

Английский текст <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Поиск участников сигнального пути ауксина к его транспортерам PIN на основе метаанализа транскриптомов, индуцированных ауксином

В.В. Коврижных^{1, 2}✉, З.С. Мустафин¹, З.З. Багаутдинова¹

¹ Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ vasilinakovr@gmail.com

Аннотация. Активный полярный транспорт гормона растений ауксина, осуществляемый его транспортерами, – ключевое звено в формировании и поддержании распределения ауксина, которое, в свою очередь, определяет морфогенез растения. Пластичность распределения ауксина в большой степени реализуется через молекулярно-генетическую регуляцию им экспрессии транспортеров семейства PIN-FORMED (PIN) белков. Регуляция ауксином экспрессии чувствительных к нему генов происходит через ARF-Aux/IAA-зависимый сигнальный путь. Однако неизвестно, какие ARF-Aux/IAA белки участвуют в регуляции ауксином экспрессии генов PIN. У *Arabidopsis thaliana* семейства белков PIN, ARF и Aux/IAA многочисленны, возможны различные комбинации представителей этих семейств в реализации сигнального пути, что создает сложность для понимания механизмов этого процесса. Использование данных высокопроизводительного секвенирования транскриптомов, индуцированных ауксином (RNA-Seq), делает возможным обнаружение генов-кандидатов, участвующих в регуляции экспрессии белков PIN. Мы разработали алгоритм метаанализа ауксин-индуцированных транскриптомов, с помощью которого отобрали гены, изменяющие свою экспрессию в ответе на ауксин вместе с PIN1, PIN3, PIN4, PIN7, и предсказали возможные регуляторы ARF-Aux/IAA сигнального пути для каждого из дифференциально экспрессирующихся PIN. Применяя сравнительный анализ, мы определили общие и специфичные аспекты в регуляторных контурах, исследуемых PIN. Реконструкция генных сетей и их оценка показали возможные взаимодействия между генами и послужили дополнительным подтверждением большинства сигнальных путей, полученных в метаанализе. С помощью комплексного подхода мы предсказали, что регуляция ауксином экспрессии PIN происходит через несколько ARF-Aux/IAA регуляторных контуров, опосредованных комбинацией ARF4, ARF10 и IAA4, IAA12, IAA17, IAA18 и IAA32. Часть из них являются специфичными при формировании ауксинового ответа с участием отдельных белков PIN, тогда как другие – общими для нескольких белков PIN. Разработанный алгоритм метаанализа можно применять для решения других задач поиска регуляторов экспрессии генов с привлечением полногеномных данных.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*; ауксин; PIN-FORMED; ауксин-регулируемые гены; метаанализ полногеномных данных; генные сети.

Для цитирования: Коврижных В.В., Мустафин З.С., Багаутдинова З.З. Поиск участников сигнального пути ауксина к его транспортерам PIN на основе метаанализа транскриптомов, индуцированных ауксином. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(1):39-45. DOI 10.18699/VJ21.005

The auxin signaling pathway to its PIN transporters: insights based on a meta-analysis of auxin-induced transcriptomes

V.V. Kovrizhnykh^{1, 2}✉, Z.S. Mustafin¹, Z.Z. Bagautdinova¹

¹ Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ vasilinakovr@gmail.com

Abstract. Active polar transport of the plant hormone auxin carried out by its PIN transporters is a key link in the formation and maintenance of auxin distribution, which, in turn, determines plant morphogenesis. The plasticity of auxin distribution is largely realized through the molecular genetic regulation of the expression of its transporters belonging to the PIN-FORMED (PIN) protein family. Regulation of auxin-response genes occurs through the ARF-Aux/IAA signaling pathway. However, it is not known which ARF-Aux/IAA proteins are involved in the regulation of PIN gene expression by auxin. In *Arabidopsis thaliana*, the PIN, ARF, and Aux/IAA families contain a larger number of members; their various combinations are possible in realization of the signaling pathway, and this is a challenge for understanding the mechanisms of this process. The use of high-throughput sequencing data on auxin-induced transcriptomes makes it possible to identify candidate genes involved in the regulation of PIN expression. To address this problem, we created an approach for the meta-analysis of auxin-induced transcriptomes, which helped us select genes that change their expression during the auxin response together with PIN1, PIN3, PIN4 and PIN7. Possible regulators of ARF-Aux/IAA signal-

ing pathway for each of the PINs under study were identified, and so were the aspects of their regulatory circuits both common for groups of *PIN* genes and specific for each *PIN* gene. Reconstruction of gene networks and their analysis predicted possible interactions between genes and served as an additional confirmation of the pathways obtained in the meta-analysis. The approach developed can be used in the search for gene expression regulators in other genome-wide data.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; auxin; PIN-FORMED; auxin-response genes; meta-analysis; gene network.

