

# УЧАСТИЕ КОМПОНЕНТОВ СИГНАЛИНГА СИНЕГО СВЕТА В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АППАРАТА ТРАНСКРИПЦИИ ПЛАСТОМА ПРИ ЦИТОКИНИН-ЗАВИСИМОЙ ДЕЭТИОЛЯЦИИ *A. THALIANA*

А.С. Дорошенко, М.Н. Данилова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия; [anastasiya04101993@gmail.com](mailto:anastasiya04101993@gmail.com)

**Аннотация.** Исследования биогенеза хлоропластов в ходе деэтиоляции *Arabidopsis thaliana* показали, что рецепторы синего света CRY1 и CRY2, а также участник трансдукции светового сигнала HY5 контролируют экспрессию генов аппарата транскрипции пластома. Цитокинин-зависимая регуляция осуществляется в первую очередь за счет *транс*-фактора HY5.

**Ключевые слова:** деэтиоляция, криптохромы, фотоморфогенез, цитокинины, экспрессия генов

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-908-912

В начале ювенильного этапа онтогенеза проростки развиваются по программе скотоморфогенеза, которая является адаптацией общей морфогенетической программы к условиям почвенной темноты. В этих условиях в семядольных листьях из пропластид формируются этиопласты, геном которых в условиях отсутствия света проявляет слабую транскрипционную активность. В этиопластах присутствуют две РНК полимеразы. Мультисубъединичная полимераза PEP (Plastid-Encoded RNA Polymerase) состоит из коровых субъединиц  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  и  $\beta''$ , которые кодируются пластомом (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* и *rpoC2*), и одного из шести сигма факторов SIG1-6 ядерного кодирования (*SIG1-6*). Моносубъединичная полимераза NEP (Nuclear-Encoded RNA Polymerase), кодируемая ядром, представлена двумя ферментами RPOTr и RPOTrp, которые, главным образом, осуществляют транскрипцию генов «домашнего хозяйства» пластид [Börner et al., 2015]. При освещении растение инициирует программу развития – фотоморфогенез, в результате чего проросток претерпевает многочисленные изменения на морфологическом, биохимическом и молекулярном уровнях. Под воздействием света происходит превращение этиопластов в хлоропласты и формирование фотосинтетически-активных комплексов в тилакоидных мембранах, а также масштабное перепрограммирование митохондриального, ядерного и хлоропластного геномов. Этот динамичный процесс происходит в течение 12-24 часов и называется деэтиоляцией [Cortleven et al., 2016].

Реализация светового сигнала осуществляется с участием сложной регуляторной сети, посредством которой растение «распознает» интенсивность, качество, и направление светового потока. В ходе деэтиоляции восприятие синего света осуществляется семейством апопротеинов, называемых криптохромами, которые регулируют транскрипцию чувствительных к синему свету генов. У *A. thaliana* семейство криптохромов представлено двумя белками CRY1 и CRY2 (Cryptochrome 1-2). В результате восприятия синего света рецепторы связываются с негативным регулятором фотоморфогенеза – комплексом COP/SPA, тем самым освобождая транскрипционные факторы HY5 (long hypocotyl 5), HYH (гомолог HY5), HFR1 (long hypocotyl in far-red) и LAF1 (long after far-red light 1) и запуская транскрипцию светорегулируемых генов [Liu et al., 2016]. К ним относятся гены хлоропластных белков ядерного и пластидного кодирования. Реализация генетической информации пластид определяется изменениями аппарата транскрипции пластома. При появлении света PEP полимеразы претерпевает значительные структурные изменения, благодаря

формированию комплекса с так называемыми PАР белками (PEP-Associated Proteins) [Liebers et al., 2017]. В результате PEP становится основной РНК-полимеразой и начинает активную транскрипцию фотосинтетических генов, в то время как NER продолжает транскрипцию генов «домашнего хозяйства» [Börner et al., 2015].

Регуляция биогенеза хлоропластов в ходе деэтиоляции определяется не только освещением, но и различными фитогормонами. Известно, что цитокинины на начальном этапе фотоморфогенеза ускоряют превращение этиопласта в хлоропласт, положительно регулируя биосинтез хлорофилла и формирование тилакоидных мембран с фотосинтетически-активными комплексами [Cortleven et al., 2016]. Однако молекулярный механизм, за счет которого цитокинины ускоряют формирование хлоропластов, не ясен. Одним из возможных способов положительной регуляции цитокининами процесса дифференцировки хлоропластов из этиопластов является стимуляция формирования аппарата транскрипции пластома. В литературе отсутствуют работы, посвященные изучению роли конкретных рецепторов света (синего или красного) на экспрессию генов аппарата транскрипции пластома при превращении этиопласта в хлоропласт. Возможное участие цитокининов в регуляции экспрессии генов аппарата транскрипции пластома при участии рецепторов света ранее также не исследовалось. Исходя из вышесказанного, цель настоящей работы заключалась в изучении механизмов регуляции светом и цитокининами экспрессии генов аппарата транскрипции пластома.

