

## ПАЛИНДРОМИ И ПОТЕНЦИЈАЛНЕ СЕКУНДАРНЕ СТРУКТУРЕ У ТРАНСКРИПТИМА ИЗОФОРМИ БИЉНИХ ГЛУТАМИН-СИНТЕТАЗА

Ана Симоновић, Слађана Тодоровић

Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“,  
Универзитет у Београду, Булевар деспота Стефана 142, 11000 Београд, Србија

### Abstract

**SIMONOVIĆ Ana, Slađana TODOROVIĆ: PALINDROMES AND POTENTIAL SECONDARY STRUCTURES IN TRANSCRIPTS OF PLANT GLUTAMINE SYNTHETASE ISOFORMS**  
[Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, University of Belgrade, Bul. Despota Stefana 142, 11000 Belgrade, Serbia]

Glutamine synthetase (GS, E.C. 6.3.1.2) plays a central role in nitrogen metabolism by assimilating ammonia into glutamine. Plants have one chloroplastic (GS2) and one or more cytosolic (GS1) isoforms. *Zea mays* and *Arabidopsis thaliana* are among species with largest GS gene families, having one GS2 and five GS1 genes. Regulation of expression of GS genes, as well as regulation of GS enzymes at the posttranslational level has been widely studied. However, there is limited information on the possibilities of posttranscriptional regulation at the level of GS transcripts. Hereby we show that maize GS mRNAs may adopt stable secondary structures in the form of hairpins and homo- or heterodimers in the region preceding or including their AUG codon, which may influence translation efficiency and transcript stability. The possibility of forming hairpins is based on the presence of palindromes with gaps, while dimers can form if sequences contain palindromes without gaps. All six maize GS transcripts, as well as three *Arabidopsis* GS transcripts have one 6-nt palindrome without gap, while one *Arabidopsis* transcript has two gapless 6-nt palindromes. In addition, maize GS1-3 and *Arabidopsis* GLN1;2 isoforms contain a perfect 8-nt palindrome with a gap. To show statistical significance of these findings, the number of found palindromes in GS transcripts was expressed as a ratio of found and expected number of palindromes of all sizes, with and without gaps in sequences of a given length. Our bioinformatics analysis suggests that GS transcripts contain structural features that allow regulation at the level of mRNAs, and presents a good starting point for experimental studies of the proposed posttranslational regulation.

**Key words:** glutamine synthetase, posttranscriptional regulation, RNA secondary structures, palindromes

### Сажетак

Глутамин синтетаза (GS, E.C. 6.3.1.2) има централну улогу у метаболизму азота јер асимилије амонијак у глутамин. Биљке поседују једну хлоропластну (GS2) и једну или више цитосолних (GS1) изоформи. *Zea mays* и *Arabidopsis thaliana* спадају у врсте са највећим фамилијама GS гена, јер поред једне GS2 имају по пет GS1 изоформи. Регулација експресије GS гена, као и регулација ензимске GS активности на посттранслационом нивоу много је проучавана. Међутим, готово да и нема информација о могућности посттранскрипционе регулације на нивоу GS транскрипата. Ми смо показали да GS мРНК могу да поприме стабилне секундарне структуре укоснице или хомо и хетеродимера у региону који претходи или укључује AUG кодон, што може

утицати на ефикасност транслације и на стабилност транскрипата. Могућност формирања укосница заснива се на присуству палиндрома са размацама, док се димери могу формирати уколико секвенце садрже палиндоме без размака. Свих шест транскрипата *GS* кукуруза, као и три транскрипта *A. thaliana* имају по један палиндром од 6 nt без размака, док један транскрипт *A. thaliana* има два оваква палиндрома. Поред тога, *GS1-3* кукуруза и *GLN1;2 A. thaliana* имају по један перфектан палиндром од 8 nt са размаком. Како би се показао статистички значај ових налаза, број нађених палиндрома у *GS* транскриптима представљен је као однос броја нађених и броја очекиваних палиндрома свих дужина са и без размака у секвенцама датих дужина. Наша биоинформатичка анализа сугерише да *GS* транскрипти поседују структурне елементе који омогућавају регулацију на нивоу мРНК и представља добру полазну основу за експерименталне студије предложене посттранслационе регулације.

**Кључне речи:** глутамин-синтетаза, посттранскрипциона регулација, секундарна структура РНК, палиндром

## УВОД

Глутамин-синтетаза (*GS*, Е.С. 6.3.1.2) има централну улогу у метаболизму азота, катализујући асимилацију амонијака пореклом од редукције нитрата, фотореспирације и других метаболичких процеса у глутамин (Lam и сар., 1996; Hirel и Lea, 2011). Биљке поседују два типа изоформи *GS*: цитосолне *GS1* изоформе које су преобладајуће у нефотосинтетичким ткивима, а кодиране малим генским фамилијама и хлоропластну изоформу *GS2*, кодирану једним нуклеарним геном (Lam и сар., 1996; Hirel и Lea, 2011). Кукуруз (*Zea mays*) и урочњак (*Arabidopsis thaliana*) спадају у биљне врсте са највише гена за *GS1* изоформе, па је регулација експресије и активности *GS* код ових врста много проучавана, како би се установило у којој мери су *GS* изоформе ткивно или развојно специфичне, а у којој мери су њихове функције редувантне. Геном *A. thaliana* садржи један ген за *GS2* (*GLN2*) и пет *GS1* гена (*GLN1;1 – GLN1;5*). Ови гени имају специфичну експресију током развића (Schmid и сар., 2005), као и различиту регулацију експресије у одговору на приступачност и форму азота у подлози (Ishiyama и сар., 2004; Lothier и сар., 2011), у одговору на регулаторе раста (Dragičević и сар., 2015) и друге факторе. Разлике у регулацији експресије и кинетичким особинама *GS* изоформи *A. thaliana* (Ishiyama и сар., 2004) сугеришу њихове не-редундантне функције (Ishiyama и сар., 2004; Lothier и сар., 2011; Guan и сар., 2015), а чињеница да различите изоформе могу да формирају каталитички активне хетеродекамере у свим стехиометријским односима (Dragičević и сар., 2014) доприноси комплексности регулације ових ензима. Кукуруз такође има једну хлоропластну (*GS2*) и пет цитосолних изоформи (*GS1-1 - GS1-5*, Sakakibara и сар., 1996; Li и сар., 1993). Као и код *A. thaliana*, експресија изоформи *GS* кукуруза различита је у различитим развојним стадијумима и органима (Li и сар., 1993; Redinbaugh и Campbell, 1993; Muhitc и сар., 2002). Осим тога, како експресија, тако и активност *GS* изоформи кукуруза зависе и од срединских фактора, а посебно од нитрата и других извора азота, од светлости, али и од температуре (Edwards и Coruzzi, 1989; Redinbaugh и Campbell, 1993; Sukanya и Snustad, 1994; Simonović и Anderson, 2007; 2008).

