



На правах рукописи

Пашковский Павел Павлович

**МикроРНК опосредованная регуляция экспрессии генов
Cu/Zn-СОД в растении *Thellungiella salsuginea* при стрессе**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Радюкина Наталия Львовна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Новикова Галина Викторовна

доктор биологических наук,
профессор

Тараканов Иван Германович

Ведущая организация: Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет.

Защита состоится «21» июня 2011 г. в 13 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: (499) 977 8018, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан «19» мая 2011 г.

Ученый секретарь

совета по защите докторских
и кандидатских диссертаций,
кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение устойчивости растений к действию неблагоприятных факторов внешней среды остается одним из центральных направлений физиологии растений. На сегодняшний день, очевидно, что существует сеть метаболических реакций, формирующая способность растений адаптироваться к изменяющимся условиям. Однако наименее изученным аспектом в проблеме устойчивости остается вопрос о регуляторных механизмах, позволяющих координировать функционирование всего комплекса реакций защитного ответа. Регуляция стрессорного ответа может осуществляться на генном, транскрипционном, посттранскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях организации. Одним из важных элементов посттранскрипционной регуляции активности генов является механизм умолкания генов, обусловленный РНК-интерференцией (РНКи). Обнаружение феномена РНКи в опытах на нематоде в 1998 году позволило выявить новый пласт регуляторных процессов, которые вовлечены в регуляцию экспрессии генов у большинства эукариот. В настоящее время механизм РНКи стал важным инструментом функциональной геномики, позволяющий специфически регулировать активность генов. В последнее время стало ясным, что в основе механизмов РНКи лежат процессы умолкания генов, который обусловлен экспрессией малых РНК.

В растениях *Arabidopsis thaliana* L. было обнаружено два основных класса малых РНК размером 21-23 нк., участвующих в подавлении экспрессии генов: siРНК (small interfering РНК) (Baulcombe, 1999) и miРНК (micro РНК) (Bartel, 2001). Роль siРНК заключается в защите клетки от вызванной РНК-вирусами инфекции, в то время как miРНК закодированы в геноме многоклеточных организмов в виде шпилечно-го предшественника (пре-miРНК) и регулируют активность генов в цитоплазме и ядре (Bartel, 2004).

Недавние исследования показали, что miРНК способны регулировать комплекс биологических процессов в растениях такие как гормональный контроль, иммунный ответ, полярный рост и адаптация к неблагоприятным условиям (Voinnet, 2009). Все больше появляется данных о том, что в условиях стресса изменяется как экспрессия miРНК, так и экспрессия мРНК – генов мишеней, а также активность miРНК-белковых комплексов (Leung *et al.*, 2010).

После проведения биоинформационного анализа было выдвинуто

предположение о возможной посттранскрипционной регуляции генов *Cu/Zn-СОД* с помощью miR398 (Bonnet, 2004; Sunkar, 2004). Изменение уровня экспрессии miR398 было отмечено у *A. thaliana* под действием абиотических стресс-факторов и при бактериальном поражении растений (Sunkar, 2006).

В работах Yamasaki (2007) сообщалось, что изменение содержания меди в питательной среде растений влияет на экспрессию, как минимум, двух из трех *МИР* генов, кодирующих miR398 (miR398 b, c), при этом также изменялся уровень мРНК генов *CSD*. Несмотря на это, точный молекулярный механизм данного процесса остается пока слабо изученным. К тому же остается неизвестным факт наличия miR398 опосредованной регуляции генов *CSD* у более устойчивых к действию абиотических стрессов растений-галофитов.

Из всего вышесказанного становится очевидным, что изучение явления РНКи открывает большие перспективы для понимания механизмов миРНК-опосредованной регуляции экспрессии генов в растениях, а также позволяет создавать трансгенные растения нового поколения, реализующие свой адаптивный потенциал для сохранения продуктивности в условиях стресса.

Цель диссертационной работы заключалась в исследовании роли микроРНК в посттранскрипционной регуляции генов *Cu/Zn-СОД* и гена *CCS* в растении *Thellungiella salsuginea* (Pallas) (*Th. salsuginea*) при действии стрессоров различной физической природы.

Задачи исследования:

1. Исследовать экспрессию семейства генов miR398 и изучить изменение уровня экспрессии miR398 при действии различных видов абиотических стрессоров (засоление, UV-B, свет высокой интенсивности, различные концентрации меди в питательной среде растений).
2. Исследовать органоспецифичность экспрессии miR398 при стрессе.
3. Сравнить закономерности процессинга miR398 с экспрессией генов *Cu/Zn-СОД*.
4. Исследовать экспрессию генов *Cu/Zn-СОД* и гена *CCS* у растений *Th. salsuginea* при различном содержании меди в питательной среде в связи с изменением уровня экспрессии miR398.
5. Исследовать уровень экспрессии генов *Argonaute (Ago)*, экзонуклеазы *Dicer-*

like1 (DCLI), транскрипционного фактора *Squamosa promoter binding protein-like 7 (SPL7)*, РНК-зависимой РНК-полимеразы 1 (*RdRP1*), вовлеченных в процесс образования и функционирования miR398 в условиях стресса.

Научная новизна проведенных исследований. Впервые показано, что экспрессия miR398 наблюдается у растений-галофитов. Установлено, что у растений *Th. salsuginea* мишенью консервативной miR398 могут выступать мРНК цитозольной Cu/Zn-СОД (*CSD1*). Другой из возможных мишеней miR398 может быть мРНК шаперона меди *CCSI*, доставляющего ионы меди к апобелкам Cu/Zn-СОД в различные компартменты клетки.

Впервые показано, что экспрессия miR398 осуществляется не только в надземной части растений, но и в корнях взрослых растений *Th. salsuginea*, что свидетельствует об отсутствии органоспецифичности. Показано, что у растений *Th. salsuginea* экспрессия miR398 зависит от концентрации меди в питательной среде, и в условиях её отсутствия значительно увеличивается, вызывая умолкание гена *CSD1*, а также гена *CCSI*. Это подтверждает важную биологическую роль miR398 опосредованной регуляции экспрессии генов при стрессе у растений *Th. salsuginea*, а также указывает на возможность существования в растительных клетках множества мишеней для уже открытых в настоящее время микроРНК.

Практическая ценность. Полученные в результате проведенных исследований данные расширяют представления о регуляторных механизмах функционирования защитного ответа растений на повреждающие воздействия стрессоров. Исследованное в ходе работы явление микроРНК опосредованной регуляции генов антиоксидантных ферментов, указывает на наличие посттранскрипционных превращений мРНК на пути созревания соответствующих белков у растений *Th. salsuginea*. Возможно также, что этот механизм принимает участие в сигнальном каскаде в растениях, находящихся в условиях стресса, или при изменении концентрации эссенциальных элементов в питательной среде. Полученные данные могут быть использованы для разработки стратегии создания трансгенных растений, реализующих свой потенциал для сохранения высокой продуктивности в условиях стресса. Все полученные материалы могут быть включены в курс лекций для студентов биологических ВУЗов.

Апробация результатов работы. Данные, представленные в работе, докладывались на конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (г. Пущино, Россия,

2009, 2010, 2011), XVII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (г. Валенсия, Испания, 2010), а также на Годичном собрании ОФР (г. Апатиты, Мурманская область, 2009).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, из которых 4 в журналах, рекомендуемых ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы и приложения. Диссертационная работа изложена на 115 страницах машинописного текста, содержит 3 таблицы, 2 схемы и 28 рисунков. Список цитируемой литературы составляет 153 наименования, из которых 142 на иностранном языке.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования.

