

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК (575.1/571.27)

Взаимодействующие гены *PARG1* и *EXA1* являются важными регуляторами аутоиммунитета у растений**Е.В. Куприянова^{1, *} , К.А. Манахова², Т.А. Ежова¹** ¹Кафедра генетики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет Сириус, Россия, 354340, Краснодарский край, пгт Сириус

*e-mail: ekupriyanova@gmail.com

Исследования выполнены на растениях двойного мутанта резуховидки (*Arabidopsis thaliana*) *parg1 exa1*, характеризующегося смертью клеток по краю листовой пластинки, активацией экспрессии генов иммунных рецепторов, генов PR-белков и генов гиперчувствительного ответа, что является признаком аутоиммунитета. В то же время, в отличие от других мутантов с проявлением аутоиммунитета, мутант *parg1 exa1* демонстрировал приобретение клетками листа плюрипотентности и способность к регенерации нового края листа. В связи с необычным фенотипом в данной работе проведен углубленный анализ транскриптома молодых листьев мутанта и растений дикого типа. У мутанта обнаружено повышение уровня экспрессии всех основных компонентов иммунного ответа, включая гены Ca^{2+} -проводящих каналов, НАДФН-оксидаз, генов синтеза салициловой кислоты, жасмоновой кислоты и многие другие. Полученные данные свидетельствуют о том, что гены *PARG1* и *EXA1*, контролирующие уровень поли(АДФ-рибозилирования) и процесс нонсенс-опосредованной деградации РНК соответственно, являются важными регуляторами иммунного ответа. Их функция необходима для предотвращения чрезмерной активации защитных систем в растениях.

Ключевые слова: аутоиммунитет растений, транскриптом, рецепторы иммунитета, салициловая кислота, клеточная смерть, мутации

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-4-8

Список сокращений:

CBL – calcineurine B-like proteins (кальциневрин В-подобные белки);
CLM – calmodulin (кальмодулин);
CML – calmoduline-like proteins (кальмодулин-подобных белков);
EDS1 – enhanced disease susceptibility 1 (белок повышенной восприимчивости к болезням 1);
GLR – glutamate-receptor-like proteins (белки, подобный рецептору глутамата);
GO – gene ontology (генная онтология);
NLR – nucleotide binding and leucine rich-repeat (нуклеотид-связывающий лейцин-богатый белок);

PAD4 – phytoalexin deficient 4 (дефицит фитоалексинов 4);
PARP – poly(ADP-ribose) polymerase (поли(АДФ-рибоза)-полимераза);
PRR – pattern-recognition receptors (рецепторы опознавания паттерна);
АФК – активные формы кислорода;
ДТ – дикий тип;
ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены;
ЖК – жасмоновая кислота;
ИО – иммунный ответ;
СК – салициловая кислота;
ТФ – транскрипционные факторы.

Введение

Растения выработали разнообразные защитные механизмы от биотических стрессовых воздействий. Для распознавания патогена и запуска защитного ответа растения используют иммунные рецепторы: мембранные рецепторы PRR (Pattern-Recognition Receptors) и ядерно-цитоплазматические нуклеотид-связывающие рецепторы NLR (Nucleotide binding and Leucine rich-Repeat). Рецепторы PRR распознают консервативные молекулярные паттерны патогенов и поврежденных растительных клеток, инициируя быстрый неспецифический защитный ответ [1, 2]. Внутриклеточные рецепторы NLR распознают расоспецифические эффекторы патогенов и активируются позже, чем PRR-рецепторы [3]. Составной частью специфического иммунного ответа (ИО), вызванного активацией NLR, является клеточная смерть в области поражения, которая ограничивает распространение и вызывает гибель патогена. Этот локализованный «гиперчувствительный ответ» обеспечивает полную устойчивость к определенным расам патогенов [4, 5].

Несмотря на различия во времени проявления и силе ИО, который запускается рецепторами PRR и NLR, начальные этапы ИО очень похожи. После связывания рецепторов с лигандами наблюдается увеличение в цитоплазме концентрации Ca^{2+} и активных форм кислорода (АФК). Эти два быстрых ответа обусловлены активацией белков Ca^{2+} -проницаемых каналов и НАДФН-оксидаз соответственно, локализованных на внешней мембране клетки [6]. К каноническим Ca^{2+} -каналам относятся CNGC – каналы, активируемые циклическими нуклеотидами, GLR – ионотропные глутаматные рецепторы, каналы ANN, образованные аннексинами, каналы MLO и некоторые другие [7, 8]. Быстрое, но временное открытие канонических Ca^{2+} -проницаемых каналов наблюдается практически сразу после активации рецепторов PRR.

Неканонические Ca^{2+} -каналы обеспечивают вторую волну поступления Ca^{2+} в клетки. Эти каналы создаются путем олигомеризации самих NLR-рецепторов. Это показано для NLR-рецептора ZAR1 резуховидки, который образует пентамер, пронизывающий мембрану [9], а также для NLR-белков резуховидки NRG1 и ADR1 после получения ими информации от других рецепторов NLR [10]. Результатом поступления Ca^{2+} в клетку является активация белков – сенсоров Ca^{2+} : кальмодулинов и кальмодулин-подобных белков, кальциневрин В-подобных белков (CBL, calcineurine B-like proteins) и протеинкиназ, взаимодействующих с CBL [11]. Сенсоры Ca^{2+} способны активировать некоторые белки Ca^{2+} -каналов, PRR- и NLR-рецепторы, транскрипционные факторы (ТФ) и ферменты (например, некоторые ме-

такаспазы), а также другие белки, что приводит к усилению и дальнейшему развитию ИО [12, 13].

Ca^{2+} -связывающие домены найдены и у белка RBOHD, который является основной субъединицей комплекса НАДФН-оксидазы, продуцирующего АФК [14]. Образующиеся АФК также могут влиять на состояние многих редокс-чувствительных белков: некоторых цистеин-богатых рецепторных киназ CRK [15], протеинкиназ, передающих информацию о появлении АФК на другие белки-мишени [16], ТФ с редокс-зависимой активностью [17, 18] и др. АФК могут влиять на вход Ca^{2+} в цитозоль, активируя аннексины [19]. Активация двух быстрых ИО (поступление Ca^{2+} и образование АФК), которая поддерживается механизмом позитивной обратной связи, приводит к существенному перепрограммированию генной экспрессии, необходимой для уничтожения патогенов [6].

Салициловая кислота (СК) и белки семейства EDS1 (Enhanced Disease Susceptibility 1) – центральные компоненты ИО, экспрессия которых зависит от содержания Ca^{2+} в цитозоле. Белки-сенсоры Ca^{2+} активируют кальмодулин-связывающий ТФ CBP60g, который вместе с ТФ SARD1 повышает транскрипцию как генов синтеза СК, так и генов семейства EDS1 [20]. Сигнальные пути СК и белков семейства EDS1 действуют параллельно и выполняют роль сигнальных промежуточных компонентов между распознаванием патогенов и осуществлением как неспецифического, так и специфического ИО.

Небольшое семейство EDS1-липазоподобных белков, специфичных для растений, кодируется генами *EDS1*, *PAD4*, *SAG101*, которые образуют комплексы EDS1–PAD4 и EDS1–SAG101. Белковый комплекс EDS1–PAD4, взаимодействуя с ТФ, может повышать транскрипцию генов *ICS1* и *PBS3*, контролирующих биосинтез СК [21, 22], что активирует сигнальный путь СК. Однако белки семейства EDS1 могут действовать независимо от пути СК. Гетеродимеры EDS1–SAG101 или EDS1–PAD4 могут активировать образование олигомерных комплексов белками NLR (NRG1 или ADR1 соответственно), которые, взаимодействуя с мембранами, образуют новые неканонические Ca^{2+} каналы [23].

