

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА МИКРОРНК775А ВО ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛАХ ИЗ ЛИСТЬЕВ КУКУРУЗЫ

Д.Н. Федорин, А.Е. Хомутова, А.Т. Епринцев

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 19.01.2024 г.

Аннотация. Стресс, связанный с низким содержанием кислорода (гипоксия) и обусловленный таким природным явлениям, как заболачивание, приводит к запуску каскада адаптивных реакций у растений. Изменения путей клеточного метаболизма могут регулироваться микроРНК, которые представляют класс малых некодирующих РНК, имеющих длину от 18 до 25 нуклеотидов и встречающихся в большинстве эукариотических организмов. Важную роль микроРНК могут играть в эпигенетических механизмах регуляции генома, включая метилирование ДНК, модификацию РНК, в том числе при посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. Для возможности оценки количества микроРНК775А был разработан специфический зонд для количественной оценки зрелой микроРНК на основе 44 нуклеотидов, представляющий собой вариант «стебель-петля». 70-нуклеотидная кДНК второй цепи miR-N1, формируемая при проведении обратной транскрипции позволяет провести количественную оценку свободной микроРНК775А методом ПЦР в реальном времени. В условиях гипоксии изменение количества микроРНК775А может служить подтверждением её участия в механизмах контроля альтернативного дыхания у растений. Также выяснено, что микроРНК775А действует по пути РНК-интерференции, связываясь с комплексом RISC, и посттранскрипционно взаимодействует с комплементарной ей мРНК. За внеклеточный транспорт микроРНК в растительном организме отвечают везикулы, формируемые на основе плазмолеммы. Применение метода дифференциального ультрацентрифугирования позволило выделить из листьев кукурузы две фракции везикул: Р40 и Р100. Анализ размеров везикул при микроскопировании позволил установить, что в фракции Р40 преобладают более крупные везикулы, размер которых составляет от 0,170 до 0,658 нм, в то время как данный показатель для везикул фракции Р100 составлял от 0,087 до 0,147 мкм. На основании данных количественной ПЦР с кДНК, полученной из зеленых листьев кукурузы, и специфических праймеров, показано, что микроРНК775А обнаружена только во внеклеточных везикулах фракции Р100. Следовательно, именно везикулы фракции Р100 осуществляют внеклеточный транспорт микроРНК775А в листьях кукурузы.

Ключевые слова: кукуруза, микроРНК, везикулы, полимеразная цепная реакция, гипоксия

Гипоксические условия, в том числе вызванные заболачиванием, являются основной причиной снижения урожайности сельскохозяйственных культур [1]. Наиболее зависимым от уровня кислорода клеточным процессом является митохондриальное дыхание, поэтому изменения при гипоксии этого метаболического механизма вызывают особый интерес [2].

Оказываясь в гипоксических условиях, клетки организмов реагируют на недостаток кислорода и применяют стратегии выживания, начиная от регуляции генов и заканчивая морфологическими адаптивными реакциями. В животной клетке за восприятие низкого содержания кислорода отве-

чает фактор, индуцируемый гипоксией (HIF-1), а у растений эта молекулярная активность контролируется Cys-веткой N-концевого пути [3].

Большое количество работ посвящено исследованию механизмов контроля стресс-зависимых генов, как посредством транскрипционных факторов (ТФ), так и микроРНК [4, 5, 6]. МикроРНК представляют эндогенные малые некодирующие РНК, которые подавляют экспрессию генов-мишеней на посттранскрипционном уровне. Ранее было показано участие многих микроРНК в клеточном ответе на гипоксию: микроРНК164 взаимодействует с ORE1, регулирующей гены SAG [7], микроРНК159 в корнях кукурузы регулирует гены MYB33 и MYB101 [8], микроРНК166 отвечает за высвобождение кальция и накопления

АФК во время роста и развития корней [6]. Также показано, что микроРНК775, которая нацелена на *GALT9*, индуцируется гипоксическими условиями, вызванными наводнением или большой высотой у *Arabidopsis* [9]. Однако механизм регуляции, опосредованный микроРНК775 при гипоксии, ещё предстоит понять.

Гипоксически-зависимые микроРНК участвуют во многих процессах, включая адаптивные реакции на стресс путем подавления соответствующих генов-мишеней, кодирующих регуляторные и функциональные белки [10]. Участие микроРНК в реакции растений на гипоксию было дополнительно подтверждено в экспериментах с химическим ингибированием митохондриального дыхания и, следовательно, имитацией гипоксии [11].