Упркос бројним истраживањима регулације експресије *GS* гена и активности *GS* ензима код *A. thaliana*, кукуруза, легуминоза и других врста, од којих су само нека поменута, могућност регулације експресије *GS* на посттранскрипцијском нивоу једва да је и испитивана. Наиме, иако је експресија гена углавном регулисана на транскрипцијском

нивоу, о судбини транскрипта се „одлучује“ на посттранскрипционом нивоу. Транскрипти еукариота имају регионе који се не транслирају (енг. 5`-*Untranslated Region* или 5`-*UTR*, као и 3`-*UTR*), већ садрже елементе који контролишу транслацију, деградацију и субћелијску локализацију мРНК (Day и Tuite, 1998; Mignone и сар., 2002). Биолошка активност регулаторних сигнала на РНК зависи не само од њихове примарне структуре, као што је то случај са регулаторним секвенцама ДНК, већ и од секундарне структуре – петљи и укосница (Day и Tuite, 1998; Mignone и сар., 2002). Од посебног значаја за формирање секундарних структура РНК су палиндромске секвенце, које су, кад се читају са лева на десно, комплементарне секвенци прочитаној са десна на лево. Осим оваквих, перфектних палиндрома, постоје и апроксимативни палиндроми који могу имати неке некомплементарне базе (грешке) или размак (енг. *gap*) између две стране палиндрома. Интрамолекулским спаривањем база између две стране палиндрома мРНК може да поприми разне секундарне структуре, као што су „укоснице“ (енг. *hairpin*) које имају дволанчани сталак и једноланчану петљу на месту размака. Формирање укосница у 5`-*UTR* делу мРНК може да утиче на ефикасност транслације јер може ометати везивање рибозома (Wang и Wessler, 2001) или представљати баријеру скенирању 43S рибозомалног комплекса (Day и Tuite, 1998). Са друге стране, РНК палиндроми без размака омогућавају интермолекулско спаривање и стога, теоријски, дају могућност стварања хомо или хетеродимера мРНК молекула (Lisnić и сар., 2005).

Показано је да транскрипт *GS2* грашка може да формира стабилну структуру укоснице у 5`-*UTR* региону који укључује и *AUG* кодон (Edwards и Coruzzi, 1989), али других истраживања могућности посттранскрипционе регулације *GS* изоформи није било. Овај рад представља биоинформатичку анализу потенцијалних секундарних структура у 5`-*UTR* регионима транскрипта изоформи *GS* кукуруза и палиндрома свих дужина, са и без размака, у свим изоформама *GS* кукуруза и *A. thaliana*, са циљем да се установи да ли ови транскрипти поседују структурне елементе који би омогућили регулацију експресије на посттранскрипционом нивоу.

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Све анализиране секвенце *GS* изоформи (Табела 1) снимљене су са сајта *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Најстабилније секундарне структуре (укоснице) које се налазе у 5`-*UTR* региону претходећи или укључујући *AUG* кодон, као и њихове слободне енергије ( $\Delta G$ ) одређене су програмом *RNAShapes* (Steffen и сар., 2006). Температуре топљења секундарних структура израчунате су помоћу програма *Melting* (Le Novere, 2001), уз подразумевано присуство 100 mM моновалентних катјона, 2 mM  $Mg^{2+}$  (укупно 278.89 mM  $Na^+$  еквивалената) и 250 pM нуклеинских киселина.

Палиндроми у секвенцама тражени су веб алгоритмом *Palindrome search* (<http://bioinfo.cs.technion.ac.il/projects/Engel-Freund/new.html>) базираном на радовима Porto и Barbosa (2002) и Tsunoda и сар. (1999). Очекивани број палиндрома  $E(p)$  дужине једне стране  $l$  нуклеотида у секвенци дужине  $n$  нуклеотида, са максималном дужином размака између страна палиндрома  $G$ , бројем грешака  $x$  и максималним бројем грешака *mis* (енг. *mismatch*) израчунат је алгоритмом *Palindrome search*, према формули:

$$E(p) = \left[ (n - 2 \cdot l + 1) \cdot (G + 1) - \frac{(1 + G) \cdot G}{2} \right] \cdot \sum_{x=0}^{mis} \binom{l}{x} \cdot \left( \frac{1}{4^{l-x}} \right) \cdot \left( \frac{3}{4} \right)^x$$

