

Konservatīvo mikroRNS pētījumi parastajā priedē

**Baiba Krivmane, Ilze Šņepste,
Vilnis Šķipars, Dainis Edgars Ruņģis**

Parastā priede



- «LVM Silava» ĢRC tiek veikta molekulārās rezistences mehānismu izpēte un vieni no aktuālākajiem pētījumiem ir balstīti uz parastās priedes (*Pinus sylvestris*) rezistences mehānismu izpēti pret stresu un slimībām.
- miRNS pētījumu mērķis ir iegūt zināšanas, kuras tiktu izmantotas priežu selekcijā, lai atlasītu kokus ar palielinātām adaptīvajām spējām un fenotipisko plasticitāti.

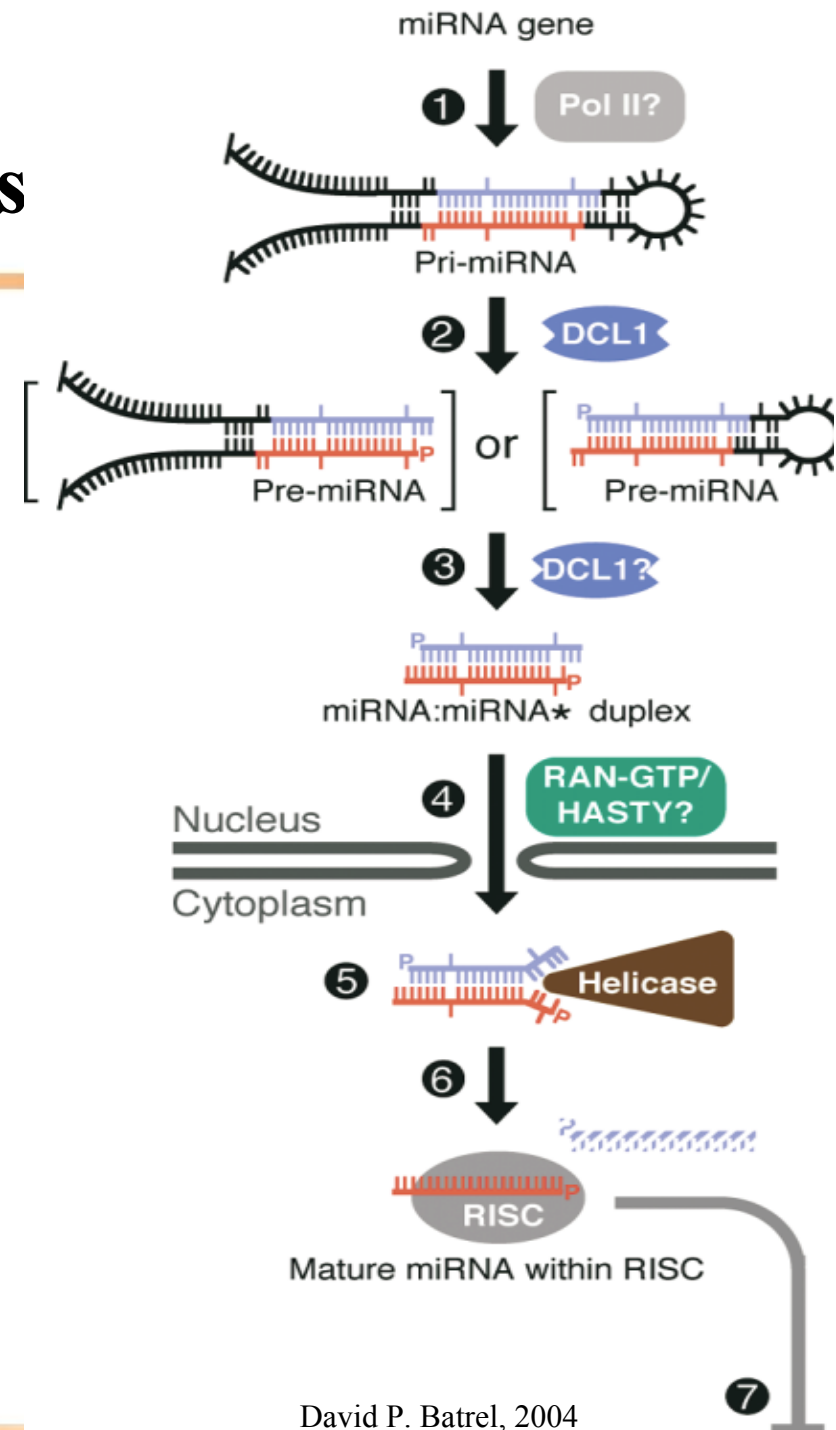
mikroRNS



- mikroRNS (miRNS) – proteīnu nekodējoši apm. 20-24 nt RNS fragmenti.
- Skujkokos miRNS - 21 nt.
- Augos piedalās gēnu ekspresijas regulēšanā, piesaistoties pie mRNS un neļaujot piesaistīties ribosomām vai šķēlot mRNS, tādējādi ietekmējot auga augšanu, attīstību, atbildes reakcijas uz stresu un slimībām utt.
- miRNS pētījumi veikti lielākoties segsēkļos un tikai dažās publikācijās parādās miRNS pētījumi skujkokos.
- Pašlaik datu bāzēs vēl neviena publikācija nav atrodama par miRNS pētījumiem parastajā priedē.

miRNS veidošanās

- Garāku transkriptu ekspresija
- Matadatas struktūras (Stem-loop) veidošanās
