

Локусы лизин-специфических деметилаз у растений способны транскрибировать кольцевые молекулы РНК

Бурсаков С.А.*, Драгни А.Г., Ефремов Л.Н., Князев А.Н., Дивашук М.Г.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва, Россия

* sergeymoscu@gmail.com

Ключевые слова: деметилирование гистона H3K27me3; кольцевые РНК; эпигенетика; *Arabidopsis thaliana*; *Glycine max*; *Solanum lycopersicum*; *Triticum aestivum*; *Zea mays*

Мотивация и цель: Метилирование гистонов является одним из ключевых эпигенетических механизмов, влияющих на рост и развитие растений в различных условиях. Этот процесс включает добавление метильных групп к аминокислотным остаткам в гистонах, что изменяет структуру хроматина и регулирует доступность ДНК для ферментов, участвующих в транскрипции. Существует множество видов метилирования гистонов, среди которых метилирование лизина 27 в гистоне H3 (H3K27me3) представляет собой яркий пример проявления сайленсинга генов, являющийся консервативным в царстве животных и растений [1]. Деметилирование H3K27me3 – обратный процесс, удаление метильных групп с лизина, что приводит к релаксации хроматина и увеличению транскрипции генов. Лизин-специфические деметилазы – белки, осуществляющие деметилирование. В настоящее время известно участие генов деметилаз в процессах роста и развития (прорастание семян, цветение), формировании стрессовых ответов на абиотические факторы, такие как засуха и засоление [2]. У арабидопса показано участие генов деметилаз в переходе к цветению, в формировании солеустойчивости, в ответе к повышенной температуре, в прорастании семян на свету и др. [3–6]. У томата показано участие Histone H3K27me3 demethylase SIJM3 в созревании плодов [7], а у сахарного тростника – как ответ на засуху [8]. Таким образом, деметилирование гистонов представляет собой мощный инструмент для улучшения агрономических характеристик и устойчивости сельскохозяйственных культур.

Кольцевые РНК (circRNA) участвуют, вероятно, в механизме регуляции экспрессии генов деметилаз. CircRNA – это класс РНК, образованных из прекурсорных молекул мРНК. Их общим свойством является образование кольцевой структуры. Изучение кольцевых РНК у растений привлекает внимание исследователей прежде всего из-за их возможности регулировать экспрессию генов. Возможным механизмом их действия является способность некоторых кольцевых РНК выступать губками миРНК, тем самым освобождая потенциальные мишени протеинкодирующих генов миРНК. Кроме того, показано, что кольцевые РНК могут регулировать экспрессию родительского гена, связываясь с промоторным регионом. Немаловажным является свойство кольцевых РНК влиять на трансляцию линейных мРНК, повышая или снижая синтез целевого белка. И наконец, кольцевые РНК могут быть мишенями для РНК-связывающих белков, выступая конкурентами для их линейных аналогов. Разнообразие механизмов действия кольцевых РНК позволяет влиять на

различные биологические процессы в растениях. Ранее была показана роль некоторых РНК при росте, развитии и формировании ответов на стрессовые факторы у арабидопсиса, томата, риса и др. [9, 10]. Однако влияние кольцевых РНК на механизм метилирования гистонов не выявлено.

Целью работы был поиск и анализ кольцевых РНК, расположенных в локусах генов гистоновых деметилаз у растений *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Solanum lycopersicum*, *Triticum aestivum* и *Zea mays*.

Методы и алгоритмы: В работе мы использовали базу данных PlantcircBase 7.0, содержащую информацию по предсказанным circRNA, с их нуклеотидными последовательностями, локализацией на геномах и возможном взаимодействии с miRNA для растений арабидопсиса, томата и мягкой пшеницы [11]. Аннотированные геномы были взяты из Phytozome [12]. Пересечение локусов кольцевых РНК с аннотированными участками геномов использовали инструменты bedtools и samtools. Визуализация и обработка данных проводились в R studio соответствующими пакетами работы с табличными данными. Для работы с нуклеотидными последовательностями извлеченных из баз данных и построения филогенетических деревьев использовали Ugene [13]. Для валидации кольцевых РНК использовали ОТ-ПЦР с подбором праймеров на линейные и кольцевые молекулы с использованием Primer3. Выделение РНК, обратную транскрипцию и ПЦР проводили по стандартной методике, описанной ранее [14]. Растения выращивали в климатических камерах 16/8 светового дня и температурой 25 °С.

