

На правах рукописи

ПОТАПОВА
Татьяна Владимировна

**ВЛИЯНИЕ РЕДОКС-СОСТОЯНИЯ ДЫХАТЕЛЬНОЙ
ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ НА ТРАНСКРИПЦИЮ
МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ И ХЛОРОПЛАСТНЫХ ГЕНОВ
*ARABIDOPSIS THALIANA***

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иркутск – 2013

Работа выполнена в лаборатории генетической инженерии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН (СИФИБР СО РАН), г. Иркутск и в институте Биологии/Генетики Университета Гумбольдта, Берлин, Германия.

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

Константинов Юрий Михайлович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
доцент
доктор биологических наук

Побежимова Тамара Павловна

Щербаков Дмитрий Юрьевич

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН

Защита диссертации состоится «18» декабря 2013 года в 09.00 часов на заседании диссертационного совета Д 003.047.01 при Сибирском институте физиологии и биохимии растений СО РАН по адресу: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317. Факс (3952) 510754, e-mail: matmod@sifibr.irk.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН.
Текст автореферата размещен на сайте Института: www.sifibr.irk.ru

Автореферат разослан «__» ноября 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 003.047.01,
кандидат биологических наук



Г.П. Акимова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Регуляция функций основных энерготрансформирующих органелл растений – хлоропластов и митохондрий – включает как anterogradную (от ядра к органеллам), так и retrogradную (от органелл к ядру) передачу сигналов, а также перекрестную связь между хлоропластами и митохондриями. Экспрессия хлоропластного и митохондриального геномов регулируется редокс-сигналами, возникающими при функционировании электрон-транспортных цепей внутри самих органелл. Существование редокс-контроля генетических функций митохондрий и хлоропластов к настоящему времени подтверждено многочисленными исследованиями. Ряд аспектов митохондриально-хлоропластных взаимодействий был изучен при исследовании митохондриальных мутантов с нарушениями функционирования хлоропластов (Leister, 2005). Достаточно детально изучены молекулярные механизмы, обеспечивающие изменения экспрессии хлоропластных генов на разных уровнях (транскрипции, трансляции) в зависимости от редокс-состояния пластохинового пула в составе фотосинтетической цепи переноса электронов (Pfannschmidt et al., 2009; Dietz, Pfannschmidt, 2011). При этом регуляция экспрессии митохондриальных генов изучена значительно слабее. До сих пор ответ митохондриального генома на изменение редокс-условий изучался только на уровне изменений общей транскрипции в изолированных митохондриях (Konstantinov et al., 1995; Wilson et al., 1996), но не на уровне изменений экспрессии индивидуальных генов органелл в целых растениях. Влияние редокс-состояния митохондриальной электрон-транспортной цепи на транскрипцию хлоропластных генов также не исследовалось ранее. В настоящее время общепризнано, что взаимодействия митохондрий и хлоропластов играют важнейшую роль в нормальном протекании процесса фотосинтеза и формировании биологической продуктивности растений (Dutilleul et al., 2003; Noguchi and Yoshida 2008; Nunes-Nesi et al., 2011). В связи с вышеизложенным изучение влияния редокс-состояния цитохромного и альтернативного пути дыхания на экспрессию индивидуальных митохондриальных и хлоропластных генов представляет как большой теоретический, так и научно-практический интерес.

Цели и задачи. Цель настоящей работы состояла в исследовании влияния редокс-состояния дыхательной цепи митохондрий на транскрипционную активность и содержание транскриптов митохондриальных и хлоропластных генов арабидопсиса. Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить влияние ингибирования цитохромного и альтернативного пути дыхания на транскрипционную активность и содержание транскриптов митохондриальных генов арабидопсиса.
2. Изучить влияние ингибирования цитохромного и альтернативного пути дыхания на транскрипционную активность хлоропластных генов арабидопсиса.
3. Исследовать влияние различий в уровне активности альтернативной оксидазы митохондрий на транскрипцию хлоропластных генов с использованием трансгенных линий арабидопсиса с повышенным и сниженным уровнем активности альтернативной оксидазы.

Научная новизна. В результате проведенных исследований установлено влияние различных редокс-состояний дыхательной цепи на транскрипцию митохондриальных

генов арабидопсиса, что проявляется принципиально разным образом в отношении скорости транскрипции и содержания транскриптов тех же генов. Впервые показано, что транскрипционная активность большинства митохондриальных генов зависит от функционирования альтернативной оксидазы. В то время как ингибирование основного пути переноса электронов приводит к снижению скорости транскрипции, ингибирование альтернативной оксидазы митохондрий ведет к увеличению скорости транскрипции митохондриальных генов. Впервые обнаружены дифференциальные изменения скорости транскрипции хлоропластных генов при изменении редокс-состояния дыхательной цепи митохондрий. Впервые показано, что повышенная активность альтернативной оксидазы митохондрий в трансгенных растениях арабидопсиса полностью снимает ингибирующее действие на хлоропластную транскрипцию, вызванное подавлением цитохромного пути дыхания при обработке цианидом калия.

Научная и практическая ценность работы. В работе детально изучено влияние различных редокс-состояний дыхательной цепи и фотосинтетической электрон-транспортной цепи на транскрипционную активность митохондриальных и хлоропластных генов *Arabidopsis thaliana*. Получены приоритетные данные о транскрипционном ответе митохондриальных и хлоропластных генов при изменениях редокс-состояния дыхательной цепи. Полученные в работе данные расширяют представления о механизмах редокс-регуляции метаболических процессов в растительной клетке и важны для понимания митохондриально-хлоропластных взаимодействий на уровне экспрессии генов. Выяснение механизмов регуляции экспрессии митохондриальных генов будет способствовать созданию новых генотипов сельскохозяйственных растений с улучшенными хозяйственно-ценными признаками методами генетической и клеточной инженерии. Разработанная автором экспериментальная система, включающая инкубацию срезанных растений с ингибиторами митохондриальной и фотосинтетической электрон-транспортных цепей, выделение органелл и проведение реакции run-on транскрипции, может служить информативным подходом в исследованиях влияния редокс-состояния цепей переноса электронов митохондрий и хлоропластов на транскрипцию органелльных генов.

