

АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание степени доктора философии (PhD)
по специальности «6D070100-Биотехнология»
Рахметуллиной Айжан Казиевны
на тему: «Характеристики связывания miRNA с mRNA генов
транскрипционных факторов сельскохозяйственных растений»

Общая характеристика работы

Настоящая диссертация посвящена определению количественных характеристик взаимодействия miRNAs с mRNAs генов транскрипционных факторов сельскохозяйственных растений.

Актуальность темы исследования

Транскрипционные факторы (ТФ) играют ключевую роль в регуляции экспрессии многих генов и в целом всего генома эукариот. В настоящее время существует важная проблема управления экспрессией ТФ с целью увеличения продуктивности растений путем изменения их роста, развития и повышения устойчивости к биотическим и абиотическим факторам среды. В большинстве видов сельскохозяйственных растений содержится более 50 семейств ТФ и требуется выбрать из них наиболее важные в функционировании растений.

По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций (FAO), наиболее часто используемыми зерновыми культурами в мире являются рис, кукуруза и пшеница, поэтому эти виды растений выбраны в качестве объектов нашего исследования. Мы использовали арабидопсис как наиболее хорошо изученный вид растений.

В последнее время обнаружено влияние miRNA (mRNA-inhibitory RNA) на экспрессию ТФ, что открывает новые возможности регуляции их синтеза. miRNA могут взаимодействовать с mRNA генов ТФ с разной эффективностью, определяя широкий диапазон от слабого подавления экспрессии до полного блокирования синтеза белка, либо разрушения mRNA. Решение проблемы установления взаимодействия miRNA с mRNA генов-мишеней затрудняется определением генов-мишеней miRNA и установлением количественных характеристик взаимодействия этих молекул. Существующие программы предсказания генов-мишеней и сайтов связывания miRNA в их mRNA несовершенны и находят много ложноположительных генов-мишеней и сайтов для miRNA. Эта причина существенно тормозит установление ассоциаций miRNA и их генов-мишеней в растениях и животных.

Несмотря на постоянное увеличение обнаруженных miRNA в геномах растений, не всегда удается достоверно выявить их конкретные гены-мишени. Данные об изменениях концентрации miRNA в клетках на разных этапах онтогенеза и при различных воздействиях быстро увеличиваются, что подтверждает их важную роль в функционировании растений. Использование miRNA в качестве модификаторов регуляции экспрессии генов перспективно, однако необходимо точно установить гены-мишени и

избежать побочных эффектов. Используемая в работе программа MirTarget может решить эту проблему и поэтому поставленные в диссертации цель и задачи исследования могут быть решены. Установление ассоциаций miRNA и их генов мишеней будет способствовать повышению эффективности генетической инженерии растений.

Цель исследования: Изучить количественные характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов семейств ТФ *A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays* и *T. aestivum* и выявить наиболее эффективные ассоциации miRNA и генов-мишеней.

Задачи исследования:

1. Создать базы данных по генам ТФ семейств TCP, HSF, MYB, GRAS, ERF, C2H2 и miRNA *A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays* и *T. aestivum*.
2. Выявить характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов ТФ семейства TCP *A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays* и *T. aestivum*.
3. Выявить характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов ТФ семейства HSF *A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays* и *T. aestivum*.
4. Выявить характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов ТФ семейства MYB *A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays* и *T. aestivum*.
5. Выявить характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов ТФ семейства GRAS *A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays* и *T. aestivum*.
6. Выявить характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов ТФ семейства ERF *A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays* и *T. aestivum*.
7. Выявить характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов ТФ семейства C2H2 *A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays* и *T. aestivum*.
8. Выявить характеристики взаимодействия miRNA риса, кукурузы и пшеницы с mRNA генов человека.

Объекты исследования: miRNA и гены ТФ полностью секвенированных геномов *A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays*, *T. aestivum*; гены человека как мишени miRNA растений.

Предмет исследования: Количественные характеристики взаимодействия miRNA растений с mRNA генов семейств ТФ *A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays* и *T. aestivum*.

Научная новизна исследования.