В промоторной части микроРНК775А были обнаружены три ARE и один ATCTA элемента. ARE и ATCTA присутствуют в промоторе Alcohol Dehydrogenase1, гене, реагирующем на гипоксию. Присутствие трех мотивов ARE, один из которых находится в непосредственной близости от TSS, позволило предположить сильное влияние этого мотива на управление промотором микроРНК775. Также в разных линиях *Arabidopsis* (WT, MIR775OXP и целевого мутанта), обнаружилось, что в MIR775OXP и мутанте по алкогольдегидрогеназе, по сравнению с WT, накапливается в больших количествах перекись водорода. Это позволяет предположить, что сниженный уровень гена-мишени как в мутанте по алкогольдегидрогеназе, так и в MIR775OXP способствует накоплению перекиси водорода в ответ на гипоксию [12].

Кроме этого, анализ промоторов 12 микроРНК, реагирующих на гипоксию, в том числе и микроРНК775А, выявил наличие в них большого количества HDZip I мотивов (ATHB1 и ATHB-5). Известно, что HDZip I связываются с ДНК в форме гомо- или гетеродимеров, и могут выступать в роли транскрипционных факторов. Многие гены HDZip I отвечают за ответные реакции на стресс: засуху, изменения светового режима, гипоксия, экстремальные температуры и т.д. Анализ генов HDZip I, связанных с гипоксией, показал, что 10 из них негативно регулируют транскрипцию, а 2 – положительно [10]. Таким образом, можно предположить, что HDZip I выступает в качестве транскрипционного фактора микроРНК775, участвующей в ответных реакциях растений на гипоксию.

Передача сигналов посредством РНК контролирует регуляцию генов, индуцированную гипок-

сией, у *Arabidopsis* при участии ARGONAUTE1 (AGO1) с AGO4-зависимым путем РНК-направленного метилирования ДНК [13]. Было обнаружено, что малые РНК представляют собой самостоятельную мобильную единицу, и их механизмы перемещения между клетками отличаются от механизмов перемещения белков [14]. Показано, что внеклеточные везикулы содержали 10 семейств микроРНК, что характеризует данные липидные структуры как механизм транспорта малых некодирующих РНК [15]. Поскольку транспорт везикул тесно связан с общими путями передачи сигнала, такими как путь фосфоинозитидкиназы, и находится под влиянием основных растительных гормонов, таких как абсцизовая кислота и ауксин, механизм транспорта везикул обладает потенциалом регулировать реакцию растений на различные стрессовые факторы окружающей среды [16].

В связи с этим целью данной работы была идентификация микроРНК775А и анализ ее внутривезикулярного содержания в листьях кукурузы при гипоксии.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования в работе использовали листья 14-дневной кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская 76, выращенные гидропонным методом при 14 часовом световом дне с интенсивностью света $90 \text{ мкмоль квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, при температуре окружающей среды 25°C .

Действие низких концентраций кислорода в среде осуществлялось путем помещения растений с предварительно удаленной корневой системой на 24 часа в вакуум-эксикатор, в который подавался азот. В качестве контрольной группы использовались растения с предварительно удаленной корневой системой, помещенные в вакуум-эксикатор в условиях нормальной аэрации. Для исключения влияния фотосинтетической системы обе группы растений предварительно экспонировались в темноте в течение 24 часов до проведения эксперимента. На протяжении всего времени эксперимента растения также находились в условиях отсутствия источников света [17]. Выделение суммарной РНК из растительных образцов осуществляли методом гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформной экстракции. В качестве осадителя использовали LiCl [18].

Обратную транскрипцию мРНК проводили с использованием обратной транскриптазы M-MuLV (СибЭнзим, Россия) согласно инструкции производителя.

Для получения кДНК анализируемой микроРНК проводили обратную транскрипцию со специфическим разработанным зондом для микроРНК775А. Параметры проведения обратной транскрипции следующие: инкубация смеси при 16°C - 30 мин, 42°C - 30 мин, 85°C - 5 мин [19].

