

УДК 577.112

## КОРОТКИЕ ЭКЗОГЕННЫЕ ПЕПТИДЫ РЕГУЛИРУЮТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВ *CLE*, *KNOX1* И *GRF* У *Nicotiana tabacum*

© 2017 Л.И. Федореева<sup>1,2</sup>, Т.А. Диловарова<sup>1</sup>,  
В.В. Ашапкин<sup>2</sup>, Ю.Ц. Мартиросян<sup>1</sup>, В.Х. Хавинсон<sup>3</sup>,  
П.Н. Харченко<sup>1</sup>, Б.Ф. Ванюшин<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной  
биотехнологии РАН, 127550 Москва, Россия;  
электронная почта: vanyush@belozersky.msu.ru

<sup>2</sup>НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,  
МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский институт биорегуляции  
и геронтологии, 197110 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 26.09.16  
После доработки 18.11.16

Экзогенные биологически активные короткие пептиды эпиталон (Ala-Glu-Asp-Gly), бронхоген (Ala-Glu-Asp-Leu) и вилон (Lys-Glu) в концентрации  $10^{-7}$ – $10^{-9}$  М существенно влияют на рост, развитие и дифференцировку каллусной культуры растений табака *Nicotiana tabacum*. Эпиталон и, особенно, бронхоген не только увеличивают рост каллусной массы, но стимулируют формирование и рост листьев у регенерантов. Поскольку регуляторная активность коротких пептидов проявляется при низких концентрациях, их действие в растительной клетке напоминает действие гормонов, и, вероятно, носит сигнальный характер и имеет эпигенетическую природу. Эти пептиды модулируют в клетках табака экспрессию генов, в том числе, отвечающих за формирование и клеточную дифференцировку. Причем, они по-разному модулируют экспрессию генов семейств *CLE*, кодирующих известные эндогенные регуляторные пептиды, генов *KNOX1* (гены факторов транскрипции) и *GRF* (гены – регуляторы факторов роста, кодирующие соответствующие ДНК-связывающие белки, такие как топоизомеразы, нуклеазы и другие). Таким образом, у растений на уровне экспрессии генов существует система пептидной регуляции образования известных более длинных пептидных регуляторов роста и развития. Изученные короткие пептиды могут быть отнесены к регуляторам роста растений нового поколения и могут найти применение в экспериментальной ботанике, молекулярной биологии растений, биотехнологии и в практическом растениеводстве.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** клеточная дифференцировка, *Nicotiana tabacum*, экспрессия генов, короткие пептиды, регуляция роста растений.

Короткие экзогенные биологически активные пептиды (эпиталон) увеличивают продолжительность жизни экспериментальных животных [1]. Бронхоген регулирует дифференцировку, пролиферацию и апоптоз в культурах клеток бронхиального эпителия человека, вилон обладает таким же действием на клетки тимуса и лимфоциты периферической крови человека и животных [2]. Эти пептиды тканеспецифично индуцируют экспрессию генов, в том числе, генов, отвечающих за репарацию и репликацию ДНК [2, 3]. Действие эпиталона, бронхогена и вилонна на растительные клетки неизвестно.

Считается, что в основе выявленного физиологического действия этих пептидов у животных лежит их геноспецифическое взаимодействие с ДНК в результате специфического (комплементарного) связывания пептидов с ДНК [2–4].

В основе действия коротких пептидов на экспрессию генов и клеточную дифференцировку у эукариот могут лежать некие общие фундаментальные регуляторные принципы и механизмы. И поэтому по аналогии с действием на животные клетки короткие пептиды, по нашему мнению, должны были бы обладать регуляторным (сигнальным) действием и на растительные клетки, влияя на дифференцировку, рост и развитие растений. Однако сначала

\* Адресат для корреспонденции.

предстояло выяснить, могут ли вообще использованные короткие пептиды как-то влиять на эти процессы у растений и каково это влияние.

Цель работы – изучить влияние коротких пептидов на рост, развитие и экспрессию генов каллусной культуры *Nicotiana tabacum*. В работе использованы тетрапептиды эпиталон (Ala-Glu-Asp-Gly), бронхоген (Ala-Glu-Asp-Leu) и дипептид вилон (Lys-Glu), которые синтезированы в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Семена табака (*Nicotiana tabacum* L., сортотип Самсун) поверхностно стерилизовали 1,5%-ным раствором гипохлорита натрия с добавлением 0,01%-ного Triton X-100 в течение 15 мин, затем промывали трижды стерильной дистиллированной водой и помещали в колбы с агаризованной средой Мурашиге–Скуга для проращивания. Образовавшиеся семядоли отрезали скальпелем и выкладывали по 10 шт на среду в чашки Петри с агаризованной средой Мурашиге–Скуга, содержащей 6-бензиламинопурин (1 мг/л), индоллил-масляную кислоту (0,2 мг/л) с добавлением пептидов вилона, эпиталона, бронхогена в концентрации  $10^{-6}$ – $10^{-9}$  М или без пептидов. В те-

чение 14 дней чашки Петри с эксплантатами выдерживали в термостате в темноте при температуре 25° С, а затем помещали в световую комнату. Эксплантаты культивировали при следующем температурном режиме: температура днем 20–22° С, ночью 16–18° С, длительность фотопериода 16 ч. Опыты по выращиванию каллусов проводили в четырех повторностях.

Каллусы табака использовали для выделения РНК с помощью набора реагентов «РНК-Экстрен» фирмы «Синтол» (Россия). Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически.

кДНК получали стандартным методом с помощью набора реагентов для проведения обратной транскрипции фирмы «Синтол» (Россия).

В работе использованы сведения о генах семейств *CLE*, *KNOX1* и *GRF Nicotiana tabacum* и *N. sylvestris* из базы данных NCBI. Праймеры к транскриптам генов были подобраны с помощью онлайн-сервиса NCBI Primer-BLAST и синтезированы в фирме «Синтол» (табл. 1–3).

