

УДК 577.21

Пептид miPER-156а капусты повышает уровень накопления собственной мРНК в трансгенном мхе *Physcomitrium patens*

Т. Н. Ерохина^{1*}, Е. В. Рябухина¹, И. С. Ляпина¹, Д. Ю. Рязанцев¹, С. К. Завриев¹,
С. Ю. Морозов²

¹Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН), Москва, 117997 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*E-mail: tne@mx.ibch.ru

Поступила в редакцию 07.04.2025

Принята к печати 13.05.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27668

РЕФЕРАТ МикроРНК – это эндогенные небольшие некодирующие РНК, которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне путем расщепления мРНК-мишеней. Зрелые микроРНК образуются в результате процессинга их первичных транскриптов (pri-miRNA). Установлено, что продуктами трансляции некоторых pri-miRNA растений являются также молекулы пептидов (miPER). Эти пептиды способны взаимодействовать со своими открытыми рамками трансляции (ОРТ) в транскрибирующихся цепях pri-miRNA и положительно регулировать накопление этих РНК и соответствующих зрелых микроРНК. Большинство консервативных микроРНК играют важную роль в развитии растений и их реакции на стресс. В настоящей работе нами получены трансгенные растения мха *Physcomitrium patens*, геном которых содержит ОРТ miPER156а капусты *Brassica oleracea* под контролем сильного 35S промотора вируса мозаики цветной капусты. Проведен анализ влияния экзогенного пептида на транскрипцию этой ОРТ в протонемах двух трансгенных линий мха. Оказалось, что обработка культуры мха химически синтезированным пептидом miPER156а вызывает усиление накопления собственной мРНК, как это показано ранее для целого ряда пептидов в однодольных и двудольных растениях. Эти данные подтверждают, что участки pri-miRNA за пределами кодирующей области пептида не требуются для активации транскрипции. Более того, нами показано, что наличие специфического промотора гена микроРНК не влияет на феномен активации транскрипции, а сам этот феномен не является видоспецифичным и наблюдается в трансгенных растениях вне зависимости от происхождения miPER.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА микроРНК, пептиды, miPER, pri-miRNA, трансгенные растения, ПЦР-анализ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ pri-miRNA – первичные транскрипты генов микроРНК; miPER – пептид, кодируемый первичным транскриптом генов микроРНК; ОРТ – открытая рамка трансляции; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что гены микроРНК транскрибируются в виде крупных первичных транскриптов (pri-miRNA) и становятся зрелыми миРНК только после нескольких этапов созревания [1]. Как и любой белок-кодирующий ген, гены микроРНК транскрибируются РНК-полимеразой II с образованием первичного транскрипта pri-miRNA, состоящего из нескольких сотен или тысяч оснований. Во внутренней области этого первичного транскрипта находится

характерная шпильчатая структура, включающая биспиральную последовательность микроРНК, которая превращается в зрелую форму после действия белка DCL1, кодируемого геном *Dicer* [1]. Этот фермент сначала отщепляет 5'- и 3'-концевые области первичного транскрипта, превращая его в шпилькообразную миРНК-предшественник (pre-miRNA), а затем расщепляет pre-miRNA для высвобождения дуплекса miRNA-miRNA*. Этот дуплекс затем транслируется в цитоплазму, где одна из цепей

(соответствует микроРНК) включается в рибонуклеопротеидную частицу, образованную нуклеазой Argonaute для формирования комплекса RISC, который затем обеспечивает микроРНК-опосредованный сайленсинг генов [1].

Десять лет назад обнаружили, что некоторые pri-miRNA содержат небольшие открытые рамки трансляции (OPT), которые могут кодировать регуляторные пептиды, называемые микроРНК-кодируемые пептиды (miPER) [2]. Механизм действия miPER в растениях заключается в усилении транскрипции и накопления соответствующей pri-miRNA, что является примером положительной обратной связи. Это приводит к повышению накопления зрелых микроРНК и усилению подавления генов-мишеней для микроРНК [3, 4]. Сверхэкспрессия miPER в трансгенных растениях или обработка листьев и корней экзогенными химически синтезированными пептидами могут приводить, например, к значительным изменениям в развитии корней, к увеличению накопления антоцианинов и повышению устойчивости к биотическим и абиотическим видам стресса [4–7]. Важно, что целый ряд таких эффектов может успешно использоваться для улучшения хозяйственно значимых свойств растений [4, 5, 7, 8].

