

УДК 581.1

АЛЬФА- И БЕТА-ЭКСПАНСИНЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕСЯ В РАЗЛИЧНЫХ ЗОНАХ РАСТУЩЕГО КОРНЯ КУКУРУЗЫ¹

© 2024 г. Т. А. Горшкова^{a,*}, Н. В. Шилова^b, Л. В. Козлова^{a,c}, О. В. Горшков^a,
А. Р. Назипова^a, А. Р. Агълмова^a, С. М. Полякова^b, А. Ю. Нокель^b, В. В. Головченко^d,
П. В. Микшина^a, О. А. Патова^d, Н. В. Бовин^b

^aКазанский институт биохимии и биофизики Федерального исследовательского центра
“Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

^bГНЦ Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова
Российской академии наук, Москва, Россия

^cЛаборатория механики и гражданской инженерии, Университет Монпелье,
Национальный центр научных исследований, Монпелье, Франция

^dИнститут физиологии Федерального исследовательского центра Коми научного центра
Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

*e-mail: gorshkova@kibb.knc.ru

Поступила в редакцию 31.08.2023 г.

После доработки 03.10.2023 г.

Принята к публикации 10.10.2023 г.

Экспансины — низкомолекулярные белки, играющие ключевую роль в модификации структуры клеточной стенки в ходе различных физиологических процессов, в частности роста клеток растяжением. Экспансины кодируются большим мультигенным семейством и подразделяются на четыре подсемейства, основными из которых являются альфа- и бета-экспансины; последние получили особое развитие у злаков. Считается, что экспансины модифицируют взаимодействия целлюлозы с ксилоглюканом (альфа-экспансины) или с арабиноксиланом (бета-экспансины). При этом экспансины не обладают каталитической активностью, конкретный механизм их действия неясен, непонятно физиологическое значение столь большого разнообразия изоформ. Для изучения характера экспрессии отдельных экспансинов мы провели транскриптомный анализ всех идентифицированных в геноме кукурузы генов экспансинов, используя удобную модельную систему — зоны растущего первичного корня кукурузы, различающиеся по стадии развития клеток и составу их клеточных стенок. Из 91 гена экспансинов кукурузы в корне экспрессировались 67, причем для большинства генов экспансинов был характерен узкий диапазон зон с максимальным уровнем транскриптов. С применением сконструированного гликоэрея, содержащего 183 полисахарида из клеточных стенок растений различных видов, показано, что рекомбинантные экспансины AtEXPA1 и AtEXPV1 способны связываться с арабиногалактанами и рамногалактуронами I и рядом других полисахаридов клеточных стенок, что расширяет список их потенциальных углеводных мишеней. Продемонстрированы различия в специфичности взаимодействия альфа- и бета-экспансинов с различными полисахаридами, как в количественном, так и в качественном отношении. Выдвинута гипотеза, что многочисленность экспансинов в одном растительном организме и тонкая регуляция их экспрессии объясняются, по крайней мере отчасти, спецификой связывания индивидуальных экспансинов с конкретными полисахаридами клеточной стенки.

Ключевые слова: Zea mays, гликоэрей, клеточная стенка, корень, полисахариды, транскриптомика, экспансины

DOI: 10.31857/S0015330324020043, EDN: OVUMQA

ВВЕДЕНИЕ

Современные представления о механизмах роста растяжением клеток растений — важнейшего морфогенетического процесса в развитии растительного организма — рассматривают в ка-

честве ключевых молекулярных игроков экспансины — белки клеточной стенки, которые за счет непонятого пока механизма способны увеличивать растяжимость клеточной стенки [1]. Так, при локальной индукции в апикальной меристеме гена экспансина происходит увеличение растяжимости ткани в месте воздействия, изменение филлотаксиса и формирование ново-

¹ Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0015330324020043

го листа в “неположенном” месте [2]. Известно также, что некоторые альфа-экспансины особенно активно экспрессируются в тех органах и тканях, которые приступают к активному росту [3]. Множество других примеров участия отдельных изоформ экспансинов в морфогенезе растений могут быть найдены в недавнем обзоре М. Samalova с соавт. [4]. При этом у экспансинов не выявлена гидролитическая активность; они не изменяют ковалентную структуру полимеров и, как правило, не снижают прочность клеточной стенки [1, 5].

Экспансины – низкомолекулярные (около 27 кДа) белки – кодируются в геномах различных растений большими мультигенными семействами, насчитывающими многие десятки генов, и подразделяются на два основных подсемейства – альфа- и бета-экспансины, которые обозначаются, соответственно, EXPA и EXPB, а также менее представленные экспансин-подобные белки – EXLA и EXLB [6, 7]. Оба основных подсемейства представлены во всех проанализированных таксонах наземных растений; бета-экспансины получили особое распространение у злаков [8]. Часть бета-экспансинов известна как аллергены пыльцы злаков; они исключительно высоко экспрессируются и могут составлять 0.1% от сухой массы пыльцы или 4% всего экстрагируемого белка [9]. Другие экспансины присутствуют в клеточной стенке в очень низких количествах; приводятся величины порядка 0.02% от сухой массы клеточной стенки, что в молодых тканях, анализировавшихся в указанной работе, должно составлять тысячные доли процента от общей сухой массы [5].

Экспансины – единственные белковые агенты, способные за секунды увеличивать растяжимость растительных тканей [10]. Более того, эти белки также способны увеличивать растяжимость фильтровальной бумаги – целлюлозного материала, далекого от состояния *in planta* [5]. Считается, что воздействие экспансинов происходит в “горячих точках” – местах, где микрофибриллы целлюлозы находятся в тесном контакте друг с другом, формируя тем самым несущий каркас растительной клеточной стенки [11]. Однако действие экспансинов в клеточной стенке обычно связывают не только с микрофибриллами целлюлозы, но и с конкретными полисахаридами матрикса. В частности, установлено, что действие альфа-экспансинов усиливается при наличии ксилоглюкана [12]. Показано, что бета-экспансины взаимодействуют с глюкуроноарабиноксиланом [13]. При этом, остаются неясными не только непосредственные механизмы действия экспансинов, но и сопряженные вопросы о том, почему экспансинов так много, и с чем связана их выраженная дифференциальная экспрессия.

Появление различных омиксных технологий позволяет провести всеобъемлющий анализ экспрессии генов экспансинов в физиологически отличающихся растительных тканях, а также выявить и оценить особенности связывания альфа- и бета-экспансинов с разнообразными полисахаридами клеточных стенок. Для масштабной характеристики экспрессирующихся экспансинов мы использовали модельную систему первичного корня кукурузы, в котором были выделены пять различных зон, содержащих клетки на последовательных стадиях развития [14, 15]. Для каждой из зон ранее охарактеризованы механические свойства клеточных стенок и набор полисахаридов, а также проанализирована экспрессия генов гликозилтрансфераз и гликозидгидролаз, обеспечивающих формирование и модификацию полисахаридного ансамбля в ходе развития [15–17]. Для изучения способности альфа- и бета-экспансинов к связыванию с компонентами клеточных стенок использован недавно сконструированный нами полисахаридный гликоэrray [18]. Этот подход позволил нам продемонстрировать, что экспансины могут связываться с рамногалактуронами I и арабиногалактанами, и что разные экспансины отличаются по наборам полисахаридов-мишеней. Совокупность полученных данных позволила выдвинуть гипотезу, что многочисленность изоформ экспансинов в одном растительном организме и тонкая регуляция их экспрессии может быть обусловлена спецификой связывания индивидуальных экспансинов с конкретными полисахаридами клеточной стенки, набор которых в свою очередь отличается в разных органах и тканях, а также на разных стадиях развития клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Исследования проводили на корнях 5-дневных проростков кукурузы (*Zea mays* L.), сорт Машук (Нива Татарстана, Казань, Россия), выращенных в темноте при 27°C. Первичный корень проростка был разделен лезвием на зоны по следующей схеме: корневой чехлик, меристема (0–1 мм, считая от соединения корня с чехликом), зона раннего растяжения (1–2 мм), активного растяжения (2–6 мм) и позднего растяжения (7–10 мм) (рис. 1). Распределение зон соответствует опубликованным ранее работам Kozlova с соавт. [15, 19] и дополнительно верифицировано путем измерения длин клеток коры и ризодермы.

Идентификация генов, кодирующих экспансины, и их филогенетический анализ. Гены экспансинов кукурузы были найдены в базе данных EnsemblPlants (<http://plants.ensembl.org/index>).