Реакцию ПЦР с регистрацией в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили в термоциклере CFX 96 Real-Time System («BioRad»). Подготовку образцов проводили по стандартному методу с помощью набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green фирмы «Синтол». ПЦР-РВ проводили в одинаковых условиях для всех образцов: 95° С – 5 мин – (акти-

Таблица 1. Гены семейства *CLE* и праймеры к ним

Гены	Праймеры	Кодируемый белок	Функция кодируемого белка
<i>CLE-1</i>	tgc tgg act tga gag cat gag ggt cct cca ggt gct act ct	PREDICTED: CLAVATA3/ESR (CLE)-related protein 5-like	подавляет сигналинг цитокинина
<i>CLE-2</i>	aag agt aac cag cct gcc ac gcc aag aac aaa ggg tgc tg	PREDICTED: CLAVATA3/ESR (CLE)-related protein 40	стимулирует биосинтез АВА, подавляет сигналинг цитокинина и избирательно регулирует сигналинг ауксина
<i>CLE-3</i>	gct atc ggg gcc ttg aaa gta tcc tcc agg tgc cac tct at	PREDICTED: CLAVATA3/ESR (CLE)-related protein 6-like	стимулирует пролиферацию клеток прокамбия, компенсирует дефицит гибберелиновой кислоты
<i>CLE-4</i>	tct cca cga gat agg ggc aa gag acc aac tgc aat gcc ac	PREDICTED: CLAVATA3/ESR (CLE)-related protein 44	
<i>CLE-5</i>	tta cca cca cca caa aca cga tgg tcc aga cgg tac gag ac	PREDICTED: CLAVATA3/ESR (CLE)-related protein 12-like	ингибирует рост латеральных корней
<i>CLE-6</i>	act tga caa agc aaa att ggt tgc tcc atc gga tct gga cca ct	PREDICTED: CLAVATA3/ESR (CLE)-related protein 18-like	
<i>CLE-7</i>	cac aag aca gca ggg atc aa gct cga gcg att ggg atc aa	PREDICTED: CLAVATA3/ESR (CLE)-related protein 45	регулирует прорастание пыльцы и развитие семян
<i>CLE-8</i>	aag gaa aac tca gcg agc ca cca ctg act cta cct ggc ct	PREDICTED: CLAVATA3/ESR (CLE)-related protein 25-like	

Таблица 2. Гены семейств *KNAT*, *LET* и праймеры к ним

Гены	Праймеры	Кодируемый белок
<i>KNAT1</i>	caa ctc agc gac ctc atg ga/tgt tcc cat ggg cct tca tc	homeobox protein knotted-1 like 1
<i>KNAT2</i>	cgc cat att ttg gat cgc cg/ccg aac aca ccg acg aca ta	homeobox protein knotted-1 like 2
<i>KNAT3</i>	cgt gtg agg cag gag cta aa/agt atc gcc cgg gag ttt tc	homeobox protein knotted-1 like 3
<i>KNAT6</i>	gct gta gca gac gcg atg at/tct ggt ggt gct cct acc tt	homeobox protein knotted-1 like 6
<i>LET6</i>	act tcc tcc tct gaa tct gct/c tgc gca gca att gac ctt tc	homeobox protein knotted-1 like LET6
<i>LET12</i>	agt gca aga gac agg gtt gc/ttt ttc acc tct ttc gtt tgc tt	homeobox protein knotted-1 like LET12

Таблица 3. Гены семейства *GRF* и праймеры к ним

Гены	Праймеры	Кодируемый белок
<i>GRF-1</i>	ccc gga ttc cca act aca ca/agc gcg tgt act tca cta ctt	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase 2-like
<i>GRF-2</i>	cat cca gca gtg cac aga ga/ctt cct gag acc gag cag tg	DNA topoisomerase 3-alpha-like
<i>GRF-3</i>	tac gaa ctg tga ggc atc cg/ttc acc act caa tgt gcc gt	3'-5' exoribonuclease 1-like
<i>GRF-4</i>	gac gaa gag gaa ggc ttg ga/gcc gta ctc cca tca gct tt	endonuclease 8-like 3

вазия ДНК-полимеразы), далее 45 циклов (94° С – 30 с, 58° С – 30 с, 72° С – 30 с). После последнего цикла реакционные смеси инкубировали при 72° С в течение 2 мин. Реакции проводили трехкратно в 2–3 параллелях. Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали по калибровочной кривой, построенной с ПЦР-продуктами, полученными с праймерами к гену *GaPDh*.

Статистическая обработка результатов. Средние арифметические величины рассчитаны по формуле:  $M_x = \sum Xi/n$ . Стандартные отклонения:

$$\sigma_x = \sqrt{Dx} = \sqrt{\sum (Xi - M_x)^2 / n - 1},$$

где  $Dx$  – дисперсия. Дисперсию и стандартное отклонение рассчитывали по программе Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При выращивании каллусов табака (*Nicotiana tabacum L.*, сортотип Самсун) на стандартной среде в присутствии  $10^{-7}$ – $10^{-9}$  М пептидов наблюдаются существенное ускорение роста каллусов и увеличение каллусной массы по сравнению с контролем (рис. 1). При более высокой концентрации пептидов ( $10^{-6}$  М) рост каллусов

угнетался по сравнению с контролем. Хотя при очень низкой концентрации ( $10^{-9}$  М) также наблюдался явный рост, стимулирующий эффект, но он менее выражен, чем при концентрации пептидов  $10^{-8}$  М. Поэтому в экспериментах по анализу экспрессии генов мы использовали в качестве оптимальной концентрацию пептидов –  $10^{-8}$  М.