Растения *A. thaliana* экотипа *Landsberg erecta* и созданные на его основе нокаут-мутанты по генам рецепции (*cry1/cry2*) и трансдукции (*hy5*) синего света выращивали в течение 4-х дней в условиях полной темноты на питательной среде Мурасиге-Скуга без гормона (контроль) и в присутствии 1 мкМ *tZ* (*транс*-зеатина) (опыт). Выращенные растения переносили на свет в климатическую камеру MLR-352H-PE (Sanyo, Япония) с интенсивностью освещения 120 мкМ фотонов\*с<sup>-1</sup>\*м<sup>-2</sup> и температурой +23 °С. Проростки фиксировали в жидком азоте спустя 3, 6, 9 и 16 ч освещения. Контрольным образцом служил вариант дикого типа, выращенный в течение 4 дней в условиях темноты без гормона. Относительный уровень транскриптов оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени после обратной транскрипции на амплификаторе LighCyclerR96 (“Roche”, Швейцария). Уровень транскриптов целевых генов был нормализован относительно уровня транскриптов референсного гена полиубиквитина (*UBQ10*).

Для проверки эффективности избранных экспериментальных условий анализировали динамику накопления транскриптов генов, экспрессия которых в ходе деэтиоляции положительно регулируется светом и цитокинином: *LHCB2.4* и *ARR5*. Освещение этиолированных проростков дикого типа и мутантов *cry1/cry2* и *hy5* приводило к достоверному увеличению уровня матриц гена светособирающего комплекса фотосистемы II *LHCB2.4* уже спустя 3 ч после начала освещения. Экзогенный цитокинин стимулировал накопление транскриптов гена *LHCB2.4* по сравнению с контрольными растениями. Сходная динамика наблюдалась и при анализе экспрессии *ARR5*: уровень транскриптов в проростках дикого типа и мутантных линий, выращенных в присутствии цитокинина, был выше как в условиях темноты, так и в процессе деэтиоляции. Эффективность экспериментальной постановки также подтверждается достоверным укорочением гипокотилей проростков дикого типа и мутантов *cry1/cry2* и *hy5*, выращенных на питательной среде, содержащей 1 мкМ *tZ*.

Анализ экспрессии генов аппарата транскрипции пластома у проростков дикого типа показал увеличение уровня матриц генов *RPOTp*, *rpoB*, *SIG1*, *SIG2*, *SIG5* и *PAP5*, с максимумом накопления транскриптов спустя 6 или 9 ч освещения (рисунок, а, б). Экзогенный цитокинин дифференциально регулировал экспрессию исследуемых генов

в проростках дикого типа: стимулировал экспрессию генов *RPOTp*, *SIG1* и *PAP5*, подавлял накопление транскриптов *SIG5* и не влиял на накопление матриц *rpoB*, *SIG2* и *SIG6*. Нокаут-мутанты *cry1/cry2* и *hy5* отличались пониженной способностью накапливать матрицы генов аппарата транскрипции пластома *rpoB*, *SIG1* и *PAP5* при освещении. Транс-зеатин способствовал достоверной активации экспрессии генов *RPOTp* и *PAP5* в ходе деэтиоляции мутанта *cry1/cry2* (рисунок а, б). При этом нокаут-мутант по транс-фактору *hy5* терял способность положительно регулировать экспрессию генов аппарата транскрипции пластома, что предполагает важную роль этого транс-фактора в цитокинин-зависимой деэтиоляции (рисунок, а, б).

