

УДК 577.2

АКТИВНОСТИ ХИМИЧЕСКИ СИНТЕЗИРОВАННОГО ПЕПТИДА, КОТОРЫЙ КОДИРУЕТСЯ РНК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОМ miR156A И КОНСЕРВАТИВЕН В РАСТЕНИЯХ СЕМЕЙСТВА Brassicaceae

© 2021 Т.Н. Ерохина¹, Д.Ю. Рязанцев¹, Л.В. Самохвалова¹, А.А. Можжев¹, А.Н. Орс¹, С.К. Завриев¹, С.Ю. Морозов^{2*}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия; электронная почта: morozov@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 25.01.2021

После доработки 03.03.2021

Принята к публикации 03.03.2021

Недавние исследования показали, что в растениях первичные транскрипты некоторых генов miRNA (pri-miRNA) способны экспрессировать короткие белки (пептиды) размером от 12–15 до 30–40 а.о. Эти пептиды, названные miPEP, могут участвовать в регуляции транскрипции собственных pri-miRNA и сохраняют биологическую активность при экзогенном введении в растения через корневую систему. Используя биоинформатический сравнительный анализ последовательностей РНК-транскриптов и геномов растений, нами ранее была обнаружена новая группа miPEP (miPEP-156a), которая кодируется первичными транскриптами pri-miR156a у нескольких десятков видов из семейства Brassicaceae. Экзогенные химически синтезированные пептиды miPEP-156a способны эффективно проникать в проростки растений через корневую систему и распространяться по растению локально и системно в листьях молодых проростков. При этом наблюдается морфологический эффект, заключающийся в ускоренном росте основного корня проростка. Параллельно наблюдается позитивный эффект на уровне экспрессии pri-miR156a. Важно, что с эффектами на морфологическом и молекулярном уровнях коррелирует способность пептида быстро проникать в ядра клеток и связываться *in vitro* как с хроматином, так и с ДНК. В настоящей работе была экспериментально установлена вторичная структура пептида и показано изменение этой структуры в комплексе с ДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: микроРНК, первичные транскрипты микроРНК, трансляция РНК-транскриптов микроРНК, короткие рамки трансляции, регуляция транскрипции, импорт белков в ядро, ДНК-связывающие пептиды.

DOI: 10.31857/S032097252105002X

ВВЕДЕНИЕ

МикроРНК (miRNA) – это короткие некодирующие одноцепочечные эндогенные РНК, которые регулируют экспрессию генов, используя специфическое расщепление и/или трансляционную репрессию целевой мРНК при комплементарном спаривании оснований [1–4]. Типичные miRNA выступают в качестве ключевых регуляторов различных процессов развития

растений и животных [5, 6]. Биогенез miRNA требует ряда хорошо скоординированных процессов, где ген miRNA сначала транскрибируется РНК-полимеразой II с образованием первичной miRNA (pri-miRNA), которая обычно имеет длину в несколько сотен или даже тысяч нуклеотидов и содержит, как и мРНК, 5'-концевую «кэп»-структуру и 3'-концевую поли(А)-последовательность [1–4, 7]. У растений pri-miRNA процессируются с образованием шпилькообразного несовершенного дуплекса (называемого предшественником miRNA (pre-miRNA)) Dicer-подобным ферментом 1 (DCL1) с участием белка HYL1 [8]. При следующем шаге процессинга с участием DCL1 у pre-miRNA отщепляется шпилечная область, что после 3'-концевого метилирования приводит к формированию зрелых miRNA, которые играют особую роль как жизненно важные регуляторы процессов развития растений, поглощения пи-

Принятые сокращения: miRNA – микроРНК; pri-miRNA – первичные транскрипты генов микроРНК; pre-miRNA – предшественник miRNA; miPEP – пептид, кодируемый первичным транскриптом генов микроРНК; ОПТ – открытая рамка трансляции; кПЦР – количественная полимеразная цепная реакция; КД – круговой дихроизм; TRAP – метод для трансляционной иммунологической очистки связанных с рибосомами РНК (translating ribosome affinity immunoprecipitation).

* Адресат для корреспонденции.

тательных веществ, а также ответа на стрессы [1–8].

В цитоплазме зрелая miRNA взаимодействует с белковым комплексом RISC, содержащим фермент Argonaute (AGO1), который связывает одну из цепей двуспиральной miRNA, и комплементарное спаривание последней с мРНК либо обеспечивает прецизионное расщепление целевой мРНК, либо ингибирует её трансляцию [1–4, 9]. Очевидно, основная роль pre-miRNA заключается в продукции регуляторных miRNA, и поэтому долгое время считалось, что это некодирующие РНК.

Таким образом, существовало общее мнение, что последовательности к 5'- и 3'-концам от шпилькообразной области pre-miRNA функционально маловажны и быстро деградируют после отщепления области pre-miRNA [10].

Однако более поздние новые методы исследований транслята растений явно указывают на трансляционную активность первичных транскриптов генов микроРНК (pri-miRNA). Чтобы облегчить захват рибосом-ассоциированной мРНК или ее фрагментов, был разработан метод для трансляционной иммунологической очистки связанных с рибосомами РНК (метод TRAP – translating ribosome affinity immunoprecipitation) [11]. При этом используется эпитоп-меченый рибосомный белок L18 (RPL18), встроенный в функциональные рибосомы в трансгенном растении *Arabidopsis thaliana*. Главное преимущество этого метода заключается в том, что уменьшается загрязнение препаратов полисом мРНК-белковыми комплексами сходной плотности, и эти препараты могут быть использованы для получения фрагментов мРНК, непосредственно связанных с рибосомами [11, 12]. TRAP-анализ показал, что в составе препаратов полисом могут быть выявлены фраг-

менты pri-miRNA, ассоциированные с рибосомами и содержащие открытые рамки трансляции (OPT) [12, 13].

Сейчас все большее число сообщений указывает на то, что действительно существуют пептиды, транслируемые на коротких OPT в 5'-проксимальных последовательностях pri-miRNA. Такие пептиды, кодируемые pri-miRNA у растений и животных, называются miPEP [10, 13–17]. В частности, ряд miPEP, синтез которых направляют короткие OPT в 5'-проксимальных последовательностях pri-miRNA, предсказан и найден у арабидопсиса (*A. thaliana*) [18], сои (*Glycine max*) [19] и арахиса (*Arachis hypogaea*) [20]. Экзогенное введение в растения синтетических пептидов через корневую систему показало, что пептиды miPEP-165a из *Arabidopsis* и miPEP-171b из *Medicago truncatula* способны активировать транскрипцию собственных pri-miRNA и ускорять развитие корней. Таким образом, формируется петля положительной обратной связи, что приводит к повышению уровня биогенеза соответствующей miRNA и изменениям в органогенезе [18, 21]. Обработка растений *M. truncatula* синтетическим пептидом miPEP-171b также повышает эндогенную экспрессию miR171b, но приводит к снижению плотности боковых корней. Этот эффект miPEP-171b был специфичным, поскольку пептид не влиял на экспрессию других miRNA. Обработка проростков *A. thaliana* и рассады винограда химически синтезированными препаратами miPEP-171c и miPEP-171d также приводила к специфическому ускорению развития корней [16]. Кроме того, недавно было показано участие miPEP-172c в контроле процесса нодуляции в корнях растений сои [19].

Ранее нами было предсказано существование коротких OPT в 5'-проксимальных последовательностях РНК-транскриптов pri-miR156a у растений рода *Brassica* (*B. napus*, *B. rapa* и *B. oleracea*) (рис. 1). Похожие короткие консервативные пептиды длиной 32–33 остатка закодированы также в геномах растений рода *Arabidopsis*, включая *A. thaliana* [22]. Используя множественные выравнивания кодирующих последовательностей микрорепептидов miPEP-156a, были идентифицированы консервативные а.о., характерные для кодируемых пептидов у многих представителей из 11 родов семейства Brassicaceae [22].

Вторичная структура и трехмерная модель miPEP-156a были предсказаны *in silico* с использованием метода I-TASSER (Iterative Threading ASSEMBly Refinement). В настоящей работе, используя синтетический пептид miPEP-156a *Brassica rapa*, были изучены биологические и ряд

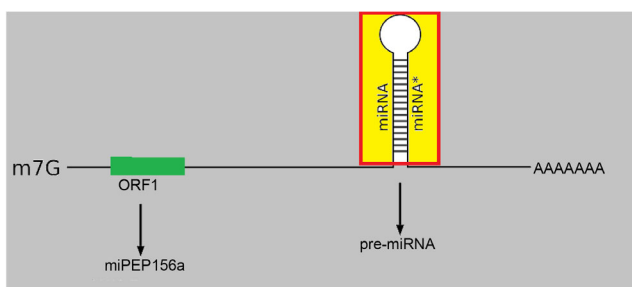


Рис. 1. Схема организации РНК-транскрипта pri-miR156a. Открытая рамка трансляции (ORF1), кодирующая пептид miPEP-156a, отмечена как зеленый прямоугольник. Шпильчатый район РНК, соответствующий pre-miR156a, отмечен жёлтым цветом. (С цветными вариантами рисунков можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

Таблица 1. Модельные пептиды, использованные в работе

Пептид	Структура
miPEP-156a	MFCSIQCLARH ^{LFPLHVR} EI ^{KKATKA} IKKDKTL
TAMRA-miPEP-156a	TAMRA-MFCSIQCLARH ^{LFPLHVR} EI ^{KKATKA} IKKDKTL
miPEP-156a (TAMRA)	MFCSIQCLAR ^H HLFPLHVR ^E I ^{KKATKA} IKKDKTL(TAMRA)

Примечание. TAMRA – остаток (5-carboxytetramethylrhodamine), TAMRA-miPEP-156a – 5-carboxytetramethylrhodamine на N-конце, miPEP-156a (TAMRA) – 5-carboxytetramethylrhodamine связан по аминок группам небольшой части лизинов и аргининов (отмечены жёлтым). Остатки, предсказанные как ДНК-связывающие, отмечены голубым. Вероятный участок сигнала ядерной локализации (NLS) подчёркнут.