Под влиянием пептидов усиливаются формообразовательные процессы: увеличиваются образование и рост листьев, часто отмечается увеличение корнеобразования. Скорость образования листьев и роста каллусов, выращенных на среде в присутствии бронхогена выше, чем в присутствии эпителина и вилонна. Судя по регенерации листьев, эффективность роста стимулирующего действия изученных пептидов можно представить в таком порядке: бронхоген > эпителин > вилон.

Таким образом, изученные короткие экзогенные пептиды обладают выраженным физиологическим действием на растения. Поскольку они эффективны в очень низких концентрациях, их действие, в известной мере, сходно с действием фитогормонов и, по-видимому, имеет сигнальную природу. Это согласуется с данными о существовании у растений многочисленных относительно коротких (2–100 аминокислотных остатков) пептидных гормонов [5–7].

Секретируемые пептиды (как и фитогормоны) играют важную роль в регуляции межклеточных взаимодействий, физиологических активностей и ответов на различные воздействия и сигналы внешней среды [5–7]. Наиболее изученными секретируемыми пептидами в расте-

ниях в настоящее время являются пептиды семейства CLE (*CLAVATA3/Endosperm surrounding region-related*) [5–7]. Гены CLE кодируют небольшие секретируемые пептиды с консервативными C-концевыми мотивами. К настоящему времени у *Arabidopsis thaliana* известны 32 пептида

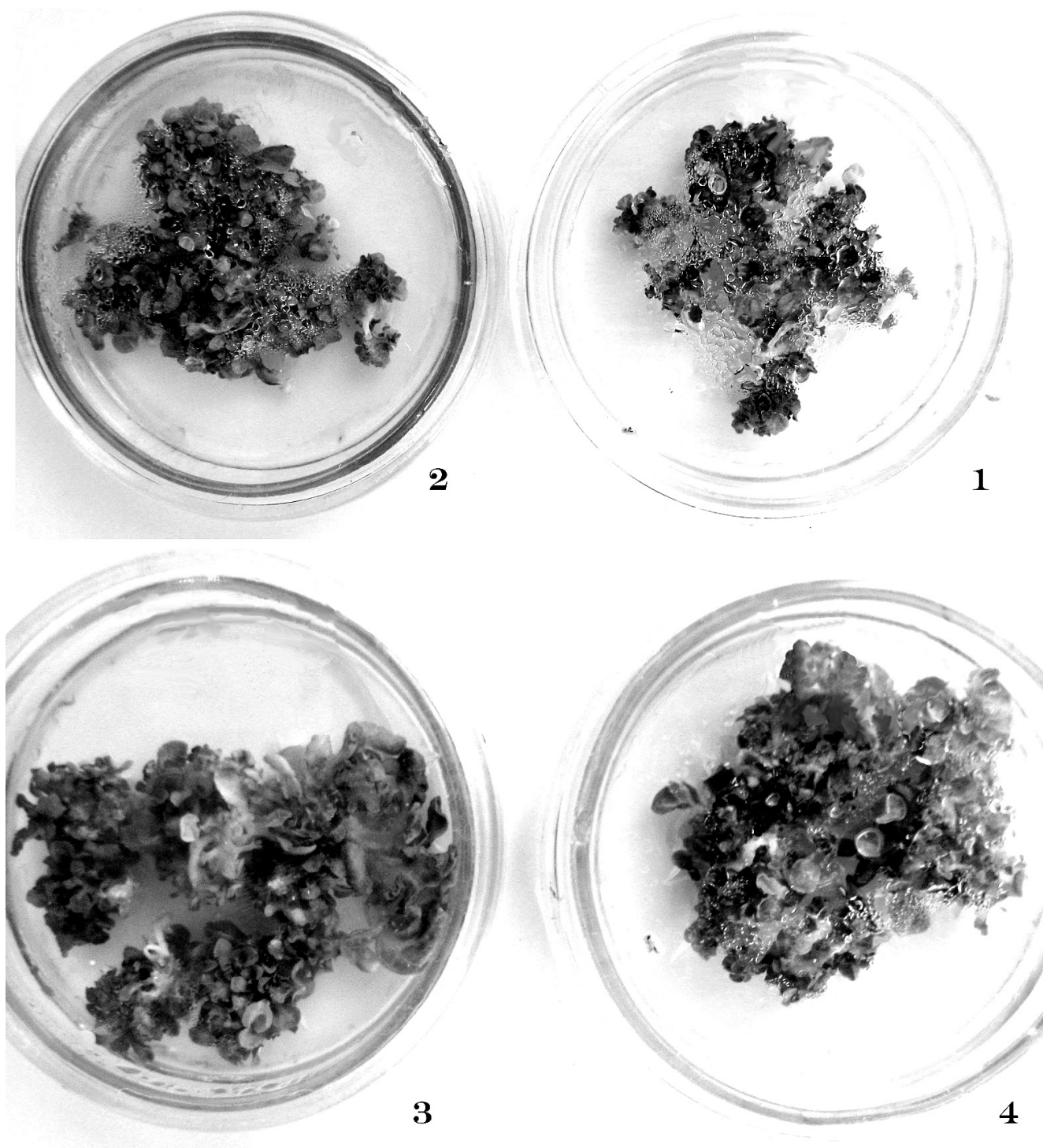


Рис. 1. Влияние пептидов в концентрации  $10^{-8}$  М на рост калусной культуры табака. 1 – Контроль; 2 – эпиталон, 3 – бронхоген, 4 – вилон

семейства CLE, но функционально охарактеризовано только несколько генов *CLE* [7]. Эндогенные пептиды и фитогормоны действуют согласованно [8, 9] и вовлечены в регуляцию физиологической активности клеток в соответствии с сигналами окружающей среды, модулируя широкий круг биологических процессов. Установлено, что пептиды CLE участвуют в регуляции развития семян, образовании сосудов и латеральных корней и прорастании пыльцевых трубок, а также в поддержании гомеостаза стволовых клеток в апикальной и корневой меристемах проростков [5–7]. У табака пептиды CLE, их функциональная роль, взаимодействие с фитогормонами и другими регуляторами роста растений практически не изучены.

