

Регуляция активности гена *MAKR6* в корне *Arabidopsis thaliana* L.

Сидоренко А.Д.^{1,2*}, Новикова Д.Д.³, Миронова В.В.^{1,2}, Землянская Е.В.^{1,2}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Университет Лозанны, Лозанна, Швейцария

* a.sidorenko1@g.nsu.ru

Ключевые слова: корень; сосудистая система; ауксин; цитокинин; мембран-ассоциированные регуляторы киназ

Мотивация и цель: Мембран-ассоциированные регуляторы киназ (МАКР) – семейство, включающее семь белков [1]. Его представители являются важными регуляторами развития растений, но неизученным остается ген *MAKR6*. Ранее на основании исследования паттерна транскрипционной активности *MAKR6* в тканях проростка *Arabidopsis thaliana* мы показали, что этот ген может быть новым тканеспецифическим ауксин-чувствительным регулятором развития растений [2]. Регуляция транскрипции играет ключевую роль в создании определенного паттерна работы гена [3], и у растений она часто контролируется фитогормонами. Целью нашей работы является исследование механизмов регуляции активности гена *MAKR6* в корне *Arabidopsis thaliana* L.

Материалы и алгоритмы: Измерение уровня экспрессии в ответ на обработку фитогормонами проводили с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Список транскрипционных факторов (ТФ), являющихся потенциальными регуляторами *MAKR6*, был составлен на основании публично доступных данных DAP-seq [4]. Репортерные линии *pMAKR6:nls3GFP* на фоне мутации *mp/arf5* были получены путем скрещивания репортерных и мутантных линий. Анализ паттерна GFP в тканях репортерных линий проводили с помощью эпифлуоресцентной и конфокальной микроскопии.

Результаты: С помощью количественной ОТ-ПЦР мы показали, что *MAKR6* повышает свою экспрессию в корне уже после тридцатиминутной обработки ауксином. Активация гена в ответ на обработку цитокинином наблюдается через 24 часа и предположительно является результатом вторичного ответа на фитогормон. В промоторе *MAKR6* были найдены потенциальные сайты связывания ТФ семейства ARF, отвечающих за первичный ответ на ауксин, а также ряда цитокинин-чувствительных ТФ, локализованные в пиках DAP-seq для соответствующих ТФ. Транскрипционный ответ гена *MAKR6*, а также репортерной конструкции *pMAKR6:nls3GFP* на ауксин на фоне мутации по гену *MP/ARF5* (ключевой регулятор развития сосудистой системы корня) не отличался от такового в генетическом окружении дикого типа. Вероятно, чувствительность *MAKR6* к ауксину регулируется другими представителями семейства ARF. Также показано, что цитокинин-чувствительный регуляторный элемент располагается за пределами проксимальной области промотора.

Выводы: На основании полученных результатов можно сказать, что транскрипция *MAKR6* в корне регулируется ауксином и цитокинином, которые известны как

ключевые регуляторы формирования и поддержания бисимметричной организации сосудистой системы в кончике корня.

Финансирование: Работа поддержана грантом РФФ № 20-14-00140.

Regulation of *MAKR6* gene activity in *Arabidopsis thaliana* L. root

Sidorenko A.D.^{1, 2*}, Novikova D.D.³, Mironova V.^{1, 2}, Zemlyanskaya E.^{1, 2}

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

* a.sidorenko1@g.nsu.ru

Key words: root; vascular tissue; auxin; cytokinin; membrane-associated kinase regulator

Motivation and Aim: Membrane-associated kinase regulators (MAKR) family contains seven proteins, most of which are important plant development regulators [1]. *MAKR6* is the only family member, whose functions are poorly understood. Previously, based on the patterns of *MAKR6* transcriptional activity in *Arabidopsis* seedling tissues, we demonstrated that *MAKR6* might be a new tissue-specific auxin-sensitive regulator of plant development [2]. Regulation of transcription plays a pivotal role in gene expression patterning [3], and, in plants, it is often controlled by phytohormones. Here, we investigate the mechanisms of *MAKR6* transcriptional regulation in *Arabidopsis thaliana* L. root.

Methods and Algorithms: We measured the overall expression level of *MAKR6* using RT-qPCR. The list of transcription factors (TF), which are the potential regulators of *MAKR6* expression, was compiled based on publicly available DAP-seq data [4]. The reporter lines, which express *pMAKR6:nls3GFP* in the *mp/arf5* background were generated by crossing the corresponding *A. thaliana* reporter lines and mutant lines. To analyze GFP pattern in the tissues of the reporter lines, we used epifluorescent and confocal microscopy techniques.

Results: Using RT-qPCR, we demonstrated that *MAKR6* is upregulated after 30 minutes of auxin application. Gene activation by cytokinin application is observed after 24 hours, and, supposedly, is the result of a secondary response to the phytohormone. *MAKR6* promoter contains potential binding sites the ARF family TFs, which promote early response to auxin, as well as a number of cytokinin-sensitive TFs, localized in DAP-seq peaks for the corresponding TFs. The transcriptional response of both *MAKR6* gene and *pMAKR6:nls3GFP* reporter construct to auxin in the mutant background *mp/arf5* (*ARF5* is known as a key regulator of the development of the root vascular system) did not differ from that in the wild-type background. Thus, *MAKR6* sensitivity to auxin is probably regulated by other ARF family members. We also demonstrated that the cytokinin-sensitive regulatory elements are located outside of the proximal promoter region of *MAKR6*.

Conclusion: Our results show that *MAKR6* transcription in the root is regulated by auxin and cytokinin, which are known as key regulators of the formation and maintenance of the bisymmetric organization of the vascular system in the root tip.

Funding: This work was supported by the RSF grant No. 20-14-00140.

Список литературы/References

1. Novikova D.D., Korosteleva A.L., Mironova V., Jaillais Y. Meet your MAKR: the membrane-associated kinase regulator protein family in the regulation of plant development. *FEBS J.* 2022;289(20):6172-6186
2. Sidorenko A.D., Novikova D.D., Mironova V., Zemlyanskaya E. Understanding the role of MAKR6 in *Arabidopsis thaliana* L. root development. In: Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022). Novosibirsk, 2022;662
3. Lee J.Y., Colinas J., Wang J.Y., Mace D., Ohler U., Benfey P.N. Transcriptional and posttranscriptional regulation of transcription factor expression in *Arabidopsis* roots. *PNAS.* 2006;103(15):6055-6060
4. O'Malley R.C., Huang S S.C., Song L., Lewsey M.G., Bartlett A., Nery J.R., Ecker J.R. Cistrome and epicistrome features shape the regulatory DNA landscape. *Cell.* 2016;165(5):1280-1292