биохимических свойств пептида. Более того, была экспериментально установлена вторичная структура пептида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Количественный ПЦР-анализ. Для выяснения тех этапов развития растений, когда происходит наиболее высокая экспрессия пептида miPEP-156a, были проведены эксперименты по определению уровня экспрессии РНК-предшественников для miRNA156a в проростках капусты брокколи (*Brassica oleracea* var. *italica*) и китайской капусты (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*) по сравнению с тканями взрослых растений. Семена высевали на удобренную почву и выдерживали при температуре 4 °С в течение 3-х дней перед переносом в камеру роста (0 день). Растения выращивали при температуре 22 °С под люминесцентными лампами в условиях длительного дня (16 ч свет/8 ч темнота). Растительные ткани (3–4-дневные целые проростки) измельчали в жидком азоте, и тотальную РНК экстрагировали с помощью TRIzol™ реагента («Invitrogen», США) в соответствии с инструкциями производителя. После определения концентрации 2 мкг РНК обрабатывали ДНК-азой I («Thermo Fisher Scientific», США). После подтверждения качества РНК методом агарозного гель-электрофореза с бромистым этидием, согласно сопроводительным инструкциям фирмы «Invitrogen» по выделению РНК, проводили обратную транскрипцию с d(T)18-праймера с использованием набора Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Fisher Scientific»). Полученную кДНК добавляли к смеси для проведения количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР), используя реактивы и инструкции производителя («Евроген», Россия). В качестве референсного гена использовали PEX4 (locus AT5G25760, PEROXIN4 = UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME 21) [23].

Праймеры и гидролизуемый зонд для кПЦР к консервативным участкам генов, кодирующих miR156 и PEX4 (контроль), были подобраны таким образом, чтобы была возможность амплификации мРНК как арабидопсиса, так и пекинской капусты и брокколи. Был использован следующий набор праймеров: MIR156g d(5'-СТТТСТТТATGGCTCTTGTCGCTT-3'), соответствующий консервативной последовательности на 3'-конце ОПТ miPEP-156a в родах *Brassica* и *Arabidopsis*, а также содержащий метку FAM зонд MIR156t d(5'FAM-CAGACATCTGTCCCTTTGCATGTAAGA-3') и MIR156f d(5'-AAATGTTCTGTTCAATTCAATGC-3'), который соответствует последовательности 5'-конца этой ОПТ. 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 5 пмоль зонда. Программа амплификации была одинакова и для miR156 и для PEX4: 95°С – 5 мин; 95°С – 15 сек, 60°С – 15 сек*, 72°С – 15 сек, 45 циклов (* – детекция флуоресценции в канале FAM). После обработки данных значения Cq использовали для расчёта нормализованной экспрессии в программе Q Gene [24].

Изучение влияния пептида miPEP-156a на развитие корневой системы проростков растений. Семена китайской капусты (*B. rapa* subsp. *pekinensis*) стерилизовали в 50%-ном растворе гипохлорита кальция с добавлением 0,5% (v/v) Tween 20 в течение 10 мин при помешивании, а затем шесть раз промывали стерильной дистиллированной водой. Семена проращивали и выращивали в стерильной MS-среде («Serva», Германия) с добавлением 30 г/л сахарозы. Для проращивания семена помещали в колбы (500 мл) со стерильной MS-средой и проращивали при покачивании 80 об./мин под лампой в течение 24 ч. Далее проросшие семена переносили в стерильные 6-луночные планшеты со стерильной MS-средой с добавлением или без добавления

пептида miPEP-156a в концентрации 10 мкг/мл. Для анализа корней 4–5-дневные проростки переносили на стеклянные пластины для наблюдения, измерения и фотографирования.

Получение флуоресцентно-меченных пептидов. Синтетические пептиды (табл. 1) были любезно предоставлены Игорем Ивановым (ИБХ РАН). Нами был также получен флуоресцентно-меченный пептид miPEP-156a (исходный пептид предоставлен И. Ивановым).

Для мечения был использован флуорофор TAMRA (5-carboxytetramethylrhodamine). В результате был получен пептид TAMRA-miPEP-156a. Мечение miPEP-156a проводили двумя разными способами: по N-концу и по аминокетильным группам. Для мечения пептида по аминокетильным группам 2 мг пептида растворяли в 0,1 М гидрокарбонате натрия (pH 8,2) и добавляли 1,5-кратный молярный избыток N-гидроксисукцинимидного эфира TAMRA («Lumiprobe», Россия) в ДМСО. Реакцию проводили 2 ч при комнатной температуре. После реакции пептид осаждали трихлоруксусной кислотой, осадок промывали ацетоном и растворяли в воде. Для очистки от непрореагировавшего красителя проводили обращенно-фазовую хроматографию на колонке Vydac C18 peptide («Nischrom», Великобритания) в градиенте ацетонитрила с добавлением 0,1%-ной трифторуксусной кислоты. Для получения отрицательного контроля смешивали 10 мМ раствор глицина в 0,1 М гидрокарбонатном буфере (pH 8,2) с 10 мМ раствором N-гидроксисукцинимидного эфира TAMRA. После инкубации 2 ч при комнатной температуре продукт реакции использовали без дополнительной очистки.

Мечение пептида по N-концу проводили в соответствии с работой Witus и Francis [25]. К 2 мг пептида, растворенного в 200 мкл фосфатного буфера (pH 6,0), добавляли пиридоксальфосфат («Sigma», США) до концентрации 10 мМ, и инкубировали ночь при комнатной температуре. После инкубации смесь центрифугировали 5 мин при 13 000 об./мин на центрифуге Eppendorf 5810 R («Eppendorf», Германия), и супернатант переносили в новую пробирку. Пептид осаждали 15%-ной трихлоруксусной кислотой, осадок промывали ацетоном и растворяли в воде. К раствору пептида добавляли гидразид TAMRA («Lumiprobe») до концентрации 5 мМ, и инкубировали ночь при комнатной температуре. После реакции пептид осаждали 15%-ной трихлоруксусной кислотой, осадок промывали ацетоном и растворяли в воде. Для очистки от непрореагировавшего красителя проводили обращенно-фазовую хроматографию на колонке Vydac C18 peptide («Nischrom») в

градиенте ацетонитрила (5–80%) с добавлением 0,1%-ной трифторуксусной кислоты.

Выделение ядерной фракции и получение хроматин-содержащего лизата из тканей *Brassica rapa* subsp. *pekinensis*. Для выделения ядерной фракции 1 г листьев растирали в ступке с 3 мл буфера А: 50 мМ Tris-HCl, pH 7,4; 15 мМ MgCl₂; 10 мМ KCl; 0,1% меркаптоэтанола; 20% (w/v) глицерина и 12,6 мкл Protease Inhibitor Cocktail («Sigma») и центрифугировали 10 мин при 1260 g («Eppendorf»). Осадок ресуспендировали в 0,5 мл буфера А с добавлением 3% (w/v) Triton X100. На дно пробирки наслаивали 0,8 мл 2,3 М сахарозы, сверху наносили ресуспендированный осадок и центрифугировали 10 мин при 12 000 g («Eppendorf»). Затем супернатант удаляли, а осадок промывали два раза буфером А и центрифугировали 5 мин при 12 000 g.

Для получения хроматин-содержащего лизата осадок ядер ресуспендировали в 1,5 мл буфера Б: 20 мМ HEPES, pH 7,9; 1,5 мМ MgCl₂; 0,42 М NaCl; 0,2 мМ EDTA; 25% (w/v) глицерина, содержащего 1,5 мкл 0,1 М DTT и 15 мкл Protease Inhibitor Cocktail, инкубировали при слабом покачивании 30 мин, затем центрифугировали 5 мин при 20 000 g («Eppendorf»). Супернатант переносили в чистую пробирку и диализовали против 0,1 М HEPES, pH 6,0. Отдельную фракцию супернатанта инкубировали 10 мин при 74 °С для удаления из нуклеосом гистонов H2A–H2B. После инкубации смесь снова центрифугировали 5 мин при 20 000 g, после чего осадок растворяли в 0,1 М HEPES, pH 6,0. Потерю хроматина гистонов H2A–H2B проверяли с помощью электрофореза в ПААГ [27] при сравнении с фракцией, не обработанной при 74 °С.

In silico предсказания ассоциации пептида miPEP-156a с ядром клетки и ДНК. Несмотря на интенсивные исследования взаимодействий между белками и ДНК в течение последних десятилетий, механизмы связывания и распознавания белок–ДНК остаются недостаточно изученными. Идентификация ядерных белков и потенциальных ДНК-связывающих областей таких белков является важным шагом к раскрытию функций транскрипционных факторов. На сегодняшний день в этой области широко применяются различные вычислительные методы, помогающие идентифицировать ядерные белки и предсказать возможные сайты связывания белка. В данной работе мы использовали достаточно новые гибридные алгоритмы для предсказания ядерной локализации miPEP-156a (<http://mleg.cse.sc.edu/seqNLS/index.html>) и идентификации потенциальных ДНК-связывающих остатков в этом пептиде (<https://dnabind.szilab.org/> и <http://mleg.cse.sc.edu/DNABind/>) [26].