Полимеразную цепную реакцию с генспецифичными праймерами проводили с помощью набора реактивов AmpliSence (Хеликон, Россия). Референсным геном выступал ген фактора элонгации EF-1 α [20]. Нуклеотидный состав праймеров микроРНК 775А: прямой - 5'-САСТГАТТСТГАТГТСТАГ-3'; обратный - 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'. Параметры амплификации были следующие: предварительная денатурация - 95°C 5 минут, цикл - 95°C - 30 сек., 58°C - 30 сек., 72°C - 30 сек. (детекция), финальная элонгация - 72°C - 10 минут.

Применяли программное обеспечение Opticon Monitor™ Software (Bio-Rad, США) для установления относительного уровня транскриптов генов на основе 2^{- $\Delta\Delta C_t$} – метода [21].

Выделение растительных внеклеточных везикул осуществляли с помощью метода дифференциального ультрацентрифугирования. Из растительного материала массой 0,5 г осуществляли сбор чистой апопластической жидкости путем вакуумной инфльтрации и центрифугирования при 900 g. Выделение из апопластической жидкости двух фракций везикул производили последовательными этапами низкоскоростного центрифугирования при 2000 g и 10000 g с дальнейшим высокоскоростным ультрацентрифугированием при 40000 g и 100000 g на приборе Beckman LB50 (Beckman, США) [22].

Визуализацию внеклеточных везикул после разделения на фракции Р40 и Р100 осуществляли с помощью метода микроскопирования на приборе Olympus CX41 (Olympus, Япония) с увеличением 1000 \times .

Количественную оценку содержания нуклеиновых кислот в образцах, выделенных из фракций везикул Р40 и Р100, и их чистоту осуществляли спектрофотометрически на приборе NanoPhotometer C40 (Implen, Германия).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ПЦР в реальном времени является золотым стандартом для количественной оценки экспрессии генов [20]. Праймеры олигонуклеотидов «стебель-петля» потенциально могут использоваться для мультиплексных реакций обратной

транскрипции и клонирования малых РНК для большей эффективности и специфичности. Конструкция олигонуклеотидов «стебель-петля» способна специфически обратно транскрибировать только выбранную зрелую микроРНК, которая впоследствии амплифицируется с помощью ПЦР в реальном времени [23]. Типичный праймер для обратной транскрипции (ОТ) «стебель-петля» включает 5–8-нуклеотидную последовательность 3'-элемента, комплементарную 3'-концу зрелой микроРНК, последовательность стебля и петли, которая также содержит универсальный 3'-сайт праймирования для последующего ПЦР-РВ.

Схема разработки зонда для количественной оценки микроРНК775А включает следующие этапы [19]:

Последовательность интересующей мкРНК:

5'-uucgaugucuagcagugcca-3'

Для увеличения размера ПЦР-продукта, необходимого для его количественной оценки методом ПЦР в реальном времени, использовали последовательность из 44 нуклеотидов, представляющую собой вариант «стебель-петля», 5'-gtcgtatccagtcagggtccgaggtattcgactggatcacgac-3' (Kramer, 2011) с комплементом из шести 3'-нуклеотидов (рис. 1). Эта шестинуклеотидная последовательность (выделено серым) представляет собой последовательность зрелой микроРНК, что является праймером обратной транскрипции «стебель-петля» микроРНК775А:

5'-gtcgtatccagtcagggtccgaggtattcgactggatcacgacggcac-3'

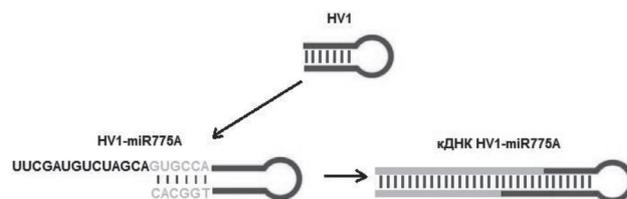


Рис. 1. Схема разработки зонда типа «стебель-петля» для оценки количества свободной микроРНК775А методом полимеразной цепной реакции. HSV1 - последовательность из 44 нуклеотидов вируса простого герпеса, представляющая собой вариант «стебель-петля». miR775А - микроРНК775А кукурузы.

