

*На правах рукописи*



**ДАНИЛОВА**  
**Мария Николаевна**

**Влияние мутаций по генам мембранных рецепторов  
цитокининов на экспрессию генов хлоропластных белков**  
*Arabidopsis thaliana*

03.01.05 – физиология и биохимия растений

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2015

Работа выполнена в лаборатории экспрессии генома растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва

**Научные руководители:**

доктор биологических наук, профессор

**Кузнецов Виктор Васильевич**

кандидат биологических наук

**Кудрякова Наталия Васильевна**

**Официальные оппоненты:**

**Кудоярова Гюзель Радомесовна,**

доктор биологических наук, профессор,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии УНЦ РАН, заведующая лабораторией физиологии растений

**Бибикова Татьяна Николаевна,**

кандидат биологических наук,

Федеральное государственное бюджетное Образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, старший научный сотрудник кафедры физиологии растений

**Ведущая организация:** Федеральное государственное автономное учреждение высшего профессионального образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет"

Защита состоится «30» июня 2015 г. в 11:00 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, г. Москва, Ботаническая ул., 35. Факс:(499)977-80-18; e-mail: ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук [www.ippras.ru](http://www.ippras.ru)

Автореферат разослан «28» апреля 2015 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Актуальность проблемы.** Цитокинины (ЦК) – растительные гормоны, оказывающие полифункциональное регуляторное влияние на рост и развитие растений на протяжении всего жизненного цикла (Кулаева, 1973; Романов, 2009; Hwang et al., 2012). Благодаря достижениям последних 15 лет стало понятно, что рецепция ЦК у *A. thaliana* осуществляется тремя мембранными гистидинкиназами (АНК2, АНК3 и АНК4/CRE1), которые при участии белков двухкомпонентной сигнальной системы, регулируют экспрессию ЦК-зависимых генов (Kieber and Schaller, 2014).

Особый интерес к цитокининам обусловлен их участием в регуляции биогенеза хлоропластов. Они стимулируют дифференцировку хлоропластов, их фотосинтетическую активность, транскрипцию ряда хлоропластных генов (Кулаева, 1973; Kusnetsov et al., 1994; Zubo et al., 2008). Несмотря на значительный прогресс в понимании механизма сигналинга цитокининов, до сих пор не было проведено систематических исследований, позволяющих установить биологическую роль индивидуальных рецепторов в ЦК-зависимом контроле экспрессии хлоропластных генов в растении в ходе его развития. В литературе также отсутствуют сведения, характеризующие участие рецепторов ЦК в регуляции экспрессии ядерных генов, отвечающих за транскрипцию пластидного генома (пластома).

Несмотря на перекрывание функций в контроле ряда биологических процессов, рецепторы ЦК имеют неодинаковый характер экспрессии в растении (Higuchi et al., 2004; Nishimura et al., 2004), различаются по лигандной специфичности (Lomin et al., 2011; Stolz et al., 2011) и характеризуются различным физиологическим значением *in planta* (Higuchi et al., 2004; Nishimura et al., 2004; Riefler et al., 2006). Это позволяет предполагать существование функциональной специфичности индивидуальных рецепторов ЦК в регуляции экспрессии генов хлоропластных белков.

Использование нокаут-мутантов по рецепторам ЦК растений *A. thaliana*, имеющих измененный цитокининовый статус, представляет хорошую экспериментальную модель для выяснения возможной роли отдельных рецепторов в регуляции экспрессии хлоропластных генов и ядерных генов, отвечающих за транскрипцию пластома (РНК-полимеразы и сигма-факторы). Так как в ходе онтогенеза растения функции индивидуальных рецепторов могут изменяться, в настоящей работе анализировали участие рецепторов ЦК в регуляции экспрессии хлоропластных генов на разных стадиях онтогенеза растения *A. thaliana*.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящей работы было изучение влияния мутаций по генам мембранных рецепторов цитокининов на экспрессию генов хлоропластных белков в ходе онтогенеза *Arabidopsis thaliana*.

В соответствии с указанной целью были поставлены следующие задачи:

1. Оценить влияние нокаут-мутаций по генам рецепторов ЦК на накопление хлорофилла, а также определить корреляцию между содержанием хлорофилла и экспрессией маркерного гена старения *SAG12* на разных стадиях онтогенеза *A. thaliana*;
2. Выявить роль рецепторов цитокинина в регуляции содержания транскриптов хлоропластных генов в листьях разного возраста у мутантов *ahk A. thaliana*;

3. Изучить действие экзогенного цитокинина на уровень транскриптов хлоропластных генов в листьях на разных стадиях развития мутантов *ahk A. thaliana*;
4. Выяснить участие рецепторных гистидинкиназ в цитокинин-зависимой регуляции интенсивности транскрипции хлоропластных генов у мутантов *ahk A. thaliana*;
5. Исследовать влияние мутаций по генам рецепторов ЦК на цитокинин-зависимую регуляцию экспрессии ядерных генов, отвечающих за транскрипционную систему хлоропластов в ходе онтогенеза *A. thaliana*.

**Научная новизна.** На инсерционных нокаут-мутантах *A. thaliana* по генам рецепторов цитокинина впервые продемонстрировано участие индивидуальных рецепторов ЦК в регуляции экспрессии хлоропластных генов в ходе онтогенеза растения. Получены данные о первостепенной роли рецепторов АНК3 совместно с АНК2 в накоплении транскриптов ряда важнейших генов пластидного кодирования, а также в поддержании их транскрипционной активности. Впервые показано, что при старении, завершающей стадии онтогенетического цикла растения, важное значение в контроле физиологического состояния листьев имеет рецептор АНК2. Обнаружено участие рецепторов ЦК в цитокинин-зависимой активации генов хлоропластных РНК-полимераз ядерного кодирования: *RpoTr* и *RpoTtr* и дифференциальной регуляции содержания транскриптов хлоропластных транс-факторов семейства *Sig* ядерного кодирования. Это дает основания предполагать, что реализация сигнала ЦК в пластидах на разных стадиях развития растений частично обусловлена гормонозависимым изменением экспрессии ядерных генов аппарата транскрипции пластома.

**Практическая значимость.** Полученные в диссертационной работе результаты вносят существенный вклад в понимание молекулярных механизмов цитокинин-зависимой регуляции экспрессии пластидных генов и дополняют существующие представления о биогенезе фотосинтетического аппарата растений. Эти данные открывают возможность избирательного воздействия на геном хлоропластов и геном ядра с целью управления фотосинтетической функцией растений и повышения их продуктивности.

Экспериментальные данные, изложенные в работе, могут быть применены в учреждениях сельскохозяйственного, биологического и биотехнологического профилей, а также использованы для подготовки курсов лекций по физиологии, биохимии и молекулярной биологии растений в ВУЗах.

**Положения, выносимые на защиту.**

1. Показана зависимость уровня хлоропластных транскриптов от функционирования индивидуальных рецепторов ЦК в ходе онтогенеза растения *A. thaliana*: на стадии проростка и в листьях молодых растений наибольшее значение в контроле уровня хлоропластных транскриптов имеют рецепторы АНК3 и АНК2. Отсутствие рецептора АНК2 способствовало замедленному старению розеточных листьев *A. thaliana*.
2. Интенсивность транскрипции большинства изученных хлоропластных генов в листьях 3-недельных растений *A. thaliana* определялась функциональной активностью рецептора АНК3, тогда как АНК2 и АНК4 играли вспомогательную роль.

3. Установлена возрастная зависимость дифференциальной регуляции содержания транскриптов хлоропластных генов у растений дикого типа и мутантов *ahk* при обработке экзогенным цитокинином.

4. Участие ЦК в регуляции экспрессии ядерных генов хлоропластных РНК-полимераз (*RpoTr* и *RpoTnp*) и генов сигма-факторов, может быть одним из возможных путей контроля цитокинином экспрессии пластидного генома.