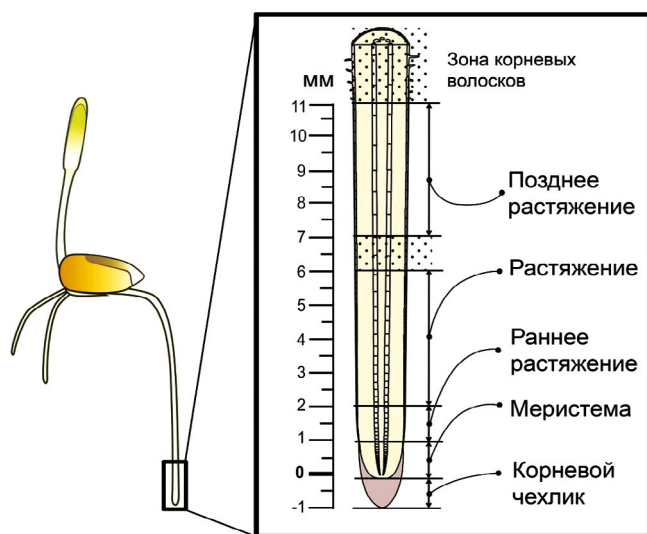


Рис. 1. Схема деления кончика первичного корня 5-дневного проростка кукурузы на зоны для анализа транскриптомов. Точками покрыты зоны корня, которые не использовались для анализа.

html) (дата доступа 20 ноября 2019 г.) и определены по наличию в последовательностях соответствующих белков одновременно двух Pfam доменов (<http://pfam.xfam.org/>): N-концевого домена DPBV (PF03330) и C-концевого бета-сэндвич домена CBM63 (PF01357) [20–22]. Гены экспансинов риса (*Oryza sativa* L., японская группа) и резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), использованные для сопоставления, были найдены в базе данных Phytozome12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) (дата доступа 20 ноября 2019 г.) также по наличию двух доменов, характерных для экспансинов [23].

Аминокислотные последовательности, кодируемые выявленными генами экспансинов, подвергали множественному выравниванию алгоритмом Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) [24]. Полученное выравнивание подвергли филогенетическому анализу методом максимального подобия в программе IQ-TREE 1.6.9 [25]. Расчет наиболее подходящей модели эволюции последовательности выполнялся с помощью функции ModelFinder (IQ-TREE 1.6.9) [26]. Наиболее подходящая модель имела самое низкое значение байесовского информационного критерия. Статистическая достоверность выделения ветвей была рассчитана с помощью алгоритма сверхбыстрой аппроксимации филогенетического бутстрепа с использованием 10000 повторов [27]. Дендрограмма была визуализирована с помощью веб-сервиса iTOL 5.3 (<https://itol.embl.de/>), затем отредактирована в графическом редакторе Adobe Illustrator CC 2017 (“Adobe Systems”, США) [28].

Транскриптомный анализ экспрессии генов экспансинов в различных зонах растущего корня кукурузы. Библиотеки мРНК из пяти зон первичного корня кукурузы в четырех повторностях каждая были секвенированы с использованием платформы Illumina NovaSeq 6000 в режиме парноконцевого прочтения с длиной ряда 150 нуклеотидов на базе Novogene Corporation (Китай, <https://en.novogene.com/>) и размещены в системе SRA (Sequence Read Archive) в виде данных BioProject с идентификатором PRJNA639682 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA639682>). После контроля качества парных прочтений отфильтрованные пулы ридов (короткие последовательности ДНК) каждого образца были картированы на геном кукурузы (версия сборки генома кукурузы B73 RefGen_v4, загружена из базы данных Gramene (https://ensembl.gramene.org/Zea_mays/Info/Index) с использованием программы HISAT2 v2.1 [29]. Для подсчета количества прочтений, выровненных на каждый ген, использовали алгоритм Stringtie v2.0 [30]. Нормализацию значений уровня экспрессии генов проводили с использованием пакета DESeq2 в программной среде R (<https://www.R-project.org/>) [31]. Ген считался экспрессируемым, если среднее (по повторностям) нормализованное значение TGR (total gene reads; общее число прочтений, приходящихся на ген) хотя бы в одном образце было больше или равнялось 16, в соответствии с рекомендациями [32].

Рекомбинантные экспансины, использованные для оценки их связывания с полисахаридами клеточных стенок с помощью гликоэкреев и твердофазного иммуоферментного анализа. Для сопоставления характера связывания альфа- и бета-экспансинов с полисахаридами клеточной стенки использовали коммерчески доступные рекомбинантные белки *Arabidopsis thaliana* (“MyBioSource”, США): MBS1412737 — Expansin-A1 (EXPA1) как альфа-экспансин и MBS1443426 — Expansin-B1 (EXPB1) как бета-экспансин. Использованный для анализа альфа-экспансин (UniProt# Q9C554, TAIR# At1g69530, мол. массой 26518 Да) экспрессирован в дрожжах, имеет 10xHis-tag на N-конце и Myc-tag на C-конце; бета-экспансин (UniProt# Q9SKU2, TAIR# At2g20750, MW 29108 Da) экспрессирован в *E. coli*, имеет 6xHis-tag на N-конце. При дальнейшем изложении в статье они обозначаются соответственно AtEXPA1 и AtEXPB1.

Для проверки чистоты препаратов проводили электрофорез на 12% полиакриламидном геле с последующим иммуоблоттингом с антителами мыши, узнающими гистициновую метку (“Bio Rad”, США) (разведение 1 : 5000), и антителами козы, конъюгированными с перок-

сидазой хрена и узнающими иммуноглобулины мыши (“Abscam”, Великобритания) (разведение 1 : 10000). Визуализация полос осуществлялась за счет окисления пероксидазой хемилюминесцентного субстрата люминола в присутствии перекиси и кумаровой кислоты. Результирующая хемилюминесценция детектировалась в системе визуализации ChemiDoc (“Bio Rad”, США).

Гликоэррей для характеристики связывания экспансинов с полисахаридами клеточной стенки растений. Гликоэррей, содержащий 183 полисахарида клеточных стенок растений, а также 29 моно- и олигосахаридов — компонентов использованных полисахаридов и/или типичных лигандов известных растительных лектинов, был напечатан в формате гликочипа как описано у А. Никифоровой с соавт. [18] с использованием эпокси-активированных слайдов СЕМИ-ГЛАС-Эпокси (“Семиотик”, Россия). Каждый лиганд был напечатан в 9 повторах. Полный список лигандов и их характеристика приведены в Дополнительных материалах (Дополнительные материалы, табл. S1). Гликочипы инкубировали в буфере для блокировки (50 мМ этаноламина (“Sigma-Aldrich”, США), 150 мМ борной кислоты (“Люми”, Россия, <https://lumi.spb.ru>), 0.2% (об/об) Tween 20 (“Sigma-Aldrich”, США), pH 8.5) в течение 120 мин при постоянном помешивании при комнатной температуре, после чего два раза промывали фосфатно-солевым буфером (“Эко-Сервис”, Россия), содержащим 0.05% (об/об) Tween 20 (ФСБ — 0.05%). Далее на чипы наносили 1 мл раствора AtEXPA1 или AtEXPB1 с концентрацией 30 мкг/мл в ФСБ — 0.1% и инкубировали 16 ч при 4°C и повышенной влажности. Далее промывали, как описано выше. Затем наносили раствор антител мыши, узнающих His-tag, меченых флуоресцентной меткой Alexa 647 (JacksonImmunoResearch, США), в разведении 1 : 400 в ФСБ — 0.1% и инкубировали 1 ч при 37°C и повышенной влажности. Гликоэррей промывали два раза ФСБ — 0.05% и на конечном этапе — в бидистиллированной воде, а затем высушивали чипы центрифугированием и сканировали (разрешение — 10 мкм) с помощью флуоресцентного ридера InnoScan 1100 AL (“Innopsys”, Франция). Полученные изображения преобразовывали в таблицу Excel с помощью программного обеспечения ScanArray Express 4.0 (“Perkin-Elmer”, США) с использованием метода подстраивающихся колец и GAL-файла. Результаты представляли в виде медианы (по 9 повторам) относительных единиц флуоресценции (RFU), отражающей аффинность и количество углевод-связывающих белков. Сигналы, величины которых были ниже 10% от максимального значения RFU, не рассматривали.