Прямой праймер для ПЦР в реальном времени должен максимально перекрывать зрелую последовательность микроРНК, для этого за основу берется первые 12 нуклеотидов 5'-конца зрелой микроРНК и 6 дополнительных 5'-нуклеотидов (выделено серым), выбранных для полу-

чения температуры отжига праймеров близкой к 60°C. Полученная последовательность является прямым праймером для проведения ПЦР в реальном времени:

5'-cactgattcgcgatgctctag-3'

При разработке обратного праймера для проведения ПЦР в реальном времени в качестве основы использовали одну и ту же последовательность «стебель-петля» из 44 нуклеотидов. Последовательность обратного праймера представляет собой:

5'-gtgcagggtccgaggt-3'

Длина зонда, применяемого при проведении ПЦР в реальном времени строго ограничена, так как более половины длины микроРНК покрыта прямым праймером. Температура плавления зонда должна быть близка к 70°C, а его длина может составлять от 12 до 17 нуклеотидов. Связующее вещество малой бороздки (MGB), которое конъюгировано с зондом, важно для увеличения T_m более короткой последовательности. При разработке этого зонда полезно предусмотреть конечные прямые и обратные нити продукта ПЦР.

После добавления к базовому зонду из 44 нуклеотидов последовательности обратного праймера для кПЦР, к 3'-концу последовательности стебельной петли добавили 20-нуклеотидный комплемент микроРНК, что увеличило размер целевого продукта амплификации до 64 нуклеотидов.

После этого добавили шесть 5'-концевых нуклеотидов прямого праймера для ПЦР-РВ к 5'-концу полученного ранее зонда. Результатом формирования специфического зонда для количественной оценки зрелой микроРНК775А с помощью ПЦР в реальном времени является 70-нуклеотидная кДНК второй цепи miR-HSV1, формируемая при проведении обратной транскрипции. Разработанный зонд охватывает соединение последовательности зрелой микроРНК-стебель-петля, не перекрывает прямой праймер и максимально удлиняется для увеличения своей температуры плавления:

5'-gtcgtatccagtcgcagggtccgaggtattcgcactggatccagctggcasc-3'

Проведенный ПЦР-анализ с кДНК, полученной на основании разработанного зонда для микроРНК775А позволил установить наличие в клетках листьев кукурузы свободной микроРНК775А. Результаты амплификации свидетельствуют о присутствии одного ампликона, что указывает на специфичность как зонда «стебель-

петля», разработанного для микроРНК775А, так и праймеров ее идентификации. Размер ампликона, определенный на основе качественного электрофоретического исследования в 1% агарозном геле в присутствии маркеров для ДНК, соотносится с теоретическими данными, рассчитанными при подборе праймеров (рис. 2).

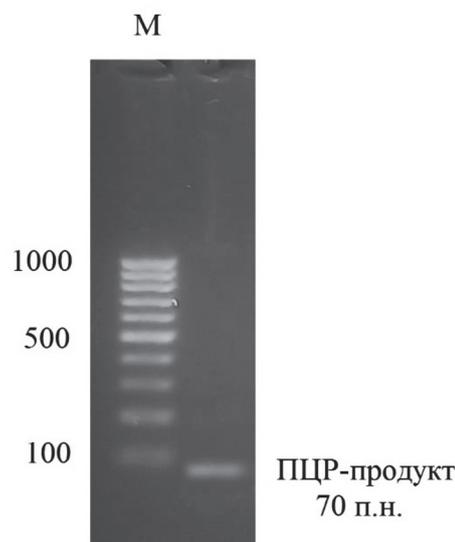


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-продуктов кДНК листьев кукурузы со специфическими праймерами к микроРНК miR775А, разработанным на основании специфического зонда типа «стебель-петля».

Применение дифференциального ультрацентрифугирования позволило получить внеклеточные везикулы фракций Р40 (40 000 g) и Р100 (100 000 g). Анализ размеров везикул при микроскопировании позволил установить, что в фракции Р40 преобладают более крупные везикулы, размер которых составляет от 0,170 до 0,658 нм, в то время как данный показатель для везикул фракции Р100 составлял от 0,087 до 0,147 мкм (рис. 3). Следовательно, дифференциальное ультрацентрифугирование позволило выделить две фракции внеклеточных везикул, отличительной особенностью которых является их величина. При 40 000 g выделяются более крупные частицы, размер которых более 170 нм.