Публикации и апробация работы. Результаты исследований по теме диссертации были представлены на Всероссийской научной конференции «Факторы устойчивости растений в экстремальных условиях и техногенной среде» (Иркутск, 2013 г.), на I Международном симпозиуме «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» (Казань, 2013 г.), на VIII Международной научной конференции «Факторы экспериментальной эволюции организмов» (Киев, 2013 г.), на Всероссийской научной конференции с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений. Годичное собрание Общества физиологов растений России» (Москва, 2013 г.).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы, включающего 232 работы отечественных и зарубежных авторов. Работа изложена на 139 страницах, содержит 22 рисунка и 4 таблицы.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Исследования проводили на 12-дневных растениях арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L. [Heunh] экотип *Col-0* (дикий тип)). Растения выращивали в климатических камерах при температуре 20–23 °С, 16-часовом освещении (130 мкмоль квантов м⁻²с⁻¹) (Lamp Master HPI-T Plus 400W E40) («Philips»). Семена проращивали в кюветах в почве, смешанной с перлитом в соотношении 1:1.

Методы. Инкубацию растений на воде и растворах ингибиторов проводили при постоянном освещении интенсивностью 180 или 270 мкмоль квантов м⁻²с⁻¹ в течение 4 часов. Конечная концентрация ингибиторов в растворе при экспозиции срезанных растений: цианид калия (KCN) – 1 мМ, антимицин А (AA) – 10 мкМ, салицилгидроксамовая кислота (СГК) – 1 мМ, олигомицин – 2 мкг/мл, ротенон – 40 мкМ, 2,5-дибромо-3-метил-6-изопропил-р-бензохинон (ДМИБ) – 25 мкМ, 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина (ДХФДММ) – 10 мкМ. В контрольном варианте растения инкубировались в течение 4 часов в водном растворе.

Методы ПЦР и электрофорез ДНК осуществлялись по стандартным методикам (Sambrook and Russell, 2006).

Выделение РНК и Нозерн-блот гибридизация осуществлялись, как описано в Yamburenko et al. (2013).

Для того чтобы определить содержание РНК методом макроэРРЭЙ, 5 мкг всей РНК каждого образца были помечены полинуклеотидной киназой T4 (Fermentas, Литва) в присутствии 30 мкКи [32P]-АТФ (Amersham, Великобритания) согласно инструкциям производителя. Меченая РНК была очищена фенол/хлороформной экстракцией и осаждением этанолом и растворялась в 150 мкл буфера гибридизации. Процедуры гибридизации, отмывки мембран и анализ данных проводили как в методе *gun-on*, при температуре гибридизации и отмывки 65 °С.

Выделение хлоропластов проводили по методу, описанному в статье (Ефимова и др., 2012) с некоторыми модификациями. Подсчет хлоропластов осуществляли с помощью цитологической счетной камеры под световым микроскопом. Для проведения одной *gun-on* реакции отбирали около 50 млн хлоропластов.

Выделение митохондрий проводили методом дифференциального центрифугирования с последующим разделением в градиенте Перколла как описано в статье (Kühn et al., 2009) с некоторыми модификациями.

Подготовку нейлоновых мембран с иммобилизованными ДНК-зондами на митохондриальные гены и проведение *gun-on* транскрипции осуществляли в соответствии с методами, описанными в работе (Zubo et al., 2008) и (Giegé et al., 2000) соответственно.

Обработку данных *gun-on* экспериментов осуществляли с помощью программ Quantity One и Excel. Данные получены как минимум в 3-кратной биологической повторности, посчитаны стандартные отклонения. В ряде случаев отношения контрольного варианта к опытному выражены в форме десятичного логарифма, для более наглядного представления данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изучение влияния ингибиторов митохондриального дыхания на транскрипцию митохондриальных генов *Arabidopsis thaliana*

1.1. Эффекты ингибирования III и IV дыхательных комплексов митохондрий на транскрипцию митохондриальных генов

Для исследования влияния редокс-состояния митохондриальной электрон-транспортной цепи на скорость транскрипции отдельных митохондриальных генов, а также возможного регуляторного влияния активности альтернативной оксидазы на экспрессию митохондриальных генов, кодирующих компоненты цитохромного пути. Используемая экспериментальная система позволила обнаружить существование регуляции экспрессии митохондриальных генов как на уровне скорости транскрипции, так и на уровне содержания их транскриптов.

Анализ транскрипционного ответа на ингибирование дыхательных комплексов показал большие различия на уровне экспрессии отдельных генов. Ингибирование III комплекса антимицином А привело к снижению скорости транскрипции генов *nad4L* и *atp1*, 2-кратно и 6-кратно, соответственно (рис. 1). После подавления комплекса IV цианидом калия скорость транскрипции генов *nad1* и *cox1* понижалась 2-кратно, тогда как для гена *ccb206* наблюдалось более чем 8-кратное понижение (рис. 2). Эти два случая представляют самое большое различие в регуляции отдельных генов, наблюдаемое во время данного исследования. Таким образом, нами выявлены уникальные ответы отдельных генов на обработку каждым ингибитором.

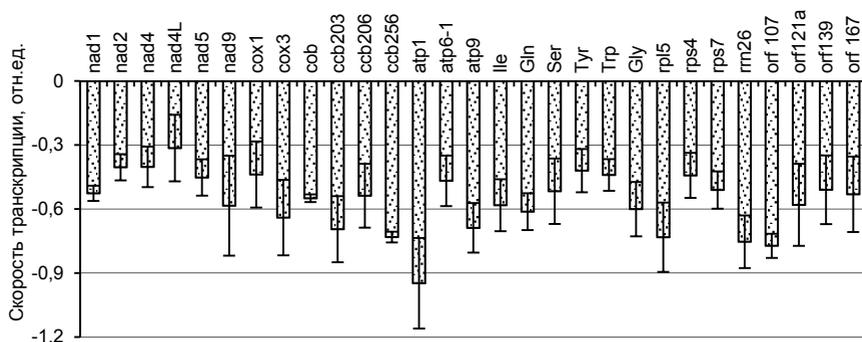


Рис. 1. Изменение скорости транскрипции митохондриальных генов при инкубировании проростков арабидопсиса на растворе антимицина А (10 мкМ). 12-дневные растения, выращенные при 130 мкмоль квантах $m^{-2}c^{-1}$, инкубировали на растворе с антимицином А (10 мкМ). Эффекты ингибиторов показаны по сравнению с водным контролем как десятичный логарифм, вычисленный от среднего значения транскрипционной активности всех исследованных митохондриальных генов как минимум 3 независимых экспериментов; (0.3 указывает на двойное увеличение, -0.3 указывает на двойное уменьшение в интенсивности митохондриальной транскрипции). Двукратные различия транскрипционной активности в экспериментах рассматривались как достоверные.