Планшетный твердофазный анализ (пТФА) для ингибиторного анализа связывания отдельных полисахаридов с экспансинами. В лунки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл раствора полисахарида № 15106, показавшего в анализе с использованием гликоэррея высокий уровень связывания и с альфа-, и с бета-экспансинами, 1 мкг/мл в Na-карбонатном буфере (pH 9.6) и инкубировали в течение ночи при 4°C, после чего блокировали их 1% бычьим сывороточным альбумином, BSA (“Sigma-Aldrich”, США) в 10 мМ Tris-HCl (“Хеликон”, Россия) pH 7.4 в течение 1 ч при 37°C и промывали трижды 10 мМ Tris-HCl pH 7.4, содержащем 0.05% Tween20 (“ICN”, США). Затем в лунки вносили 50 мкл раствора ингибиторов — полисахаридов, отобранных по результатам гликоэррея, а также на основе литературных данных (полисахариды №№ 15106, 15148, 15058, 15090 и 15165 согласно нумерации в Дополнительных материалах и ранее опубликованной статье, их характеристика дается при изложении результатов) в двукратном разведении в диапазоне от 20 до 0.3 мкг/мл в 0.1 М фосфатно-цитратном буфере, pH 5.0 и прибавляли туда 50 мкл раствора AtEXPA1 или AtEXPB1 в том же буфере, до конечной концентрации 10 мкг/мл, и инкубировали 1 ч при 37°C и промывали [18]. Затем в лунки планшета вносили 100 мкл раствора анти-His-tag-антител мыши в разведении 1 : 5000 в 10 мМ Tris-HCl pH 7.4, содержащем 0.3% BSA, инкубировали 1 ч при 37°C и промывали как описано выше. После чего прибавляли 100 мкл раствора антител козы, узнающих иммуноглобулины мыши, меченые пероксидазой хрена, в разведении 1 : 7000 в 10 мМ Tris-HCl, pH 7.4, содержащем 0.3% BSA, инкубировали 1 ч при 37°C и промывали. Затем в лунки вносили по 100 мкл 0.04% о-фенилендиамина (“Sigma-Aldrich”, США) и 0.03% H₂O₂ в 0.1 М фосфатно-цитратном буфере, pH 5.0 и останавливали реакцию путем добавления в каждую лунку 50 мкл 1 М раствора H₂SO₄ в воде. Поглощение считывали при 492 нм с помощью планшетного ридера Wallac 1420 Victor 2 (“PerkinElmer”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Идентификация генов экспансинов кукурузы и филогенетический анализ последовательностей соответствующих белков. В геноме кукурузы выявлен 91 ген экспансинов — существенно больше, чем в геномах *A. thaliana* (35 генов) и риса (55 генов). Среди них 45 генов относятся к альфа-экспансином, 43 гена — к бета-экспансином и 3 гена представляют собой альфа-экспансин-подобные белки; генов бета-экспансин-подобных белков в геноме кукурузы не выявлено. Количество бета-экспансинов у кукурузы (43) значительно превышает количество бета-экспансинов (6) и

бета-экспансин-подобных белков (3) у *A. thaliana*, вместе взятых. Филогенетический анализ позволил подразделить выявленные последовательности экспансинов кукурузы на подсемейства и клады и соотнести их с таковыми у риса и *A. thaliana* (рис. 2).

На филогенетическом древе экспансинов четко выделялись различные клады, которые обозначены римскими цифрами (рис. 2): альфа-экспансины кукурузы подразделены нами на 14 основных кладов, а бета-экспансины – на 5. В каждой кладе альфа-экспансинов кукурузы присутствовали также альфа-экспансины риса, а подобные белки *A. thaliana* отсутствовали почти в половине кладов (I–V, XIV). Для бета-экспансинов кукурузы характерна большая специфичность: в I–III кладах отсутствовали гомологи из *A. thaliana*, а I и II клады бета-экспансинов кукурузы хорошо отделялись и от генов риса (рис. 2).

Экспрессия генов экспансинов в различных зонах растущего корня кукурузы. Из 91 гена экспансинов кукурузы в корне экспрессировались 67, причем практически все они имели ярко выраженный дифференциальный характер экспрессии в различных зонах корня, отличающихся по стадии развития клеток (рис. 3). Гены экспансинов, занимающие на древе одну кладу, часто имели сходную динамику количества транскриптов по зонам растягивающегося корня (рис. 3). Например, содержание транскриптов практически всех экспрессирующих представителей клады IV бета-экспансинов, как и клады II альфа-экспансинов, были максимальными в зоне активного растяжения, в то время как транскрипты представителей клады V альфа-экспансинов кукурузы, не имеющих гомологов в *A. thaliana* (рис. 2), обнаруживались только в чехлике (рис. 3).

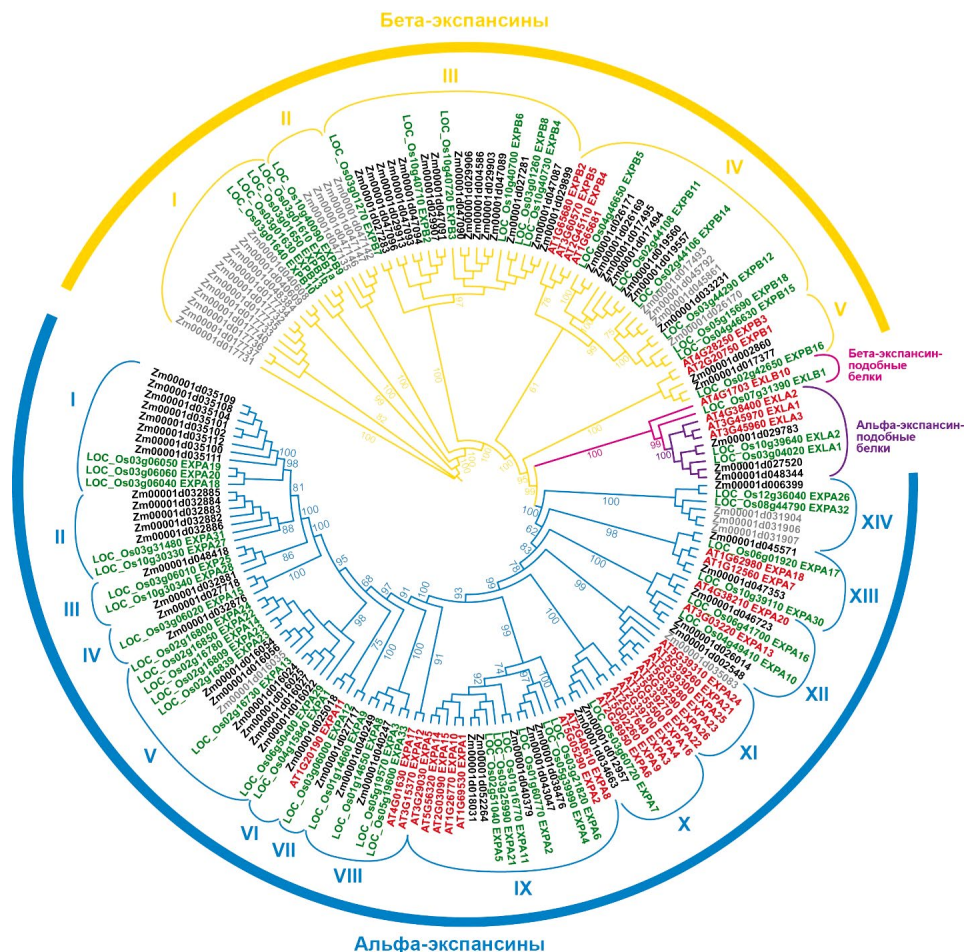


Рис. 2. Филогенетическое древо экспансинов кукурузы (*Zea mays*), резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana*) и риса (*Oryza sativa*). Наименования экспансинов, гены которых экспрессируются в корне кукурузы, обозначены на древе черным шрифтом, а те, гены которых не экспрессируются ($TGR < 16$ во всех образцах) – серым шрифтом. Для резуховидки Таля дополнительно указаны названия экспансинов, предложенные Kende с соавт. [6], для риса – согласно Choi с соавт. [33]. Круглыми скобками и римскими цифрами указаны нами клады для альфа- и бета-экспансинов кукурузы. Арабскими цифрами указаны индексы сверхбыстрой аппроксимации филогенетического бутстрапа.