Во внеклеточных везикулах, выделенных из листьев кукурузы, было проанализировано содержание микроРНК775А методом ПЦР в реальном времени. Установлено, что в разных фракциях везикул обнаружено различие в содержании исследуемой микроРНК. МикроРНК775А в везикулах фракции Р40 не было обнаружено. При этом

в везикулах фракции Р100 было показано наличие микроРНК775А (рис. 4). Следовательно, на основании данных количественной ПЦР с кДНК, полученной из зеленых листьев кукурузы, можно сделать заключение, что микроРНК775А обнаружена во внеклеточных везикулах фракции Р100.

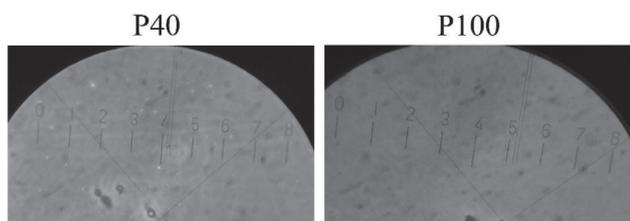


Рис. 3. Фотографии фракций внеклеточных везикул фракций Р40 и Р100, сделанных с помощью микроскопа Olympus CX41 с увеличением 1000×. Р40 – фракция везикул, полученная после дифференциального центрифугирования со скоростью 40 000 g, имеющая размер от 170 нм и более. Р100 – фракция везикул, выделенная после центрифугирования со скоростью 100 000 g и имеющая размер до 147 нм.

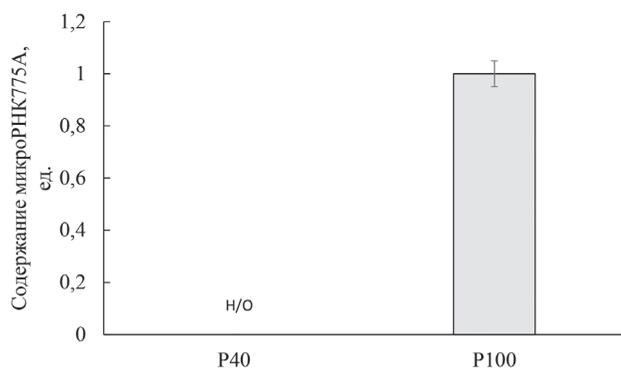


Рис. 4. Содержание микроРНК775А в фракциях Р40 и Р100 везикул, выделенных из листьев кукурузы. Н/О – не обнаружено. Данные представляют собой средние значения трех биологических повторов \pm SD.

В литературе имеются работы, свидетельствующие об изменении содержания микроРНК775А при гипоксии в некоторых растениях [10, 24]. Ингибирование митохондриального дыхания в данных условиях и увеличении свободной микроРНК775А может свидетельствовать о том, что данная микроРНК участвует в регуляции экспрессии генов ферментов, задействованных в процессе дыхания [10]. С помощью BLAST удалось выяснить, что микроРНК775А может быть связана с транскрипционным фактором МУВ, участвующим в различных биологических функциях, в том числе, в стрессовом ответе

при гипоксии [25]. Была доказана роль AtMYB2 в индукции гена алкогольдегидрогеназы Arabidopsis (ADH1) при низком уровне кислорода [26]. Можно предположить, что микроРНК 775А участвует в регуляции ферментативных систем при переходе на альтернативное дыхание растительной клетки при гипоксическом стрессе посредством транскрипционных факторов семейства МУВ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При гипоксии в растениях запускаются механизмы адаптивных реакций, изменяется транскрипция генов, ответственных за клеточный ответ на стресс [10]. Естественным инструментом регуляции метаболизма клетки являются микроРНК, обеспечивающие контроль на посттранскрипционном уровне. В качестве стресс-зависимой микроРНК, ответственной за стрессовый ответ при гипоксии, является микроРНК775А. Для оценки количественной микроРНК775А в листьях кукурузы методом ПЦР реального времени был разработан специфический зонд на основе 44 нуклеотидов, представляющий собой вариант «стебель-петля». Применение метода дифференциального ультрацентрифугирования позволило выделить из листьев кукурузы внеклеточные везикулы двух фракций. Фракция Р40 представлена крупными везикулами размером от 0,170 до 0,658 нм, а фракция Р100 – везикулами от 0,087 до 0,147. Показано, что микроРНК775А обнаруживается во внеклеточных везикулах фракции Р100, в то время как в везикулах фракции Р40 данная микроРНК не обнаружена. Следовательно, внеклеточный транспорт микро-РНК775А в листьях кукурузы осуществляется при участии малых везикул фракции Р100.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Boyer J.S. // Science. 1982. Vol. 218, pp. 443–448.
- Agarwal S., Grover A. // Critical Reviews in Plant Sciences. 2006. Vol. 25, pp. 1–21.
- Loreti E., Perata P. // Plants (Basel). 2020. Vol. 9: 745.
- Li G., Deng Y., Geng Y., Zhou C., Wang Y., Zhang W., Song Z., Gao L., Yang J. // Front. Plant Sci. 2017. Vol. 8: 2078.
- Franke K.R., Schmidt S.A., Park S., Jeong D.-H., Accerbi M., Green P.J. // BMC Genomics. 2018. Vol.19: 547.
- Fukao T., Barrera-Figueroa B.E., Juntawong P., Pena-Castro J.M. // Front. Plant Sci. 2019. Vol.10: 340.

