

КАНДИДАТНЫЕ ГЕНЫ ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ЛИПОКСИГЕНАЗЫ

М.Д. Пермякова¹, С.В. Осипова^{1, 4}, А.В. Пермяков¹, Т.А. Пшеничникова²,
Е.Г. Рудиковская¹, А.А. Дорошков², И.Н. Леонова², В.В. Верхотуров⁵, U. Lohwasser³,
A. Börner³

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *marperm@rambler.ru*

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия, *wheatpsh@bionet.nsc.ru*

³Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany, *boerner@ipk-gatersleben.de*

⁴Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия, *svetlanaosipova2@mail.ru*

⁵Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский национальный исследовательский технический университет», Иркутск, Россия, *vervv@mail.ru*

Аннотация. Для QTL на пшеничной хромосоме 2A, ассоциированного с активностью липоксигеназы в условиях засухи, было выявлено 19 кандидатных генов с взаимосвязанными функциями. Среди них гены метаболических путей полифосфатов инозита, альдо-кето редуктаз, рецептор-подобных протеин киназ, F-box-белков, субъединиц SWI3A хроматин-ремодулирующего комплекса SWI/SNF, субъединицы B7 ядерного фактора Y(NF-Y), белков семейства 87 цитохрома P450 и кальций-связывающей пероксигеназы.

Ключевые слова: липоксигеназа, пшеница, кандидатные гены, QTL, засуха

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-970-974

С использованием рекомбинантных замещенных дигиплоидных линий пшеницы Саратовская 29/Янецкис Пробат по хромосоме 2A были выявлены два кластера локусов количественных признаков (QTL). Хромосомный регион 2A 108.5–109.5сМ оказался связанным с наибольшим числом (23) физиологических признаков, включая активность липоксигеназы (ЛОГ). Хромосомный регион 2A 102 сМ был связан с 15 признаками. Оба очень близко расположенных кластера включали признаки газообмена, флуоресценции хлорофилла, фенологии, зерновой продуктивности и их индексы устойчивости. Биоинформационным анализом в этих регионах было обнаружено 42 белок-кодирующих гена. Анализ функций выявленных генов показал, что они взаимосвязаны и представляют собой функциональную единицу для перестройки метаболизма растений пшеницы при адаптации к водному дефициту.

ЛОГ катализирует образование гидропероксидов ЖК, дающих начало многим путям метаболизма липидов, в том числе пути биосинтеза фитогормона жасмоновая кислота (ЖАК). Так как этот фермент участвует в широком диапазоне биохимических и молекулярных процессов, функциональные характеристики многих выявленных нами генов позволяют отнести их к кандидатным генам для регуляции активности ЛОГ.

Среди генов в регионе 2A 108.5–109.5сМ были обнаружены аннотированные гомологи двух генов метаболических путей полифосфатов инозита:

– Р-связанная субъединица фосфотидилинозитол N-ацетилглюкозамин трансферазы. Фермент участвует в биосинтезе гликановых структур и в сборке

гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-якоря [Shears, 2015]. GPI-закрепление является консервативной стратегией эукариот для управления широким спектром процессов. GPI-закрепленные белки включают β -1,3-глюкоаназы, металло- и аспартил-протеазы, глицерофосфодиэстеразы, фитоцианины, фасцилин-подобные арабиногалактанные белки, мульти-медь-оксидазы, экстензины, рецепторы плазматических мембран, включая серин/треанин и обогащенные лейциновым повтором рецептор-подобные протеинкиназы, липид-трансферные белки [Vorner, 2003].

– Фосфолипаза С. Фермент продуцирует (модулирует) три сигнала, регулирующие ионные каналы и участвующие в сигнализации Ca^{2+} : инозитол 1,4,5-трифосфат, диацилглицерин и фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат; расщепляет фосфоглицериновую связь в GPI-закрепленных белках, выделяя их из клеточной мембраны [Putney, Tomita, 2012].