- miRNS veidošanā piedalās dažādi enzīmi (Pol II, Dicer-like enzīme 1, HASTY, Helicase, RISC u.c.)
- Gala produkts– 20-24 nt miRNS



Darba mērķis un uzdevumi



Darba mērķis ir izpētīt parastās priedes *Pinus sylvestris* mikroRNS lomu atbildes reakcijā pret stresu un slimībām.

Darba uzdevumi:

- miRNS identificēšana parastajā priedē
- 20-24 nt mikroRNS fragmentu iegūšana
- Noteikt atšķirīgi ekspresētus miRNS pēc paraugu apstrādes ar stresa izraisošo faktoru (sākotnēji ar 10 mM metiljasmonātu u.c.)
- Iegūto miRNS fragmentu klonēšana, sekvenēšana un datu salīdzināšana ar datu bāzes sekvencēm, lai noskaidrotu pētāmajā populācijā izplatītās miRNS un izvēlētos tālākajai analīzei piemērotākās.
- Iespējamo kandidātģēnu identificēšana, uz kuriem miRNS varētu iedarboties.

Zinātniskais darbs



1. Rezistences reakcijas inducēšana ar 10 mM metiljasmonātu

Izmantoti 6 parastās priedes rameti no viena klona. 3 rameti apstrādāti ar 10 mM metiljasmonātu, 3 rameti izmantoti kontrolei. Rameti turēti klimata kamerās (temperatūra 17-22 °C; 16 st. gaisma + 8 st. tumsa).



Pēc 2 nedēļām ievāktas skujas un no 100 mg skujām izdalīta kopējā RNS, izmantojot šķidro slāpekli un fenola:hloroforma:izoamilspirta izdalīšanas metodi.

