

УДК 581.1

ТРАНС-ФАКТОР HY5 УЧАСТВУЕТ В ЦИТОКИНИН-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ БЕЛКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПЛАСТИДНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗой БАКТЕРИАЛЬНОГО ТИПА ПРИ ДЕЭТИОЛЯЦИИ *ARABIDOPSIS THALIANA*

© 2020 г. А. С. Дорошенко¹, М. Н. Данилова¹, А. А. Андреева^{1,2}, Н. В. Кудрякова^{1,*}, член-корреспондент РАН Вл. В. Кузнецов¹, В. В. Кузнецов¹

Поступило 06.02.2020 г.
После доработки 06.02.2020 г.
Принято к публикации 06.02.2020 г.

HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL5), bZIP *транс*-фактор, принадлежит к числу основных регуляторов светового и гормонального сигналинга. Среди мишеней этого гена особое место занимают гены транскрипционного комплекса хлоропластов, координированная экспрессия которых обеспечивает начальные этапы фотоморфогенеза. В представленной работе мы показали, что при деэтиоляции HY5 функционирует как положительный цитокинин (ЦК)-зависимый регулятор экспрессии генов белков, ассоциированных с пластидной РНК полимеразой (PAP), действующий ниже первичной цепи восприятия цитокининового сигнала. При этом отсутствие блокирующего действия мутаций по генам фоторецепторов *CRY1*, *CRY2*, *PHYA*, *PHYB* на ЦК-зависимое содержание транскриптов генов *PAP* свидетельствует о параллельном действии света и гормона в их регуляции.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, деэтиоляция, мутанты, свет, *транс*-факторы, цитокинины

DOI: 10.31857/S2686738920020109

ВВЕДЕНИЕ

HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL5) кодирует bZIP *транс*-фактор, который принадлежит к числу основных регуляторов фотоморфогенеза [1]. Белок является субстратом для E3 убиквитинлигазы COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1), способной образовывать комплекс с SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME A-105(SPA). Комплекс COP/SPA функционирует в качестве отрицательного регулятора фотоморфогенеза в темноте. При освещении фоторецепторы, связываясь с ним, защищают HY5, а также ряд других *транс*-факторов (HYH, HFR1 и LAF1) от деградации и запускают транскрипцию светорегулируемых генов [2]. Наряду с участием в световом сигналинге, HY5 является компонентом реализации сигнала цитокинина. Согласно модели Vandenberg

и коллег [3], цитокинин, воспринимаемый рецепторными гистидинкиназами АНК, ингибирует COP1-зависимую деградацию HY5 за счет неизвестного механизма и способствует повышенной экспрессии светорегулируемых генов.

К числу таких светорегулируемых генов, критичных для биогенеза хлоропластов, принадлежат гены транскрипционного комплекса хлоропластов PEP-A. Этот комплекс образуется в процессе деэтиоляции, когда под действием света к транскрипционному комплексу PEP-B этиопластов, включающему субъединицы РНК-полимеразы бактериального типа (PEP) и один из σ -факторов, присоединяются дополнительные полипептиды, так называемые PEP ассоциированные белки (PEP-ASSOCIATED PROTEINS, PAP). Хотя PAP и различаются по своей структуре и функциям, анализ *in silico* транскриптомных данных свидетельствует, что кодирующие их ядерные гены образуют регулон [4]. Инактивация любого из генов PAP приводит к нарушениям в сборке PEP комплекса и/или его стабильности и нарушениям в транскрипции хлоропластных генов и как результат к бесхлорофильному фенотипу.