Результаты нашего исследования имеют следующую новизну: 1. Для miRNA впервые предсказаны группы генов-мишеней ТФ семейств TCP, HSF, MYB, GRAS, ERF, C2H2 *A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays* и *T. aestivum*; 2. Для некоторых miRNA впервые установлены сайты связывания в mRNA генов-мишеней различных растений, которые являются консервативными и кодируют консервативные олигопептиды; 3. Впервые выявлено, что некоторые miRNA растений могут иметь более чем один ген-мишень и mRNA некоторых генов-мишеней содержат сайты связывания для двух или более разных miRNA; 4. Сайты связывания некоторых miRNA в CDS mRNA генов ТФ растений могут кодировать разные олигопептиды в зависимости от рамки считывания; 5. Впервые установлены сайты связывания miRNA риса,

кукурузы и пшеницы с mRNA генов, участвующих в различных заболеваниях человека.

Теоретическая значимость работы. Установлены количественные характеристики взаимодействия miRNA с mRNA многих генов ТФ растений, которые позволяют оценивать взаимодействия этих молекул. Выявлены полностью комплементарные взаимодействия нуклеотидов некоторых miRNA с mRNA генов ТФ растений, что свидетельствует об эффективном связывании этих miRNA с mRNA. Выявленные взаимодействия miRNA растений с mRNA ТФ способствуют пониманию влияния miRNA на многие физиологические процессы и позволяют целенаправленно использовать miRNA при генетической модификации растений. Предсказанные взаимодействия miRNA растений с mRNA генов человека позволяют рекомендовать некоторые miRNA в качестве регуляторов экспрессии генов человека.

Практическая ценность исследования. Установление ассоциаций miRNA растений и их генов мишеней ТФ семейств TCP, MYB, GRAS, ERF, C2H2 в сотни тысяч раз сокращает временные и материальные затраты поиска связей между miRNA и генами-мишенями сельскохозяйственных растений, по сравнению с нахождением ассоциаций miRNA с mRNA в мокрых опытах. Выявленные ассоциации miRNA и генов-мишеней ТФ в изученных растениях позволяют целенаправленно проводить модификацию для улучшения многих полезных свойств разных видов растений. Программа MirTarget успешно использована для нахождения сайтов связывания miRNA в mRNA генов растений и человека, и установления количественных характеристик взаимодействия miRNA с mRNA генов-мишеней. Выявленные miRNA растений могут влиять на гены человека и использоваться в качестве биологически активных соединений, поскольку они легко проникают в организм человека. Получено свидетельство об авторском праве №15600 от 2 марта 2021 года «MirTarSeq».

Основные положения, выносимые на защиту:

Часть из общего количества 2403 генов ТФ семейств TCP, HSF, MYB, GRAS, ERF, C2H2 *A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays*, *T. aestivum* могут быть мишенями miRNA этих организмов.

Результаты исследований влияния miRNA растений на mRNA генов ТФ семейств TCP, HSF, MYB, GRAS, ERF, C2H2 *A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays* и *T. aestivum* показывают, что многие изученные miRNA могут оказывать влияние на рост и развитие растений посредством влияния на ТФ.

Сайты связывания miRNA в mRNA изученных генов ТФ семейств TCP, HSF, MYB, GRAS, ERF, C2H2 располагаются в 5'UTR, CDS, и 3'UTR.

Количественные характеристики взаимодействия miRNA с mRNA изученных генов ТФ семейств TCP, HSF, MYB, GRAS, ERF, C2H2 свидетельствуют об эффективном влиянии miRNA на многие гены ТФ этих семейств.

miRNA *O. sativa*, *T. aestivum*, *Z. mays*, активно участвующих в росте и развитии растений, могут влиять на трансляцию mRNA генов человека.

Основные результаты исследований и выводы:

1. В формате для программы MirTarget созданы: базы данных по генам ТФ семейств TCP, HSF, MYB, GRAS, ERF, C2H2 состоящие из 442 генов для *A. thaliana*, 474 генов для *O. sativa*, 653 генов для *Z. mays* и 834 генов для *T. aestivum*; базы данных из 428, 738, 325 и 125 miRNA *A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays* и *T. aestivum*, соответственно.