7. Yeung E., van Veen H., Vashisht D., Sobral Paiva A.L., Hummel M., Rankenberg T., Steffens B., Steffen-Heins A., Sauter M., de Vries M., Schuurink R.C., Bazin J., Bailey-Serres J., Voesenek L.A.C.J., Sasidharan R. // PNAS USA. 2018. Vol.115: E6085-E6094.
8. Liu Z., Kumari S., Zhang L., Zheng Y., Ware D. // PLoS One. 2012. Vol.7:e39786.
9. Tripathi A.M., Singh A., Singh R., Verma A.K., Roy S. // Sci. Rep. 2019. Vol. 9: 441.
10. Moldovan D., Spriggs A., Yang J., Pogson B.J., Dennis E.S., Wilson I.W. // J Exp Bot. 2010. Vol. 6, pp. 165-177.
11. Khraiweh B., Zhu J.K., Zhu J. // Biochim Biophys Acta. 2012. Vol. 1819, pp.137-148.
12. Mishra P., Singh A., Verma A.K., Mishra S.K., Singh R., Roy S. // Journal of Plant Growth Regulation. 2022. pp. 1-14. – DOI: 10.1101/2021.01.28.428559.
13. Loreti E., Betti F., Ladera-Carmona M.J., Fontana F., Novi G., Valeri M.C., Perata P. // Plant Physiol. 2020. Vol.182, pp. 287-300.
14. Skopelitis D.S., Hill K., Klesen S., Marco C.F., von Born P. // Nat. Commun. 2018. Vol. 9:3107.
15. Lopez de Las Hazas M.C., Tome-Carneiro J., Del Pozo-Acebo L., Del Saz-Lara A., Chapado L.A., Balaguer L., Rojo E., Espin J.C., Crespo C., Moreno D.A., Garcia-Viguera C., Ordovas J.M., Visioli F., Davalos A. // Pharmacol Res. 2023. Vol. 198:106999.
16. Levine A.J. // Plant Physiology and Biochemistry. 2002. Vol. 40, pp. 531-535.
17. Епринцев А.Т., Анохина Г.Б., Гатаулина М.О., Федорин Д.Н. // Физиология растений. 2021. Т. 68. Вып. 2. С. 187–193.
18. Vennapusa A.R., Somayanda I.M., Doherty C.J., Jagadish S.K. // Scientific reports. 2020. Vol. 10, pp. 1-13.
19. Kramer M.F. // Curr Protoc Mol Biol. 2011. CHAPTER: Unit15.10
20. Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. // J Exp Bot. 2005. Vol.56, pp. 2907-2914.
21. Livak K.J., Schmittgen T.D. // Methods. 2001. Vol. 25, p. 402.
22. Huang Y., Wang S., Cai Q., Jin H. // J Integr Plant Biol. 2021. Vol. 63, pp. 2020-2030.
23. Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T., Barbisin M., Xu N.L., Mahuvakar V.R., Andersen M.R., Lao K.Q., Livak K.J., Guegler K.J. // Nucleic Acids Res. 2005. Vol. 33:e179.
24. Mishra V., Singh A., Gandhi N., Sarkar Das S., Yadav S., Kumar A., Sarkar A.K. // Development. 2022. Vol.149: dev199974.
25. Ambawat S., Sharma P., Yadav N.R., Yadav R.C. // Physiol Mol Biol Plants. 2013. Vol.3, pp. 307-321.
26. Hoeren F.U., Dolferus R., Wu Y., Peacock W.J., Dennis E.S. // Genetics. 1998. Vol.149, pp. 479-490.