¹ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: nvkudryakova@mail.ru

Координированная экспрессия *PAP* генов на ранних этапах биогенеза хлоропластов предполагает существование общего регулятора, потенциальным кандидатом на роль которого является HY5. Согласно данным Liebers и коллег [5] при переходе от ското- к фотоморфогенезу накопление транскриптов *HY5* соответствует профилю накопления транскриптов генов *PAP*. Таким образом, HY5 может являться одним из базовых регуляторов экспрессии *PAP* генов, если HY5 не следует клеточной регуляции, идентичной *PAP*. Участие HY5 в светоиндуцируемой экспрессии генов *PAP* можно продемонстрировать, используя в качестве модели гормон-зависимую активацию их экспрессии при деэтиоляции. В наших предыдущих исследованиях [6] было обнаружено, что компоненты цепи трансдукции сигнала ЦК способны регулировать накопление матриц генов аппарата транскрипции пластид при переходе от ското- к фотоморфогенезу, включая транскрипты гена *PAP5*. Белок NEMERA/pTAC12/PAP5 участвует в формировании PEP комплекса в хлоропластах и одновременно осуществляет протеолиз фитохрома A [7] в составе фитохромных ядерных телец. В настоящей работе мы впервые показали, что цитокинин-зависимая регуляция *PAP* генов при деэтиоляции происходит при участии *транс*-фактора HY5.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали стандартную биологическую тест-систему, в основе которой лежит светоиндуцируемая деэтиоляция проростков, выращенных в темноте и перенесенных на свет. Мутанты *Arabidopsis thaliana* (*hy5*, *cry1cry2* и *phyAphyB*) и проростки исходного родительского экотипа *Landsberg erecta* культивировали в течение 4-х дней в условиях полной темноты на питательной среде Мурасиге–Скуга без гормона (контроль) и в присутствии 1 мкМ *транс*-зеатина (опыт), а затем переносили в климатическую камеру MLR-352H-PE (Sanyo, Япония) с интенсивностью освещения $120 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и температурой 21°C. Экспрессию генов *PAP* исследовали на проростках, зафиксированных в 7 ч утра и через 6 ч после начала освещения (точное время фиксации связано со значительной регуляцией экспрессии *PAP* генов циркадными ритмами). Параллельно анализировали 7-дневные проростки, выращенные на свету при интенсивности освещения $120 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, температуре 21°C и фотопериоде 16 ч свет/8 ч темнота и обработанные раствором 5 мкМ *транс*-зеатина в течение 3 ч. Относительный уровень транскриптов оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени после обратной транскрипции на амплификаторе LigthCyclerR96 (Roche, Швейцария) согласно протоколу, описанному ранее [6].

Последовательности использованных праймеров приведены в наших недавних публикациях [6, 8]. Эксперименты проводили в 3–4-кратной биологической повторности. Достоверность различий проверяли при помощи критерия Стьюдента (*t*-критерий).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Укорочение гипокотилей проростков *A. thaliana*, культивируемых в условиях полной темноты на среде с добавлением ЦК, является одним из общепринятых тестов на чувствительность объекта к гормону [9]. В нашей предшествующей работе показано, что величины гипокотилей у 4-дневных проростков *hy5* и проростков *L. erecta*, выращенных на питательной среде с добавлением 1 мкМ *транс*-зеатина, не имели существенных различий, то есть в условиях темноты по этому параметру оба образца имели одинаковую чувствительность к гормону. При этом экзогенный цитокинин стимулировал накопление хлорофилла при освещении в обоих образцах, а добавление гормона в среду культивирования резко увеличивало содержание транскриптов гена *ARR5*, индикатора действия цитокинина [6, 8].

Однако при сохранении способности к восприятию гормонального сигнала мутация по гену *HY5* оказала значимое влияние на уровни базовой экспрессии компонентов цепи сигналинга ЦК. Согласно полученным нами результатам базовые уровни накопления матриц рецепторов ЦК *AHK2*, *AHK3* и регуляторов ответа типа В *ARR1* и *ARR10* у мутанта были существенно выше, чем у растений дикого типа. ЦК способствовал активации генов *AHK2* и *AHK4* и росту матриц *ARR1* и *ARR10*, но подавлял экспрессию гена *ARR12* (рис. 1). Ранее о нарушении чувствительности к экзогенному ЦК в корнях и каллусе мутанта *hy5* сообщали Cluis et al. [10], которые связывали с измененным балансом между генами сигналинга ЦК и ауксинов.

HY5, в соответствии с данными Xie et al. [11] является одним из возможных целевых генов для регуляторов ответа на ЦК *ARR1*, *ARR10*, *ARR12*. Помимо ключевых компонентов цепи трансдукции ЦК, включающих сенсорные гистидинкиназы, фосфотрансмиттеры и регуляторы ответы типа В, реакция транскриптома на действие ЦК обеспечивается множественными дополнительными *транс*-факторами. Среди них особый интерес с точки зрения перекрестных взаимодействий с HY5 представляют факторы ответа на цитокинин – CRF (Cytokinin Response Factors), принадлежащих к классу транскрипционных факторов APETALA2/ETHYLENE FACTOR. Три из них CRF1, CRF5 и CRF6 напрямую связываются с HY5, который при этом активирует их экспрессию в 3–4 раза [12]. Кроме того, HY5 способен