В табл. 1 приведены некоторые известные пептиды семейства CLE табака *Nicotiana tabacum* и данные по функциональной активности подобных пептидов у *Arabidopsis thaliana* [9]. Сравнительные данные по функциональной активности пептидов CLE из различных источников позволили предположить, что и у изучаемых нами растений табака (*Nicotiana tabacum*) эти пептиды могут играть сходную роль.

На рис. 2 представлены данные по экспрессии генов *CLE* в каллусах табака в контроле и при наличии в среде коротких экзогенных пептидов. Эпиталон и бронхоген – близкие по первичной структуре кислые тетрапептиды (Ala-Glu-Asp-Gly и Ala-Glu-Asp-Leu соответственно). Вилон (Lys-Glu) – нейтральный дипептид, он отличается по структуре от двух других. Поэтому можно было думать, что действие вилонна на экспрессию генов в каллусах табака будет отличаться от действия бронхогена и эпиталона.

Вилон значительно подавляет экспрессию генов семейства *CLE*, за единственным исключением – гена *CLE6*, экспрессия которого увеличивается почти в два раза. Действие эпиталона и бронхогена на экспрессию генов *CLE* отличается от эффектов вилонна, как, впрочем, и от эффектов друг друга. Очевидно, действие изученных пептидов на экспрессию генов у растений избирательно, так же как и у животных [1]. Под влиянием обоих тетрапептидов увеличивается экспрессия генов *CLE2*, *CLE5* и *CLE6*. Экспрессия гена *CLE1* заметно подавляется эпиталонами и почти не изменяется бронхогеном и вилонном. Эпиталон заметно ингибирует, а вилон практически полностью блокирует экспрессию гена *CLE4*. Бронхоген, наоборот, почти вдвое увеличивает ее. Оба тетрапептида практически не влияют на экспрессию гена *CLE3*, а вилон заметно уменьшает ее. Таким образом, короткие экзогенные пептиды воздействуют на экспрессию генов, кодирующих эндогенные регуляторные пептиды (CLE), и это воздействие зависит от природы экзогенных пептидов.

Ранее было обнаружено, что короткие экзогенные пептиды могут проникать в клетки и ядра, и, тем самым, они потенциально могут взаимодействовать с хроматином и его структурными элементами [10]. Мы предположили, что пептиды, в зависимости от структуры, могут связываться с разными участками промоторной области генов [4, 10]. По-видимому, это может происходить и при возможном взаимодействии пептидов с генами *CLE*, и это может привести к изменению уровня экспрессии этих генов.

Белки класса KNOTTED1-like homeodomain (KNOX) являются критическими регуляторами

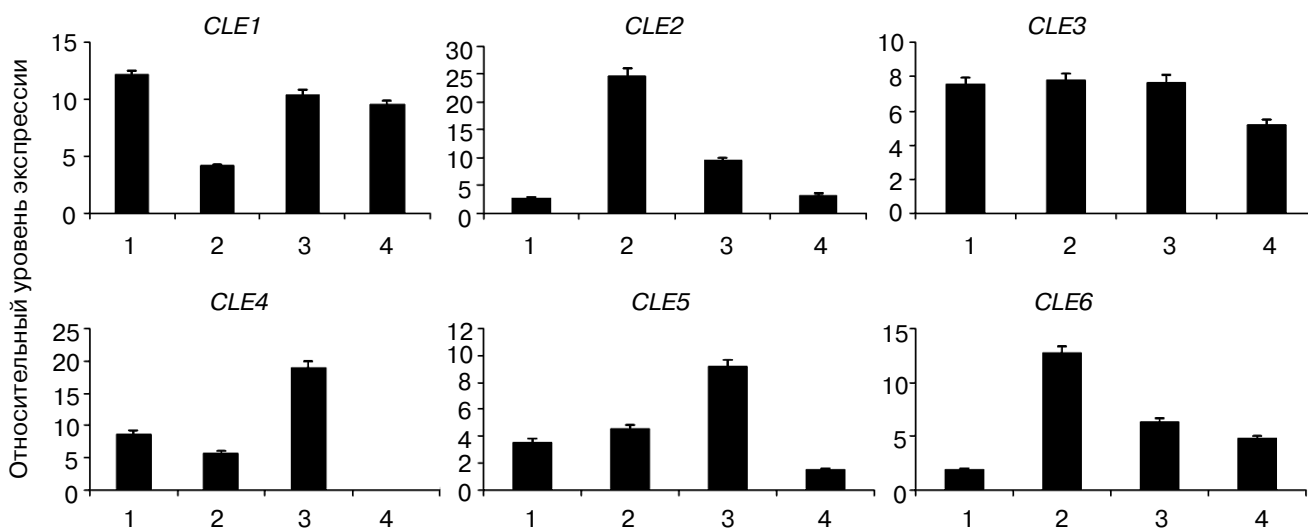


Рис. 2. Влияние пептидов на экспрессию генов семейства *CLE*. 1 – Контроль; 2 – эпиталон; 3 – бронхоген; 4 – вилон

гомеостаза стволовых клеток у растений. Гены *KNOX* кодируют факторы транскрипции, которые участвуют в остановке клеточной дифференцировки в апикальной зоне проростка, они идентифицированы у всех одно- и двудольных растений [11]. Эктопическая экспрессия генов *KNOX* у различных растений влияет на уровни фитогормонов и приводит к драматическим изменениям морфологии листьев и цветов [11].