Объектом исследований являлись растения *Thellungiella salsuginea* (Pallas) (*Th. salsuginea*), выращенные в водной культуре на среде Джонсона, модифицированной по Винтер, в камере фитотрона при температуре $23 \pm 1^\circ\text{C}$ днем и $16 \pm 1^\circ\text{C}$ ночью. При достижении растениями возраста 6 недель (стадия розетки) их разделяли на четыре группы и подвергали обработке: NaCl (100 мМ и 300 мМ), CuSO₄ (0; 1 и 100 мкМ), облучению UV-B в камере с УФ лампами (280-315 нм, 3.94-4.43 эВ, "Philips", Голландия) в течение 10 и 20 минут (12,3 и 24,6 кДж/м² соответственно) или светом высокой интенсивности (20 мин, ДНАТ ФАР 54,1 Вт/м², 650–750 нм., "Reflux 250", Россия). Питательный раствор, не содержащий ионов меди, готовили в кюветах, обработанных 100мМ ЭДТА с применением деионизированной воды. Корни растений перед перенесением на среду без меди промывались 10 мМ ЭДТА. Пробы листьев и корней отбирали сразу после начала эксперимента и через 24 ч, полученные образцы хранили при -70°C . Эксперименты проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях. В исследованиях для сравнительной оценки изучаемых параметров был использован контрастный по устойчивости вид - *Arabidopsis thaliana* L. Dijon.

Методы исследования. Выделение тотальной РНК осуществляли с реактивом TRIZOL™ (Invitrogen, США). После гомогенизации проводили экстракцию фенол-

хлороформной смесью (pH=4,3), образцы инкубировали 10 минут на льду, центрифугировали 15 мин 8000 g (+4°C). РНК осаждали 3М CH₃COONa (pH=5,5) и абсолютным этанолом в течение 12 ч при -70°C, с последующим центрифугированием 30 мин при 10000 g (+4°C). Осадок промывали абсолютным этанолом, центрифугировали 15 мин при 10000 g (+4°C) и подсушивали при 42°C. Осадок растворяли в 20-30 мкл RNA Loading Dye Solution (Fermentas, Канада) и определяли концентрацию РНК. Для Нозерн-блот гибридизации проводили гель-электрофорез 30 мкг тотальной РНК в 20% ПААГ (процентное отношение массы бисакриламида к общей массе обоих мономеров составляло 5%) в присутствии 7М мочевины, затем блот-перенос на мембрану Hybond-N+ (Amersham, США) с последующим ее инкубированием под UV-B в следующей последовательности: 50 сек. 360 нм, 10 сек. 240 нм. Мембрану гибридизовали в течение 12 ч с антисмысловым ДНК-олигонуклеотидом к miR398, меченным γ -³²P по 5'-концу. Мембрану анализировали с помощью сканера Typhoon™ 9410 (GE Healthcare, США). Для контроля загрузки полученный фильтр после сканирования отмывали и вновь гибридизовали с антисмысловым радиоактивно меченым ДНК олигонуклеотидом, комплементарным малой ядерной РНК U6. Полученные результаты обрабатывались как отношение свечения образцов миРНК к свечению контроля загрузки U6 и выражались в процентах от контрольных значений.

Оценку содержания белка CSD1 и CCS1 проводили с помощью вестерн-блот анализа. Белки экстрагировали буфером: 50 мМ Tris-HCl (pH=8); глицерин 10%; SDS 5%; β -меркаптоэтанол 5%; ЭДТА 25 мМ; коктейль ингибиторов протеаз (Fermentas, Канада) 0,1%; PMSF 1мМ. Определение концентрации белков проводили по Smith (1985) с бицинониновой кислотой (Acros, США). Концентрацию белка рассчитывали по калибровочной кривой, построенной с использованием растворов БСА с известной концентрацией.

Электрофорез белковой фракции в денатурирующих условиях проводили в 15% полиакриламидном геле по стандартной методике Laemmli (1970) на приборе Bio-Rad «Miniprotean 3» (США). Процентное отношение массы бисакриламида к общей массе обоих мономеров составляло 0,25%.

Вестерн-блоттинг проводили по методу Tobin (1979). Электро-блоттинг осуществляли в течение 2 ч (1В/1см²). После стандартной процедуры подготовки (Маниатис и др., 1984) мембрану инкубировали с первичными поликлональными антителами на

Cu/Zn-СОД CSD1 и шаперона меди для СОД CCS1 в течение 12 ч при +4°C. После отмывки мембраны проводили реакцию с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным соединением Dy-Light 488 (Agrisera, Швеция) в течение 1 ч, затем мембрану отмывали и сканировали на Typhoon™ 9410 (GE Healthcare, США).

Синтез кДНК осуществляли с помощью M-MLV Reverse Transcriptase Kit (Fermentas, Канада) и праймером oligo(dT)₂₁. Далее проводили ПЦР с ген-специфичными праймерами, подобранными с использованием нуклеотидных последовательностей генов баз данных NCBI (National center of bioinformatics, США, www.ncbi.nlm.nih.gov) в среде программы Vector NTI Suite 9 (Invitrogen, США). Количественную оценку ампликонов проводили на сканере Typhoon™ 9410 (GE Healthcare, США). Результаты экспериментов подвергали математической обработке, средние значения и их стандартные отклонения получены в результате проведения трех независимых повторений эксперимента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Разработка методических подходов для исследования экспрессии miR398.

Для исследования экспрессии miR398 был осуществлен биоинформационный анализ последовательностей 3'-НТО мРНК генов *CSD* растений *Thellungiella* и *Arabidopsis* по выявлению сайтов связывания с известными последовательностями miR398. Для этого в программной среде Vector NTI 9.0 (Invitrogen, США) были выровнены последовательности мРНК *CSD1*, найденные в базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) относительно miR398, обнаруженных в базе данных малых РНК (<http://www.mirbase.org>) (рис. 1).

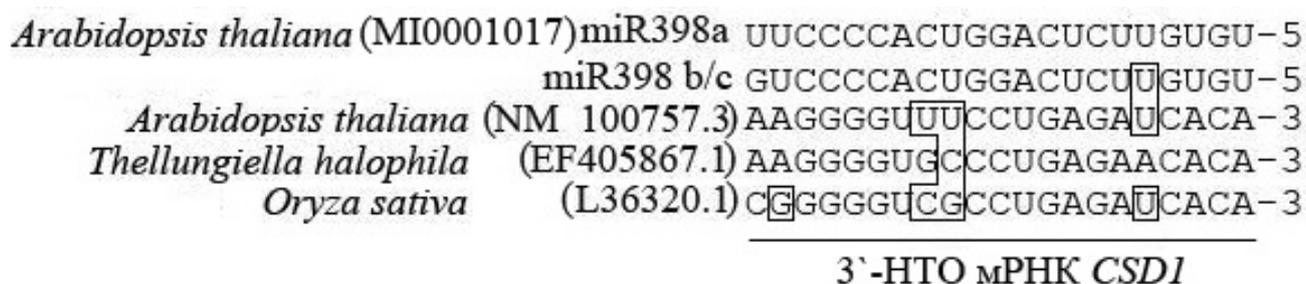


Рис.1 Выравнивание последовательностей 3'-НТО мРНК гена *CSD1* некоторых высших растений относительно друг друга и относительно miR398 a, b, c *Arabidopsis thaliana*.