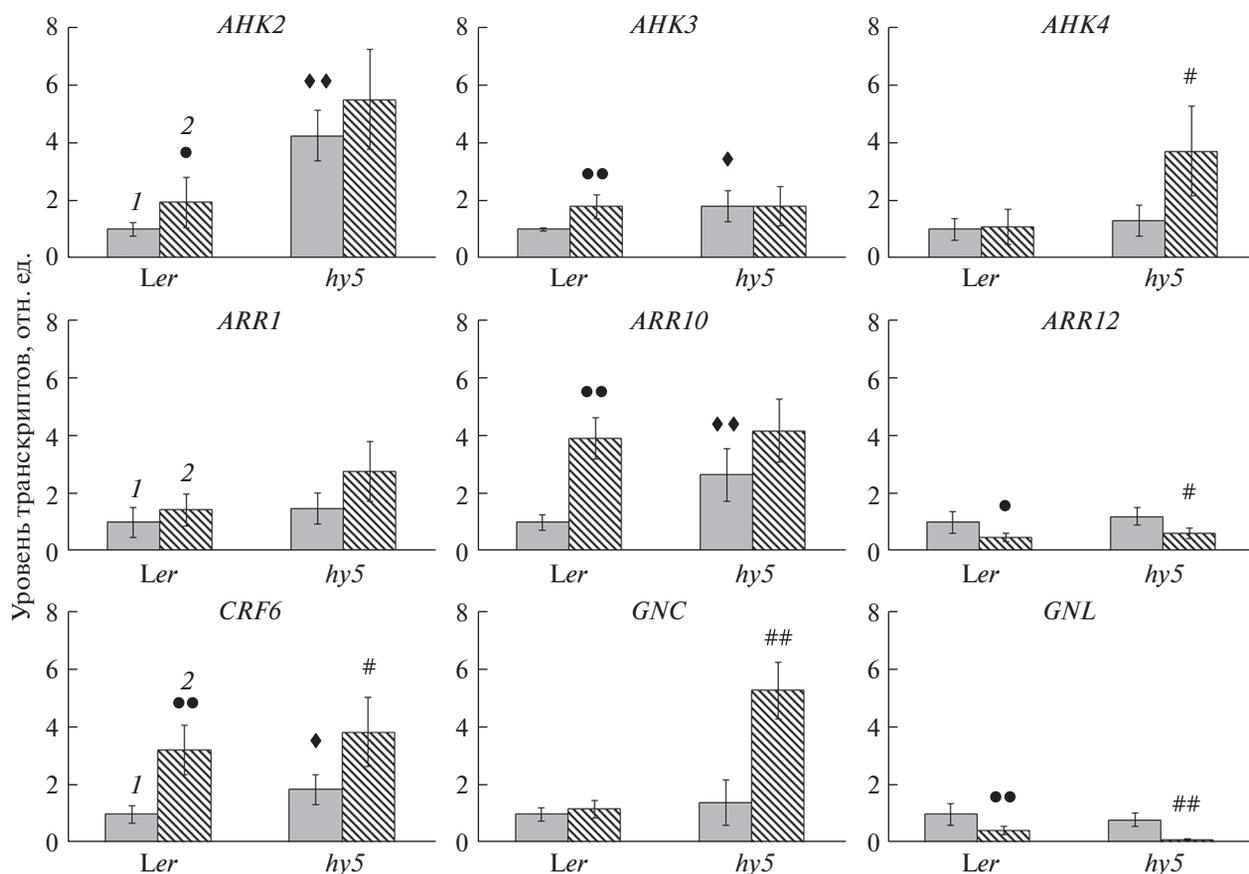


Рис. 1. Влияние цитокинина и мутации по гену *HY5* на содержание транскриптов генов, кодирующих белки передачи сигнала цитокинина и цитокинин-зависимые *транс*-факторы в 4-дневных этиолированных проростках *A. thaliana* дикого типа *Landsberg erecta* (*Ler*) и мутанта *hy5*. (1 – 0 мкМ *транс*-зеатина, 2 – 1 мкМ *транс*-зеатина).