Анализ связывания пептида с ядерной ДНК и хроматином. Для анализа связывания флуоресцентно-меченных пептидов с тотальной ядерной ДНК и хроматином из клеток китайской капусты использовали метод сдвига в агарозном геле [27].

Неспецифический ДНК-фрагмент длиной 280 п.н. представлял собой ПЦР-продукт плазмиды pUC18 из области, содержащей полилинкер. Растворы пептида и ДНК смешивали в буфере, содержащем 10 мМ HEPES pH 8,0; 50 мМ KCl; 0,1 мМ ЭДТА и 5% (w/v) глицерин, таким образом, чтобы получить молярное соотношение ДНК/пептид от 1/25 до 1/200. Эксперименты проводили также с добавлением хлорида магния до концентрации 10 мМ и с добавлением 10 мМ хлорида магния и 0,5% меркаптоэтанола. Образцы инкубировали 30 мин в холодильнике (при температуре 6 °С), смешивали с буфером для нанесения на гель и проводили электрофорез в 1,2%-ном агарозном геле. Присутствие или отсутствие 10 мМ MgCl₂ и меркаптоэтанола (0,05% и 0,5%) не оказывало влияния на образование комплекса пептид–нуклеиновая кислота. Кроме того, чтобы определить стабильность комплексов пептид–ДНК и пептид–хроматин, фрагменты тотальной ДНК из хроматинсодержащего лизата (~15 000–20 000 п.н.) или хроматина были растворены вместе с флуоресцентно-меченным пептидом (1 мкг пептида/10 нг ДНК растений) в буфере, содержащем 10 мМ HEPES pH 8,0; 50 мМ KCl; 0,1 мМ ЭДТА и 5% (w/v) глицерин. Эти смеси инкубировали 10 мин при комнатной температуре и анализировали в 0,8%-ном агарозном геле.

Изучение вторичной структуры пептида miPEP-156a и его комплексов с ДНК с помощью метода кругового дихроизма (КД). Для исследования был использован пептид miPEP-156a (концентрация 1 мг/мл или 0,259 нмоль/мл). Был приготовлен раствор пептида в воде и в растворе тотальной ДНК капусты (5 мкг/мл).

Растворы инкубировали при комнатной температуре 30 мин, а затем выполняли измерения спектров КД на спектрополяриметре J-810 («JASCO», Япония) в диапазоне 250–190 нм в кварцевой кювете толщиной 0,05 или 0,1 см при комнатной температуре. Записи спектров КД проводились с шагом 0,2 нм (скорость сканирования 20 нм/мин) и шириной оптической щели 1 нм, затем выполняли усреднение по 4-м спектрам. Для расчета вторичной структуры использовали программу CONTINLL (пакет CDPPro) и набор референсных спектров SMP56.

Изучение локализации флуоресцентно-меченого пептида miPEP-156a в клетках животных. Учитывая средство miPEP-156a к нуклеиновым

кислотам, мы провели предварительные эксперименты по изучению внутриклеточной локализации TAMRA-miPEP-156a в клетках мышинной миеломной линии Sp2/0 («Creative Biolabs», Германия). Для этого клетки рассевали в среде DMEM, дополненной 10% (v/v) фетальной бычьей сыворотки («Gibco», США), в 24-луночные планшеты, на дно которых были заранее положены круглые стерильные стекла. Клетки рассевали в такой концентрации, чтобы на следующий день они составляли 40–60% от монослоя. На следующий день в среду добавляли TAMRA-miPEP-156a (5 мкг/мл) и инкубировали в течение 2 ч в CO₂-инкубаторе («Heraeus», Германия). Через 1 ч после начала инкубации добавляли 10 мкл ядерного маркера Hoechst 33342 (0,625 мг/мл) («Thermo Fisher Scientific») и инкубировали еще час. В случае мечения клеточных мембран через 50 мин после добавления маркера Hoechst добавляли 0,2 мкл 1 мМ маркера ER-Tracker™ Green (glibenclamide BODIPY® FL) («Thermo Fisher Scientific»). Затем стекла с клетками 3 раза отмывали бессывороточной средой DMEM («Gibco»). После этого стекла извлекали из планшета и с помощью специального клея прикрепляли к предметным стеклам. Внутриклеточную локализацию меченого пептида TAMRA-miPEP-156a, маркера ER-Tracker™ Green и ядерного маркера Hoechst 33342 изучали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (CLSM).

Изучение локализации пептида miPEP-156a в клетках растений. Пептид miPEP-156a (10 мкг/мл), меченный с N-конца флуорофором TAMRA, инкубировали в МГ-буфере (10 мМ MgCl₂, 10 мМ Tris-HCl, pH 5,8) с 4-дневными проростками *B. rapa* при погружении корней в раствор пептида (23 °С в течение 18 ч). После обработки проростки трижды промывали при мягком встряхивании в течение 5 мин в МГ-буфере, обрабатывали 20 мин раствором ядерного маркера Hoechst 33342 (10 мкл на 1,5 мл буфера, концентрация маркера 0,625 мг/мл), и их корни и листья анализировали с помощью конфокального микроскопа «Nikon Eclipse TE 2000-E» («Nikon», Япония). Флуоресценция визуализировалась следующим образом: возбуждение 495 нм/эмиссия 545 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ накопления РНК-транскриптов pri-miR156a в растениях капусты и арабидопсиса. Ранее было показано, что наиболее интенсивный синтез pri-miR156a в листьях и корнях проростков арабидопсиса происходит в

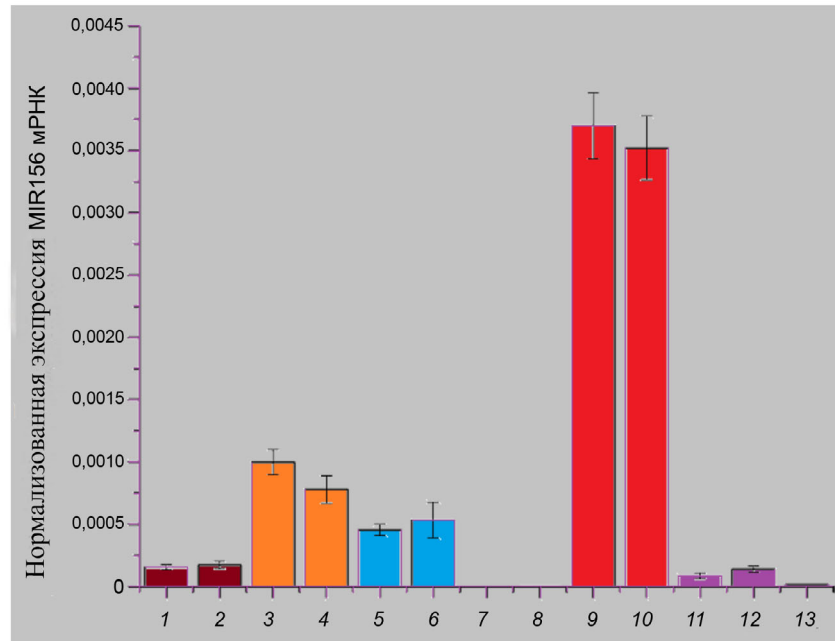


Рис. 2. Результаты кПЦР по измерению уровня экспрессии pri-miRNA156a в растениях семейства Brassicaceae. 1 – Брокколи (20-дневное растение, листья); 2 – брокколи (20-дневное растение, корень); 3 – проростки брокколи (4 дня) с добавлением пептида miPEP-156a (10 мкг/мл, выращивание при 20 °С); 4 – проростки брокколи (4 дня) с добавлением пептида (10 мкг/мл, выращивание при 24 °С); 5 – проростки брокколи (4 дня) на чашке Петри, контроль (вода, выращивание при 20 °С); 6 – проростки брокколи (4 дня) на чашке Петри, контроль (вода, выращивание при 24 °С); 7 – взрослые цветущие растения арабидопсиса (корни); 8 – взрослые цветущие растения арабидопсиса (листья); 9 – арабидопсис, проростки (4 дня при 20 °С) целиком (с корнями); 10 – арабидопсис, проростки (4 дня при 24 °С) целиком (с корнями); 11 – пекинская капуста (20-дневное растение, стебель); 12 – пекинская капуста (20-дневное растение, лист); 13 – пекинская капуста (20-дневное растение, корень). Для каждого из трех независимых повторов РНК выделяли из смеси пяти растительных проб. На рисунке указаны средние статистические значения в виде столбчатой диаграммы и стандартные отклонения. Статистическая значимость различий сумм значений в экспериментах 3 и 4 относительно экспериментов 5 и 6 составляла для этих двух выборок $p < 0,05$, согласно критерию Стьюдента (расчёт на основе программы GraphPad Prism 7.0 – <https://graphpad-prism.software.informer.com/7.0/>)

ходе прорастания между 2-м и 10-м днём при 23 °С [28, 29]. После 10-го дня экспрессия многократно падает. Мы решили сравнить динамику накопления pri-miR156a в растениях капусты брокколи и китайской капусты (*B. oleracea* var. *italica* и *B. rapa* subsp. *pekinensis*) по сравнению с растениями арабидопсиса. Для этого была выделена суммарная РНК из листьев и корней 3–4-дневных проростков, а также цветущих растений, и проведен кПЦР-анализ с использованием препарата кДНК, полученного с помощью олиго(дТ)-затравки (рис. 2). Ранее такого рода сравнительные исследования для растений капусты не проводили.