*Воронежский государственный университет
Федорин Дмитрий Николаевич, доцент кафедр
дры биохимии и физиологии клетки,
E-mail: rybolov@mail.ru*

*Хомутова Анна Евгеньевна, студент кафедры
биохимии и физиологии клетки,
E-mail: anna.khomutova2002@gmail.com*

*Епринцев Александр Трофимович, заведующий
кафедрой биохимии и физиологии клетки,
E-mail: bc366@bio.vsu.ru*

*Voronezh State University
Fedorin Dmitry N., assistant professor of
biochemistry and cell physiology,
E-mail: rybolov@mail.ru*

*Khomutova Anna E., student of biochemistry and
cell physiology,
E-mail: anna.khomutova2002@gmail.com*

*Eprintsev Alexander T., head of the department of
biochemistry and cell physiology,
E-mail: bc366@bio.vsu.ru*

IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF MICRORNA775A IN EXTRACELLULAR VESICLES FROM CORN LEAVES

D.N. Fedorin, A.E. Khomutova, A.T. Eprintsev

Voronezh State University, Voronezh

Abstract. Stress associated with low oxygen content (hypoxia) and caused by natural phenomena such as waterlogging leads to the launch of a cascade of adaptive reactions in plants. Changes in cellular met-

abolic pathways can be regulated by microRNAs, which are a class of small non-coding RNAs ranging from 18 to 25 nucleotides in length and found in most eukaryotic organisms. MicroRNAs can play an important role in epigenetic mechanisms of genome regulation, including DNA methylation, RNA modification, including post-transcriptional regulation of gene expression. To be able to estimate the amount of miRNA775A, a specific probe was developed to quantify the mature miRNA based on 44 nucleotides, which is a stem-loop variant. The 70-nucleotide cDNA of the second strand of miR-H1, formed during reverse transcription, allows for quantitative assessment of free miR-775A by real-time PCR. Under hypoxic conditions, a change in the amount of microRNA775A may serve as confirmation of its participation in the mechanisms of control of alternative respiration in plants. It was also found that microRNA775A acts through the RNA interference pathway, binding to the RISC complex, and post-transcriptionally interacts with its complementary mRNA. Vesicles formed on the basis of the plasmalemma are responsible for the extracellular transport of microRNAs in the plant organism. The use of differential ultracentrifugation made it possible to isolate two fractions of vesicles from maize leaves: P40 and P100. An analysis of the size of vesicles under microscopy revealed that the P40 fraction was dominated by larger vesicles, the size of which ranged from 0.170 to 0.658 μm , while this figure for vesicles of the P100 fraction ranged from 0.087 to 0.147 μm . Based on quantitative PCR data with cDNA obtained from green maize leaves and specific primers, it was shown that microRNA775A was detected only in extracellular vesicles of the P100 fraction. Consequently, it is the vesicles of the P100 fraction that carry out the extracellular transport of microRNA775A in maize leaves.