**Апробация работы.** Результаты данной работы были представлены на III Всероссийском симпозиуме «Физиология трансгенного растения и фундаментальные основы биобезопасности» (Москва, 2010); семинаре молодых ученых в Институте физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН (Москва, 2012); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2011» (Москва, 2011); Международной конференции «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2011); VII Съезде Общества физиологов растений «Физиология растений - фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Нижний Новгород, 2011); IV Всероссийском симпозиуме «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность» (Москва, 2012); на 18-ом Международном конгрессе биологии растений (Фрайбург, Германия); Международной научной конференции и школе молодых ученых «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Калининград, 2014).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 11 работ, из которых 4 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследований, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Материалы диссертации изложены на 157 страницах машинописного текста и содержат 12 таблиц и 37 рисунков. Список цитируемой литературы включает 275 наименований, в т.ч. 250 иностранных.

### **ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**Объект исследований.** В качестве объекта исследований использовали растения *Arabidopsis thaliana* (экотипа *Columbia-0*) дикого типа и созданные на его основе одинарные и двойные инсерционные нокаут-мутанты по генам рецепторов цитокининов (*ahk* мутанты), экспрессирующие два или один из трех рецепторов цитокинина соответственно. Семена инсерционных нокаут-мутантов были получены из коллекции ABRC (Ohio State University, USA).

**Выращивание растений *A. thaliana* и условия проведения опытов.** В экспериментах по исследованию влияния мутаций *ahk* на уровень транскриптов хлоропластных генов в онтогенезе использовали растения дикого типа и мутантов *ahk* на трех стадиях развития: 7-дневные проростки, 3 – и 7 – недельные растения.

**Выращивание 7-дневных проростков *A. thaliana* в стерильных условиях.** Семена растений стерилизовали раствором гипохлорита натрия в течение 5 мин и трижды промывали стерильной водой. Семена проращивали на жидкой питательной среде МС/2 (Murashige and Skoog, 1962) в климатической камере при режиме 16 ч день/8 ч ночь, интенсивности освещения  $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  и температуре 20-23° С. Возраст растений определяли с момента прорастания семян. Для синхронизации всходов

чашки Петри с семенами выдерживали в течение 2 дней при +4° С в темноте и затем переносили в климатическую камеру.

*Выращивание растений A. thaliana в почве.* Для экспериментов с молодыми и стареющими растениями проростки выращивали в почве, смешанной с перлитом, до 3 – и 7 – недельного возраста в климатической камере при вышеописанных условиях.

**Обработка растений цитокининами.** Для анализа эффекта ЦК на уровень транскриптов хлоропластных и ядерных генов на ранней стадии развития 7-дневные проростки *A. thaliana* переносили на среду выращивания (МС/2) с добавлением экзогенного *транс*-зеатина (*tZ*) в концентрации 5 мкМ и инкубировали в течение 15 минут и 3 часов. С целью исследования влияния экзогенного ЦК на уровень транскриптов генов хлоропластного и ядерного кодирования на стадии взрослых (3-недельных) и стареющих (7-недельных) растений, листья опрыскивали раствором цитокинина той же концентрации (*tZ*, 5 мкМ) и через 3 часа отбирали 5-й и 6-й настоящие листья с пяти разных растений с целью последующей экстракции РНК.

**Выделение РНК.** Суммарную РНК выделяли из растительной ткани с помощью реагента TRIzol согласно рекомендации производителя (Invitrogen, США). Содержание РНК определяли на спектрофотометре Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, США).

**Количественный анализ экспрессии генов методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР РВ).**

*Обратная транскрипция.* Выделенную РНК предварительно очищали от возможной примеси геномной ДНК, используя ДНКазу I свободную от РНКаз (Fermentas, Литва) в соответствии с рекомендациями производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили в соответствии с протоколом фирмы-производителя, используя обратную транскриптазу RevertAid M-MuLV (Fermentas, Литва). Синтез кДНК проводили в присутствии Oligo(dT)<sub>12-18</sub> праймеров (ДНК-синтез, Россия) для последующего определения уровня транскриптов генов ядерного кодирования. Для анализа уровня транскриптов генов хлоропластного кодирования синтезировали суммарную кДНК с использованием Oligo(dT)<sub>12-18</sub> и случайных праймеров (random6) (ДНК-синтез, Россия).

*ПЦР в режиме реального времени.* Полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени осуществляли с помощью амплификатора с оптическим модулем ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, США). Реакцию проводили в объеме 25 мкл, содержащем 5х готовую реакционную смесь qPCRmix-HS SYBR+LowROX («Евроген», Россия), по 0,5 мкМ каждого праймера и 5 мкл кДНК (100 нг для анализа ядерных генов, 50 нг для анализа хлоропластных генов) в следующем режиме: начальная денатурация в течение 5 мин при 94°С; амплификационный цикл (40 повторов): денатурация в течение 15 с при 94°С; отжиг праймеров в течение 15 с при 58°С, элонгация в течение 25 с при 72° С; достраивание цепей ДНК в течение 3 мин при 72° С. По окончании амплификации для подтверждения наличия ПЦР-продукта и специфичности отжига праймеров проводили процедуру плавления.

Для определения исходного количественного содержания транскриптов использовали калибровочные кривые, построенные как для целевого, так и для референсного генов с помощью специализированного программного обеспечения Applied Biosystems SDS v2.0.6 (Applied Biosystems, США). Оценку уровня

транскриптов целевых генов проводили относительно референсного гена *UBQ10*. Праймеры для последовательностей целевых генов подбирали с использованием пакета программ Vector NTI 9 и синтезировали в НПФ «Литех» (Россия).

#### **Выделение хлоропластов и проведение run-on транскрипции.**

Анализ интенсивности транскрипции хлоропластных генов проводили на розеточных листьях 3-недельных растений дикого типа и *ahk* мутантов. Выделение хлоропластов и проведение run-on транскрипции осуществляли по методу, описанному ранее (Зубо и Кузнецов, 2008).  $^{32}\text{P}$  – меченая РНК, синтезированная в ходе реакции транскрипции, была экстрагирована из реакционной смеси и использована для гибридизации с фрагментами ДНК, нанесенными на нейлоновую мембрану. После гибридизации нейлоновую мембрану экспонировали в кассете с радиочувствительным экраном, после чего экран сканировали на приборе фосфоимиджер Typhoon Trio (GE Healthcare, США). Обработку данных проводили с помощью программ Quantity One и Excel. Двукратные различия в интенсивности транскрипции в эксперименте рассматривались как достоверно значимые.

**Определение содержания фотосинтетических пигментов** проводили по методу Lichtenthaler (Lichtenthaler, 1987).

Статистическая обработка данных. Все эксперименты проводили в трех аналитических и трех биологических повторностях. На рисунках и таблицах приведены среднеарифметические значения и их стандартные ошибки.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **1. Влияние мутаций *ahk* на уровень транскриптов хлоропластных генов в ходе онтогенеза *A. thaliana***

Для того чтобы лучше понять роль индивидуальных рецепторов ЦК в регуляции экспрессии хлоропластных генов, анализировали содержание транскриптов генов хлоропластного кодирования у нокаут-мутантов *ahk* и растений дикого типа *A. thaliana* на трех возрастных стадиях (7-дневные проростки, 3- и 7-недельные растения) при помощи количественного ПЦР после обратной транскрипции.

Для анализа были выбраны 12 хлоропластных генов, кодирующих субъединицы белковых комплексов, необходимых для осуществления процесса фотосинтеза (*psaA*, *psaB*, *psbA*, *psbD*, *atpB*, *rbcL* и *petD*) и гены «домашнего хозяйства», кодирующие белки или молекулы РНК, участвующие в поддержании функционального состояния хлоропластов (*rpoB*, *rrn16*, *trnE*, *rps14*, *rpl16*), например, процессов транскрипции и трансляции. Выбранные гены принадлежат к разным оперонам, транскрибируются разными РНК-полимеразами, а кодируемые ими белки входят в состав различных функциональных комплексов. Результаты по исследованию экспрессии генов *rpl16* и *petD* приведены в диссертационной работе.

#### **1.1. Влияние мутаций по генам рецепторов ЦК на уровень транскриптов хлоропластных генов в 7-дневных проростках *A.thaliana***

С целью выяснения роли рецепторов ЦК в регуляции уровня транскриптов хлоропластных генов на ранней стадии развития растений *Arabidopsis* использовали 7-дневные проростки дикого типа, а также одинарные и двойные мутанты по рецепторам ЦК.