Относящиеся к семейству *KNOX* гены *KNAT1*, *KNAT2*, *KNAT6* и *STM* (у *Nicotiana* вместо *STM* гены *LET6* и *LET12*) (табл. 2) участвуют в дифференцировке стволовых клеток. Экспрессия гена *STM* приводит к более раннему формированию листьев в каллусных культурах. У растений арабидопсиса образование клеток листа регулируется всеми генами семейства *KNOX* [12].

По воздействию изученных пептидов на экспрессию гены *KNOX* можно разделить на три группы (рис. 3). Первая включает гены *KNAT1* и *KNAT2*, на экспрессию которых короткие экзогенные пептиды практически не действуют. Вторая группа – гены *KNAT3* и *KNAT6*, на экспрессию которых влияют все пептиды. Эпиталон и вилон увеличивают экспрессию гена *KNAT3* почти в два, а бронхоген – в четыре раза. Под действием эпиталона уровень экспрессии гена *KNAT6* увеличивается более, чем в 4 раза, а под действием бронхогена и виллона – в шесть и более раз. К третьей группе относятся гены *LET6* и *LET12*. Экспрессия гена *LET6* практически не изменяется эпиталонами и слегка сти-

мулируется бронхогеном и виллоном. Экспрессия гена *LET12* заметно (в 1,6 раза) стимулируется бронхогеном и незначительно – эпиталонами и виллоном. Известно, что у арабидопсиса ген *STM* (гомолог генов *LET6* и *LET12* табака) существенен для формирования листьев. Образование листьев заметно увеличивается в каллусной культуре табака, выращенной в присутствии бронхогена (рис. 1). Это согласуется с предположением о том, что гены *LET6* и *LET12* отвечают за дифференцировку листьев. Формирование листьев в каллусах табака, выращенных в присутствии дипептида виллона, также происходит в более ранние сроки, чем в контроле. Виллон увеличивает экспрессию только генов *KNAT3* и *KNAT6* (рис. 3). Следовательно, у растений табака *Nicotiana tabacum* гены *KNAT3*, *KNAT6*, как и *LET6*, и *LET12*, также могут отвечать за формирование листьев.

Регуляция экспрессии генов *KNOX* контролируется многими факторами и агентами, влияющими на структурную и функциональную организацию хроматина [13]. Известно, что короткие пептиды могут специфично связываться с хроматином и, тем самым, влиять на его энзиматические модификации, взаимодействие с факторами транскрипции, ферментами синтеза ДНК, другими белками и РНК. Ранее было обнаружено, что короткие пептиды могут специфично взаимодействовать с гистонами H1 и коргистонами [14]. Бронхоген и эпиталон, скорее всего, связываются с положительно заряженным мотивом *kaakakk*, а виллон, содержащий ос-

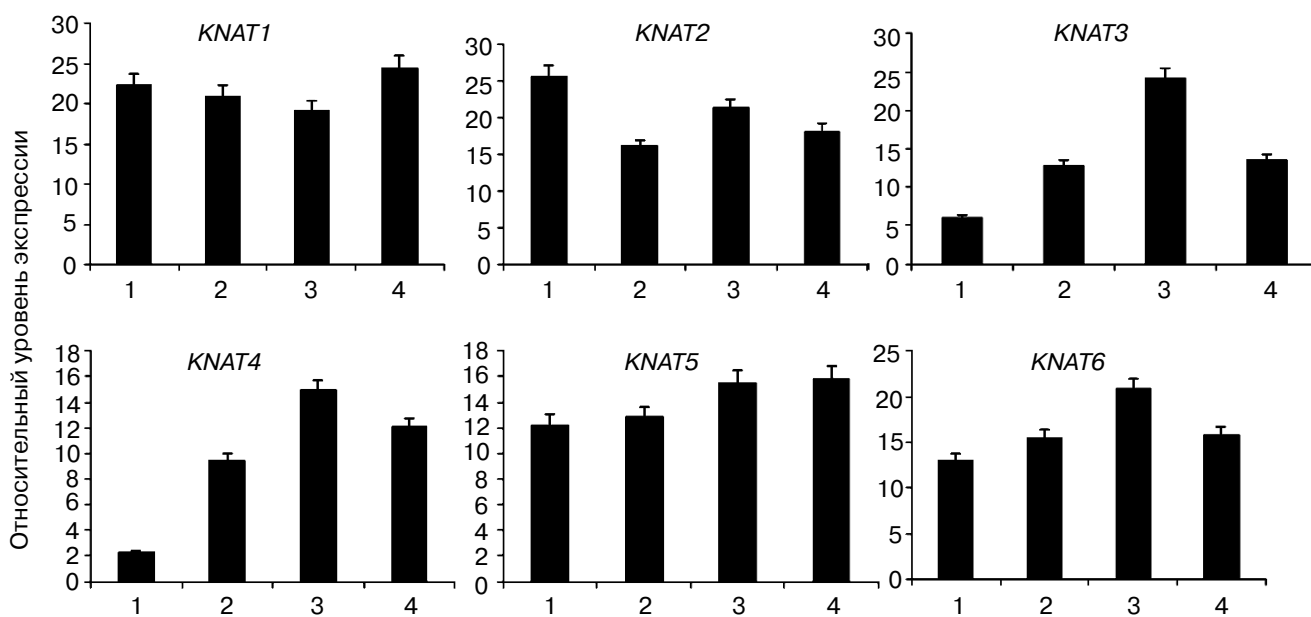


Рис. 3. Влияние пептидов на экспрессию генов семейства *KNOX1*. 1 – Контроль; 2 – эпиталон; 3 – бронхоген; 4 – вилон

таток лизина, вероятнее всего связывается с отрицательно заряженным мотивом – *evaa*. Предполагается, что специфическое связывание коротких биологически активных пептидов с гистонами может модулировать действие различных ферментов на гистоны хроматина и существенно влиять на множественные известные энзиматические модификации «хвостов» гистонов. Тем самым, модифицируя хроматин, белок-белковые взаимодействия коротких пептидов с гистонами в хроматине могут служить контрольным механизмом эпигенетической регуляции активности генов и клеточной дифференцировки.