На основе полученных биоинформационных и литературных данных был разработан антисмысловой ДНК олигонуклеотид, который затем испытывали в качестве зонда методом Нозерн-блот гибридизации в системе положительных и отрицательных контролей. В качестве положительного контроля использовали искусственный олигонуклеотид (ЛиТех, Москва), соответствующий по своей нуклеотидной последовательности miR398, в концентрации 10 фМ. Разработанный зонд показал высокий уровень комплементарности к последовательности искусственного олигонуклеотида, соответствующего miR398, а также последовательностям miR398, обнаруженных в тотальной РНК *Th. salsuginea*. Растительные миРНК, в отличие от животных, высоко комплементарны последовательностям мРНК своих мишеней, что обуславливает строго определенное количество целевых генов, способных регулироваться одной миРНК. Однако у растений *A. thaliana* в последовательностях в 3'-НТО области мРНК гена *CCS1*, шаперона меди, доставляющего медь к апобелкам Cu/Zn-СОД, были обнаружены сайты связывания с miR398, что может указывать на возможность регуляции Cu/Zn-СОД не только прямо, но и косвенно через регуляцию экспрессии *CCS1* (Beauclair et al., 2010).

При проведении биоинформационного анализа мРНК *CCS1* некоторых видов высших растений в 3'-НТО этих мРНК, был идентифицирован возможный сайт связывания, который согласно выравненным последовательностям также может являться областью взаимодействия с miR398 (рис. 2).

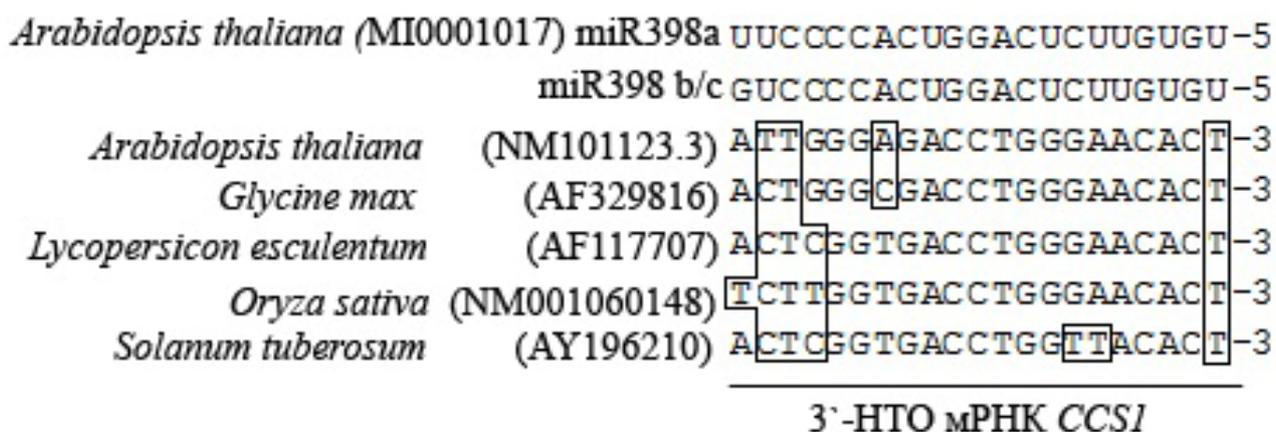


Рис.2 Выравнивание последовательностей 3'-НТО мРНК гена *CCS1* некоторых высших растений относительно друг друга и относительно miR398 a, b, c *A. thaliana*.

2. Анализ уровня экспрессии miR398 у различных видов растений.

Среди примерно тысячи растительных *МИР* генов, представленных в базе данных миРНК (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences>), 100 семейств родственных миРНК

образуют эволюционный ряд микроРНК *A. thaliana*. Некоторые семейства миРНК консервативны у мхов и плауновидных, что указывает на их древнее происхождение. Другие семейства миРНК развились после разделения на высшие растения и мхи, но до появления однодольных и двудольных. Семейство miR398, вероятно, является одним из примеров сравнительно недавнего эволюционного приобретения высших растений (Vionnet, 2009). Из представленных на рисунке 3 результатов Нозерн-блот гибридизации видно, что радиоактивно меченый зонд связался с тотальной РНК, выделенной из листьев и корней *Th. salsuginea* и *A. thaliana*. Ровная конститутивная экспрессия U6 указывает на равномерность загрузки выделенной РНК представленных растений.

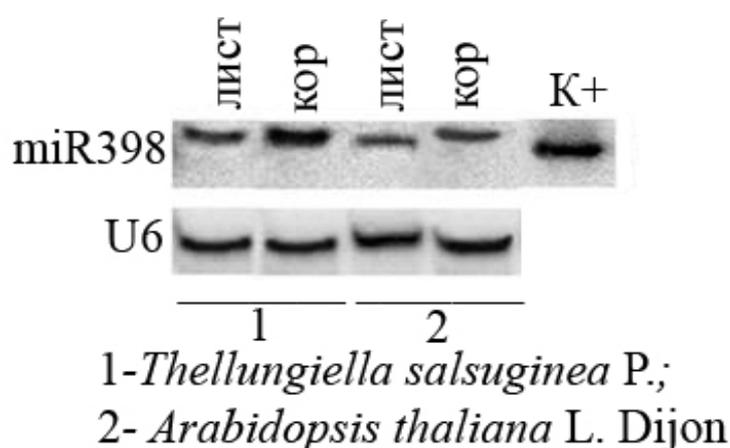


Рис. 3 Результат Нозерн-блот гибридизации 30 мкг тотальной РНК из листьев и корней растений с антисмысловым зондом к последовательностям miR398 *A. thaliana*.

Нозерн-блот гибридизация с зондом, комплементарным miR398 *A. thaliana*, выявила у галофита *Th. salsuginea* малую РНК размером 21 нуклеотид (рис. 3). При проведении Нозерн-блот гибридизации во фракции тотальной РНК *Th. salsuginea* также была выявлена более длинная РНК, которая, по всей видимости, является предшественником, а именно пре-миРНК miR398. Длина этого фрагмента примерно на 10 нуклеотидов больше, чем длина пре-миРНК miR398 у *A. thaliana* (EU549620.1) (данные не приведены).

Таким образом, на основании проведенных исследований, нами было установлено, что miR398 конститутивно экспрессируется в листьях и корнях растений галофита *Th. salsuginea*.

3. Исследование экспрессии miR398 и *CSD1* при действии NaCl, света высокой интенсивности и UV-B облучения на растения *Th. salsuginea*.

Важная роль miR398 в регуляции гена *CSD1* была показана у растений *A. thaliana*, находившихся под действием абиотических стресс-факторов (Sunkar et al., 2006). Поскольку *A. thaliana* и *Th. salsuginea* контрастно различаются по степени устойчивости к действию засоления, было важно исследовать изменения уровня экспрессии miR398 у галофита *Th. salsuginea* в условиях действия NaCl. Анализ экспрессии гена *CSD1* у *Th. salsuginea* методом ОТ-ПЦР позволил установить, что на среде с NaCl (300 мМ) уровень мРНК *CSD1* увеличивается в корнях, но снижается в листьях через 24 ч после начала обработки. Как было обнаружено ранее, растения *Th. salsuginea* отвечают на действие NaCl (300 мМ) повышением общей активности СОД (Радюкина и др., 2008). Как показал анализ экспрессии miR398 (Нозерн-блот) в растениях *Th. salsuginea* при действии 300 мМ NaCl уровень miR398 в листьях повышался через 24 ч, в то время как в корнях он снижался. (рис. 4).