Zinātniskais darbs



2. Paraugu sagatavošana un sekvenēšana ar jonu plūsmas sekvenātoru IonTorrent PGM

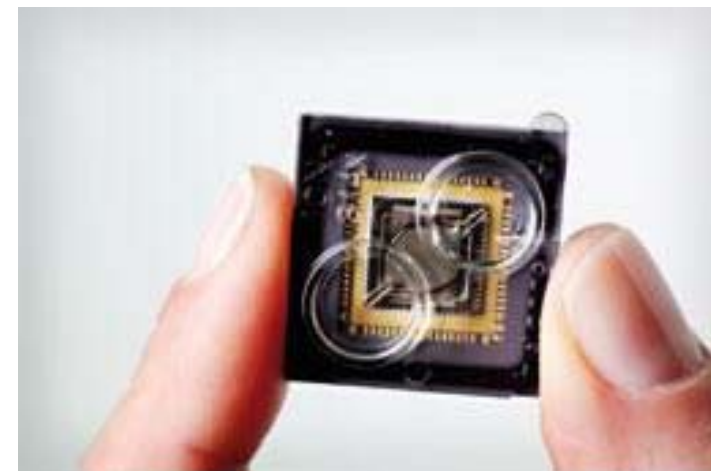
- MikroRNS sakoncentrēta un atdalīta no totālā RNS un izveidotas 6 cDNS bibliotēkas.
- Pēc cDNS kvalitātes un kvantitātes pārbaudes, pagatavotas amplificētās cDNS parauga – jonu sfēru daļiņas, izmantojot Ion OneTouch™ 2 aparātu.



Zinātniskais darbs



- Jonu sfēru daļiņu kvalitāte un kvantitāte pārbaudīta ar *Life technologies* Qubit® 2.0 fluorometeru un *Life technologies* „Ion Sphere™ Quality Control kit”, tad tās bagātinātas un sekvenētas ar IonTorrent PGM.
- 3. Iegūto datu salīdzināšana** ar miRbase 20 datubāzi, izmantojot CLC Genomics Workbench datorprogrammu.