• – достоверные различия между средними значениями экспрессии у дикого типа *Landsberg erecta* (*Ler*) без ЦК и с ЦК при $p \leq 0.05$, •• при $p \leq 0.01$; # – достоверные различия между средними значениями экспрессии у мутанта *hy5* без ЦК и с ЦК при $p \leq 0.05$, ## при $p \leq 0.01$; ♦ – достоверные различия между средними значениями экспрессии у мутанта *hy5* без ЦК и экспрессии у дикого типа *Landsberg erecta* (*Ler*) без ЦК при $p \leq 0.05$, ♦♦ при $p \leq 0.01$.

опосредовано регулировать более 1000 генов [13], действуя через субсети других регуляторов. Показано также, что экспрессия *HY5* коррелировала с экспрессией ЦК-индуцируемого гена *GNL* (*CYTOKININ-RESPONSIVE GATA1*) [14]. Однако *GNL*, как и еще один ЦК-зависимый *транс*-фактор *GNC* (*GATA NITRATE-INDUCIBLE CARBON-METABOLISM-INVOLVED*), по-видимому, не являются облигатными участниками реализации сигнала ЦК при деэтиоляции, так как двойной мутант *gncgnl*, по данным Cortleven et al. [15] сохранял способность отвечать на действие ЦК.

В наших экспериментах у проростков мутанта *hy5* и проростков дикого типа экспрессия гена *CRF6* на среде с ЦК возрастала. Присутствие ЦК в среде не оказывало существенного влияния на уровень транскриптов генов *GNC* и *GNL* у растений экотипа *L. erecta*, тогда как у мутантной линии содержание матриц гена *GNC* достоверно

увеличивалось, а уровень матриц *GNL* снижался (рис. 1).

Эти данные позволяют заключить, что в условиях темноты *HY5* является положительным регулятором ЦК-индуцируемой экспрессии гена *транс*-фактора *GNL/CGA1* и отрицательным *GNC*. При этом у мутанта *hy5* сохранялась повышенная чувствительность к гормону.

Тем не менее, наиболее очевидным и выраженным последствием инактивации гена *HY5* в наших опытах является почти полное отсутствие ЦК-зависимого роста экспрессии генов *PAP* при деэтиоляции. Если у растений дикого типа уровень матриц всех генов *PAP* достигал максимума через 6 ч после начала освещения и существенно превышал в этой временной точке значения “темновых” вариантов, то у мутанта, напротив, содержание транскриптов *PAP* генов в присутствии ЦК не отличалось от “темнового” варианта

