

УДК 581.1

ИНАКТИВАЦИЯ ГЕНА МЕМБРАННОГО РЕЦЕПТОРА ЦИТОКИНИНА АНК2 ВЫЗЫВАЕТ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНУЮ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ТРАНС-ФАКТОРОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РЕГУЛЯЦИИ СТАРЕНИЯ ЛИСТЬЕВ *ARABIDOPSIS THALIANA*¹

© 2021 г. Н. В. Кудрякова^{a, *}, М. Н. Данилова^a, А. А. Андреева^a, А. С. Дорошенко^a,
А. В. Клепикова^{b, c}, В. Ю. Штратникова^d, В. В. Кузнецов^a

^aИнститут физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

^bСколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

^cИнститут проблем передачи информации Российской академии наук, Москва, Россия

^dНаучно-исследовательский институт им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: nvkudryakova@mail.ru

Поступила в редакцию 26.03.2021 г.

После доработки 02.04.2021 г.

Принята к публикации 02.04.2021 г.

Старение листьев инициируется дифференциальной экспрессией генов транскрипционных факторов и контролируется различными фитогормонами, среди которых важная роль принадлежит цитокининам (ЦК), осуществляющим негативную регуляцию данного процесса. Согласно результатам проведенного нами транскриптомного анализа и ПЦР в режиме реального времени избранных генов, задержка старения листьев у мутантов с инактивированным геном рецептора ЦК АНК2 была связана с измененной экспрессией генов *транс*-факторов, принадлежащих к семействам AP2-EREBP, bHLH, C2H2, GATA, MYB, NAC и WRKY. Наиболее значимые количественные изменения у мутантов *ahk2*, по сравнению с листьями растений дикого типа, наблюдались в профиле экспрессии генов *bHLH38*, *bHLH39* и *bHLH100* из пула регуляторов поглощения железа. Значительно повышенные уровни транскриптов этих генов были сопряжены с активацией генов *FEP2* (*AT1G47395*) и *FEP3* (*AT1G47400*), способных при дефиците железа индуцировать экспрессию *bHLH38* и *bHLH39*. Увеличенная экспрессия генов *DREB26*, *ESE3*, *GATA4*, *ETC2* и *F11O4.13* сопровождалась повышенным накоплением транскриптов гена арабиногалактонового белка *AGP17*, а также генов *IBL1*, *BEE2*, *Ole e 1* и *GDSL*, связанных с регуляцией белков клеточной стенки. Таким образом, рецептор АНК2, с которым принято отождествлять вспомогательную роль в восприятии сигнала ЦК листьями, ассоциирован со специфичным набором генов, вовлеченных в регуляцию оттока железа и деградации компонентов клеточной стенки на финальных стадиях онтогенеза листа.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, старение, мутанты, транскриптом, *транс*-факторы, цитокинины

DOI: 10.31857/S0015330321060087

ВВЕДЕНИЕ

Старение листьев – сложный и строго регулируемый процесс, который является неотъемлемой частью программы развития растений [1]. В его основе лежит ремобилизация питательных компонентов, накопленных в стареющем листе, в молодые

листья или запасающие органы растения. У монокарпических растений, к числу которых относится *Arabidopsis*, старение листьев строго подчинено репродуктивной программе, на реализацию которой, вместе с тем, оказывают влияние сигналы среды [2]. Эта цепь событий сопровождается перепрограммированием транскриптома, которое инициируется дифференциальной экспрессией транскрипционных факторов (ТФ). Связываясь с *цис*-элементами промоторной области целевых генов, *транс*-факторы изменяют их экспрессию, вызывая активацию и/или подавление.

¹ К статье имеются дополнительные материалы, доступные для авторизированных пользователей по doi: 10.31857/S0015330321060087

Сокращения: ЦК – цитокинины, ОТ ПЦР РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени после обратной транскрипции, АНК – *Arabidopsis Histidine Kinase*, ТФ – *транс*-фактор, ДТ – дикий тип.

Известно, что гены *транс*-факторов составляют 5–6% (примерно 1250 генов) от общего ядерного генома *Arabidopsis*, а в регуляции старения принимают участие около 200 генов, принадлежащих преимущественно к семействам NAC, WRKY, MYB, C2H2, zinc-finger, bZIP и AP2/EREB [3]. Некоторые из этих генов возникли в результате дупликаций генома *Arabidopsis* в процессе эволюции, что имело следствием появление дублированных пар с частичной генетической избыточностью, способствующей поддержанию механизмов функциональной компенсации при реализации программ старения. К их числу, в частности, относится ряд генов транскрипционных факторов семейств NAC, WRKY и TCP [4]. В процессе эволюции некоторые из этих *транс*-факторов смогли полностью сохранить сети сопряженных с ними целевых генов и характер пространственно-временной регуляции, тогда как другие, в условиях низкого селективного давления, приобрели новые функции за счет нейтральных мутаций.

Принято считать, что *транс*-факторы, индуцируемые при старении листьев, являются активными участниками этого процесса, тогда как ингибируемые *транс*-факторы, экспрессия которых подавляется, могут отражать общее падение активности листа и не быть его непосредственными регуляторами. Однако часть ингибируемых регуляторов может функционировать в молодых листьях в качестве репрессоров старения [3]. Этот механизм позволяет избежать энергетически затратных деструктивных процессов в молодых листьях, даже при неблагоприятных условиях среды.