Клада	Ген	Чех	Мер	рРаст	Раст	пРаст	Чех	Мер	рРаст	Раст	пРаст
ZmEXPA											
I	Zm00001d035112	0	1	0	289	139	0	0	0	100	48
I	Zm00001d035108	0	1	3	251	43	0	0	1	100	17
I	Zm00001d035109	0	0	2	223	31	0	0	1	100	14
I	Zm00001d035111	0	0	0	175	55	0	0	0	100	31
I	Zm00001d035102	0	0	2	137	28	0	0	1	100	20
I	Zm00001d035101	0	0	2	124	21	0	0	1	100	17
I	Zm00001d035100	0	0	0	92	27	0	0	0	100	29
I	Zm00001d035104	0	0	1	89	17	0	0	1	100	19
II	Zm00001d032886	20	454	1326	1082	35	2	34	100	82	3
II	Zm00001d032883	0	1	24	2048	458	0	0	1	100	22
II	Zm00001d032882	0	14	276	1605	101	0	1	17	100	6
II	Zm00001d032884	0	2	131	1168	224	0	0	11	100	19
II	Zm00001d032885	0	3	182	1095	128	0	0	17	100	12
III	Zm00001d032881	9	379	1714	856	6	1	22	100	50	0
III	Zm00001d048418	0	157	1213	761	2	0	13	100	63	0
IV	Zm00001d032876	31	790	883	38	0	4	90	100	4	0
IV	Zm00001d027718	151	170	63	3	1	89	100	37	2	0
V	Zm00001d016022	755	45	1	3	8	100	6	0	0	1
V	Zm00001d016054	468	32	0	2	1	100	7	0	0	0
V	Zm00001d016024	306	21	1	2	3	100	7	0	1	1
V	Zm00001d047353	315	13	1	0	0	100	4	0	0	0
V	Zm00001d016025	212	15	1	1	3	100	7	1	1	1
V	Zm00001d016027	203	14	1	1	2	100	7	0	1	1
V	Zm00001d016056	115	7	0	0	0	100	6	0	0	0
VI	Zm00001d025018	0	721	5688	2969	142	0	13	100	52	3
VII	Zm00001d027717	1351	1433	561	29	1	94	100	39	2	0
VIII	Zm00001d040249	0	0	37	305	33	0	0	12	100	11
VIII	Zm00001d040247	0	0	4	19	3	0	0	22	100	15
IX	Zm00001d040379	2172	2799	2343	289	28	78	100	84	10	1
IX	Zm00001d038476	183	730	3486	2352	64	5	21	100	67	2
IX	Zm00001d043047	273	657	2793	2524	188	10	24	100	90	7
IX	Zm00001d018031	938	215	22	22	69	100	23	2	2	7
IX	Zm00001d052264	429	198	50	74	193	100	46	12	17	45
X	Zm00001d012957	361	161	202	323	85	100	45	56	89	23
X	Zm00001d034663	56	23	61	171	478	12	5	13	36	100
XII	Zm00001d026014	1221	1696	1663	526	189	72	100	98	31	11
XII	Zm00001d002548	435	696	845	256	82	52	82	100	30	10
XII	Zm00001d046723	77	44	135	778	783	10	6	17	99	100
XIII	Zm00001d045571	0	0	18	109	84	0	0	16	100	77
XIII	Zm00001d047353	0	0	10	29	25	0	0	33	100	85
ZmEXPB											
III	Zm00001d029899	1136	2660	12036	7680	255	9	22	100	64	2
III	Zm00001d027281	387	2728	5183	1181	218	7	53	100	23	4
III	Zm00001d029903	0	9	841	5428	248	0	0	15	100	5
III	Zm00001d047089	34	320	2201	2894	66	1	11	76	100	2
III	Zm00001d047087	527	802	2555	1328	265	21	31	100	52	10
III	Zm00001d047091	203	550	1006	1137	4	18	48	88	100	0
III	Zm00001d027283	176	239	406	748	872	20	27	47	86	100
III	Zm00001d047096	757	556	497	331	51	100	74	66	44	7
III	Zm00001d047093	1151	58	8	8	119	100	5	1	1	10
III	Zm00001d004586	389	233	98	145	214	100	60	25	37	55
III	Zm00001d029906	0	0	7	241	681	0	0	1	35	100
III	Zm00001d029913	13	14	17	133	361	4	4	5	37	100
III	Zm00001d047094	0	0	17	161	98	0	0	11	100	61
III	Zm00001d047090	1	10	43	153	52	1	7	28	100	34
III	Zm00001d029907	0	0	5	36	0	0	0	13	100	0
IV	Zm00001d019560	1	31	2685	9125	1262	0	0	29	100	14
IV	Zm00001d017495	23	23	168	898	238	3	3	19	100	26
IV	Zm00001d017494	0	2	78	894	297	0	0	9	100	33
IV	Zm00001d033231	600	392	120	67	80	100	65	20	11	13
IV	Zm00001d026171	0	16	115	244	4	0	6	47	100	2
IV	Zm00001d019557	0	0	23	92	5	0	0	25	100	6
IV	Zm00001d026169	0	0	7	29	16	0	0	23	100	57
V	Zm00001d017377	21	131	78	34	613	3	21	13	5	100
V	Zm00001d002860	135	100	14	0	23	100	74	10	0	17
ZmEXLA											
-	Zm00001d027520	14	6	11	206	1173	1	1	1	18	100
-	Zm00001d029783	190	74	61	178	360	53	21	17	50	100
-	Zm00001d048344	17	7	11	55	354	5	2	3	16	100

Рис. 3. Уровень транскриптов генов экспансинов, экспрессирующихся ($TGR \geq 16$ хотя бы в одной зоне) в различных зонах корня проростка кукурузы. Гены отсортированы по подсемействам (EXPA — альфа-экспансины, EXPB — бета-экспансины, EXLA — альфа-экспансин-подобные белки), внутри подсемейств — по клладам (обозначены римскими цифрами и соответствуют филогенетическому дереву на рис. 2), а внутри клад — по убыванию суммарных значений TGR во всех образцах. Тепловая карта экспрессии: левая панель — значения TGR; правая панель — относительный уровень экспрессии генов в процентах, где за 100% принято максимальное для каждого гена значение TGR. Чех — чехлик, Мер — меристема, рРаст — ранее растяжение, Раст — активное растяжение, пРаст — позднее растяжение.

В целом, количество транскриптов генов экспансинов было максимальным в зонах инициации растяжения и активного растяжения. Так, число генов со значениями $TGR > 500$ составляло 10–12 в чехлике и меристеме, возрастало до 18–22 в зонах начала и активного растяжения, а в зоне позднего растяжения падало до 6 (рис. 3). Еще нагляднее эта закономерность выявляется при оценке суммарного содержания транскриптов всех высокоэкспрессирующихся ($TGR > 500$) генов экспансинов в каждой зоне: в зонах начала и активного роста растяжением, где скорость роста клеток наибольшая, этот показатель в 3–8 раз выше, чем в других зонах (рис. 3). Наиболее высокие значения содержания транскриптов отмечены для генов бета-экспансинов *Zm00001d029899* и *Zm00001d019560* (клады III и IV соответственно), у которых максимумы приходились, соответственно, на зоны начала растяжения и активного растяжения; среди альфа-экспансинов наибольший уровень транскриптов был отмечен для *Zm00001d025018* с пиком значений в зоне начала растяжения (рис. 3).

Обращает на себя внимание, что гены, число транскриптов которых резко увеличивалось в зоне начала растяжения по сравнению с чехликом и меристемой, затем часто характеризовались снижением числа транскриптов в зоне наиболее активного роста; например, гены *Zm00001d029899*, *Zm00001d025018* и *Zm00001d038476* (рис. 3). При этом в активно растущих клетках был отмечен максимально высокий уровень транскриптов другого ряда генов, чьи транскрипты были слабо представлены на более ранних стадиях развития клеток, включая начало растяжения. К числу таких генов относились, например, *Zm00001d019560*, *Zm00001d029903* и *Zm00001d032883*. Таким образом, наборы генов экспансинов, активно транскрибируемых при индукции роста растяжением и при его наибольших скоростях, существенно различаются (рис. 3). Эта закономерность имеет более общий характер: для большинства генов экспансинов характерен узкий диапазон зон с максимальным уровнем транскриптов. Так, значения TGR близкие или равные 100% чаще всего наблюдали в одной зоне, иногда в двух, но не более (рис. 3). Следует отметить, что клеточные стенки в различных зонах корня отличаются по набору полисахаридов и механическим свойствам [15, 16].

Ряд генов экспансинов — *Zm00001d027717*, *Zm00001d040379*, *Zm00001d026014* — характеризовался наибольшим уровнем транскриптов в меристематической зоне; все эти гены кодируют альфа-экспансины (рис. 3). Транскрипты генов значительной части и альфа-, и бета-экспансинов были максимально представлены в чехлике, хотя уровень значений TGR был невысок (рис. 3).

Несмотря на резкое снижение при замедлении роста растяжением общей экспрессии генов, кодирующих экспансины (рис. 3), несколько генов имели в этой зоне максимальную для них представленность транскриптов: *Zm00001d029906*, *Zm00001d034663*, *Zm00001d029913*. Аналогичный паттерн был характерен и для всех трех генов альфа-экспансин-подобных белков, в частности, для *Zm00001d027520* (рис. 3).

Примечательно, что не экспрессирующиеся в растущем корне кукурузы гены экспансинов собираются на древе в группы. Например, клады I и II бета-экспансинов и одна из частей обширной клады IV, а также клад XI и XIV альфа-экспансинов (рис. 2). При этом к не экспрессирующимся в корне относился ген ранее охарактеризованного белка *ZmEXPB1* (*Zm00001d047147*) из клады I, которым исключительно богата пыльца кукурузы [34], а также все его ближайшие гомологи (рис. 2).

Сопоставление способностей альфа- и бета-экспансинов связываться с различными полисахаридами клеточной стенки. Для сопоставления способностей альфа- и бета-экспансинов связываться с различными полисахаридами клеточной стенки использовали сконструированный ранее гликоэзрей в расширенной версии (Дополнительные материалы, табл. S1) [18]. В качестве альфа- и бета-экспансинов использовали коммерческие рекомбинантные белки *AtEXPA1* и *AtEXPB1*. Электрофорез белков с последующим иммуноблоттингом с антителами на гистициновую метку продемонстрировал высокую чистоту препаратов (рис. 4).