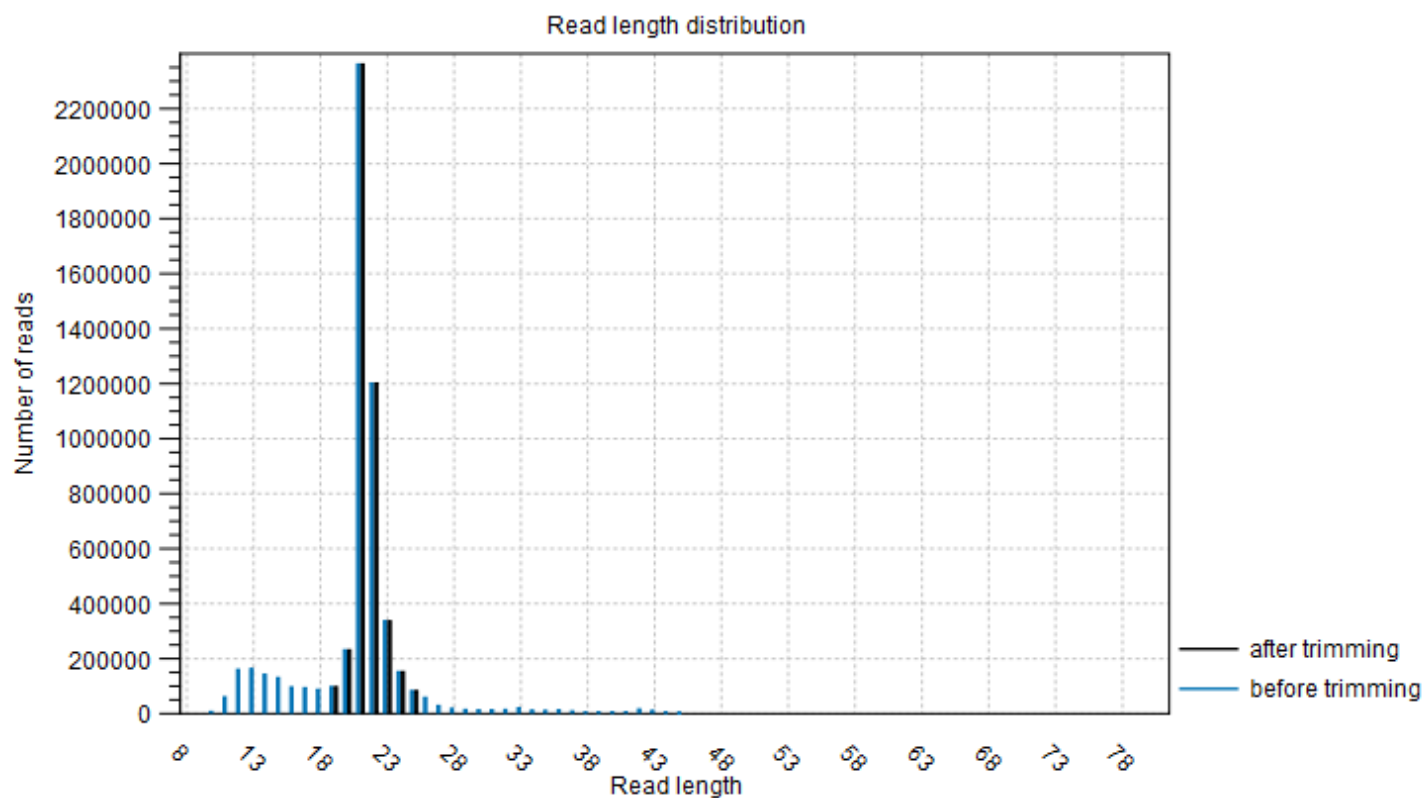


Rezultāti



- Iegūtas 1021696 sekvences ar vidējo garumu 21 nt

2 Read length before / after trimming



Rezultāti



- 497 sekvences (0,5 %) - iepriekš anotētas miRBase datubāzē 1016721 - neanotētas (99,5 %). No anotētajām sekvencēm 33,7 % ir pārstāvētas arī Parastajā eglē (*Picea abies*), 29,3 % Terpentīna priedē (*Pinus taeda*) un 11,8 % Kalna priedē (*Pinus densata*).

Annotation	Count	Percentage
Annotated	4,975	0.5%
with miRBase (Acacia auriculiformis)	41	0.8%
with miRBase (Arabidopsis thaliana)	457	9.2%
with miRBase (Oryza sativa)	307	6.2%
with miRBase (Picea abies)	1,676	33.7%
with miRBase (Pinus taeda)	1,459	29.3%
with miRBase (Pinus densata)	586	11.8%
with miRBase (Populus euphratica)	2	0.0%
with miRBase (Populus trichocarpa)	162	3.3%
with miRBase (Nicotiana tabacum)	82	1.6%
with miRBase (Vitis vinifera)	132	2.7%
with miRBase (Zea mays)	71	1.4%
Unannotated	1,016,721	99.5%
Total	1,021,696	100.0%