Путь СК взаимодействует не только с Ca^{2+} -сигналингом, но и с АФК-сигнальным путем. Сигнальный путь СК активирует накопление АФК, влияя на транскрипцию генов *RBOH* НАДФН-оксидаз. Кроме того, СК может индуцировать накопление H_2O_2 , подавляя экспрессию каталаз и пероксидаз [24]. Сигнальный путь СК активирует транскрипцию целого ряда генов, специфических именно для этого гормона: генов ТФ семейств WRKY, ZIP, NAC, генов рецепторов NLR и PRR, генов *PR1*, *PR2* и *PR5*, кодирующих патогенез-ассоциированные белки [25]. СК считается важным

компонентом, инициирующим клеточную смерть, хотя точные механизмы этого влияния пока не выяснены [26]. Неотъемлемым компонентом клеточной смерти являются протеазы — метакаспазы, ферменты вакуолярного процессинга и цистеиновые протеазы [27]. Некоторые протеазы индуцируются СК [28].

Другим важнейшим защитным гормоном является жасмоновая кислота (ЖК). В отличие от СК, защищающей растения от биотрофов, ЖК необходима для защиты от некротрофов и насекомых. Между сигнальными путями ЖК и СК существуют сложные, часто антагонистические, взаимоотношения, что позволяет выбирать оптимальную линию защиты [29]. Среди мишеней есть группы генов, специфичные именно для ЖК: гены ответа на поранение, гены вторичного метаболизма, включая метаболизм глюкозинолатов и флавоноидов и пр. [25].

Среди мишеней ЖК и СК есть гены, которые активируются обоими гормонами или регулируются ими противоположным образом. Так, уровень транскрипции многих генов рецепторов NLR и PRR повышался при воздействии СК, но снижался при действии ЖК [25]. То же показано для генов *PAD4*, *EDS1*, *SAG101*, *ICS1*, *CBP60G* и *SARD1*, которые важны для накопления высокого уровня СК [30, 25]. Таким образом, ЖК может ослаблять ИО, индуцированный СК, путем ингибирования накопления СК и подавления генов-мишеней СК. Однако сигнальные пути могут действовать и совместно [31].

Продукция АФК, защитных белков, перестройка метаболизма и клеточная смерть приводят к прекращению роста и развития растений. Поэтому, наряду с генами, активирующими защитную реакцию на стрессовые воздействия, существуют негативные регуляторы ИО, поддерживающие баланс между развитием и защитным ответом [32]. Мутации в негативных регуляторах ИО, как и мутации, вызывающие эктопическую экспрессию позитивных регуляторов ИО, приводят к аутоиммунитету. Для аутоиммунных мутантов характерны накопление СК и АФК, а также реакции гиперчувствительности в отсутствие патогенов, существенное угнетение роста и даже летальность [32, 33].

В коллекции мутантов резуховидки кафедры генетики МГУ есть мутант *tae*, у которого обнаружены признаки проявления аутоиммунитета — смерть клеток листа, активация транскрипции генов иммунных рецепторов, генов PR-белков и генов гиперчувствительного ответа [34]. Вместе с тем, фенотип мутанта отличается от фенотипов ранее описанных аутоиммунных мутантов. У нашего мутанта более узкие листья, чем у дикого типа (ДТ). На поздних стадиях развития листа клетки реактивируют экспрессию генов плюрипотентности, образуют почки и лопасти [35], что никогда не

наблюдалось у других аутоиммунных мутантов. Генетическое картирование с использованием секвенирования показало, что фенотип обусловлен одновременным присутствием двух мутаций *parg1* и *exa1* в гомозиготном состоянии.

Ген *PARG1* кодирует гликогидролазу поли(АДФ-рибозы), которая синтезируется белками PARP (поли(АДФ-рибоза)-полимераза, poly(ADP-ribose) polymerase). Высокий уровень поли(АДФ-рибозы) растение может распознать как сигнал стресса [36–39]. Снижая уровень поли(АДФ-рибозы), ген *PARG1* уменьшает стрессовый сигнал и способствует выживанию клеток в условиях генотоксического стресса [39]. Ген *EXA1* участвует в нонсенс-опосредованном распаде мРНК [40], ограничивает трансляцию мРНК иммунных рецепторов, взаимодействуя с фактором eIF4E инициации трансляции, подавляет клеточную смерть при атаке патогенов [40, 41].

Целью данной работы был детальный анализ экспрессии основных компонентов ИО для подтверждения проявления аутоиммунитета у двойного мутанта. Мы осуществили поиск в транскриптоме дополнительных групп генов, кодирующих иммунные рецепторы, генов, участвующих в Ca^{2+} -сигналинге и продукции АФК, генов, контролирующих синтез СК и ответ на этот стрессовый гормон, а также некоторых других групп генов, играющих важную роль в ИО. Наши исследования подтвердили, что мутант проявляет мощный аутоиммунитет, что позволяет утверждать, что гены *PARG1* и *EXA1* являются важными негативными регуляторами ИО.

Материалы и методы

Использованы данные секвенирования РНК, выделенной из молодых листьев растений резуховидки (*Arabidopsis thaliana*) мутанта *tae* и экотипа Blanes (линия К-6, исходная для получения мутанта) из коллекции кафедры генетики МГУ. О методах выделения РНК (по четыре биологических повторности для мутанта и ДТ), секвенирования на платформе Illumina NextSeq (Illumina, США) и сборке транскриптома мы сообщали ранее [34]. Наборы данных, созданные в ходе исследования и использованные в данной работе, депонированы в NCBI SRA и доступны через BioProject (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA926955>).

Анализ дифференциальной экспрессии проводили с помощью пакета DESeq2. Гены с более чем двукратным изменением экспрессии Log2FC (FC — fold change, отражает кратность изменения содержания РНК в растениях мутанта по сравнению с диким типом) и р-значением с поправкой на FDR (Padj) менее 0,05 (Benjamini and Hochberg's метод) были определены как дифференциально экспрессирующиеся (ДЭГ). Список ДЭГ, содержащий 3551 ген, использован в данной работе для анализа функционального обогащения с использованием

биоинформационного ресурса AgriGO v2.0 (<http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/>), который создан специально для углубленного анализа транскриптомов растений [42].

Для визуализации результатов исследований использованы возможности ресурса SRplot (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) и BioRender (<https://app.biorender.com/illustrations/>).

Результаты

Анализ генов иммунных рецепторов. Ранее мы сообщали об активации у мутанта 92 генов рецепторных белков, среди которых как гены мембранных PRR-рецепторов (20 генов цистеиновых рецептор-подобных киназ CLK и 16 генов рецептор-подобных белков RLP), так и 56 генов разнообразных рецепторов NLR [34]. Детальный анализ транскриптома, проведенный в данной работе, позволил дополнить список иммунных рецепторов PRR, транскрипция которых повышена у мутанта (рис. 1; табл. 1 приложения). Это 25 генов рецепторных киназ с лектиновым доменом (LecRK), которые распознают различные углеводы и участвуют в защите от биотических и абиотических стрессов [43, 44], 10 генов протеинкиназ (4 гена WAK и 6 генов WAKL), контролирующих растяжение клеток и ответ на стрессовые воздействия [45, 46], а также два гена рецепторов фитогормонов PEPR1 и PEPR2, которые активируются небольшими пептидами растительного происхождения, появляющимися в клетках после их повреждения [47].