Высокофосфорилированные, растворимые инозиты представляют собой группу вторичных мессенджеров с фундаментальным значением во многих клеточных процессах, таких как мембранный траффик, поддержание теломер, рибосомный биогенез, апоптоз и экспрессии генов на уровне транскрипции, ремоделирования хроматина, редактирования и экспорта мРНК [Alcazar-Roman, Wente, 2008]. Известна важная функция инозитолпирофосфатов и в регулировании зависимых от жасмоната ответов. F-box-белки, участвующие в восприятии ЖАК (COI1) и ауксина (TIR1), включают инозитол полифосфаты в качестве корецепторов [Laha et al., 2016].

В данном регионе также были обнаружены аннотированные гомологи двух генов альдо-кето редуктазы. Этот фермент, обладая широкой субстратной специфичностью, может трансформировать липидные альдегиды и кетостероиды [Penning, 2015]. Вероятно, все четыре гена липидного метаболизма могут быть кандидатами для QTL, связанного с активностью растворимой ЛОГ листьев в условиях водного дефицита, обнаруженном в этом хромосомном регионе.

Три из аннотированных гомологов являются генами рецептор-подобных протеинкиназ, обогащенных лейциновыми повторами (LRR), играющих решающую роль в развитии и стрессовых реакциях, опосредованных фитогормонами. Например, взаимодействие LRR PEPR1 с подобным системину пептидом *AtPEP1* повышает цитозольный Ca^{2+} , активирует защитные гены, регулируемые гормонами ЖАК/этилен/салициловая кислота, и индуцируют экспрессию *PDF1.2 (defensin)* – маркерного гена, индуцируемого ЖАК [Liu et al., 2017]. Таким образом, гены LRR могут влиять на фенотипическое проявление активности ЛОГ.

Аннотированные гомологи генов, кодирующих два белка, содержащие F-боксы и DUF-домен, специфичные для однодольных, связаны с убиквитин-протеасомной системой деградации белков в клетках. Принцип восприятия гормонов через убиквитин лигазы SCF распространен в гормональных сигнальных системах растений. Убиквитин-протеасомная система является центральным регулятором в жасмонатном восприятии и сигнализации [Wasternack, Hause, 2013], поэтому эти два гена также могут быть вовлечены в регуляцию активности ЛОГ, ассоциированную с данным хромосомным регионом.

В регионе 2A 108.5–109.5 сМ были обнаружены аннотированные гомологи двух генов, кодирующих субъединицу SWI3A мультибелкового АТФ-зависимого ремодулирующего хроматин комплекса SWI/SNF. Этот комплекс изменяет структуру хроматина путем изменения контактов ДНК-гистон в нуклеосоме. Он участвует в регуляции гормонов посредством физического взаимодействия с различными компонентами гормональных сигнальных путей и регуляторов транскрипции генов, участвующих в биосинтезе и восприятии гормонов [Sarnowska et al., 2016].

Транскрипция ЖАК-чувствительных генов опосредуется субъединицей 25 (MED25) Медиаторного комплекса [Wasternack, Hause, 2013], которая взаимодействует с SWI/SNF и CHD1 комплексами, регулируя архитектуру хроматина [Allen, Taatjes, 2015]. Кроме того, MED25 позитивно регулирует CONSTANS – положительный регулятор *FLOWERING LOCUS T*, чтобы способствовать цветению [Kazan, 2017]. Эти сведения позволяют считать геном-кандидатом для активности ЛОГ аннотированный гомолог гена субъединицы В7 ядерного фактора Y(NF-Y), регулирующего цветение взаимодействием с CONSTANS, а также два гена, кодирующие субъединицу SWI3A комплекса SWI/SNF.

