

УДК 577.21

<sup>1</sup>А.И. Сагайдак\*, <sup>1</sup>И.В. Пинский, <sup>1</sup>А.Т. Иващенко, <sup>2</sup>М. Ренье, <sup>1</sup>А.А. Бари  
<sup>1</sup>Институт проблем биологии и биотехнологии, КазНУ имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан  
<sup>2</sup>Национальный исследовательский институт информатики и автоматизации, г. Париж, Франция  
 \*e-mail: a\_sagaidak\_11@mail.ru

### Связывание microRNA с mRNA генов рост-регулирующих транскрипционных факторов арабидопсиса, риса и кукурузы

Изучено взаимодействие microRNA с mRNA генов рост-регулирующих транскрипционных факторов арабидопсиса, риса и кукурузы. Установлено, что из 338 miRNA арабидопсиса только семейство ath-miR396 эффективно связывалась с mRNA GRF. Выявлено, что из 661 miRNA риса с mRNA девяти рост-регулирующих факторов с высокой специфичностью связывались все девять членов семейства osa-miR396. Установлено, что из 321 miRNA кукурузы с mRNA 36 рост-регулирующих факторов кукурузы с высокой специфичностью связывались все восемь членов семейства zma-miR396.

**Ключевые слова:** miRNA, mRNA, miR396, растение.

### А.И. Сагайдак, И.В. Пинский, А.Т. Иващенко, М. Regnier, А.А. Бари microRNA-ның арабидопсис, күріш және жүгерінің өсуді реттейтін транскрипция факторлары гендерінің mRNA-дарымен байланысуы

Арабидопсис, күріш және жүгері microRNA-ның өсуді реттейтін транскрипция факторлар гендер mRNA-мен әрекеттесуі зерттелген. Арабидопсисстың 338 miRNA арасында тек қана ath-miR396 тұқымдасының GRF mRNA-мен байланысуы анықталған. Күріштің 661 miRNA-ның ішінде osa-miR396 тұқымдасының барлық тоғыз мүшесі тоғыз өсуді реттейтін транскрипция факторлар mRNA-мен байланысқаны анықталған. Жүгерінің 321 miRNA арасында zma-miR396 тұқымдасының барлық сегіз мүшесі 36 GRF mRNA-мен биік дәрежелі ерекшелікпен байланысуы анықталған.

**Түйінді сөздер:** miRNA, mRNA, miR396, өсімдік.

### A.I. Sagaidak, I.V. Pinsky, A.T. Ivashchenko, M. Regnier, A.A. Bari Binding of microRNAs with mRNAs of Growth Regulating Transcription Factors Genes in Arabidopsis, Rice and Maize

The interaction of microRNAs with mRNAs of growth regulating transcription factors in arabidopsis, rice and corn is studied. It was found that among 338 miRNAs in arabidopsis only ath-miR396 family efficiently bound to GRF mRNAs. It was revealed that among 661 rice miRNAs all nine members of osa-miR396 family bound to mRNAs of nine growth regulatory factors with high specificity. It was found that all eight members of zma-miR396 family out of 321 corn miRNAs bound to 36 mRNAs of growth regulating factors with high specificity.

**Keywords:** miRNA, mRNA, miR396, plant.

microRNA (miRNA) - класс малых некодирующих RNA, которые играют важную роль в экспрессии генов [1-6]. miRNA контролируют процессы роста и развития растений посредством регуляции экспрессии транскрипционных факторов [7-10]. Установлено регуляторное действие miRNA на пролиферацию клеток *Arabidopsis thaliana* [11-15]. Показано прямое действие на экспрессию генов рост-регулирующих транскрипционных факторов (GRF) растений [11, 13, 16, 17]. Увеличение концентрации miR396 приводит к подавлению транскрипционных факторов, а снижение экспрессии miR396 повышает уровень экспрессии GRF [3, 12, 18]. Применение программы предсказания генов мишеней miRNA позволяет с высокой точностью определять сайты связывания их с mRNA [6, 19, 20]. В геноме *A. thaliana* имеется более 2500 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, которые играют большую роль в процессах роста и развития растений.