Выявлено также несколько активированных генов, кодирующих малоисследованные группы RLK-рецепторов: три гена пролин-богатых рецепторных киназ PERK, два гена рецепторных киназ с двумя внеклеточными доменами (LRR и MAL), которые активируются олигосахаридами и рассматриваются как сенсоры целостности клеточных

стенок [48, 49], и три гена *LYK*, кодирующие рецептор-подобные киназы с лизиновыми мотивами LysM, которые распознают хитин [50]. Обнаружены также два гена *CCR*, кодирующие рецепторы с повторами CRINKLY4, и один ген для малектиновых рецепторов MLR, лиганды для которых еще не найдены [51, 52]. Среди генов, транскрипция которых у мутанта снижена по сравнению с ДТ, выявлено только три гена иммунных PRR-лектиновых рецепторов LecRK.

Анализ генов Ca^{2+} -проводящих каналов и генов, кодирующих сенсоры Ca^{2+} . Поскольку кальциевый сигналинг является первым быстрым ответом на активацию рецепторов, мы исследовали наличие генов Ca^{2+} -каналов среди ДЭГ. Наиболее представленными транспортерами Ca^{2+} оказались рецепторы глутамата GLR (glutamate-receptor-like proteins), которые считают основными регуляторами баланса между защитным ответом и процессами регенерации [53]. В листьях мутанта 8 генов GLR повышают уровень транскрипции (рис. 2А). Обнаружено повышение уровня транскрипции пяти генов MLO, кодирующих специфичные для растений белки Ca^{2+} -проводящих каналов с семью трансмембранными доменами [54].

Среди активированных у мутанта ДЭГ обнаружены также гены Ca^{2+} -каналов, гомологи которых выполняют ту же функцию у животных. Это три гена, кодирующие Ca^{2+} -каналы CNGC-класса, а также один ген аннексинов *ANN1*, экспрессия которого регулируется СК [55]. Обнаружена также активация пяти генов *ACA* Ca^{2+} -проводящих каналов (от Autoinhibited Ca^{2+} -ATPases) и двух генов *CAX* (Ca^{2+} exchangers), кодирующих белки каналов, локализованных на мембранах вакуолей и способствующих снижению содержания Ca^{2+} в цитозоле для поддержания гомеостаза его уровня [56]. Среди репрессированных генов Ca^{2+} -проводящих каналов найден лишь один ген *MLO13* (рис. 2А).

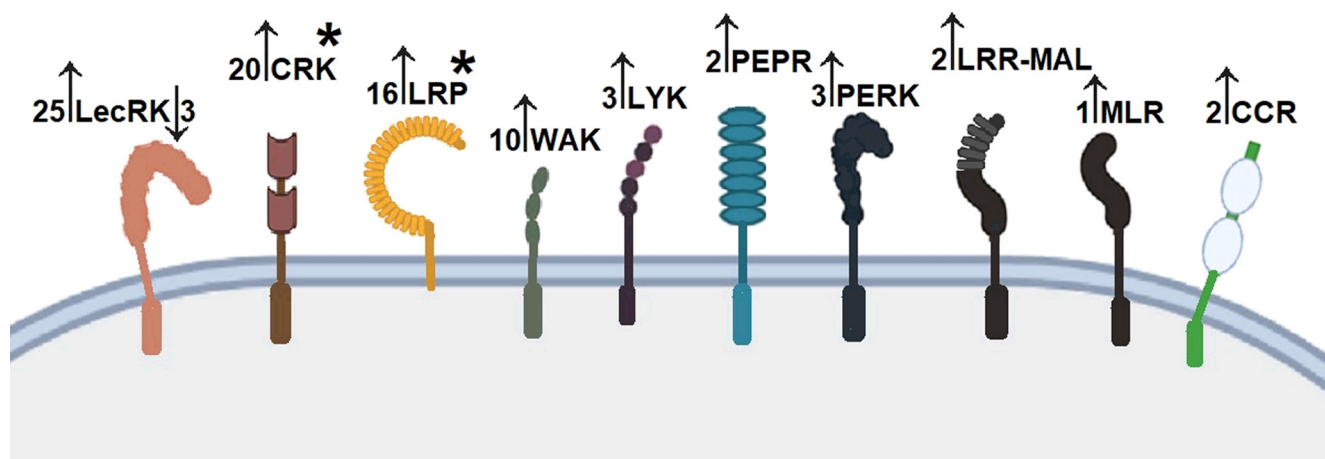


Рис. 1. Иммунные мембранные рецепторы PRR, экспрессия которых повышена у мутанта *par1 exa1*. Схематически показаны разные типы рецепторов и число кодирующих их генов, которые повышают (↑) или понижают (↓) свою экспрессию у мутанта *par1 exa1*. Группы генов, выявленные нами ранее [34], отмечены звездочкой (*). Список выявленных в данной работе рецепторов PRR и изменения уровня их экспрессии (log2FC) представлены в табл. 1 приложения.

У мутанта повышается также транскрипция генов неканонических каналов Ca^{2+} . Это гены, кодирующие рецепторы NLR-класса CC-NB-LRR, которые способны олигомеризоваться и образовывать Ca^{2+} -проводящие поры [57]. О повышенной экспрессии таких генов *ZAR1*, *ADR1* и *NRG1B* (*AT5G66910*) мы сообщали ранее [34]. Повышенный уровень ($\log_2\text{FC} = 6,04$, $\text{Padj} = 0,00084$) транскрипции гена *NRG1C* (*AT5G66890*) выявлен в данной работе. Результатом поступления Ca^{2+} в клетку является активация белковых молекул – сенсоров уровня кальция, среди которых гены *CLM* кальмодулина и *CML* кальмодулин-подобных белков (11 генов), гены кальциневрин В-подобных белков CBL и протеинкиназы, взаимодействующие с CBL (10 генов). Среди репрессированных генов нам удалось найти лишь один ген – *CIPK13* (рис. 2А).

Анализ генов, связанных с образованием АФК.
Среди активированных ДЭГ у мутанта найдены два гена *RBOHD* и *RBOHB* НАДФН-оксидаз, способных образовывать АФК. О продукции АФК в клетках мутанта свидетельствует также повышение транскрипции 18 генов пероксидаз, 20 генов глутатионпероксидаз, одного гена каталазы *CAT3* и трех генов гермин-подобных белков GLP, которые могут осуществлять функции супероксид-дисмутаз [58], и некоторых других (табл. 2 приложения). У мутанта повышена экспрессия редокс-чувствительного гена *OXII*, транскрипция которого регулируется H_2O_2 [16]. Ген *OXII* кодирует серин-треониновую протеинкиназу, которая активирует ряд MAP-киназ и опосредованно влияет на транскрипцию генов *RBOHD* и *RBOHB* НАДФН-оксидаз, гена *ICS1* синтеза СК, гена *PAD3* синтеза камалексина и гена *FMO1* синтеза