For citation: Kovrizhnykh V.V., Mustafin Z.S., Bagautdinova Z.Z. The auxin signaling pathway to its PIN transporters: insights based on a meta-analysis of auxin-induced transcriptomes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(1):39-45. DOI 10.18699/VJ21.005

Введение

Ключевая роль ауксина в регуляции роста и развития растений – давно признанный факт (Mroue et al., 2018). Значительная часть ауксина синтезируется в апикальных меристемах надземной части растения и затем переносится к корню, обеспечивая там развитие боковых и придаточных корней, а также поддержание ниши ствольных клеток в меристеме главного корня. На клеточном уровне роль ауксина в физиологических процессах осуществляется за счет концентрационно-зависимого действия на скорость деления и удлинения клеток (Campanoni, Nick, 2005). Поэтому формирование и поддержание градиентов концентрации ауксина в тканях имеют решающую роль в морфогенезе. Например, в экспериментах по отсечению кончика корня было показано, что через несколько часов может вновь сформироваться распределение ауксина с максимумом, отстоящим от нового кончика корня на определенном расстоянии (Grieneisen et al., 2007; Mironova et al., 2010). При этом регенерация меристемы и нормальное функционирование корня происходят только после восстановления паттерна распределения ауксина (Xu et al., 2006).

Гены семейства *PIN-FORMED* (*PIN*), которые у *Arabidopsis thaliana* кодируют восемь трансмембранных белков-транспортёров, осуществляют отток ауксина из клетки (Weijers et al., 2001; Petrasek, 2006). Транспортёры *PIN1-4*, *PIN7* локализуются неравномерно (полярно) на плазматической мембране клетки, за счет чего в ткани формируются направленные потоки ауксина. Так, в результате объединения потоков ауксина на уровне отдельных клеток в кончике корня *A. thaliana* формируется распределение этого гормона с максимумом в покоем центре, определяющем поддержание ниши ствольных клеток в корне (Ferguson, Friml, 2008). В большинстве случаев функция белков *PIN* является основополагающей в формировании и поддержании распределения ауксина. Известно, что существует сложная сеть регуляции ауксином экспрессии генов *PIN*, которая включает положительные и отрицательные обратные связи (Geldner et al., 2001; Friml, 2004; Sauer et al., 2006; Vieten et al., 2007). В работе A. Vieten с коллегами (2005) экспериментально показано, что обработка экзогенным ауксином приводит к увеличению транскрипции всех генов *PIN* (*PIN1-PIN4*, *PIN6*, *PIN7*) в корне, и оптимальная концентрация ауксина для максимального повышения уровня различается у каждого из этих генов (Vieten et al., 2005). Позднее мы сообщили, что транскрипционная и посттранскрипционная регуляция экспрессии *PIN1* ауксином имеют свои особенности (Omelyanchuk et al., 2016). На транскрипционном уровне повышение экспрессии *PIN1* происходит в широком диа-

пазоне концентраций экзогенно применяемого ауксина, в то время как уровень белка *PIN1* изменяется нелинейно, повышаясь с ростом концентрации ауксина при низких дозах гормона и понижаясь при увеличении концентрации ауксина в районе его высоких доз.

Основной механизм регуляции ауксином экспрессии чувствительных к нему генов происходит через ARF-Aux/IAA-зависимый сигнальный путь (Ulmasov et al., 1997). В отсутствие ауксина транскрипционные факторы ARF связаны корепрессорами Aux/IAA. При поступлении в клетку ауксин взаимодействует с рецептором TIR1, который формирует убиквитин-лигазный комплекс SCF^{TIR1} вместе с другими белками (Dharmasiri et al., 2005; Kepinski, Leyser, 2005). Далее этот комплекс связывается с белками Aux/IAA, регулируя их деградацию в протеосоме 26S (Calderon-Villalobos et al., 2010; Hayashi, 2012). Таким образом, транскрипционные факторы ARF начинают функционировать и активировать или подавлять транскрипцию генов ответа на ауксин. В геноме *A. thaliana* найдено 29 генов *Aux/IAA* и 23 *ARF*, их экспрессия в разных типах клеток отличается, создавая достаточную молекулярную сложность для обеспечения множества различных ответов на ауксин (Remington et al., 2004; Teale et al., 2006). При этом не установлено, какие именно ARF-Aux/IAA белки участвуют в регуляции экспрессии генов *PIN* ауксином. Известно лишь, что в промоторах всех генов *PIN* биоинформатическими методами были обнаружены сайты связывания транскрипционных факторов ARF (Habets, Offringa, 2014).

Реконструкция сигнального пути ауксина к его *PIN* транспортёрам имеет сложности для прямого решения экспериментальными методами. В связи с этим мы провели метаанализ полногеномных данных транскриптомов, индуцированных ауксином, с целью получить список наиболее вероятных регуляторов экспрессии генов *PIN* ауксином. Мы разработали алгоритм метаанализа комбинированных полногеномных данных и определили списки генов, значимо меняющих экспрессию совместно с генами *PIN* в ответ на ауксин. Комплексный подход, включающий сравнительный анализ этих списков и на их основе реконструированных генных сетей, предсказал участников ARF-Aux/IAA сигнального пути, вовлеченных в регуляцию экспрессии *PIN* ауксином. Так, общие сигнальные пути для *PIN1*, *PIN3*, *PIN7* опосредованы комбинацией *ARF4* с *IAA12* и *IAA18*. В то время как специфичная регуляция ауксином экспрессии отдельных генов *PIN*, вероятно, осуществляется другими белками ARF-Aux/IAA сигнального пути. Например, *ARF10* и *IAA32*, по результатам нашего анализа, присутствовали только в списках генов, значимо меняющих экспрессию

вместе с *PIN4*. Кроме того, в списках генов-кандидатов мы отметили дифференциальную экспрессию генов, которые вовлечены в посттранскрипционную регуляцию активности PIN.