Среди 13 генов, локализованных в регионе 2А 102 сМ, нами были выбраны семь:

– Аннотированные гомологи четырех генов специфических для злаков серин/треонин протеин киназ, два из которых кодировали MAP киназу 27, WNK2. Эти киназы образуют каскады сигнальных путей, участвующих в реакции абиотического стресса и способны фосфорилировать широкий спектр субстратов, включая другие киназы и/или транскрипционные факторы. Члены каскадов могут активироваться более, чем одним типом стресса и выступать в качестве точек пересечения нескольких сигнальных путей. Например, *AtMPK6* участвует в сигнальных путях O₃, H₂O₂, этилена, АБК и ЖАК [Sinha et al., 2011].

– Аннотированные гомологи двух генов цитохрома P450, семейство 87, подсемейство А, полипептид 2. Эти белки участвуют в окислении ЖК, биосинтезе brassinosteroidов и основных фитоалексинов, в циркадной регуляции биосинтеза каротиноидов, оксипиринов, глюкозинолатов и brassinosteroidов [Bolwell et al., 1994].

– Аннотированный гомолог специфической для СЗ-злаков кальций-связывающей пероксигеназы 2. Этот интегральный мембранный белок – калеозин участвует в генерации окисленных ЖК в сигнальных путях АБК и салициловой кислоты, является частью пути ЛОГ, вызванного стрессами, и также может генерировать противогрибковые соединения, полученные из ЖК [Partridge and Murphy, 2009].

По результатам анализа функциональных взаимосвязей генов, локализованных в регионе 2А 102–109.5 сМ, можно представить, как внеклеточные стимулы, связанные с водным дефицитом, могут инициировать транскрипционное перепрограммирование, а также определить место и роль ЛОГ в этом процессе.

Считают, что изменение содержания полифосфатов инозита в определенных физиологических условиях может использоваться клеткой в качестве решающих сигналов [Alcazar-Roman, Wentе, 2008]. В нашем случае сигналы проявились в нескольких направлениях: мобилизация Ca²⁺, GPI-закрепление белков, связывание с рецепторами растительных гормонов, ремоделирование хроматина и экспрессия генов, что соответствует литературным данным.

Быстрая и тонкая перестройка метаболизма растений в условиях стресса происходит за счет посттрансляционных модификаций белков (ПТМ) [Hashiguchi, Komatsu, 2016]. Среди генов, обнаруженных в двух регионах хромосомы 2А и кандидатных генов для активности ЛОГ, большинство имеют отношение к одной из ПТМ, таким как фосфорилирование, убиквитинирование, гликолипирование.

Функциональные взаимосвязи исследуемых генов свидетельствуют о «перекрестном разговоре» гормонов ЖАК, АБК, ауксин, этилен, салициловая кислота и brassinosteroid. Механизм взаимодействия гормональных сигнальных каскадов, конечной точкой которого является многосубъединичный Медиаторный комплекс [Allen, Taatjes, 2015], используются растениями для адаптации своего ответа к типу испытываемого стресса и достижения баланса между ростом и защитой в динамических экологических условиях [Verma et al., 2017].

По нашим данным, по меньшей мере, 19 аннотированных гомологов генов в двух близко расположенных кластерах на хромосоме 2А могут являться кандидатными генами для регуляции активности ЛОГ в условиях дефицита воды. Это свидетельствует о важной роли этого фермента, главным образом, его жасмонатного метаболического пути, в адаптации растений пшеницы к засухе и значительном влиянии на экспрессию засухо-отзывчивых генов.

Работа поддержана грантами РФФИ 15-04-02762 и 18-04-00481. Все эксперименты были проведены с использованием станции искусственного климата Центра коллективного пользования научным оборудованием «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН и на экспериментальных базах двух ЦКП ИЦИГ СО РАН «Лаборатория искусственного выращивания растений» и «Селекционно-генетическая лаборатория».

Литература

Alcazar-Roman A.R., Wentе S.R. Inositol polyphosphates: a new frontier for regulating gene expression // *Chromosoma*. – 2008. – V. 117, No. 1. – P. 1–13.

Allen B.L., Taatjes D.J. The Mediator complex: a central integrator of transcription // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2015. – V. 16, No. 3. – P. 155–166.