Из данных, представленных на рисунках 1 и 2, можно видеть, что в условиях ингибирования транспорта электронов в митохондриях по цитохромному пути как с помощью антимицина А, так и цианида калия, наблюдалось значительное (более чем 4-кратное) снижение суммарной скорости транскрипции митохондриальных

генов, обусловленное падением скорости транскрипции всех изучаемых генов. При этом важной особенностью действия ингибиторов основной цепи переноса электронов на скорость транскрипции в митохондриях было подавление этого процесса в более сильной степени под влиянием цианида калия, нежели антимицина А, что можно объяснить более восстановленным состоянием дыхательной цепи при действии цианида калия по сравнению с антимицином А. При обработке растений цианидом калия наблюдалось 6-кратное снижение скорости транскрипции большего числа генов, чем в случае использования антимицина А. При этом наибольшую чувствительность к действию цианида калия продемонстрировали гены *nad2*, *nad5*, *cox3*, *ccb206*, *ccb256*. В случае обработки антимицином А 6-кратное снижение скорости транскрипции наблюдалось только для генов *atp1*, *rpl5*. Такой результат может служить ясным указанием на существование выраженной зависимости скорости транскрипции в митохондриях арабидопсиса от редокс-состояния основной дыхательной цепи органелл.

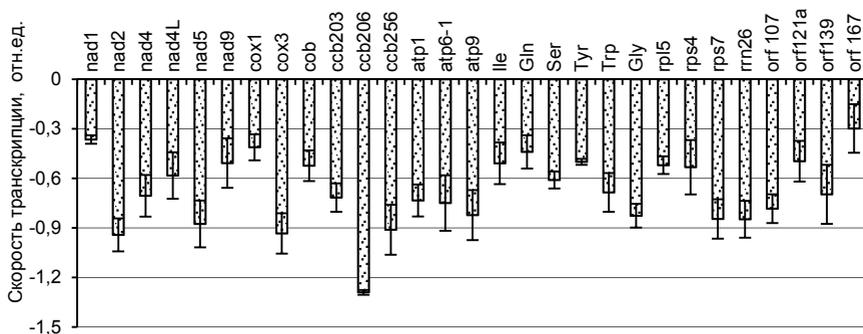


Рис. 2. Изменение скорости транскрипции митохондриальных генов при инкубировании проростков арабидопсиса на растворе цианида калия (1 мМ). 12-дневные растения, выращенные при 130 мкмоль квантах $m^{-2}c^{-1}$, инкубировали на растворе цианида калия (1 мМ). Эффекты ингибиторов показаны по сравнению с водным контролем как десятичный логарифм, вычисленный от среднего значения транскрипционной активности всех исследованных митохондриальных генов как минимум 3 независимых экспериментов; (0.3 указывает на двойное увеличение, -0.3 указывает на двойное уменьшение в интенсивности митохондриальной транскрипции). Двукратные различия транскрипционной активности в экспериментах рассматривались как достоверные.

1.2. Активация скорости транскрипции митохондриальных генов при ингибировании альтернативной оксидазы

В отличие от значительного снижения скорости транскрипции под влиянием ингибиторов цитохромного пути митохондриального дыхания, обработка растений салицилгидроксамовой кислотой, напротив, приводила к существенному возрастанию скорости транскрипции для большинства исследуемых генов (рис. 3). При этом более чем двукратное увеличение скорости транскрипции демонстрировали гены субъединиц дыхательного комплекса I (*nad1*, *nad4L*, *nad5*, *nad9*), комплекса III (*cob*), комплекса V (*atp1*, *atp6.1*, *atp9*), генов биогенеза цитохрома c (*ccb203*, *ccb206*, *ccb256*), генов тРНК (Gln, Tyr, Trp), рибосомальных генов (*rpl5*, *rps4*) и *orf107*.

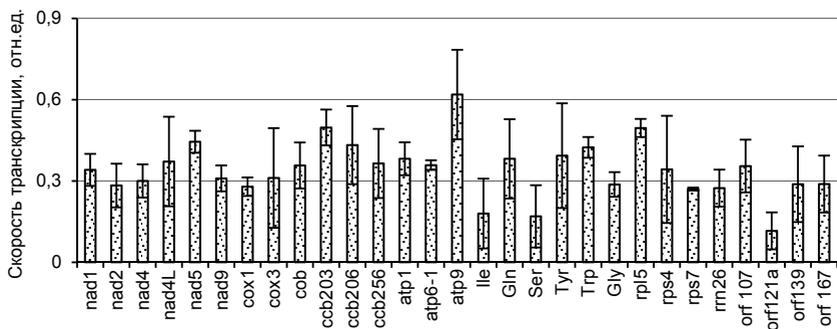


Рис. 3. Изменение скорости транскрипции митохондриальных генов при инкубировании проростков арабидопсиса на растворе салицилгидроксамовой кислоты (1 мМ). 12-дневные растения, выращенные при 130 мкмоль квантах $m^{-2}c^{-1}$, инкубировали на растворе салицилгидроксамовой кислоты (1 мМ). Эффекты ингибиторов показаны по сравнению с водным контролем как десятичный логарифм, вычисленный от среднего значения транскрипционной активности всех исследованных митохондриальных генов как минимум 3 независимых экспериментов; (0.3 указывает на двойное увеличение, -0.3 указывает на двойное уменьшение в интенсивности митохондриальной транскрипции). Двукратные различия транскрипционной активности в экспериментах рассматривались как достоверные.

Таким образом, из полученных результатов следует, что транскрипционная активность большинства исследуемых митохондриальных генов зависит от функционирования альтернативной оксидазы: ингибирование альтернативной оксидазы с помощью СГК вызывало увеличение в той или иной степени скорости транскрипции практически всех генов. Такой результат может быть истолкован в пользу существования механизма транскрипционного контроля экспрессии митохондриальных генов, основанного на передаче сигналов непосредственно от альтернативной оксидазы к геному митохондрий.