Факторы регуляции роста растений (GRF) в основном являются специфическими факторами транскрипции [15]. Хотя у табака определено не так много генов регуляторов факторов роста (не более 20), только для четырех из них определены соответствующие кодируемые белки. Это и послужило основанием для выбора объектов (генов) для изучения влияния пептидов на экспрессию генов, кодирующих GRF. Все кодируемые этими генами белки связываются с ДНК по определенным участкам. Это – ДНК-апуриновая/апириимидиновая лигаза, ДНК-топоизомераза 3 $\alpha$ , 3', 5'-экзонуклеаза и эндонуклеаза 8 (табл. 1). Так как в базе данных NCBI сведения о

*GRF* генах *Nicotiana tabacum* отсутствуют, мы использовали для подбора праймеров последовательности соответствующих генов *Nicotiana sylvestris*. Используемые праймеры к транскриптам генов *GRF Nicotiana sylvestris* успешно амплифицировали фрагменты кДНК *Nicotiana tabacum* (табл. 3, рис. 4).

В каллусах табака бронхоген увеличивает экспрессию гена *GRF1* более, чем в два раза, а эпиталон и вилон слегка ингибируют ее. Экспрессия гена *GRF2* под действием эпиталона увеличивается почти в 10 раз, а бронхоген и вилон не влияют на нее. Экспрессия гена *GRF3* умеренно (в 1,6 раз) стимулируется бронхогеном и практически не изменяется эпиталоном и вилонем. Наконец, экспрессия гена *GRF4* под влиянием эпиталона и бронхогена увеличивается в два и три раза соответственно, а вилон практически не влияет на нее. Таким образом, короткие экзогенные пептиды влияют на экспрессию генов, кодирующих белки регуляторов факторов роста растений, и это действие зависит от первичной структуры пептидов.

Известно, что *GRF7* из *Arabidopsis thaliana* связывается с коровой последовательностью TGTCAGG [16]. В промоторе гена *Oskn2* из семейства генов *KNOX1* (KNOTTED-LIKE HOMEOBOX) риса найдены гомологичные мотивы и установ-

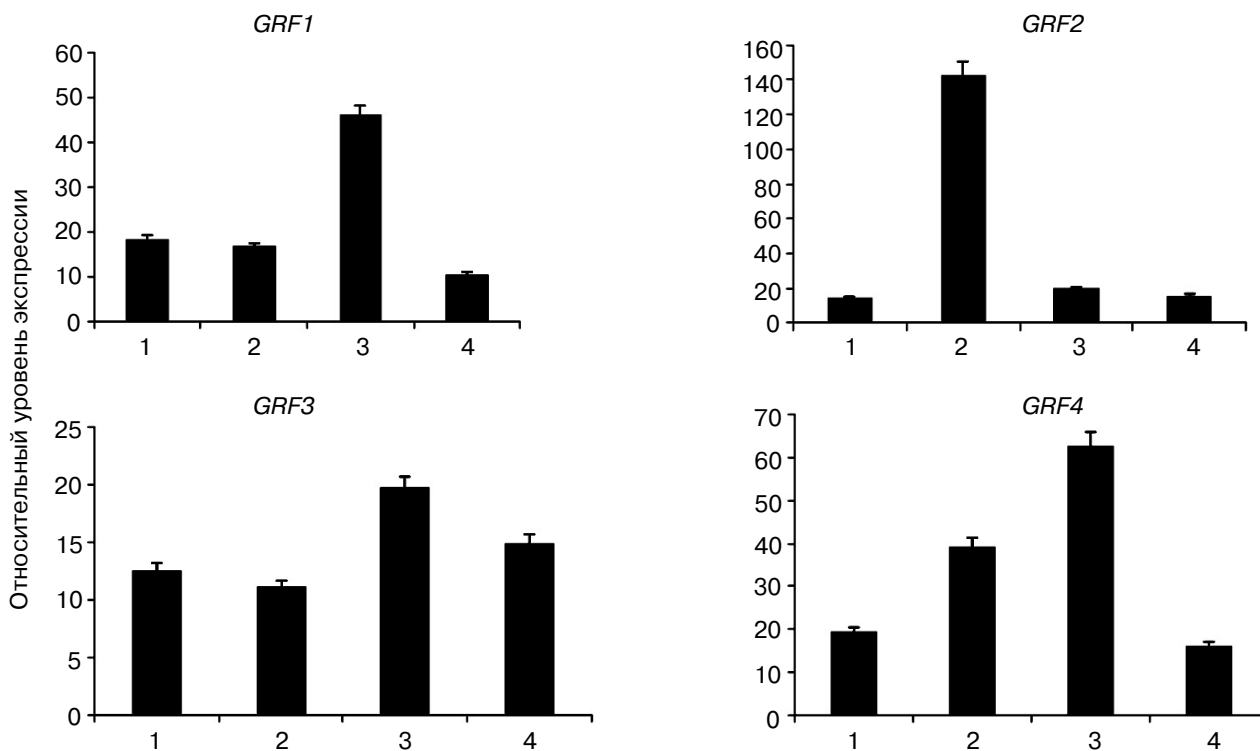


Рис. 4. Влияние пептидов на экспрессию генов регуляторов факторов роста. 1 – Контроль; 2 – эпиталон; 3 – бронхоген; 4 – вилон

лено, что субфрагменты, связывающие OsGRF3 и OsGRF10, обогащены мотивом CAG, который находится внутри этой коровой последовательности (TGTCAGG). Тем самым, регуляторы факторов роста (GRF) риса, по-видимому, связываются с промоторами через мотивы CAG или CTG [13]. Ранее нами было установлено, что эпителин и бронхоген при взаимодействии с дезоксирибоолигонуклеотидами предпочтительно связываются с мотивом CNG [10]. По-видимому, и в клетках растений табака короткие экзогенные пептиды также могут связываться с промоторными участками генов через CAG и CTG сайты и изменять экспрессию этих генов. Известно, что эти нуклеотидные последовательности служат сайтами метилирования цитозиновых остатков в ДНК растений цитозиновыми ДНК-метилтрансферазами [17]. Не исключено, что связывание пептидов с этими нуклеотидными последовательностями может влиять на уровень метилирования CNG сайтов.