#### Материалы и методы

Нуклеотидные последовательности GRF генов *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Zea mays* были получены из Genbank. Нуклеотидные последовательности miRNA геномов изученных растений были заимствованы из miRBase. Свободную энергию ( $\Delta G$ ) связывания miRNA, величину  $\Delta G/\Delta G_m$  (%), позицию и схемы потенциальных сайтов связывания рассчитывали программой MirTarget.  $\Delta G_m$  для miRNA определяли как свободную энергию связывания miRNA с полностью комплементарной ей

нуклеотидной последовательностью. Величина  $\Delta G/\Delta G_m$  использовалась в качестве сравнительного критерия степени взаимодействия miRNA и mRNA.

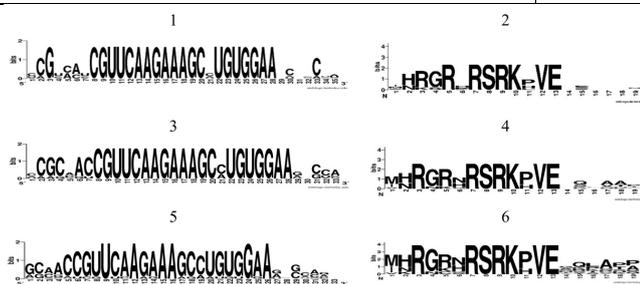
### Результаты и их обсуждение

Установлено, что из 338 miRNA *A. thaliana* только ath-miR396a,b эффективно связывалась с mRNA *GRF*. Из девяти генов *GRF* mRNA *GRF1-4* и *GRF7-9* являются мишенями miR396 с величиной  $\Delta G/\Delta G_m$  от 85 до 90% (таблица 1). В mRNA генов *GRF* арабидопсиса сайты связывания находились в белок-кодирующей части, имели высокую гомологию и кодировали гептапептид RSRKPVE или RSRKHVE (рисунок 1).

Установлено, что из 661 miRNA риса с mRNA девяти рост регулирующих факторов с высокой специфичностью связывались все девять членов семейства osa-miR396a-i (таблица 1). Эти miRNA в разной степени связывались с mRNA генов *GRF* и распределялись в пять групп: osa-miR396a,b; osa-miR396c; osa-miR396d,e; osa-miR396f; osa-miR396g,h,i. Относительная свободная энергия связывания (величина  $\Delta G/\Delta G_m$ ) mRNA шести генов *GRF* риса составляла от 85,4 до 100% и по возрастающей эффективности они располагались в ряд: osa-miR396a,b < osa-miR396c < osa-miR396d,e < osa-miR396f < osa-miR396g,h,i. С mRNA трех генов *GRF* риса относительная свободная энергия связывания членов семейства osa-miR396a-i составляла от 75,9 до 88,1% и по возрастающей эффективности они располагались в последовательности: osa-miR396f < osa-miR396d,e < osa-miR396a,b < osa-miR396g,h,i < osa-miR396c. В mRNA всех генов рост-регулирующих факторов кукурузы сайты связывания osa-miR396a-i находились в белок-кодирующей части, были гомологичны и кодировали гептапептид RSRKPVE или RSRKHVE (рисунок 1).

**Таблица 1** - Относительная свободная энергия взаимодействия семейства miR396 с miRNA генов *GRF* *A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays*.

Гены	miRNA	$\Delta G/\Delta G_m$ , %
AT2G22840, AT4G37740, AT2G36400, AT3G52910, AT5G53660, AT4G24150, AT2G45480	ath-miR396a,b	85,2-90,4
Os06g0116200, Os02g0678800, Os02g0701300, Os02g0776900, Os03g0674700, Os04g0600900	osa-miR396a-i	84,9-100
Os03g0729500, Os11g0551900, Os12g0484900	osa-miR396a-i	75,9-88,1
Zma000362, Zma002853, Zma002963, Zma003319, Zma004217, Zma004793, Zma013797, Zma013999, Zma015997, Zma023472, Zma024988, Zma027510, Zma027808, Zma040855, Zma033368, Zma035070, Zma042909, Zma050402, Zma050878, Zma051502, Zma051860, Zma052142, Zma052445, Zma054079, Zma058313, Zma058936	zma-miR396a-h	80,0-100
Zma007079, Zma007506, Zma011215, Zma011730, Zma030100, Zma030201, Zma030802, Zma031491, Zma031965, Zma033300	zma-miR396a-h	80,9-88,9



**Рисунок 1** - Вариабельность нуклеотидов в сайте связывания miR396 с mRNA генов *GRF* (1, 3, 5), и вариабельность аминокислот в соответствующем домене белка GRF (2, 4, 6) арабидопсиса, риса и кукурузы, соответственно.