Полисахариды, нанесенные на гликоэзрей, представлены, в основном, разнообразными пектиновыми веществами из различных источников, а также некоторыми гемицеллюлозами. В соответствии с характерными элементами

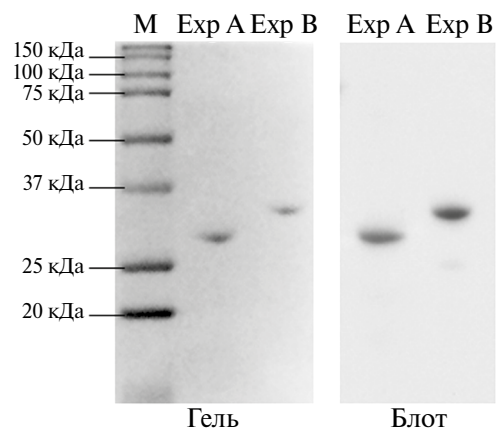


Рис. 4. Оценка чистоты рекомбинантных экспансинов с помощью электрофореза (Гель) с последующим иммуноблоттингом (Блот) с антителами на гистициновую метку.

структуры, все полисахариды подразделены на девять групп (рис. 5). Если использовать пороговую величину в 10% от максимальной для отсечки полисахаридов, не продемонстрировавших взаимодействия, AtEXPA1 взаимодействовал с 85, а AtEXPB1 — с 15 из 183 полисахаридов гликоэррея. Ни один из 29 низкомолекулярных углеводов гликоэррея не показал значимого связывания ни с одним из проанализированных экспансинов (Дополнительные материалы, табл. S1).

Для сопоставления результатов отдельных экспериментов с AtEXPA1 и AtEXPB1 данные представлены в % от максимального значения интенсивности сигнала (RFU) (рис. 5). Максимальные значения RFU в экспериментах с обоими экспансинами были сопоставимы и составляли порядка 8500 единиц (Дополнительные материалы, табл. S1). По результатам связывания с гликоэрреем, проанализированный альфа-экспансин AtEXPA1 взаимодействовал преимущественно с полисахаридами, содержащими Ara или Gal, либо оба моносахарида (т.е. с представителями групп 5–8), а также с полисахаридом из группы 9 — гемицеллюлозой из подсолнечника (рис. 5). Значительно слабее он связывался с рамногалактуронами с невысокой представленностью боковых цепей (группа 4) и с гомогалактуронами (группы 1–3). При этом, карбоксильные группы значительной части представленных гомогалактуронов не были этерифицированы метильными группами (определено для образцов 15011, 15084, 15087, 15088, 15131, 15134).

Максимальное взаимодействие с альфа-экспансином отмечено для полисахаридов 15058 и 15106 (рис. 5). Образец 15058 — арабиногалактан из камеди акации (*Acacia* sp.), имеющий моносахаридный состав Ara 32%, Gal 46%, Rha 11%, GalA 3%, GlcA 8% (Дополнительные материалы, табл. S1). Образец 15106 — арабиногалактан из зелени пихты сибирской (*Abies sibirica* Ldb.) (Ara 29%, Gal 33%, Rha 2%, UA 30%, белок 8%). Арабиногалактаны обоих образцов относятся ко II типу, в котором остатки галактозы присутствуют в виде 1,3- и 1,6-β-D-Galp, а не 1,4-β-D-Galp, как у арабиногалактанов I типа. Основная высокоразветвленная цепь в полисахаридах 15058 и 15106 состоит из 1,3-β-D-Galp. Боковые цепи преимущественно представлены остатками 1,6-β-D-Galp, присоединенными к главной углеводной цепи по O-6 положению. В качестве терминальных остатков на концах галактановых цепей могут располагаться α-L-Araf, β-L-Arap, α-L-Rhap, β-D-GlcA и 4-O-метил-β-D-GlcA [35].

С полисахаридом 15106 активно взаимодействовал и бета-экспансин, AtEXPB1, для которого наиболее выраженным было связывание с

полимерами из группы 4, в частности, с полисахаридом 15090 (GalA 57%, Rha 26%, Gal 9%, Ara 3%), выделенным из листьев березы пушистой (*Betula alba* L.). Главным компонентом этого образца является рамногалактуронан I с остатками Rhap замещенными по O-4 единичными остатками D-Galp [36].

AtEXPB1 взаимодействовал с полисахаридами, имеющими в своем составе рамногалактуронан I (группы 3 и 4), Ara и Gal (группы 5–7), а также с гемицеллюлозой 15180 (группа 9) из подсолнечника, которая, судя по моносахаридному составу (GalA 13%, GlcA < 1%, Rha 4%, Ara 13%, Xyl 63%, Glc 2%, Gal 5%), является глюкуроноарабиноксиланом; этот полимер взаимодействовал и с AtEXPA1 (рис. 5). Из полисахаридов этой группы взаимодействие с экспансином AtEXPA1 продемонстрировал также образец 15051 из сахарной свеклы с высокой долей глюкозы (UA 3%, Rha 3%, Ara 26%, Glc 54%, Gal 13%) (рис. 5). Этот образец не окрашивался йодом (данные не приведены), т.е. не содержал примеси крахмала — альфа-глюкана, не присутствующего в клеточной стенке. Пограничное значение по интенсивности взаимодействия с AtEXPA1 было выявлено для глюкуроноксилана 15191 из древесины бука (*Fagus* sp. L.) (GalA 1%, GlcA < 1%, Xyl 97%, Gal 2%). Остальные гемицеллюлозы гликоэррея, включая галактоманнан из камеди рожкового дерева (*Ceratonia siliqua*) (15153) (UA 6%, Gal 20%, Man 74%), ксилоглюкан из семян тамаринда (*Tamarindus indica*) (15148) (UA 7%, Ara 2%, Xyl 31%, Glc 45%, Gal 15%) и бета-глюкан со смешанным типом связи из ячменя (*Hordeum* sp.) (15116) (Ara 1%, Xyl 2%, Glc 97%), не показали значимого связывания (Дополнительные материалы, табл. S1).

Чтобы подтвердить специфичность взаимодействия экспансинов с полисахаридами был проведен планшетный твердофазный анализ (пТФА) в ингибиторном варианте. В качестве основного (для нанесения на подложку) взяли полисахарид 15106 (группа 5, арабиногалактан из зелени пихты сибирской), имеющий, по данным гликоэррея, высокий сигнал как для AtEXPA1, так и для AtEXPB1 (рис. 5). Взаимодействие исследуемых белков с полисахаридом 15106 было оценено в прямом пТФА в диапазоне концентраций полисахарида 0.07–5.00 мкг/мл (данные не показаны), и в качестве оптимальной была выбрана концентрация 1 мкг/мл.

По результатам ингибиторного анализа взаимодействие альфа- и бета-экспансинов с полисахаридом 15106 было подтверждено — концентрация 50% ингибирования (IC50) составила 0.80 и 0.65 мкг/мл соответственно (рис. 6). В качестве ингибиторов, помимо самого образца 15106, были выбраны охарактеризованные выше полисахариды 15058 (арабиногалактан акации)



Рис. 5. Взаимодействия рекомбинантных альфа- и бета-экспансинов (AtEXPA1 и AtEXPB1) с полисахаридами растительной клеточной стенки, входящими в состав гликоэрея. Представлено по пять полисахаридов с максимальным уровнем взаимодействия для каждой из 9 групп полисахаридов, существенно различающихся по моносахаридному составу. Для сопоставления результатов отдельных экспериментов с AtEXPA1 и AtEXPB1 данные представлены в % от максимального значения RFU в каждом эксперименте (% норм RFU). Пороговой величиной для отсечки полисахаридов, не продемонстрировавших взаимодействия, считали 10% от максимального значения RFU (указано вертикальной пунктирной линией).

и 15090 (пектин березы пушистой), принадлежащие к разным группам и продемонстрировавшие разную интенсивность взаимодействия с экспансинами на чипе. Также был взят ксиллоглюкан из тамаринда (образец 15148, группа 9), т.к. считается, что основными мишенями альфа-экспансинов могут быть участки тесного взаимодействия ксиллоглюкана и микрофибрилл целлюлозы [1]. По результатам гликоэрея этот полисахарид значимого связывания не продемонстрировал и не вошел в топ-5 своей группы (рис. 5). В качестве отрицательного контроля был взят фруктан из цикория (15165) – растительный полисахарид, не локализующийся в клеточной стенке.

Для AtEXPA1 слабое ингибиторное действие в отношении связывания с образцом 15106 оказывал арабиногалактан 15058 из акации, а остальные в используемом диапазоне концентраций не ингибировали взаимодействие этого экспансина с образцом 15106. Для AtEXPB1 ингибирующее действие оказывал пектин с преобладанием рамногалактуронана I из березы (15090, $IC_{50} = 3$ мкг/мл), а ксиллоглюкан из тамаринда (15148) оказывал лишь слабое ингибирующее действие. Фруктан из цикория (15165) ожидаемо не оказывал действия ни на альфа-экспансин, ни на бета-экспансин. В целом, данные ингибиторного анализа подтверждают результаты, полученные с использованием гликоэрея, включая демонстрацию взаимодействия и особенностей связывания, использованных альфа- и бета-экспансинов с ранее широко не обсуждаемыми вариантами полисахаридов растительной клеточной стенки (рамногалактуронаны I и арабиногалактаны). Интересным отличием бета-экспансина служит значитель-

но более узкий спектр связываемых гликанов по сравнению с таковым у альфа-экспансина. Это может свидетельствовать о большей специфичности этого белка.