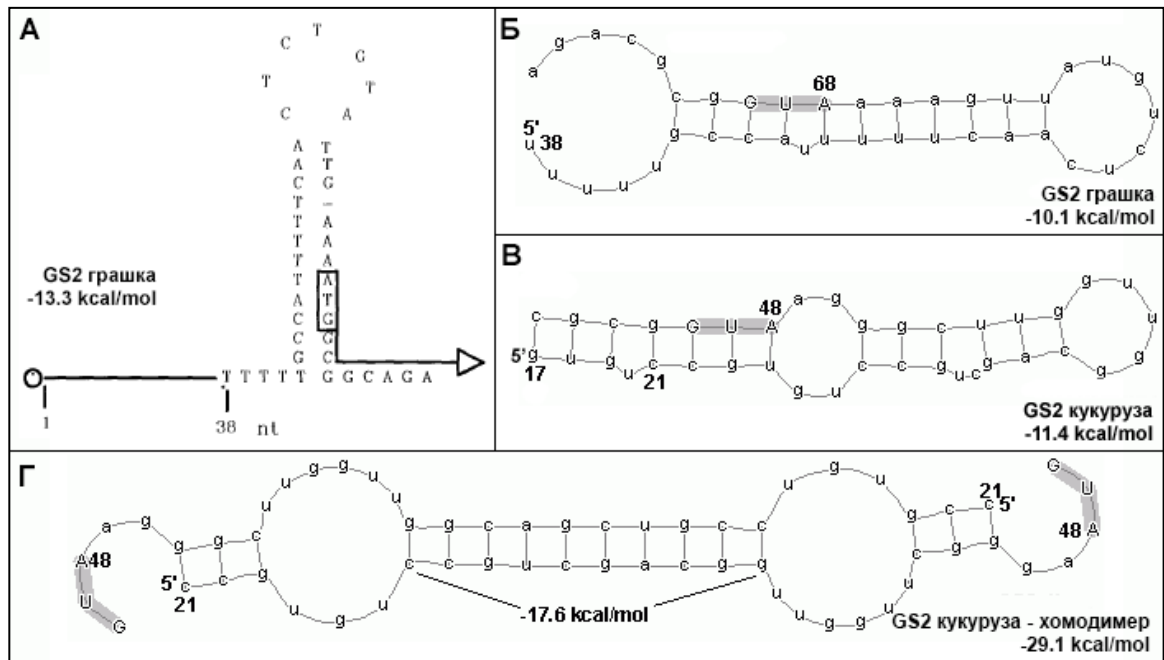
У овом раду представљени су само „савршени“ палиндроми без грешака ( $mis = 0$ ). Нађени палиндроми груписани су као палиндроми без размака ( $G = 0$ ) или палиндроми са размаком (приказани заједно, до  $G = 9$ ).

## РЕЗУЛТАТИ

Укоснице, дволанчани сегменти и друге секундарне структуре могу се формирати у било ком делу ланца мРНК, али су за потенцијалну регулацију на посттранскрипционом нивоу од значаја оне које се формирају у 5'-UTR региону, јер могу ометати иницијацију транслације. Секундарне структуре које се теоријски могу формирати у 5'-UTR региону *GS2* изоформе кукуруза дате су на Слици 1, приказане упоредо са једином публикованом оваквом структуром нађеном код *GS2* грашка (Edwards и Coruzzi, 1989), док су секундарне структуре нађене у 5'-UTR региону *GS1* изоформи кукуруза приказане на Слици 2. Транскрипт *GS2* кукуруза може да формира несавршену али релативно стабилну укосницу ( $\Delta G = -11,4$  kcal/mol) која укључује СТАРТ кодон (Слика 1В). Слична укосница први је пут уочена код *GS2* грашка ( $\Delta G = -13,3$  kcal/mol према програму *DNAasis*, Edwards и Coruzzi, 1989, Слика 1А, односно  $-10,1$  kcal/mol према програму *RNAShapes*, (Слика 1Б). Транскрипти цитосолних изоформи такође могу да формирају укоснице (Слика 2). Секвенце *GS1-1* и *GS1-5*, које су иначе 96% идентичне, могу да формирају укоснице сличног облика и стабилности, које укључују *AUG* кодон (Слике 2А и Б). Региони који укључују *AUG* кодон код транскрипата *GS1-3* и *GS1-4* потпуно су идентични (јер су ове две изоформе идентичне чак 99%), па је у оба случаја предвиђено формирање стабилне неправилне укоснице ( $\Delta G = -9,3$  kcal/mol, Слика 2Г). Једина изоформа која не поседује никакве потенцијалне секундарне структуре у 5'-UTR региону је *GS1-2*, јер најстабилнија структура има слободну енергију од свега  $-2.4$  kcal/mol (Слика 2Д).