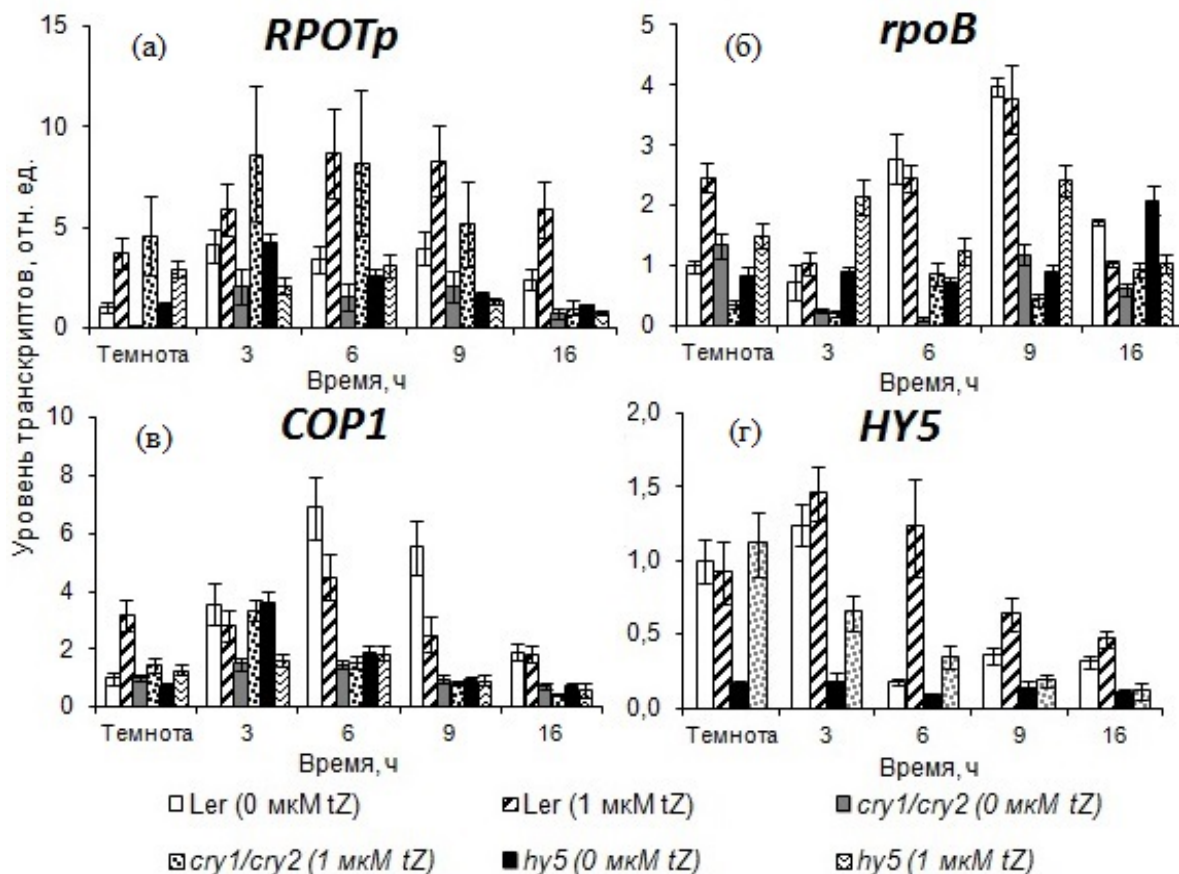


Рисунок. Влияние цитокинина на уровень транскриптов генов *RPOTp* (а), *rpoB* (б), *COP1* (в), *HY5* (г) в 4-х дневных этиолированных проростках *A. thaliana* дикого типа и нокаут-мутантов по компонентам рецепции и трансдукции сигнала синего света *cry1/cry2* и *hy5* в ходе деэтиоляции.

Одним из возможных путей регуляции цитокинином начального этапа фотоморфогенеза является модуляция компонентов сигналинга синего света, поэтому в дальнейшем оценивали динамику накопления матриц генов *HY5* и *COP1*. В ходе деэтиоляции проростков дикого типа свет стимулировал экспрессию гена Е3 убиквитин-лигазы *COP1* и способствовал снижению уровня транскриптов гена транс-фактора *HY5* (рисунок, в, г). Цитокинин на фоне действия света подавлял накопление матриц негативного регулятора фотоморфогенеза *COP1* и не регулировал экспрессию гена *HY5* в растениях материнской линии (рисунок, в, г). Мутанты *cry1/cry2* и *hy5* отличались пониженным уровнем матриц *COP1* на свету и не регулировались цитокинином в процессе деэтиоляции. Экзогенный цитокинин стимулировал

накопление транскриптов гена *HY5* у нокаут-мутанта *cry1/cry2*, но не у проростков дикого типа (рисунок, г).