ОБСУЖДЕНИЕ

Экспансины способны связываться с различными полисахаридами матрикса. Механизм действия экспансинов на растяжимость клеточной стенки связывают с модификацией сети из микрофибрилл целлюлозы [1]. Эти белки за секунды способны увеличивать растяжимость даже фильтровальной бумаги, которая представляет собой почти чистую целлюлозу, однако их действие усиливается в присутствии некоторых полисахаридов матрикса [5, 12]. Поскольку ключевыми элементами, необходимыми для роста растяжением, обычно считаются ксиллоглюкан и, в случае злаков, глюкуроноарабиноксилан, именно эти полисахариды, в основном, тестировались на взаимодействие с экспансинами. Большинство подобных исследований проводилось с использованием ограниченного набора экспансинов и полисахаридов. Например, связывание бета-экспансина кукурузы ZmEXPB1 с несколькими коммерческими гемицеллюлозами оценивалось по уменьшению количества белка в супернатанте после выдерживания в растворе экспансина нитроцеллюлозной мембраны с нанесенным полисахаридом [34]. Так было продемонстрировано преимущественное связывание ZmEXPB1 с ксиланами, практическое отсутствие взаимодействия для глюкана со смешанным типом связей и глюкоманнана и промежуточные значения для ксиллоглюкана; другие полисахариды при этом не тестировались [34].

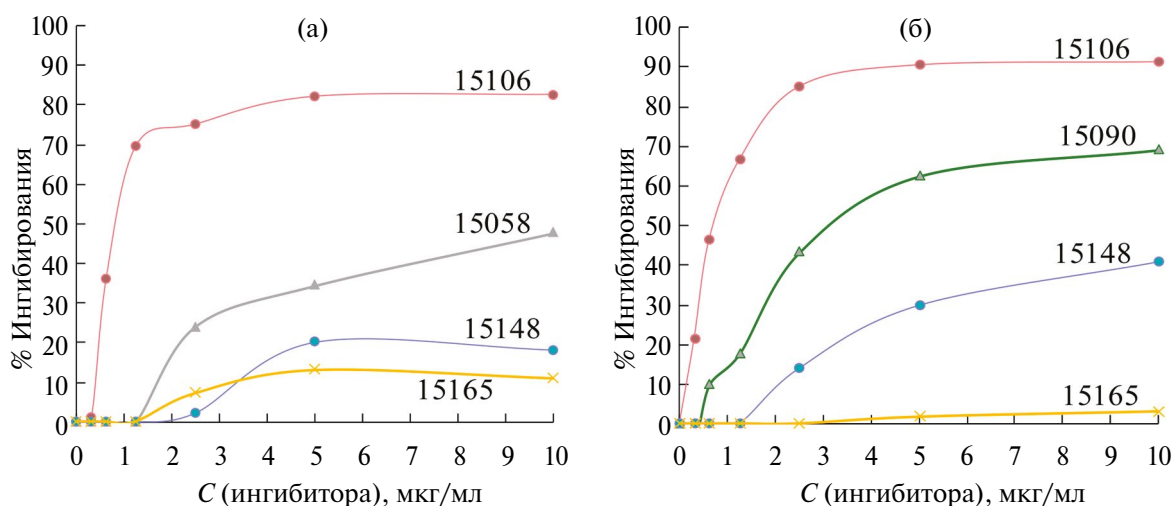


Рис. 6. Ингибирование взаимодействия экспансинов AtEXPA1 (а) и AtEXPB1 (б) с полисахаридом 15106 (арабиногалактан из зелени пихты, концентрация 1 мкг/мл) с помощью различных полисахаридов (15106, 15058, 15148, 15090, 15165, описание в тексте) по результатам планшетного твердофазного анализа. Концентрация экспансинов: 10 мкг/мл.

Выводы о том, что действие альфа-экспансинов опосредовано ксилоглюканом, сделаны также на основании увеличения растяжимости различных образцов на основе целлюлозы при наличии в них ксилоглюкана и значительно меньшего эффекта, или его отсутствия для других гемицеллюлоз [12]. Дополнительным аргументом служит то, что мутант резуховидки Таля *xxt1/xxt2*, не имеющий детектируемого ксилоглюкана, характеризуется меньшими размерами растений по сравнению с диким типом. Предполагается, что это может быть связано с меньшей чувствительностью клеточных стенок этого мутанта к действию альфа-экспансинов [37].

Нами с использованием гликоэстреев осуществлен анализ связывания широкого набора полисахаридов клеточной стенки с двумя экспансинами. Гликоэстрей — ключевой элемент омиксной технологии, позволяющей оценивать взаимодействие гликанов с различными лигандами [18, 38, 39]. Этот инструментальный, сформированный для изучения углеводов-связывающих белков, содержит, как правило, олигомеры, присутствующие в гликозилированных белках, и чаще всего нацелен на изучение специфичности лектинов и антител [39, 40]. Однако даже широкая совокупность олигомеров не может отражать ни разнообразия возможных эпипетов в полисахаридах растительной клеточной стенки, ни, тем более, их пространственной организации в составе полимера. Гликоэстреи, содержащие полисахариды клеточной стенки растений, крайне немногочисленны, хотя отмечается их значительный потенциал в решении многих вопросов [38]. Так, гликоэстреи, содержащие 50 отдельных полисахаридов и более многокомпонентных фракций клеточной стенки, эффективно использовались для характеристики специфичности антител [41]. Для более широкого изучения углеводов-связывающих белков, взаимодействующих с разнообразными гликанами клеточной стенки растений, нами был использован гликоэстрей, содержащий около двух сотен полисахаридов, созданный как описано в работе [18]. Установлено, что экспансины способны связываться с широким набором полисахаридов, в первую очередь — с арабиногалактанами и рамногалактуронанами I (рис. 5). Эти результаты подтверждены и в опытах с планшетным твердофазным анализом (рис. 6). Связывание с кислыми полисахаридами клеточной стенки резуховидки Таля отмечалось и для бактериального экспансина EXLX1 при использовании твердотельного ЯМР; однако считалось, что оно не сказывается на активности экспансинов и не имеет существенной функциональной нагрузки [42].

Взаимодействие экспансинов, которые являются щелочными белками, с полисахари-

дами, содержащими уроновые кислоты, можно попытаться объяснить неспецифическим электростатическим притяжением [9]. Именно так объясняется взаимодействие пектинов с экспансинами, отмеченное в работе, где использовался экспансин-подобный рекомбинантный белок бактериального происхождения BsEXLX1, который напоминает по характеру своего действия альфа-экпансина, хотя и значительно уступает им по активности [43]. Кристаллографические исследования выявили в домене D2 бактериального экспансина поверхность, сформированную слабоконсервативными основными аминокислотами, которая отвечает за связывание экспансина с клеточной стенкой. Более того, именно взаимодействием с глюкуроновой кислотой обусловлено связывание глюкуроноарабиноксилана с бета-экпансином кукурузы EXPB1 (*Zm00001d047147*). Это убедительно продемонстрировано в исследовании, использовавшем ситуацию с исключительно большим накоплением этого бета-экпансина в пыле кукурузы, где взаимодействие оценивалось *in situ* с применением особого варианта твердотельного ЯМР [13].

Действительно, и арабиногалактаны, и рамногалактуронаны I, продемонстрировавшие связывание с экспансинами в наших экспериментах, содержат уроновые кислоты (рис. 5). Однако выявленные с помощью гликоэстрея взаимодействия вряд ли объясняются только наличием заряда: во-первых, не все пектиновые полисахариды взаимодействовали с экспансинами; связывание также не отмечено ни с одним из низкомолекулярных углеводов гликоэстрея, несмотря на наличие в некоторых уроновых кислот (Дополнительные материалы, табл. S1). Во-вторых, “плотность” заряда не была пропорциональна интенсивности связывания, поскольку наибольшая величина взаимодействия характерна для арабиногалактанов и рамногалактуронанов I, в которых доля уроновых кислот многократно ниже, чем в гомогалактуронанах (рис. 5); последние, если и проявляли взаимодействие, то значительно более слабое, в том числе — при отсутствии этерификации карбоксилатов (то есть “экранирования” заряда) метильными группами.