Konservatīvo miRNS analīze



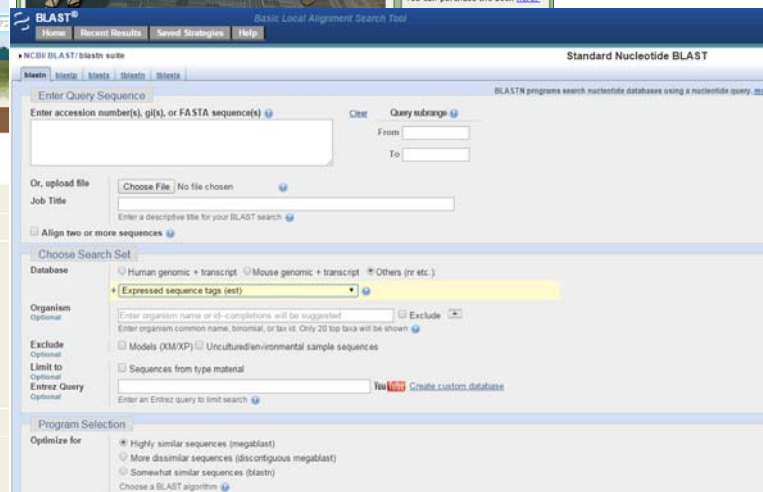
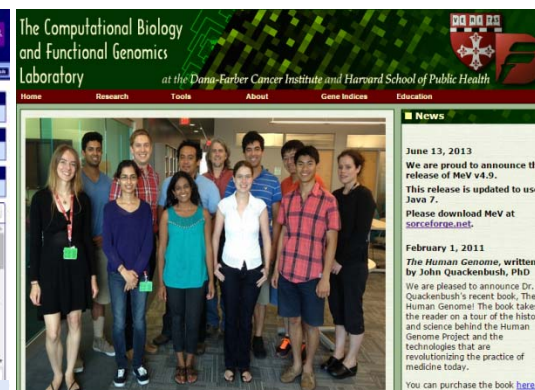
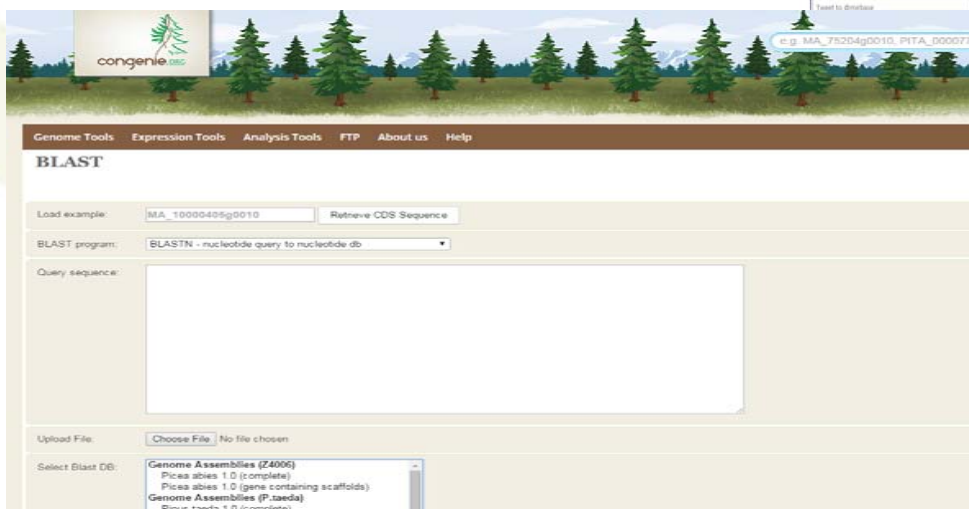
- Salīdzinot iegūtos datus ar miRBase datubāzē atrodamajām *Pinus taeda* sekvencēm, konstatēju, ka 91,7% *Pinus taeda* mikroRNS sekvenses ir sastopamas arī mūsu sekvenētajos Parastās priedes paraugos.

Resource	Sequences in resource	Sequences found	Percentage found
miRBase (Acacia auriculiformis)	7	4	57.1%
miRBase (Arabidopsis thaliana)	298	90	30.2%
miRBase (Oryza sativa)	592	82	13.9%
miRBase (Picea abies)	40	30	75.0%
miRBase (Pinus taeda)	36	33	91.7%
miRBase (Pinus densata)	30	21	70.0%
miRBase (Populus euphratica)	4	1	25.0%
miRBase (Populus trichocarpa)	352	73	20.7%
miRBase (Nicotiana tabacum)	162	30	18.5%
miRBase (Vitis vinifera)	163	27	16.6%
miRBase (Zea mays)	172	37	21.5%

Iespējamā pre-miRNS identificēšana



- Iespējamie pre-miRNS iegūti izmantjot NCBI blast EST, Congenie un Compbio, miRBase datubāzes.