Инициация и развитие старения листа связаны с комплексной активностью сигнальных путей различных фитогормонов, которые могут быть его позитивными или негативными регуляторами. При этом рост содержания некоторых позитивных регуляторов на поздних стадиях старения листа (этилен, салициловая и жасмоновая кислоты) определяется не только их регуляторной функцией, но и ролью в защите растений от инфекций, к которым стареющие листья особо восприимчивы [2]. Цитокинины (ЦК) являются универсальными ретардантами старения. Они влияют на этот процесс, главным образом, через регуляцию транскрипционной сети, действуя ниже участка восприятия гормонального сигнала [5]. Известно, что из двух рецепторов ЦК, которым принадлежит основная роль в восприятии сигнала ЦК в листьях, АНК3 отвечает за ЦК-зависимую задержку старения через специфичное фосфорилирование транскрипционного фактора ARR2 [6]. АНК2, напротив, является позитивным регулятором старения [7], однако молекулярные механизмы действия этого рецептора не вполне ясны. В процессе старения, безусловно, происходит также значительное изменение экспрессии пластидного генома. В предыдущей работе мы показали,

что регуляторное влияние рецепторов ЦК на геном пластид при старении может быть связано с изменением экспрессии ядерных генов, кодирующих аппарат транскрипции хлоропластов [7]. В представленном исследовании, опираясь на данные транскриптомного профилирования, мы предприняли попытку выяснить, какие транскрипционные факторы, участвующие в контроле старения листа, интегрированы с рецептором АНК2. Анализ предполагаемых мишеней таких *транс*-факторов позволит в дальнейшем выявить специфичные последовательности генов, регулируемые АНК2, которые вовлечены в сферу влияния этого рецептора в процессе старения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования транскриптомов были выбраны одинарный и два двойных мутанта *Arabidopsis thaliana* (*ahk2*, *ahk2ahk3* и *ahk2ahk4*), несущих гомозиготную мутацию в гене АНК2, которая делает соответствующий рецептор нефункциональным, а также исходный экотип Columbia-0 (дикий тип, ДТ). Мутанты имели пролонгированный период вегетации, что подтверждалось результатами анализа содержания хлорофилла, значений максимального квантового выхода ФСII F_v/F_m и экспрессии генов *SAG* [8]. Кроме того, в анализ включили двойной мутант *ahk3ahk4* с ускоренным старением, где АНК2 является единственным активным рецептором. Растения выращивали в почве при температуре 22°C, 16-часовом фотопериоде и освещенности 100 мкмоль/(м² с). Для экспериментов использовали шестой лист 7-недельных растений.

Библиотеки мРНК для RNA-seq анализа получали на основе тотальной РНК, выделенной с помощью Trizol (Invitrogen) из шестого листа 7-недельных растений *Arabidopsis* [7]. Библиотеки готовили набором NEBNext Ultra II RNA Library Prep, с использованием NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module ("New England Biolabs", США) согласно инструкциям производителя (метод более подробно описан в статье [8]). Секвенирование проводили с использованием платформы Illumina HiSeq4000 ("Illumina Inc.", США) с получением не менее 25 миллионов одноконцевых чтений длиной 50 нуклеотидов. Дальнейшая обработка чтений проводилась с помощью программы CLC Genomics Workbench 7.0.3 ("Qiagen", Нидерланды). Полученные чтения были отфильтрованы по качеству с удержанием только тех позиций, которые имели качество больше 20 и чтений с длиной более 25 нуклеотидов и картированы на референсный геном *A. thaliana* (TAIR10) со следующими установками: доля выравненного участка – 100%, порог по уровню сходства – 94%, штраф за несовпадение – 2, штраф за индель – 3, допускаются только уникальные картирования. В результате было получено в среднем 22.5 миллионов высоко-

Таблица 1. Гены ТФ семейства *NAC*, которые изменяли свою экспрессию в два и более раза в листьях стареющих мутантных растений *A. thaliana*.

Название гена	Локус	FC*			
		<i>ahk2</i> /ДТ	<i>ahk2ahk3</i> /ДТ	<i>ahk2ahk4</i> /ДТ	<i>ahk3ahk4</i> /ДТ
<i>NAC3/ANAC055</i>	<i>AT3G15500</i>	–	–4.012	–	–3.925
<i>ORE1(NAC6)</i>	<i>AT5G39610</i>	–	–2.848		
<i>NAC046</i>	<i>AT3G04060</i>	–2.486	–4.660		
<i>AtNAP</i>	<i>AT1G69490</i>		–3.51		–4.67
<i>ATAF1</i>	<i>AT1G01720</i>				
<i>ORS1</i>	<i>AT2G41230</i>				
<i>VNI2</i>	<i>AT5G13180</i>		–2.120		
<i>JUB1</i>	<i>AT2G43000</i>		–3.582		
<i>NAC019</i>	<i>AT1G52890</i>		–6.134		
<i>RD26/ANAC07</i>	<i>AT4G27410</i>		–3.405		
<i>ANAC087</i>	<i>AT5G18270</i>		–10.588		
<i>NAC084</i>	<i>AT5G14000</i>	–5.924	–6.510	–4.529	–4.579
<i>NAC060</i>	<i>AT3G44290</i>				42.991
<i>NAC047</i>	<i>AT3G04070</i>	–3.333	–2.941	–9.090	

Примечание: * FC (fold change) – изменение уровня экспрессии гена.

кокачественных уникально картированных чтений для каждого образца.

Для последующего подтверждения данных RNA-seq анализа относительный уровень транскриптов, обнаруживших наиболее значимые изменения в экспрессии, оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени после обратной транскрипции (ОТ ПЦР РВ) на приборе LigthCyclerR96 (“Roche”, Швейцария) согласно протоколу, описанному ранее [8]. Специфичные пары праймеров к исследуемым генам подбирали с помощью программы Vector NT11 (Дополнительные материалы табл. S1). В качестве референсного гена использовали *UBQ10*.

Статистический анализ. Все эксперименты проводили в трех биологических повторностях. Достоверность различий между опытными и контрольными образцами оценивали с помощью критерия Стьюдента. На рисунках приведены средние значения и стандартные ошибки средних.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дифференциальная экспрессия генов транс-факторов при старении листьев мутантов по гену АНК2

Из общего пула генов, кодирующих транскрипционные факторы, которые выявили дифференциальную экспрессию у мутантов с инактивированным рецептором АНК2 (50 – у *ahk2*, 128 – у *ahk2ahk3* и 24 – у *ahk2ahk4*) мы выделили гены ТФ, участвующие в регуляции старения [1,

3, 4]. Далее эти гены, были классифицированы по семействам с использованием списка генов ТФ сайта AtTFDB (<http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtTFDB/>).