Итак, короткие биологически активные пептиды существенно влияют на рост, развитие и дифференцировку каллусной культуры растений табака. Они действуют при очень низких концентрациях и геноспецифично модулируют экспрессию генов, в том числе, и генов клеточной дифференцировки. Рассчитанные в данной работе константы связывания пептидов с олигонуклеотидами и ДНК *in vitro* составляют величины порядка  $10^{-8}$ – $10^{-9}$  М [10], и они близки константам связывания компонентов в комплексах гормон-рецептор. Это в сочетании с геноспецифичным действием пептидов, в известной мере, сходно с действием фитогормонов.

Мы не знаем, существуют ли рецепторы для использованных нами коротких пептидов. Главное достоверно, что в животные клетки эти пептиды проникают и обнаруживаются в цитоплазме, ядре и ядрышке [10]. Поэтому (как уже отмечалось) они потенциально могут взаимодействовать с разными, в том числе, и нуклеиновыми компонентами клетки. Можно предположить, что такие короткие пептиды, действующие геноспецифично как на растительные, так и животные клетки, могли быть эволюционно ранними и общими для эукариот. Возможно, на ранних этапах эволюции они обходились без специфических рецепторов. Если в ходе эволюции для таких биологически активных коротких пептидов и возникли свои рецепторы, то они должны быть у растений и животных довольно сходными. Разумеется, что поиск и анализ таких возможных рецепторов для коротких пептидов имеет самостоятельный интерес.

Следует отметить, что у коротких экзогенных пептидов впервые выявлена контрольная функция регуляции генов пептидных регуляторов. В частности, это выражается в контроле короткими пептидами за экспрессией генов, кодирующих известные более длинные регуляторные полипептиды. Одни (короткие) пептиды контролируют экспрессию других, т.е. найдены своеобразные регуляторы регуляторов, действие которых осуществляется путем модуляции экспрессии генов. Можно предположить, что в процессе жизнедеятельности растений, образованные в результате деградации белков (как собственных, так и чужеродных) короткие (из 2–4 аминокислотных остатков) пептиды могут проявлять регуляторную активность, и действие их в клетке может быть (в какой-то мере) сходно с действием гормонов. Оно носит сигнальный характер и, по-видимому, имеет эпигенетическую природу. Короткие пептиды могут рассматриваться как перспективные регуляторы роста растений нового поколения, и они безусловно найдут применение в экспериментальном и практическом растениеводстве. К сожалению, молекулярные механизмы регуляторного действия коротких пептидов на экспрессию генов все еще неясны. Одним из возможных механизмов действия коротких пептидов на уровень экспрессии генов, имеющим эпигенетический характер, является ингибирование процесса метилирования промоторной области гена в результате блокирования его пептидом.

Таким образом, использованные нами короткие пептиды физиологически активны как у животных, так и у растений. У тех и других они, в основном, контролируют рост, развитие и клеточную дифференцировку путем регуляции экспрессии генов. Это может свидетельствовать о существовании общих механизмов пептидной регуляции жизнедеятельности у эукариот и об эволюционно раннем происхождении этих общих регуляторов и соответствующих регуляторных механизмов.

#### Благодарности

Авторы благодарят Алексеева Я.И. и Кузубова А.В. за синтез и предоставление праймеров.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФ (грант 14-50-00029).