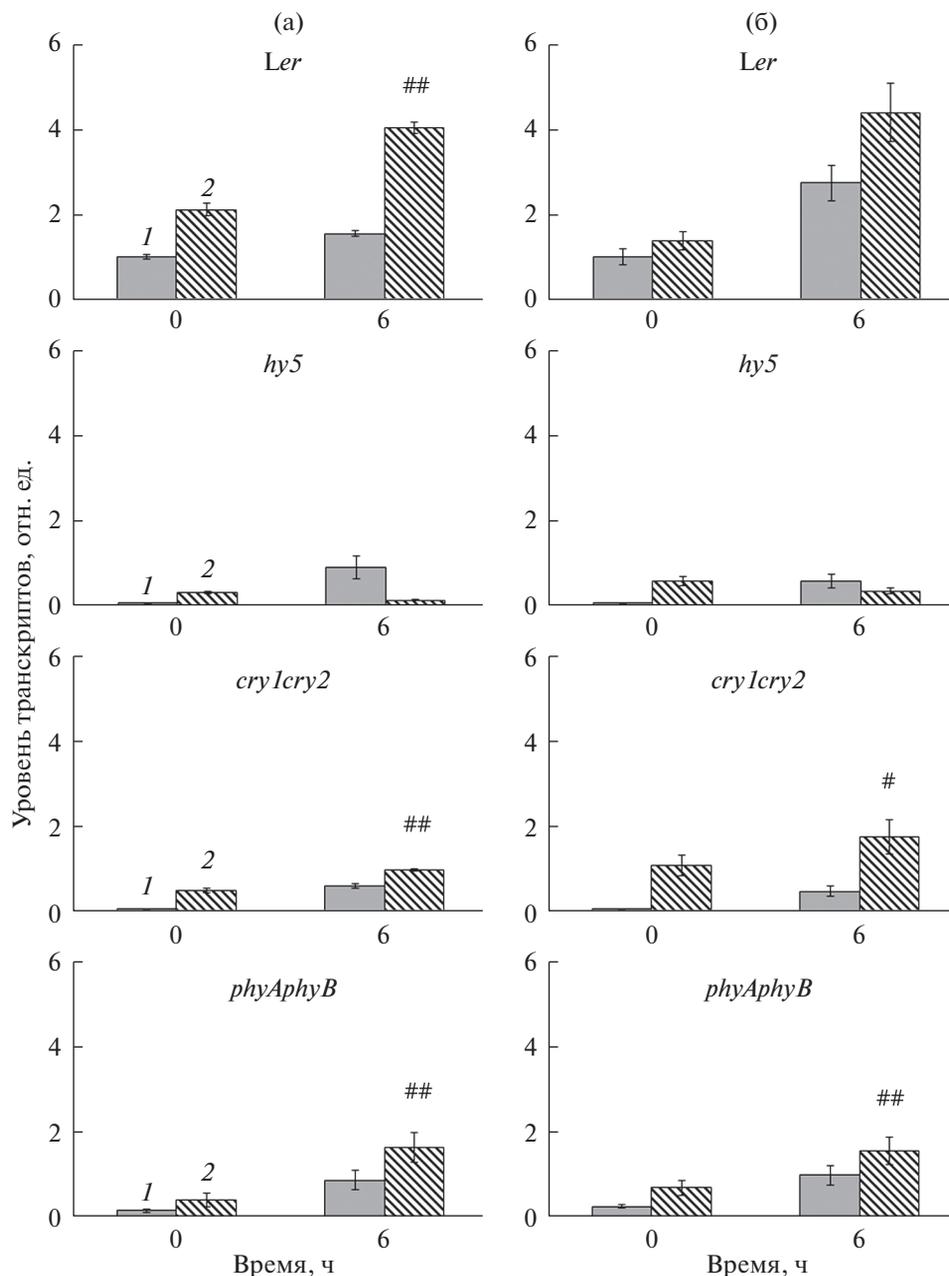


Рис. 2. Влияние цитокинина и света на содержание транскриптов генов *PAP6* (столбец “а”) и *PAP7* (столбец “б”) в 4-дневных этиолированных проростках *A. thaliana* дикого типа Landsberg *erecta* (*Ler*) и нокаут-мутантов *hy5*, *cry1cry2* и *phyAphyB*. (1 – 0 мкМ *транс*-зеатина, 2 – 1 мкМ *транс*-зеатина.) # – достоверные различия между средними значениями экспрессии у проростков, выращенных на питательной среде с ЦК, в условиях темноты и экспрессии у проростков, выращенных на питательной среде с ЦК, спустя 6 ч освещения при $p \leq 0.05$, ## при $p \leq 0.01$.

или было снижено. При этом свето-зависимая активация на среде без гормона сохранялась. Следует особо подчеркнуть, что все 12 *PAP* генов продемонстрировали высокую степень корегуляции в соответствии с предположением об их принадлежности к общему регулону [4]. На рис. 2 и 3 приведены данные для *PAP* генов, представляющих две основные функциональные группы.

Первый из них, *PAP6*, относится к группе, связанной с редокс-регуляцией и защитой от окислительного стресса, тогда как *PAP7* принимает участие в ДНК/РНК метаболизме. Интересно, что у мутантов по генам фоторецепторов *cry1cry2* и *phyAphyB* характер ЦК-зависимой экспрессии генов *PAP* при деэтиоляции не отличался от показателей дикого типа, то есть фоторецепторы не