Центральными участниками в модуляции транскрипционных изменений при старении принято считать семейства *NAC* и *WRKY* [3]. Максимальное число генов *NAC*, обнаруживших пониженную по сравнению с диким типом экспрессию, отмечено у мутанта *ahk2/3* (табл. 1), для которого характерны наиболее замедленные темпы старения [8]. В их число входили не только позитивные (*ORE1/6*, *ANAC046*, *NAP*, *NAC019*), но и негативные (*VNI2/83*, *JUB1/42*) регуляторы старения [9, 4]. Возможной причиной подавления экспрессии негативных регуляторов может быть их одновременное участие в регуляторных сетях, не связанных со старением. При этом пониженная экспрессия, выявленная для *NAC084* у всех исследованных мутантов, не зависела от типа или числа инактивированных рецепторов. Можно предполагать, что регуляция экспрессии этого гена определяется скорее нарушениями в нормальном восприятии цитокининового сигнала, чем пролонгированным или укороченным периодом вегетации листьев. Более предсказуемой оказалась реакция позитивного регулятора старения *NAC060*. У мутанта *ahk3/4* уровень транскриптов *NAC060* был повышен более, чем в 40 раз по сравнению с диким типом (табл. 1). *NAC060* в свою очередь, способен регулироваться абсцизовой кислотой через фактор транскрипции *ABI4* и ослаблять ее эф-

Таблица 2. Гены ТФ семейства *WRKY*, которые изменяли свою экспрессию в два и более раза в листьях стареющих мутантных растений *A. thaliana*.

Название гена	Локус	FC*			
		<i>ahk2</i> /ДТ	<i>ahk2ahk3</i> /ДТ	<i>ahk2ahk4</i> /ДТ	<i>ahk3ahk4</i> /ДТ
<i>WRKY6</i>	<i>AT1G62300</i>	—	–2.809	—	
<i>WRKY18</i>	<i>AT4G31800</i>	—			3.297
<i>WRKY54</i>	<i>AT2G40750</i>	5.807		5.214	4.576
<i>WRKY70</i>	<i>AT3G56400</i>			4.053	
<i>WRKY75</i>	<i>AT5G13080</i>		–15.123		
<i>WRKY45</i>	<i>AT3G01970</i>		–3.276		
<i>WRKY53</i>	<i>AT4G23810</i>		–3.426		
<i>WRKY16</i>	<i>AT5G45050</i>		2.654		

Примечание: * FC (fold change) – изменение уровня экспрессии гена.

фект, определяя тем самым нечувствительность к сахарам [10].

Семейство *WRKY*, так же, как и семейство *NAC*, включает позитивные и негативные регуляторы старения. Сниженная экспрессия была отмечена лишь у линии *ahk2ahk3* и только для позитивных регуляторов старения в соответствии с пролонгированным онтогенезом этого мутанта (табл. 2). Наиболее сильно (до 15 раз) была подавлена экспрессия гена *WRKY75*, который ускоряет старение, стимулируя, образование салициловой кислоты и частично подавляет транскрипцию *CATALASE2* [11]. Несколько слабее оказалась ингибирована экспрессия позитивного регулятора *WRKY45*, который стимулирует старение за счет взаимодействия с *DELLA* белком *RGL1* [12], а также позитивных регуляторов *WRKY6* и *WRKY53*, способных напрямую связываться с промоторами различных *SAG* генов, ассоциированных со старением [13, 14]. Негативный регулятор старения *WRKY54*, который одновременно является позитивным регулятором защитных реакций растений, продемонстрировал значительный рост экспрессии у всех мутантов за исключением *ahk2ahk3*, и, возможно, эта активация *WRKY54* была связана с защитой стареющих листьев растений от инфекций. Заметим в этой связи, что *WRKY54* коэкспрессируется с геном ответа на патогены и циркадные ритмы *PCC1*, увеличенный уровень транскриптов которого по сравнению с диким типом также был выявлен у всех изученных мутантов (9.72 – для *ahk2*/ДТ, 13.35 – для *ahk2ahk3*/ДТ и 6.19 – для *ahk3ahk4*/ДТ).

Помимо ТФ *NAC* и *WRKY* измененная экспрессия в транскриптомах стареющих листьев мутанта *ahk2ahk3* была характерна также для членов семейств *AP2-EREBP*, *bHLH*, *C2H2*, *MYB* и *GATA*. Однако дифференциальная экспрессия генов этих *транс*-факторов, как и членов семейств *NAC* и *WRKY*, выявляемая только у мутанта

ahk2ahk3, могла быть обусловлена его пролонгированным онтогенезом, не интегрированным напрямую с рецептором АНК2, через компенсаторный механизм, связанный с экспрессией генов семейства *SAUR (SMALL AUXIN UP RNAs)* и пула генов транспорта и сигналинга ауксинов [8]. При этом особенностью транскрипционного профиля мутанта *ahk3/4* с активным рецептором АНК2 было отсутствие значимых изменений в экспрессии каких-либо генов ТФ, вовлеченных в контроль естественного старения, за исключением *NAC060*. Основываясь лишь на профиле транскриптов этого мутанта, предполагать состав транскрипционной регуляторной сети, определяющей его ускоренное старение за счет рецептора АНК2, довольно сложно.

В этой связи мы сосредоточили наше внимание на транскрипционных факторах, которые выявили дифференциальную экспрессию по меньшей мере у двух мутантов с инактивированным геном рецептора АНК2. Среди членов семейств *NAC* и *WRKY* только позитивные регуляторы старения *ANAC046* и *ANAC047* продемонстрировали сниженную экспрессию одновременно у *ahk2* и *ahk2/3*. В списке генов ТФ с резко увеличенной экспрессией у обоих мутантов присутствовали два представителя семейства *ERF/AP2 DREB26* и *ESE3* (табл. 3). Семейство *ERF (ethylene-responsive element-binding factor family)* содержит у *Arabidopsis* 147 членов, сгруппированных в четыре подсемейства: *AP2*, *DREB*, *ERF* и *RAV*. В качестве транскрипционных факторов белки семейства играют ключевую роль во многих регуляторных процессах и интегрируют метаболические, гормональные и внешние сигналы, связанные с адаптацией к стрессам и ретроградным сигналингом [15].