Установлено, что из 321 miRNA кукурузы с mRNA 36 рост-регулирующих факторов кукурузы с высокой специфичностью связывались все восемь членов семейства zma-

miR396a-h (таблица 1). Эти miRNA в разной степени связывались с mRNA генов рост регулирующих факторов и распределялись в пять групп: zma-miR396a,b; zma-miR396c; zma-miR396d,e; zma-miR396f; zma-miR396g,h. С mRNA 16 генов кукурузы относительная энергия связывания членов семейства zma-miR396a-i составляла от 82,1 до 100% и по возрастающей эффективности связывания (величине  $\Delta G/\Delta G_m$ ) они располагались в последовательности: zma-miR396f < zma-miR396d,e < zma-miR396a,b < zma-miR396g,h < zma-miR396c. С mRNA 10 генов кукурузы относительная энергия связывания членов семейства zma-miR396a-h составляла от 80,9 до 88,8% (таблица 1) и по возрастающей величине  $\Delta G/\Delta G_m$  они располагались в той же последовательности. Во всех случаях свободная энергия связывания членов семейства zma-miR396a-h с mRNA 36 генов рост-регулирующих факторов кукурузы составляла более 80,9% от максимальной свободной энергии, что является высоким показателем их взаимодействия. Полученные данные показывают, что все паралоги гены рост-регулирующих факторов кукурузы связываются со всеми членами семейства zma-miR396. Следовательно, синтез всех рост регулирующих факторов кукурузы (транскрипционных факторов), определяющих многие признаки продуктивности кукурузы, находится под контролем только членов семейства zma-miR396a-h.

В mRNA 36 генов рост-регулирующих факторов кукурузы сайты связывания семейства zma-miR396 находились в белок-кодирующей части, были высоко гомологичны и кодировали гептапептид RSRKPVE или RSRKHVE (рисунок 1).

Нами установлено, что восемь генов рост регулирующих факторов растений кукурузы, входящих в международную базу данных транскрипционных факторов, являются не отдельными генами, а изоформами продуктов соответствующих генов-мишеней для miRNA.

Сайты взаимодействия miR396 и mRNA *GRF* находились в белок-кодирующей области и кодировали гептапептиды RSRKHVE или RSRKPVE (рисунок 1).

Анализ взаимодействий miR396 с ортологами *GRF* в *A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays* показал консервативный характер сайта связывания miRNA.

Полученные результаты показывают, что сайты связывания miR396 находятся в кодирующей области mRNA и их нуклеотидная последовательность консервативна в *A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays*. Высокая величина  $\Delta G/\Delta G_m$  свидетельствует о сильном контроле экспрессии генов семейства *GRF* со стороны miR396 и высокой селективности miRNA-мишеней.

#### Литература

- Ding Y., Tao Y., Zhu C. Emerging roles of microRNAs in the mediation of drought stress response in plants // J. Exp. Bot. - 2013. - Vol. 64. - P. 3077-3086.
- 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. - Vol. 8. - e64238. - doi:10.1371/journal.pone.0064238.
- Minorsky P.V. Syncytium formation by cyst nematodes: involvement of a microRNA // Plant Physiol. - 2012. - Vol. 159. - P. 1-2.
- 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. - Vol. 54. - P. 317-324.
- 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.) // J. of Plant Studies. - 2014. - Vol. 3. - P. 13-27.
- 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.
- 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. - Vol. 134. - P. 1101-1110.
- 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. - Vol. 101. - P. 13374-13379.
- 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. - Vol. 49. - P.463-468.
- 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. - Vol. 36. - P. 94-104.
- 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. - Vol. 43. - P. 68-78.
- 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. - Vol.137. - P. 103-112.
- 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.- Vol. 136. - P. 223-236.
- Palatnik J.F., Allen E., Wu X., Schommer C., Schwab R., Carrington J.C., Weigel, D. Control of leaf morphogenesis by microRNAs // Nature. - 2003. - Vol. 425. - P. 257-263.