Оказалось, что онтогенетическая корреляция возраста растений и накопления pri-miR156a сходна в листьях и корнях разных растений семейства Brassicaceae. Накопление pri-miR156a в проростках многократно выше, чем у цветущих растений (рис. 2). Следовательно, можно предположить, что наиболее эффективный синтез miPEP-156a в растениях происходит на ранних стадиях онтогенеза.

Биоинформатический анализ транслятома арабидопсиса. Ранее исследователями был поднят вопрос о том, с помощью каких подходов можно апробировать реальную экспрессию потенциальных miPEP в растениях [30]. Например, miPEP-165a арабидопсиса и ряд других пептидов не были обнаружены с помощью масс-спектрометрии [18, 31], хотя TRAP-анализ показал, что в составе препаратов полисом могут быть выявлены фрагменты pri-miRNA, кодирующие эти пептиды [12]. В наших предварительных экспериментах попытки выявить miPEP-156a в проростках арабидопсиса методами масс-спектрометрии и иммунопреципитации с помощью поликлональных антител также не дали положительного результата (данные не приведены). Таким образом, чтобы получить хотя бы косвенные доказательства трансляционной активности ОПТ для miPEP-156a в 5'-концевой области pri-miR156a в растениях вплоть до получения эффективных моноклональных антител, мы провели биоинформатический BLASTn-анализ последовательностей РНК в транслятоме

арабидопсиса на базе архива NCBI SRA (SRA, short read assembly).

Ген арабидопсиса pri-miR156a (AT2G25095) расположен на хромосоме 2 и состоит из 3108 п.н. Этот ген содержит 4 экзона и 3 интрона. Последовательность pre-miR156a расположена в экзоне 2, а ОПТ miPEP-156a — в экзоне 1 (рис. 1). В качестве якорных последовательностей в BLASTn-анализе была взята область ОПТ miPEP-156a и аналогичная по размеру область экзона 4. В ходе анализа данных ряда TRAP-экспериментов мы выявили наличие ОПТ miPEP-156a в рибосом-связанных фрагментах РНК из флоэмы корней проростков (NCBI accessions SRX3204187, SRX3204194, SRX3204195, SRX3204199 [32]), хотя последовательности 3'-концевого экзона 4 среди рибосом-связанных сегментов не обнаружены. Аналогичные результаты получены для экзона 2 и 3. Таким образом, мы получили косвенные доказательства того, что 5'-концевая ОПТ на РНК pri-miR156 подвергается трансляции, по крайней мере, в корнях проростков *A. thaliana*. Кроме того, эти данные указывают, что в цитоплазме клетки, видимо, транслируется не полноразмерная РНК pri-miR156a, а лишь её 5'-концевая область после процессинга.

Влияние пептида miPEP-156a на развитие корней у проростков растений. Поскольку известно, что экзогенное введение miPEP-156a через корни арабидопсиса влияет на накопление зрелой miRNA165a путём усиления транскрипции её РНК-предшественника, и это, в свою очередь, увеличивает скорость развития корней проростков [18], мы предположили, что экзогенное применение miPEP-156a также может влиять на раз-

витие корневой системы молодых растений капусты. Чтобы проверить, является ли miPEP-156a китайской капусты (*B. rapa* subsp. *pekinensis*) физиологически активным, её семена проращивали на питательной среде для растений, дополненной синтетическим пептидом в концентрации 10 мкг/мл. Оказалось, что длина основного (первичного) корня 5-дневных проростков, выращенных на среде, дополненной экзогенным miPEP-156a, увеличивалась по сравнению с контролем (водный раствор солей) (рис. 3).

Полученное увеличение в длине корней сопоставимо с эффектом, который описан в литературе для проростков арабидопсиса, сверхэкспрессирующих miR165a [29]. При этом проростки с повышенной экспрессией miR165a имели более длинные первичные корни, чем дикий тип (увеличение длины составляло ~20%). Наоборот, в условиях подавления синтеза miR165a развивались более короткие первичные корни, чем у дикого типа [29].

Таким образом, литературные данные позволили нам выдвинуть гипотезу, что miPEP-156a играет какую-то роль в усилении накопления miR156 и, опосредованно, в росте первичных корней у капусты. Это аналогично эффекту miPEP-156a арабидопсиса на рост первичных корней и усилению накопления соответствующей miRNA [18]. Действительно, прямое измерение количества pri-miRNA156a в проростках брокколи, прорастающих в присутствии пептида, выявило явное (хотя и достаточно умеренное) увеличение концентрации этой РНК в растениях (рис. 2).

Изучение локализации пептида miPEP-156a в проростках растений. Наличие физиологическо-



Рис. 3. Типичный фенотип при проращивании семян капусты (длина корня) в присутствии и при отсутствии miPEP-156a. Верхний ряд — проращивание без miPEP-156a, среднее квадратичное отклонение для 50 растений — $1,2 \pm 0,19$ см; нижний ряд — проращивание с добавлением miPEP-156a (10 мкг/мл), среднее квадратичное отклонение для 50 растений — $4,3 \pm 0,79$ см. Так как выборки не имели нормального распределения, статистический анализ проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. При выявленном уровне значимости $p < 0,05$ средние значения для контроля и эксперимента считаются достоверно различными (расчёт по программе OriginPro 6.0)

го эффекта экзогенного *miPEP-156a* на рост растений указывает на его способность проникать в ткани проростков. Ранее такой эффект был детально изучен на примере *miPEP-165a* арабидопсиса [33]. В опубликованном исследовании использовался пептид, меченный флуоресцентным красителем на базе флуоресцеина. Было показано, что в 7-дневных проростках арабидопсиса меченый пептид в течение 2 ч инкубации активно проникает в корневую чехлик и корневую меристему. При этом для проникновения в другие части корня требуется больше времени. Установлено, что при этом задействованы два механизма – первичная пассивная диффузия пептида с последующим процессом эндоцитоза [33]. Важно, что в ходе этих процессов *miPEP-165a* не может проникнуть в центральный цилиндр корня, не попадает во флоэму и, следовательно, не мигрирует от корней в верхнюю часть растения. Эти данные могут указывать, что экзогенные *miPEP* не могут оказывать системного эффекта на растение в целом [33].

Однако наши эксперименты с проникновением *miPEP-156a* в проростки капусты выявили

заметно отличающуюся картину. После 18-часовой инкубации с TAMRA-*miPEP-156a* (табл. 1) было показано, что весьма малые количества пептида локализуются в корне проростков. При этом наблюдается лишь мечение ядер сильно удлинённых клеток в центральном цилиндре корня (предположительно, клетки флоэмной паренхимы и клетки-спутницы) (рис. 4, а). Микроскопический анализ листьев проростков показал, что в отличие от *miPEP-165a*, наиболее интенсивное накопление TAMRA-*miPEP-156a* наблюдается в листьях проростков. Причем накопление пептида явно выше в областях листа вблизи жилок, что указывает на его транспорт по флоэме из корней в верхнюю часть проростка. В клетках, где накапливается достаточно большое количество пептида, наблюдается его концентрация вблизи и внутри ядра (рис. 4, б). Сравнение наших данных с теми, что представлены в литературе ранее [33] (см. выше), явно указывает на различия в проникновении в растения пептидов с разной первичной структурой, что, возможно, обусловлено особенностями их функционирования при эндогенной экспрессии.

Изучение локализации пептида *miPEP-156a* в клетках животных. Наблюдаемая нами локализация TAMRA-*miPEP-156a* в ядрах клеток растений капусты, что не было выявлено в случае *miPEP-165a* в арабидопсисе [33], указывает на способность пептида *miPEP-156a* к ядерно-цитоплазматическому транспорту. Механизмы такого транспорта весьма консервативны у растений и животных [34, 35]. Поэтому в качестве объекта для контроля эффективности ядерного импорта пептида *miPEP-156a* мы выбрали клетки мышей миломной линии Sp2/0. Клетки инкубировали с TAMRA-*miPEP-156a* в течение 2 ч, отмывали и анализировали с помощью конфокального микроскопа. Предварительная окраска клеток ядерным маркером Hoechst 33342 и маркерным флуорофором, окрашивающим эндоплазматический ретикулум, показала, что ядро клетки занимает большую часть её объема и имеется лишь достаточно тонкий слой цитоплазмы, примыкающий к плазматической мембране (рис. 5, а и б).

При визуализации проникновения в клетки флуоресцирующего пептида и Hoechst 33342 стало очевидно, что пептид полностью импортируется в ядро и вообще не наблюдается в цитоплазме клетки при разных уровнях увеличения (рис. 6, а и б). Такой результат, очевидно, свидетельствует в пользу активного транспорта пептида в ядро и не может быть объяснен лишь за счет его пассивной диффузии через ядерные поры.