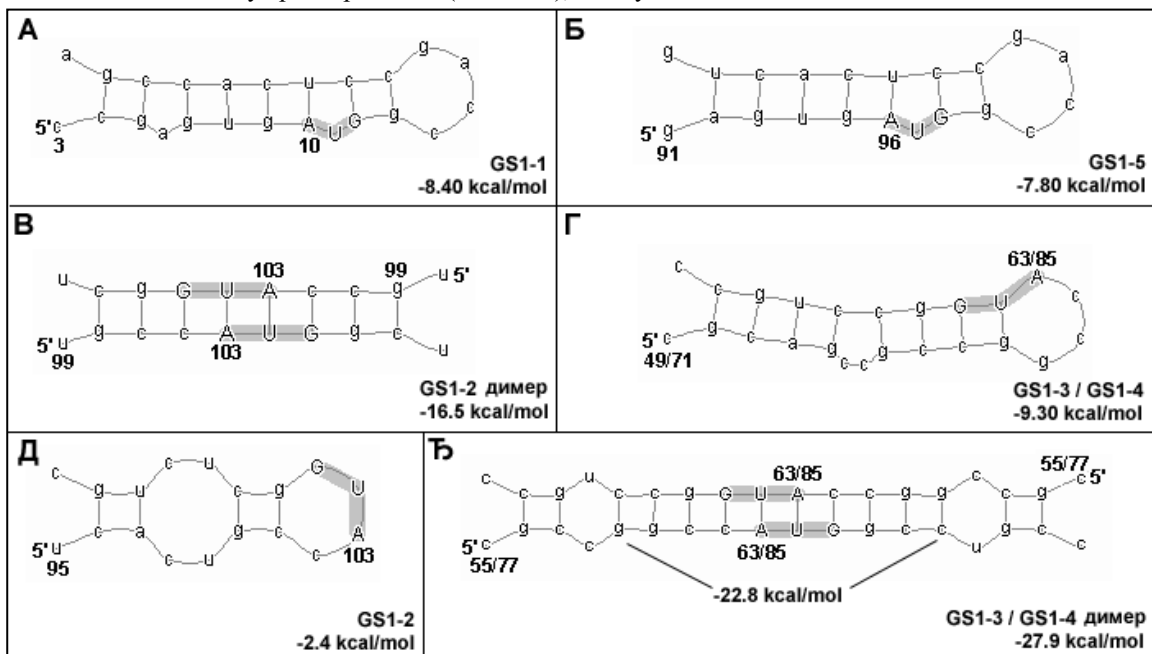
Друга одлика 5'-UTR региона појединих транскрипата *GS* кукуруза је присуство палиндрома богатих GC нуклеотидима, дужине (обе стране) 8–10 nt (Слике 1Г, 2В и 2Ђ). Како ови палиндроми немају размак, теоријски могу да промовишу асоцијацију између две идентичне мРНК у супротним смеровима (Lisnić и сар., 2005). Ако би палиндром од 10 nt нађен у 5'-UTR *GS2* образовао хомодимер, овај сегмент дуплекса имао би  $\Delta G = -17.6$  kcal/mol и температуру топљења од  $31.8$  °C због високог %GC од 80% (Слика 1Г). Секвенца која уоквирује палиндром само би сабилизвала формацију димера и снизила слободну енергију на  $-29.1$  kcal/mol. Транскрипти изоформи *GS1-2*, *GS1-3* и *GS1-4* имају исти палиндром од 8 nt који укључује *AUG* (**gccAUGgc**). У случају *GS1-2* то је заправо само типична Козакина секвенца (**rccAUGg** где је r = пурин, Kozak, 1986) праћена једним „с“ (Слика 2В). Код *GS1-3* и *GS1-4* овај палиндром је дужи (**ggccAUGgcc**,  $-22.8$  kcal/mol,  $T_m = 38.4$  °C, 80% GC) и додатно стабилизован околном секвенцом на  $-27.9$  kcal/mol (Слика 2Ђ). Како је исти палиндром присутан у „сестринским“ изоформама *GS1-3* и *GS1-4*, постоји теоријска могућност формирања не само хомо већ и хетеродимерних

дволанчаних РНК сегмената. Изоформе *GS1-1* и *GS1-5* немају дужих палиндрома у 5'-*UTR* региону.



**Слика 1.** Могуће секундарне структуре у 5'-*UTR* региону *GS2* транскрипата грашка и кукуруза.

Информациона РНК *GS2* грашка (**А**) може да формира структуру укоснице са  $\Delta G = -13.3$  kcal/mol (према Edwards и Coruzzi, 1989, који су користили програм *DNAsis*), односно са  $\Delta G = -10.1$  kcal/mol (**Б**, израчунато програмом *RNAshapes*). Транскрипт *GS2* кукуруза може да формира још стабилнију али неправилну укосницу (**В**), као и хомодимер у региону непосредно пре *AUG* кодона (**Г**). Бројеви означавају позиције база у транскрипима (Табела 1), док су *AUG* кодони осенчени.