Количественный ПЦР-анализ показал, что на стадии проростка рецепторы ЦК оказывают дифференциальное влияние на экспрессию пластидных генов. Однако одинарные мутанты незначительно отличались по уровню транскриптов от дикого типа, за исключением мутантов *ahk3* и *ahk4*, которые отличались повышенным уровнем транскриптов *trnE* и *atpB*, а также *rpoB*, *trnE* и *rbcL*, соответственно.

Одновременная инактивация двух генов рецепторов АНК2 и АНК3 у мутанта *ahk2ahk3*, обладающего единственным геном рецептора АНК4, привела к 2-кратному снижению содержания мРНК большинства фотосинтетических генов (*psaA*, *psaB*, *psbA*, *psbD*, *atpB* и *rbcL*) (рис. 1) и уменьшению содержания суммарного хлорофилла по сравнению с диким типом (данные не представлены).

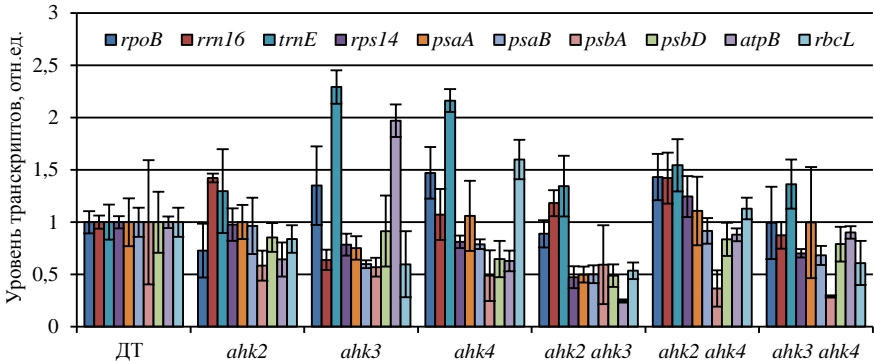


Рис. 1. Влияние мутаций *ahk* на уровень транскриптов хлоропластных генов в 7-дневных проростках *A. thaliana*

Двойной мутант *ahk2ahk4*, содержащий функционально активный белок-рецептор АНК3, характеризовался отсутствием изменений в уровне транскриптов большинства хлоропластных генов (рис. 1) и сходным с диким типом содержанием суммарного хлорофилла (данные не приводятся).

Полученные результаты свидетельствуют о функциональном перекрытии рецепторов ЦК в регуляции экспрессии генов «домашнего хозяйства» *rpoB*, *rrn16* и *trnE* на стадии проростка *Arabidopsis*. Кроме того, они демонстрируют зависимость экспрессии генов фотосинтетических белков от рецепторов АНК3 и АНК2 на ранней стадии развития растения.

## 1.2. Влияние мутаций по генам рецепторов ЦК на уровень транскриптов хлоропластных генов в розеточных листьях 3-недельных растений *A. thaliana*

Для того чтобы исследовать роль рецепторов ЦК в регуляции экспрессии хлоропластных генов в листьях молодых растений, содержащих фотосинтетически-активные хлоропласты, использовали 3-недельные растения *ahk* мутантов и дикого типа *Arabidopsis*. Количественный ПЦР-анализ уровня хлоропластных транскриптов в 5-м и 6-м листьях 3-недельных растений не выявил значительного влияния одинарных мутаций на содержание целевых хлоропластных РНК. Тем не менее, выключение индивидуальных рецепторов АНК2 и АНК4 (*ahk2* и *ahk4* мутанты) приводило к



повышению содержания транскриптов ряда генов пластидного кодирования, в том числе *rpoB*, *rrn16*, *atpB* и *rbcL* (рис. 2).

При этом функционально-активный рецептор АНК2 был необходим для нормального уровня экспрессии генов *psbA* и *psbD*, кодирующих белки D1 и D2 реакционного центра ФСII, поскольку его инактивация приводила к достоверному снижению содержания транскриптов этих генов (рис. 2).

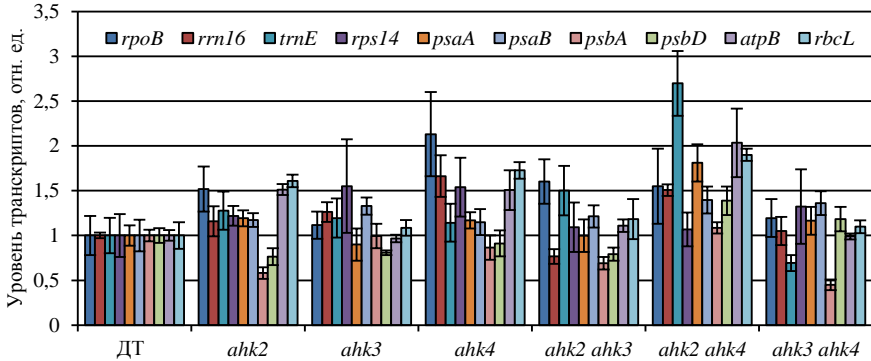


Рис. 2. Влияние мутаций *ahk* на уровень транскриптов хлоропластных генов в листьях 3-недельных растений *A. thaliana*.

В листьях 3-недельных растений двойного мутанта *ahk2ahk3*, содержащего рецептор АНК4, экспрессия которого преобладает в корнях (Mähönen et al., 2000; Higuchi et al., 2004), происходило снижение уровня транскриптов генов ФСII (*psbA* и *psbD*) (рис.2). Аналогичная тенденция к снижению уровня транскриптов гена *psbA*, кодирующего белок D1 реакционного центра ФСII, была выявлена в листьях 4 - недельных растений мутанта *ahk2ahk3 A. thaliana* (Cortleven et al., 2014).

Двойной мутант *ahk2 ahk4*, с единственным рецептором АНК3 характеризовался нормальным (*rps14*, *psbA*) или достоверно повышенным (*rpoB*, *rrn16*, *psaA*, *psaB*, *psbD*, *atpB*, *rbcL* и *trnE*) накоплением большинства исследованных транскриптов (рис. 2). Следовательно, рецептор АНК3, экспрессирующийся главным образом в розеточных листьях (Higuchi et al., 2004), самостоятельно способен обеспечить поддержание нормального уровня транскриптов исследованных хлоропластных генов в листьях 3-недельных растений, содержащих зрелые активно фотосинтезирующие хлоропласты.

Снижение содержания транскриптов некоторых фотосинтетических генов в отсутствие рецепторов АНК3 и АНК2 в листьях, вероятно обусловлено ослаблением трансдукции сигнала эндогенного ЦК в пластиды. На основе полученных результатов можно заключить, что рецептору АНК3 принадлежит первостепенная, а рецептору АНК2 вспомогательная роль в контроле экспрессии пластидных генов в розеточных листьях 3-недельных растений *A. thaliana*.

### 1.3. Влияние мутаций по генам рецепторов ЦК на уровень транскриптов хлоропластных генов в розеточных листьях 7-недельных растений *A. thaliana*

Для того чтобы выяснить участие рецепторных гистидинкиназ в контроле экспрессии хлоропластных генов в процессе старения листьев, анализировали уровень транскриптов в 5 и 6 листьях стареющих 7-недельных растений.

Стареющие листья 7-недельных мутантных линий *ahk2*, *ahk2ahk3* и *ahk2ahk4* характеризовались достоверно более высоким уровнем транскриптов большинства хлоропластных генов по сравнению с диким типом. Наиболее значимым повышением содержания транскриптов отличался одинарный мутант *ahk2*, который обнаружил более чем 2-кратное повышение экспрессии 7 генов (*rpoB*, *rps14*, *psaA*, *psaB*, *psbD*, *atpB* и *rbcL*) (рис. 3).