Pre-miRNS meklēšana



Izmantojot nosekvenētos paraugus un CLC Genominc Workbench ieguvu:

Mature 5': **TTCCACAGCTTTCTTGA**ACTA (jābūt 20-24 nt)

miRBase 20 atrod, ka šī sekvenca atbilst miR396a.

Jāatrod pre-miRNS, lai pierādītu, ka šī sekvenca varētu būt nobriedušī miRNS!

miRBase 20 datubāzē ir publicēta *Picea abies* pre-miRNS sekvenca:

AATCCCGCCATGCTC**TTCCACAGCTTTCTTGA**ACTAAGAGTCGATCGGATCCGGTCAGTTCAGAGCTCA
AGAAAGCTGTGGGAAAACATGGGCGGATTCTG.

Meklēju līdzīgu sekvenci, piem., NCBI Blast datubāzē starp dažādu sugu priedes EST. Atrodu *Pinus taeda* sekvenci:

GAGGACCTAAATCGAGGTCGAGAGGTCGAATCCTGCGAGCTTTCTGATCAGCTGAAAATTAGGTTAAA
GATCCGCTTTTCGACGATGAATCCCGCCATGCTC**TTCCACAGCTTTCTTGA**ACTAAGAGCCGATCGGAT
CGG
GTCAGTTCAGAGCTCAAGAAAGCTGTGGGAAAACATGGACGGATTCTGATGATCTTA (97%, 0 gaps).

Izmantojot mfold, saloku sekvenci, lai veidotos cilpas struktūra (Stem loop).



THE RNA INSTITUTE
COLLEGE OF ARTS AND SCIENCES
UNIVERSITY AT ALBANY State University of New York

The mfold Web Server

[Home](#)
[DINAMelt Application](#)
[Mfold Application](#)
[Forum](#)

Applications

- [RNA Folding Form](#)
- [DNA Folding Form](#)
- [Structure Display and Free Energy Determination](#)
- [RNA Folding Form \(version 2.3 energies\)](#)

View Folding Results

- [Folding Results](#)

Documentation

- [Mfold References](#)
- [FAQs](#)
- [Folding & output options](#)
- [Folding with constraints](#)

Software

- [Mfold](#)

About

- [About](#)

Contact

- [Contact](#)

RNA Folding Form

M. Zuker
Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction.
Nucleic Acids Res. **31** (13), 3406-15, (2003)
[\[Abstract\]](#) [\[Full Text\]](#) [\[Supplementary Material\]](#) [\[Additional Information\]](#)

The folding temperature is fixed at 37°. You may still fold with the older version 2.3 RNA parameters, which allow the temperature to be varied.

[DNA mfold server](#) [Quikfold](#). Fold many short RNA or DNA sequences at once.

Enter sequence name:

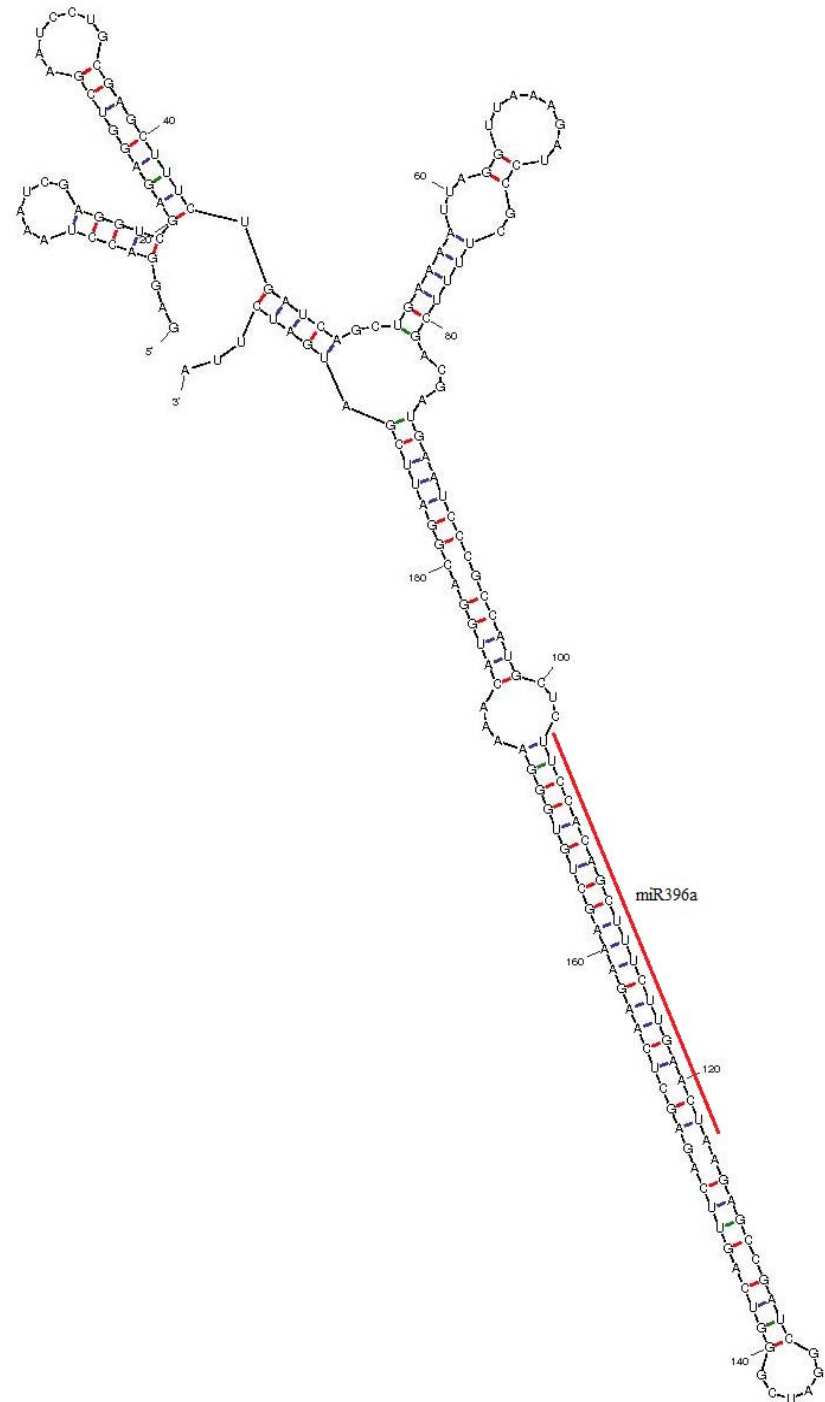
Enter the sequence to be folded in the box below. All non-alphabet characters will be removed. FASTA format may be used.

Enter [constraint information](#) in the box at the right. (optional) You may:

- force bases $i, i+1, \dots, i+k-1$ to be double stranded by entering:
 $E \ i \ 0 \ k$ on 1 line in the constraint box.
- force consecutive base pairs $i, i+1, j-1, \dots, i+k-1, j-k+1$ by entering:
 $E \ i \ j \ k$ on 1 line in the constraint box.

Lai samazinātu viltus pozitīvos rezultātus, skatos, lai (pēc Neutelings et al., 2012):

- Sekvence izveidotu stem loop struktūru
- miRNS neatrastos cilpas galā
- nebūtu pārrāvumu (*gaps*) miRNS-mRNS duplexā
- Nebūtu vairāk par 4 nesakritībām starp nukleotīdiem (*mismatches*) komplementārajā vietā



Šajā sekvencē komplementārajā vietā atrodu 2 nesakritības (*mismatches*) un sekvence atbilst iepriekš nosauktajiem kritērijiem. Pre-miRNS garums

Initial $\Delta G = -78.80$

```

      10
.-GAG|  AA
   GACCU A
   CUGGA U
 \ ---^  GC

