

## Роль регуляторных элементов промотора гена транскрипционного фактора NIN и структурных особенностей его доменов в регуляции поздних стадий органогенеза клубеньков у бобовых

Е.С. Канцурова\*, А.В. Долгих, П.Ю. Козюлина, Е.А. Сальникова, Е.А. Долгих

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

\* *es.kantsurova@arriam.ru*

**Цель:** Транскрипционный фактор NIN (NODULE INCEPTION) является основателем семейства NIN-подобных белков (NLP), которые широко представлены практически во всех группах растений. Несмотря на общее сходство всех белков NLP, только NIN был рекрутирован для выполнения ключевой роли в регуляции развития ризобияльного симбиоза. Он необходим для контроля развития инфекции, регуляции органогенеза клубеньков, а также вовлечен в системную регуляцию клубенькообразования. На сегодняшний день предложены две гипотезы, объясняющие многообразие функций NIN в развитии бобово-ризобияльного симбиоза: протеолитическое расщепление транскрипционного фактора NIN с проявлением разной активности у образованных форм и наличие разнообразных регуляторных мотивов в промоторе гена NIN, обеспечивающие его избирательную активацию в разных тканях. В данной работе были рассмотрены обе гипотезы и проведен анализ данных, объясняющих участие NIN в регуляции различных процессов при симбиозе.

**Материалы и методы:** Был проведен скрининг библиотек кДНК корней гороха (7 суток после инокуляции), транскрибуемых в клетках дрожжей, с помощью дрожжевой двугибридной системы, совмещенной с высокопроизводительным секвенированием для выявления новых ко-регуляторов транскрипционного фактора NIN. Одним из основных методов является получение композитных растений гороха посевного (*Pisum sativum* L.), который был использован для локализации активности промотора гена *NIN* и комплементации мутантов гороха по этому гену. Была проведена иммунопреципитация хроматина на трансгенных корнях гороха, с последующим высокопроизводительным секвенированием (ChIP-Seq-анализ) для выявления новых генов-мишеней транскрипционного фактора PsNIN в растениях с недетерминированным типом клубеньков.

**Результаты:** Ряд регуляторов, показавших взаимодействие с NIN в дрожжевой двугибридной системе, могут непосредственно участвовать в посттрансляционной модификации белков. В связи с тем, что ранее была предсказана возможность протеолиза транскрипционного фактора NIN для контроля его активности, выявленные нами регуляторы могут выполнять такую функцию. Кроме того, нами были выявлены уникальные мотивы в аминокислотной последовательности NIN, которые могут быть специфичными для транскрипционного фактора NIN у бобовых с недетерминированным типом клубеньков.

Промотор гена *NIN* содержит по меньшей мере три регуляторных элемента, участвующих в контроле пространственно-временной активности этого гена, что было показано на модельных бобовых растениях. Предполагается, что активация гена *NIN* в эпидермисе регулируется транскрипционным фактором IPD3/CYCLOPS и комплексом транскрипционных факторов NSP1/NSP2 через CYC- и NSP-регуляторные элементы (Liu et al., 2019). Это приводит к активации транскрипционным фактором NIN комплекса регуляторов инфекционного процесса в эпидермисе, а также стимулирует выработку неизвестного фактора X, который перемещается из эпидермиса в перицикл и эндодерму и стимулирует в этих тканях накопление цитокининов. Регулятор цитокининового ответа транскрипционный фактор RR Б-типа связывается с другой регуляторной последовательностью в промоторе (CE-элементом), что стимулирует дополнительную экспрессию *NIN* в этих тканях и связанную с ней активацию пролиферации клеток перицикла и эндодермы и закладку примордия клубенька. Наряду с тремя этими регуляторными элементами, более детальный анализ промоторной области гена *NIN* гороха позволил нам выявить еще один GA-регуляторный элемент, который активируется гиббереллинами и может быть важен для стимуляции дальнейших этапов формирования клубенька из его примордия. С использованием транскриптомного анализа и иммунопреципитации хроматина нами впервые был выявлен набор генов, которые регулируются транскрипционным фактором NIN на более поздних этапах морфогенеза клубеньков у гороха под влиянием цитокининов.

**Выводы:** В ходе данной работы были выявлены новые механизмы регуляции транскрипционного фактора NIN у гороха при развитии симбиоза с клубеньковыми бактериями.

**Финансирование:** Исследование поддержано грантом РНФ № 24-16-00180.