Материалы и методы

Информация, используемая в метаанализе. Для исследования были взяты общедоступные данные по транскриптомам (микрочипам и секвенированию РНК) *A. thaliana*, индуцированным ауксином, большая часть которых использована ранее в работе (Cherenkov et al., 2018). Сводная таблица была дополнена данными из статьи (Omelyanchuk et al., 2017). В итоге для метаанализа мы взяли результаты 22 экспериментов. Гены определяли как дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ), если критерий *p* (по Бенджамини–Хохбергу) был меньше 0.05. На основе этих данных в соответствии с разработанным нами алгоритмом (см. раздел «Результаты. Алгоритм метаанализа») для каждого *PIN* были выделены свои наборы экспериментов (Приложение 1)¹.

Работа со сводной таблицей и списками проведена в программе Excel с помощью стандартных инструментов (фильтры, условное форматирование).

Реконструкция генных сетей. Генные сети на основе списков дифференциально экспрессирующихся генов были реконструированы с помощью ресурса String (<https://string-db.org/>) (Szklarczyk et al., 2019). Этот ресурс строит генные сети, используя заданные пользователем критерии, объединяя заданные гены по следующим типам связей: experimentally determined (экспериментальные данные, такие как, например, аффинная хроматография), databases (связь, полученная из записей из различных баз данных), textmining (упоминание генов/белков вместе в публикациях), co-expression (связь, полученная из сходства паттернов экспрессии мРНК), neighborhood (вычисляется на основании близости расстояния между генами в различных геномах), gene fusion (выявление при сравнении геномов гибридных генов, образованных в ходе эволюции из ранее независимых генов в результате хромосомных перестроек), co-occurrence (определение при сравнении геномов совместного переноса, потери или дубликации генов в эволюции, что может указывать на участие в общей функции), protein homology (гомология белков). Каждая связь обладает собственным значением достоверности, вычисленной посредством алгоритмов String.

Результаты

Алгоритм метаанализа

Этап 1: сбор данных. Формируем сводную таблицу из всех общедоступных микрочип-экспериментов и данных по РНК секвенированию на интересующую тему. В нашем случае это информация о дифференциальной экспрессии генов *A. thaliana* в ответ на обработку экзогенным ауксином. Собранные данные могут быть разнородными, например в 22 экспериментах, используемых нами в метаанализе, содержится два типа образцов (корень, весь проросток), три стадии развития (3-, 5–7-, 10–12-дневные

проростки), пять временных отрезков обработки (0.5–1 ч, 2–4, 6–8, 12, 24 ч), шесть типов ауксина и концентраций (0.1; 1; 5; 10 мкМ ИУК; 10 мкМ НУК; 10 мкМ ИБК).

Этап 2: отбор экспериментов, соответствующих задаче. Находим в сводной таблице, полученной на этапе 1, в каких экспериментах происходило изменение экспрессии генов, для которых мы ищем регуляторы. Согласно нашей задаче, известно, что у *A. thaliana* есть восемь транспортеров PIN. Дифференциально экспрессирующимися в данных общедоступных транскриптомах, индуцированных ауксином, мы обнаружили *PIN1* (в пяти экспериментах), *PIN3* (в восьми экспериментах), *PIN4* (в одном эксперименте) и *PIN7* (в шести экспериментах).

Этап 3: определение генов, меняющих свою экспрессию под действием ауксина вместе с генами PIN. Отдельно для каждого *PIN* мы отбирали только те ДЭГ, которые изменялись исключительно в экспериментах, где этот *PIN* меняет экспрессию, а в других экспериментах экспрессия этих генов была прежней. Таким образом, мы выявляем гены, потенциально участвующие в регуляции ауксином экспрессии генов *PIN*. Здесь также могут оказаться гены – непосредственные мишени изменения градиента ауксина под действием белков PIN. Для каждого исследуемого гена *PIN* формируется таблица, в которой отмечены гены, изменяющие свою экспрессию совместно с ним хотя бы в одном эксперименте, а также содержится информация о направлении изменения экспрессии каждого гена (активация или подавление) под воздействием исследуемого фактора.

Этап 4: формирование списков ДЭГ, значимо изменяющих экспрессию совместно с PIN. Мы применили биномиальный тест для определения, в скольких экспериментах ДЭГ должен присутствовать, чтобы считать совместное с геном *PIN* изменение экспрессии значимым с вероятностью более 95 %. Для разных списков генов пороговые величины значимости отличаются в соответствии с разным числом экспериментов, в которых определенный *PIN* дифференциально экспрессируется (см. этап 2). В нашем случае для *PIN3* ДЭГ считается значимым, если меняет свою экспрессию совместно в трех и более экспериментах, для *PIN1* и *PIN7* – в двух и более. Поскольку изменение экспрессии *PIN4* происходит в одном эксперименте, то список из этапа 3 в его случае не изменится.

Этап 5: определение общих и специфичных групп генов. Сравнивая между собой списки ДЭГ из предыдущего этапа, выделяем гены, встречающиеся в нескольких списках, т.е. общие для нескольких *PIN*, а также отмечаем гены, обнаруженные только в одном списке, тем самым определяя гены, специфично изменяющие экспрессию совместно с определенным *PIN*.

Этап 6: построение генных сетей. Используя подготовленные списки дифференциально-экспрессирующихся генов из этапа 4, реконструируем сеть взаимодействий между всеми генами. Наличие связности в этой сети отображает набор генов, для которых уже было найдено одно из доступных в базе String взаимодействий (textmining, co-expression, co-occurrence и т.д.).