В работе использовано оборудование Центра коллективного пользования ФГБНУ ВНИИСБ РАН.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khavinson, V.Kh., and Malinin, V.V. (2005) *Gerontological aspects of genome peptide regulation*, Karger AG, Basel (Switzerland), pp. 104.
2. Khavinson, V.Kh., Tendler, S.M., Vanyushin, B.F., Kasyanenko, N.A., Kvetnoy, I.M., Linkova, N.S., Ashapkin, V.V., Polyakova, V.O., Basharina, V.S., and Bernadotte, A. (2014) Peptide regulation of gene expression and protein synthesis in bronchial epithelium, *Lung*, **192**, 781–791.
3. Khavinson, V.Kh., Tendler, S.M., Kasyanenko, N.A., Tarnovskaya, S.I., Linkova, N.S., Ashapkin, V.V., Yakutseni, P.P., and Vanyushin, B.F. (2015) Tetrapeptide KEDW interacts with DNA and regulates gene expression, *Am. J. Biomed. Sci.*, **7**, 156–169.
4. Хавинсон В.Х., Федореева Л.И., Ванюшин Б.Ф. (2011) Короткие пептиды модулируют действие эукариотических эндонуклеаз из проростков пшеницы, *Докл. РАН*, **437**, 124–127.
5. Motomitsu, A., Sawa, S., and Ishida, T. (2015) Plant peptide hormone signaling, *Essays Biochem.*, **58**, 115–131.
6. Czyniewicz, N., Yue, K., Beeckman, T., and De Smet, I. (2013) Message in a bottle: small signalling peptide outputs during growth and development, *J. Exp. Bot.*, **64**, 5281–5296.
7. Tavormina, P., De Coninck, B., Nikonorova, N., De Smet, I., and Cammue, B. (2015) The plant peptidome: an expanding repertoire of structural features and biological functions, *Plant Cell*, **27**, 2095–2118.
8. Murphy, E., Smith, S., and De Smet, I. (2012) Small signalling peptides in Arabidopsis development: how cells communicate over a short distance, *Plant Cell*, **24**, 3198–3217.
9. Wang, G., Zhang, G., and Wu, M. (2016) CLE peptide signaling and crosstalk with phytohormones and environmental stimuli, *Front. Plant Sci.*, **6**, 1211.
10. Федореева Л.И., Киреев И.И., Хавинсон В.Х., Ванюшин Б.Ф. (2011) Проникновение коротких флуоресцентно-меченых пептидов в ядро в клетках HeLa и специфическое взаимодействие пептидов с дезоксирибополионуклеотидами и ДНК *in vitro*, *Биохимия*, **76**, 1505–1516.
11. Srinivasan, C., Liu, Z., and Scorza, R. (2011). Ectopic expression of class *IKNOX* genes induce adventitious shoot regeneration and alter growth and development of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and European plum (*Prunus domestica* L.), *Plant Cell Rep.*, **30**, 655–664.
12. Wenjin, Zhang, and Rongming, Yu. (2014) Molecular mechanism of stem cells in *Arabidopsis thaliana*, *Pharmacogn. Rev.*, **8**, 105–112.
13. Kuijt, S.J.H., Greco, R., Agolou, A., Shao, J., 't Hoen, C.C., Overnas, E., Osnato, M., Curiale, S., Meynard, D., Van Gulik, R., De Faria Maraschin, S., Atallah, M., De Kam, R.J., Lamers, G.E., Guiderdoni, E., Rossini, L., Meijer, A.H., and Ouwkerk, P.B. (2014) Interaction between the growth-regulating factor and KNOTTED1-like homeobox families of transcription factors, *Plant Physiol.*, **164**, 1952–1996.
14. Федореева Л.И., Смирнова Т.А., Коломийцева Г.Я., Хавинсон В.Х., Ванюшин Б.Ф. (2013) Взаимодействие коротких биологически активных пептидов с FITS-мечеными гистонами пшеницы и их комплексы с дезоксирибополионуклеотидами, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 230–242.
15. Omidbakhshfar, M.A., Proost, S., Fujikura, U., and Mueller-Roeber, B. (2015) Growth-regulating factors (GRFs): a small transcription factor family with important functions in plant biology, *Mol. Plant*, **8**, 998–1010.
16. Kim, J.S., Mizoi, J., Kidokoro, S., Maruyama, K., Nakajima, J., Nakashima, K., Mitsuda, N., Takiguchi, Y., Ohme-Takagi, M., Kondou, Y., Yoshizumi, T., Matsui, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012) *Arabidopsis* growth-regulating factor7 functions as a transcriptional repressor of abscisic acid- and osmotic stress-responsive genes, including *DREB2A*, *Plant Cell*, **24**, 3393–3405.
17. Кирнос М.Д., Александровичкина Н.И., Ванюшин Б.Ф. (1981) 5-метилцитозин в пиримидиновых последовательностях ДНК растений и животных: специфичность метилирования, *Биохимия*, **46**, 1458–1474.

**SHORT EXOGENOUS PEPTIDES REGULATE  
EXPRESSION OF *CLE*, *KNOX1*, AND *GRF*  
FAMILY GENES IN *Nicotiana tabacum***

**L. I. Fedoreyeva<sup>1,2</sup>, T. A. Diloarova<sup>1</sup>, V. V. Ashapkin<sup>2</sup>,  
Yu. Ts. Martirosyan<sup>1</sup>, V. Kh. Khavinson<sup>3</sup>, P. N. Kharchenko<sup>1</sup>,  
and B. F. Vanyushin<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup> *All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology,  
Russian Academy of Sciences, 127550 Moscow, Russia;  
E-mail: vanyush@belozersky.msu.ru*

<sup>2</sup> *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,  
Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

<sup>3</sup> *Saint Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology,  
Russian Academy of Sciences, 197110 St. Petersburg, Russia*

Received September 26, 2016

Revision received November 18, 2016

The biologically active in animals short exogenous peptides Epitalon (Ala-Glu-Asp-Gly), Bronchogen (Ala-Glu-Asp-Leu), and Vilon (Lys-Glu) at concentrations  $10^{-7}$ – $10^{-9}$  M significantly influence growth, development, and differentiation in callus culture of *Nicotiana tabacum* tobacco plants. Epitalon and Bronchogen, in particular, strongly induce both plant tissue growth and stimulate formation and growth of leaves in plant regenerants. Thus, these peptides regulate formation of organs in plants. As far as the regulatory effects of peptides investigated were observed at very low concentrations, the activity of the peptides in the plant cell reminds to some extent plant hormone action, it is of signaling character and seems to have mainly epigenetic nature. The peptides investigated modulate gene-specifically the gene expression in tobacco cells including transcription of genes responsible for cell differentiation and formation of plant organs. These peptides modulate differently expression of the *CLE* family genes coding for known endogenous regulatory peptides, the *KNOX1* family genes (transcription factor genes) and the *GRF* family genes coding for growth regulatory factors that mainly operate with DNA, such as topoisomerases, nucleases, and others. Epitalon and Bronchogen mainly stimulate but dipeptide Vilon inhibits the expression of individual genes. Thus, in plants at the gene expression level, the system of short peptide regulation of formation of known longer peptide growth regulators is observed. In other words, short peptides control other known regulatory peptides. The investigated small peptides seem to be properly called plant growth regulators (PGR) of a new generation. Certainly, these new PGRs may be efficient to use in experimental botany, plant molecular biology, and biotechnology, as well as in a practical agronomy.

**Keywords:** cell differentiation, *Nicotiana tabacum*, gene expression, short peptides, plant growth regulation