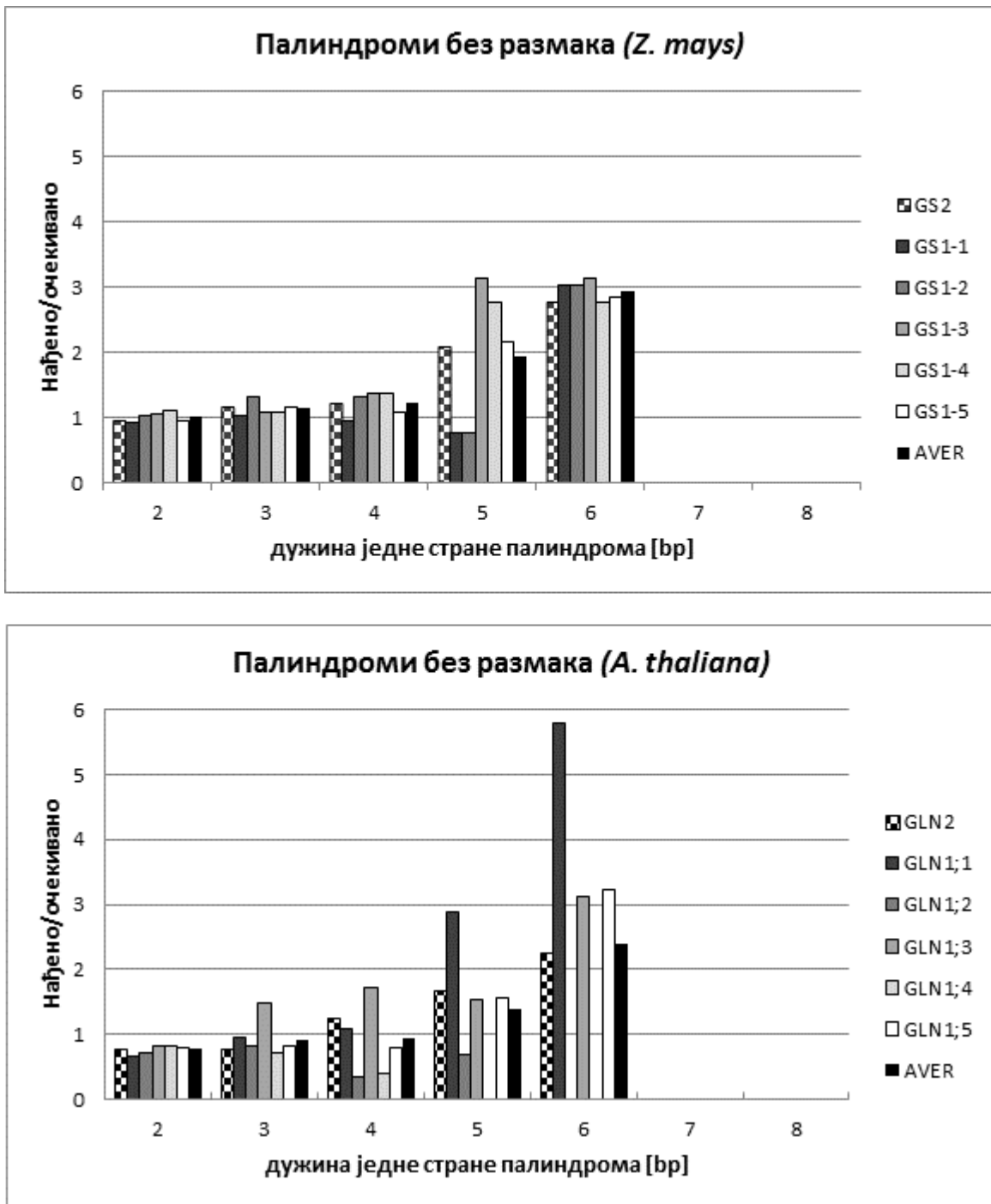


**Слика 2.** Могуће секундарне структуре у 5'-*UTR* регионима *GS1* изоформи кукуруза. Транскрипти *GS1-1* и *GS1-5* могу да формирају укоснице сличне структуре и стабилности (**А**, **Б**). Транскрипт *GS1-2* не формира стабилну укосницу (**Д**), али палиндром од 8 нуклеотида који укључује *AUG* може да формира хомодимер (**В**). Секвенце око *AUG* кодона изоформи *GS1-3* и *GS1-4* су идентичне, тако да обе мРНК могу да формирају било укосницу (**Г**) било веома стабилан хомо или хетеродимер који би блокирао *AUG* кодон (**Ђ**). Бројеви означавају позиције база у транскрипима (Табела 1), док су *AUG* кодони осенчени.