1.3. Эффекты ингибиторов митохондриального дыхания на содержание транскриптов митохондриальных генов

Чтобы исследовать потенциальную роль редокс-состояния электрон-транспортной цепи в регулировании экспрессии митохондриальных генов не только на скорость транскрипции, но и на содержание митохондриальных РНК, мы количественно оценили влияние антимицина, цианида калия и СГК на уровни транскриптов генов *atp1*, *atp9*, *tРНК-Ser* и *tРНК-Tyr* с помощью Нозерн-блот анализа (рис. 4). Ингибирование альтернативной оксидазы СГК имело противоположные эффекты на гены, кодирующие *tРНК* и субъединицы АТФ-синтазы. Уровни транскриптов генов *tРНК* и *atp* были повышены (особенно *atp1*), тогда как уровни транскриптов *tRNA-Ser* и *tRNA-Tyr* были снижены до 46 % и 39 % по отношению к контролю, соответственно. Обработка KCN (так же как смесь СГК и KCN) незначительно снижала содержание транскриптов.

Интересный результат был получен при ингибировании дыхательного комплекса III антимицином А. В отличие от эффектов антимицина А на скорость митохондриальной транскрипции (рис. 1), мы заметили, что приблизительно в 2,5 раза повышено содержание транскриптов *atp1* и *atp9* после химического подавления активности комплекса III антимицином А. Уровень транскриптов *tRNA-Ser* и *tRNA-Tyr*, однако, был снижен (рис. 4) в соответствии с показанным нами ранее подавляющим эффектом антимицина А на скорость транскрипции (рис. 1).

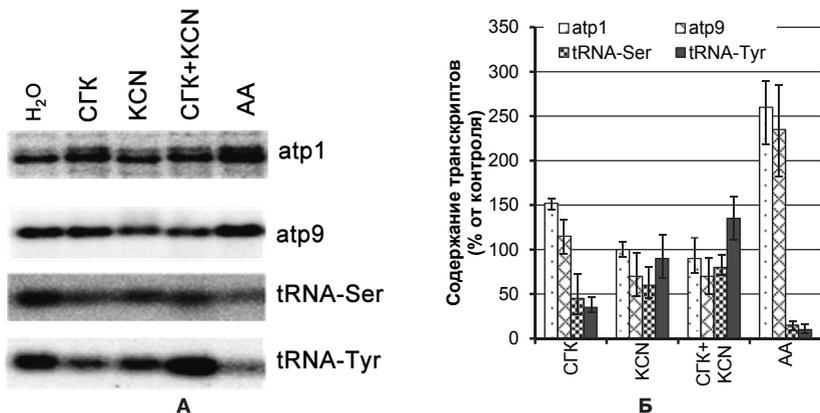


Рис. 4. **А** – представлены результаты радиоавтографии после Нозерн-гибридизации; **Б** – уровень транскриптов митохондриальных генов арабидопсиса при инкубировании проростков на растворах антимицина А (10 мкМ), KCN (1 мМ) и СГК (1 мМ).

Чтобы подтвердить результаты обработок СГК, KCN и антимицином А и определить содержание транскриптов для большего числа генов, была выполнена Нозерн-блот гибридикация с зондами для 27 митохондриальных генов (рис. 5, 6). Результаты отдельных независимых экспериментов этого макроэкрэи анализа показали большие стандартные отклонения (рис. 5, 6), однако, в целом по существу подтвердили данные Нозерн-блот гибридикации РНК (рис. 4).

Из представленных на рисунках 5 и 6 результатов можно видеть, что по сравнению с влиянием на скорость митохондриальной транскрипции антимицинов А и цианид калия оказывали иное действие на содержание транскриптов исследуемых генов. В противоположность эффекту на скорость транскрипции антимицин А вызывал достоверное увеличение содержания транскриптов большинства генов, за исключением генов тРНК (Ile, Gln, Ser, Tyr, Trp, Gly), для которых обнаружено более чем 2-кратное снижение содержания транскриптов (рис. 5, 6).

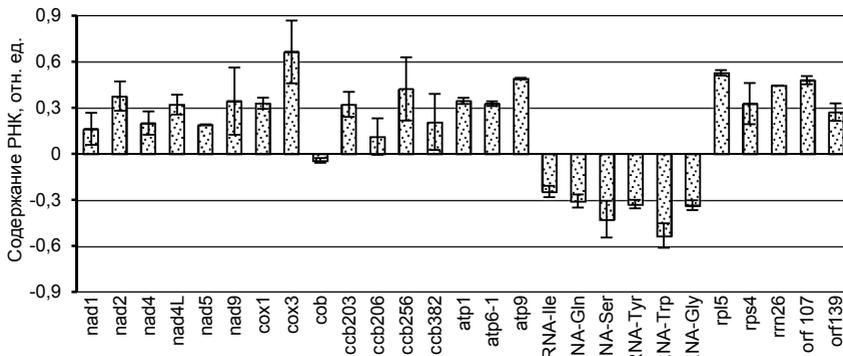


Рис. 5. Изменение содержания транскриптов митохондриальных генов при инкубировании проростков арабидопсиса на растворе антимицина А (10 мкМ).

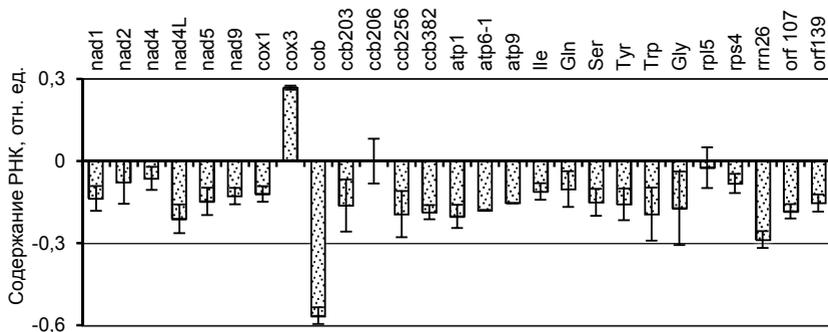


Рис. 6. Изменение содержания транскриптов митохондриальных генов при инкубировании проростков арабидопсиса на растворе цианида калия (1 мМ).