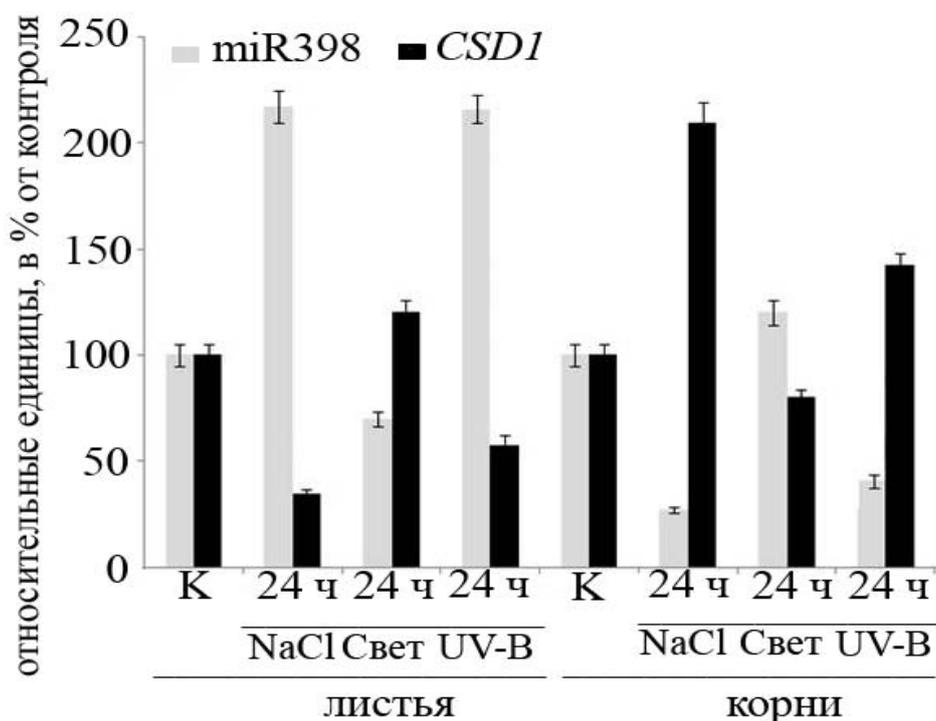


Рис. 4 Изменение уровней экспрессии miR398 (Нозерн-блот) и мРНК *CSD1* (ОТ-ПЦР) в корнях и листьях растений *Th. salsuginea* при действии 300 мМ NaCl, 20 минут света высокой интенсивности и 20 минут UV-B через 24 часа после начала эксперимента.

Сравнение уровней miR398 и мРНК гена *CSD1* в корнях и, особенно, в листьях, как и у *A. thaliana* в условиях засоления, выявило обратное соотношение уровней их

экспрессии через 24 часа после обработки NaCl (рис 4.).

Галофиты, как правило, произрастают в регионах с засушливым климатом и помимо избыточного содержания солей в почве подвергаются действию комплекса ксеротермических факторов, одним из которых является солнечная радиация. Чтобы выяснить действует ли механизм мРНК опосредованной регуляции экспрессии генов *CSD* только при солевом стрессе, или функционирует в ответ на действие стрессоров иной природы, мы изучили экспрессию miR398 при действии света высокой интенсивности. Для облучения использовали свет в 10 раз более интенсивный по сравнению с нормальным освещением. Исследование уровня miR398 показало, что в ответ на облучение в листьях *Th. salsuginea* через 24 ч наблюдалось снижение экспрессии miR398 (рис. 4), в то время как в корнях – повышение. Таким образом, при облучении светом высокой интенсивности сохранялась тенденция обратной зависимости между экспрессией miR398 в корнях и листьях так же, как и при засолении. При этом уровни экспрессии miR398 и мРНК *CSD1* также находились в обратной зависимости. Однако изменения в экспрессии наблюдаемых генов были менее выражены, чем при действии NaCl.

UV-B облучение, подобно действию других повреждающих абиотических факторов, вызывает окислительный стресс, следствием которого является изменение активности СОД. Основываясь на проведенных в лаборатории исследованиях, мы использовали 10 и 20 минутное UV-B облучение для изучения уровней экспрессии miR398 и гена *CSD1* (Радюкина и др., 2010). Полученные данные показали, что характер экспрессии гена *CSD1* и miR398 в листьях и корнях *Th. salsuginea* при двух дозах облучения был довольно близок (данные для 10 мин облучения приведены в диссертации). Сравнение уровней экспрессии гена *CSD1* и miR398 при двух дозах облучения показало дозозависимый характер: более сильное облучение соответствовало более сильному изменению экспрессии. Данные, представленные на рисунке 4, демонстрируют уровень экспрессии miR398 и *CSD1* через 24 ч после облучения UV-B (20 минут) в листьях и корнях. Важно, что после действия UV-B облучения наблюдалось обратное соотношение между изменением количества miR398 в листьях и в корнях, а также сохранялась тенденция к обратному соотношению между уровнями мРНК гена *CSD1* и miR398. Изменения в экспрессии исследуемых генов при действии UV-B были сопоставимы с изменением их экспрессии при действии NaCl, несмотря на кратко-

временность воздействия UV-B на листья. Причем наблюдалось изменение экспрессии изучаемых генов не только в листьях, но и в корнях. Это может быть связано с тем, что облучение UV-B влияет на экспрессию целого ряда генов специфического ответа и, возможно на экспрессию отдельных представителей семейства генов *МИР* 398.

4. Изучение регуляции процессинга *CSD1* и *CCS1* в листьях и корнях *Th. salsuginea* в условиях различных концентраций меди в питательной среде.

Медь является эссенциальным микроэлементом для питания растений. Среди основных белков, имеющих в составе кофактора ионы меди, можно выделить пластоцианин (играет важную роль в передаче электронов при фотосинтезе), Cu/Zn-СОД, цитохром С (участвует в процессах дыхания в митохондриях), лакказу (семейство оксидаз). На долю этих белков приходится большая часть внутриклеточной меди.

В ряде работ показано, что в условиях недостатка меди отмечалось снижение содержания белка Cu/Zn-СОД и его ферментативной активности. При этом у *A. thaliana* наблюдалось повышение уровня мРНК гена, кодирующего другую изоформу - Fe-СОД, и ферментативной активности этого белка (Yamasaki *et al.*, 2007). Было также показано, что у *A. thaliana* и некоторых других высших растений различные концентрации меди регулируют экспрессию мРНК гена *CCS1*, кодирующего шаперон меди, доставляющего Cu к апобелкам различных изоферментов Cu/Zn-СОД (Beauclair *et al.*, 2010). Поскольку, предыдущими экспериментами нами было показано участие miR398 в регуляции экспрессии гена *CSD1* у галофита *Th. salsuginea* в условиях действия различных абиотических стрессоров, особый интерес представляло исследование влияния различных концентраций меди в питательной среде на регуляцию экспрессии гена *CSD1* с помощью miR398.

Основываясь на литературных данных и данных наших предварительных экспериментов были выбраны следующие концентрации Cu: 1 мкМ и 100 мкМ. Следует отметить, что растения *A. thaliana* оказались более чувствительными к действию меди, чем *Th. salsuginea*. Медь в концентрации 100 мкМ была летальной для растений *A. thaliana* и приводила к гибели 95% растений на 5 сутки эксперимента. У оставшихся 5% растений под действием 100 мкМ меди наблюдалось стимулирование стадии цветения, которая наступала раньше, чем у контрольных растений. Растения *Th.*

salsuginea проявляли большую устойчивость к действию высокой концентрации меди. Концентрация 100 мкМ не вызывала у этих растений никаких внешних физиологических изменений за исключением потемнения корней.