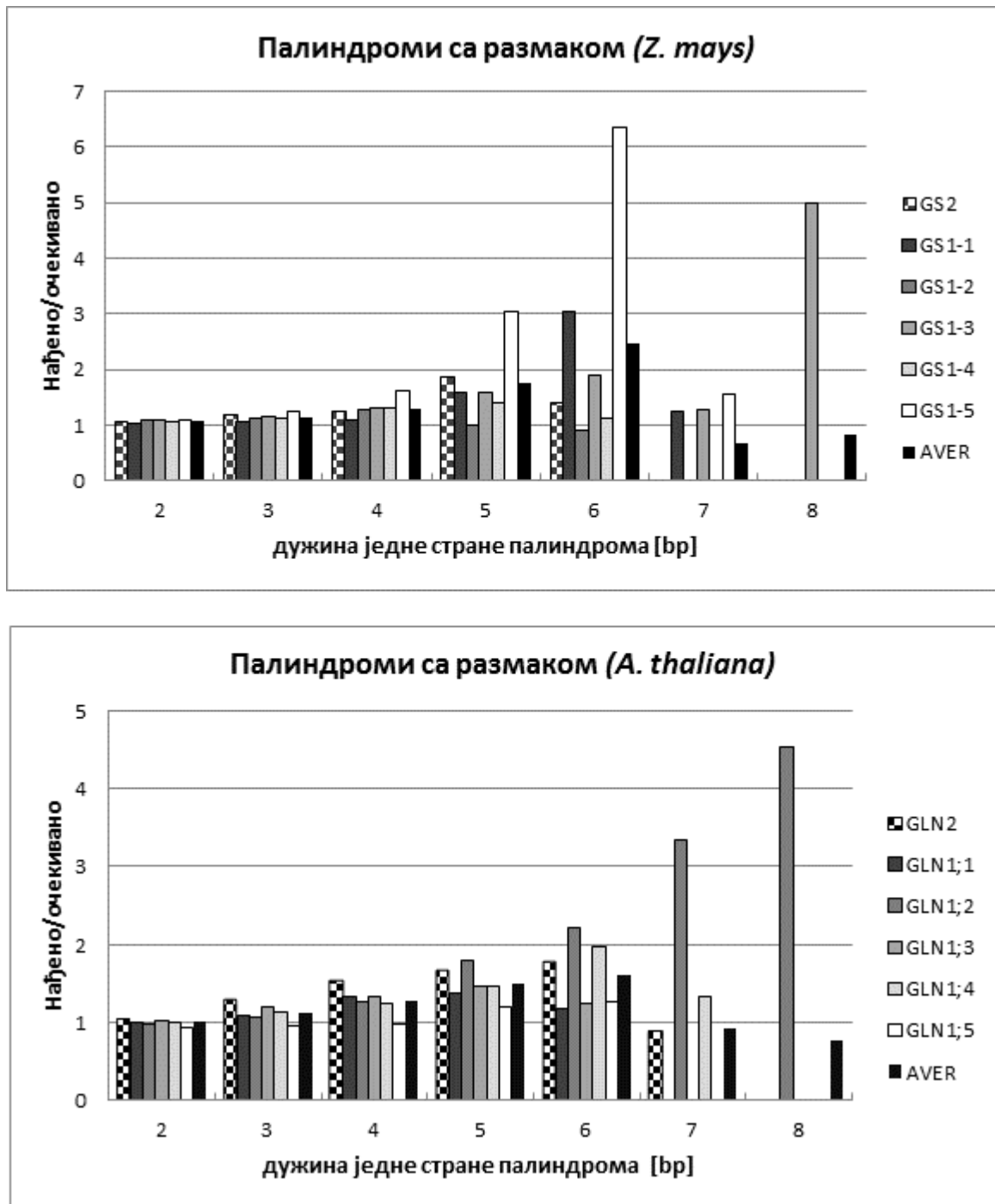
Иако у формирању стабилних укосница, димера и других секундарних структура могу учествовати и апроксимативни палиндроми (Слике 1 и 2), у овом раду су даље анализирани само палиндроми без грешака, са и без размака. Број палиндрома одређен је у целим секвенцама *GS* мРНК кукуруза и *A. thaliana*, а резултати су приказани као број палиндрома чија је дужина једне стране 4 или више нуклеотида (Табела 1), јер су краћи палиндроми бројни и нису значајни за формирање термодинамички стабилних структура. Као што се види из Табеле 1, палиндроми без размака далеко су ређи од оних са размаком (до 9 nt), што је и очекивано. Свих 12 анализираних секвенци поседује палиндроме без размака од 4 nt, али иако најдужа секвенца, *GLN2* од 1829 bp, има највише (9), а најкраћа, *GLN1;4* од 1269 nt најмање (2) ових палиндрома, њихов број није увек сразмеран дужини секвенце. Све изоформе кукуруза имају по један палиндром без размака од 6 nt, док код секвенци *A. thaliana* ових палиндрома има 0–2. Све анализираних секвенце поседују већи број палиндрома дужине 4–6 nt са размаком, а поједине имају и палиндроме чија је једна страна дуга 7 или чак 8 nt (Табела 1). Како број нађених палиндрома не говори ништа о статистичкој значајности њиховог налажења, представљен је и однос броја нађених палиндрома и броја палиндрома дате дужине за који се очекује да ће бити нађен у секвенци одређене дужине (Слике 3 и 4). Из ових резултата видимо да је број кратких палиндрома (дужине једне стране 2–4 nt), како са размаком тако и без размака, приближно једнак очекиваном броју у свим анализираним секвенцама (однос је  $\approx 1$ ), док већина секвенци има нешто више палиндрома од 5 nt него што се очекује (Слике 3 и 4). Свих 6 секвенци кукуруза и 3 секвенце *A. thaliana* имају по један палиндром од 6 nt без размака (Табела 1), што је 3 пута више од очекиваног, док *GLN1;1 A. thaliana* има два оваква палиндрома, што је 6 пута више од очекиваног (Слика 3). Што се тиче палиндрома са размаком, од очекиваних вредности посебно одскачу *GS1-5* са 22 палиндрома дужине 6 nt, као и *GS1-3* и *GLN1;2*, код којих је нађен по један палиндром од 8 nt (Табела 1 и Слика 4).

**Табела 1.** Анализираних секвенце транскрипата *GS Zea mays* и *Arabidopsis thaliana* са наведеном дужином, приступним бројевима базе *GenBank* и бројем нађених палиндрома чија је дужина једне стране 4–6 nt за палиндроме без размака, односно 4–8 nt за палиндроме са размаком

Биљна врста	Изоформа	<i>GenBank</i>	мРНК bp	Пал. без размака			Пал. са размаком				
				4	5	6	4	5	6	7	8
<i>Z. mays</i>	<b>GS2</b>	X65931	1483	7	3	1	72	27	5	0	0
	<b>GS1-1</b>	X65926	1359	5	1	1	57	21	10	1	0
	<b>GS1-2</b>	X65927	1369	7	1	1	67	13	3	0	0
	<b>GS1-3</b>	X65928	1317	7	4	1	67	20	6	1	1
	<b>GS1-4</b>	X65929	1490	8	4	1	75	20	4	0	0
	<b>GS1-5</b>	D14578	1433	6	3	1	89	42	22	1	0
<i>A. thaliana</i>	<b>GLN2</b>	NM_122954	1829	9	3	1	111	30	8	1	0
	<b>GLN1;1</b>	NM_123119	1494	6	4	2	74	20	5	0	0
	<b>GLN1;2</b>	NM_105291	1499	2	1	0	73	26	8	3	1
	<b>GLN1;3</b>	NM_112663	1341	9	2	1	69	19	4	0	0
	<b>GLN1;4</b>	NM_121663	1269	2	0	0	61	18	6	1	0
<b>GLN1;5</b>	NM_103743	1307	4	2	1	49	15	4	0	0	
<i>P. sativum</i>	<b>GS2</b>	M20664	1540								



**Слика 3.** Однос броја пронађених и броја очекиваних палиндрома дате дужине без размака нађених у *GS* изоформама кукуруза и *A. thaliana*. *AVER* – просек за све изоформе



**Слика 4.** Однос броја пронађених и броја очекиваних палиндрома дате дужине са размаком нађених у *GS* изоформама кукуруза и *A. thaliana*. *AVER* – просек за све изоформе

## ДИСКУСИЈА

У овом раду показали смо да анализирани транскрипти поседују бројне палиндроме који представљају основ за формирање секундарних структура РНК. Међутим, да ли ће нека секундарна структура 5'-UTR региона ометати транслацију зависи од њене стабилности (слободне енергије), од температуре, као и од активности хеликазе *eIF4A* (дела комплекса *eIF4F* који се везује за „шеширић“ мРНК током иницијације транслације), која „топи“ секундарне структуре мРНК, чиме омогућава везивања 40S