Этап 7: анализ состава генных сетей. В первую очередь выделяли гены, для которых в String найдены связи к исследуемым генам, обращая внимание, на основе ка-

¹ Приложения 1–3 см. по адресу:

<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2021-25/appx1.pdf>

ких данных определено взаимодействие. Затем в списке генов онтологий выбираем биологические процессы, имеющие отношение к исследуемому вопросу. В нашем исследовании мы выбирали активируемый ауксином сигнальный путь.

Применив описанный выше алгоритм метаанализа данных, мы получили несколько генов-кандидатов, с высокой долей вероятности осуществляющих регуляцию экспрессии исследуемых генов *PIN*. Далее описываем результаты для задачи реконструкции сигнального пути ауксина к его транспортерам *PIN*.

Метаанализ транскриптомов, индуцированных ауксином

Изначально в собранных транскриптомах, индуцированных ауксином, было более 20 тыс. ДЭГ, изменяющих экспрессию в ответ на обработку ауксином, среди этих генов было четыре представителя из семейства *PIN*: *PIN1*, *PIN3*, *PIN4*, *PIN7*. Выполнив описанный выше алгоритм метаанализа, мы получили четыре списка ДЭГ, совместно изменяющих экспрессию с *PIN1*, *PIN3*, *PIN4*, *PIN7* соответственно (Приложение 2). Суммарно значимо повышал экспрессию 531 ген, 236 генов снижали экспрессию (рис. 1). Совместно с *PIN1* значимо изменяли экспрессию 378 генов, 375 из которых так же, как *PIN1*, повысили уровень экспрессии в ответ на обработку ауксином. Для остальных генов *PIN* разница в числе подавляемых и активируемых ауксином потенциальных регуляторов была не такой резкой.

Затем, сравнивая списки между собой, мы определили ДЭГ, общие для нескольких *PIN* и специфичные для каждого гена *PIN*. Получено 12 групп генов: для каждого *PIN* были найдены специфичные активируемые ауксином гены и специфичные подавляемые, а также две группы генов, активируемых ауксином, общие для групп (*PIN1*, *PIN3*, *PIN7*) и (*PIN1*, *PIN7*), две группы генов, подавляемых ауксином, общие для (*PIN3*, *PIN7*) и (*PIN1*, *PIN3*). Активируемые и подавляемые потенциальные регуляторы *PIN4* не пересекаются с таковыми для других *PIN*. Поскольку среди потенциальных генов-регуляторов активности *PIN* присутствовали участники сигнального пути ответа на ауксин, то мы провели их поиск в списках (см. Приложение 2) и оценили, к каким из 12 групп ДЭГ, описанных выше, они принадлежат.

Предсказание ауксин-зависимых регуляторов экспрессии генов *PIN*

Поскольку метаанализ направлен на предсказание ауксин-зависимых регуляторов экспрессии генов *PIN*, в списках ДЭГ мы выделили гены транскрипционной и посттранскрипционной регуляции. Поиск возможных транскрипционных регуляторов мы ограничили транскрипционными факторами ARF и белками IAA. Возможные посттранскрипционные регуляторы определяли среди членов известных семейств белков, влияющих на локализацию белков *PIN* на мембране клетки.

Возможные регуляторы экспрессии *PIN* на транскрипционном уровне. В результате метаанализа мы нашли, что общими потенциальными регуляторами для (*PIN1*, *PIN3*, *PIN7*) являются *ARF4* и *IAA12*, *IAA18*. Спе-

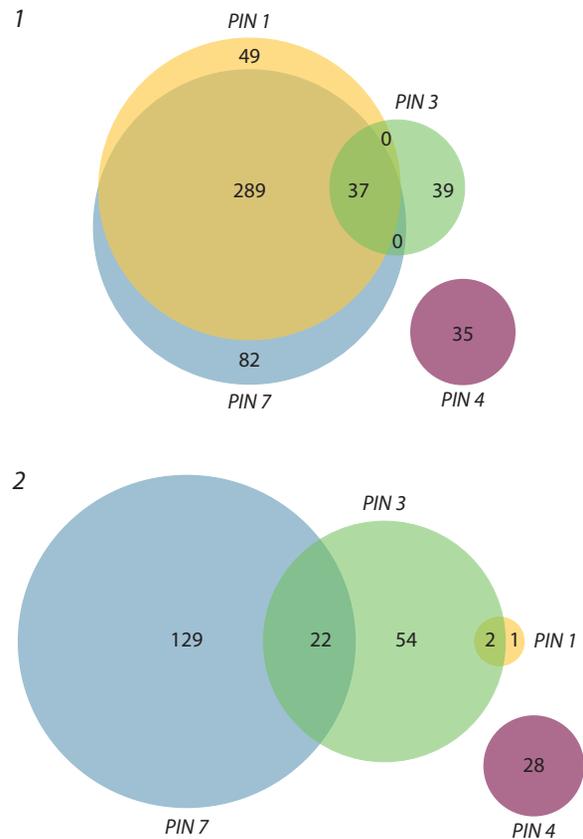


Рис. 1. Выявленные в метаанализе 12 групп генов, значимо меняющих свою экспрессию совместно с *PIN1*, *PIN3*, *PIN4*, *PIN7*, экспрессия которых активируется (1) и подавляется (2) в ответ на ауксин.