Ранее мы использовали биоинформатический подход для сравнительного анализа последовательностей OPT из генов pri-miRNA в геномах растений и идентифицировали новую группу miPER (пептиды miPER156a), кодируемых pri-miR156a, у нескольких десятков видов семейства *Brassicaceae* [9]. Экзогенные химически синтезированные пептиды miPER156a могут эффективно проникать в протопласты растений через корневую систему и системно распространяться в листья. Пептиды оказывают явный морфологический эффект, ускоряя рост первичных корней. Параллельно пептиды miPER156a усиливают экспрессию собственной pri-miR156a [9]. Важно отметить способность пептида быстро проникать в ядро клетки и связываться с хроматином. В этой работе нами установлены общие свойства вторичной структуры miPER156a и обнаружены ее изменения, вызванные образованием пептидного комплекса с нуклеиновыми кислотами [9].

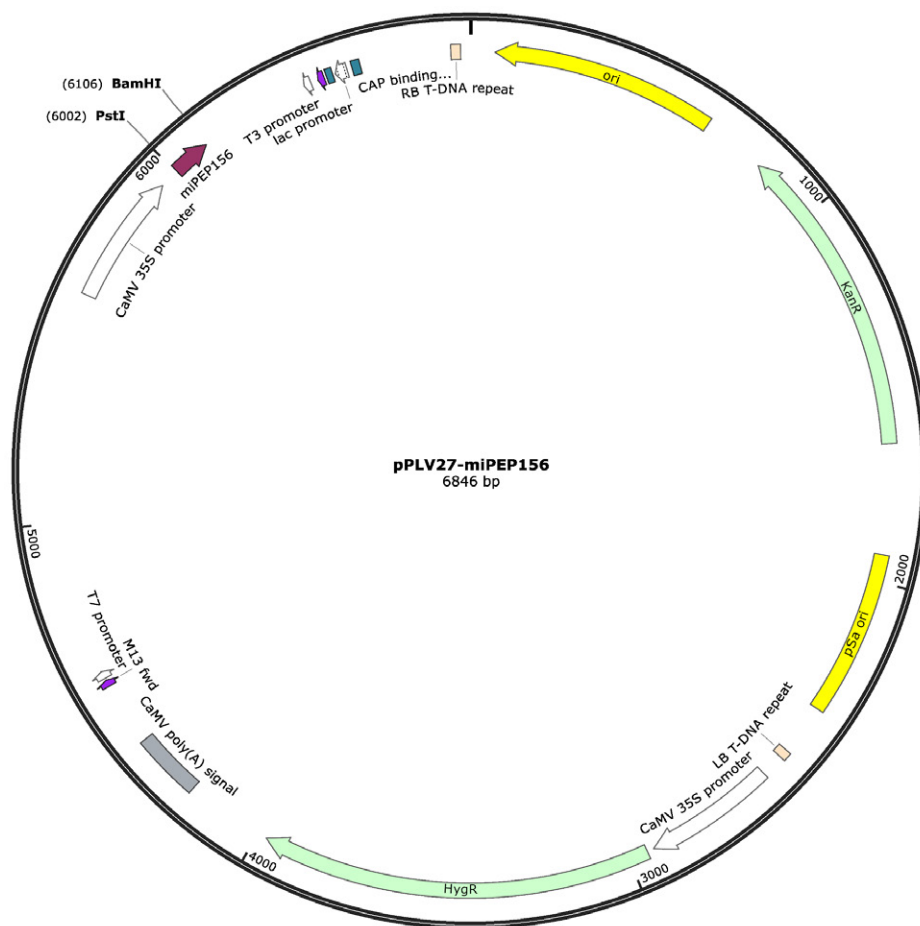
Недавно было доказано взаимодействие пептида Mt-miPER171b из бобовых с транскрибируемыми (в основном недостроенными) молекулами pri-miR171b, входящими в комплекс с матричной цепью хромосомной ДНК. Было высказано предположение, что это новый вид связывания белка с РНК, который полностью зависит от наличия определенного линейного набора кодонов в матрице, кодирующей данный miPER, а эти пептиды могут выполнять специфические регуляторные функции только в от-