Значимое превышение у мутантов по сравнению с диким типом (в 53.54 раза для *ahk2* и 53.01 для *ahk2ahk3*) отмечено в уровне транскриптов гена *ETC2 (AT2G30420)*, кодирующего *MYB транс*-фактор *R3*-типа (табл. 3). Белок *ETC2* участвует в дифференциации клеток эпидермиса *A. thaliana*,

Таблица 3. Гены ТФ, вовлеченные согласно списку Balazadeh et al. [3] в контроль старения листьев, которые изменяли свою экспрессию одновременно у двух мутантов по гену *АНК2*

Название ТФ	Семейство	Локус	FC*		
			<i>ahk2</i>	<i>ahk2ahk3</i>	<i>ahk2ahk4</i>
<i>T11P11.2</i>	C2H2	<i>AT2G28710</i>	-3.144	-5.984	
<i>bHLH38</i>	bHLH	<i>AT3G56970</i>	248.281	522.276	137.514
<i>DREB26</i>	AP2	<i>AT1G21910</i>	59.361	8.593	
<i>ESE3</i>	AP2	<i>AT5G25190</i>	30.682	26.118	
<i>F11O4.13</i>	bHLH	<i>AT4G01460</i>	35.049	47.868	
<i>GATA4</i>	GATA	<i>AT3G60530</i>	3.772	2.700	
<i>ETC2</i>	MYB	<i>AT2G30420</i>	53.54	53.01	

Примечание: * FC (fold change) – изменение уровня экспрессии гена.

репрессировав образование трихом и индуцируя дифференциацию корневых волосков [16]. Помимо названных функций белки семейства могут оказывать плейотропный эффект на развитие растений и время цветения, одновременно взаимодействуя с регуляторными каскадами, интегрирующими взаимодействие фитогормонов, белков клеточной стенки и структур цитоскелета [17]. Определенный интерес с точки зрения возрастных изменений клеточной стенки представляет сохранение у *ahk2* и *ahk2/3* умеренно повышенной экспрессии гена *GATA4* (*At3g60530*) из одноименного семейства *транс*-факторов, который, согласно литературным данным, коэкспрессируется с генами сборки клеточной стенки, включая гены, кодирующие экспансины, арабиногалактановые белки и гликозилгидролазы [18].

Максимальный рост экспрессии у мутантов по сравнению с диким типом (от 137 до 522 раз) был характерен для транскриптов гена *bHLH38* (*basic helix-loop-helix 38*) из подгруппы 1b семейства *bHLH*, участвующего в регуляции генов поглощения железа [19]. При этом *bHLH38* оказался единственным геном из списка *транс*-факторов, активация или сохранение повышенной экспрессии которого были отмечены у всех трех нокаут мутантов по гену *АНК2* (табл. 3). Параллельно старение листьев у растений дикого типа сопровождалось существенным снижением (вплоть до нулевых значений) уровня транскриптов генов, относимых к функциональной подкатегории “iron” – железо.

Еще один член семейства *bHLH* *F11O4.13* с резко повышенным уровнем транскриптов у мутантов *ahk2* и *ahk2ahk3* (в 37 и 47 раз соответственно) относится к подгруппе *транс*-факторов bHLH, члены которого способны взаимодействовать с комплексом компонентов SWI/SNF. Этот комплекс обеспечивает ремодуляцию хроматина, лежащую в основе многих онтогенетических программ. *F11O4.13* физически связывается с

АТФ-азой Brahma (BRM) этого комплекса, которая за счет изменения нуклеосомной позиции или конформации открывает доступ специфичным ДНК связывающим белкам к геномной ДНК [20].

Пониженная экспрессия одновременно у мутантов *ahk2* и *ahk2ahk3* была выявлена для гена *T11P11.2*, кодирующего белок, относимый к подсемейству C2H2 семейства *транс*-факторов с доменами типа “цинковые пальцы” (табл. 3). Белки, содержащие домены цинкового пальца, играют важную роль в эукариотических клетках, регулируя различные пути передачи сигналов и контролируя развитие и программируемую гибель клеток [21].

Избирательная проверка методом ОТ ПЦР РВ относительного уровня транскриптов генов, обнаруживших наиболее значимые изменения в экспрессии, подтвердила данные, выявленные при секвенировании транскриптомов, хотя значения, полученные при использовании ОТ ПЦР РВ, были, как правило, ниже, чем следовало из результатов RNA-seq анализа. На рисунке 1 приведены графики полученных результатов. По сравнению с растениями дикого типа у мутантов с инактивированным геном *АНК2* была достоверно увеличена экспрессия генов семейства *bHLH* (*bHLH38* и *F11O4.13*), а также генов семейства *ERF/AP2* (*ETC2*, *DREB26* и *ESE3*). Следует, однако, отметить, что уровень транскриптов гена *DREB26* был существенно повышен лишь у мутанта *ahk2ahk3*, а накопление транскриптов *F11O4.13*, *ETC2* и *ESE3* оказалось, кроме того, достоверно выше у мутанта *ahk2ahk4*.

Подводя итоги проведенного анализа, следует заключить, что транскрипционные факторы с дифференциальной экспрессией у мутантов по гену *АНК2* различались по своим функциям. Все они могли участвовать в контроле продолжительности жизненного цикла мутантов и подчинялись прямой или опосредованной регуляции со стороны рецепторов ЦК.