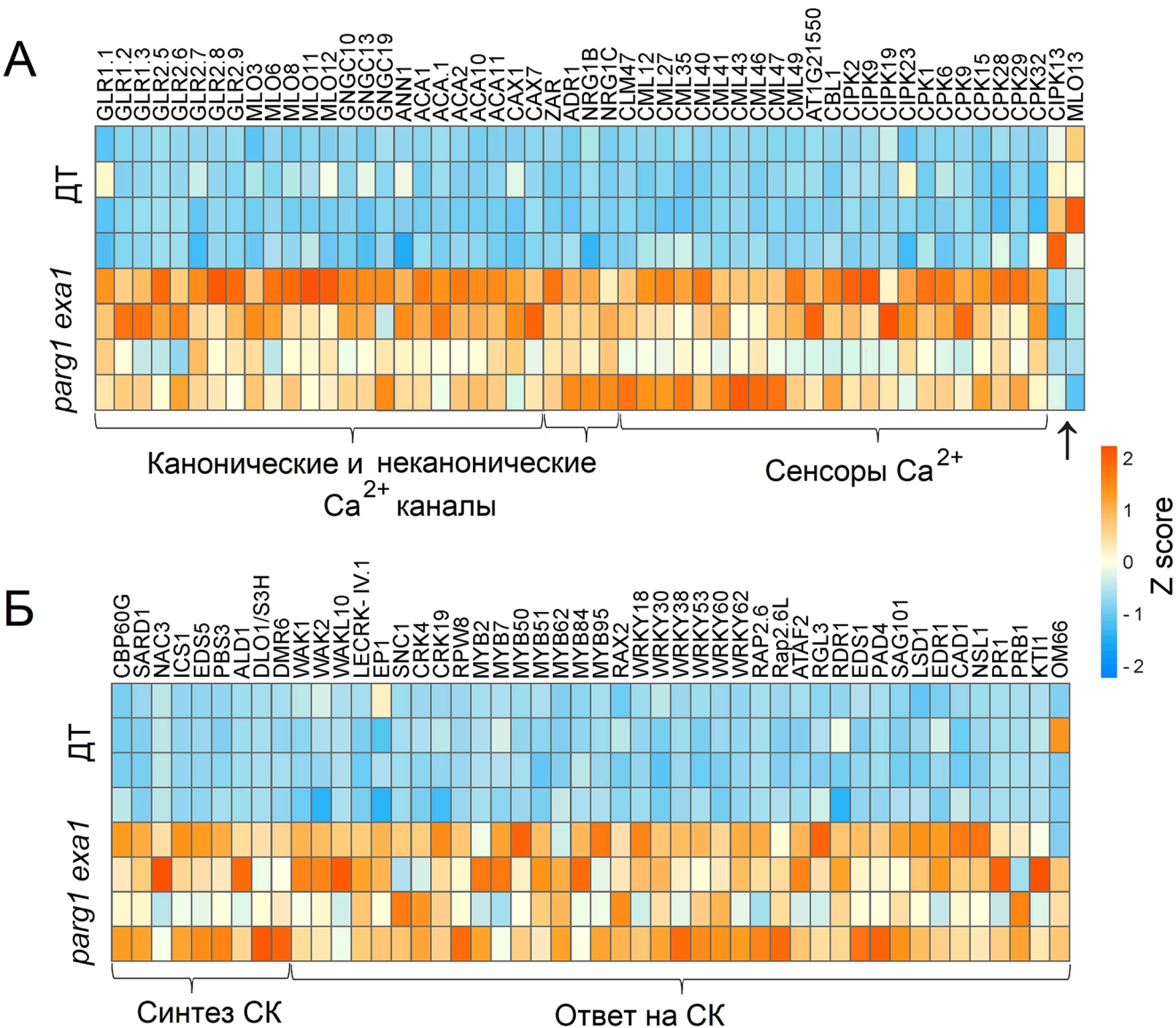


Рис. 2. ДЭГ, вовлеченные в сигнальный путь Ca^{2+} -сигналинга (А) и салициловой кислоты (Б). Различия в уровне экспрессии генов у ДТ и мутанта представлены в виде тепловой карты, построенной на основе расчета величин Z-score (по четыре повторности для каждого генотипа) с использованием ресурса SRplo. Справа на рис. А стрелкой отмечены два гена, снижающие экспрессию у мутанта.

пипекоевой кислоты [59]. Транскрипция всех перечисленных генов, играющих важнейшую роль в защите от патогенов, также повышена у мутанта.

Анализ генов, контролирующих сигнальные пути СК и EDS. Среди ДЭГ многие гены ассоциированы с ответом на СК. По результатам анализа с использованием ресурса AgriGO у мутанта повышена экспрессия 67 генов категории GO:0009751 (ответ на СК). Анализ транскриптома мутанта обнаружил повышение экспрессии ключевых генов, активирующих транскрипцию генов синтеза СК. Это Ca^{2+} -регулируемый ген *CBP60g* и ген *SARD1*, которые осуществляют совместную регуляцию генов синтеза СК [20]. У мутанта повышена также экспрессия гена ТФ NAC3, который активирует транскрипцию гена *ICS1* изохоризматсинтазы — ключевого фермента биосинтеза СК, катализирующего превращение хоризмата в изохоризмат в пластидах. У мутанта повышена транскрипция еще двух ключевых генов биосинтеза СК: гена *EDS5*, кодирующего транспортный белок MATE, необходимый для транспортировки изохоризмата в цитозоль, а также гена *PBS3*, превращающего изохоризмат в СК [60]. Повышена экспрессия гена *ALD1* аминотрансферазы, транскрипция которого активируется ТФ CBP60g и *SARD1*. Этот ген также важен для накопления в клетках высокого уровня СК [61].

Об активации сигнального пути СК у мутанта свидетельствует также повышение экспрессии многих генов ответа на СК. Среди них — гены PRR-рецепторов (WAK, WAKL, RLK-рецепторы) и рецепторов NLR (гены *SNC* и *RPW8*). Повышается экспрессия ряда генов ТФ семейств MYB, WRKY, AP2/ERF и NAC (рис. 2Б). Обнаружена активация гена *RGL3*, который кодирует негативный регулятор гиббереллинового пути с DELLA-доменом. Этот ген известен как мишень сигнального пути ЖК и как активатор этого пути [62]. Среди мишеней СК мы обнаружили еще одну известную мишень СК — активированный ген *RDR1* РНК-зависимой РНК-полимеразы, участвующей в посттранскрипционном замолкании генов [63].

Среди генов, регулируемых СК, есть все представители EDS1-семейства, которые работают как независимо от пути СК, так и вместе с ним. Это гены *EDS1*, *PAD4* и *SAG101* (рис. 2Б), которые поддерживают высокий уровень СК и активируют образование неканонических Ca^{2+} -пор, вторую волну «кальциевой вспышки» и смерть клеток. В то же время в списке генов, регулируемых СК, мы обнаружили негативный регулятор клеточной смерти — ген *LSD1* — с повышенной экспрессией (рис. 2Б). Выполняя молекулярную функцию транскрипционного регулятора и каркасного белка, *LSD1* снижает содержание СК и подавляет клеточную смерть [64]. Среди мишеней СК в транскриптом мутанта обнаружен еще один негативный регулятор ИО. Это ген *EDR1*, кодирующий Raf-подобную протеинкиназу MAPKKK, ко-

торая может взаимодействовать с белками EDS1, препятствуя формированию ими функциональных комплексов [65].

Интересно, что СК активировала также два гена гидролаз DLO/S3H и DMR6, которые могут превращать СК в 2,3-дигидроксibenзойную кислоту (рис. 2Б) [66, 67].

Среди генов, регулируемых СК, есть гены PR-белков: ген хитиназы *PR1* (главный маркер активации сигнального пути СК) и его гомолог *PRB1*, а также ген *KTII*, кодирующий ингибитор трипсина (рис. 2Б). Ранее мы сообщали и о повышении транскрипции ряда других PR-генов [34].

Анализ генов клеточной смерти (активированных СК и других). Мишенью сигнального пути СК является ген *OM66*, активирующий клеточную смерть. Ген *OM66* кодирует белок, образующий мультимерный комплекс на внешней мембране митохондрий и играющий важную роль в смерти клеток и амплификации сигналинга СК [68]. Протеазы — финальный компонент клеточной смерти. Ранее мы сообщали об активации трех генов метакспаз [34]. В данной работе обнаружена активация еще 5 генов цистеиновых протеаз, среди которых и гены протеаз *AT3G22260*, *AT4G01610*, которые активируются СК, и один ген, кодирующий фермент вакуолярного процессинга (табл. 2 приложения). О других генах — позитивных регуляторах клеточной смерти, повышающих экспрессию у мутанта, мы сообщали ранее [34].