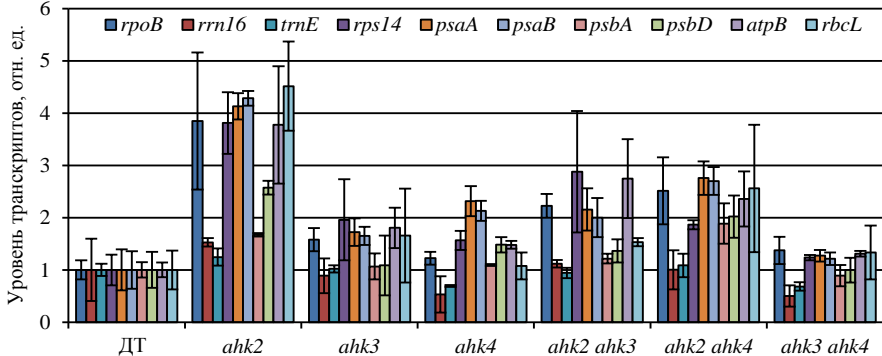


Рис. 3. Влияние мутаций *ahk* на уровень транскриптов хлоропластных генов в листьях 7-недельных растений *A. thaliana*

Одинарный мутант *ahk3*, несмотря на достоверное повышение экспрессии гена *Sag12* в сравнении с Col-0 (рис. 4), не отличался по содержанию транскриптов хлоропластных генов (*rrn16*, *trnE*, *psbA* и *psbD*), а также содержал повышенный уровень транскриптов генов *rpoB*, *psaA*, *psaB*, *atpB* (рис. 3). Содержание большинства хлоропластных мРНК в старых листьях мутанта *ahk3ahk4*, имеющего высокий уровень транскриптов гена старения *Sag12* (рис. 4), незначительно отличалось от растений дикого типа (рис. 3).

Повышенный уровень транскриптов большинства хлоропластных генов у мутантов по гену *AHK2*, возможно, обусловлен задержкой старения этих линий, что подтверждается подавленной у этих линий экспрессией гена маркера старения *Sag12* (рис. 4) и сниженной скоростью разрушения хлорофилла (рис. 5).

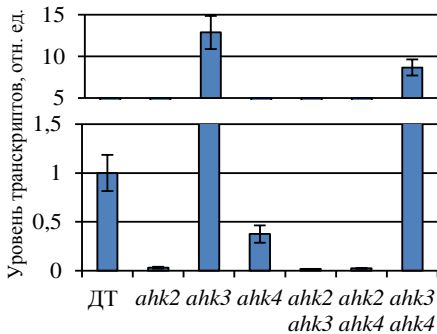


Рис. 4. Экспрессия гена *Sag12* в листьях 7-недельных растений *ahk* мутантов и дикого типа *A. thaliana*.

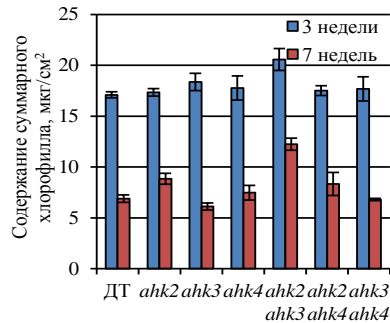


Рис. 5. Содержание хлорофилла в листьях 3 и 7-недельных растений *ahk* мутантов и дикого типа *A. thaliana*.

Таким образом, подавленная экспрессия гена маркера старения (*Sag12*), повышенный уровень хлорофилла, а также повышенное содержание транскриптов хлоропластных генов в листьях 7-недельных мутантов *ahk2*, *ahk2ahk3*, *ahk2ahk4* по сравнению с диким типом демонстрируют негативную роль белка-рецептора АНК2 в задержке старения розеточных листьев *Arabidopsis*. Однако механизм замедленного старения листьев с участием рецептора АНК2 остается мало исследованным.

#### 1.4. Роль рецепторов цитокинина в регуляции интенсивности транскрипции хлоропластных генов

Уровень хлоропластных транскриптов в любой момент времени зависит от соотношения интенсивности их синтеза и деградации. С целью изучения регуляторной роли рецепторов ЦК в контроле интенсивности транскрипции генов пластома у *ahk* мутантов *A. thaliana* использовали метод *gun-on* транскрипции. Сравнение интенсивности транскрипции хлоропластных генов в листьях 3-недельных растений одинарных *ahk* мутантов не выявило существенных изменений по сравнению с диким типом. Отсутствие влияния одинарных *ahk* мутаций на транскрипцию хлоропластных генов, возможно, объясняется функциональной избыточностью рецепторов ЦК, позволяющей двум активным рецепторам компенсировать недостающий. Двойные мутанты *ahk2ahk3* и *ahk3ahk4* отличались снижением транскрипции фотосинтетических генов *psaA*, *psaB*, *psbA*, *psbD*, *rbcL* и *atpB* по сравнению с диким типом, тогда как ген «домашнего хозяйства» *rrn16* имел нормальную (*ahk3ahk4*) или повышенную (*ahk2ahk3*) транскрипционную активность (данные не представлены). При этом двойной мутант *ahk2ahk4* с единственным функционально-активным рецептором АНК3 не отличался по интенсивности транскрипции изученных генов от дикого типа. Следовательно, рецептор АНК3 играет первостепенную роль в регуляции экспрессии хлоропластных генов на уровне транскрипции. Полученные данные по интенсивности транскрипции ряда хлоропластных генов в листьях 3-недельных растений *ahk* мутантов коррелируют с данными по уровню мРНК хлоропластных

генов, полученными нами с помощью ОТ ПЦР РВ (п.1.2). Следовательно, накопление транскриптов ряда пластидных генов в значительной мере определяется интенсивностью их транскрипции.

## **2. Влияние экзогенного цитокинина на уровень транскриптов хлоропластных генов у мутантов *ahk A. thaliana* в ходе онтогенеза**

Одним из наиболее ярких проявлений физиологической активности цитокининов является их способность активировать биогенез хлоропластов, что согласуется с активацией ЦК экспрессии пластидных генов как на уровне содержания транскриптов (Seyer and Lescure, 1984; Brenner et al., 2005), так и на уровне интенсивности транскрипции (Zubo et al., 2008).

С целью изучения участия рецепторов ЦК *in planta* в цитокинин-зависимой регуляции уровня транскриптов хлоропластных генов одинарные и двойные *ahk* мутанты *A. thaliana* обрабатывали экзогенным цитокинином (*tZ*, 5 мкМ) на трех возрастных стадиях: 7-дневные проростки, 3- и 7-недельные растения.

### **2.1. Регуляция экзогенным цитокинином экспрессии хлоропластных генов в 7-дневных проростках мутантов *ahk A.thaliana***

Для выяснения роли рецепторов ЦК в регуляции экзогенным цитокинином уровня транскриптов хлоропластных генов на ранней стадии развития, 7-дневные проростки *Arabidopsis* в течение 3 часов инкубировали на среде выращивания (МС/2) с добавлением *транс*-зеатина (*tZ*, 5 мкМ). Предварительный анализ ЦК-опосредованного накопления матриц гена первичного ответа на ЦК - *ARR5* у дикого типа показал значительную активацию (~22 раза), на фоне значимо сниженной экспрессии у всех *ahk* мутантов, особенно у растений с выключенными генами рецепторов АНК2 и АНК3.

Обработка 7-дневных проростков дикого типа *транс*-зеатином (5 мкМ) приводила к существенному (от 2 до 5 раз) повышению уровня транскриптов как генов фотосинтеза (*psaA*, *psaB*, *psbD*, *atpB* и *rbcL*), так и генов «домашнего хозяйства» (*rrn16*, *trnE* и *rps14*) на фоне снижения уровня мРНК гена *psaA* (рис. 6). Содержание транскриптов гена *rpoB*, кодирующего  $\beta$ -субъединицу РЕР (РНК-полимеразы пластидного кодирования), на стадии проростка не регулировалось ЦК (рис. 6).

Двойной мутант *ahk2ahk3* (активный рецептор АНК4) характеризовался отсутствием активации цитокинином экспрессии генов обеих фотосистем (*psaA*, *psaB* и *psbD*), а также гена *rbcL* в сравнении с диким типом (рис. 6). При этом у него происходило накопление транскриптов генов «домашнего хозяйства» (*rrn16*, *rps14* и *trnE*) и *atpB*, однако, менее выраженное в сравнении с диким типом (рис. 6). Это может свидетельствовать о способности рецептора АНК4 избирательно регулировать экспрессию генов пластома разных функциональных групп.