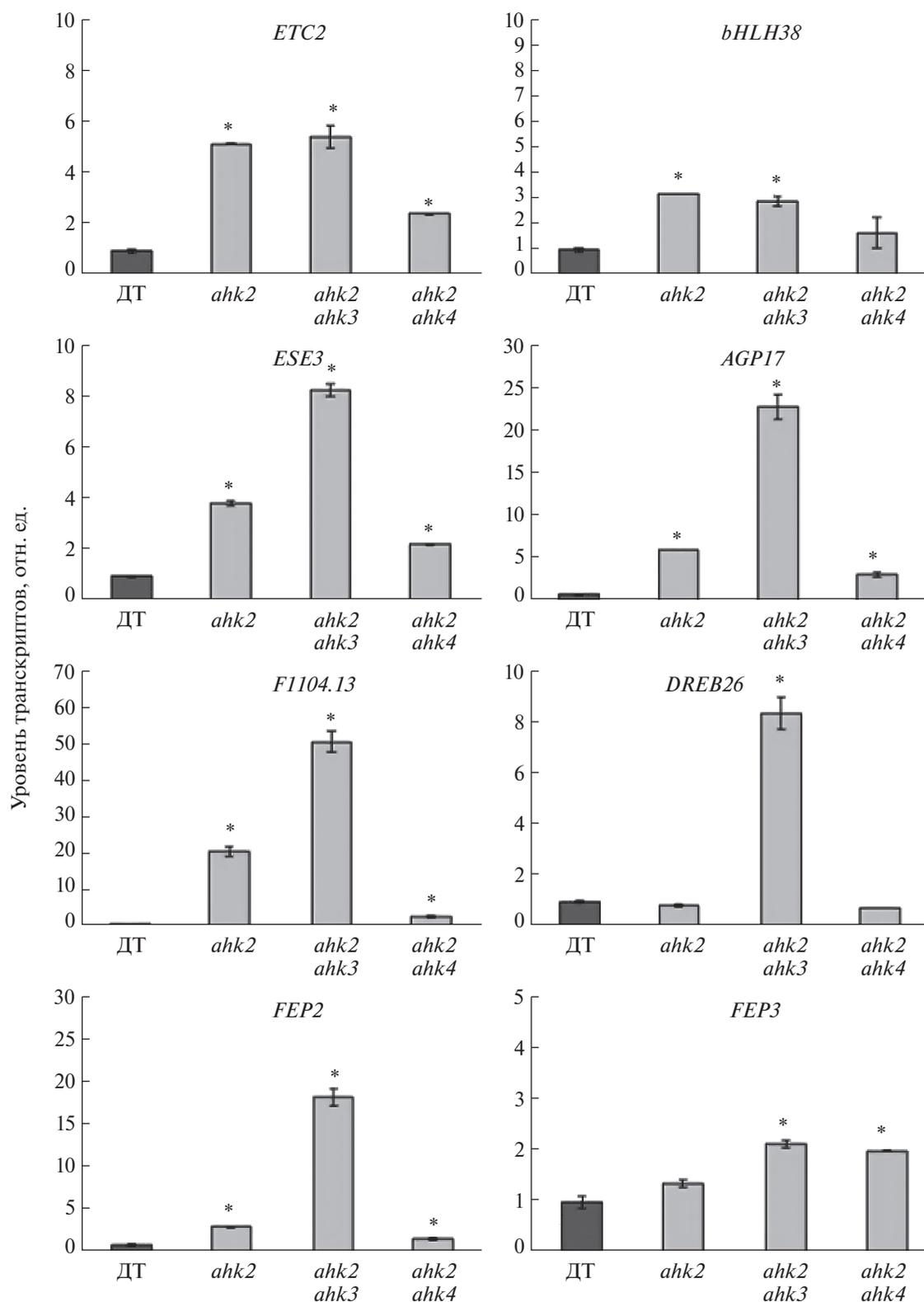


Рис. 1. Избирательная проверка методом ОТ ПЦР РВ относительного уровня транскриптов генов, обнаруживших значимые изменения в экспрессии у мутантов с инактивированным геном АНК2 по сравнению с растениями дикого типа. РНК выделяли из шестого листа 7-недельных растений *A. thaliana*. Данные представлены в виде средних значений трех биологических повторов и ошибки среднего. Достоверность различий оценивалась по критерию Стьюдента. * $P \leq 0.05$.

Таблица 4. Гены, коэкспрессирующиеся с генами АНК2-зависимых транскрипционных факторов при старении листьев *Arabidopsis*

Название гена	Локус	FC*		
		<i>ahk2</i>	<i>ahk2ahk3</i>	<i>ahk2ahk4</i> **
<i>AGP 17</i>	<i>AT2G23130</i>	20.83	41.58	
<i>IBL1</i>	<i>AT4G30410</i>	9.18	10.78	
<i>BEE2</i>	<i>AT4G36540</i>	5.91	12.12	
<i>Ole e 1</i>	<i>AT5G13140</i>	14.10	46.69	
<i>GDSL</i>	<i>AT4G01130</i>	4.61	7.31	
<i>bHLH39</i>	<i>AT3G56980</i>	119.29	191.17	
<i>bHLH100</i>	<i>AT2G41240</i>		44.29	
<i>FEP2</i>	<i>AT1G47395</i>	5.90	12.11	
<i>FEP3</i>	<i>AT1G47400</i>	9.07	14.4	

Примечание: * FC (fold change) – изменение уровня экспрессии гена. ** В мутанте *ahk2ahk4* значимых различий не обнаружено по данным RNA-seq анализа, однако при анализе отдельных генов ОТ ПЦР РВ были получены некоторые различия.