```

```

      20      30
        G  AAU
--GAGAG UCG \
   CUUUC AGC C
 \      G  GUC
      40

```

```

      50      60
U--  .-GC  UUA  UUA
   GAUCA  UGAAAA  GG  A
   CUAGU  GCUUUU  CC  A
AUU  \  --  CG-  UAG
      190    80    70

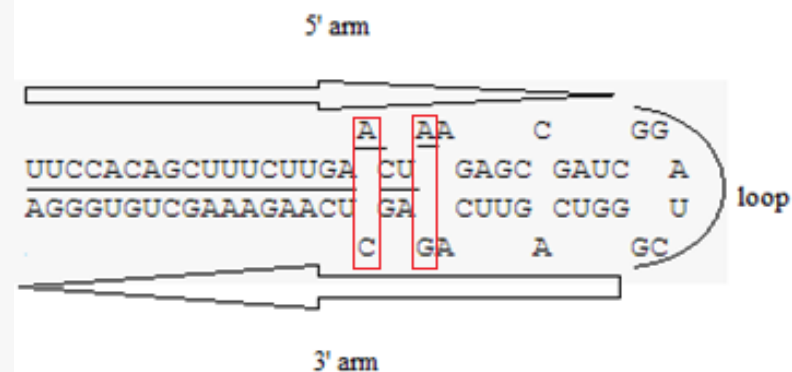
```

```

      90      100      110      120      130
ACGA  CG  CUC  A  AA  C  GG
   UGAAUCC  CCAUG  UUCCACAGCUUUCUUGA  CU  GAGC  GAUC  A
   GCUUAGG  GGUAC  AGGGUGUCGAAAGAACU  GA  CUUG  CUGG  U
A---  CA  AAA  C  GA  A  GC
      180    170    160    150    140

```

miRNA hairpin precursor



Brīvās enerģijas aprēķināšana

MFE (minimal folding free energy) – aprēķina mfold (kcal/mol)

AMFE (adjusted MFE, atspoguļo 100 nt MFE) = (MFE: RNS sekvences garums) x 100

MFEI (minimal folding free energy index) = $AMFE / (G+C)\%$

G, C, A, U daudzums (G+C, A+U)

Jo (pēc Zhang *et al.*, 2006 d):

1. pre-miRNS un nobriedis miRNS satur vairāk A+U kā citus bāžu pārus (A+U ir mazāk stabils, jo satur 2 ūdeņražu saites pretēji G+C, kas satur 3, tādejādi A+U ļaujot pre-miRNS pārveidoties par nobriedušu miRNS-RISC kompleksu)

2. pre-miRNS ir zemāks MFEI kā citiem RNS:

- pre-miRNS MFEI – 0.85 vai lielāks (vidēji – 0.97)
- tRNS – 0.64
- rRNS – 0.59
- mRNS – 0.62-0.66

3. Vidēji AMFE lielumi ir :

- augu pre-miRNS- -45.93 ± 9.43 kcal/mol
- tRNS - -32.67 ± 6.47 kcal/mol
- rRNS – -33.10 ± 2.56 kcal/mol
- mRNS – -28.53 ± 3.04 kcal/mol vai -30.44 ± 2.08 kcal/mol

MIR396a



MFE (dG, - kcal/mol)	AMFE= (MFE: RNS sekvenses garums) x 100 (- kcal/mol)	MFEI = AMFE/(G+ C)%	Sekvenses garums (nt)	(G+C) %	A(%)	C (%)	G (%)	U (%)
51	51	1	100	51	27	25	26	22

Nākotnes uzdevumi



1. Pabeigt anotēto miRNS pierādīšanu;
 2. Veikt neanotēto miRNS pierādīšanu;
 3. Veikt miRNS ekspresijas datu analīzi;
 4. Salīdzināt miRNS ekspresiju ar gēnu ekspresijas datiem.
-

Paldies par uzmanību!