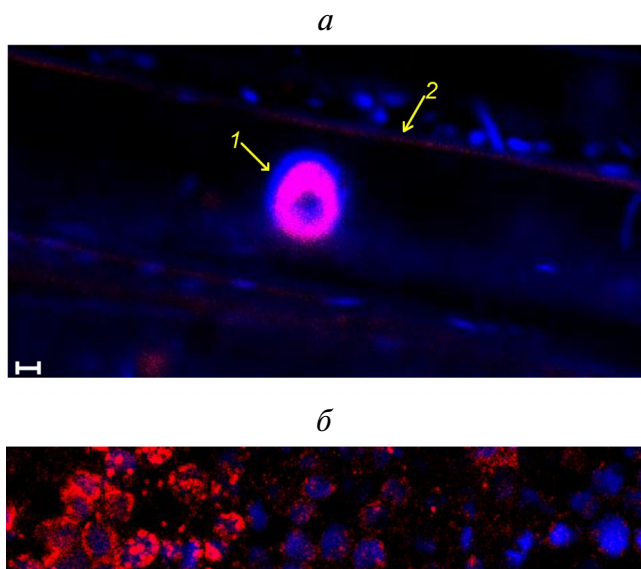


Рис. 4. Внутриклеточная локализация специфических маркеров в клетках капусты. а – Конфокальная микроскопия клетки-спутницы из корня проростка капусты, инкубированного в присутствии флуоресцирующего пептида TAMRA-*miPEP-156a* (красный). Окраска ядер с помощью Hoechst 33342 (синий). Левая часть рисунка соответствует клеткам мезофилла в части листа вблизи центральной жилки, 1 – ядро, 2 – стенка клетки-спутницы. Масштабная линейка – 1 мкм. б – Конфокальная микроскопия участка корня проростка капусты, инкубированного в присутствии флуоресцирующего пептида TAMRA-*miPEP-156a* (красный). Окраска ядер с помощью Hoechst 33342 (синий). Левая часть рисунка соответствует клеткам части листа вблизи центральной жилки. Масштабная линейка – 1 мкм

Действительно, результаты анализа *in silico* первичной структуры miPEP-156a позволили выдвинуть гипотезу о том, что последовательность пептида несет положительно-заряженный

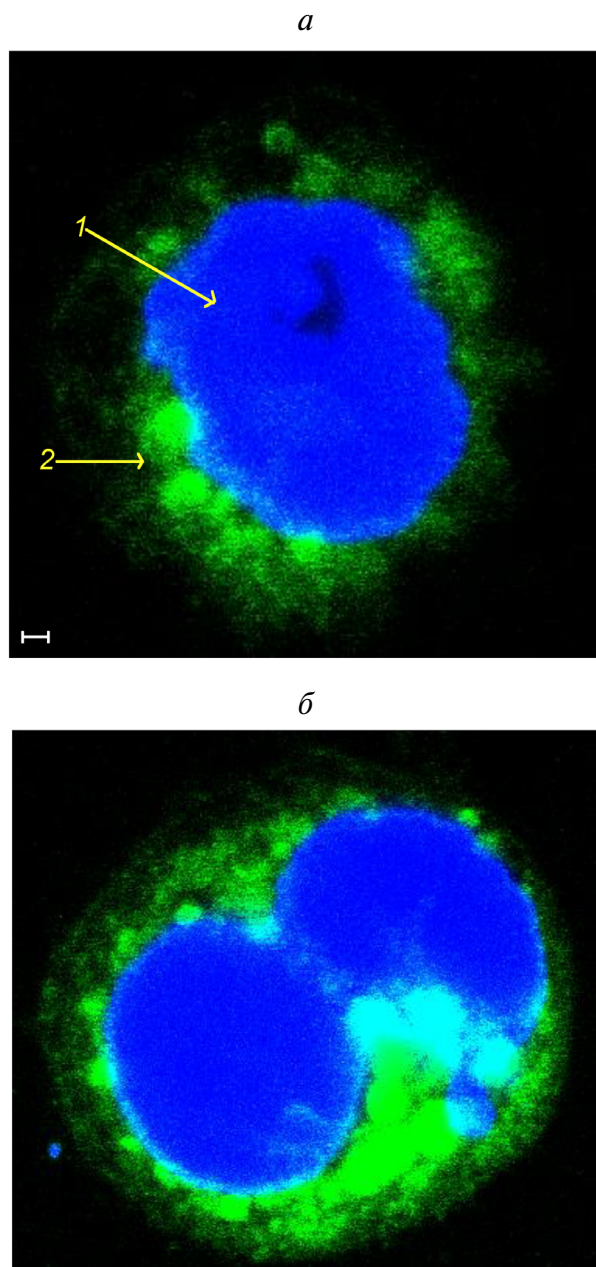


Рис. 5. Внутриклеточная локализация специфических маркеров в клетках мышиной миеломной линии Sp2/0. *а* – Конфокальная микроскопия клетки мышиной миеломной линии Sp2/0. Окраска Hoechst 33342 (синий) – ядро и маркером ER-Tracker™ Green – эндоплазматический ретикулум. 1 – Ядро, 2 – цитоплазма. Масштабная линейка – 1 мкм. *б* – Конфокальная микроскопия делящейся клетки мышиной миеломной линии Sp2/0. Окраска Hoechst 33342 (синий) – ядро и маркером ER-Tracker™ Green – эндоплазматический ретикулум. Масштабная линейка – 1 мкм

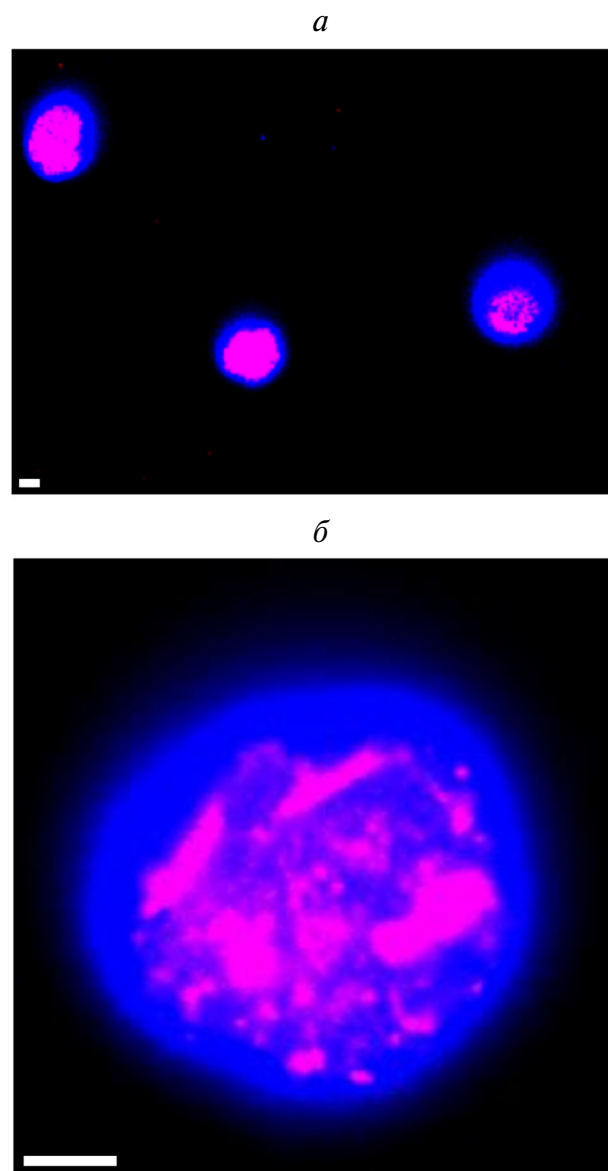


Рис. 6. Проникновение в клетки мышиной миеломной линии Sp2/0 флуоресцирующего пептида и Hoechst 33342. *а* – Конфокальная микроскопия клеток мышиной миеломной линии Sp2/0, инкубированных в присутствии флуоресцирующего пептида TAMRA-miPEP-156a (красный). Окраска Hoechst 33342 (синий) – ядро. Масштабная линейка – 250 нм. *б* – Конфокальная микроскопия клетки мышиной миеломной линии Sp2/0 после инкубации с флуоресцирующим пептидом TAMRA-miPEP-156a (красный). Окраска Hoechst 33342 (синий) – ядро. Масштабная линейка – 1 мкм

сегмент ККАТКАИККDK, который включает сигнал ядерной локализации (NLS) (<http://mleg.cse.sc.edu/seqNLS/index.html>) [34, 35] (табл. 1). В частности, этот сегмент содержит участок 28–31 (KKDK), близкий по структуре последовательности KKKGK, которая отвечает за ядерную локализацию фермента фруктозо-

1,6-бисфосфатаза в клетках животных, где показано, что целостность мотива имеет решающее значение для ядерной локализации фермента [36].

Связывания пептида miPEP-156a с ядерной ДНК и хроматином растений. Эффективная концентрация miPEP-156a в ядрах клеток животных и растений может свидетельствовать в пользу его активного связывания с хроматином за счет белок-белковых и/или ДНК-белковых взаимодействий. Действительно, использование компьютерных предсказаний на базе алгоритмов (<https://dnabind.szilab.org/>) и (<http://mleg.cse.sc.edu/DNABind/>) [26] показало, что пептид потенциально взаимодействует с ДНК с вероятностью ~99%, и в этот процесс потенциально могут быть вовлечены 10 а.о. (табл. 1).