Анализ генов, коэкспрессирующихся с генами АНК2-зависимых транскрипционных факторов, при старении листьев A. thaliana

Для выявления возможных функций транскрипционных факторов в регуляции старения нами был проведен анализ *in silico* коэкспрессирующихся с ними генных сетей (*bar.utoromto.ca*) и последующее сопоставление баз данных с транскрипционными профилями мутантов. Повышенный уровень экспрессии двух представителей семейства ERF/AP2 *DREB26* и *ESE3* сопровождался активацией гена *AGP17* (*AT2G23130*), который кодирует арабиногалактановый белок, локализованный в плазматических мембранах и нитях Гекта (Hechtian strands) [22]. AGP участвуют в различных процессах, например, в пролиферации клеток, передаче клеточных сигналов, нацеливании на пыльцевые трубки во время прогамной фазы развития растений, а также в запрограммированной гибели клеток, опадении органов и во взаимодействиях с микробами и регуляторами растений. Резко повышенный уровень транскриптов *AGP17* в листьях мутантов (табл. 4), подтвержденный данными ОТ ПЦР РВ (рис. 1), свидетельствует о несомненной роли рецептора АНК2 в ускоренной деградации клеточной стенки. Таким образом, ЦК могут влиять на процесс старения, контролируя не только донорно-акцепторные отношения за счет активности инвертазы клеточной стенки и гексокиназы [23], но и регулируя синтез арабиногалактановых белков.

Среди генов, корегулируемых с геном семейства *bHLH F1104.13*, выраженное изменение уровня транскриптов отмечалось для гена негативного ответа на брассиностероиды и удлинение клеток *IBL1* (*INCREASED LEAF INCLINATION1 BINDING bHLH1, AT4G30410*) и гена *BEE2* (*BR-ENHANCED EXPRESSION 2, AT4G36540*), коди-

рующего компонент передачи сигнала брассиностероидов и также участвующего в регуляции удлинения клеток (табл. 4) [24, 25]. Увеличенный уровень транскриптов выявлен, кроме того, для гена *AT5G13140* (табл. 4). *AT5G13140* кодирует белок аллергена пыльцы и семейства экстенсинов Ole e 1 (Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein) [26]. Можно заключить, что *F1104.13* наряду с *GATA4*, *DREB26* и *ESE3* входит в сеть регуляторов модификации компонентов клеточной стенки при участии цитокининов и брассиностероидов, однако детали функционирования этой системы нуждаются в дополнительных исследованиях. К этой системе может также относиться MYB *транс*-фактор R3-типа ETC2, который, как отмечалось выше, способен интегрировать взаимодействие фитогормонов и белков клеточной стенки [17]. Коэкспрессия этого *транс*-фактора с геном липазы *GDSL* (*GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein, AT4G01130*) у мутантов (табл. 4) позволяет предполагать участие рецепторов ЦК в регуляции липидного обмена при старении листьев.

В сети генов, корегулируемых с *bHLH38*, мы нашли два гена *bHLH39* и *bHLH100* из подгруппы 1b bHLH с дифференциальной экспрессией в листьях мутантов по гену *АНК2* (табл. 4). Все эти *транс*-факторы, принимают участие в обеспечении поглощения железа и поддержания его гомеостаза. Совместно с ключевым bHLH белком FIT (FER-LIKE DEFICIENCY INDUCED) они активируют гены *FRO2* и *IRT1*, кодирующие Ферредуктооксидазу и транспортер железа, соответственно [19]. Однако, согласно данным RNA-seq анализа библиотек стареющих листьев, названные гены (*FIT, FRO2* и *IRT1*), а также еще ряд генов, связанных с метаболизмом железа, не отличались по уровню экспрессии у мутантов и дикого типа.

Вместе с тем, два гена из пула регуляторов ответа на дефицит железа *FEP2* (*AT1G47395*) и *FEP3* (*AT1G47400*) (FE-UPTAKE-INDUCING PEPTIDE 2 и 3) оказались существенно ингибированы у растений дикого типа по сравнению с нокаут мутантами *ahk2* и *ahk2ahk3* (табл. 4). Эти особенности экспрессии генов, регулирующих метаболизм железа, соответствовали данным ОТ ПЦР РВ анализа, но изменения в уровне их относительной экспрессии у мутантов (рис. 1), были, как правило, ниже, чем следовало из результатов RNA-seq анализа. Как и для генов *F11O4.13*, *ETC2* и *ESE3*, уровень транскриптов *FEP2* и *FEP3* оказался достоверно выше у мутанта *ahk2ahk4*, по сравнению с растениями дикого типа.

Полученные нами данные в определенной степени согласуются с работой Нугауама и коллег [27], которые впервые обнаружили участие продуктов генов *FEP* в регуляции экспрессии ответа на недостаточность железа. Эти исследователи установили, что три гена *FEP* кодируют короткие полипептиды (менее 100 аминокислот), способные при дефиците железа индуцировать экспрессию *bHLH38* и *bHLH39* независимо от FIT. При этом у мутанта *sep1* и только в побегах активировались *bHLH38*, *bHLH39* и *FEP2*, но не *FRO2* и *IRT1*. Параллелизм в характере регуляции генов метаболизма железа в стареющих листьях *Arabidopsis* и у мутанта с недостаточностью пептида, индуцирующего поглощение железа, свидетельствует, что FEP-зависимый регуляторный механизм ответа на обеспеченность железом функционирует и при ремобилизации питательных компонентов, накопленных в стареющем листе. При этом уровень экспрессии генов *FEP* может определяться уровнем гема или других молекул, координирующих содержание железа.

Физиологическая взаимосвязь между рецептором ЦК АНК2 и метаболизмом железа в стареющих листьях несомненна, хотя она может быть не прямой. Не исключено, что она связана с влиянием этого рецептора на возрастные параметры листа, детерминирующие отток железа, однако конкретные цепочки, объединяющие эти взаимозависимые сигналы, нуждаются в дополнительных исследованиях. Ранее было показано, что при регуляции поглощения железа корнями экзогенный цитокинин репрессирует гены *FIT*, *FRO2* и *IRT1* на уровне накопления транскриптов, и это подавление опосредовано рецепторами АНК3 и АНК4 [28]. Однако сигналы ЦК и дефицита железа действовали через различные метаболические пути, поскольку негативная регуляция цитокининами гена *IRT1* не зависела от доступности железа. Цитокинины, по мнению авторов исследования, косвенно воздействовали на аппарат поглощения железа, модифицируя архитектуру корней.