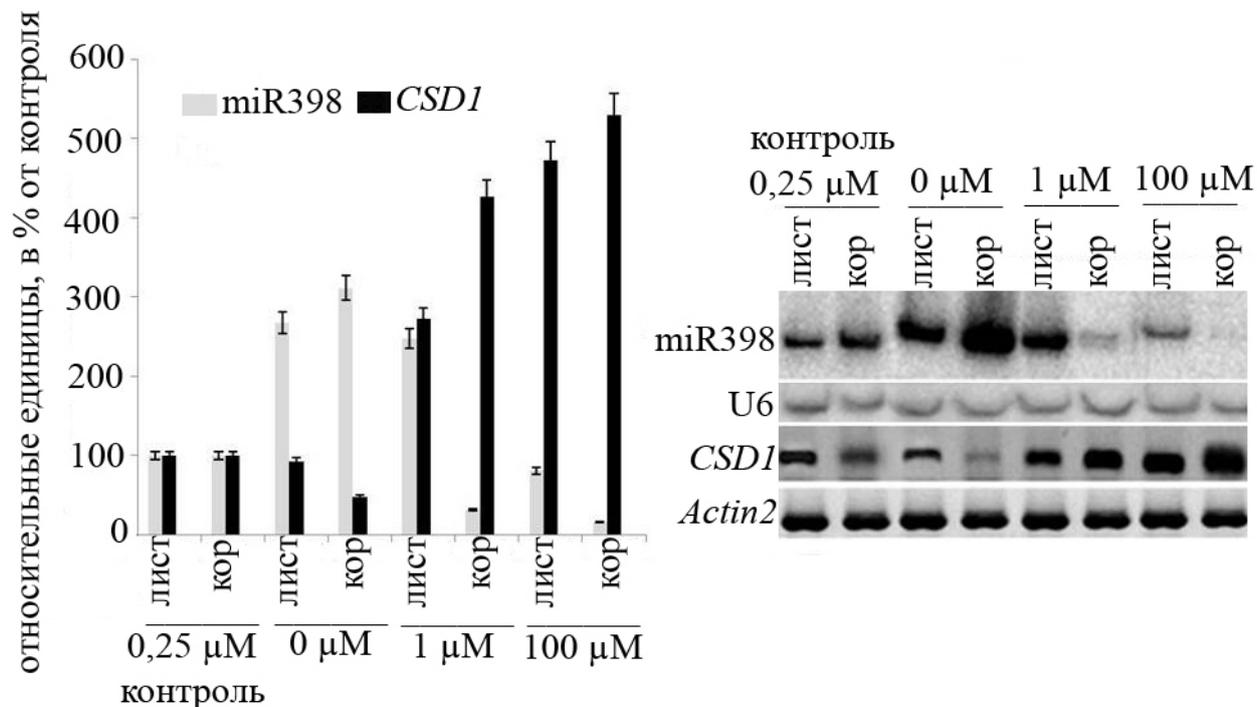


Рис. 5 Влияние различных концентраций CuSO_4 на уровень экспрессии miR398 и *CSD1* в листьях и корнях растений *Th. salsuginea* через 24 часа.

Как показали данные Нозерн-блот гибридизации тотальной РНК *Th. salsuginea*, при внесении 100 мкМ CuSO_4 в питательную среду, происходило почти полное ингибирование экспрессии miR398 в листьях и, особенно, в корнях. В экспериментах с отсутствием меди в питательной среде наблюдали значительное увеличение экспрессии miR398 в листьях и, особенно, в корнях (рис. 5). При исследовании экспрессии гена *CSD1* в листьях и корнях показано, что через 24 ч отсутствия меди в питательной среде вызывало снижение экспрессии этого гена в корнях и в листьях. При концентрации меди 100 мкМ в подземной и надземной частях растений *Th. salsuginea* наблюдалось существенное увеличение количества мРНК гена *CSD1*. Однако вестерн-блот анализ со специфичными для цитозольной формы Cu/Zn-СОД антителами показал, что этот белок определялся только в листьях растения при всех исследованных концентрациях меди в питательной среде (рис. 6). Это может свидетельствовать о том, что синтез самого белка может осуществляться только в листьях. При высокой концентрации меди 100 мкМ в листьях наблюдалось усиление экспрессии гена *CSD1*, однако, повышения

содержания белка CSD1 не происходило. С другой стороны, при исследовании экспрессии гена *CCSI* шаперона меди для СОД, в листьях и корнях было показано, что количество мРНК этого гена увеличивалось в листьях при концентрации CuSO_4 1 и 100 мкМ, в условиях же отсутствия меди экспрессия этого гена значительно снижалась в листьях и корнях. Белок CCSI обнаруживался только в листьях у контрольных растений (0,25 мкМ CuSO_4), а также при внесении 1 мкМ CuSO_4 в питательную среду. Важно отметить, что в условиях различной концентрации меди в питательной среде *Th. salsuginea* как в листьях, так и в корнях прослеживается реципрокный характер взаимоотношений между экспрессией miR398, с одной стороны, и экспрессией гена *CSD1* и гена *CCSI*, с другой. В связи с этим можно предположить, что в условиях различной концентрации меди в питательной среде, наблюдается посттранскрипционная miR398 опосредованная регуляция генов *CSD1* и *CCSI*.

При исследовании в листьях и корнях *Th. salsuginea* экспрессии miR398 показано, что через 48 ч в растениях, в питательный раствор которых, был внесен CuSO_4 в исследуемых концентрациях, продолжалось ингибирование экспрессии miR398 на фоне увеличения содержания предшественника пре-miR398 (данные приведены в диссертации). Этот факт может указывать на ингибирование функции экзонуклеазы Dicer, которая необходима для процессирования пре-миРНК в зрелую miR398. Также, можно сделать предположение, что высокое содержание меди в питательной среде может ингибировать процессинг белка Cu/Zn-СОД за счет нарушения структуры активного центра ионами меди.

Возможно также, что увеличение miR398 обусловленной регуляции мРНК *CCSI* в условиях отсутствия меди в питательной среде сокращает количество доставляемой меди к белку CSD1 и, как следствие, снижается его содержание в листьях. Вероятно, в условиях отсутствия меди в питательной среде может происходить перераспределение поступающих ионов меди между Cu/Zn-СОД и другими важными медь-содержащими белками, например, такими, как пластоцианин, играющего важную роль в фотосинтезе.

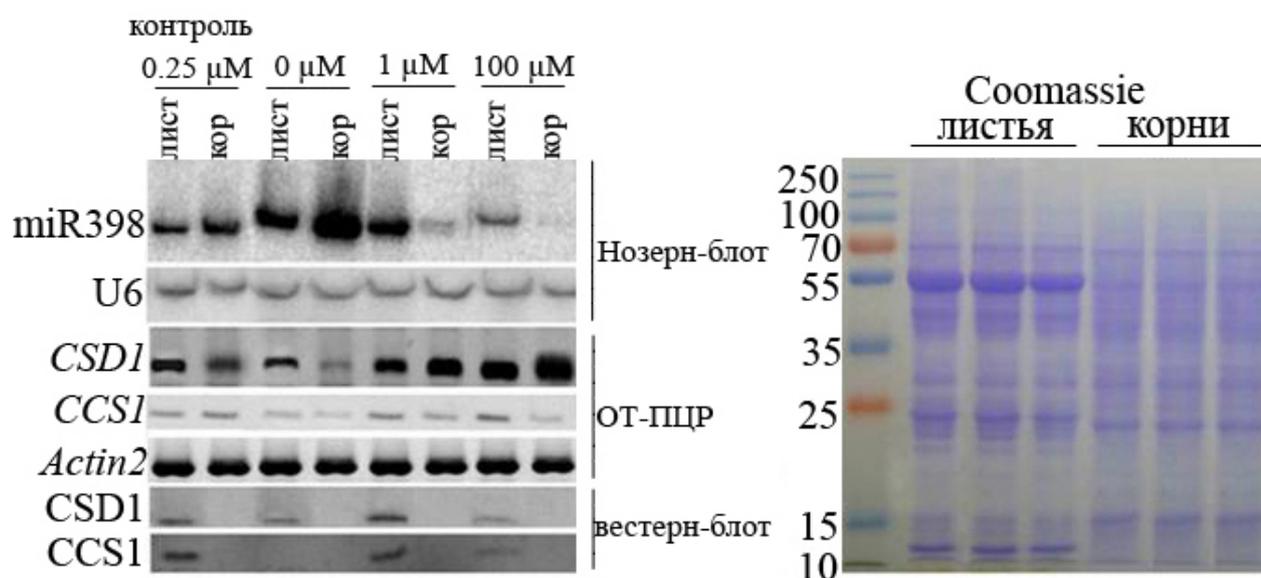


Рис.6 Влияние различных концентраций CuSO_4 в питательной среде растений *Th. salsginea* на экспрессию miR398 (Нозерн-блот), генов *CSD1*, *CCS1* (ОТ-ПЦР) и содержание белка *CSD1* и *CCS1* (вестерн-блот) через 24 часа.