Ключевым событием перехода от гетеротрофного к автотрофному типу питания является светозависимое превращение этиопласта в хлоропласт. Из литературных данных известно, что криптохромы и цитокинины контролируют процессы деэтиоляции [Cortleven et al., 2016; Vandenbussche et al., 2007]. В данной работе исследовали участие компонентов сигналинга синего света в регуляции экспрессии генов аппарата транскрипции пластома при цитокинин-зависимой деэтиоляции *A. thaliana*. Наши эксперименты показали, что компоненты рецепции и трансдукции сигнала синего света вносят значительный вклад в регуляцию экспрессии генов аппарата транскрипции как ядерного, так и пластидного кодирования, и, следовательно, представляют важное звено в реализации процесса деэтиоляции. Подтверждением этого является то, что мутанты *cry1/cry2* и *hy5* отличаются пониженными уровнями матриц генов аппарата транскрипции на начальном этапе фотоморфогенеза. Тем не менее, под действием света мутантные линии *cry1/cry2* и *hy5* оказались способны накапливать транскрипты генов *SIG5*, *RPOTr* и *PAP5* на свету, что, возможно, происходило за счет компенсаторного действия сигнальной системы красного света.

Хорошо известно, что экзогенный цитокинин на фоне действия света дифференциально регулирует экспрессию хлоропластных и ядерных генов, тем самым ускоряя формирование хлоропластов из этиопластов [Cortleven et al., 2016]. В наших экспериментах активирующий эффект цитокинина на экспрессию генов аппарата транскрипции пластома наблюдался только у мутанта *cry1/cry2*, что, возможно, связано с подавлением экспрессии гена – негативного регулятора фотоморфогенеза *COP1* и сопряженной стимуляцией накопления матриц *транс*-фактора *HY5*. Наоборот, у мутанта *hy5* не наблюдалось активации экспрессии генов аппарата транскрипции. Это позволяет предполагать, что *транс*-фактор *HY5* играет значимую роль в пересечении путей трансдукции сигналов синего света и цитокининов.

Положительное действие цитокинина, возможно, также осуществляется через систему восприятия и трансдукции красного света. В дальнейшем мы планируем проанализировать влияние красной части светового спектра на формирование аппарата транскрипции на уровне экспрессии генов РНК-полимераз PEP и NEP.

*Работа выполнена при поддержке Гранта Президента РФ (грант № МК-1908.2018.4).*

#### Литература

Biswal B., Krupinska K., Biswal U.C. Plastid Development in Leaves during Growth and Senescence. – Dordrecht, Heidelberg, New York, London: Springer, 2013. – 876 p.

Börner T., Aleynikova A.Y., Zubo Y.O., Kusnetsov V.V. Chloroplast RNA polymerases: role in chloroplast biogenesis // Biochim Biophys Acta. – 2015. – V. 1847, No. 9. – P. 761-769.

Cortleven A., Marg I., Yamburenko M. V., Schlicke H., Hill K., Grimm B., Schaller G. E., Schmölling T. Cytokinin regulates etioplast-chloroplast transition through activation of chloroplast-related genes // Plant Physiol. – 2016. – V. 172, No. 1. – P. 464-478.

Liu B., Yang Z., Gomez A., Liu B., Lin C., Oka Y. Signaling mechanisms of plant cryptochromes in *Arabidopsis thaliana* // Journal of Plant Research. – 2016. – V. 129, No. 2. – P. 137–148.

Liebers M., Pfannschmidt T. Plastid RNA polymerases and nuclear-encoded proteins associated with them in *Arabidopsis thaliana* // Endocytobiosis and Cell Research. – 2017. – V. 28, No. 1. – P. 20–32.

Vandenbussche F., Habricot Y., Condiff A.S., Maldiney R., van der Straeten D., Ahmad

M. HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signaling pathways in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. – 2007. – V. 49. – P. 428–441.

**PARTICIPATION OF THE BLUE LIGHT SIGNALING COMPONENTS IN THE  
REGULATION OF GENE EXPRESSION OF THE PLASTOME TRANSCRIPTION  
APPARATUS DURING CYTOKININ-DEPENDENT DE-ETIOLATION  
OF *A. THALIANA***

A.S. Doroshenko, M.N. Danilova

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia,  
*anastasiya04101993@gmail.com*

**Abstract.** Studies of the chloroplast biogenesis during the de-etiolation of *Arabidopsis thaliana* have shown that the blue light receptors CRY1 and CRY2, as well as the component of the light signal transduction pathway HY5, control the expression of the genes for the transcriptional apparatus of the plastome. Cytokinin-dependent regulation is carried out primarily through the transcriptional factor HY5.

**Keywords:** *de-etiolation, cryptochromes, photomorphogenesis, cytokinins, gene expression*