цифичными были определены *IAA4* для *PIN1*, *ARF10* и *IAA32* для *PIN4*. Кроме того, *IAA17* был найден в группе генов, изменяющих свою экспрессию с *PIN1* и *PIN7*. Интересно, что среди специфичных регуляторов *PIN3* и *PIN7* мы не обнаружили транскрипционные факторы, относящиеся к семейству Aux/IAA, но нашли регуляторы, принадлежащие к другим семействам транскрипционных факторов. Следовательно, очевидны различия в наборах ARF-Aux/IAA для исследуемых генов *PIN*, что может также обуславливать различия в дозозависимой регуляции ауксином.

Возможные регуляторы полярной локализации белков *PIN*. Согласно опубликованным данным, белки *PIN* циркулируют между мембраной и цитоплазмой в везикулах. Этот процесс регулируется белками BIG, GN, ARF1, семейством киназ AGC, PID, функционирование которых находится под контролем ауксина (Dhonukshe, 2011). На полярную локализацию белков *PIN* влияют также такие ключевые регуляторы, как ABCB1 и ABCB19, семейства ROPGEF (Pan et al., 2015). В ходе метаанализа данных среди дифференциально экспрессирующихся генов в ответ на обработку ауксином мы обнаружили снижение экспрессии *BIG4* и *ROPGEF11* в списках генов, изменяющих свою экспрессию вместе с *PIN7* и *PIN4* соответственно. Повышение экспрессии было отмечено для *WAG2* (семейство киназ AGC) в группе генов, изменяющих свою экспрессию вместе с *PIN1* и *PIN7*.

Кроме того, на наш взгляд, интересно, что сигнальный пептид из RGF/GLV/CLE семейства *RGF6/GLV1/CLEL6* повышает свою активность в ответе на ауксин в экспериментах, где увеличивается активность *PIN1* и *PIN7*, а другой сигнальный пептид из этого семейства, *RGF8/GLV6/CLEL2*, – в экспериментах, где повышалась экспрессия только *PIN7*.

Таким образом, формирование реакций в ответ на ауксин для (*PIN1*, *PIN3*, *PIN7*) группы обусловлено двумя общими сигнальными путями – *ARF4* с *IAA12* или *IAA18*. Дополнительно существуют специфичные ARF-Аух/IAA пути для *PIN1* и *PIN4*. Также среди известных ауксинчувствительных генов, влияющих на экспрессию *PIN*, мы обнаружили подавление экспрессии *BIG4* и *ROPGEF11*, что, вероятно, вносит вклад в специфичные ответы *PIN7* и *PIN4* соответственно.

Реконструкция генных сетей

Мы использовали списки ДЭГ для каждого гена *PIN* и реконструировали генные сети, что позволило оценить, для каких ДЭГ описано взаимодействие и, главное, как все эти ДЭГ могут влиять на активность генов *PIN*. В результате связанные сети, в которых были найдены взаимодействия с генами *PIN*, получились только для *PIN1*, *PIN3* и *PIN7*. Метаанализ, на основе которого были сделаны списки генов для генных сетей, сам по себе обеспечивает значимость, поэтому мы использовали порог для построения связей 0.4. Поскольку нас интересует реконструкция сигнального пути ауксина, в String мы отметили только этот биологический процесс. Примечательно, что большинство связей образовано на основе автоматического анализа текстов статей. В генной сети, реконструированной на основе ДЭГ, меняющих свою экспрессию вместе с *PIN1*, было найдено 12 генов, относящихся к активации сигнального пути ауксина (Приложение 3). При этом напрямую с *PIN1* были связаны *IAA12*, *IAA17* (*AXR3*), *WAG2*, *AUX1*, остальные гены ответа на ауксин были связаны с *PIN1* опосредованно (рис. 2). Можно отметить также, что напрямую с *PIN1* были связаны *AIL6/PLT3* и *AVP1*, относящиеся к процессам развития органов арабидопсиса, регулируемых ауксином (Krizek, 2011). Эти гены можно отнести к генам, являющимся непосредственными мишенями изменения градиента ауксина под действием белков *PIN*. Среди этих генов связи *PIN1* с *AIL6* и *WAG2* построены на основе данных о коэкспрессии в полногеномных экспериментах РНК секвенирования.

В генной сети, реконструированной для ДЭГ, изменяющих экспрессию вместе с *PIN3*, было восемь генов, традиционно относящихся к сигнальному пути ауксина (см. Приложение 3). Прямые связи с *PIN3* были найдены для *AUX1* и *IAA12*, *SAUR9*. В генной сети для *PIN7* 14 генов относились к традиционному сигнальному пути ауксина. При этом *PIN7* напрямую взаимодействует с *IAA12*, *IAA17* (*AXR3*), *AUX1*, *LRP1*, *WAG2* (см. Приложение 3). Кроме того, у *PIN7* были прямые связи с *ABCG33*, *NFA6*, *PHOT1*, *YUC2*, *YUC6*, относящимися к другим биологическим процессам, контролируемым ауксином. Реконструкция генных сетей – дополнительное подтверждение того, что регуляция ауксином экспрессии генов *PIN*, вероятно, происходит с участием *IAA12*,