Результаты: Анализ существующих геномных баз данных и имеющихся предсказанных кольцевых РНК растений арабидопсиса, томата, пшеницы, сои и кукурузы показал, что в генах лизин-специфических деметилаз могут быть сайты обратного сплайсинга, которые указывают на возможность образования кольцевых РНК. Сайты обратного сплайсинга имеются не во всех локусах гистоновых деметилаз у рассматриваемых растений. Доказательства формирования кольцевых структур с использованием ОТ-ПЦР получены для некоторых кольцевых РНК выбранных нами растений. Показана низкая экспрессия кольцевых РНК локусов лизин-специфических деметилаз по сравнению с линейным аналогом. Такая экспрессия может быть объяснена отсутствием стрессовых условий выращивания растений. Некоторые кольцевые РНК генов гистоновых деметилаз могут выступать мишенями miRNA. Выявлена низкая консервативность среди проанализированных кольцевых РНК, расположенных в генах лизин-специфических деметилаз.

Выводы: Отдельные гены лизин-специфических деметилаз у арабидопсиса, томата, сои, пшеницы и кукурузы могут транскрибировать кольцевые молекулы РНК. Наличие таких молекул указывает на возможность регуляции экспрессии соответствующих генов кольцевыми структурами, приводящей к эпигенетическим изменениям. Планируемые исследования влияния кольцевых молекул РНК на уровень деметилирования H3K27me позволят разработать новый механизм регулирования роста, развития и повышения устойчивости сельскохозяйственных растений к стрессовым факторам.

Финансирование: Исследование поддержано государственным заданием FGUM-2022-0007.

Lysine-specific demethylase loci in plants are capable of transcribing circRNA molecules

Bursakov S.A.*, Dragni A.G., Efremov L.N., Knyazev A.N., Divashuk M.G.

Federal State Budgetary Scientific Institution "All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology", Moscow, Russia

* sergeymoscu@gmail.com

Key words: histone H3K27me3 demethylation; circular RNAs; epigenetics; *Arabidopsis thaliana*; *Glycine max*; *Solanum lycopersicum*; *Triticum aestivum*; *Zea mays*

Motivation and Aim: Histone methylation is one of the key epigenetic mechanisms affecting plant growth and development under various conditions. This process involves the addition of methyl groups to amino acid residues in histones, which changes the structure of chromatin and regulates the availability of DNA for enzymes involved in transcription. There are many types of histone methylation, among which the methylation of lysine 27 in histone H3 (H3K27me3) is a striking example of gene silencing manifestation that is conserved in the animal and plant kingdom [1]. Demethylation of H3K27me3 is the reverse process, removal of methyl groups from lysine, which leads to chromatin relaxation and increased gene transcription. Lysine-specific demethylases – proteins that carry out demethylation. It is now known that demethylase genes participate in the processes of growth and development (seed germination, flowering), formation of stress responses to abiotic factors such as drought and salinity [2]. In *Arabidopsis*, demethylase genes have been shown to be involved in the transition to flowering, in the formation of salt tolerance, in the response to elevated temperature, in seed germination under light, etc. [3–6]. In tomato, Histone H3K27me3 demethylase SIJM3 has been shown to be involved in fruit ripening [7], and in sugarcane as a response to drought [8]. Thus, histone demethylation is a powerful tool for improving agronomic traits and crop stability.

Circular RNAs (circRNAs) are probably involved in the mechanism of regulation of demethylase gene expression. CircRNAs are a class of RNAs formed from precursor mRNA molecules. Their common property is the formation of a ring structure. The study of circular RNAs in plants attracts the attention of researchers primarily because of their ability to regulate gene expression. A possible mechanism of their action is the ability of some circular RNAs to act as miRNA sponges, thereby releasing potential targets of protein-coding miRNA genes. In addition, it has been shown that circular RNAs can regulate the expression of the parental gene by binding to the promoter region. The property of circular RNAs to influence the translation of linear mRNAs by increasing or decreasing the synthesis of the target protein is also important. Finally, circular RNAs can act as targets for RNA-binding proteins, acting as competitors for their linear analogs. The diversity of mechanisms of action of circular RNAs makes it possible to influence various biological processes in plants. The role of some RNAs in the growth, development, and formation of responses to stress factors in *Arabidopsis*, tomato, rice, etc. was shown earlier [9, 10]. However, the influence of circular RNAs on the mechanism of histone methylation has not been revealed.

The aim of this work was to search for and analyze circular RNAs located in the loci of histone demethylase genes in *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Solanum lycopersicum*, *Triticum aestivum*, and *Zea mays* plants.