Среди генов, активируемых СК, помимо позитивных регуляторов клеточной смерти мы нашли еще два негативных регулятора клеточной смерти. Это гены *CAD1*, *NSL1* — кодирующие белки, напоминающие перфорины животных и являющиеся частью их иммунной системы. Молекулярная функция этих белков у растений исследована не полностью. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что в клетках растений они подавляют ИО, зависимый от СК [69].

Обсуждение

Гены PARG1 и EXA1 — важные участники регуляции ИО. Анализ транскриптома мутанта резуховидки выявил активацию всех основных групп генов ИО. В данной работе мы дополнили список рецепторов ИО представителями 8 разных типов PRR-рецепторов (рис. 1; табл. 1 приложения). О еще двух типах PRR (CRK и RLP) мы сообщали ранее [34]. С учетом ранее выявленных, у мутанта в общей сложности повышена транскрипция 138 генов иммунных рецепторов, из которых 82 гена кодируют мембранные рецепторы PRR, а 56 генов — ядерно-цитоплазматические рецепторы NLR.

Выявлено повышение уровня транскрипции 17 генов, кодирующих канонические Ca^{2+} -проводящие каналы четырех типов (GLR-типе, MLO, CNGC, ANNAT1), которые повышают концен-

трацию Ca^{2+} в цитозоле в ответ на активацию рецепторов PRR. Повышается также уровень транскрипции 6 генов, которые кодируют каналы ACA и SAX, выводящие Ca^{2+} из клетки в вакуоли (рис. 1A) и способствующие предотвращению смерти клеток. Выявлен более высокий уровень транскрипции у мутанта генов неканонических Ca^{2+} -каналов, которые образуются после активации рецепторов NLR и обуславливают вторую волну поступления Ca^{2+} в клетки. Обнаруженные у мутанта 23 гена сенсоров Ca^{2+} (рис. 2A) с повышенным уровнем транскрипции могут активировать разнообразные белки, включая ТФ. Отметим, что у мутанта повышена экспрессия кальмодулин-связывающего ТФ СВР60g, который вместе с ТФ SARD1 позитивно регулирует гены синтеза СК и гены липазоподобных белков семейства EDS. Эти ТФ, как и регулируемые ими центральные сигнальные компоненты иммунного ответа, приводят к глобальному изменению спектра экспрессирующихся генов, необходимых для активации защитных систем.

Наряду с генами Ca^{2+} -сигналинга выявлено повышение транскрипции генов, которые связаны с образованием АФК (табл. 2 приложения). Активация Ca^{2+} -сигналинга и продукции АФК считаются самыми быстрыми ответами на атаку патогенов, которые необходимы для дальнейшей активации сенсоров кальция и белков, чувствительных к редокс-потенциалу. Результатом этих быстрых ответов являются так называемые «кальциевая вспышка» и «окислительный взрыв», способные вызвать гибель не только патогенов, но и самих растительных клеток, что ограничивает возможность распространения инфекции на соседние клетки.

Проявление большого числа активированных генов ИО является убедительным свидетельством проявления мощного аутоиммунитета у мутанта. В общей сложности среди ДЭГ в листьях мутанта *parg1 exa1* выявлено 2660 генов с увеличенным и 891 ген — со сниженным уровнем экспрессии по сравнению с ДТ [34]. В недавно опубликованной работе, проведенной на мутанте по гену *IBM1* (ген гистоновой H3K9-деметилазы) с аутоиммунным фенотипом [70], в растениях дифференциально экспрессируются по сравнению с ДТ 1396 активированных и 498 репрессированных генов, изменивших экспрессию более чем в два раза. Как и в нашем случае, основными группами активированных генов были гены защитного ответа. Других исследований аутоиммунных мутантов с использованием метода секвенирования РНК и детальным анализом транскриптома мы не обнаружили. Однако и этого сравнения достаточно, чтобы утверждать, что мутации *parg1 exa1* приводят к глобальному перепрограммированию генома, уровень которого сопоставим с таковым и даже превышает его при мутации в гене-эпигенетическом регулято-

ре. Полученные результаты указывают на новую и важную роль генов *PARG1* и *EXA1* в негативной регуляции ИО. Поскольку гены участвуют в контроле уровня поли(АДФ-рибозилирования) белков (*PARG1*) и деградации аномальных вариантов РНК (*EXA1*), можно предположить, что активация защитного ответа может быть результатом вызванного мутациями накопления высокого уровня поли(АДФ-рибозы) и аномальных мРНК, которые могут быть токсичными для клеток.

Особенности ИО, вызванного мутациями *parg1* и *exa1*. Проведенный ранее общий анализ транскриптомов мутанта и ДТ, а также изучение обогащения списков ДЭГ категориями Gene Ontology (GO), показал, что у мутанта среди активированных генов наблюдается перепредставленность категориями, связанными с ответом на самые разные стрессоры: бактерии, грибы, вирусы, насекомые, гипоксия, солевой стресс, окислительный стресс, недостаток влаги, жара и холод [34]. Отсутствие специфичности в проявлении защитного ответа подтверждается и обнаруженной в данной работе активацией у мутанта 10 типов рецепторов, которые связываются с разными лигандами.

На неспецифичность ответа указывает и одновременная активация у мутанта генов, контролирующих синтез и сигнальный путь двух главных стрессовых гормонов. Это путь СК, который анализировался в данной работе, и путь ЖК, анализ которого проведен ранее [34]. Одновременная активация конкурирующих сигнальных путей ЖК и СК указывает на особенность ИО, вызванного одновременным присутствием в гомозиготе мутаций *parg1* и *exa1*.

Еще одной особенностью ИО, связанной с мутациями *parg1* и *exa1*, является присутствие в транскриптоме мутанта активированных генов — негативных регуляторов ИО, действующих на разных этапах развития иммунного ответа. Это 7 генов Ca^{2+} -каналов, выкачивающих Ca^{2+} из цитозоля в вакуоли [56], и два гена кальмодулин-подобных белков CML46 и CML47, которые, в отличие от других белков CLM и CML, не активируют, а подавляют [71] уровень экспрессии центрального кальмодулин-связывающего ТФ СВР60g, активирующего транскрипцию генов синтеза СК и генов семейства EDS1 [20]. Негативные регуляторы клеточной смерти — гены *CAD1*, *NSL1*, *LSD1* — подавляют ИО, зависимый от СК [69, 64]. Ген *EDR1* препятствует нормальной сборке комплекса белков семейства EDS1 [65], а гены гидролаз DLO/S3H и DMR6 снижают уровень СК, превращая ее в 2,3-дигидроксibenзойную кислоту [66, 67]. Таким образом, одновременно с активацией генов, усиливающих ИО (гены рецепторов ИО, гены сигнальных путей Ca^{2+} , АФК, СК, ЖК, гены EDS и клеточной смерти), активируется транскрипция генов, способных снизить уровень ИО. Можно предполагать, что уникаль-

ная особенность фенотипа мутанта *parg1 exa1* — его способность к регенерации — обусловлена работой негативных регуляторов ИО.