ношении своих матричных pri-miRNA [10]. Исходя из особенностей взаимодействия между miPER и их pri-miRNA, предложена следующая схема активации транскрипции pri-miRNA кодируемыми пептидами: 1) miPER транслируется в цитоплазме из полноразмерной pri-miRNA или ее фрагмента, содержащего OPT, кодирующую miPER; 2) затем этот пептид мигрирует в ядро, где связывается с синтезируемой pri-miRNA в области его кодирующей последовательности; 3) такое взаимодействие усиливает накопление микроРНК на уровне транскрипции [4, 10]. Существующий экспериментальный опыт не позволяет нам сделать вывод о том, связывает ли miPER рибонуклеотидные цепочки pri-miRNA (или РНК в форме РНП) или РНК-ДНК-гибриды. Очевидно, нельзя исключать, что miPER обладают потенциалом взаимодействия не только с РНК, но и, как показано нами ранее [3], с ДНК (и/или хроматином) в областях генов микроРНК. Таким образом, miPER могут регулировать активность РНК-полимеразы II и/или медиаторного комплекса на стадиях инициации и/или элонгации транскрипции [8].

В нашей работе на модели miPER156a капусты (*Brassica oleracea*) мы поставили задачи выяснить: 1) насколько важны участки pri-miRNA за пределами кодирующей области пептида для активации транскрипции; 2) роль специфического промотора гена микроРНК в феномене активации транскрипции; 3) является ли феномен активации транскрипции видоспецифичным, т.е. может ли пептид miPER одного вида растений функционировать в других таксономически удаленных видах. С этой целью нами получены трансгенные растения мха *Physcomitrium patens*, содержащие в геноме OPT miPER156a капусты брокколи под контролем сильного 35S промотора вируса мозаики цветной капусты, и проанализировано влияние экзогенного пептида на транскрипцию этой OPT в протопластах мха.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Кодирующая область OPT miPER156a, включающая иницирующий и терминирующий кодоны, была амплифицирована с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на матрице хромосомной ДНК *B. oleracea*. Для этого использовали пару ДНК-затравок: mir156r (5'-CTTTCTTTATGGCTCTTGTCGCTT) и mir156f (5'-AAATGTTCTGTTCAATTCAATGC) [9]. Полученный продукт амплификации клонировали в вектор pPLV27, используя метод LIC (ligation-independent cloning) [11]. После клонирования плазмиду pPLV27-miPER156a (рис. 1) накапливали в клетках *Escherichia coli*, очищали с помощью Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, ФРГ) и секвенировали.



Для получения трансенов протонему мха *P. patens* Gransden 2004 выращивали на 9-см чашках Петри на твердой среде Кюпа, содержащей 1.5% агара (Helicon, Россия) и 500 мг/л аммония тартрата (Helicon), при освещении белым светом от люминесцентных ламп (Sanyo Plant Growth Incubator MLR-352H (Panasonic, Япония)) с фотонным потоком 61 мкмоль/м² в условиях 16-часового светового дня при 24°C и относительной влажности 50%. Протопласты получали из пятидневной протонемы. Протонему собирали с поверхности агара с помощью шпателя, отжимали и помещали в 0.5% раствор драйзелазы (Sigma-Aldrich, США) в 0.48 М маннитоле на 45 мин при непрерывном покачивании в темноте. Затем суспензию фильтровали через металлическое ситечко (100 мкм). Затем протопласты осаждали в 50 мл пластиковых пробирках центрифугированием при 150 *g* в течение 5 мин. Далее протопласты дважды отмывали 0.48 М маннитолом с последующим центрифугированием в тех же условиях. Затем супернатант сливали, а полученные протопласты трансформировали согласно протоколу PEG-трансформации [11]. Протопласты в концентрации 1.5×10^6 /мл ресуспендировали в рас-

творе ММg (0.48 М маннитол, 15 мМ MgCl₂, 0.1% MES, рН 5.6), инкубировали в течение 20 мин, затем добавляли 10 мкг плазмиды pPLV27-miPEP156a (рис. 1) и раствор 33% PEG, инкубировали в течение еще 30 мин. После отмывки протопласты высевали в верхнем агаре в чашки Петри на твердую среду поверх пленки. Затем чашки помещали в темноту на сутки. Далее их культивировали в обычных условиях для регенерации протопластов.