Выявляемое при действии антимицина А повышение уровня транскриптов большинства исследованных генов является, возможно, результатом работы механизма редокс-регуляции генной экспрессии в митохондриях. На основе этого механизма, обеспечивающего активацию экспрессии митохондриальных генов в условиях окисления и ее подавление в условиях восстановления (Konstantinov et al., 1995), можно объяснить обнаруженные различия в действии антимицина А и цианида калия как на скорость транскрипции, так и на уровень транскриптов в митохондриях арабидопсиса. Принципиальные отличия при действии антимицина А, наглядно проявляющиеся в увеличении содержания транскриптов генов (рис. 5), можно объяснить наличием окисленного участка дыхательной цепи слева от точки приложения эффекта ингибитора. В то же время при действии цианида калия дыхательная цепь находится в полностью восстановленном состоянии, что приводит к падению содержания транскриптов. Обнаруженное снижение уровня транскриптов генов тРНК (рис. 5), возможно, является результатом падения в этих условиях уровня внутримитохондриального АТФ, который необходим для работы генов тРНК. Напротив, при обработке цианидом калия наблюдалась тенденция к снижению содержания транскриптов большинства митохондриальных генов, за исключением гена *cox3*, уровень транскриптов которого повышался почти в 2 раза. Следует также отметить существенно более высокую степень подавления транскрипции гена *cob*, составляющую 4 раза (рис. 6).

Результаты определения уровня транскриптов некоторых митохондриальных генов при обработке растений ингибиторами цитохромного пути (АА, KCN) и альтернативной оксидазы (СГК), представленные на рис. 4, демонстрируют существенные отличия в характере наблюдаемых изменений этого параметра по сравнению со скоростью транскрипции. В этом случае только для гена *atp1* при обработке СГК наблюдалось достоверное увеличение содержания транскриптов, в то время как уровень транскриптов генов тРНК достоверно снижался (рис. 4). При этом такое разнонаправленное действие СГК на транскрипцию данных генов устранялось при совместной обработке СГК и KCN.

Примечательно, что ответы транскрипционных уровней и скорости транскрипции митохондриальных генов на ингибирование электрон-транспортной цепи отличались друг от друга во многих случаях. В то время как обработка СГК положительно влияла на скорость транскрипции, она оказывала слабые эффекты на содержание мРНК. Обработка KCN сильно подавляла транскрипцию, но либо не имела эффекта, либо ока-

зывала только слабое отрицательное влияние на содержание транскриптов. Обработка антимицином А подавляла скорость транскрипции всех митохондриальных генов, но привела к увеличению содержания большей части мРНК, однако вызывала уменьшение уровня тРНК в 2–3 раза. Таким образом, уровни тРНК показывают противоположный ответ на подавление комплекса III по сравнению с другими митохондриальными мРНК и рРНК (рис. 5, 6). Наши результаты подтверждают независимые эффекты альтернативной оксидазы и цитохромного пути на транскрипцию и уровни транскриптов в митохондриях.

Таким образом, мы показали существование двух механизмов, регулирующих митохондриальную экспрессию генов. Во-первых, скорость транскрипции и содержание транскриптов регулируются редокс-состоянием цитохромного пути переноса электронов, что приводит к различиям между действием антимицина А и цианида калия. Во-вторых, по-видимому, экспрессия митохондриальных генов регулируется через тесное взаимодействие цитохромного пути переноса электронов и альтернативного пути.

2. Изучение влияния ингибиторов митохондриального дыхания на транскрипцию хлоропластных генов *A. thaliana*

На следующем этапе работы мы изучали влияние редокс-состояния основной электрон-транспортной цепи митохондрий и активности альтернативной оксидазы на скорость транскрипции хлоропластных генов в фотосинтетически активных, а также в фотосинтетически не активных хлоропластах. Инкубацию растений и выделение хлоропластов проводили либо на свету, либо в темноте.

2.1. Транскрипция хлоропластных генов при обработке ингибиторами комплексов I, III и IV митохондрий в условиях освещения

Использование ротенона, ингибитора комплекса I, не оказало влияния на скорость транскрипции хлоропластных генов (рис. 7). Вероятно, это объясняется тем, что растения содержат ротенон-нечувствительные НАДН дегидрогеназы, расположенные с обеих сторон внутренней мембраны, которые могут доставлять электроны к убахинону из матрикса или из межмембранного пространства (Rasmusson et al., 2004).

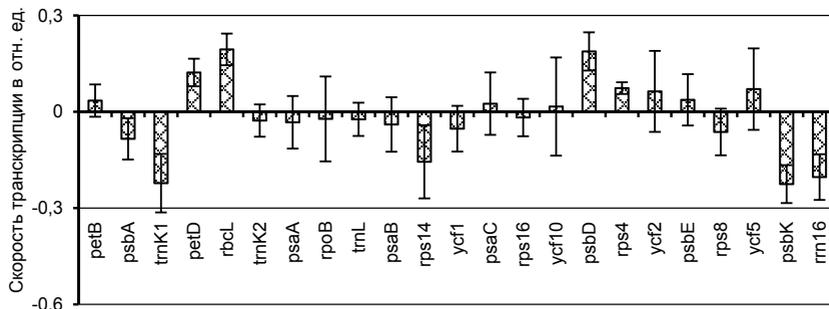


Рис. 7. Изменение скорости транскрипции хлоропластных генов при инкубировании проростков арабидопсиса на растворе ротенона (40 мкМ) в условиях освещения. 12-дневные растения, выращенные при 130 мкмоль квантах $m^{-2}c^{-1}$, инкубировали на растворе ротенона (40 мкМ). Эффекты ингибитора показаны по сравнению с водным контролем как десятичный логарифм, вычисленный от среднего значения транскрипционной активности всех исследованных хлоропластных генов как минимум 3 независимых экспериментов (0.3 указывает на двойное увеличение, -0.3 указывает на двойное уменьшение в интенсивности хлоропластной транскрипции). Двукратные различия транскрипционной активности в экспериментах рассматривались как достоверные.