Реализация сигнала ЦК при участии рецепторов происходит с помощью двух групп ТФ – ARR типа В (MYB-подобных ДНК-связывающих белков) и CRF (Cytokinin Response Factors) из семейства ERF/AP2. Важно заметить, что анализ промотора гена *bHLH38* выявил в пределах последовательности в 500 п.н. вверх от стартового кодона ATG *cis*-элементы для таких *trans*-факторов как ARR1, ARR2, ARR11 и ARR14 (AthaMap server). Таким образом, ЦК через рецептор АНК2 может напрямую влиять на метаболизм железа при старении листьев, что не исключает, однако, существование механизмов опосредованной регуляции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты секвенирования транскриптомов и их последующая выборочная оценка методом ПЦР в режиме реального времени показали, что цитокинин-зависимый контроль продолжительности жизни листьев, регулируемый рецептором АНК2, интегрирован с изменением профилей экспрессии генов ряда *trans*-факторов семейств NAC, AP2-EREBP, bHLH, MYB и GATA. Задержка естественного старения листьев у мутантов с инактивированным геном АНК2 сопровождалась резко повышенной экспрессией генов семейства ERF/AP2 *DREB26* и *ESE3* и корегулируемого с ними гена арабиногалактанового белка *AGP17*. Помимо *DREB26* и *ESE3* в сеть сопряженных с АНК2 регуляторов модификации компонентов клеточной стенки могли входить ген *GATA4* (*AT3G60530*), коэкспрессирующийся с генами экспансинов, арабиногалактановых белков и гликозилгидролазы [18], а также гены *ETC2* (семейство MYB) и *F11O4.13* (семейство bHLH), участвующие во взаимодействии brassinостероидов и генов белков клеточной стенки. Таким образом, непосредственными мишенями рецептора АНК2 в стареющих листьях являются гены компонентов клеточных стенок и связанных с ними регуляторов. Наряду с этим, *F11O4.13* через комплекс компонентов SWI/SNF мог влиять на ремодуляцию хроматина, лежащую в основе реализации многих онтогенетических программ [20].

Наиболее значимые количественные изменения у мутантов с инактивированным рецептором АНК2 наблюдались в профиле экспрессии генов *bHLH38*, *bHLH39* и *bHLH100* из пула регуляторов поглощения железа. Увеличение их экспрессии у мутантов по гену *АНК2* сопровождалось повышенным накоплением транскриптов генов *FEP2* и *FEP3*, кодирующих короткие полипептиды, которые при дефиците железа способны индуцировать экспрессию *bHLH38* и *bHLH39* [27]. Хотя анализ *in silico* промотора гена *bHLH38* свидетельствовал о возможном присутствии в нем *cis*-элементов для *trans*-факторов ARR1, ARR2, ARR11 и ARR14 из цепи трансдукции сигнала ЦК, непо-

средственные механизмы взаимодействия генов сигналинга ЦК и регуляции оттока железа в стареющих листьях требуют дополнительных исследований, включающих анализ связывания ЦК-зависимых *транс*-факторов с промоторами генов-регуляторов метаболизма железа.

Полученные в настоящей работе данные об особенностях экспрессии генов *транс*-факторов у мутантов по рецепторам ЦК могут служить стартовым звеном в расшифровке модулей, связывающих рецептор АНК2 и реализацию программы старения листьев. Суммируя результаты проведенного исследования, следует подчеркнуть, что этот рецептор, с которым принято отождествлять вспомогательную роль в восприятии сигнала ЦК [29] листьями, ассоциирован со специфичным набором генов, вовлеченных в регуляцию оттока железа и деградации компонентов клеточной стенки на финальных стадиях онтогенеза листа. Таким образом, несмотря на частичную генетическую избыточность и перекрывающиеся функции, рецепторы ЦК АНК2 и АНК3 могут действовать независимо, регулируя при старении листа различные сети целевых генов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 20-14-00065. Результаты, представленные на рис. 1, получены за счет средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 0106-2019-0001). Секвенирование и биоинформатический анализ данных секвенирования проводили в ЦКП геномики Сколковского института науки и технологии.