Для экспериментальной проверки предсказаний мы использовали связывание флуоресцентно-меченного пептида *in vitro* с хроматином и тотальной ДНК капусты (рис. 7, а). «Мономерный строительный блок» хроматина, нуклеосома, содержит ~150 п.н. ДНК, обернутых вокруг гистонового октамера, состоящего из 4-х основных гистонов – H2A, H2B, H3 и H4 [37]. Довольно давно установлено, что для изменений в структуре хроматина, необходимых для эффективного связывания многих транскрипционных факторов и активации транскрипции генов, часто требуется удаление димеров H2A–H2B из нуклеосомы. Причём, как правило, при ремоделировании нуклеосомного октамера гистонов димер H2A–H2B более легко вытесняется, чем H3 и H4 [38]. При этом *in vivo* вытеснение димера H2A–H2B из области промоторов обычно осуществляют специальные ядерные факторы транскрипции (факторы «первопроходчики» – pioneer transcription factors), которые часто структурно принимают трехмерную укладку аналогично основным гистонам H2A и H2B [39]. Можно предположить, что если miPEP-156a функционально сходен с miPEP-165a, о чем свидетельствуют наши косвенные данные, то он должен взаимодействовать с хроматином наподобие транскрипционных факторов. Учитывая, что данные *in vitro* указывают на прямую конкуренцию за связывание с промоторами между транскрипционными факторами и димером H2A–H2B [40], мы использовали *in vitro* 2 типа препаратов хроматина капусты – исходный («нативный хроматин») и хроматин, подвергшийся температурной обработке при 74 °С. Известно, что такая обработка приводит к вытеснению димера H2A–H2B, но сохраняет в нуклеосомах H3 и H4 [41]. Оказалось, что эффективность связывания miPEP-156a с хроматином многократно возросла после температурной

обработки (рис. 7, а). Таким образом, данные результаты косвенно подтверждают предположение, что miPEP-156a, подобно miPEP-165a арабидопсиса, может модулировать транскрипционную активность генов, взаимодействуя с модифицированным хроматином.

Кроме того, мы проверили способность miPEP-156a взаимодействовать с изолированной ДНК растений. Использование метода сдвига подвижности в агарозном геле подтвердило предсказание, что пептид обладает способностью связывать не только ДНП-комплекс хроматина, но и ДНК растений, и неспецифический фрагмент ДНК. При этом в высоких концентрациях пептид покрывает, видимо, значительную часть длины молекул ДНК, т.к. подвижность комплекса значительно снижается (рис. 7, б и в).

Изучение вторичной структуры пептида miPEP-156a и его комплексов с ДНК. Среди белков, участвующих в регуляции транскрипции, значительная доля взаимодействует с хроматином путем распознавания специфических последовательностей ДНК как с помощью различных высокоупорядоченных ДНК-связывающих доменов, так и через внутренне неупорядоченные области (IDR – intrinsically disordered regions). IDR являются белковыми доменами, которые не имеют стабильной трехмерной структуры в физиологических условиях [42]. Многие IDR принимают четко определенную конформацию при взаимодействии с молекулами-мишенями. Значительное количество таких белков взаимодействуют с хроматином [43, 44]. При этом связывание и модификация хроматина может происходить независимым от специфической нуклеотидной последовательности образом [45].

Недавно специфическое взаимодействие ДНК-связывающего пептида с модельными ДНК было изучено на примере транскрипционного фактора GCN4 [46]. Мы обратили внимание, что мономерный пептид на базе GCN4, включающий 34 а.о., сам по себе не был способен связываться со специфической дсДНК. Лишь его димер, образованный через цистеиновые остатки, сохраняет способность к специфическому распознаванию консенсусных ДНК последовательностей, что, очевидно, указывает на димеризацию, как на существенную предпосылку образования комплекса пептид–ДНК. Для пептида GCN4 было показано, что при связывании с ДНК неупорядоченные элементы могут претерпевать структурные переходы, приводящие к формированию четко определенной конформации, стабильной в связанном состоянии [47]. Это процесс называется сопряженным складыванием, когда в белке происходит пере-

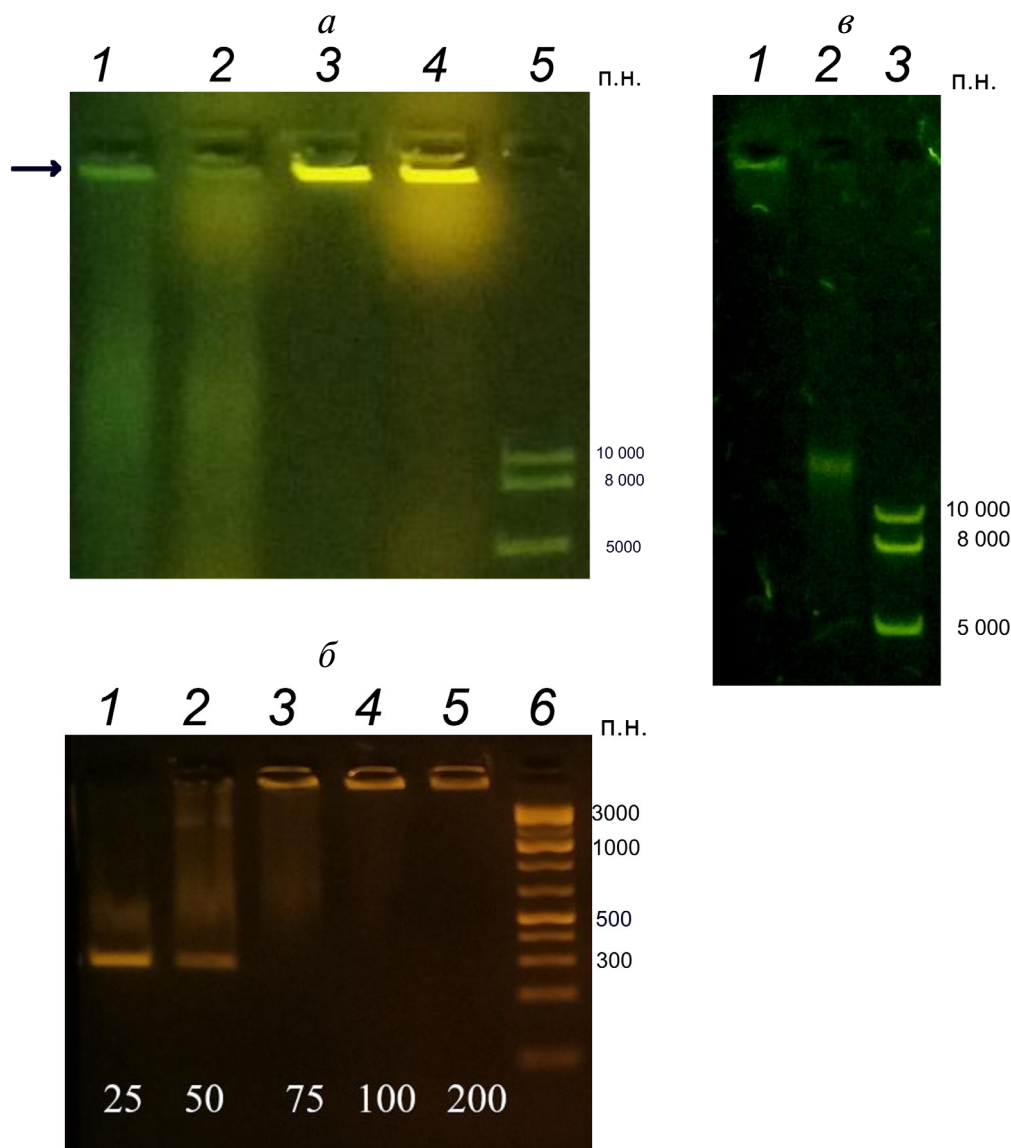


Рис. 7. Выявление комплексов пептид–ДНК после связывания флуоресцентно-меченного пептида *in vitro*. *а* – Выявление комплексов пептид–хроматин в 0,8%-ном агарозном геле после связывания флуоресцентного пептида TAMRA-miPEP-156a и хроматина капусты. 1 – Нативный хроматин с TAMRA-miPEP-156a; 2 – нативный хроматин с miPEP-156a (TAMRA); 3 – хроматин, подвергшийся температурной обработке (74 °С), с TAMRA-miPEP-156a; 4 – хроматин, подвергшийся температурной обработке (74 °С), с miPEP-156a (TAMRA); 5 – маркерная ДНК (10 000, 8000, 5000 п.н.). Стрелка указывает положение хроматина при отсутствии пептида. *б* – Выявление комплексов пептид–ДНК в 1,5%-ном агарозном геле после связывания пептида miPEP-156a и неспецифического фрагмента ДНК. Молярное соотношение пептид/ДНК – 25/1 (1), 50/1 (2), 75/1 (3), 100/1 (4), 200/1 (5), маркерная ДНК (6) включает и короткие ДНК-фрагменты – снизу вверх 100, 200, 300, 400, 500 п.н.). *в* – Выявление комплексов пептид–ДНК в 0,8%-ном агарозном геле после связывания флуоресцентного пептида TAMRA-miPEP-156a и ДНК капусты. 1 – ДНК капусты с TAMRA-miPEP-156a; 2 – ДНК капусты (контроль); 3 – маркерная ДНК (10 000, 8000, 5000 п.н.)

ход от неупорядоченной конформации к частично упорядоченной при взаимодействии аминокислот с гидрофобными связующими карманами ДНК [48].