Эти НАД(Ф)Н дегидрогеназы типа II нечувствительны к ротенону и, следовательно, дыхание растений может продолжиться в присутствии ингибитора (Roberts et al., 1995; Melo et al., 1996), но они не перемещают протоны и не производят АТФ.

Из представленных на рис. 8 и 9 данных можно видеть, что в условиях ингибирования транспорта электронов в митохондриях по цитохромному пути с помощью антимицина А и KCN наблюдалось значительное (более чем 2-кратное) снижение скорости транскрипции хлоропластных генов. Как видно из результатов, представленных на рисунках 8 и 9, важной особенностью действия ингибиторов основной цепи переноса электронов на скорость транскрипции генов в хлоропластах было подавление этого процесса в более сильной степени под влиянием KCN нежели антимицина А, что можно объяснить более восстановленным состоянием дыхательной цепи при действии KCN по сравнению с антимицином А. Эта же особенность была отмечена при действии ингибиторов антимицина А и KCN на скорость митохондриальной транскрипции. При обработке растений KCN наблюдалось 3-кратное снижение скорости транскрипции большего числа генов, чем в случае использования антимицина А. При этом наибольшую чувствительность к действию KCN продемонстрировали гены *rrn16*, *ycf5*, *rps8*, *rps16*, *rpoB*, *trnK1*. В случае обработки антимицином А 2-кратное снижение скорости хлоропластной транскрипции наблюдалось только для генов, кодирующих субъединицы рибосом *rps4*, *rps8*, *rps14*, гены рибосомальной (*rrn16*) и транспортных РНК. Наиболее сильный подавляющий эффект показан для гена *rrn16*. Интересно, что в отличие от генов «домашнего хозяйства» (отвечающих за экспрессию хлоропластного генома) подавляющий эффект ингибиторов на фотосинтетические гены оказался слабым. Исключение составил ген *petB*, скорость транскрипции которого 2-кратно повышалась при обработке антимицином А, хотя значение стандартного отклонения для этого гена велико.

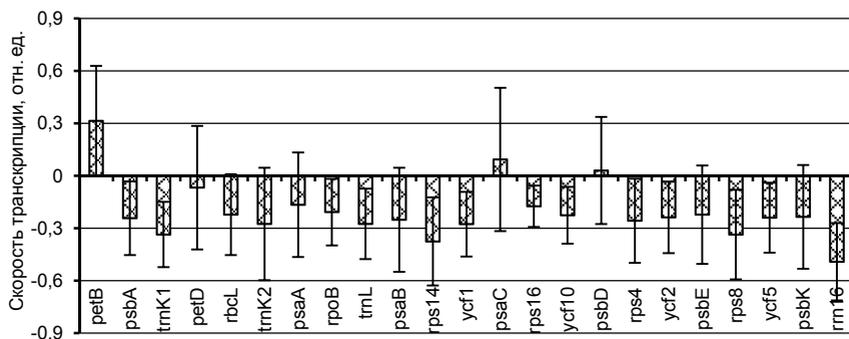


Рис. 8. Изменение скорости транскрипции хлоропластных генов при инкубировании проростков арабидопсиса на растворе антимицина А (10 мкМ) в условиях освещения. 12-дневные растения, выращенные при 130 мкмоль квантах $m^{-2}s^{-1}$, инкубировали на растворе антимицина А (10 мкМ). Эффекты ингибиторов показаны по сравнению с водным контролем как десятичный логарифм, вычисленный от среднего значения транскрипционной активности всех исследованных хлоропластных генов как минимум 3 независимых экспериментов (0.3 указывает на двойное увеличение, -0.3 указывает на двойное уменьшение в интенсивности хлоропластной транскрипции). Двукратные различия транскрипционной активности в экспериментах рассматривались как достоверные.

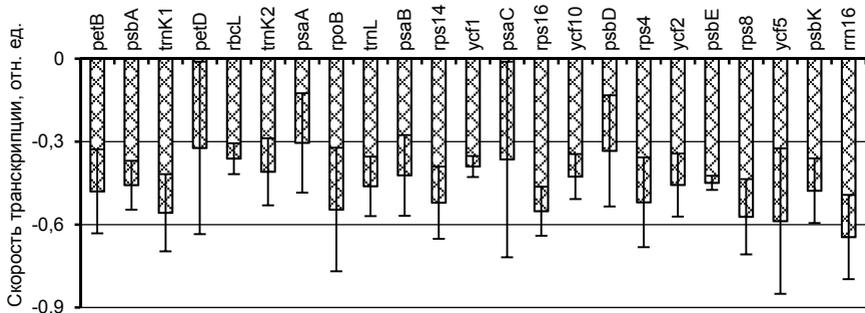


Рис. 9. Изменение скорости транскрипции хлоропластных генов при инкубировании проростков арабидопсиса на растворе цианида калия (1 мМ) в условиях освещения. 12-дневные растения, выращенные при 130 мкмоль квантах $m^{-2}c^{-1}$, инкубировали на растворе цианида калия (1 мМ). Эффекты ингибиторов показаны по сравнению с водным контролем как десятичный логарифм, вычисленный от среднего значения транскрипционной активности всех исследованных хлоропластных генов как минимум 3 независимых экспериментов (0.3 указывает на двойное увеличение, -0.3 указывает на двойное уменьшение в интенсивности хлоропластной транскрипции). Двукратные различия транскрипционной активности в экспериментах рассматривались как достоверные.

В настоящей работе нами впервые получены данные, свидетельствующие о том, что транскрипционный аппарат хлоропластов способен напрямую реагировать на сигнал, связанный с изменением редокс-состояния митохондриальной электрон-транспортной цепи.

2.2. Транскрипция хлоропластных генов при обработке ингибиторами дыхания в условиях темноты

Инкубация срезанных растений с митохондриальными ингибиторами в темноте не оказала влияния на скорость транскрипции хлоропластных генов (рис. 10–12).