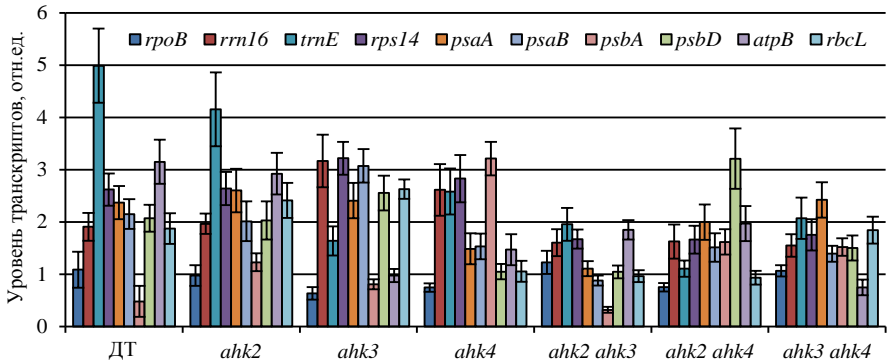


Рис. 6. Влияние *транс*-зеатина (5 мкМ, 3 часа) на уровень транскриптов хлоропластных генов в 7-дневных проростках дикого типа и *ahk* мутантов *A. thaliana*. На рисунке представлено отношение уровня транскриптов растений, обработанных *транс*-зеатином, к уровню транскриптов контрольных растений соответствующего генотипа.

Проростки двойных мутантов *ahk2ahk4* и *ahk3ahk4*, экспрессирующие один рецептор ЦК – АНК3 и АНК2 соответственно, обнаружили более выраженную реакцию на ЦК в сравнении с мутантом *ahk2ahk3* и были способны после обработки гормоном активировать накопление транскриптов как генов фотосистем I и II, так и генов «домашнего хозяйства» (рис. 6).

Таким образом, результаты исследования показывают, что на стадии проростка, несмотря на частичное перекрытие функций мембранных рецепторов в регуляции экспрессии пластидных генов, рецепторам АНК3 и АНК2 принадлежит первостепенная роль в реализации эффекта экзогенного цитокинина в хлоропластах на уровне регуляции содержания транскриптов.

## 2.2. Регуляция экзогенным цитокинином экспрессии хлоропластных генов в листьях 3-недельных мутантов *ahk* растения *A.thaliana*

Для того чтобы выявить регуляторную роль рецепторов в ЦК-зависимом изменении содержания транскриптов хлоропластных генов в розеточных листьях молодых 3-недельных растений *Arabidopsis* растения опрыскивали *транс*-зеатином (5 мкМ) и через 3 часа определяли уровень транскриптов пластидных генов методом ОТ ПЦР РВ. На данной стадии развития ЦК-опосредованный уровень мРНК гена *ARR5* в молодых розеточных листьях мутантов *ahk3*, *ahk2ahk3* и *ahk3ahk4* был значительно снижен по сравнению с диким типом, который, в свою очередь, характеризовался умеренным ответом (~2,5 раза).

По сравнению с 7-дневными проростками экспрессия пластидных генов в молодых листьях под действием экзогенного ЦК (*tZ*, 5мкМ) через 3 часа изменялась незначительно (от 1,5 до 2 раз).

Результаты анализа влияния экзогенного цитокинина на уровень транскриптов хлоропластных генов у одинарных мутантов показывают, что на этом этапе биогенеза

хлоропластов функции мембранных рецепторов в контроле ЦК-зависимой экспрессии большинства исследованных пластидных генов перекрываются. Однако у мутанта *ahk2* под влиянием транс-зеатина наблюдался повышенный по сравнению с ДТ уровень транскриптов генов ФСII - *psbA* и *psbD* (рис. 7). Мутант *ahk3* в ответ на ЦК накапливал меньше транскриптов генов *trnE*, *rps14*, *psaB* и *psbA* по сравнению с диким типом (рис. 7).

Двойной мутант *ahk2 ahk3* практически не отвечал на обработку экзогенным цитокинином в 3-недельных растениях (исключение *rrn16* и *trnE*) в отличие от мутантов *ahk2 ahk4* и *ahk3ahk4*, которые, напротив, накапливали существенное количество транскриптов ряда исследуемых генов - *rpoB*, *rrn16*, *atpB* и *rbcL* (рис. 7).

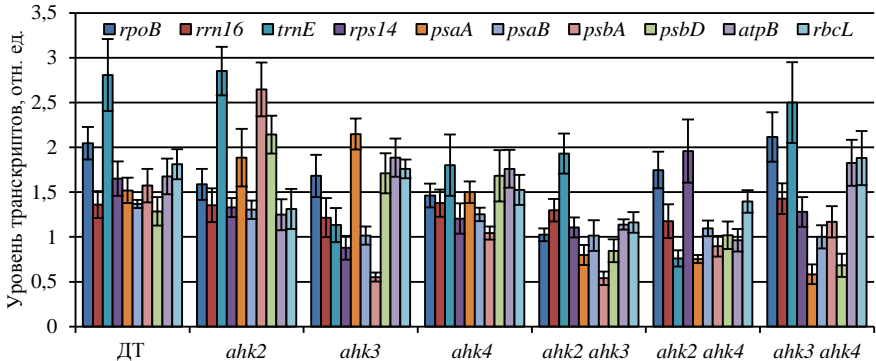


Рис. 7. Влияние транс-зеатина (5 мкМ, 3 часа) на уровень транскриптов хлоропластных генов в листьях 3-недельных растений дикого типа и мутантов *ahk A. thaliana*. На рисунке представлено отношение уровня транскриптов растений, обработанных транс-зеатином, к уровню транскриптов контрольных растений соответствующего генотипа.

Следовательно, функционально активные рецепторы АНК3 и АНК2 способны самостоятельно обеспечивать активацию накопления транскриптов части хлоропластных генов «домашнего хозяйства» и фотосинтеза при участии экзогенного ЦК. Однако индивидуальные рецепторы ЦК у всех двойных мутантов не могли обеспечить накопление транскриптов генов ФСI (*psaA* и *psaB*) и ФСII (*psbA* и *psbD*) на данной стадии развития растений.

Таким образом, в ответ на обработку экзогенным цитокинином листьев 3-недельных растений происходила дифференциальная регуляция экспрессии генов в хлоропластах при участии рецепторов ЦК. Однако, несмотря на перекрывание функций всех рецепторов, наиболее активное участие в этом процессе принимает рецептор АНК3, что согласуется с его доминирующей ролью в восприятии ЦК сигнала в листьях растений (Riefler et al., 2006; Романов, 2009).

### 2.3. Регуляция экзогенным цитокинином экспрессии хлоропластных генов в листьях 7-недельных мутантов *ahk* растения *A.thaliana*

Для того, чтобы выяснить участие рецепторов ЦК в цитокинин-зависимой регуляции уровня хлоропластных транскриптов в стареющих листьях, 7-недельные растения *Arabidopsis* опрыскивали *транс*-зеатином (5 мкМ) и через 3 часа определяли уровень транскриптов пластидных генов методом ОТ ПЦР РВ. Анализ ЦК-индуцированного накопления транскриптов гена *ARR5* показал значительный активирующий эффект гормона в стареющих листьях дикого типа (~25 раз), в отличие от мутантов *ahk3*, *ahk2ahk3* и *ahk3ahk4*, у которых достоверный стимулирующий эффект гормона отсутствовал.

Стареющие листья 7-недельных растений дикого типа, характеризующиеся наличием всех трех функционально-активных белков-рецепторов, под влиянием экзогенного цитокина накапливали наибольшее, по сравнению с *ahk* мутантами, количество транскриптов всех исследованных хлоропластных генов. При этом степень активации варьировала в интервале от 1,7 до 5 (рис. 8).