Methods and Algorithms: In this work, we used PlantcircBase 7.0 database containing information on predicted circRNAs, with their nucleotide sequences, localization on genomes and possible interaction with miRNAs for *Arabidopsis*, tomato and soft wheat plants [11]. Annotated genomes were taken from Phytozome [12]. Intersection of circular RNA loci with annotated regions of the genomes was performed using bedtools and samtools tools. Data visualization and processing were performed in R studio using appropriate packages for working with tabular data. Ugene [13] was used to work with nucleotide sequences extracted from databases and to construct phylogenetic trees. To validate the circular RNAs, we used RT-PCR with primer selection on linear and circular molecules using Primer3. RNA isolation, reverse transcription, and PCR were performed according to the standard method described previously [14]. Plants were grown in climatic chambers of 16/8 daylight hours and 25 °C temperature.

Results: Analysis of existing genomic databases and available predicted circular RNAs from plants of *Arabidopsis*, tomato, wheat, soybean, and maize showed that there may be reverse splicing sites in lysine-specific demethylase genes that indicate the possibility of circular RNA formation. Reverse splicing sites are not present in all loci of histone demethylases in the plants under consideration. Evidence for the formation of ring structures using OT-PCR was obtained for some ring RNAs of our selected plants. Low expression of the ring RNA loci of lysine-specific demethylases was shown compared to the linine analog. This expression can be explained by the absence of stressful conditions of plant cultivation. Some circular RNAs of histone demethylase genes may act as miRNA targets. Low conservation among the analyzed circular RNAs located in the genes of lysine-specific demethylases was revealed.

Conclusion: Some genes of lysine-specific demethylases in *arabidopsis*, tomato, soybean, wheat, and maize can transcribe circular RNA molecules. The presence of such molecules indicates the possibility of regulation of expression of co-relevant genes by ring structures, leading to epigenetic changes. The planned studies of the influence of RNA ring molecules on the level of demethylation of H3K27me will make it possible to develop a new mechanism to regulate growth, development and increase the resistance of agricultural plants to stress factors.

Funding: The study is supported by the State Assignment FGUM-2022-0007.

Список литературы/References

1. Xiao J., Wagner D. Polycomb repression in the regulation of growth and development in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol.* 2015;23:15-24. doi 10.1016/j.pbi.2014.10.003
2. Crevillén P. Histone demethylases as counterbalance to H3K27me3 silencing in plants. *iScience.* 2020;23(11):101715. doi 10.1016/j.isci.2020.101715
3. He K., Mei H., Zhu J., Qiu Q., Cao X., Deng X. The histone H3K27 demethylase REF6/JMJ12 promotes thermomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Natl Sci Rev.* 2022;9(5):nwab213. doi 10.1093/nsr/nwab213
4. Yang W., Jiang D., Jiang J., He Y. A plant-specific histone H3 lysine 4 demethylase represses the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2010;62(4):663-673. doi 10.1111/j.1365-313X.2010.04182.x
5. Shen Y., Conde e Silva N., Audonnet L., Servet C., Wei W., Zhou D.-X. Over-expression of histone H3K4 demethylase gene JMJ15 enhances salt tolerance in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci.* 2014;5:290. doi 10.3389/fpls.2014.00290
6. Wang Y., Gu D., Deng L., He C., Zheng F., Liu X. The histone H3K27 demethylase REF6 is a positive regulator of light-initiated seed germination in *arabidopsis*. *Cells.* 2023;12(2):295. doi 10.3390/cells12020295

7. Li Z. et al. Histone H3K27 demethylase SlJMJ3 modulates fruit ripening in tomato. *Plant Physiol.* 2024;kiae233. doi 10.1093/plphys/kiae233
8. Yu G. et al. H3K27 demethylase SsJMJ4 negatively regulates drought-stress responses in sugarcane. *J Exp Bot.* 2024;75(10):3040-3053. doi 10.1093/jxb/erae037
9. Liu R., Ma Y., Guo T., Li G. Identification, biogenesis, function, and mechanism of action of circular RNAs in plants. *Plant Commun.* 2023;4(1):100430. doi 10.1016/j.xplc.2022.100430
10. Chu Q. et al. Recent origination of circular RNAs in plants. *New Phytol.* 2021;233(1):515-525. doi 10.1111/nph.17798
11. Xu X. et al. PlantcircBase 7.0: Full-length transcripts and conservation of plant circRNAs. *Plant Commun.* 2022;3(4):100343. doi 10.1016/j.xplc.2022.100343
12. Goodstein D.M. et al. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(D1):D1178-D1186. doi 10.1093/nar/gkr944
13. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 2012;28(8):1166-1167. doi 10.1093/bioinformatics/bts091
14. Fesenko I. et al. Distinct types of short open reading frames are translated in plant cells. *Genome Res.* 2019;29(9):1464-1477. doi 10.1101/gr.253302.119