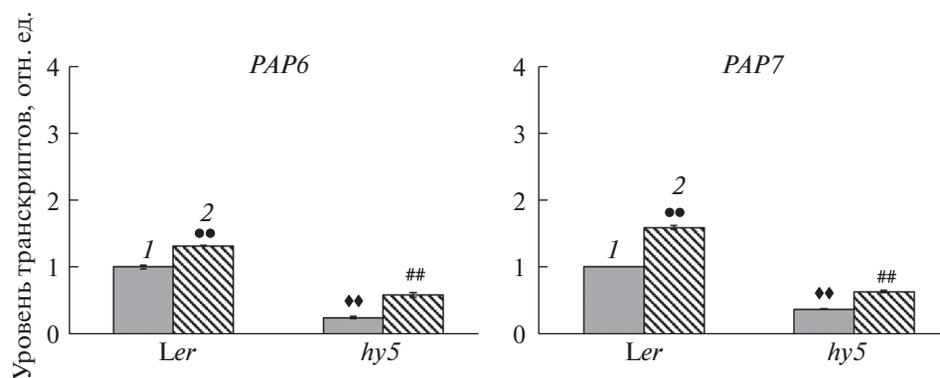


Рис. 3. Влияние цитокинина и мутации по гену *HY5* на содержание транскриптов генов, кодирующих белки, ассоциированные с РНК-полимеразой бактериального типа в 7-дневных растениях *A. thaliana* дикого типа Landsberg erecta (*Ler*) и мутанта *hy5*. (1 – 0 мкМ *транс*-зеатина, 2 – 5×10^{-6} *транс*-зеатина). •• – достоверные различия между средними значениями экспрессии у дикого типа Landsberg erecta (*Ler*) с ЦК и экспрессии у дикого типа Landsberg erecta (*Ler*) без ЦК при $p \leq 0.01$; ♦♦ – достоверные различия между средними значениями экспрессии у мутанта *hy5* и экспрессии у дикого типа Landsberg erecta (*Ler*) при $p \leq 0.01$; ## – достоверные различия между средними значениями экспрессии у мутанта *hy5* с ЦК и экспрессии у дикого типа Landsberg erecta (*Ler*) с ЦК при $p \leq 0.01$.