Для отбора клонов, имеющих вставку с целевым геном, регенерировавшие протопласты культивировали на селективной среде с гигромицином. В результате выявили пять устойчивых трансгенных линий мха *P. patens*: 2450, 2451, 2453, 2456 и 2483. Из растительных тканей этих линий экстрагировали суммарную ДНК с помощью DNeasy Plant Kit в соответствии с инструкциями производителя (Qiagen). С помощью ПЦР показали, что специфические продукты реакции, несущие вставку с OPT miR156a размером 700 п.н. и полученные с помощью затравок p35Sf (5'-AACAAAGGATAATTTTCGGGAAAC) и tNOSr (5'-TCGCGTATTAAATGTATAATTGC), комплементарных областям плазмиды pPLV27 с 35S промотором и терминатором транскрипции соот-

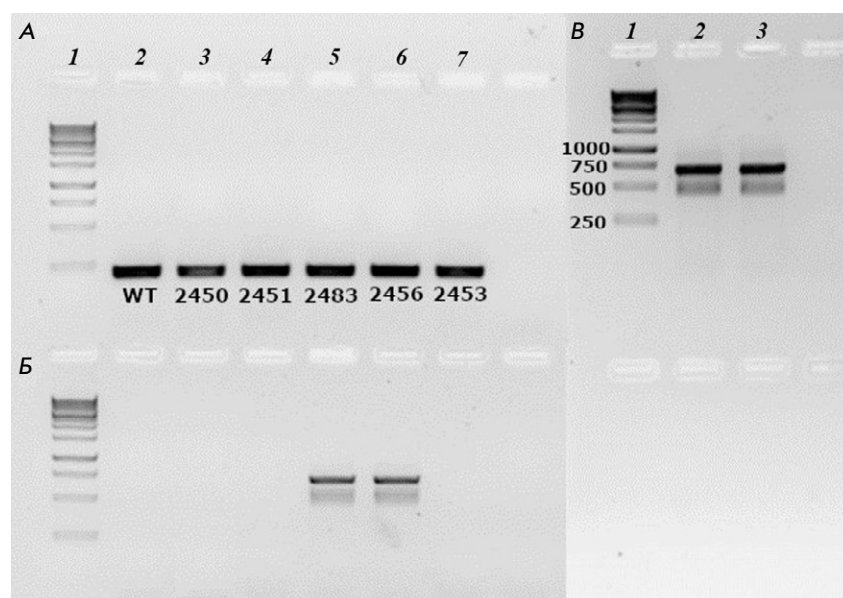


Рис. 2. Проверка наличия целевой вставки в ДНК отобранных линий *P. patens*, устойчивых к гигромицину (линии 2450, 2451, 2483, 2456, 2453), с помощью ПЦР. Геномную ДНК исходной линии мха (WT) использовали в качестве контроля. А – контрольная проверка качества выделенной ДНК референсного гена мха EF1-alpha (фактор элонгации трансляции 1а). Дорожка 1 – маркеры длины ДНК; 2 – WT; 3 – линия 2450; 4 – линия 2451; 5 – линия 2483; 6 – линия 2456; 7 – линия 2453. Б – ПЦР геномной ДНК с праймерами p35Sf и tNOSr. Расположение дорожек как на панели А. В – повторная проверка вставки в медленно растущей линии мха 2450 с праймерами p35Sf и tNOSr. Дорожка 1 – маркеры длины ДНК (размеры фрагментов указаны слева), 2 – линия 2450, 3 – ДНК плазмиды pPLV27-miPER156a

ветственно (рис. 1), образовывались лишь в случае линий 2450 и 2483 (рис. 2). Специфичность вставок подтвердили секвенированием продуктов ПЦР. Интересно, что колонии мха этих линий имеют существенно разную скорость роста. Если скорость роста у линии 2483 близка к скорости у растений дикого типа, то развитие колоний у 2450 было существенно замедлено. В этой связи важно отметить, что в трансгенных растениях *P. patens*, сверхэкспрессирующих ряд эндогенных пептидов, в большинстве случаев также наблюдается снижение скорости роста колоний [11].

