

УДК 577.1

П.П. Пашковский¹, Н.Л. Радюкина²

¹Российский университет дружбы народов (г. Москва)

²Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (г. Москва)

МИКРОРНК И РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ Cu/Zn-СОД В РАСТЕНИИ *Thellungiella salsuginea* ПРИ ДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ МЕДИ

Исследования поддержаны грантами ФЦП Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг. (ГК № 14.740.11.0728, № 14.740.12.0820).

Материалы опубликованы в рамках проекта ФЦП «Организационно-техническое обеспечение проведения Международной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (ГК № 14.741.12.0153).

*Исследование посвящено изучению роли микроРНК в посттранскрипционной регуляции генов Cu/Zn-СОД и гена CCS в растении *Thellungiella salsuginea* при действии различных концентраций меди. Объектом исследований являлись растения *Thellungiella salsuginea*. Оценку содержания белка CSD1 и CCS1 проводили с помощью вестерн-блот анализа, уровень экспрессии других генов проводили методом ОТ-ПЦР с ген-специфичными праймерами. Показано, что в зависимости от концентрации меди в питательной среде в растениях прослеживается реципрокный характер взаимоотношений между экспрессией miR398 и экспрессией генов CSD1 CCS1. Сделано предположение, что повышенное содержание меди в питательной среде ингибирует процессинг белка Cu/Zn-СОД за счет нарушения структуры активного центра ионами меди.*

Ключевые слова: тяжелые металлы; медь; микроРНК; супероксиддисмутаза.

Введение

Одним из важных элементов посттранскрипционной регуляции активности генов является механизм умолкания генов, обусловленный РНК-интерференцией, который связан с экспрессией малых РНК.

В растениях *Arabidopsis thaliana* L. было обнаружено два основных класса малых РНК размером 21–23 нк., участвующих в подавлении экспрессии генов: small interfering РНК и микроРНК [1]. Все больше появляется данных о том, что в условиях стресса изменяется как экспрессия миРНК, так и экспрессия мРНК – генов мишеней, а также активность миРНК-белковых комплексов.

Цель настоящих исследований заключалась в изучении роли микроРНК в посттранскрипционной регуляции генов *Cu/Zn-СОД* и гена *CCS* в растении *Thellungiella salsuginea* при действии различных концентраций меди, учитывая то, что медь является эссенциальным микроэлементом для питания растений и входит в состав кофакторов пластоцианина, *Cu/Zn-СОД*, цитохрома С и лакказы.

Материалы и методики исследования

Объектом исследований являлись растения *Thellungiella salsuginea*, Pallas, выращенные в водной культуре на среде Джонсона, в камере фитотрона. В возрасте 6 недель растения разделяли на группы и подвергали обработке CuSO_4 (0; 1 и 100 мкМ). Эксперименты проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях.

Выделение тотальной РНК осуществляли с реактивом TRIZOL™. Уровень экспрессии микроРНК оценивали методом Нозерн-блот гибридизации. Оценку содержания белка *CSD1* и *CCS1* проводили с помощью вестерн-блот анализа по стандартной методике Laemmli (1970). Уровень экспрессии других исследованных генов проводили методом ОТ-ПЦР с ген-специфичными праймерами.

Результаты исследования и обсуждение

В ряде работ показано, что в условиях недостатка меди отмечалось снижение содержания белка Cu/Zn-COD и его ферментативной активности. 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-COD [4].

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 экспериментах с отсутствием меди в питательной среде наблюдали увеличение экспрессии *miR398* (рис. 1, 2).