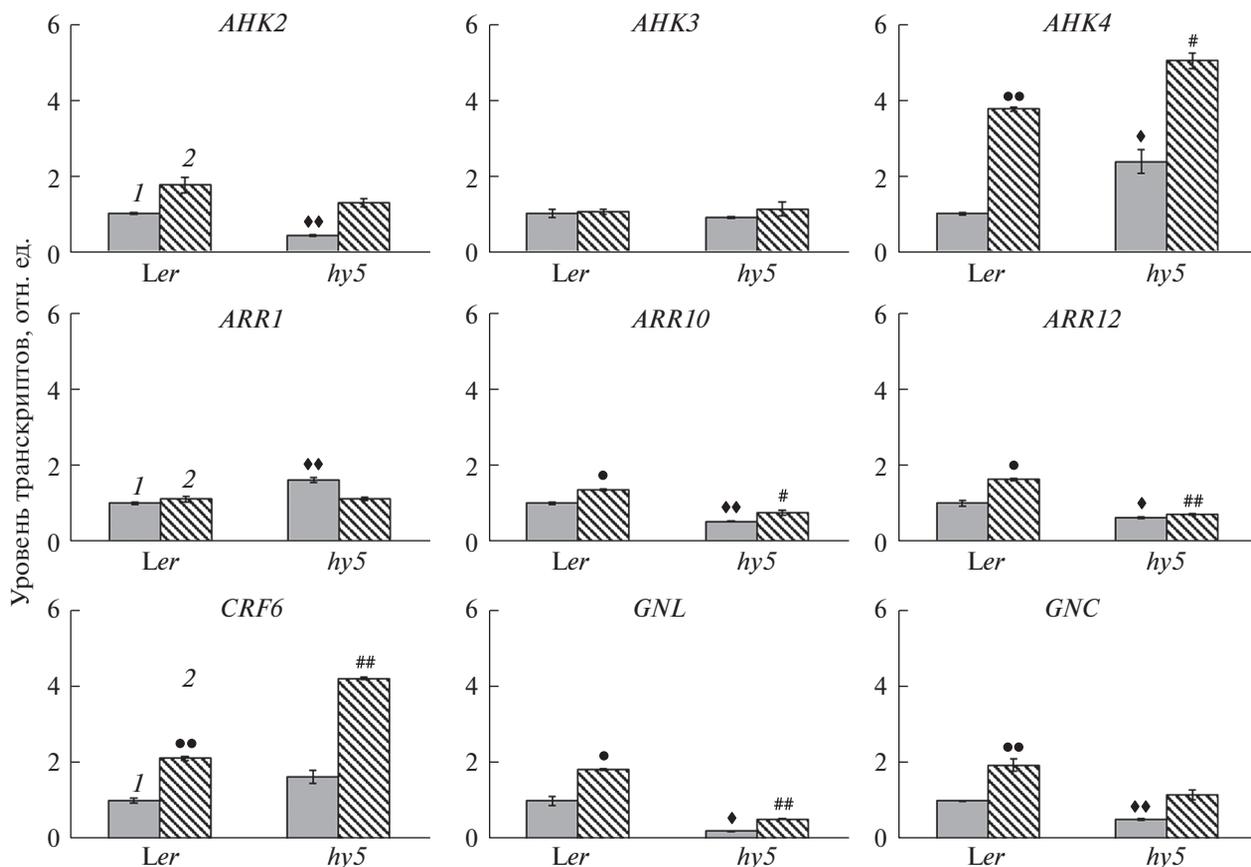


Рис. 4. Влияние цитокинина и мутации по гену *HY5* на содержание транскриптов генов, кодирующих белки передачи сигнала цитокинина и цитокинин-зависимые *транс*-факторы в 7-дневных растениях *A. thaliana* дикого типа Landsberg erecta (*Ler*) и мутанта *hy5*. (1 – 0 мкМ *транс*-зеатина, 2 – 5×10^{-6} *транс*-зеатина).

• – достоверные различия между средними значениями экспрессии у дикого типа Landsberg erecta (*Ler*) с ЦК и экспрессии у дикого типа Landsberg erecta (*Ler*) без ЦК при $p \leq 0.05$, •• при $p \leq 0.01$; ♦ – достоверные различия между средними значениями экспрессии у мутанта *hy5* и экспрессии у дикого типа Landsberg erecta (*Ler*) при $p \leq 0.05$, ♦♦ при $p \leq 0.01$; # – достоверные различия между средними значениями экспрессии у мутанта *hy5* с ЦК и экспрессии у дикого типа Landsberg erecta (*Ler*) с ЦК при $p \leq 0.05$, ## при $p \leq 0.01$.

были задействованы в модуляции ответа генов *PAP* на действие гормона (рис. 2). Тот факт, что экзогенный цитокинин сохранял способность стимулировать накопление на свету транскриптов гена *HY5* у нокаут-мутантов *cry1cry2* и *phyA-phyB* свидетельствует в пользу отсутствия блокирующего действия мутаций по фоторецепторам на передачу сигнала ЦК, и, следовательно, о параллельном действии света и гормона в регуляции экспрессии *HY5*.

Таким образом, полученные нами данные позволяют сделать вывод, что при деэтиоляции транс-фактор *HY5* функционирует как положительный ЦК-зависимый регулятор экспрессии генов *PAP*, действующий ниже первичной цепи восприятия цитокининового сигнала. При этом механизм транскрипционной регуляции генов *PAP* может обеспечиваться взаимодействием *HY5* с субсетью ЦК-регулируемых транс-факторов, включая *CRF6*, *GNL* и *GNC*.

Интересно, что у 7-дневных проростков, выращенных при стандартном освещении на среде без гормона, блокирующее влияние мутации *hy5* на увеличение экспрессии генов *PAP* под действием ЦК отсутствовало. У мутанта, как и у растений дикого типа, наблюдалось достоверное увеличение экспрессии генов *PAP* уже через три часа после обработки транс-зеатином (рис. 3). При этом базовые уровни транскриптов *PAP* генов были снижены в 3–8 раз. Базовые уровни компонентов цепи сигналинга ЦК *AHK2*, *AHK4*, *ARR1*, *ARR10* и *ARR12* и целевых генов *CRF6*, *GNL* и *GNC* у мутантов, а также профили их экспрессии при обработке гормоном также существенно отличались от показателей дикого типа (рис. 4).

Можно предположить, что в отсутствие белка *HY5* у мутанта *hy5* функцию этого транс-фактора в ЦК зависимой экспрессии *PAP* генов при фотоморфогенезе принимает на себя его гомолог *HYH* (*HY5 HOMOLOG*), который, как и *HY5*, способен связывать ACGT – содержащие цис-элементы промоторов целевых генов [13] и/или другие положительные регуляторы фотоморфогенеза (*FHY3*, *FAR1*, *HFR1*, *LAF1*). На начальных этапах деэтиоляции действие *HYH* у мутантных растений могло полностью ингибироваться убиквитин-лигазным комплексом *COP1/SPA*, усиливающим дегградацию *HYH* и ряда других положительных регуляторов фотоморфогенеза. По мере деэтиоляции свет способен усиливать физиологическую активность транс-факторов, запускающих транскрипцию светорегулируемых генов за счет ингибирования их фосфорилирования и связывания комплекса *COP1/SPA* фоторецепторами. Справедливость этой модели предполагается проверить в дальнейшем с привлечением мутантов *hyh* и двойного мутанта *hy5hyh*.