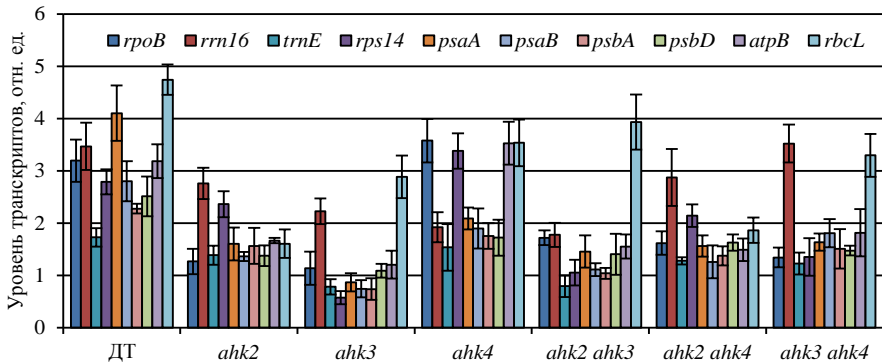


Рис. 8. Влияние *транс*-зеатина (5 мкМ, 3 часа) на уровень транскриптов хлоропластных генов в листьях 7-недельных растений дикого типа и мутантов *ahk* *A. thaliana*. На рисунке представлено отношение уровня транскриптов растений, обработанных *транс*-зеатином, к уровню транскриптов контрольных растений соответствующего генотипа.

В листьях дикого типа максимальный активирующий эффект цитокина (свыше трех раз) был характерен для транскриптов генов *rpoB*, *rrm16*, *psaA*, *atpB* и *rbcL*, минимальный - для *trnE* (~1,7). Одиарные мутации *ahk2* и *ahk3* снижали активирующий эффект ЦК на уровень хлоропластных транскриптов в листьях 7-недельных растений. При этом ЦК-опосредованное изменение уровня транскриптов в стареющих листьях у мутанта *ahk4* с функционально-активными рецепторами АНК3 и АНК2 было сходным с диким типом (рис. 8).

Двойные мутанты *ahk2ahk3*, *ahk2ahk4* и *ahk3ahk4*, содержащие единственные функционально-активные рецепторы АНК4, АНК3, АНК2 соответственно, характеризовались сниженной способностью к активации накопления мРНК генов ФСИ (*psaA* и *psaB*) и ФСII (*psbA* и *psbD*), а также *rpoB* и *atpB* в ответ на ЦК. Из этого может следовать, что функциональной активности одного, любого из рецепторов ЦК,

недостаточно для активной экспрессии пластидных генов. Вместе с тем, у мутантов *ahk2ahk3* и *ahk3ahk4* сохранялась способность к активации гена *rbcL*, а у *ahk3ahk4* и *ahk2ahk4* гена *rrn16* (рис. 8).

Таким образом, дифференциальная активация накопления транскриптов в хлоропластах при участии цитокинина позволяет сделать вывод об индивидуальной реакции различных пластидных генов на действие гормона. При этом особенности ответа различных мутантов позволяют заключить, что наряду с перекрыванием функций для рецепторов ЦК характерна определенная специфичность в проведении сигнала ЦК в хлоропласты стареющих листьев.

### **3. Влияние рецепторов цитокинина на экспрессию ядерных генов аппарата транскрипции пластома**

Одним из возможных путей реализации цитокининового сигнала в хлоропластах при участии рецепторов ЦК может быть его влияние на экспрессию ядерных генов, кодирующих компоненты аппарата транскрипции хлоропластного генома. Транскрипция пластома у высших растений осуществляется двумя типами РНК-полимераз – NEP и PEP (от англ. Nuclear и Plastid Encoded Polymerase соответственно). PEP для узнавания и связывания промоторных областей нуждается в одном из шести транс-факторов сигма ( $\sigma$ -факторов, семейства Sig). Учитывая, что в предыдущих экспериментах была выявлена дифференциальная регуляторная роль рецепторов ЦК в контроле транскрипции пластома и накоплении транскриптов в хлоропластах в ходе онтогенеза, на следующем этапе анализировали роль рецепторов в ЦК-зависимой экспрессии ядерных генов, продукты которых участвуют в транскрипции хлоропластных генов. Для анализа были выбраны два гена РНК-полимераз из семейства РpoT - *RpoTr* и *RpoTmr*, функционирующие только в пластидах или одновременно в пластидах и митохондриях соответственно. В ходе онтогенеза растений дикого типа и мутантов *ahk A. thaliana* также исследовали ЦК – индуцированную экспрессию генов сигма-факторов.



### 3.1. Регуляция цитокинином экспрессии генов *RpoTr* и *RpoTnp* у мутантов *ahk* *A.thaliana* в ходе онтогенеза

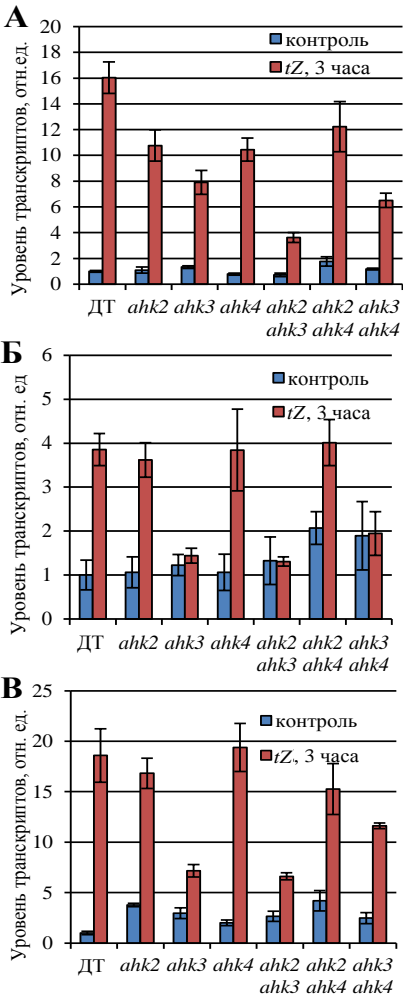


Рис. 9. – Влияние *транс*-зеатина (5 мкМ, 3 часа) на уровень транскриптов гена *RpoTr* в проростках (А), листьях 3-недельных (Б) и 7 – недельных (В) растений дикого типа и мутантов *ahk* *A. thaliana*.

До настоящего времени не было изучено влияние цитокинина на экспрессию генов семейства *RpoT* в ходе онтогенеза, а также не известно участие отдельных рецепторов ЦК в регуляции уровня матриц этих генов. В связи с этим мы исследовали действие экзогенного ЦК на экспрессию генов *RpoTr* и *RpoTnp* на разных стадиях онтогенеза дикого типа и мутантных растений (*ahk*) *A. thaliana*.

Количественный ПЦР-анализ выявил значительный активирующий эффект экзогенного цитокинина на экспрессию гена *RpoTr* в проростках и стареющих листьях дикого типа, имеющего три активных рецептора ЦК (рис. 9). Исследование ЦК-зависимого уровня мРНК гена *RpoTr* у *ahk* мутантов позволило выявить первостепенную регуляторную роль рецептора АНК3 и вспомогательную рецептора АНК2 на всех изученных возрастных стадиях растения *A. thaliana* (рис. 9).

Изучение ЦК-зависимой экспрессии гена *RpoTnp* позволило сделать аналогичное заключение, хотя эффект ЦК на экспрессию этого гена был несколько ниже, чем на *RpoTr* (данные не приводятся).

Таким образом, реализация сигнала ЦК в пластидах на разных стадиях развития растений, частично может быть опосредована гормон-зависимым изменением экспрессии пластидных РНК-полимераз ядерного кодирования.

### 3.2. Роль рецепторов ЦК в регуляции экспрессии генов сигма-факторов в ходе онтогенеза *A. thaliana*

Участие рецепторов ЦК в регуляции уровня транскриптов и интенсивности транскрипции хлоропластных генов, транскрибируемых PEP, у мутантов *ahk* может заключаться в способности индивидуальных рецепторов ЦК регулировать экспрессию генов сигма-факторов (*Sig1-Sig6*).

Анализ влияния цитокинина (*tZ*, 3 часа) на содержание транскриптов всех шести сигма-факторов на стадии 3-недельных растений дикого типа и *ahk* мутантов *A. thaliana* показал повышение экспрессии всех генов, за исключением *Sig5*, однако уровень их активации, как правило, не превышал двукратный.