5. Исследование уровня экспрессии генов, участвующих в процессинге miR398.

У растений, в отличие от животных, белки, участвующие в процессинге микроРНК, представлены множественными гомологами, которые способны активироваться в ответ на действие стрессоров различной природы (Vionnet, 2009). Однако среди множества белков можно выделить несколько важнейших групп. К ним относятся белки Argonaute, которые являются обязательными элементами RISC (RNA induced silencing complex), непосредственно выполняющего ингибирование или рестрикцию мРНК. У растений семейство белков Argonaute представлено 10 белками (Ago1-10). Из проведенных нами экспериментов следует, что значительное влияние на экспрессию miR398 у растений *Th. salsgenia* оказывает изменение концентрации меди в питательной среде. miR398 являются, по всей видимости, важными маркерными молекулами, позволяющими растениям быстро реагировать на изменение концентрации меди в питательной среде. Поскольку в условиях отсутствия меди в питательной среде наблюдалась наибольшая экспрессия miR398, необходимо было установить, какой из генов, кодирующих белки Argonaute при этом активируется. На рисунке 7 представлен результат ОТ-ПЦР мРНК растений перенесенных на питательный раствор без меди. В течение суток, в листьях наблюдалось увеличение экспрессии мРНК генов, кодирующих белки Ago1, Ago4, Ago9 и Ago10.

Важными дцРНК (двухцепочечная РНК) связывающими белками, непосредст-

венно участвующими в процессинге миРНК, являются белки типа Dicer (Dicer-like1). У растений это семейство представлено 4 белками (DCL1-4), но важнейшим из них в процессинге миРНК считается DCL1. Растения, мутантные по этому гену, проявляют серьезные фенотипические отклонения, а нокаут генов *Dicer* может приводить к полному ингибированию процессинга зрелых миРНК. В условиях недостатка меди в питательной среде происходит увеличение экспрессии гена *Dicer1*, что согласуется с наблюдаемым увеличением уровня miR398.

В обычных условиях после расхождения миРНК дуплекса одна из цепочек интегрируется в RISC комплекс, а другая, как правило, деградирует. В условиях стресса или недостатка определенных элементов в питательной среде, вторая часть миРНК дуплекса может выступать в качестве затравки для беспраймерного синтеза нового миРНК дуплекса. Для этого важного в большинстве эукариотических клеток процесса существуют РНК-зависимые РНК-полимеразы (RdRP1-4). Эти белки в условиях стресса позволяют увеличивать уровень тех или иных миРНК без активации *МИР* генов на уровне гетерохроматина.

В условиях отсутствия меди в питательной среде у растений *Th.salsuginea* происходит увеличение уровня экспрессии *RDR1* гена, что может указывать на беспраймерный синтез новых миРНК дуплексов на «отстающей» цепи миРНК дуплекса как на матрице. Это может способствовать сокращению продолжительности процессинга и тем самым ускорить ответ растений на стресс.

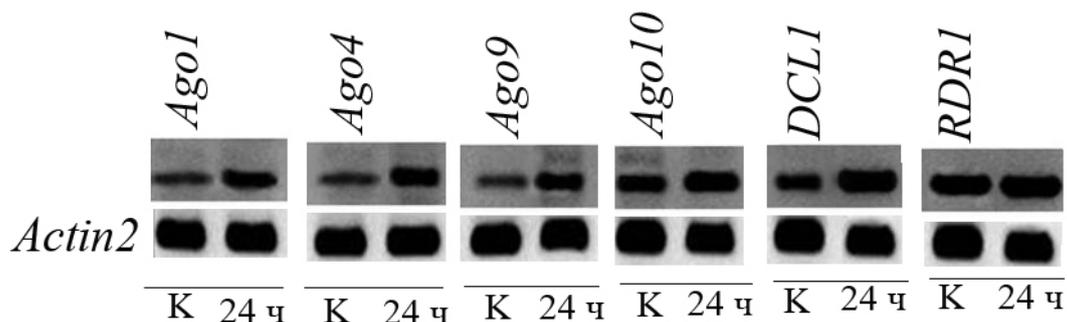


Рис. 7 Изменение уровней экспрессии мРНК *Ago1*, *Ago4*, *Ago9*, *Ago10*, *DCL1*, *RDR1* в листьях растений *Th. salsuginea* в условиях отсутствия меди в питательной среде через 24 часа.

Экспрессии miR398 и мРНК генов *CSD1* и *CCS1*, их регуляция могут зависеть от других важных факторов, например, транскрипционных. Согласно литературным данным, у *A. thaliana* в промоторных последовательностях генов *МИР* 398 обнаружен

цис-элемент GTAC бокса, активизирующийся в условиях недостатка меди (Yamasaki *et al.*, 2009). Более того, GTAC промоторная область генов miR398 способна связываться с SPL доменом транскрипционного фактора SPL7 (SQUAMOSA промотор-связывающийся белок-7), который способен активировать экспрессию генов *MIIP* 398. Методом ОТ-ПЦР нами было показано увеличение экспрессии гена *SPL7* в условиях отсутствия меди в питательной среде через 24 ч после начала эксперимента (рис. 8), что согласуется с увеличением уровня miR398.