Таким образом, результаты проведенных нами исследований позволяют впервые заключить, что транс-фактор *HY5* определяет цитокинин-зависимую экспрессию генов PEP-ассоциированных белков при деэтиоляции, действуя ниже первичной цепи восприятия цитокининового сигнала.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований гранты № 20-04-00294 и 19-34-90183.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gangappa S.N., Botto J.F. // *Molecular Plant* 2016. V. 9. P. 1353–1365.
2. Lau O.S., Deng X.W. // *Trends in Plant Sci.* 2012. V. 17. P. 584–593.
3. Vandebussche F., Habricot Y., Condiff A.S., Maldiney R., Van Der Straeten D., Ahmad M. // *Plant J.* 2007. V. 49. P. 428–441.
4. Pfannschmidt Th., Blanvillain R., Merendino L., Courtois F., Chevalier F., Liebers M., Grübler B., Hommel E., Lerbs-Mache S. // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. P. 6957–6973.
5. Liebers M., Chevalier F., Blanvillain R., Pfannschmidt Th. // *Planta* 2018. V. 284. P. 629–636.
6. Danilova M.N., Doroshenko A.S., Kudryakova N.V., Andreeva A.A., Kusnetsov V.V. // *Russian Journal of Plant Physiology* 2018. V. 65. P. 801–812.
7. Chen M., Galvão R.M., Li M., Burger B., Bugea J., Bolado J., Chory J. // *Cell.* 2010. V. 141. P. 1230–1240.
8. Дорошенко А.С., Данилова М.Н., Медведева А.С., Кузнецов В.В. // *Физиология растений* 2019. Т. 66. С. 403–411.
9. Chory J., Reinecke D., Sim S., Washburn T., Brenner M. // *Plant Physiol.* 1994. V. 104. P. 339–347.
10. Cluis C.P., Mouchel C.F., Hardtke C.S. // *Plant J.* 2004. V. 38. P. 332–347. The Arabidopsis transcription factor *HY5* integrates light and hormone signaling pathways.
11. Xie M., Chen H., Huang L., O'Neil R.C., Shokhirev M.N., Ecker J.R. // *Nature Communications.* 2018. V. 9. P. 1604. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03921-6>
12. Zhang H., He H., Wang X., Wang X., Yang X., Li L., Deng X.W. // *Plant J.* 2011. V.65. P. 346–358.
13. Ee J., He K., Stolz V., Lee H., Gao F.P., Zhao T.W., Lee I., Deng X.W. // *Plant Cell* V. 19. P. 731–749.
14. Monte E., Tepperman J.M., Al-Sady B., Kaczorowski K.A., Alonso J.M., Ecker J.R., Li X., Zhang Y.L., Quail P.H. // *PNAS.* 2004. V. 101. P. 16091–16098.
15. Cortleven A., Marg I., Yamburenko M.V., Schlicke H., Hill K., Grimm B., Schaller G.E., Schmulling T. // *Plant Physiol.* 2016. V. 172. P. 464–478.

THE TRANSCRIPTION FACTOR HY5 IS INVOLVED IN THE CYTOKININ-DEPENDENT REGULATION OF THE EXPRESSION OF GENES ENCODING PROTEINS ASSOCIATED WITH BACTERIAL PLASTID RNA- POLYMERASE DURING DE-ETIOLATION OF *ARABIDOPSIS THALIANA*

A. S. Doroshenko^a, M. N. Danilova^a, A. A. Andreeva^{a,b}, N. V. Kudryakova^{a,#},

Corresponding Member of RAS V. V. Kuznetsov^a, and V. V. Kusnetsov^a

^a *Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^b *Moscow State University, Moscow, 119991 Russian Federation*

[#] *e-mail: nvkudryakova@mail.ru*

HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL5), a bZIP transcription factor, is one of the main regulators of light and hormonal signaling. The genes for the transcriptional machinery of chloroplasts are particularly significant among the targets of this gene since their coordinated expression ensures the initial stages of photomorphogenesis. In this paper, we have shown that during de-etiolation, HY5 acts as a positive CK-dependent regulator of the expression of genes encoding proteins associated with plastid RNA polymerase (PAPs), which functions below the primary chain of perception of the cytokinin signal. The absence of blocking effect of mutations of the *CRY1*, *CRY2*, *PHYA*, *PHYB* photoreceptor genes on the CK-dependent content of PAP gene transcripts indicates the parallel action of the hormone and light in their regulation.

Keywords: Arabidopsis thaliana, deetiolation, mutants, shine, trans factors, cytokinins