.

В mRNA всех генов рост-регулирующих факторов изученных растений все сайты связывания с miR396 находились в белок-кодирующей части, были гомологичны и кодировали гептапептид RSRKPVE или RSRKHVE (таблица 2).

Полученные результаты показывают, что сайты связывания miR396 находятся в кодирующей области mRNA и их нуклеотидная последовательность консервативна в *G. max*, *M. truncatula*, *S. lycopersicum*, *S. bicolor* и *V. vinifera*. Высокая величина $\Delta G/\Delta G_m$ свидетельствует о сильном контроле экспрессии генов семейства *GRF* со стороны miR396 и высокой селективности miRNA-мишеней.

Важным результатом настоящей работы является установление сайтов связывания miRNA в белок-кодирующей части mRNA рост-регулирующих факторов. Ранее нами было показано связывание miRNA в белок-кодирующей части генов транскрипционных факторов SPL [17]. По-видимому, экспрессия большинства транскрипционных факторов растений регулируется посредством связывания miRNA в белок-кодирующей части mRNA этих генов.

Литература

1. Ding Y., Tao Y., Zhu C. Emerging roles of microRNAs in the mediation of drought stress response in plants // *J. Exp. Bot.* – 2013. doi: 10.1093/jxb/ert164
2. Hauser F., Chen W., Deinlein U., Chang K., Ossowski S., Fitz J., Hannon G.J., Schroeder J.I. A genomic-scale artificial microRNA library as a tool to investigate the functionally redundant gene space in *Arabidopsis* // *Plant Cell* . - 2013. - V.25. - P. 2848-2863.
3. Hwang D-G, Park J.H., Lim J.Y., Kim D., Choi Y., et al. The hot pepper (*Capsicum annuum*) microRNA transcriptome reveals novel and conserved targets: a foundation for understanding microRNA functional roles in hot pepper // *PLoS ONE*. – 2013. - V. 8, N.5. doi:10.1371/journal.pone.0064238
4. Hwang E.-W., Shin S.-J., Kwon H.-B. Identification of microRNAs and their putative targets that respond to drought stress in *Solanum tuberosum* // *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* – 2011. - V. 54. - P. 317-324.
5. Xia R., Zhu H., An Y.-G., Beers E.P., Liu Z. Apple miRNAs and tasiRNAs with novel regulatory networks // *Genome Biology*. – 2012. - V. 13. - P. 47-51
6. Haga N., Kato K., Murase M., Araki S., Kubo M., Demura T., Suzuki K., Muller I., Voss U., Jurgens G. et al. // R1R2R3-Myb proteins positively regulate cytokinesis through activation of KNOLLE transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Development* - 2007. - V.134. - P.1101-1110.
7. Horiguchi G., Kim G. T. and Tsukaya H. The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* - 2005. - V. 43. - P. 68-78.
8. Kim J. H. and Lee B. H. Growth-regulating factor 4 of *Arabidopsis thaliana* is required for development of leaves, cotyledons, and shoot apical meristem // *J. Plant Biol.* - 2006. - V. 49. - P. 463-468.
9. Kim J. H., Choi D., Kende H. The AtGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in *Arabidopsis* // *Plant J.* - 2003. - V. 36. - P. 94-104.
10. Kim J. H. and Kende H. A transcriptional coactivator, AtGIF1, is involved in regulating leaf growth and morphology in *Arabidopsis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2004. - V.101. - P. 13374-13379.
11. Rodriguez R.E., Mecchia M.A., Debernardi J.M., Schommer C., Weigel D., Palatnik J.F. Control of cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* by microRNA miR396 // *Development*. - 2010. - V. 137. - P. 103-12.
12. Liu D., Song Y., Chen Z. and Yu D. Ectopic expression of miR396 suppresses GRF target gene expression and alters leaf growth in *Arabidopsis* // *Physiol. Plant.* - 2009. - V. 136. - P. 223-236.
13. Minorsky P.V. Syncytium formation by cyst nematodes: involvement of a microRNA // *Plant Physiology*. - 2012. - V. 159. - P. 1-2.
14. Palatnik J.F., Allen E., Wu X., Schommer C., Schwab R., Carrington J.C., Weigel, D. Control of leaf morphogenesis by microRNAs // *Nature*. - 2003. - V. 425. - P. 257-263.
15. Schwab R., Palatnik J. F., Riester M., Schommer C., Schmid M., Weigel, D. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome // *Dev. Cell*. - 2005. - V. 8. - P. 517-527.
16. Zhang Y., Yin Z., Feng X., Shen F. Differential expression of microRNAs between 21A genetic male sterile line and its maintainer line in cotton (*Gossypium hirsutum L.*) // *Journal of Plant Studies*. - 2014. - V. 3, N. 1. - P. 13
17. Bari A.A., Orazova S.B., Ivashchenko A.T. miR156- and miR171-binding sites in the protein-coding sequences of several plant genes // *Biomed Res Int.* - 2013. doi: 307145.