Авторы выражают благодарность руководителю ЦКП геномики Сколковского института науки и технологии к.б.н. Логачевой М.Д. за оказанную помощь при проведении данного исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Buchanan-Wollaston V., Earl S., Harrison E., Mathas E., Navabpour S., Page T., Pink D. The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach // *Plant Biotechnol. J.* 2003. V. 1. P. 3. <https://doi.org/10.1046/j.1467-7652.2003.00004.x>.
2. Jibrán R., Hunter D.A., Dijkwel P.P. Hormonal regulation of leaf senescence through integration of developmental and stress signals // *Plant Mol. Biol.* 2013. V. 82. P. 547. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0043-2>.
3. Balazadeh S., Riaño-Pachón D.M., Mueller-Roeber B. Transcription factors regulating leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Biol.* 2008. V. 10 P. 63. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00088.x>.
4. Li Z., Woo H.R., Guo H. Genetic redundancy of senescence-associated transcription factors in *Arabidopsis*. // *J. Exp. Bot.* 2018. V. 69. P. 811. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx345>
5. Raines T., Shanks C., Cheng C.Y., McPherson D., Argueso C.T., Kim H.J., Franco-Zorrilla J.M., López-Vidriero I., Solano R., Vaňková R., Schaller G.E., Kieber J.J. The cytokinin response factors modulate root and shoot growth and promote leaf senescence in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2016. V. 85. P. 134. <https://doi.org/10.1111/tpj.13097>.
6. Kim H.J., Ryu H., Hong S.H., Woo H.R., Lim P.O., Lee I.C., Sheen J., Nam H.G., Hwang I. Cytokinin-mediated control of leaf longevity by ANK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis* // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 2006. V. 103. P. 814. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505150103>.
7. Danilova M.N., Kudryakova N.V., Doroshenko A.S., Zabrodin D.A., Rakhmankulova Z.F., Oelmüller R., Kusnetsov V.V. Opposite roles of the *Arabidopsis* cytokinin receptors ANK2 and ANK3 in the expression of plastid genes and genes for the plastid transcriptional machinery during senescence // *Plant Mol. Biol.* 2017. V. 93. P. 533. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0580-6>
8. Данилова М.Н., Дорошенко А.С., Кудрякова Н.В., Клепикова А.В., Штратникова В. Ю., Кузнецов В.В. Взаиморегуляция сигнальных путей цитокинина и ауксина в контроле естественного старения листьев *Arabidopsis thaliana* // *Физиология растений.* 2020. Т. 67. С. 616. <https://doi.org/10.31857/S0015330320060032>
9. Podzimska-Sroka D., O'Shea C., Gregersen P.L., Skriver K. NAC transcription factors in senescence: from molecular structure to function in crops // *Plants.* 2015. V. 4. P. 412. <https://doi.org/10.3390/plants4030412>
10. Li P., Zhou H., Shi X., Yu B., Zhou Y., Chen S., Wang Y., Peng Y., Meyer R.C., Smeekens S.C., Teng S. The ABI4-induced *Arabidopsis* ANAC060 transcription factor attenuates ABA signaling and renders seedlings sugar insensitive when present in the nucleus. // *PLoS Genet.* 2014. V. 13. e1004213. <https://doi.org/10.1371>
11. Guo P., Li Z., Huang P., Li B., Fang S., Chu J., Guo H. A tripartite amplification loop involving the transcription factor WRKY75, salicylic acid, and reactive oxygen species accelerates leaf senescence // *The Plant Cell.* 2017. V. 29. P. 2854. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00438>
12. Chen L., Xiang S., Chen Y., Li D., Yu D. *Arabidopsis* WRKY45 interacts with the DELLA protein RGL1 to positively regulate age triggered leaf senescence // *Molecular Plant.* 2017. V. 10. P. 1174. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.008>
13. Robatzek S., Somssich I.E. Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense // *Genes & Development.* 2002. V. 16. P. 1139. <https://doi.org/10.1101/gad.222702>
14. Miao Y., Laun T., Zimmermann P., Zentgraf U. Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis* // *Plant Mol Biol.* 2004. V. 55. P. 853. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-2142-6>

15. Dietz K.J., Vogel M.O., Viehhauser A. AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signalling // *Protoplasma*. 2010. V. 245. P. 3. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0142-8>
16. Yamada K., Sasabe M., Fujikawa M., Wada T., Tomimaga-Wada R. Amino acid substitutions in CPC-LIKE MYB reveal residues important for protein stability in *Arabidopsis* roots // *PLoS One*. 2018. V. 13 (10) e0205522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205522>
17. Tominaga R., Iwata M., Sano R., Inoue K., Okada K., Wada T. *Arabidopsis* CAPRICE-LIKE MYB 3 (CPL3) controls endoreduplication and flowering development in addition to trichome and root hair formation // *Development*. 2008. V. 135. P. 1335. <https://doi.org/10.1242/dev.017947>
18. Manfield I.W., Devlin P.F., Jen C.-H., Westhead D.R., Gilmartin P.M. Conservation, convergence, and divergence of light-responsive, circadian-regulated, and tissue-specific expression patterns during evolution of the *Arabidopsis* GATA gene family // *Plant Physiol.* 2007. V. 143. P. 941. <https://doi.org/10.1104/pp.106.090761>
19. Cui Y., Chen C.L., Cui M., Zhou W.J., Wu H.L., Ling H.Q. Four IVa bHLH transcription factors are novel interactors of FIT and mediate JA inhibition of iron uptake in *Arabidopsis* // *Mol. Plant*. 2018. V. 11. P. 1166. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.06.005>
20. Efroni I., Han S. K., Kim H. J., Wu M. F., Steiner E., Birnbaum K. D., Hong J.C., Eshed Y. Wagner D. Regulation of leaf maturation by chromatin-mediated modulation of cytokinin responses // *Dev. Cell*. 2013. V. 24. P. 438. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.01.019>
21. Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. The zinc finger network of plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008. V. 65. P. 1150. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7473-4>
22. Yoneda A., Ohtani M., Katagiri D., Hosokawa Y., Demura T. Hechtian strands transmit cell wall integrity signals in plant cells // *Plants*. 2020. V. 9. P. 604. <https://doi.org/10.3390/plants9050604>
23. Zwack P.J., Rashotte A.M. Cytokinin inhibition of leaf senescence // *Plant Signal Behav.* 2013. V. 8 (7): e24737. <https://doi.org/10.4161/psb.24737>
24. Zhiponova M.K., Morohashi K., Vanhoutte I., Machemer Noonan K., Revalska M., Van Montagu M., Grotewold E., Russinova E. Helix-loop-helix/basic helix-loop-helix transcription factor network represses cell elongation in *Arabidopsis* through an apparent incoherent feed forward loop // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. P. 2824. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400203111>
25. Friedrichsen D.M., Nemhauser J., Muramitsu T., Maloof J.N., Alonso J., Ecker J.R., Furuya M., Chory J. Three redundant brassinosteroid early response genes encode putative bHLH transcription factors required for normal growth // *Genetics*. 2002. V. 162. P. 1445.
26. Fernández-González M., González-Fernández E., Fernández-González D., Rodríguez-Rajo F.J. Secondary outcomes of the Ole e 1 proteins involved in pollen tube development: impact on allergies // *Frontiers in Plant Science*. 2020. V. 11. Article 974. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00974>
27. Hirayama T., Lei G.J., Yamaji N., Nakagawa N., Ma J.F. The putative peptide gene FEP1 regulates iron deficiency response in *Arabidopsis*. // *Plant Cell Physiol*. 2018. V. 59. P. 1739. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy145>
28. Séguéla M., Briat J.F., Vert G., Curie C. Cytokinin negatively regulate the root iron uptake machinery in *Arabidopsis* through a growth-dependent pathway // *Plant J*. 2008. V. 55. P. 289. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03502.x>
29. Higuchi M., Pischke S.M., Mähönen P.A., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Helariutta Y., Sussman R.M., Kakimoto T. In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 8821. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402887101>