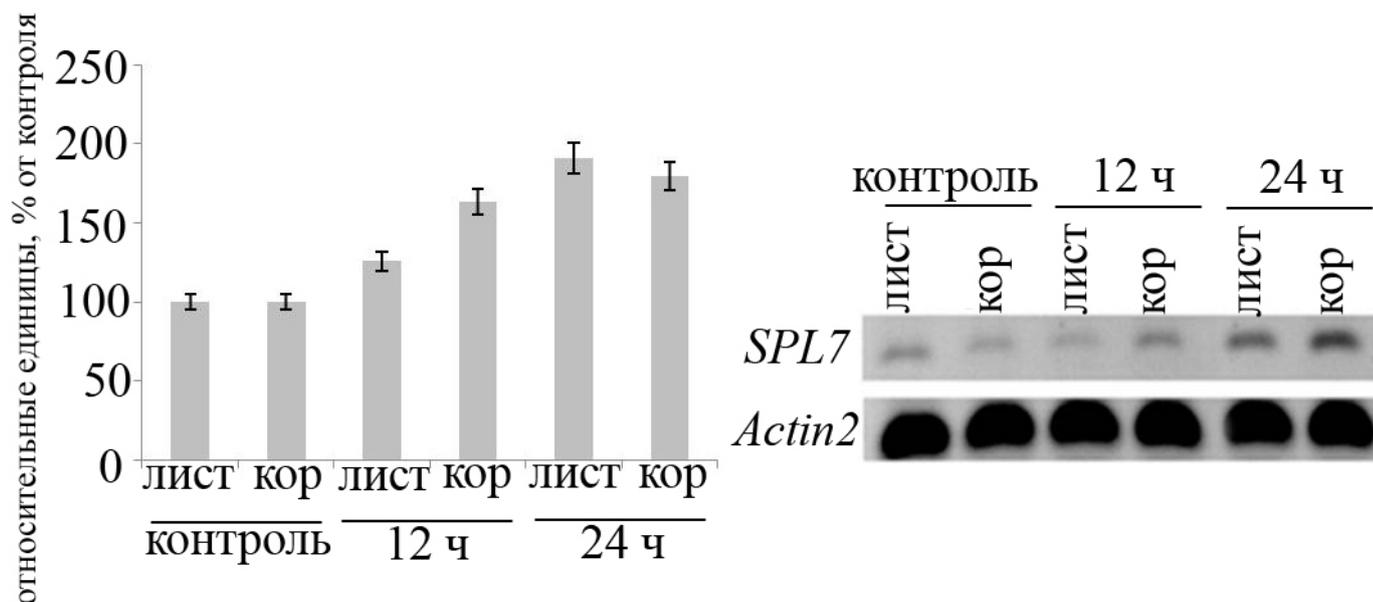


Рис. 8 Влияние отсутствия меди в питательной среде на уровень экспрессии *SPL7* (ОТ-ПЦР) в листьях и корнях *Th. salsuginea* в течение 24 часов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Антиоксидантные ферменты, одним из которых является Cu/Zn-СОД, играют важную роль в детоксикации АФК, интенсивная генерация которых происходит в условиях действия стрессоров различной природы. Регуляция экспрессии кодирующих эти ферменты генов может осуществляться на геномном, транскрипционном, посттранскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях. Функционирование механизма посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, а именно РНК-интерференции с участием мРНК, недавно было продемонстрировано у растений гликофитов при действии повреждающих факторов (NaCl, паракват, сахароза, высокие концентрации меди, железа). В частности, у *A. thaliana*, наблюдалось увеличение количества мРНК *CSD1* и *CSD2* на фоне снижения уровня miR398. Вопрос о том, функционирует ли подобный механизм miR398 зависимой регуляции экспрессии

CSD генов в растениях галофитах, обладающих высокой конститутивной устойчивостью к засолению и другим экстремальным факторам, оставался открытым.

Проведенные биоинформационные исследования позволили установить возможные сайты связывания с 3'-НТО мРНК *CSD1* и *CCSI* у растений *Th. salsuginea*, а также позволили разработать антисмысловой зонд. Полученный ДНК зонд, способный связываться с семейством miR398, позволил изучить их конститутивную экспрессию у растений *Th. salsuginea*.

В проведенных нами исследованиях было показано, что у *Th. salsuginea* интенсивность экспрессии miR398 изменяется не только при засолении, но и при действии света высокой интенсивности, UV-B облучения и в условиях различных концентраций меди в питательной среде (рис. 4, 5). Это указывает на стресс-зависимость такого механизма регуляции, функционирующего как в устойчивых, так и в чувствительных растениях. Уровень экспрессии miR398 у *Th. salsuginea* в ответ на действие стрессора носит дозозависимый характер, что особенно четко проявляется в условиях засоления, а также действия различных концентраций меди (рис. 4, 6) и, в меньшей степени, при действии света высокой интенсивности и UV-B (рис. 4). При этом наблюдалось отсутствие органоспецифичности. Можно полагать, что в основе этого явления лежит интенсивность образования АФК, генерация которых возрастает при усилении повреждающего воздействия стрессора. Нельзя исключать, что АФК, индуцирующие синтез антиоксидантных ферментов, одновременно ингибируют экспрессию miR398, что повышает эффективность функционирования клеточной антиоксидантной системы.

Анализ динамики уровней miR398 у растений *Th. salsuginea* в ответ на UV-B облучение и свет высокой интенсивности свидетельствует о том, что облучение листьев сопровождается чрезвычайно быстрым (0.5-1 ч) изменением экспрессии miR398 в корнях, которые непосредственно не подвергались стрессорному воздействию (рис. 4). Эти данные находятся в полном соответствии с ранее установленным фактом, согласно которому не только листья, но и корни вовлекаются в формирование защитного ответа на действие UV-B облучения. Результаты экспериментов позволяют высказать предположение, согласно которому экспрессия miR398 находится под контролем сигналов межорганного действия, которые инициируются в листе и передаются в корневую систему. Изучение роли miR398 в регуляции экспрессии *CSD1* показало,

что у галофита *Th. salsuginea*, также как и у гликофита *A. thaliana*, существует обратная зависимость между экспрессией генов *CSD1* и miR398. Наиболее четко такая зависимость проявлялась при ответе растений на засоление и на различные концентрации меди, хотя подобная тенденция сохранялась и при действии UV-B облучения (рис. 4). Это свидетельствует в пользу того, что ген *CSD1* может являться одной из мишеней для miR398 как при действии засоления, так и при действии тяжелых металлов, в частности меди, на растения.

Из экспериментов по влиянию различных концентраций меди в питательной среде растений *Th. salsuginea* следует, что изменение экспрессии miR398 может зависеть от содержания меди в клетках растений и являться своего рода маркером ее доступности из питательной среды. При внесении 1 мкМ CuSO₄, то есть в 4 раза более высокой концентрации, чем в контроле (0,25 мкМ), наблюдалось снижение экспрессии miR398. Снижение экспрессии miR398 приводит к ослаблению посттранскрипционной регуляции мРНК, в 3'-НТО областях которых были обнаружены сайты связывания с miR398. В результате этого наблюдалось увеличение содержания белков CCS1 и CSD1. Галофит *Th. salsuginea* проявляет значительную устойчивость к действию тяжелых металлов. В условиях отсутствия меди у *Th. salsuginea* происходило увеличение уровня экспрессии двух обнаруженных генов Fe-СОД (данные приведены в диссертации). Возможно, это было частью компенсаторного механизма при снижении содержания белка Cu/Zn-СОД и его активности. Анализ экспрессии гена шаперона меди *CCS1* и содержания белка *CCS1* в условиях действия различных концентраций меди позволил предположить, что miR398 способна регулировать Cu/Zn-СОД не только прямо, но и косвенно через регуляцию шаперона меди, доставляющего медь к апобелкам СОД. Кроме того, в условиях отсутствия меди в питательной среде у *Th. salsuginea* наблюдается повышение уровня экспрессии гена транскрипционного фактора *SQUAMOSA proteine like-7*, содержащего мотив, связывающийся с промоторной областью генов, кодирующих miR398.

Таким образом, миРНК-RISC комплексы связываются с нетранслируемыми областями, они позволяют разобщить в пространстве и во времени синтез белка и его регуляцию. Это ускоряет реакцию растения на изменяющиеся условия внешней среды, что позволило нам составить возможную схему, описывающую механизм miR398 опосредованной регуляции Cu/Zn-СОД в условиях действия стрессоров различной

природы, а также при различных концентрациях меди в питательной среде у растений *Th. salsuginea* (рис. 9).