Анализируя состав представленных на гликоэстрее полисахаридов (Дополнительные материалы, табл. S1), не удается выделить моно- или олигосахаридные элементы, которые присутствовали в гликанах, показавших взаимодействие с экспансинами, но отсутствовали в тех, которые не продемонстрировали связывания. В дальнейшем необходимы дополнительные исследования по определению характера взаимодействия и конкретных эпипетов, участвующих в связывании, однако очевидно, что два

исследовавшихся экспансина отличаются по набору предпочтительных полисахаридов-мишеней. Сходные предположения высказывались на основе результатов моделирования различных изоформ экспансинов клубники и сосны, и проведения исследований по моделированию их взаимодействия с различными лигандами методом молекулярного докинга [44, 45].

Паттерн экспрессии различных генов экспансинов имеет параллели в характере распределения полисахаридов клеточной стенки по зонам корня. Гены многих альфа- и бета экспансинов имели четко выраженный дифференциальный характер экспрессии в различных зонах корня (рис. 3). Первичный корень представляет собой продуктивную модельную систему для исследования роста растяжением, поскольку в нем на основании расстояния от чехлика может быть выделено несколько зон, содержащих клетки на разных стадиях развития [14]. Омиксные технологии, включая транскриптомику и протеомику, были многократно использованы для анализа различных тканей растений кукурузы, однако в соответствии с задачами конкретных экспериментов, лишь отчасти реализовали преимущества этой модельной системы: зоны корня, которые использовались для анализов, были слишком крупными, или органы использовались целиком, что не позволяло делать выводы о молекулярных событиях, обуславливающих инициацию, реализацию и окончание роста растяжением [46, 47].

В серии наших экспериментов охарактеризовано формирование и функционирование клеточных стенок в различных зонах корня кукурузы [15–17], что дает возможность сопрычь эти данные с характером экспрессии различных генов экспансинов. Кукуруза, как и все злаки, имеет первичные клеточные стенки II типа, в которых преобладающими полисахаридами матрикса служат глюкуроноарабиноксилан и глюкан со смешанным типом связей [19, 48]. На ранних этапах развития клеток корня кукурузы выражено присутствие ксилоглюкана и пектиновых веществ — характерных компонентов клеточных стенок I типа [15–17]. Экспрессия генов ферментов биосинтеза некоторых пектиновых веществ имеет пик в зоне инициации растяжения клеток, а в ходе активного растяжения наиболее представленными становятся глюкуроноарабиноксилан и глюкан со смешанным типом связей [15]. Наборы генов экспансинов, активно транскрибируемых в меристематической зоне, при индукции роста растяжением и при его наибольших скоростях, существенно различаются (рис. 3). Например, среди представителей клады IX альфа-экспансинов кукурузы, некоторые характеризуются максимальным уровнем транскриптов в чехлике, некоторые — в

меристеме, а некоторые — в зоне раннего растяжения (рис. 3). Эта клада включает гены кукурузы, гомологичные *AtEXPA1* — наиболее полно охарактеризованного альфа-экспансина двудольных растений, а также гомологи *AtEXPA10*, *14* и *15*, для которых недавно была показана стадия- и тканеспецифичная экспрессия в растущем корне резуховидки Таля [49] (рис. 2). Экспрессия этих генов на ранних этапах развития клеток корня кукурузы (рис. 3) соотносится с широкой представленностью в этих зонах компонентов клеточных стенок, типичных для двудольных растений, что подтверждает возможное сходство механизмов растяжения клеточных стенок I и II типов за счет сходства их составов. Однако помимо экспрессии представителей IX клады альфа-экспансинов, в корне кукурузы также были отмечены высокие уровни транскриптов генов, принадлежащих к другим кладам альфа- и бета-экспансинов (рис. 3), что указывает на существование не только сходств, но и различий в механизмах растяжения клеточных стенок I и II типов.

Сопрягая все эти результаты с различиями в связывании рекомбинантных экспансинов с полисахаридами, представленными на гликоэре, мы предполагаем, что дифференциальная экспрессия экспансинов в различных зонах корня имеет не только тканевую и временную привязку, но и объясняется особенностями связывания *in vivo* индивидуальных экспансинов и конкретных полисахаридов матрикса клеточной стенки. Эта гипотеза помогает объяснить наличие большого разнообразия экспансинов и подчеркивает важность взаимодействия этих белков с более широким кругом полисахаридов клеточных стенок, чем это активно обсуждалось ранее.

Большое количество изоформ экспансинов, кодируемое в геномах злаков, по сравнению с геномами двудольных растений может быть обусловлено большим разнообразием полисахаридов матрикса клеточных стенок, характерным для растений с клеточными стенками II типа. При этом считается, что альфа-экспансины не увеличивают растяжимость клеточных стенок злаков, однако они не только кодируются в их геномах, но и активно экспрессируются в различных органах и тканях (рис. 3) [8, 10]. Это может быть связано с тем, что на ранних этапах своего развития клетки злаков имеют клеточные стенки значительно более похожие на клеточные стенки двудольных растений, и приобретают характерный для клеточных стенок II типа состав только на стадии активного роста растяжением [15]. Таким образом, можно предположить, что ткани злаков, использовавшиеся для оценки активности альфа-экспансинов (преимущественно coleoptили), не отвечали на них в первую очередь

потому, что уже не были чувствительны к ним вследствие отсутствия достаточного количества молодых клеток. Роль отдельных изоформ экспансинов в морфогенезе злаков, а также конкретика механизмов действия экспансинов на свойства растительных клеточных стенок требуют дальнейших исследований.

Работа выполнена при поддержке грантов для междисциплинарных проектов Российского научного фонда (№ 20-64-47036, очистка, разделение и характеристика полисахаридов, № 20-63-47110 печать и работа с гликоэреями), а также при поддержке государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН (характеристика филогении и экспрессии экспансинов).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cosgrove D.J.* Building an extensible cell wall // *Plant Physiol.* 2022. V. 189. P. 1246. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac184>
2. *Pien S., Wyrzykowska J., McQueen-Mason S., Smart C., Fleming A.* Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001. V. 98. P. 11812. <https://doi.org/10.1073/pnas.191380498>
3. *Cho H.T., Cosgrove D.J.* Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2002. V. 14. P. 3237. <https://doi.org/10.1105/tpc.006437>
4. *Samalova M., Gahurova E., Hejatk J.* Expansin-mediated developmental and adaptive responses: A matter of cell wall biomechanics? // *Quant. Plant Biol.* 2022. V. 3. P. e11. <https://doi.org/10.1017/qpb.2022.6>
5. *McQueen-Mason S., Cosgrove D.J.* Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994. V. 91. P. 6574. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.14.6574>
6. *Kende H., Bradford K., Brummell D., Cho H.T., Cosgrove D.J., Fleming A., Gehring C., Lee Y., Queen-Mason S., Rose J., Voesenek L.A.* Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins // *Plant Mol. Biol.* 2004. V. 55. P. 311. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-0158-6>
7. *Sampedro J., Cosgrove D.J.* The expansin superfamily // *Genome Biol.* 2005. V. 6. P. 1. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-12-242>
8. *Sampedro J., Guttman M., Li L.C., Cosgrove D.J.* Evolutionary divergence of β -expansin structure and function in grasses parallels emergence of distinctive primary cell wall traits // *Plant J.* 2015. V. 81. P. 108. <https://doi.org/10.1111/tpj.12715>
9. *Li L.C., Bedinger P.A., Volk C., Jones A.D., Cosgrove D.J.* Purification and characterization of four beta-expansins (Zea m 1 isoforms) from maize pollen // *Plant Physiol.* 2003. V. 132. P. 2073. <https://doi.org/10.1104/pp.103.020024>
10. *McQueen-Mason S., Durachko D.M., Cosgrove D.J.* Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants // *Plant Cell.* 1992. V. 4. P. 1425. <https://doi.org/10.1105/tpc.4.11.1425>
11. *Park Y.B., Cosgrove D.J.* A revised architecture of primary cell walls based on biomechanical changes induced by substrate-specific endoglucanases // *Plant Physiol.* 2012. V. 158. P. 1933. <https://doi.org/10.1104/pp.111.192880>
12. *Whitney S.E., Gidley M.J., McQueen-Mason S.J.* Probing expansin action using cellulose/hemicellulose composites // *Plant J.* 2000. V. 22. P. 327. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00742.x>
13. *Wang T., Chen Y., Tabuchi A., Cosgrove D.J., Hong M.* The target of β -expansin EXPB1 in maize cell walls from binding and solid-state NMR studies // *Plant Physiol.* 2016. V. 172. P. 2107. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01311>
14. *Иванов В.Б.* Клеточные основы роста растений. Москва: Наука, 1974. 222 с.
15. *Kozlova L.V., Nazipova A.R., Gorshkov O.V., Petrova A.A., Gorshkova T.A.* Elongating maize root: zone-specific combinations of polysaccharides from type I and type II primary cell walls // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 10956. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67782-0>
16. *Petrova A., Gorshkova T., Kozlova L.* Gradients of cell wall nano-mechanical properties along and across elongating primary roots of maize // *J. Exp. Bot.* 2021. V. 72. P. 1764. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa561>
17. *Nazipova A., Gorshkov O., Eneyskaya E., Petrova N., Kulminskaya A., Gorshkova T., Kozlova L.* Forgotten actors: Glycoside hydrolases during elongation growth of maize primary root // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 12. P. 802424. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.802424>
18. *Nikiforova A.V., Golovchenko V.V., Mikshina P.V., Patova O.A., Gorshkova T.A., Bovin N.V., Shilova N.V.* Plant polysaccharide array for studying carbohydrate-binding proteins // *Biochemistry (Moscow).* 2022. V. 87. P. 890. <https://doi.org/10.1134/S0006297922090036>
19. *Kozlova L.V., Ageeva M.V., Ibragimova N.N., Gorshkova T.A.* Arrangement of mixed-linkage glucan and glucuronoarabinoxylan in the cell walls of growing maize roots // *Ann. Bot. (Oxford, U. K.).* 2014. V. 114. P. 1135. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu125>
20. *Bolser D., Staines D.M., Pritchard E., Kersey P.* Ensembl plants: integrating tools for visualizing, mining, and analyzing plant genomics data // *Plant bioinform-*