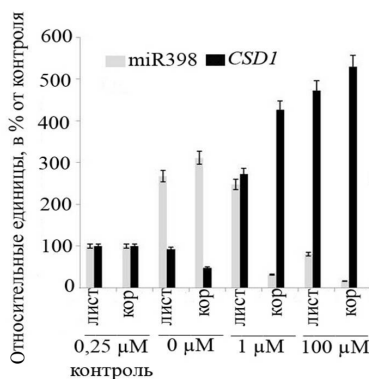


Рис. 1. Влияние различных концентраций CuSO_4 на уровень экспрессии *miR398* и *CSD1* через 24 ч, выраженных в относительных единицах

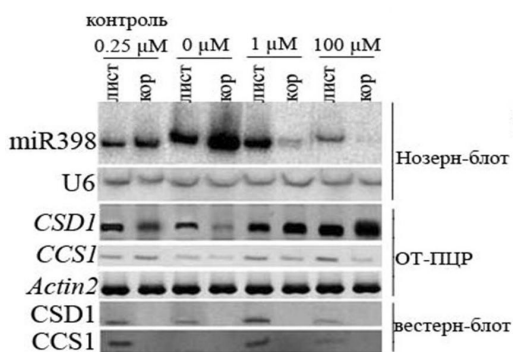


Рис. 2. Влияние различных концентраций CuSO_4 на уровень экспрессии *miR398* (Нозерн-блот) и *CSD1* (ОТ-ПЦР) через 24 ч

Исследование экспрессии гена *CSD1* показало, что через 24 ч отсутствия меди в питательной среде вызывало снижение экспрессии этого гена. При концентрации меди 100 мкМ во всех частях растений *Th. salsuginea* наблюда-

лось 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.

Это свидетельствует 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 *CCS1* 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 *CCS1* обнаруживался только в листьях у контрольных растений (0,25 мкМ CuSO_4), а также при внесении 1 мкМ CuSO_4 в питательную среду. В условиях различной концентрации меди в питательной среде в растениях прослеживается реципрокный характер взаимоотношений между экспрессией *miR398* и экспрессией генов *CSD1* *CCS1*. Можно предположить, что в условиях различной концентрации меди в питательной среде наблюдается *miR398* опосредованная регуляция генов *CSD1* и *CCS1*. Можно сделать предположение, что повышенное содержание меди в питательной среде ингибирует процессинг белка Cu/Zn-СОД за счет нарушения структуры активного центра ионами меди.

Возможно также, что увеличение *miR398* обусловленной регуляции мРНК *CCS1* 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 медьсодержащими белками, например, такими, как пластоцианин.

Заключение

Продемонстрировано наличие обратной связи между интенсивностью экспрессии генов *CSD* и *CCS*, с одной стороны, и уровнем *miR398* в условиях воздействия различных концентраций меди – с другой, что свидетельствует о функционировании механизма посттранскрипционной регуляции экспрессии генов супероксиддисмутазы и металлошаперона меди. 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*. Совокупность полученных данных свидетельствует о наличии механизма *miR398* опосредованной регуляции экспрессии стресс-зависимых генов у *Th. salsuginea* в условиях действия различных концентраций CuSO_4 , а также о наличии у данной микроРНК множественных генов-мишеней, что позволяет одновременно контролировать протекание различных физиологических процессов.

Литература

1. Jones L., Hamilton A.J., Voinnet O., Thomas C.L., Maule A.J., Baulcombe D.C. RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing // *The Plant cell*. 1999. Vol. 11. P. 2291–2301.
2. Vionnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs // *Cell*. 2009. Vol. 136. P. 669–687.
3. Leung A.K., Sharp P.A. MicroRNA functions in stress responses. Review // *Molecular Cell*. 2010. Vol. 40. P. 205–215.
4. Beauclair L., Yu A., Bouche N. microRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in Arabidopsis // *The Plant Journal*. 2010. Vol. 62. P. 454–462.

Поступила в редакцию 05.07.2011 г.