Интересно, что miPEP-156a, имеющий длину 33 остатка, содержит 2 цистеина и потенциально способен к образованию димеров и тетрамеров [22]. Учитывая формальное сходство пеп-

тида GCN4 и miPEP-156a, мы экспериментально изучили вторичную структуру растительного пептида в свободном состоянии и в комплексе с ДНК капусты. Всего было проведено по 6 независимых измерений в двух повторах (см. «Материалы и методы», табл. 2).

Существует обратно пропорциональная зависимость между количеством бета-структур и

Таблица 2. Данные кругового дихроизма модельного пептида и комплекса с ДНК

Образец	Альфа-спираль, %	Бета-структура, %	Поворот, %	Неупорядоченная конформация, %	NRMSD*
1	6,9 + 0,5	28,5 + 0,9	22,4 + 0,5	41,2 + 0,8	0,043
2	5,5 + 0,9	37,4 + 2,2	23,0 + 0,7	33,9 + 1,9	0,06

Примечание. 1 – свободный пептид, 2 – комплекс с ДНК.

* Оптимальное значение NRMSD (normalized root-mean-square deviation) в расчётах должно быть < 0,1.

интенсивностью отрицательного сигнала при 200 нм в спектре КД *miPER-156a*, отличающая его от пептида *GCN4* (рис. 8). В случае *GCN4*, который сильно неупорядочен при отсутствии дсДНК, резко увеличивается его сворачивание в альфа-спираль в комплексе с ДНК [46]. Однако у *miPER-156a* происходит возрастание количества бета-структур, когда он взаимодействует с ДНК (табл. 2). Важно, что у обоих пептидов после образования комплекса с ДНК заметно снижается процент неупорядоченных участков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени, кроме найденного нами *miPER-156a* в семействе *Brassicaceae*, есть данные о нескольких других пептидах *miPER* у растений. Это *miPER-165a* и *miPER-858* из *A. Thaliana* [18, 49], *miPER-171b* из *M. truncatula* и *miPER-172c* из *G. Max* [19, 21], а также *vv-miPER-171d1* из *Vitis vinifera* [16]. В нашей работе выявлены некоторые общие с перечисленными выше пептидами особенности функционирования *miPER-156a*: во-первых, все пептиды способны при экзогенном воздействии на проростки растений изменять их фенотип, что выражается в общем позитивном эффекте на рост первичных корней; во-вторых, обработка син-

тетическими пептидами показывает, что микропротеины способны активировать транскрипцию собственных *rgi-miRNA*, направляющих их трансляцию. Однако мы наблюдали и новые эффекты, не описанные в опубликованных исследованиях. В частности, доставка пептида через корневую систему проростков в случае *miPER-156a* приводит к эффективному транспорту его в листья, тогда как в случае *miPER-165a* арабидопсиса выявлена полная задержка пептида в корнях, а именно в эпидермисе и перicycle, но не во флоэме. Пептид *miPER-156a*, наоборот, наблюдался нами только в отдельных клетках флоэмы корня, что, по-видимому, согласуется с его быстрым транспортом в листья проростков. Полностью за рамками исследования в опубликованных работах осталась способность пептидов *miPER* взаимодействовать с ДНК и транспортироваться в ядро. Таким образом, следует отметить, что наши исследования выявили новый спектр активности пептидов *miPER* при их экзогенном применении, что согласуется с их предполагаемыми функциями в транскрипционной регуляции. Полученные нами данные для экзогенных пептидов, несомненно, помогут следующему этапу работы, связанному с изучением тканевой локализации и активности эндогенного *miPER-156a* в растениях капусты и арабидопсиса.

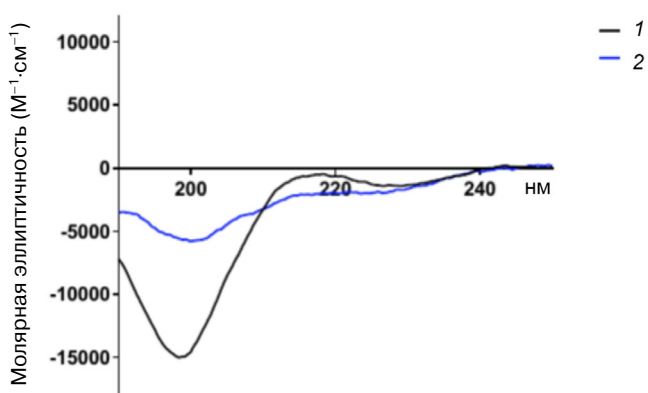


Рис. 8. Типичные спектры КД пептида *miPER-156a* (1) и его комплекса с ДНК (2)

Финансирование. Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-00174-а).

Благодарности. Авторы благодарят Игнатову Анастасию Александровну (ИБХ РАН) за помощь в экспериментах по измерению вторичной структуры пептида с помощью метода кругового дихроизма.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wang, J., Mei, J., and Ren, G. (2019) Plant microRNAs: biogenesis, homeostasis, and degradation, *Front. Plant Sci.*, **10**, 1-12, doi: 10.3389/fpls.2019.00360.
- Bartel, D. P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, **116**, 281-297, doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.
- Rogers, K., and Chen, X. (2013) Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs, *Plant Cell*, **25**, 2383-2399, doi: 10.1105/tpc.113.113159.
- Yu, Y., Jia, T., and Chen, X. (2017) The 'how' and 'where' of plant microRNAs, *New Phytol.*, **216**, 1002-1017, doi: 10.1111/nph.14834.
- Song, X., Li, Y., Cao, X., and Qi, Y. (2019) MicroRNAs and their regulatory roles in plant-environment interactions, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **70**, 489-525, doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-100334.
- Liu, H., Yu, H., Tang, G., and Huang, T. (2018) Small but powerful: function of microRNAs in plant development, *Plant Cell Rep.*, **37**, 515-528, doi: 10.1007/s00299-017-2246-5.
- Budak, H., and Akpinar, B. A. (2015) Plant miRNAs: biogenesis, organization and origins, *Funct. Integr. Genomics*, **15**, 523-531, doi: 10.1007/s10142-015-0451-2.
- Fukudome, A., and Fukuhara, T. (2017) Plant dicer-like proteins: double-stranded RNA-cleaving enzymes for small RNA biogenesis, *J. Plant Res.*, **130**, 33-44, doi: 10.1007/s10265-016-0877-1.
- Zhang, H., Xia, R., Meyers, B. C., and Walbot, V. (2015) Evolution, functions, and mysteries of plant ARGONAUTE proteins, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **27**, 84-90, doi: 10.1016/j.pbi.2015.06.011.
- Tavormina, P., De Coninck, B., Nikonorova, N., De Smet, I., and Cammue, B. P. (2015) The plant peptidome: an expanding repertoire of structural features and biological functions, *Plant Cell*, **27**, 2095-2118, doi: 10.1105/tpc.15.00440.
- Zanetti, M. E., Chang, I. F., Gong, F., Galbraith, D. W., and Bailey-Serres, J. (2005) Immunopurification of polyribosomal complexes of Arabidopsis for global analysis of gene expression, *Plant Physiol.*, **138**, 624-635, doi: 10.1104/pp.105.059477.
- Juntawong, P., Girke, T., Bazin, J., and Bailey-Serres, J. (2014) Translational dynamics revealed by genome-wide profiling of ribosome footprints in Arabidopsis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, E203-212, doi: 10.1073/pnas.1317811111.
- Zhu, S., Wang, J., He, Y., Meng, N., and Yan, G.-R. (2018) Peptides/proteins encoded by non-coding RNA: a novel resource bank for drug targets and biomarkers, *Front. Pharmacol.*, **9**, 1295, doi: 10.3389/fphar.2018.01295.
- Hellens, R. P., Brown, C. M., Chisnall, M. A. W., Waterhouse, P. M., and Macknight, R. C. (2016) The emerging world of small ORFs, *Trends Plant Sci.*, **21**, 317-328, doi: 10.1016/j.tplants.2015.11.005.
- Li, L. J., Leng, R. X., Fan, Y. G., Pan, H. F., and Ye, D. Q. (2017) Translation of noncoding RNAs: focus on lncRNAs, pri-miRNAs, and circRNAs, *Exp. Cell Res.*, **361**, 1-8, doi: 10.1016/j.yexcr.2017.10.010.
- Chen, Q. J., Deng, B. H., Gao, J., Zhao, Z. Y., Chen, Z. L., et al. (2020) A miRNA-encoded small peptide, vvi-miPEP171d1, regulates adventitious root formation, *Plant Physiol.*, **183**, 656-670, doi: 10.1104/pp.20.00197.
- Yeasmin, F., Yada, T., and Akimitsu, N. (2018) Micropeptides encoded in transcripts previously identified as long noncoding RNAs: a new chapter in transcriptomics and proteomics, *Front. Genet.*, **9**, 144, doi: 10.3389/fgene.2018.00144.
- Lauressergues, D., Couzigou, J. M., Clemente, H. S., Martinez, Y., Dunand, C., et al. (2015) Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides, *Nature*, **520**, 90-93, doi: 10.1038/nature14346.
- Couzigou, J. M., André, O., Guillotin, B., Alexandre, M., Combiere, J. P. (2016) Use of microRNA-encoded peptide miPEP172c to stimulate nodulation in soybean, *New Phytol.*, **211**, 379-381, doi: 10.1111/nph.13991.
- Ram, M. K., Mukherjee, K., and Pandey, D. M. (2019) Identification of miRNA, their targets and miPEPs in peanut (*Arachis hypogaea* L.), *Comput. Biol. Chem.*, **83**, 107100, doi: 10.1016/j.compbiolchem.2019.107100.
- Couzigou, J. M., Lauressergues, D., Bécard, G., and Combiere, J. P. (2015) miRNA-encoded peptides (miPEPs): a new tool to analyze the roles of miRNAs in plant biology, *RNA Biol.*, **12**, 1178-1180, doi: 10.1080/15476286.2015.1094601.
- Morozov, S. Y., Ryazantsev, D. Y., and Erokhina, T. N. (2019) Bioinformatics analysis of the novel conserved micropeptides encoded by the plants of family Brassicaceae, *J. Bioinform. Syst. Biol.*, **2**, 066-077, doi: 10.26502/jbsb.5107009.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K., and Scheible, W. R. (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis, *Plant Physiol.*, **139**, 5-17, doi: 10.1104/pp.105.063743.
- Simon, P. (2003) Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data, *Bioinformatics*, **19**, 1439-1440, doi: 10.1093/bioinformatics/btg157.
- Witus, L. S., and Francis, M. (2010) Site-specific protein bioconjugation via a pyridoxal 5'-phosphate-mediated N-terminal transamination reaction, *Curr. Protoc. Chem. Biol.*, **2**, 125-134, doi: 10.1002/9780470559277.ch100018.
- Liu, R., and Hu, J. (2013) DNABind: a hybrid algorithm for DNA-binding residue prediction by combining machine learning and template-based approaches, *Proteins Struct. Funct. Bioinform.*, **81**, 1888-1899, doi: 10.1002/prot.24330.
- Rakitina, D. V., Taliatsky, M., Brown, J. W. S., and Kalinina, N. O. (2011) Two RNA-binding sites in plant fibrillar protein provide interactions with various RNA substrates, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 8869-8880, doi: 10.1093/nar/gkr594.
- Kim, W., Kim, H. E., Jun, A. R., Jung, M. G., Jin, S., et al. (2016) Structural determinants of miR156a precursor processing in temperature-responsive flowering in Arabidopsis, *J. Exp. Bot.*, **67**, 4659-4670, doi: 10.1093/jxb/erw248.
- Yu, N., Niu, Q. W., Ng, K. H., and Chua, N. H. (2015) The role of miR156/SPLs modules in Arabidopsis lateral root development, *Plant J.*, **83**, 673-685, doi: 10.1111/tpj.12919.
- Lv, S., Pan, L., and Wang, G. (2016) Commentary: primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides, *Front Plant Sci.*, **22**, 1436, doi: 10.3389/fpls.2016.01436.
- Shahin-Kaleybar, B., Niazi, A., Afsharifar, A., Nematzadeh, G., Yousefi, R., et al. (2020) Isolation of cysteine-rich peptides from *Citrullus colocynthis*, *Biomolecules*, **10**, E1326, doi: 10.3390/biom10091326.
- Brosnan, C. A., Sarazin, A., Lim, P., Bologna, N. G., Hirsch-Hoffmann, M., and Voinnet, O. (2019) Genome-scale, single-cell-type resolution of microRNA activities within a whole plant organ, *EMBO J.*, **38**, e100754, doi: 10.15252/embj.2018100754.
- Ormancey, M., Le Ru, A., Duboé, C., Jin, H., Thuleau, P., et al. (2020) Internalization of miPEP165a into Arabidopsis roots depends on both passive diffusion and endocytosis-associated processes, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2266, doi: 10.3390/ijms21072266.