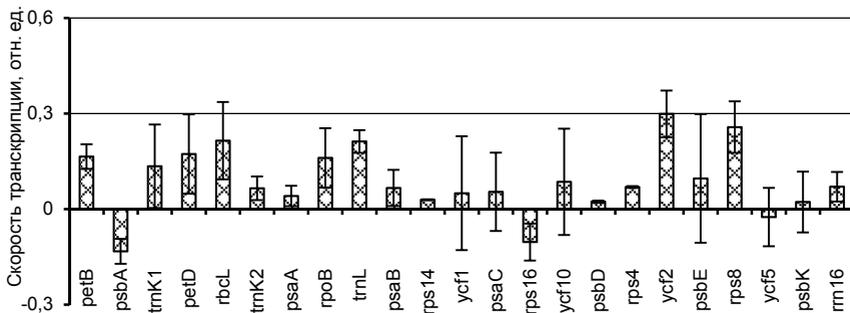


Рис. 10. Изменение скорости транскрипции хлоропластных генов при обработке проростков арабидопсиса антимицином А (10 мкМ) в условиях темноты. 12-дневные растения выращивали при 130 мкмоль квантах $m^{-2}c^{-1}$. Инкубацию на растворе антимицина А (10 мкМ) и выделение хлоропластов проводили в темноте. Эффекты ингибитора показаны по сравнению с водным контролем как десятичный логарифм, вычисленный от среднего значения транскрипционной активности всех исследованных хлоропластных генов как минимум 3 независимых экспериментов (0.3 указывает на двойное увеличение, -0.3 указывает на двойное уменьшение в интенсивности хлоропластной транскрипции). Двукратные различия транскрипционной активности в экспериментах рассматривались как достоверные.

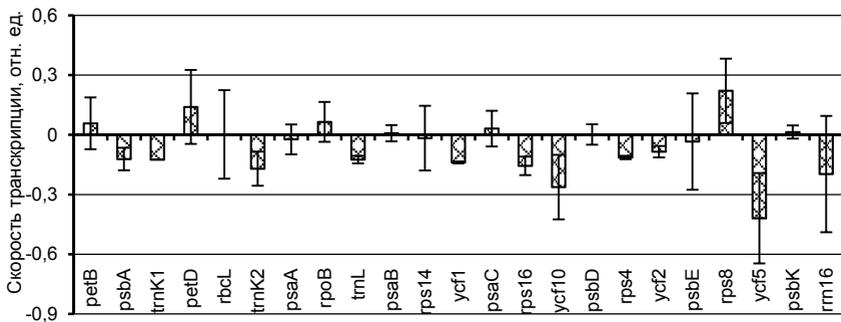


Рис. 11. Изменение скорости транскрипции хлоропластных генов при обработке проростков арабидопсиса цианидом калия (1 мМ) в условиях темноты. 12-дневные растения выращивали при 130 мкмоль квантах $m^{-2}c^{-1}$. Инкубацию на растворе цианида калия (1 мМ) и выделение хлоропластов проводили в темноте. Эффекты ингибитора показаны по сравнению с водным контролем как десятичный логарифм, вычисленный от среднего значения транскрипционной активности всех исследованных хлоропластных генов как минимум 3 независимых экспериментов (0.3 указывает на двойное увеличение, -0.3 указывает на двойное уменьшение в интенсивности хлоропластной транскрипции). Двукратные различия транскрипционной активности в экспериментах рассматривались как достоверные.

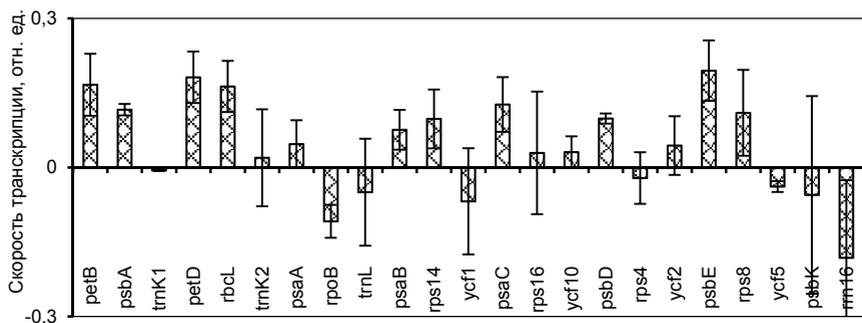


Рис. 12. Изменение скорости транскрипции хлоропластных генов при обработке проростков арабидопсиса салицилгидроксаметовой кислотой (1 мМ) в условиях темноты. 12-дневные растения выращивали при 130 мкмоль квантах $m^{-2}c^{-1}$. Инкубацию на растворе салицилгидроксаметовой кислоты (1 мМ) и выделение хлоропластов проводили в темноте. Эффекты ингибитора показаны по сравнению с водным контролем как десятичный логарифм, вычисленный от среднего значения транскрипционной активности всех исследованных хлоропластных генов как минимум 3 независимых экспериментов (0.3 указывает на двойное увеличение, -0.3 указывает на двойное уменьшение в интенсивности хлоропластной транскрипции). Двукратные различия транскрипционной активности в экспериментах рассматривались как достоверные.

В темноте хлоропласты не производят восстановительные эквиваленты и АФК, напротив, происходят темновые процессы фиксации CO_2 , в которых используется «ассимиляционная сила» молекул АТФ и НАДФН. Митохондриальный метаболизм, особенно биоэнергетические реакции окислительного переноса электронов и фосфорилирования, важны для поддержания фотосинтетической ассимиляции углерода только на свету (Padmasree et al., 2002; Raghavendra and Padmasree, 2003; Noctor et al., 2007; Yoshida et al., 2008; Nunes-Nesi et al., 2008).

Таким образом, в отсутствие световых реакций фотосинтеза ингибирование митохондриальной электрон-транспортной цепи не влияет на скорость

транскрипции хлоропластных генов. Функции митохондрий в предотвращении сверхвосстановления фотосинтетической электрон-транспортной цепи во время темновых реакций фотосинтеза для хлоропластов не имеют значения. Нами показано, что обработка срезанных растений арабидопсиса ингибиторами митохондриальной электрон-транспортной цепи приводила к снижению скорости транскрипции хлоропластных генов только в условиях освещения. При этом степень понижения скорости транскрипции зависела от степени восстановленности дыхательной цепи митохондрий.