Изучение аутоиммунного двойного мутанта *parg1 exa1* проведено впервые, хотя ранее проводили исследования одиночных мутантов резуховидки *parg1* или *exa1*. Было показано, что только после воздействия генотоксикантов или патогенов (или их эффекторов) одиночные мутанты проявляют выраженную клеточную смерть в листьях [40, 39]. Видимого усиления ИО в отсутствие стрессоров у одиночных мутантов *parg1* не наблюдалось [37, 39]. Изучение транскриптома листьев мутанта *parg1* и растений ДТ с помощью микрочипов выявило только 128 ДЭГ, среди которых было 10 генов рецепторов NLR с повышенной экспрессией [72]. Транскриптом мутантов *exa1* не исследовался. В то же время, в растениях мутантов *exa1* обнаружен повышенный уровень экспрессии генов *PR1* [40], *PR1*, *PR2* [41] и *PR5* [73], указывающих на проявление аутоиммунитета. Кроме того, обнаружено накопление белка (но не мРНК) четырех генов рецепторов NLR, что позволило предположить, что белок EXA1, взаимодействуя с фактором инициации трансляции eIF4E, может блокировать трансляцию NLR мРНК, предотвращая аутоиммунитет [41].

Мутации *parg1* и *exa1*, обнаруженные у мутанта *tae*, получены на кафедре генетики МГУ, и они отличаются по характеру генетических нарушений от ранее исследованных [34]. Тем не менее, растения, гомозиготные по одной из мутаций *parg1* или *exa1*, не отличаются от ДТ. Фенотипические изменения (суженный лист, клеточная смерть по краю листа, возврат клеток к плюрипотентному состоянию и образование эктопических выростов) обнаруживаются только у двойного мутанта, что указывает на синергистическое взаимодействие генов

PARG1 и *EXA1* в контроле ИО у растений ДТ. На каком уровне может осуществляться взаимодействие генов *PARG1* и *EXA1*, пока не известно.

Заключение

Проведенный в данной работе анализ транскриптома показал, что растения двойного мутанта резуховидки *parg1 exa1* проявляют мощный аутоиммунитет. Это выражается в активации транскрипции всех основных групп генов, участвующих в развитии иммунитета растений, включая гены мембранных и ядерно-цитоплазматических иммунных рецепторов, Ca^{2+} -проводящих каналов и Ca^{2+} -сигналинга, гены, связанные с образованием АФК, сигнальными путями стрессовых гормонов, клеточной смертью и пр.

В отличие от других аутоиммунных мутантов, у исследованного в данной работе мутанта отсутствует специфичность в проявлении защитного ответа, о чем свидетельствует повышение транскрипции 10 типов рецепторов, которые распознают разные лиганды, а также одновременная активация конкурирующих сигнальных путей ЖК и СК.

Таким образом, впервые установлено, что ген *PARG1* (способствует выживанию клеток в условиях генотоксического стресса, снижая уровень поли(АДФ-рибозы)) и ген *EXA1* (участвует в нонсенс-опосредованном распаде мРНК) играют важную роль регуляторов иммунного ответа. Они ограничивают уровень ИО, независимо от причины, вызвавшей активацию иммунитета.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №19-04-00149_а). Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Böhm H., Albert I., Fan L., Reinhard A., Nürnberger T. Immune receptor complexes at the plant cell surface. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2014;20:47–54.
2. de Azevedo E., Manhães A.M., Ortiz-Moreno F.A., He P., Shan L. Plant plasma membrane-resident receptors: Surveillance for infections and coordination for growth and development. *J. Integr. Plant Biol.* 2021;63(1):79–101.
3. Maruta N., Burdett H., Lim B.Y.J., Hu X., Desai S., Manik M.K., Kobe B. Structural basis of NLR activation and innate immune signalling in plants. *Immunogenetics.* 2022;74(1):5–26.
4. Lüdke D., Yan Q., Rohmann P.F., Wiermer M. NLR we there yet? Nucleocytoplasmic coordination of NLR-mediated immunity. *New Phytol.* 2022;236(1):24–42.
5. Zhang B., Liu M., Wang Y., Yuan W., Zhang H. Plant NLRs: Evolving with pathogen effectors and engineerable to improve resistance. *Front. Microbiol.* 2022;13:1018504.
6. Marcec M.J., Gilroy S., Poovaiah B.W., Tanaka K. Mutual interplay of Ca^{2+} and ROS signaling in plant immune response. *Plant Sci.* 2019;283:343–354.
7. Xu G., Moeder W., Yoshioka K., Shan L. A tale of many families: calcium channels in plant immunity. *Plant Cell.* 2022;34(5):1551–1567.
8. Köster P., DeFalco T.A., Zipfel C. Ca^{2+} signals in plant immunity. *EMBO J.* 2022;41(12):e110741.
9. Bi G., Su M., Li N., Liang Y., Dang S., Xu J., Hu M., Wang J., Zou M., Deng Y., Li Q., Huang S., Li J., Chai J., He K., Chen Y.H., Zhou J.M. The ZAR1 resistosome is a calcium-permeable channel triggering plant immune signaling. *Cell.* 2021;184(13):3528–3541.
10. Jacob P., Kim N.H., Wu F., El-Kasbi F., Chi Y., Walton W.G., Furzer O.J., Lietzan A.D., Sunil S., Kempthorn K., Redinbo M.R., Pei Z.M., Wan L., Dangl J.L. Plant “helper” immune receptors are Ca^{2+} -permeable nonselective cation channels. *Science.* 2021;373(6553):420–425.