рибозомалне субјединице. Експерименти са вештачком интродукцијом укосница у 5'-UTR гена за цитохром Ц квасца показали су да овакве укоснице значајно утичу на ефикасност транслације (Bain и Sherman, 1988). Ови аутори показали су да перфектна укосница са сталком од 8 bp који укључује „А“ из AUG кодона и са  $\Delta G$  од само -7.6 kcal/mol (дакле, мање стабилна од укосница GS транскриптата, Слика 1 и 2) смањује ефикасност транслације за чак 90%. Слично томе, укосница близу 5'-краја транскрипта транскрипционог активатора Lc кукуруза, са сталком од 9 bp ( $\Delta G = -15.6$  kcal/mol) значајно утиче на ефикасност транслације, јер мутације које ремете спаривање у сталку ове укоснице повећавају транслацију 11 пута (Wang и Wessler, 2001). Према другим ауторима, међутим, умерено стабилне секундарне структуре, чија је  $\Delta G \geq -30$  kcal/mol, не спречавају миграцију 40S субјединице рибозома, док значајно смањење ефикасности транслације могу да узрокују само веома стабилне структуре, са дволанчаним деловима од 65–130 bp и  $\Delta G \leq -50$  kcal/mol (Mignone и сар., 2002). Ипак, већина ових истраживања обављана је на лабораторијским квасцима (чија је оптимална температура раста 30–37°C) или на сисарским модел-системима, док је, рецимо, оптимална температура за гајење кукуруза 27 °C, мада су биљке у пољу редовно изложене и много нижим температурама, као и хладном стресу. Стабилност секундарних структура и кинетика савијања РНК веома је зависна од температуре, а оформљене структуре стабилније су на нижим температурама (Zhang и Chen 2002). То значи да би евентуални ефекат присуства 5'-UTR укосница на ефикасност транслације био значајнији на нижим температурама. Показано је да је активност GS изоформи кукуруза снижена код клијанаца изложених хладном стресу (Simonović и Anderson, 2007). Иако је то, вероватно, последица секундарног оксидативног стреса на саме ензиме, није искључено да би томе могла допринети и претпостављена слабија транслација изоформи које имају 5'-UTR укоснице. За сличну укосницу нађену у 5'-UTR делу GS2 грашка (Слика 1А) претпоставља се да би могла утицати на транслацију ове изоформе (Edwards и Coruzzi, 1989). Осим тога, интересантно је да и код кукуруза и код *A. thaliana* GS изоформе са специфичним функцијама и ниском, орган-специфичном експресијом, има најмање палиндрома са размаком, који би могли формирати стабилне укоснице. Изоформа GS1-2 кукуруза која има специфичну улогу у ремобилизацији азота током наливања семена (Muhitch и сар., 2002) и најмање је заступљена у вегетативним ткивима од свих изоформи, не формира стабилне укоснице у 5'-UTR региону (Слика 2Д) и има најмање палиндрома са размаком од 5 и 6 nt од свих изоформи GS кукуруза (Табела 1). Аналогно томе, изоформа GLN1;5 *A. thaliana*, која се уопште не експримира у вегетативним ткивима већ само у семенима (Schmid и сар., 2005; Dragičević и сар., 2014), такође има најмање палиндрома са размаком од свих изоформи (Табела 1).

Кад су у питању палиндроми без размака, претпоставља се да би овакви палиндроми могли промовисати асоцијацију два идентична ланца мРНК у супротним смеровима (Lisnić и сар., 2005). Иако је формирање дволанчане РНК у основи утишавања гена и *antisense* технологије, мало је доказа да две еукариотске мРНК заправо формирају димере у неком делу своје секвенце, за разлику од ретровиралних РНК, код којих је то правило. Један од ретких извештаја о формирању мРНК/мРНК дуплекса код еукариота, а који се заснива на спаривању палиндрома, доступан је код транскриптата колагена типа I (Rossi и Crombrughe, 1987). Аутори су показали да палиндромска секвенца од 38 nt, која укључује AUG, може да формира било неправилну укосницу (-16.9 kcal/mol) било димер

(-39.8 kcal/mol), који утиче на транслацију. Специфична „CGCGCG“ секвенца, заправо палиндром дужине једне стране свега 3 nt, довољна је за димеризацију РНК теломеразе квасца *in vitro* (Gipson и сар., 2007). Иако се у овом случају не ради о мРНК, већ о РНК које су део рибонуклеопротеинског комплекса теломеразе, овај пример показује да и кратки палиндроми могу да промовишу димеризацију.

## ЗАКЉУЧАК

Биоинформатичка анализа секвенци транскрипата *GS* изоформи кукуруза и *A. thaliana* указује да ове секвенце имају палиндроме са и без размака, који омогућавају формирање релативно стабилних секундарних структура типа укосница и димера који би, теоријски, могли утицати на ниво транслације ових мРНК. Због тога овај рад може да послужи као основа за експерименталну проверу могуће посттранслационе регулације изоформи глутамин-синтетазе.