Pavel P. Pashkovskiy¹, Natalya L. Raduykina²

¹People's Friendship University of Russia, Moscow, Russia

²K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

**MICRORNA AND REGULATION OF GENE EXPRESSION OF Cu/Zn-SOD
IN *Thellungiella salsuginea* PLANTS UNDER EFFECT OF THE DIFFERENT
CONCENTRATIONS OF COPPER**

One of the important element of posttranscriptional regulation of gene activity is a mechanism for silencing genes, due to RNA interference, which is associated with expression of small RNAs. In *Arabidopsis thaliana* L. plants found two major classes of small RNAs in size 21–23 base pair involved in the suppression of gene expression: siRNA (small interfering) and miRNA (microRNA). There is increasing evidence that under stress conditions changes as the expression of miRNA and expression of they targets genes and the activity of miRNA-protein complexes.

The purpose of present study was to examine the role of microRNAs in posttranscriptional regulation of genes Cu/Zn-SOD and CCS gene in a plant *Thellungiella salsuginea* under the influence of different concentrations of copper, given that copper is a trace element essential for plant nutrition and is a member of the cofactors of plastocyanin, Cu/Zn-SOD, cytochrome c and laccase. Object of research is plants *Thellungiella salsuginea*, Pallas were grown in water culture in a medium of Johnson. At the age of 6 weeks the plants were divided into groups and subjected to treatment CuSO₄ (0,1 and 100 μM). Experiments were performed in three biological and three analytical replications.

Isolation of total RNA was performed TRIzol[®] reagent. Level of expression of miRNAs was assessed by Northern blot hybridization. Evaluation of protein content CSD1 and CCS1 performed using Western blot analysis by standard methods Laemmli (1970). The level of expression of genes other studied was performed by RT-PCR with gene-specific primers.

Several studies have shown that in the conditions of a copper lack decrease content of the protein Cu/Zn-SOD and its enzymatic activity. It was also shown that in *A. thaliana* and other higher plants, various concentrations of copper regulate expression of mRNA CCS1, encoding a chaperone copper, delivering Cu to apoprotein different isoenzymes of Cu/Zn-SOD.

As have shown Nozern-blot hybridization of total RNA *Th. salsuginea*, at entering 100 μM CuSO₄ in a nutrient medium occurred almost full inhibition of an expression miR398. In experiments with absence of copper in a nutrient medium observed increase expression of miR398.

The study of CSD1 expression showed that after 24 hours absence of copper in the growth medium caused a decrease expression of this gene. When the copper concentration was 100 μM in all parts of the plant *Th. salsuginea* observed increase in mRNA CSD1. However, western blot analysis with specific forms for the cytosolic Cu/Zn-SOD antibody revealed that this protein was determined only in the leaves of plants at all studied concentrations of copper in the medium. This give evidence that the synthesis of the protein may be exercised only in the leaves. At high concentrations of copper (100 μM) in the leaves was shown enhance of CSD1 expression, however, increase of the protein content CSD1 didn't happened. On the other hand, the study of gene expression CCS1 copper chaperone for SOD in leaves and roots showed that the amount of mRNA of this gene increased in the leaves at a concentration of CuSO_4 1 and 100 μM , in the absence of copper as expression of this gene significantly decreased in the leaves and roots. CCS1 protein found only in the leaves in the control plants (0,25 μM CuSO_4), as well as 1 μM CuSO_4 in the nutrient medium. In terms of different concentrations of copper in the growth medium of plants observed reciprocal relationship between the expression of miR398 and genes expression CSD1 and CCS1. We can assume that under conditions of different concentrations of copper in the growth medium, there is a miR398-mediated regulation of genes CSD1 and CCS1. It is likely that the increase due to miR398 regulation of mRNA CCS1 in the absence of copper in the growth medium reduces the number of copper delivered to the protein CSD1 and, consequently, reduced its contents in the leaves. Probably, in the absence of copper in the nutrient medium may be coming redistribution of copper ions between Cu/Zn-SOD and copper-containing proteins other important, for example, such as plastocyanin.

Key word: heavy metal, copper, microRNA, superoxide dismutase.

Received July 5, 2011