- matix: Methods and protocols. 2016. V. 1374. P. 115.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3167-5_6
21. *El-Gebali S., Mistry J., Bateman A., Eddy S.R., Luciani A., Potter S.C., Qureshi M., Richardson L.J., Salazar G.A., Smart A., Sonnhammer E.L.L., Hirsh L., Paladin L., Piovesan D., Tosatto S.C.E.* The Pfam protein families database in 2019 // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47. P. D427.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky995>
 22. *Cosgrove D.J.* Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2015. V. 25. P. 162.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.014>
 23. *Goodstein D.M., Shu S., Howson R., Neupane R., Hayes R.D., Fazo J., Mitros T., Dirks W., Hellsten U., Putnam N., Rokhsar D.S.* Phytozome: a comparative platform for green plant genomics // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. P. D1178.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>
 24. *Madeira F., Park Y.M., Lee J., Buso N., Gur T., Madhusoodanan N., Basutkar P., Tivey A.R.N., Potter S.C., Finn R.D., Lopez R.* The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019 // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47. P. W636.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
 25. *Nguyen L.T., Schmidt H.A., Von Haeseler A., Minh B.Q.* IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 2015. V. 32. P. 268.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
 26. *Kalyanamoorthy S., Min B.Q., Wong T.K., Von Haeseler A., Jermin L.S.* ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates // *Nat. Methods.* 2017. V. 14. P. 587.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
 27. *Minh B.Q., Nguyen M.A.T., Von Haeseler A.* Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30. P. 1188.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst024>
 28. *Letunic I., Bork P.* Interactive tree of life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation // *Nucleic Acids Res.* 2021. V. 49. P. W293.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
 29. *Kim D., Landmead B., Salzberg S.L.* HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements // *Nat. Methods.* 2015. V. 12. P. 357.
<https://doi.org/10.1038/Nmeth.3317>
 30. *Pertea M., Kim D., Pertea G.M., Leek J.T., Salzberg S.L.* Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown // *Nat. Protoc.* 2016. V. 11. P. 1650.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2016.095>
 31. *Love M.I., Huber W., Anders S.* Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // *Genome Biol.* 2014. V. 15. P. 550.
<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
 32. *Su Z.Q., Labaj P.P., Li S., Thierry-Mieg J., Thierry-Mieg D., Shi W., Wang C., Schroth G.P., Setterquist R.A., Thompson J.F., Jones W.D., Xiao W., Xu W., Jensen R.V., Kelly R. et al.* A comprehensive assessment of RNA-seq accuracy, reproducibility and information content by the sequencing quality control consortium // *Nat. Biotech.* 2014. V. 32. P. 903.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2957>
 33. *Choi D., Cho H.T., Lee Y.* Expansins: expanding importance in plant growth and development // *Physiol. Plant.* 2006. V. 126. P. 511.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00612.x>
 34. *Yennawar N.H., Li L.C., Dudzinski D.M., Tabuchi A., Cosgrove D.J.* Crystal structure and activities of EXPB1 (Zea m 1), a beta-expansin and group-1 pollen allergen from maize // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006. V. 103. P. 14664.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0605979103>
 35. *Nie S.-P., Wang C., Cui S.W., Wang Q., Xie M.-Y., Phillips G.O.* A further amendment to the classical core structure of gum arabic (*Acacia senegal*) // *Food Hydrocolloids.* 2013. V. 31. P. 42.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.09.014>
 36. *Golovchenko V.V., Khlopin V.A., Patova O.A., Feltsinger L.S., Bilan M.I., Dmitrenok A.S., Shashkov A.S.* Pectin from leaves of birch (*Betula pendula* Roth.): Results of NMR experiments and hypothesis of the RG-I structure // *Carbohydr. Polym.* 2022. V. 284. P. 119186.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119186>
 37. *Park Y.B., Cosgrove D.J.* Changes in cell wall biomechanical properties in the xyloglucan-deficient xxt1/xx2 mutant of *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2012. V. 158. P. 465.
<https://doi.org/10.1104/pp.111.189779>
 38. *Sørensen I., Pedersen H.L., Willats W.G.* An array of possibilities for pectin // *Carbohydr. Res.* 2009. V. 344. P. 1872.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.12.008>
 39. *Ruprecht C., Bartetzko M.P., Senf D., Dallabernadina P., Boos I., Andersen M.C.F., Kotake T., Knox J.P., Hahn M.G., Clausen M.H., Pfrenkle F.* A synthetic glycan microarray enables epitope mapping of plant cell wall glycan-directed antibodies // *Plant Physiol.* 2017. V. 175. P. 1094.
<https://doi.org/10.1104/pp.17.00737>
 40. *Blixt O., Head S., Mondala T., Scanlan C., Huflejt M.E., Alvarez R., Bryan M.C., Fazio F., Calarese D., Stevens J., Razi N., Stevens D.J., Skehel J.J., van Die I., Burton D.R.* Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004. V. 101. P. 17033.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0407902101>
 41. *Moller I., Marcus S.E., Haeger A., Verhertbruggen Y., Verhoef R., Schols H., Ulvskov P., Mikkelsen J.D., Knox J.P., Willats W.* High-throughput screening of monoclonal antibodies against plant cell wall glycans by hierarchical clustering of their carbohydrate microarray binding profiles // *Glycoconjugate J.* 2008. V. 25. P. 37.
<https://doi.org/10.1007/s10719-007-9059-7>
 42. *Wang T., Park Y.B., Caporini M.A., Rosay M., Zhong L., Cosgrove D.J., Hong M.* Sensitivity-en-

- hanced solid-state NMR detection of expansin's target in plant cell walls // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013. V. 110. P. 16444.
<https://doi.org/10.1073/pnas.131629011>
43. *Georgelis N., Tabuchi A., Nikolaidis N., Cosgrove D.J.* Structure-function analysis of the bacterial expansin EXLX1 // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 16814.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.225037>
 44. *Mateluna P., Valenzuela-Riffo F., Morales-Quintana L., Herrera R., Ramos P.* Transcriptional and computational study of expansins differentially expressed in the response to inclination in radiata pine // *Plant Physiol. Biochem.* 2017. V. 115. P. 12.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.03.005>
 45. *Valenzuela-Riffo F., Gaete-Eastman C., Stappung Y., Lizana R., Herrera R., Moya-Leon M. A., Morales-Quintana L.* Comparative in silico study of the differences in the structure and ligand interaction properties of three alpha-expansin proteins from *Fragaria chiloensis* fruit // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2020. V. 37. P. 3245.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1517610>
 46. *Marcon C., Malik W.A., Walley J.W., Shen Z., Paschold A., Smith L.G., Piepho H.P., Briggs S.P., Hochholdinger F.* A high-resolution tissue-specific proteome and phosphoproteome atlas of maize primary roots reveals functional gradients along the root axes // *Plant Physiol.* 2015. V. 168. P. 233.
<https://doi.org/10.1104/pp.15.00138>
 47. *Stelplflug S.C., Sekhon R.S., Vaillancourt B., Hirsch C.N., Buell C.R., de Leon N., Kaeppler S.M.* An expanded maize gene expression atlas based on RNA sequencing and its use to explore root development // *Plant Gen.* 2016. V. 9. P. plantgenome2015.04.0025.
<https://doi.org/10.3835/plantgenome2015.04.0025>
 48. *Carpita N.C.* Structure and biogenesis of the cell walls of grasses // *Annu. Rev. Plant Biol.* 1996. V. 47. P. 445.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.445>
 49. *Samalova M., Melnikava A., Elsayad K., Peaucelle A., Gahurova E., Gumulec J., Spyroglou I., Zemlyanskaya E.V., Ubogoeva E.V., Balkova D., Demko M., Blavet N., Alexiou P., Benes V., Mouille G. et al.* Hormone-regulated expansins: expression, localization, and cell wall biomechanics in Arabidopsis root growth // *Plant Physiol.* 2023. V. 19. P. kiad228.
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiad228>