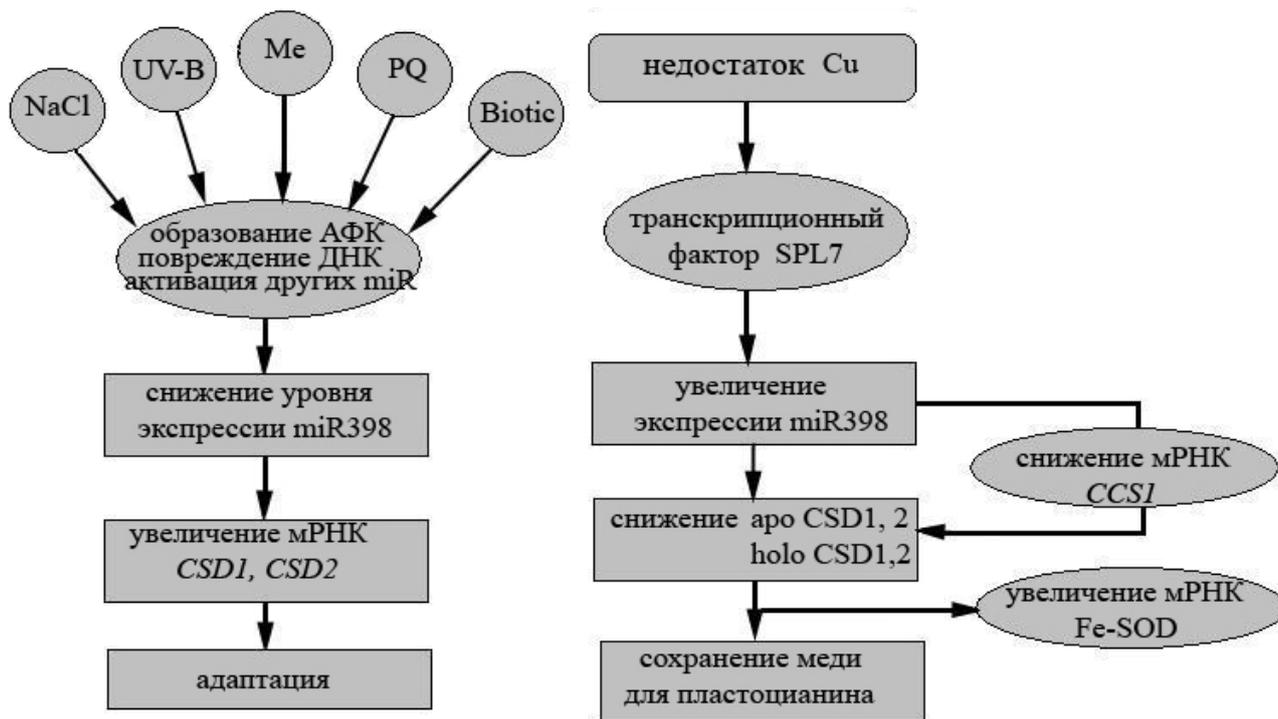


Рис. 9 Схема возможной miR398 опосредованной регуляции генов Cu/Zn-СОД в растении при стрессе.

ВЫВОДЫ

1. Установлены мишени действия miR398 в растении *Th. salsuginea*, в качестве которых выступают мРНК цитозольной Cu/Zn-СОД (*CSD1*) и мРНК шаперона меди *CCS1*, доставляющего ионы меди к апобелкам супероксиддисмутаз, имеющим цитозольную (*CSD1*), хлоропластную (*CSD2*) и пероксисомальную (*CSD3*) локализацию.

2. Продемонстрировано наличие обратной связи между интенсивностью экспрессии генов *CSD* и *CCS*, с одной стороны, и уровнем miR398 в условиях стресса, с другой, что свидетельствует о функционировании механизма посттранскрипционной регуляции экспрессии генов супероксиддисмутазы и металлошаперона меди.

3. Уровень экспрессии miR398 в растении *Th. salsuginea* определяется доступностью меди. Снижение концентрации меди в питательной среде сопровождается стимуляцией экспрессии miR398, снижением уровня мРНК цитоплазматической СОД, а также miR398 опосредованной регуляции *CCS1* и усилением экспрессии транскрипционного фактора *SPL7*.

4. miR398 опосредованная регуляция экспрессии гена *CSD1* не является орга-

носпецифичной, а экспрессия miR398 в корнях и листьях имеет обратную зависимость.

5. Совокупность полученных данных свидетельствует о наличии механизма miR398 опосредованной регуляции экспрессии стресс-зависимых генов у *Th. salsuginea* в условиях действия повреждающих абиотических факторов, а также о наличии у данной микроРНК множественных генов-мишеней, что позволяет одновременно контролировать протекание различных физиологических процессов.

СПИСОК РАБОТ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Карташов А.В., Иванов Ю.В., Пашковский П.П., Радюкина Н.Л., Кузнецов Вл.В. (2007) Исследование ранней индукции защитных систем растений подорожника большого (*Plantago major L.*) под действием NaCl. В сб: *Тезисы VI Съезда Общества физиологов растений*. Сыктывкар, с. 176 – 177.

2. Карташов А.В., Радюкина Н.Л., Пашковский П.П., Кузнецов Вл.В. (2008) Роль систем антиоксидантной защиты при адаптации дикорастущих видов растений к солевому стрессу. *Физиология растений*, **55**, 516 – 522.

3. Пашковский П.П., Рязанский С.С., Кузнецов Вл.В. (2009) Экспрессия малых РНК под действием абиотических факторов у растений *Thellungiella halophila*. В сб: *13-я Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых "Биология – наука XXI века"*, Пушкино, с. 131 – 132.

4. Пашковский П.П., Рязанский С.С., Радюкина Н.Л., Кузнецов Вл.В. (2009) Влияние абиотических факторов на экспрессию малых РНК miR398 у растений *Thellungiella halophila*. В сб: *Тезисы докладов Годичного собрания ОФР «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях крайнего севера»*, Апатиты, с. 260 – 261.

5. Иванов Ю.В., Карташов А.В., Радюкина Н.Л., Пашковский П.П., Юренков А.А. (2009) Участие пролина в защитном ответе растений на действие абиотических стрессоров. В сб: *Тезисы докладов IX Международной конференции молодых учёных «Леса Евразии – Польские леса»*, Курник (Польша), с. 181 – 184.

6. Пашковский П.П., Рязанский С.С., Кузнецов Вл.В. (2010) МикроРНК опосредованная регуляция гена цитозольной Cu/Zn-СОД у растений *Thellungiella halophila* под действием абиотических стрессов. В сб: *14-я Международная*

Пушинская школа-конференция молодых ученых "Биология – наука XXI века", Пушкино, с. 321 – 322.

7. Пашковский П.П., Рязанский С.С., Радюкина Н.Л., Гвоздев В.А., Кузнецов Вл.В. (2010) miR398 и регуляция экспрессии гена цитоплазматической Cu/Zn-СОД в растениях *Thellungiella halophila* в условиях стресса. *Физиология растений*, **57**, 707 – 714.

8. Pashkovskiy P., Ryazansky S., Kuznetsov V. (2010) Cu/Zn superoxide dismutase mRNA levels in *Thellungiella halophila* opposite correlate with expression of MIR398 under abiotic stresses. In: *Abstr. Am. Soc. Plant Biol. Can. Soc. Plant Physiol.*, № P07023, p. 98.

9. Pashkovskiy P., Ryazansky S., Radyukina N., Kuznetsov V. (2010) Expression of small microRNA MIR398 under abiotic stress in *Thellungiella halophila* plants. In: *Abstr. FESPB-2010*, p. 112.

10. Пашковский П.П., Радюкина Н.Л. (2010) МикроРНК и гены антиоксидантной защитной системы у растений *Thellungiella halophila* при стрессе. В сб: *Всероссийский симпозиум "Растение и стресс"*, Москва, с. 269 – 270.

11. Пашковский П.П. (2011) МикроРНК опосредованная регуляция мРНК шаперона меди *CCSI* и Cu/Zn СОД *CSD1, 2* в растениях *Thellungiella salsuginea*. В сб: *15-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых "Биология – наука XXI века"*. Пушкино, с. 20 – 21.

12. Парфенов И.А., Ревина Т.А., Пашковский П.П., Радюкина Н.Л., Валуева Т.А. (2011) Фрагмент гена, кодирующего белок-ингибитор химотрипсина и трипсина в картофеле. *Прикладная биохимия и микробиология*, **47**, 1 – 5.

13. Radyukina N.L., Ivanov Yu.V., Pashkovskiy P.P., Kartashov A.V., Shevyakova N.I., Kuznecov V.I. (2011) Regulation of gene expression governing proline metabolism in *Thellungiella salsuginea* by NaCl and paraquat. *Russian Journal of Plant Physiology*, **58**, 643 – 652 .