Для изучения влияния пептида miPER156a на экспрессию мРНК в трансгенных растениях с помощью количественного ПЦР-анализа протонему линий 2450 и 2483 *P. patens* выращивали в 100 мл жидкой среды Кнопа, содержащей 500 мг/л тартрата аммония (Helicon, Россия), на качалках при освещении белым светом от люминесцентных ламп Sanyo Plant Growth Incubator MLR-352H (Panasonic, Япония) с фотонным потоком 61 мкмоль/м² в условиях 16-часового светового дня при 24°C и относительной влажности 50%. Для анализа семидневную протонему обрабатывали раствором пептида в воде (5 мкг/мл) в конечном объеме 50 мл. Образцы инкубировали в течение ночи, а затем нити протонемы отделяли от среды, отжимали от лишней влаги с помощью фильтровальной бумаги и замораживали в жидком азоте. Из замороженных тканей экстрагировали тотальную РНК с помощью TRIzol™ реагента (Invitrogen, США) в соответствии с инструкциями производителя. После определения концентрации 2 мкг РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США). Затем проводили

обратную транскрипцию с праймером со случайной последовательностью с использованием набора Mini kit («Евроген», Россия). Полученную кДНК добавляли к смеси для проведения количественной ПЦР, используя реактивы и инструкции производителя («Евроген»). Количественную ПЦР проводили с использованием готовой смеси qPCRmix HS («Евроген») на амплификаторе DT prime («ДНК-Технологии», Россия). Реакционная смесь (25 мкл) содержала 10 пмоль каждого праймера и интеркалирующий краситель Eva Green 1x. Использовали следующую программу амплификации: 95°C – 5 мин; 95°C – 15 с, 60°C – 15 с*, 72°C – 15 с, 45 циклов (* – детекция флуоресценции в канале FAM). После обработки данных значения Cq использовали для расчета нормализованной экспрессии в программе Q Gene [12] (рис. 3).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате количественного ПЦР-анализа (рис. 3) было выяснено, что обработка культуры мха экзогенным, химически синтезированным пептидом miPER156a в питательном растворе вызывает усиление накопления собственной мРНК в трансгенной культуре мха. В линии 2483 увеличение накопления РНК-матрицы для пептида miPER156a составляет около 60%. В случае линии 2450 этот эффект выражен даже сильнее: накопление РНК-матрицы для пептида капусты увеличивается на 240%, что выше эффекта, наблюдаемого при обработке проростков капусты [9].

В ходе исследования нами получены трансгенные растения мха *P. patens*, содержащие в геноме ОПТ miPER156a капусты брокколи под контролем