11. Allan C., Morris R.J., Meisrimler C.N. Encoding, transmission, decoding, and specificity of calcium signals in plants. *J. Exp. Bot.* 2022;73(11):3372–3385.
12. Galon Y., Finkler A., Fromm H. Calcium-regulated transcription in plants. *Mol. Plant.* 2010;3(4):653–669.
13. Ren H., Zhang Y., Zhong M., Hussian J., Tang Y., Liu S., Qi G. Calcium signaling-mediated transcriptional reprogramming during abiotic stress response in plants. *Theor. Appl. Genet.* 2023;136(10):210.
14. Kimura S., Hunter K., Vaahtera L., Tran H.C., Citterico M., Vaattovaara A., Rokka A., Stolze S.C., Harzen A., Meißner L., Wilkens M.M.T., Hamann T., Toyota M., Nakagami H., Wrzaczek M. CRK2 and C-terminal phosphorylation of NADPH oxidase RBOHD regulate reactive oxygen species production in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2020;32(4):1063–1080.
15. Bourdais G., Burdiak P., Gauthier A., Nitsch L., Salojärvi J., Rayapuram C., Idänheimo N., Hunter K., Kimura S., Merilo E., Vaattovaara A., Oracz K., Kaufholdt D., Pallon A., Anggoro D.T. et al. Large-scale phenomics identifies primary and fine-tuning Roles for CRKs in responses related to oxidative stress. *PLoS Genet.* 2015;11(7):e1005373.
16. Rentel M.C., Lecourieux D., Ouaked F., Usher S.L., Petersen L., Okamoto H., Knight H., Peck S.C., Grierson C.S., Hirt H., Knight M.R. OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature.* 2004;427(6977):858–861.
17. Dietz K.J. Redox regulation of transcription factors in plant stress acclimation and development. *Antioxid. Redox. Signal.* 2014;21(9):1356–1372.
18. He H., Breusegem F., Mhamdi A. Redox-dependent control of nuclear transcription in plants. *J. Exp. Bot.* 2018;69(14):3359–3372.
19. Мацкевич В.С., Самохина В.В., Гриусевич П.В., Войтехович М.А., Соколик А.И., Демидчик В.В. Ca²⁺-проницаемые катионные каналы плазматической мембраны клеток высших растений. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2018;2:11–26.
20. Sun T., Zhang Y., Li Y., Zhang Q., Ding Y., Zhang Y. ChIP-seq reveals broad roles of SARD1 and CBP60g in regulating plant immunity. *Nat. Commun.* 2015;6(1):1.
21. Cui H., Gobbato E., Kracher B., Qiu J., Bautor J., Parker J.E. A core function of EDS1 with PAD4 is to protect the salicylic acid defense sector in *Arabidopsis* immunity. *New Phytol.* 2017;213(4):1802–1817.
22. Rekhter D., Lüdke D., Ding Y., Feussner K., Zienkiewicz K., Lipka V., Wiermer M., Zhang Y., Feussner I. Isochorismate-derived biosynthesis of the plant stress hormone salicylic acid. *Science.* 2019;365(6452):498–502.
23. Wang Z., Liu X., Yu J., Yin S., Cai W., Kim N.H., El Kasmí F., Dangel J.L., Wan L. Plasma membrane association and resistosome formation of plant helper immune receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2023;120(32):e2222036120.
24. Saleem M., Fariduddin Q., Castroverde C.D.M. Salicylic acid: A key regulator of redox signalling and plant immunity. *Plant Physiol. Biochem.* 2021;168:381–397.
25. Zhang N., Zhou S., Yang D., Fan Z. Revealing shared and distinct genes responding to JA and SA signaling in *Arabidopsis* by meta-analysis. *Front. Plant Sci.* 2020;11:908.
26. Zhou J.M., Zhang Y. Plant immunity: danger perception and signaling. *Cell.* 2020;181(5):978–989.
27. Balakireva A.V., Zamyatnin A.A. Cutting out the gaps between proteases and programmed cell death. *Front. Plant Sci.* 2019;10:704.
28. Kovács J., Poór P., Szepesi Á., Tari I. Salicylic acid induced cysteine protease activity during programmed cell death in tomato plants. *Acta Biol. Hung.* 2016;67(2):148–158.
29. Robert-Seilanianantz A., Grant M., Jones J.D. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2011;49:317–343.
30. Zhang Y., Li X. Salicylic acid: biosynthesis, perception, and contributions to plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2019;50:29–36.
31. Yang J., Duan G., Li C., Liu L., Han G., Zhang Y., Wang, C. The crosstalks between jasmonic acid and other plant hormone signaling highlight the involvement of jasmonic acid as a core component in plant response to biotic and abiotic stresses. *Front. Plant Sci.* 2019;10:1349.
32. Chakraborty J., Ghosh P., Das S. Autoimmunity in plants. *Planta.* 2018;248(4):751–767.
33. Freh M., Gao J., Petersen M., Panstruga R. Plant autoimmunity-fresh insights into an old phenomenon. *Plant Physiol.* 2022;188(3):1419–1434.
34. Kupriyanova E., Manakhov A., Ezhova T. *PARG1* and *EXA1* genes as possible components of the facultative epigenetic control of plant development. *Physiol. Plant.* 2023;175(4):e13959.
35. Kupriyanova E.V., Denisova E.R., Baier M.A., Ezhova T.A. Differences in the manifestation of cell pluripotency *in vivo* and *in vitro* in the mutant *Arabidopsis thaliana* with the phenotype of cell memory disorder. *Russ. J. Plant Physiol.* 2021;68(1):46–55.
36. Adams-Phillips L., Briggs A.G., Bent A.F. Disruption of poly(ADP-ribosylation) mechanisms alters responses of *Arabidopsis* to biotic stress. *Plant Physiol.* 2010;152(1):267–280.
37. Feng B., Liu C., de Oliveira M.V., Intorne A.C., Li B., Babilonia K., de Souza Filho G.A., Shan L., He P. Protein poly(ADP-ribosylation) regulates *Arabidopsis* immune gene expression and defense responses. *PLoS Genet.* 2015;11:e1004936.
38. Li G., Nasar V., Yang Y., Li W., Liu B., Sun L., Li D., Song F. *Arabidopsis* poly(ADP-ribose) glycohydrolase 1 is required for drought, osmotic and oxidative stress responses. *Plant Sci.* 2011;180(2):283–291.
39. Zhang H., Gu Z., Wu Q., Yang L., Liu C., Ma H., Xia Y., Ge X. *Arabidopsis* PARG1 is the key factor promoting cell survival among the enzymes regulating post-translational poly(ADP-ribosylation). *Sci. Rep.* 2015;5:15892.
40. Matsui H., Nomura Y., Egusa M., Hamada T., Hyon G.S., Kaminaka H., Watanabe Y., Ueda T., Trujillo M., Shirasu K., Nakagami H. The GYF domain protein PSIG1 dampens the induction of cell death during plant-pathogen interactions. *PLoS Genet.* 2017;13:e1007037.
41. Wu Z., Huang S., Zhang X., Wu D., Xia S., Li X. Regulation of plant immune receptor accumulation through translational repression by a glycine-tyrosine-phenylalanine (GYF) domain protein. *eLife.* 2017;6:e23684.
42. Tian T., Liu Y., Yan H., You Q., Yi X., Du Z., Xu W., Su Z. agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(W1):W122–W129.
43. Sun Y., Qiao Z., Muchero W., Chen J.G. Lectin receptor-like kinases: the sensor and mediator at the plant cell surface. *Front. Plant Sci.* 2020;11:596301.
44. Liu L., Liu J., Xu N. Ligand recognition and signal transduction by lectin receptor-like kinases in plant immunity. *Front. Plant Sci.* 2023;14:1201805.