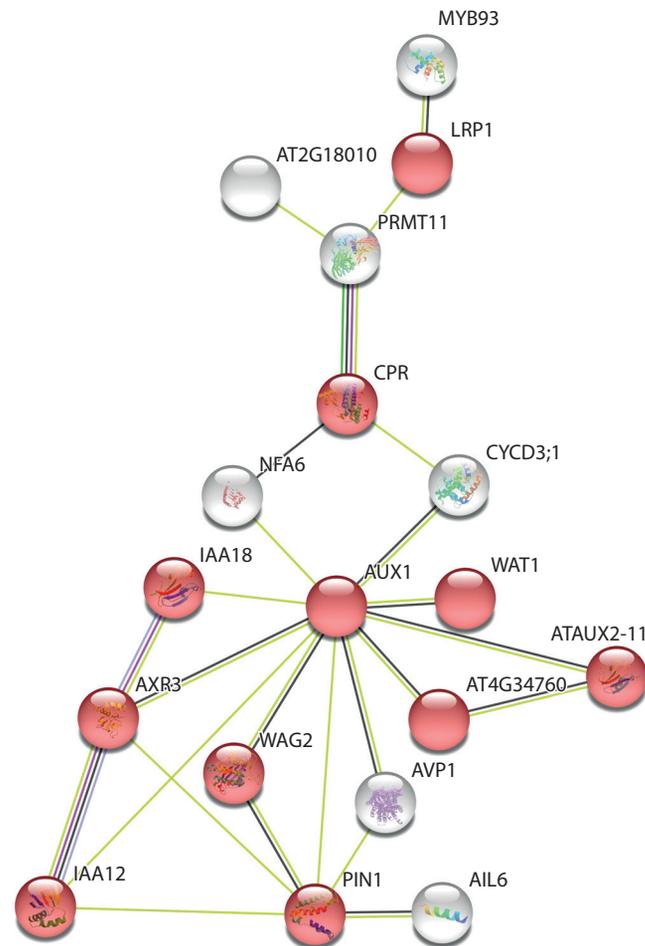


Рис. 2. Фрагмент генной сети, содержащий гены, связанные с *PIN1*, и гены сигнального пути ауксина.

Красными кругами обозначены гены, традиционно относящиеся к сигнальному пути ауксина, серыми – гены, выявленные в метаанализе, для которых в String были найдены прямые или опосредованные связи к *PIN1*. Цвет связи отражает, на основе каких данных из String построено взаимодействие. Желтым цветом показаны связи, построенные исходя из анализа текстов статей, черным – по данным о коэкспрессии, голубым – по принципу гомологии белков, розовым – на основе данных о белок-белковом взаимодействии.

IAA17. При этом следует отметить, что отсутствие прямых связей с *PIN* для остальных предсказанных метаанализом регуляторов ARF-Аух/IAA сигнального пути не исключает их из списка кандидатов для экспериментальной проверки в будущем.

Обсуждение

Фитогормоны активно участвуют в процессах роста и морфогенеза растений. Действие ауксина в этих процессах хорошо изучено и основано на изменении распределения ауксина в тканях (Mroue et al., 2018). Следовательно, концентрация ауксина в клетке – лимитирующий фактор в определении ее судьбы. Белки-транспортеры семейства *PIN* играют важную роль в реализации морфогенетического действия ауксина, так как создают направленные потоки этого гормона в тканях и, таким образом, опосредуют формирование градиентов концентрации ауксина (Vanneste, Friml, 2009).

Важным аспектом в описанном выше процессе является наличие положительных и отрицательных обратных связей во взаимной регуляции оттока ауксина из клетки посредством функционирования белков PIN и количества этих транспортеров, контролируемого ауксином. Регуляция экспрессии чувствительных к ауксину генов опосредована двумя семействами белков. Первое семейство – транскрипционные факторы ARF, которые в промоторе чувствительного к ауксину гена связываются с сайтом AuxRe и выступают в роли активатора или репрессора экспрессии (Ulmasov et al., 1997). В некоторых источниках предположительно активаторами экспрессии считаются только ARF5-ARF8, ARF19, однако экспериментального подтверждения этому нет (Guilfoyle, Hagen, 2007). Второе – корепрессоры Aux/IAA, которые в отсутствие ауксина связаны с ARF.

Ранее были сообщения о подавлении экспрессии PIN1–4, PIN7 в мутантах *axr3/iaa17* и *solitary-root-1(slr-1)/iaa14* (Vieten et al., 2005) и о регуляции экспрессии PIN1 транскрипционным фактором ARF5 (Wenzel et al., 2007), который взаимодействует с IAA12 (Hamann, 2002). В настоящей работе, используя компьютерные методы метаанализа полногеномных данных и реконструкции генных сетей, мы предсказали детали сигнального пути ауксина к его транспортерам PIN. Результаты говорят о том, что для регуляции ауксином транскрипции *PIN1*, *PIN3*, *PIN7* и *PIN1*, *PIN7* существуют общие механизмы, а также есть специфичные механизмы регуляции ауксином экспрессии *PIN*. Общим механизмом для *PIN1*, *PIN3*, *PIN7* мы предсказываем активацию их экспрессии через ARF4-IAA12, ARF4-IAA18, а для *PIN1* и *PIN7* – дополнительно через ARF4-IAA17. Специфичные механизмы осуществляются через ARF4-IAA4 и ARF10-IAA32 для *PIN1* и *PIN4* соответственно. Взаимодействия между указанными ARF и IAA имеют экспериментальные подтверждения (Рапонов et al., 2008). Недавно было показано, что засоленность снижает экспрессию генов *PIN* и приводит к стабилизации IAA17 (Liu et al., 2015). Причем этот вид стресса вызывает уменьшение размера апикальной меристемы корня из-за снижения накопления ауксина, опосредованного падением уровня экспрессии *PIN1*, *PIN3*, *PIN7*. В наших данных в транскриптомах, индуцированных ауксином, повышению экспрессии *PIN1* и *PIN7* сопутствует увеличение экспрессии *IAA17*.