34. Sorokin, A. V., Kim, E. R., Ovchinnikov, L. P. (2007) Nucleocytoplasmic transport of proteins, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1439-1457, doi: 10.1134/s0006297907130032.
35. Merkle, T. (2011) Nucleo-cytoplasmic transport of proteins and RNA in plants, *Plant Cell Rep.*, **30**, 153-176, doi: 10.1007/s00299-010-0928-3.
36. Gizak, A., Maciaszyk-Dziubinska, E., Jurowicz, M., and Rakus, D. (2009) Muscle FBPase is targeted to nucleus by its 203-KKKGK-207 sequence, *Proteins*, **77**, 262-267, doi: 10.1002/prot.22506.
37. Lanctot, C., Cheutin, T., Cremer, M., Cavalli, G., and Cremer, T. (2007) Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions, *Nat. Rev. Genet.*, **8**, 104-115, doi: 10.1038/nrg2041.
38. Bennetzen, M. V., Larsen, D. H., Bunkenborg, J., Bartek, J., Lukas, J., and Andersen, J. S. (2010) Site-specific phosphorylation dynamics of the nuclear proteome during the DNA damage response, *Mol. Cell. Proteomics*, **9**, 1314-1323, doi: 10.1074/mcp.M900616-MCP200.
39. Lai, X., Verhage, L., Hugouvieux, V., and Zubieta, C. (2018) Pioneer factors in animals and plants-colonizing chromatin for gene regulation, *Molecules*, **23**, 1914-1936, doi: 10.3390/molecules23081914.
40. Lone, I. N., Shukla, M. S., Charles Richard, J. L., Peshev, Z. Y., Dimitrov, S., et al. (2013) Binding of NF- κ B to nucleosomes: effect of translational positioning, nucleosome remodeling and linker histone H1, *PLoS Genet.*, **9**, e1003830, doi: 10.1371/journal.pgen.1003830.
41. Horikoshi, N., Kujirai, T., Sato, K., Kimura, H., and Kurumizaka, H. (2019) Structure-based design of an H2A.Z.1 mutant stabilizing a nucleosome *in vitro* and *in vivo*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **515**, 719-724, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.06.012.
42. Van der Lee, R., Buljan, M., Lang, B., Weatheritt, R. J., Daughdrill, G. W., et al. (2014) Classification of intrinsically disordered regions and proteins, *Chem. Rev.*, **114**, 6589-6631, doi: 10.1021/cr400525m.
43. Peng, Z., and Kurgan, L. (2015) High-throughput prediction of RNA, DNA and protein binding regions mediated by intrinsic disorder, *Nucleic Acids Res.*, **43**, e121, doi: 10.1093/nar/gkv585.
44. Wang, C., Uversky, V. N., and Kurgan, L. (2016) Disordered nucleome: Abundance of intrinsic disorder in the DNA- and RNA-binding proteins in 1121 species from Eukaryota, Bacteria and Archaea, *Proteomics*, **16**, 1486-1498, doi: 10.1002/pmic.201500177.
45. Sabari, B. R., Dall'Agnesse, A., Boija, A., Klein, I. A., Coffey, E. L., et al. (2018) Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control, *Science*, **361**, earr3958, doi: 10.1126/science.aar3958.
46. Quirolo, Z. B., Sequeira, M. A., Martins, J. C., and Doderio, V. I. (2019) Sequence-specific DNA binding by noncovalent peptide – azocyclodextrin dimer complex as a suitable model for conformational fuzziness, *Molecules*, **24**, 2508-2528, doi: 10.3390/molecules24132508.
47. Miskei, M., Gregus, A., Sharma, R., Duro, N., Zsolyomi, F., and Fuxreiter, M. (2017) Fuzziness enables context dependence protein interactions, *FEBS Lett.*, **591**, 2682-2695, doi: 10.1002/1873-3468.12762.
48. Wright, P. E., and Dyson, H. J. (2009) Linking folding and binding, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **19**, 31-38, doi: 10.1016/j.sbi.2008.12.003.
49. Sharma, A., Badola, P. K., Bhatia, C., Sharma, D., and Trivedi, P. K. (2020) Primary transcript of miR858 encodes regulatory peptide and controls flavonoid biosynthesis and development in *Arabidopsis*, *Nat. Plants*, **6**, 1262-1274, doi: 10.1038/s41477-020-00769-x.

ACTIVITIES OF CHEMICALLY SYNTHESIZED PEPTIDE ENCODED BY THE miR156A PRECURSOR AND CONSERVED IN THE Brassicaceae FAMILY PLANTS

T. N. Erokhina¹, D. Y. Ryazantsev¹, L. V. Samokhvalova¹, A. A. Mozhaev¹,
A. N. Orsa¹, S. K. Zavriev¹, and S. Y. Morozov^{2*}

¹ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; E-mail: morozov@belozersky.msu.ru

It was recently found that the primary transcripts of some microRNA genes (pri-miRNAs) are able to express peptides with 12 to 40 residues in length. These peptides, called miPEPs, participate in the transcriptional regulation of their own pri-miRNAs. In our previous studies, we used bioinformatic approach for comparative analysis of pri-miRNA sequences in plant genomes to identify a new group of miPEPs (miPEP-156a peptides) encoded by pri-miR156a in several dozen species of the Brassicaceae family. Exogenous miPEP-156a peptides could efficiently penetrate into the plant seedlings through the root system and spread systemically to the leaves. The peptides produced moderate morphological effect accelerating primary root growth. In parallel, the miPEP-156a peptides upregulated expression of their own pri-miR156a. Importantly, the observed effects at both morphological and molecular levels correlated with the peptide ability to quickly translocate into the cell nucleus and to bind chromatin. In this work, we established secondary structure of the miPEP-156a and demonstrated its changes induced by formation of the peptide complex with DNA.

Keywords: microRNA, primary transcripts of microRNA, translation of the microRNA primary transcripts, short open reading frames, transcription regulation, protein import into nucleus, DNA-binding peptides