Для двух генов *Sig5* и *Sig6* изучали изменение ЦК-зависимой экспрессии на стадии проростка и в стареющих листьях. Первый из них *Sig5* – индуцибельный ген, активируемый светом и стрессовыми факторами. Экспрессия *Sig6* особенно важна на начальных стадиях биогенеза хлоропластов, где он регулирует транскрипцию целого ряда пластидных генов, включая *atpB*, *atpE*, *rbcL*, *psbA*, *psbD* и все рибосомные РНК (Ishizaki et al., 2005).

Анализ экспрессии гена *Sig5* у 7-дневных проростков продемонстрировал значимое подавление экспрессии этого гена под действием ЦК (рис. 10А). Однако на стадии 7 недель экзогенный гормон практически не оказывал влияния на содержание транскриптов *Sig5* (рис. 10Б).

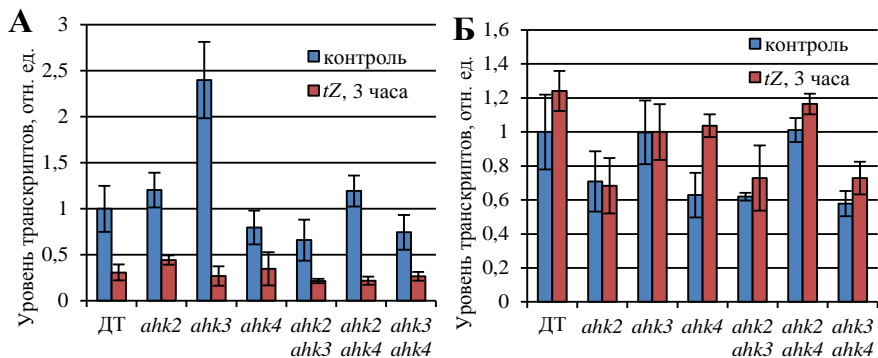


Рис. 10. Влияние *транс*-зеатина (5мкМ, 3 часа) на уровень транскриптов гена *Sig5* в 7-дневных проростках (А) и листьях 7-недельных растений (Б) дикого типа и *ahk* мутантов *A. thaliana*

Экспрессия гена *Sig6* значительно индуцировалась экзогенным гормоном в 7-дневных проростках (до 6 раз у мутанта *ahk2*) (рис. 11А). При этом двойной мутант *ahk2ahk3* отличался от дикого типа значимым снижением исходного уровня мРНК гена *Sig6* (рис. 11А), а мутант *ahk2ahk4*, содержащий функционально-активный рецептор АНК3, напротив, имел достоверно повышенный исходный уровень мРНК гена *Sig6* (рис. 11А).

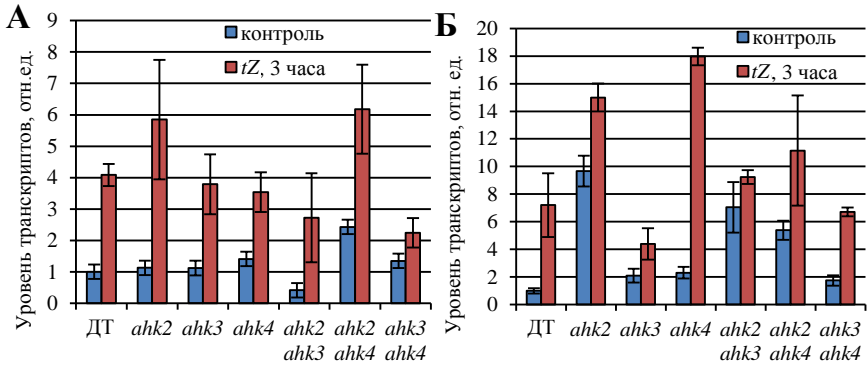


Рис. 11. Влияние *транс*-зеатина (5мкМ, 3 часа) на уровень транскриптов гена *Sig6* в 7 - дневных проростках (А) и листьях 7-недельных растений (Б) дикого типа и *ahk* мутантов *A. thaliana*

Повышенный исходный уровень транскриптов гена *Sig6* наблюдался также у мутантов с инактивированным геном *ahk2* на стадии 7 недель (рис. 11Б). Однако рост ЦК-индуцированного накопления матриц у этих мутантов, а также мутанта *ahk3*, оказался в значительной мере снижен по сравнению с диким типом и мутантом *ahk4*, которые обнаружили на этой стадии онтогенеза более чем 7-кратную активацию экспрессии гена *Sig6* (рис. 11Б).

Таким образом, полученные в работе результаты свидетельствуют о многообразном влиянии цитокининов при участии мембранных рецепторов ЦК на экспрессию генов сигма-факторов ядерного кодирования на протяжении различных этапов онтогенеза растения *A.thaliana*.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе с использованием одинарных и двойных инсерционных нокаут-мутантов растения *A. thaliana* с инактивированными генами рецепторов цитокининов показана зависимость уровня транскриптов хлоропластных генов от функционирования рецепторов ЦК в ходе онтогенеза. На стадии проростка и молодых активно фотосинтезирующих растений первостепенное значение в контроле уровня хлоропластных транскриптов принадлежало рецепторам АНК3 и АНК2. В процессе старения листьев ключевая роль в цитокинин-опосредованном контроле уровня хлоропластных транскриптов переходит к рецептору АНК2.

Показано, что чувствительность растений к действию экзогенного цитокинина, о которой судили по индуцибельной экспрессии гена первичного ответа на цитокинин *ARR5*, изменялась в ходе онтогенеза растений.

Наибольший активирующий эффект цитокинина на содержание транскриптов в хлоропластах наблюдался в проростках и стареющих листьях. В ходе онтогенеза растения содержание транскриптов функционально различных хлоропластных генов в разной степени активировалось или подавлялось экзогенным цитокинином, что

свидетельствует об индивидуальной реакции различных пластидных генов на действие гормона.

Инактивация рецепторов ЦК вызывала изменения в содержании транскриптов хлоропластных генов в ответ на действие экзогенного гормона. Особенности ответа различных мутантов на разных стадиях онтогенеза позволяют заключить, что наряду с перекрыванием функций для рецепторов ЦК характерна определенная специфичность в проведении сигнала ЦК в хлоропласты. При этом сниженное накопление транскриптов в хлоропластах двойных *ahk* мутантов при действии гормона свидетельствует о ведущей роли рецептора АНК3 в позитивной цитокинин-зависимой регуляции содержания транскриптов хлоропластных генов.

Показано участие рецепторов ЦК в регуляции интенсивности транскрипции генов пластома. Стабильную транскрипционную активность хлоропластных генов в листьях 3-недельных растений *A.thaliana* обеспечивает присутствие рецептора АНК3, тогда как АНК2 и АНК4 выполняют вспомогательную функцию.

В работе впервые показана первостепенная роль рецептора АНК3 в активации экзогенным цитокинином экспрессии генов РНК-полимераз ядерного кодирования (*RpoTr* и *RpoTmp*) на всех изученных стадиях онтогенеза растения *A.thaliana*.

Впервые показано участие рецепторов ЦК в дифференциальной регуляции уровня транскриптов компонентов аппарата транскрипции пластома - хлоропластных транс-факторов (семейства Sig) ядерного кодирования – Sig5 и Sig6 в ходе онтогенеза растения *A. thaliana*.

На основе полученных результатов и данных литературы (López -Juez and Pyke, 2005 и Hwang et al., 2012) можно предложить следующую модель регуляции рецепторами цитокининов экспрессии генов хлоропластных белков ядерного и пластидного кодирования (рис. 12). Мембранные гистиридиновые протеинкиназы (АНК2, АНК3, АНК4/CRE1) воспринимают цитокининовый сигнал и передают его через фосфатный каскад при участии белков АНР в ядро на ЦК-специфичные транс-факторы ARR типа В, которые в свою очередь активируют транскрипцию ЦК-регулируемых генов в ядре. Белки CRF, активируемые ЦК при участии АНР, накапливаются в ядре и активируют транскрипцию ЦК-зависимых ядерных генов. При участии этой сигнальной системы происходит дифференциальная регуляция содержания транскриптов ядерных генов РНК-полимераз (*RpoTr* и *RpoTmp*) и мРНК транс-факторов семейства Sig, продукты которых в свою очередь регулируют экспрессию хлоропластных генов.