45. Verica J.A., He Z.H. The cell wall-associated kinase (*WAK*) and *WAK*-like kinase gene family. *Plant Physiol.* 2002;129(2):455–459.
46. Zhang Z., Huo W., Wang X., Ren Z., Zhao J., Liu Y., He K., Zhang F., Li W., Jin S., Yang D. Origin, evolution, and diversification of the wall-associated kinase gene family in plants. *Plant Cell Rep.* 2023;42(12):1891–1906.
47. Yamaguchi Y., Huffaker A., Bryan A.C., Tax F.E., Ryan C.A. PEPR2 is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2010;22(2):508–522.
48. Invernizzi M., Hanemian M., Keller J., Libourel C., Roby D. PERKing up our understanding of the proline-rich extensin-like receptor kinases, a forgotten plant receptor kinase family. *New Phytol.* 2022;235(3):875–884.
49. Martín-Dacal M., Fernández-Calvo P., Jiménez-Sandoval P., López G., Garrido-Arandía M., Rebaque D., Del Hierro I., Berlanga D.J., Torres M.Á., Kumar V., Mérida H., Pacios L.F., Santiago J., Molina A. *Arabidopsis* immune responses triggered by cellulose- and mixed-linked glucan-derived oligosaccharides require a group of leucine-rich repeat lectin receptor kinases. *Plant J.* 2023;113(4):833–850.
50. Wan J., Tanaka K., Zhang X.C., Son G.H., Brechenmacher L., Nguyen T.H., Stacey G. LYK4, a lysin motif receptor-like kinase, is important for chitin signaling and plant innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2012;160(1):396–406.
51. Stokes K.D., Gururaj Rao A. Dimerization properties of the transmembrane domains of *Arabidopsis* CRINKLY4 receptor-like kinase and homologs. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008;477(2):219–226.
52. Ortiz-Moreno F.A., Liu J., Shan L., He P. Lectin-like receptor kinases as protector deities in plant immunity. *Nat. Plants.* 2022;8(1):27–37.
53. Hernandez-Coronado M., Araujo P.C.D., Ip P.L., Nunes C.O., Rahni R., Wudick M.M., Lizzio M.A., Feijo J.A., Birnbaum K.D. Plant glutamate receptors mediate a bet-hedging strategy between regeneration and defense. *Dev. Cell.* 2022;57(4):451–465.
54. Acevedo-Garcia J., Kusch S., Panstruga R. Magical mystery tour: MLO proteins in plant immunity and beyond. *New Phytol.* 2014;204(2):273–281.
55. Wu X., Wang Y., Bian Y., Ren Y., Xu X., Zhou F., Ding H. A critical review on plant annexin: Structure, function, and mechanism. *Plant Physiol. Biochem.* 2022;190:81–89.
56. Wang C., Luan S. Calcium homeostasis and signaling in plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2024;77:102485.
57. Saile S.C., El Kasmi F. Small family, big impact: RNL helper NLRs and their importance in plant innate immunity. *PLoS Pathog.* 2023;19(4):e1011315.
58. Membré N., Bernier F., Staiger D., Berna A. *Arabidopsis thaliana* germin-like proteins: common and specific features point to a variety of functions. *Planta.* 2000;211(3):345–354.
59. Rawat A.A., Hartmann M., Harzen A., Luan R., Stolze S.C., Forzani C., Abts L., Reißweber S., Rayapuram N., Nakagami H., Zeier J., Hirt H. OXIDATIVE SIGNAL-INDUCIBLE1 induces immunity by coordinating N-hydroxy-pipecolic acid, salicylic acid, and camalexin synthesis. *New Phytol.* 2023;237(4):1285–1301.
60. Lefevre H., Bauters L., Gheysen G. Salicylic acid biosynthesis in plants. *Front. Plant Sci.* 2020;11: 338.
61. Yoo S.J., Choi H.J., Noh S.W., Cecchini N.M., Greenberg J.T., Jung H.W. Genetic requirements for infection-specific responses in conferring disease resistance in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 2022;13:1068438.
62. Wild M., Achard P. The DELLA protein RGL3 positively contributes to jasmonate/ethylene defense responses. *Plant Signal. Behav.* 2013;8(4):e23891.
63. Hunter L.J., Westwood J.H., Heath G., Macaulay K., Smith A.G., Macfarlane S.A., Palukaitis P., Carr J.P. Regulation of RNA-dependent RNA polymerase 1 and isochorismate synthase gene expression in *Arabidopsis*. *PLoS One.* 2013;8(6):e66530.
64. Bernacki M.J., Rusaczek A., Czarnocka W., Karpiński S. Salicylic acid accumulation controlled by LSD1 is essential in triggering cell death in response to abiotic stress. *Cells.* 2021;10(4):962.
65. Neubauer M., Serrano I., Rodibaugh N., Bhandari D.D., Bautor J., Parker J.E., Innes R.W. *Arabidopsis* EDR1 protein kinase regulates the association of EDS1 and PAD4 to inhibit cell death. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2020;33(4):693–703.
66. Zhang K., Halitschke R., Yin C., Liu C.J., Gan S.S. Salicylic acid 3-hydroxylase regulates *Arabidopsis* leaf longevity by mediating salicylic acid catabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013;110(36):14807–14812.
67. Zhang Y.J., Zhao L., Zhao J.Z., Li Y.J., Wang J.B., Guo R., Gan S.S., Liu C.J., Zhanga K.W. S5H/DMR6 encodes a salicylic acid 5-hydroxylase that fine-tunes salicylic acid homeostasis. *Plant Physiol.* 2017;175(3):1082–1093.
68. Zhang B., Van Aken O., Thatcher L., De Clercq I., Duncan O., Law S.R., Murcha M.W., van der Merwe M., Seifi H.S., Carrie C., Cazzonelli C., Radomiljac J., Höfte M., Singh K.B., Van Breusegem F., Whelan J. The mitochondrial outer membrane AAA ATPase AtOM66 affects cell death and pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2014;80(4):709–727.
69. Holmes D.R., Bredow M., Thor K., Pascetta S.A., Sementchoukova I., Siegel K.R., Zipfel C., Monaghan J. A novel allele of the *Arabidopsis thaliana* MACPF protein CAD1 results in deregulated immune signaling. *Genetics.* 2021;217:iyab022.
70. Lv S., Yang Y., Yu G., Peng L., Zheng S., Singh S.K., Vilchez J.I., Kaushal R., Zi H., Yi D., Wang Y., Luo S., Wu X., Zuo Z., Huang W., Liu R., Du J., Macho A.P., Tang K., Zhang H. Dysfunction of histone demethylase IBM1 in *Arabidopsis* causes autoimmunity and reshapes the root microbiome. *ISME J.* 2022;16(11):2513–2524.
71. Lu Y., Truman W., Liu X., Bethke G., Zhou M., Myers C.L., Katagiri F., Glazebrook J. Different modes of negative regulation of plant immunity by calmodulin-related genes. *Plant Physiol.* 2018;176(4):3046–3061.
72. Briggs A.G., Adams-Phillips L.C., Keppler B.D., Zebell S.G., Arend K.C., Apfelbaum A.A., Smith J.A., Bent A.F. A transcriptomics approach uncovers novel roles for poly(ADP-ribosylation) in the basal defense response in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One.* 2017;12:e0190268.
73. Hashimoto M., Neriya Y., Keima T., Iwabuchi N., Koinuma H., Hagiwara-Komoda Y., Ishikawa K., Himeno M., Maejima K., Yamaji Y., Namba S. EXA1, a GYF domain protein, is responsible for loss-of-susceptibility to plantago asiatica mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2016;88(1):120–131.

Поступила в редакцию 10.04.2024

После доработки 01.10.2024

Принята в печать 12.12.2024

RESEARCH ARTICLE

PARG1 and *EXA1* interacting genes are important regulators of autoimmunity in plants

E.V. Kupriyanova^{1,*} , K.A. Manakhova², T.A. Ezhova¹ 

¹Department of Genetics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Center of Genetics and Life Science, Sirius University of Science and Technology, Sirius, Sochi, Krasnodar region, 354340, Russia

*e-mail: ekupriyanova@gmail.com

Studies were performed on the *Arabidopsis* double mutant plants *parg1 exa1* characterized by cell death along the leaf margin, activation of expression of immune receptor genes, PR-genes and hypersensitive response genes, which is a sign of autoimmunity. At the same time, unlike other autoimmunity mutations, the *parg1 exa1* mutant demonstrated the acquisition of pluripotency by leaf cells and the ability to regenerate new leaf margins. Because of the unusual phenotype, this study analyzed in depth the transcriptome of young leaves of mutant and wild-type plants. The mutant was found to have increased expression levels of all major components of the immune response, including genes for Ca²⁺ conducting channels, NADPH oxidases, salicylic acid synthesis genes, jasmonic acid, and many others. The findings suggest that *PARG1* and *EXA1* genes, which control the level of poly(ADP-ribosylation) and the process of nonsense-mediated RNA degradation, respectively, are important regulators of the immune response. Their function is essential to prevent overactivation of defense systems in plants.

Keywords: *Plant autoimmunity, transcriptome, immune receptors, salicylic acid, cell death, mutations*

Funding: The research was funded by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 19-04-00149_a).

Сведения об авторах

Куприянова Евгения Владимировна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры генетики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-90; e-mail: ekupriyanova@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8106-5911>

Ежова Татьяна Анатольевна — докт. биол. наук, проф. кафедры генетики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-90; e-mail: ezhova2001@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5816-3051>

Манахова Карина Айратовна — науч. сотр. (направление «Генетика») научного центра генетики и наук о жизни Научно-технологического университета Сириус. Тел.: 8-800-100-41-55; manakhova.ka@talantiuspeh.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7405-1914>