Keywords: corn, microRNA, vesicles, polymerase chain reaction, hypoxia

REFERENCES

1. Boyer J.S., *Science*, 1982, Vol. 218, pp. 443–448. DOI: 10.1126/science.218.4571.443.
2. Agarwal S., Grover A., *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2006, Vol. 25, pp. 1–21. DOI: 10.1080/07352680500365232
3. Loreti E., Perata P., *Plants (Basel)*, 2020, Vol. 9: 745. DOI: 10.3390/plants9060745.
4. Li G., Deng Y., Geng Y., Zhou C., Wang Y., Zhang W., Song Z., Gao L., Yang J., *Front. Plant Sci.*, 2017, Vol. 8: 2078. DOI:10.3389/fpls.2017.02078.
5. Franke K.R., Schmidt S.A., Park S., Jeong D.-H., Accerbi M., Green, P.J., *BMC Genomics*, 2018, Vol.19: 547. DOI: 10.3389/fpls.2019.00340.
6. Fukao T., Barrera-Figueroa B.E., Juntawong P., Pena-Castro J.M., *Front. Plant Sci.* 2019. Vol.10: 340. DOI: 10.3389/fpls.2019.00340.
7. Yeung E., van Veen H., Vashisht D., Sobral Paiva A.L., Hummel M., Rankenberg T., Steffens B., Steffen-Heins A., Sauter M., de Vries M., Schuurink R.C., Bazin J., Bailey-Serres J., Voesenek L.A.C.J., Sasidharan R., *PNAS USA*, 2018, Vol.115: E6085-E6094. DOI: 10.1073/pnas.1803841115.
8. Liu Z., Kumari S., Zhang L., Zheng Y., Ware D., *PLoS One*, 2012, Vol.7:e39786. DOI: 10.1371/journal.pone.0039786.
9. Tripathi A.M., Singh A., Singh R., Verma A.K., Roy S., *Sci. Rep.*, 2019, Vol. 9: 441. DOI: 10.1038/s41598-018-37465-y.
10. Moldovan D., Spriggs A., Yang J., Pogson B.J., Dennis E.S., Wilson I.W., *J Exp Bot.*, 2010, Vol. 6, pp. 165-177. DOI: 10.1093/jxb/erp296.
11. Khraiwesh B., Zhu J.K., Zhu J., *Biochim Biophys Acta.*, 2012, Vol. 1819, pp.137-148. DOI: 10.1016/j.bbagr.2011.05.001.
12. Mishra P., Singh A., Verma A.K., Mishra S.K., Singh R., Roy S., *Journal of Plant Growth Regulation*. 2022. pp. 1-14. – DOI: 10.1101/2021.01.28.428559.
13. Loreti E., Betti F., Ladera-Carmona M.J., Fontana F., Novi G., Valeri M.C., Perata P., *Plant Physiol.*, 2020, Vol.182, pp. 287-300. DOI: 10.1104/pp.19.00741.
14. Skopelitis D. S., Hill K., Klesen S., Marco C. F., von Born P., *Nat. Commun.*, 2018, Vol. 9:3107. DOI: 10.1038/s41467-018-05571-0.
15. Lopez de Las Hazas M.C., Tome-Carneiro J., Del Pozo-Acebo L., Del Saz-Lara A., Chapado L.A., Balaguer L., Rojo E., Espin J.C., Crespo C., Moreno D.A., Garcia-Viguera C., Ordovas J.M., Visioli F., Davalos A. // *Pharmacol Res.* 2023. Vol. 198:106999.
16. Levine A.J., *Plant Physiology and Biochemistry*. 2002. Vol.40, pp. 531-535. DOI: 10.1016/S0981-9428(02)01398-0.
17. Eprincev A.T., Anohina G.B., Gataullina M.O., Fedorin D.N., *Russian journal of plants physiology*, 2021, Vol. 68, No. 2, pp. 187–193.
18. Vennapusa A.R., Somayanda I.M., Doherty C.J., Jagadish S.K., *Scientific reports*, 2020, Vol. 10, pp. 1-13. DOI: 10.1038/s41598-020-73958-5.
19. Kramer M.F., *Curr Protoc Mol Biol.*, 2011, CHAPTER: Unit15.10. DOI: 10.1002/0471142727.mb1510s95.
20. Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D., *J Exp Bot.*, 2005, Vol.56, pp. 2907-2914.

21. Livak K.J., Schmittgen T.D., *Methods*, 2001, Vol. 25, p. 402. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
22. Huang Y., Wang S., Cai Q., Jin H. // *J Integr Plant Biol.* 2021. Vol. 63, pp. 2020-2030. DOI: 10.1111/jipb.13181.
23. Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T., Barbisin M., Xu N.L., Mahuvakar V.R., Andersen M.R., Lao K.Q., Livak K.J., Guegler K.J., *Nucleic Acids Res.*, 2005, Vol. 33:e179. DOI: 10.1093/nar/gni178.
24. Mishra V., Singh A., Gandhi N., Sarkar Das S., Yadav S., Kumar A., Sarkar A.K., *Development*, 2022, Vol.149: dev199974. DOI: 10.1242/dev.199974.
25. Ambawat S., Sharma P., Yadav N.R., Yadav R.C., *Physiol Mol Biol Plants.*, 2013, Vol.3, pp. 307-321. DOI: 10.1007/s12298-013-0179-1.
26. Hoeren F.U., Dolferus R., Wu Y., Peacock W.J., Dennis E.S., *Genetics*, 1998, Vol.149, pp. 479-490. DOI: 10.1093/genetics/149.2.479.