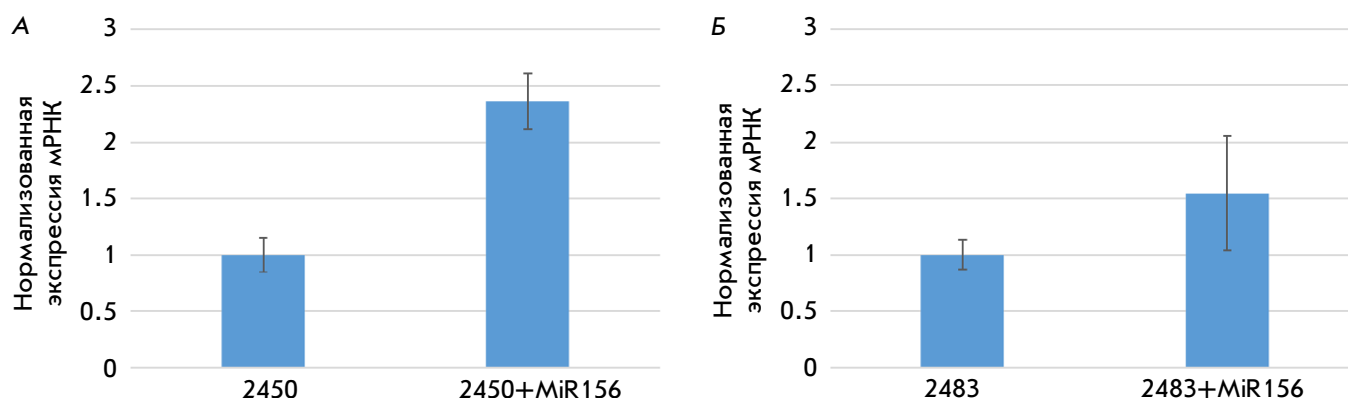


Рис. 3. Результаты кПЦР по измерению уровня экспрессии матрицы для miPER156a в трансгенных растениях мха *P. patens* линий 2450 (А) и 2483 (Б). Для каждого из пяти независимых повторов РНК выделяли из пяти проб мха, выросших в разные периоды времени. Указаны средние статистические значения в виде столбчатой диаграммы и стандартные отклонения. Статистическая значимость различий сумм значений в контрольных экспериментах (без инкубации с пептидом) и опытных экспериментов (с добавлением пептида miPER156a) составляла для этих двух выборок $p < 0.05$ согласно критерию Стьюдента (расчет на основе программы GraphPad Prism 7.0 – ([https:// graphpad_prism.software.informer.com/7.0/](https://graphpad_prism.software.informer.com/7.0/)))

сильного 35S промотора вируса мозаики цветной капусты, и проведен анализ влияния экзогенного пептида на транскрипцию этой ОРТ в протонемах двух трансгенных линий мха. Оказалось, что экзогенный, химически синтезированный пептид miPER156a вызывает усиление накопления в культуре мха собственной мРНК, как показано ранее для целого ряда пептидов в однодольных и двудольных растениях [3–5]. Наши текущие данные указывают, что участки pri-miRNA за пределами кодирующей области пептида не требуются для активации транскрипции. Более того, специфический промотор гена микроРНК не участвует в феномене активации транскрипции, а сам феномен активации транскрипции не является видоспецифичным, т.е.

пептид miPER156a капустных может функционировать в других таксономически удаленных видах растений, таких как мох. Таким образом, полученные нами данные находятся в согласии со схемой действия miPER, где связывание пептида со своей транскрибируемой pri-miRNA-матрицей обеспечивает активацию синтеза этих РНК [10]. ●

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда № 24-24-00016,
<https://rscf.ru/project/24-24-00016/>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Axtell M.J. // Annu. Rev. Plant Biol. 2013. V. 64. № 1. P. 137–159. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120043
- Lauressergues D., Couzigou J.M., Clemente H.S., Martinez Y., Dunand C., Bécard G., Combier J.P. // Nature. 2015. V. 520. № 7545. P. 90–93. doi: 10.1038/nature14346
- Erokhina T.N., Ryazantsev D.Y., Zavriev S.K., Morozov S.Y. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. № 3. P. 2114. <https://doi.org/10.3390/ijms24032114>
- Thuleau P., Ormancey M., Plaza S., Combier J.P. // J. Exp. Bot. 2024. erae501. doi: 10.1093/jxb/erae501.
- Erokhina T.N., Ryazantsev D.Y., Zavriev S.K., Morozov S.Y. // Plants. 2024. V. 13. № 8. P. 1137. <https://doi.org/10.3390/plants13081137>
- Ormancey M., Guillotin B., Ribeyre C., Medina C., Jariais N., San Clemente H., Thuleau P., Plaza S., Beck M., Combier J.P. // Plant Biotechnol. J. 2024. V. 22. № 8. P. 13–15. doi: 10.1111/pbi.14187
- Zhou J., Zhang R., Han Q., Yang H., Wang W., Wang Y., Zheng X., Luo F., Cai G., Zhang Y. // Plant Cell Rep. 2024. V. 44. № 1. P. 9. doi: 10.1007/s00299-024-0338y
- Ormancey M., Thuleau P., Combier J.P., Plaza S. // Biomolecules. 2023. V. 13. № 2. P. 206. doi:10.3390/biom13020206
- Erokhina T.N., Ryazantsev D.Y., Samokhvalova L.V., Mozhaev A.A., Orsa A.N., Zavriev S.K., Morozov S.Y. // Biochemistry (Moscow). 2021. V. 86. № 5. P. 551–562. doi: 10.1134/S0006297921050047.
- Lauressergues D., Ormancey M., Guillotin B., Gervais V., Plaza S., Combier J.P. // Cell Rep. 2022. V. 38. № 6. P. 110339. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110339.
- Fesenko I., Kirov I., Kniazev A., Khazigaleeva R., Lazarev V., Kharlampieva D., Gafskaja E., Zgoda V., Butenko I., et al. // Genome Res. 2019. V. 29. № 9. P. 1464–1477. doi: 10.1101/gr.253302.119
- Simon P. // Bioinformatics. 2003. V. 19. № 11. P. 1439–1440. doi: 10.1093/bioinformatics/btg157