2. На основании количественных характеристик взаимодействия 428 ath-miRNA и mRNA 27 генов ТФ семейства TCP *A. thaliana* обнаружено только 11 генов-мишеней для пяти miRNA. Сайты связывания ath-miR5021-5p были обнаружены в mRNA трех генов *A. thaliana* и в mRNA 27 генов 17 видов растений. Сайты связывания ath-miR5658-5p консервативны в mRNA 23 генов 19 видов растений. Из 738 osa-miRNA и mRNA 22 генов семейства TCP *O. sativa* только 14 генов являются мишенями для 17 miRNA. Сайты связывания osa-miR2102-5p в mRNA десяти генов семи видов растений и mRNA восьми генов шести видов растений кодируют олигопептиды AAAAAA и GGGGGG, соответственно. При взаимодействии 325 zma-miRNA и mRNA 46 генов семейства TCP *Z. mays* было выявлено только семь генов-мишеней для 11 miRNA. Из 125 miRNA и 28 mRNA генов семейства TCP *T. aestivum* выявлено, что только пять tae-miRNA имеют пять mRNA генов-мишеней. Сайты связывания tae-miR319-3p кодируют консервативный олигопептид QRGPLQS в ТФ семейства TCP у 54 видов растений. Сайты связывания tae-miR444a-3p кодируют олигопептид STSETS в mRNA 29 генов 28 видов растений.

3. Из 428 ath-miRNA и mRNA 24 генов HSF *A. thaliana* только пять генов были мишенями для пяти miRNA. Из 738 osa-miRNA и mRNA 25 генов семейства HSF *O. sativa* 12 генов находились под контролем десяти miRNA, из которых наибольшее число сайтов связывания имела miR5075-3p. Из 325 zma-miRNA и mRNA 28 генов семейства HSF *Z. mays* было выявлено только шесть генов-мишеней для семи miRNA. Из 125 tae-miRNA и mRNA 51 гена семейства HSF *T. aestivum* было обнаружено, что только три гена семейства HSF являются мишенями для четырех miRNA.

4. Из 428 ath-miRNA в mRNA 144 генов MYB *A. thaliana* было выявлено, что 32 гена являются мишенями 15 miRNA. Из 738 osa-miRNA и mRNA 124 генов семейства MYB *O. sativa* выявлено, что 34 гена являются мишенями для 32 miRNA. Из 325 zma-miRNA и mRNA 169 генов семейства MYB *Z. mays* 25 генов были мишенями для 26 miRNA. Из 125 tae-miRNA связывающихся с mRNA 258 генов семейства MYB *T. aestivum* только восемь генов были мишенями для восьми miRNA. Сайты связывания tae-miR159a,b-3p кодируют олигопептид WSSIRSK, который консервативен в 27 белках ТФ семейства MYB 22 видов растений. Белки семейства MYB 22 видов растений содержали олигопептид ELPSNQ, кодируемый сайтами связывания miR159e-3p в mRNA 23 генов 20 видов растений.

5. Из 428 ath-miRNA и mRNA 37 генов семейства GRAS *A. thaliana* было обнаружено, что только 11 генов были мишенями для восьми miRNA. Из 738 osa-miRNA только 16 miRNA могли связываться с mRNA 18 генов из 60

генов семейства GRAS *O. sativa*. Из 325 zma-miRNA и mRNA 86 генов семейства GRAS *Z. mays* только 14 генов были мишенями для восьми miRNA. Из 125 tae-miRNA и mRNA 117 генов TF семейства GRAS *T. aestivum* выявлено только пять генов-мишеней для трех miRNA. Нуклеотидные последовательности ath-miR171a-3p, osa-miR171a-3p, zma-miR171n-3p были идентичны и имели сайты связывания в mRNA 13 генов TF семейства GRAS и кодировали консервативный олигопептид ILARN.

6. Из 428 ath-miRNA и mRNA 123 генов TF семейства ERF *A. thaliana* было обнаружено, что 25 генов являются мишенями для восьми miRNA. Из 738 miRNA *O. sativa* только 13 miRNA эффективно связывались с mRNA 16 генов из 138 генов. Из 325 miRNA и mRNA 186 генов TF семейства ERF *Z. mays* только два гена были мишенями для двух miRNA. Из 125 miRNA и 169 mRNA генов *T. aestivum* было обнаружено, что только пять генов были мишенями для четырех miRNA.