Для сигнальных пептидов семейства RGF/GLV/CLEL ранее было отмечено, что при гравитропизме они меняют градиент ауксина в гипокотиле и корне (Whitford et al., 2012). В корне это происходит за счет регуляции пептидами этого семейства локализации белков PIN2. При этом показано, что пептиды GLV3 и, возможно, GLV6 и GLV9 секретируются из кортекса и эндодермиса и проходят во внешние слои для регуляции локализации PIN2. Пептид GLV1 не экспрессируется в корне, но есть в гипокотиле, где также меняет градиент ауксина при гравитропизме, как при сверхэкспрессии, так и при потере функции при мутации (Whitford et al., 2012). И, судя по нашим данным, пептиды RGF/GLV/CLEL участвуют в сигнальном пути, регулирующем локализацию на мембране PIN1 и PIN7 транспортеров, и, возможно, опосредованно влияют на увеличение экспрессии этих генов *PIN*. Сверхэкспрессия

или обработка GLV1 приводят к удлинению корня и его апикальной меристемы за счет того, что увеличивается зона клеточных делений в корне, т. е. клетки позже переходят к дифференцировке (Fernandez et al., 2013). Этот переход также связан с изменением распределения ауксина, которое формируется его транспортерами.

Заключение

Таким образом, разработанный алгоритм метаанализа полногеномных данных был применен к задаче поиска участников и реконструкции сигнального пути ауксина к его транспортерам PIN. Нам удалось выявить, что ауксин контролирует экспрессию *PIN1*, *PIN3* и *PIN7* как через общие регуляторы, так и специфично, в то время как для *PIN4* были определены только специфичные регуляторы. Мы нашли опубликованные экспериментальные данные, которые частично подтверждают наши предположения. В результате проведенного компьютерного исследования нами выдвинуты новые кандидаты для экспериментальной проверки.

Список литературы / References

- Calderon-Villalobos L.L., Tan X., Zheng N., Estelle M. Auxin perception – structural insights. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010;2: a005546-a005546. DOI 10.1101/cshperspect.a005546.
- Campanoni P., Nick P. Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiol.* 2005;137:939-948. DOI 10.1104/pp.104.053843.
- Cherenkov P., Novikova D., Omelyanchuk N., Levitsky V., Grosse I., Weijers D., Mironova V. Diversity of cis-regulatory elements associated with auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 2018; 69:329-339. DOI 10.1093/jxb/erx254.
- Dharmasiri N., Dharmasiri S., Estelle M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature.* 2005;435:441-445. DOI 10.1038/nature 03543.
- Dhonukshe P. PIN polarity regulation by AGC-3 kinases and ARF-GEF. *Plant Signal. Behav.* 2011;6:1333-1337. DOI 10.4161/psb.6.9. 16611.
- Feraru E., Friml J. PIN polar targeting. *Plant Physiol.* 2008;147:1553-1559. DOI 10.1104/pp.108.121756.
- Fernandez A., Hilson P., Beeckman T. GOLVEN peptides as important regulatory signalling molecules of plant development. *J. Exp. Bot.* 2013;64:5263-5268. DOI 10.1093/jxb/ert248.
- Friml J. A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science.* 2004;306:862-865. DOI 10.1126/science.1100618.
- Geldner N., Friml J., Stierhof Y.-D., Jürgens G., Palme K. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature.* 2001;413:425-428. DOI 10.1038/35096571.
- Grieneisen V.A., Xu J., Marée A.F.M., Hogeweg P., Scheres B. Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature.* 2007;449:1008-1013. DOI 10.1038/nature 06215.
- Guilfoyle T.J., Hagen G. Auxin response factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2007;10:453-460. DOI 10.1016/j.pbi.2007.08.014.
- Habets M.E.J., Offringa R. PIN-driven polar auxin transport in plant developmental plasticity: a key target for environmental and endogenous signals. *New Phytol.* 2014;203:362-377. DOI 10.1111/nph. 12831.
- Hamann T. The *Arabidopsis* *BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes Dev.* 2002;16:1610-1615. DOI 10.1101/gad.229402.
- Hayashi K. The interaction and integration of auxin signaling components. *Plant Cell Physiol.* 2012;53:965-975. DOI 10.1093/pcp/ pcs035.