Bolwell G.P., Bozak K., Zimmerlin A. Plant cytochrome P45 // *Phytochemistry*. – 1994. – V. 37, No. 6. – P. 1491–506.

Borner G.H.H., Lilley K.S., Stevens T.J., Dupree P. Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Arabidopsis*. a proteomic and genomic analysis // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 132. – P. 568–577.

Hashiguchi A., Komatsu S. Impact of post-translational modifications of crop proteins under abiotic stress // *Proteomes*. – 2016. – V. 4, No. 4. – P. 42.

Kazan K. The multitasking MEDIATOR25 // *Frontiers in Plant Science*. – 2017. – V. 8. – A. 999. – P. 1–11.

Laha D., Parvin N., Dynowski M., Johnen P., Mao H., Bitters S.T., Zheng N., Schaaf G. Inositol polyphosphate binding specificity of the jasmonate receptor complex // *Plant Physiology*. – 2016. – V. 171. – P. 2364–2370.

Liu P.-L., Du L., Huang Y., Gao S.-M., Yu M. Origin and diversification of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRR-RLK) genes in plants // *BMC Evolutionary Biology*. – 2017. – V. 17. – A. 47.

Partridge M., Murphy D.J. Roles of a membrane-bound caleosin and putative peroxygenase in biotic and abiotic stress responses in *Arabidopsis* // *Plant Physiol. Biochem.* – 2009. – V. 47, No. 9. – P. 796–806.

Penning T.M. The aldo-keto reductases (AKRs): overview // *Chem. Biol. Interact.* – 2015. – V. 5, No. 234. – P. 236–246.

Putney J.W., Tomita T. Phospholipase C signaling and calcium influx // *Adv. Biol. Regul.* – 2012. – V. 52, No. 1. – P. 152–164.

Sarnowska E., Gratkowska D.M., Sacharowski S.P., Cwiek P., Tohge T., Fernie A.R., Siedlecki J.A., Koncz C., Sarnowski T.J. The role of SWI/SNF chromatin remodeling complexes in hormone crosstalk // *Trends in Plant Science*. – 2016. – V. 21, No. 7. – P. 594–608.

Sinha A.K., Jaggi M., Raghuramand B., Tuteja N. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress // *Plant Signaling & Behavior*. – 2011. – V. 6. – P. 196–203.

Shears S.B. Inositol pyrophosphates: why so many phosphates? // *Adv. Biol. Regul.* – 2015. – V. 57. – P. 203–216.

Verma V., Ravindran P., Kuma P.P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses // BMC Plant Biology. – 2016. – V. 16. – A. 86.

Wasternack C., Hause B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany // Annals of Botany. – 2013. – V. 111. – P. 1021–1058.

CANDIDATE GENES FOR REGULATION OF LIPOXYGENASE ACTIVITY

M.D. Permyakova¹, S.V. Osipova^{1, 4}, A.V. Permyakov¹, T.A. Pshenichnikova², E.G. Rudikovskaya¹, A.A. Doroshkov², I.N. Leonova², V.V. Verkhoturov⁵, U. Lohwasser³, A. Börner³

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, *marperm@rambler.ru*

²Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia, *wheatpsh@bionet.nsc.ru*

³Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany, *boerner@ipk-gatersleben.de*

⁴Irkutsk State University, Irkutsk, Russia, *svetlanaosipova2@mail.ru*

⁵Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Irkutsk National Research Technical University», Irkutsk, Russia, *vervv@mail.ru*

Abstract. For the QTL associated with lipoxygenase activity under drought, the 19 candidate genes with interrelated functions were identified. Among them were the genes of metabolic pathways of inositol polyphosphates, aldo-keto reductases, receptor-like protein kinases, F-box proteins, SWI3A subunits of the chromatin remodeling complex SWI / SNF, B7 subunit of nuclear factor Y (NF- Y), cytochromes P450 (87 family) and calcium-binding peroxxygenase.

Keywords: *lipoxygenase, wheat, candidate genes, QTL, drought*