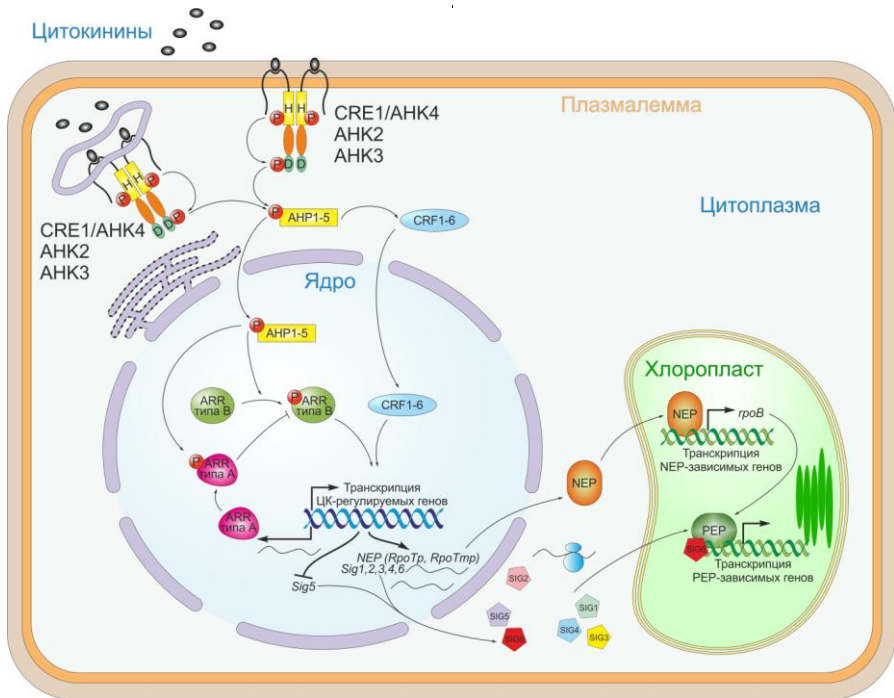


Рис. 12. Предполагаемая схема регуляции рецепторами цитокининов экспрессии генов хлоропластных белков ядерного и хлоропластного кодирования. CRE1/АНК4, АНК2, АНК3 – мембранные рецепторы цитокинина, гистидиновые протеинкиназы; АНР – белки переносчики фосфата с киназ на регуляторы ответа; СRF – транс-факторы ответа на цитокинин; АНР-А и АНР-В белки регуляторы ответа; NEP – РНК-полимераза ядерного кодирования; PEP – РНК-полимераза пластидного кодирования; Sig – транс-факторы PEP. (Модифицировано по López -Juez and Pyke, 2005 и Hwang et al., 2012).

## ВЫВОДЫ

1. Использование одинарных и двойных мутантов *A. thaliana* с инактивированными генами мембранных рецепторов ЦК впервые позволило установить, что уровень транскриптов преимущественно фотосинтетических хлоропластных генов, зависит от активности рецепторов АНК3 и АНК2 на протяжении всего онтогенеза растения, в то время как роль рецептора АНК4 в этом процессе второстепенна.
2. Экзогенный цитокинин вызывает дифференциальную регуляцию содержания транскриптов хлоропластных генов в листьях дикого типа и мутантов *ahk* в зависимости от возраста растений *A. thaliana*. Наибольший активирующий эффект цитокинина на содержание матриц в хлоропластах наблюдали на стадии проростка и в стареющих листьях.

3. Интенсивность транскрипции большинства изученных хлоропластных генов в молодых розеточных листьях *A. thaliana* определялась функциональной активностью рецептора АНК3, тогда как АНК2 и АНК4 играли меньшую роль.
4. Выявлено участие рецепторов ЦК в цитокинин-зависимой активации генов хлоропластных РНК полимераз ядерного кодирования - *RpoTr* и *RpoTnp*. Показана дифференциальная регуляция содержания транскриптов ядерных генов хлоропластных транс-факторов семейства Sig. Регуляция ЦК экспрессии ядерных генов, кодирующих важнейшие компоненты транскрипционной системы хлоропластов, представляется одним из возможных путей участия ЦК в регуляции биогенеза хлоропластов.
5. Показана негативная роль белка-рецептора АНК2 в задержке старения розеточных листьев *A. thaliana*.

### СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

#### Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК МОН РФ

1. Данилова М.Н., Кудрякова Н.В., Р. Оельмюллер., Кузнецов В.В., Кулаева О.Н. (2012) Участие мембранных рецепторов цитокинина в регуляции транскрипции хлоропластных генов. *Вестник РУДН, Серия: агрономия и животноводство*, **4**, 23-33.
2. Данилова М.Н., Кудрякова Н.В., Зубкова Н.К., Кузнецов В.В., Кулаева О.Н. (2012) Цитокинин вызывает дифференциальную регуляцию экспрессии конструкций Р<sub>АНК</sub>-GUS в трансгенных растениях *Arabidopsis thaliana*. *Физиология растений*, **59(1)**, 323-331.
3. Kudryakova N.V., Efimova M.V., Danilova M.N., Zubkova N.K., Khripach V.A., Kusnetsov V.V., Kulaeva O.N. (2013) Exogenous brassinosteroids activate cytokinin signalling pathway gene expression in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul*, **70**, 61–69.
4. Данилова М.Н., Кудрякова Н.В., Воронин П. Ю., Оельмюллер Р., Кузнецов В. В., Кулаева О. Н. (2014) Мембранные рецепторы цитокинина и их регуляторная роль в реакции растений *Arabidopsis thaliana* на фотоокислительный стресс в условиях водного дефицита. *Физиология растений*, **61(4)**, 466-475.

#### Публикации в сборниках и материалах конференций

1. Данилова М.Н. Кудрякова Н.В. Кузнецов В.В. Кулаева О.Н. (2010) Генно-модифицированные растения *Arabidopsis thaliana* как инструмент исследования цитокинин-регулируемой экспрессии генов гистидиновых киназ. *III Всероссийский симпозиум «Физиология трансгенного растения и фундаментальные основы биобезопасности»* (Москва), с.38.
2. Данилова М.Н., Кудрякова Н.В., Кузнецов В.В., Кулаева О.Н. (2011) Выяснение влияния инактивации генов рецепторов цитокинина на транскрипцию хлоропластного генома *A. thaliana*. *VII Съезд Общества физиологов растений России «Физиология растений-фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» и Международная научная школа Инновации в биологии для развития биоиндустрии сельскохозяйственной продукции* (Нижний Новгород), с. 205
3. Данилова М.Н. Влияние мутации по генам рецепторов цитокинина на транскрипцию хлоропластных генов *A. thaliana*. *«Ломоносов-2011». Тезисы*

докладов: XVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых (Москва), с. 222.

4. **Данилова М.Н.**, Кудрякова Н.В. (2011) Выяснение роли мембранных рецепторов цитокинина в регуляции транскрипции хлоропластных генов. *«Биология наука XXI века». Сборник тезисов: 15 Пушинская международная школа-конференция молодых ученых (Пушино)*, с. 423.
5. **Данилова М.Н.**, Кудрякова Н.В., Кузнецов В.В., Воронин П.Ю. Кулаева О.Н. (2012) Влияние мутаций по генам мембранных рецепторов цитокинина на темновой выход флуоресценции ФСІ И ФСІІ у растений *A. thaliana*. *IV Всероссийский симпозиум «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность»* и Годичное собрание ОФР (Москва), с. 35.
6. **Danilova M.N.**, Kudryakova N.V., Oelmüller R., Kusnetsov V.V., Kulaeva O.N. (2012) Elucidation of the role for cytokinin receptors in transcription of chloroplast genes in *Arabidopsis thaliana*. «18<sup>th</sup> Plant Biology Congress» (Freiburg, Germany), p. 764.
7. **Данилова М.Н.**, Кудрякова Н.В., Дорошенко А.С., Кузнецов В.В., Кулаева О.Н. (2014) Рецептору цитокинина АНКЗ принадлежит ведущая роль в контроле экспрессии пластидных генов *A. thaliana*. *Международная научная конференция и школа молодых ученых «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий»* и Годичное собрание ОФР (Калининград), с. 52-54.