- Kepinski S., Leyser O. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*. 2005;435:446-451. DOI 10.1038/nature03542.
- Krizek B.A. Auxin regulation of *Arabidopsis* flower development involves members of the AINTEGUMENTA-LIKE/PLETHORA (AIL/PLT) family. *J. Exp. Bot.* 2011;62:3311-3319. DOI 10.1093/jxb/err127.
- Liu W., Li R.-J., Han T.-T., Cai W., Fu Z.-W., Lu Y.-T. Salt stress reduces root meristem size by nitric oxide-mediated modulation of auxin accumulation and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2015;168:343-356. DOI 10.1104/pp.15.00030.
- Mironova V.V., Omelyanchuk N.A., Yosiphon G., Fadeev S.I., Kolchanov N.A., Mjolsness E., Likhoshvai V.A. A plausible mechanism for auxin patterning along the developing root. *BMC Syst. Biol.* 2010; 4:98. DOI 10.1186/1752-0509-4-98.
- Mroue S., Simeunovic A., Robert H.S. Auxin production as an integrator of environmental cues for developmental growth regulation. *J. Exp. Bot.* 2018;69:201-212. DOI 10.1093/jxb/erx259.
- Omelyanchuk N.A., Kovrizhnykh V.V., Oshchepkova E.A., Pasternak T., Palme K., Mironova V.V. A detailed expression map of the PIN1 auxin transporter in *Arabidopsis thaliana* root. *BMC Plant Biol.* 2016;16:5. DOI 10.1186/s12870-015-0685-0.
- Omelyanchuk N.A., Wiebe D.S., Novikova D.D., Levitsky V.G., Klimova N., Gorelova V., Weinholdt C., Vasiliev G.V., Zemlyanskaya E.V., Kolchanov N.A., Kochetov A.V., Grosse I., Mironova V.V. Auxin regulates functional gene groups in a fold-change-specific manner in *Arabidopsis thaliana* roots. *Sci. Rep.* 2017;7:2489. DOI 10.1038/s41598-017-02476-8.
- Pan X., Chen J., Yang Z. Auxin regulation of cell polarity in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2015;28:144-153. DOI 10.1016/j.pbi.2015.10.009.
- Paponov I.A., Paponov M., Teale W., Menges M., Chakrabortee S., Murray J.A.H., Palme K. Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in *Arabidopsis*. *Mol. Plant.* 2008;1:321-337. DOI 10.1093/mp/ssm021.
- Petrasek J. PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science*. 2006;312:914-918. DOI 10.1126/science.1123542.
- Remington D.L., Vision T.J., Guilfoyle T.J., Reed J.W. Contrasting modes of diversification in the *Aux/IAA* and *ARF* gene families. *Plant Physiol.* 2004;135:1738-1752. DOI 10.1104/pp.104.039669.
- Sauer M., Balla J., Luschnig C., Wisniewska J., Reinohl V., Friml J., Benkova E. Canalization of auxin flow by *Aux/IAA-ARF*-dependent feedback regulation of PIN polarity. *Genes Dev.* 2006;20:2902-2911. DOI 10.1101/gad.390806.
- Szklarczyk D., Gable A.L., Lyon D., Junge A., Wyder S., Huerta-Cepas J., Simonovic M., Doncheva N.T., Morris J.H., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 2019;47: D607-D613. DOI 10.1093/nar/gky1131.
- Teale W.D., Paponov I.A., Palme K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006;7:847-859. DOI 10.1038/nrm2020.
- Ulmasov T., Murfett J., Hagen G., Guilfoyle T.J. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell.* 1997;9:1963-1971. DOI 10.1105/tpc.9.11.1963.
- Vanneste S., Friml J. Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell.* 2009;136:1005-1016. DOI 10.1016/j.cell.2009.03.001.
- Vieten A., Sauer M., Brewer P.B., Friml J. Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends Plant Sci.* 2007;12:160-168. DOI 10.1016/j.tplants.2007.03.006.
- Vieten A., Vanneste S., Wisniewska J., Benkova E., Benjamins R., Beeckman T., Luschnig C., Friml J. Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development.* 2005;132:4521-4531. DOI 10.1242/dev.02027.
- Weijers D., Franke-van Dijk M., Vencken R.J., Quint A., Hooykaas P., Offringa R. An *Arabidopsis* Minute-like phenotype caused by a semi-dominant mutation in a RIBOSOMAL PROTEIN S5 gene. *Development.* 2001;128:4289-4299.
- Wenzel C.L., Schuetz M., Yu Q., Mattsson J. Dynamics of MONOPTEROS and PIN-FORMED1 expression during leaf vein pattern formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2007;49:387-398. DOI 10.1111/j.1365-3113X.2006.02977.x.
- Whitford R., Fernandez A., Tejos R., Pérez A.C., Kleine-Vehn J., Vanneste S., Drozdzecki A., Leitner J., Abas L., Aerts M., Hoogewijs K., Baster P., De Groodt R., Lin Y.-C., Storme V., Van de Peer Y., Beeckman T., Madder A., Devreese B., Luschnig C., Friml J., Hilson P. GOLVEN secretory peptides regulate auxin carrier turnover during plant gravitropic responses. *Dev. Cell.* 2012;22:678-685. DOI 10.1016/j.devcel.2012.02.002.
- Xu J., Hofhuis H., Heidstra R., Sauer M., Friml J., Scheres B. A molecular framework for plant regeneration. *Science*. 2006;311:385-388. DOI 10.1126/science.1121790.

ORCID ID

Z.S. Mustafin orcid.org/0000-0003-2724-4497

Благодарности. Работа поддержана бюджетным проектом № 0259-2021-0009 и грантом Президента РФ МК-3470.2021.1.4.

Прозрачность финансовой деятельности. Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.10.2020. После доработки 12.01.2021. Принята к публикации 14.01.2021.