## ЗАХВАЛНИЦА

Овај рад финансирао је Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, Пројекат ON173024.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Baim, S. B., and Sherman, F. mRNA structures influencing translation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 8(4), 1591–1601, Washington DC, 1988.
2. Day, D. A., and Tuite, M. F. Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *Journal of Endocrinology*, 157(3), 361–371, Bristol, 1998.
3. Dragičević, M., Simonović, A., Bogdanović, M., Subotić, A., Ghalawenji, N., Dragičević, I., and Todorović, S. Differential regulation of GS-GOGAT gene expression by plant growth regulators in *Arabidopsis* seedlings. *Archives of Biological Sciences*, doi:10.2298/ABS150608087D, Belgrade, 2015.
4. Dragičević, M., Todorović, S., Bogdanović, M., Filipović, B., Mišić, D., and Simonović, A. Knockout mutants as a tool to identify the subunit composition of *Arabidopsis* glutamine synthetase isoforms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 79, 1–9, Paris, 2014.
5. Edwards, J. W., and Coruzzi, G. M. Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. *The Plant Cell*, 1(2), 241–248, Rockville, 1989.
6. Gipson, C. L., Xin, Z. T., Danzy, S. C., Parslow, T. G., and Ly, H. Functional characterization of yeast telomerase RNA dimerization. *Journal of Biological Chemistry*, 282(26), 18857–18863, Bethesda, 2007.
7. Guan, M., Møller, I. S., and Schjoerring, J. K. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms play specific roles for seed germination and seed yield structure in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 66(1), 203–212, Oxford, 2015.

8. Hirel, B., and Lea, P. J. The molecular genetics of nitrogen use efficiency in crops, in: *The Molecular and Physiological Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops*, (Malcolm J. Hawkesford, Peter Barraclough, Eds) 139-164, John Wiley and Sons, 2011.
9. Ishiyama, K., Inoue, E., Watanabe-Takahashi, A., Obara, M., Yamaya, T., and Takahashi, H. Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 16598–16605, Bethesda, 2004.
10. Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 44(2), 283–292.
11. Lam, H. M., Coschigano, K. T., Oliveira, I. C., Melo-Oliveira, R., and Coruzzi, G. M. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual review of plant biology*, 47(1), 569–593, Palo Alto, 1996.
12. Le Novère, N. MELTING, computing the melting temperature of nucleic acid duplex. *Bioinformatics*, 17(12), 1226-1227, Oxford, 2001.
13. Li, M. G., Villemur, R., Hussey, P. J., Silflow, C. D., Gantt, J. S., and Snustad, D. P. Differential expression of six glutamine synthetase genes in *Zea mays*. *Plant molecular biology*, 23(2), 401–407, Dordrecht, 1993.
14. Lisnić, B., Svetec, I. K., Šarić, H., Nikolić, I., and Zgaga, Z. Palindrome content of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Current genetics*, 47(5), 289–297, Heidelberg, 2005.
15. Lothier, J., Gaufichon, L., Sormani, R., Lemaître, T., Azzopardi, M., Morin, H., Chardon F, Reisdorf-Cren M, Avice J-C, and Masclaux-Daubresse, C. The cytosolic glutamine synthetase GLN1; 2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in *Arabidopsis* rosettes when nitrate supply is not limiting. *Journal of experimental botany*, 62(4), 1375–1390, Oxford, 2011.
16. Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S., and Pesole, G. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biology*, 3(3), 1–10, Cleveland, 2002.
17. Muhitch, M. J., Liang, H., Rastogi, R., and Sollenberger, K. G. Isolation of a promoter sequence from the glutamine synthetase 1–2 gene capable of conferring tissue-specific gene expression in transgenic maize. *Plant Science*, 163(4), 865–872, Amsterdam, 2002.
18. Porto, A. H., and Barbosa, V. C. Finding approximate palindromes in strings. *Pattern Recognition*, 35(11), 2581–2591, Oxford, 2002.
19. Redinbaugh, M. G., and Campbell, W. H. Glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase expression in the maize (*Zea mays*) root primary response to nitrate (evidence for an organ-specific response). *Plant Physiology*, 101(4), 1249–1255, Rockville, 1993.
20. Sakakibara, H., Shimizu, H., Hase, T., Yamazaki, Y., Takao, T., Shimonishi, Y., and Sugiyama, T. Molecular identification and characterization of cytosolic isoforms of glutamine synthetase in maize roots. *Journal of Biological Chemistry*, 271(47), 29561–29568, Bethesda, 1996.
21. Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R., Pape, U. J., Demar, M., Vingron, M., Scholkopf B, Weigel D and Lohmann, J. U. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature genetics*, 37(5), 501–506, New York, 2005.

22. Simonović, A. D., and Anderson, M. D. Effect of chilling and acclimation on the activity of glutamine synthetase isoforms in maize seedlings. *Archives of Biological Sciences*, 59(3), 177–185, Belgrade, 2007.
23. Simonović, A. D., and Anderson, M. D. Light modulates activity and expression of glutamine synthetase isoforms in maize seedling roots. *Archives of Biological Sciences*, 60(4), 649–660, Belgrade, 2008.
24. Steffen, P., Voß, B., Rehmsmeier, M., Reeder, J., and Giegerich, R. : RNAshapes: an integrated RNA analysis package based on abstract shapes. *Bioinformatics*, 22(4), 500–503, Oxford, 2006.
25. Sukanya, R., Li, M. G., and Snustad, D. P. Root-and shoot-specific responses of individual glutamine synthetase genes of maize to nitrate and ammonium. *Plant molecular biology*, 26(6), 1935–1946, Dordrecht, 1994.
26. Tsunoda, T., Fukagawa, M., and Takagi, T. : Time and memory efficient algorithm for extracting palindromic and repetitive subsequences in nucleic acid sequences. In: *Pacific Symposium on Biocomputing Vol. 4*, 202–213, Stanford, 1999.
27. Wang, L., and Wessler, S. R. : Role of mRNA Secondary Structure in Translational Repression of the Maize Transcriptional Activator Lc. *Plant Physiology*, 125(3), 1380–1387, Rockville, 2001.
28. Zhang, W., and Chen, S. J. : RNA hairpin-folding kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 99(4), 1931–1936, Washington DC, 2002.

Примљено: 16.10.2015.

Одобрено: 20.04.2016.