7. Из 428 ath-miRNA и mRNA 87 генов TF семейства C2H2 *A. thaliana* только 17 генов были мишенями девяти miRNA. Из 738 osa-miRNA и mRNA 105 генов TF семейства C2H2 *O. sativa* выявлено только 17 генов-мишеней для 14 miRNA. Из 325 zma-miRNA и mRNA 138 генов TF семейства C2H2 *Z. mays* число генов-мишеней, связывающихся с zma-miRNA, было равным шести. Из 125 miRNA и mRNA 211 генов TF семейства C2H2 *T. aestivum* для трех miRNA было идентифицировано только шесть генов-мишеней.

8. Для ath-miR5021-5p, ath-miR5658-5p, osa-miR2102-5p, osa-miR5075-3p, имеющих несколько генов-мишеней в TF семействах C2H2, ERF, GRAS, было установлено, что нуклеотидные последовательности сайтов связывания были консервативными и кодировали консервативные олигопептиды: ath-miR5021-5p - SSSSSS, ath-miR5658-5p - НННННН, osa-miR2102-5p - ААААА и GGGGGG, osa-miR5075-3p - ААААА и GGGGGG.

9. Из 325 zma-miRNA и mRNA 17508 генов человека выявлено только 38 генов-мишеней для девяти одиночных zma-miRNA и 211 генов-мишеней для 94 семейств zma-miRNA. Из 125 tae-miRNA и mRNA 17508 генов человека выявлено только 116 генов-мишеней для 44 одиночных tae-miRNA и 57 генов-мишеней для 23 семейств tae-miRNA. Среди 17508 генов человека с 738 osa-miRNA установлены 942 генов-мишеней для 277 osa-miRNA. Для 131 одиночных miRNA установлены 641 генов-мишеней. Общее число семейств osa-miRNA составляет 146, а число их генов-мишеней равно 301. Большинство изученных zma-miRNA, tae-miRNA, osa-miRNA могут влиять на гены человека участвующие в развитии онкологических, нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний.

Связь с планом основных научных работ.

Диссертационная работа выполнена в рамках проекта «Разработка тест-систем ранней диагностики сердечно-сосудистых, онкологических и нейродегенеративных заболеваний на основе ассоциаций miRNA и их генов-мишеней» № AP05132460 Министерства образования и науки Республики Казахстан (2018-2020 гг.).

Апробация работы. Основные результаты представлены и обсуждены:

- на VII Международной научной конференции "Prospects for the development of biology, medicine and pharmacy" (Шымкент, Казахстан, 2018);
- на Международном конгрессе "Biotechnology: state of the art and perspectives" (Москва, Россия, 2019);
- на V Международной научной конференции "Plant genetics, genomics, bioinformatics and biotechnology" (Новосибирск, Россия, 2019);
- на VI Международной научной конференции студентов и молодых ученых "Farabi alemi" (Алматы, Казахстан, 2019);
- на IX Московской конференции МССМВ'19 (Москва, Россия, 2019).
- на V Международной научной конференции "Current challenges in plant genetics, genomics, bioinformatics, and biotechnology" (Новосибирск, Россия, 2019);
- на Международной научной конференции молодых ученых «Fundamental research and innovations in molecular biology, biotechnology, biochemistry» посвященная 80-летию академика Мурата Абеновича Айтхожина (Алматы, Казахстан, 2019);
- на Международной научно-практической конференции "The synergy of science and practice in the context of innovative breakthroughs in the development of economy and society: national and international aspects" (Санкт-Петербург, Россия, 2019);
- на VII Международной научно-практической конференции "Biotechnology: science and practice" (Севастополь, Россия, 2019);
- на XII Международной мультikonференции "Bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology" (Новосибирск, Россия, 2020).

Публикации и личный вклад автора. Основное содержание диссертации отражено в 16 печатных работах, в том числе 2 статьи в международном журнале с импакт-фактором, цитируемом в Scopus и Web of Knowledge; 3 статей из перечня Комитета по обеспечению качества в сфере образования и науки; 11 тезисов в материалах международных конференций.

Автор самостоятельно провёл анализ литературных данных по теме исследования, экспериментальные исследования, анализ результатов исследования, написание и оформление рукописи диссертации.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 164 страницах и состоит из обозначений и сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения и списка использованных источников из 422 наименований; содержит 32 таблицы, 17 рисунков.