3. Исследование влияния различий в уровне экспрессии генов альтернативной оксидазы на транскрипцию хлоропластных генов с использованием трансгенных линий XX-2 и AS-12

На начальной стадии работы мы исследовали возможную зависимость хлоропластной транскрипции от активности альтернативного пути дыхания посредством обработки растений ингибитором альтернативной оксидазы – салицилгидроксамовой кислотой. Как видно из рисунка 13, обработка СГК снижала интенсивность транскрипции большинства хлоропластных генов в растениях дикого типа. Наиболее выраженный эффект наблюдался для генов, кодирующих транспортную и рибосомальную РНК (*trnK1*, *trnL*, *rrn16*). Обработка ингибитором цитохромного пути цианидом калия приводила к более заметному снижению транскрипции в хлоропластах. Однако наиболее сильное подавление транскрипции всех изученных генов наблюдалось при обработке растений смесью СГК и KCN, что свидетельствует об участии обоих путей транспорта электронов в генерации сигнала, влияющего на транскрипцию хлоропластных генов (рис. 13).

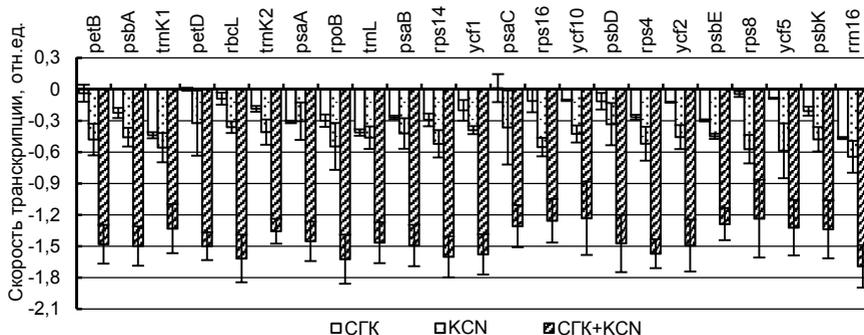


Рис. 13. Отношение интенсивности транскрипции хлоропластных генов в растениях арабидопсиса линии дикого типа (Col-0), обработанных СГК (1 мМ), KCN (1 мМ) либо смесью KCN и СГК, к интенсивности транскрипции в необработанных растениях той же линии. Эффекты ингибиторов показаны по сравнению с водным контролем как десятичный логарифм, вычисленный от среднего значения транскрипционной активности всех исследованных хлоропластных генов как минимум 3 независимых экспериментов (0.3 указывает на двойное увеличение, -0.3 указывает на двойное уменьшение в интенсивности хлоропластной транскрипции). Двукратные различия транскрипционной активности в экспериментах рассматривались как достоверные.

На следующем этапе мы сравнили изменения хлоропластной транскрипции в трансгенных растениях арабидопсиса с повышенным (XX-2) и пониженным (AS-12)

уровнем белка АOX1а, обработанных KCN либо смесью СГК и KCN (рис. 14, 15). Интенсивность транскрипции большинства хлоропластных генов была снижена в 5–6 раз в проростках линии AS-12, обработанных KCN. Наибольшую чувствительность к KCN продемонстрировали гены *psbA*, *psbD*, *clpP*, *petB*, *rps14*. Следует отметить, что в целом степень подавления транскрипции была выше, чем в растениях дикого типа. Однако в отличие от ситуации с растениями дикого типа обработка смесью СГК и KCN не вызвала дальнейшого усиления репрессии хлоропластной транскрипции, что подтверждает отсутствие активности альтернативной оксидазы в растениях AS-12.

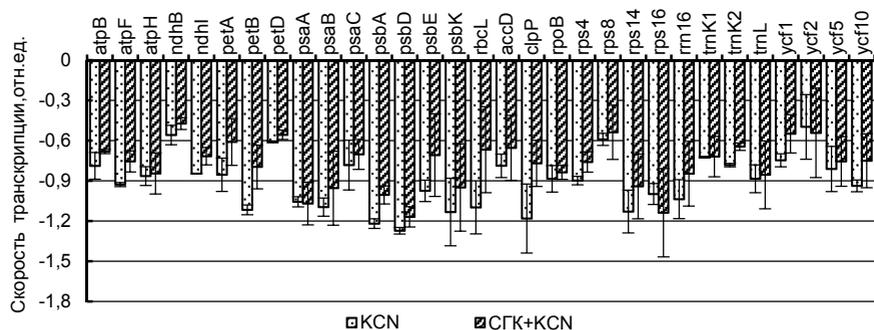


Рис. 14. Отношение интенсивности транскрипции хлоропластных генов в растениях арабидопсиса линии с пониженным уровнем активности альтернативной оксидазы (AS-12), обработанных KCN (1 мМ) либо KCN и СГК (1 мМ), к интенсивности транскрипции в необработанных растениях той же линии. Эффекты ингибиторов показаны по сравнению с водным контролем как десятичный логарифм, вычисленный от среднего значения транскрипционной активности всех исследованных хлоропластных генов как минимум 3 независимых экспериментов (0.3 указывает на двойное увеличение, -0.3 указывает на двойное уменьшение в интенсивности хлоропластной транскрипции). Двукратные различия транскрипционной активности в экспериментах рассматривались как достоверные.

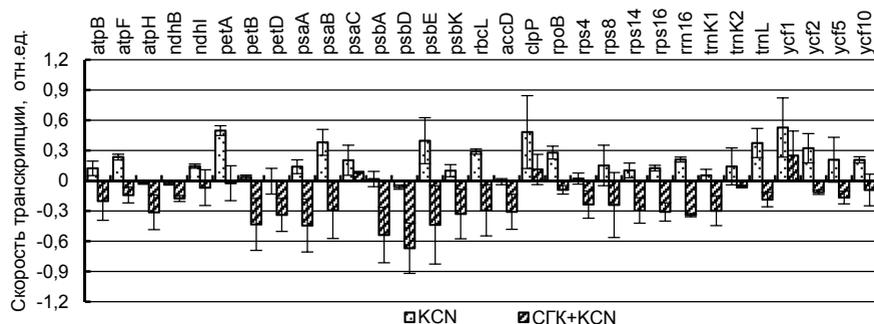


Рис. 15. Отношение интенсивности транскрипции хлоропластных генов в растениях арабидопсиса линии с повышенным уровнем активности альтернативной оксидазы (XX-2), обработанных KCN (1 мМ) либо KCN и СГК (1 мМ), к интенсивности транскрипции в необработанных растениях той же линии. Эффекты ингибиторов показаны по сравнению с водным контролем как десятичный логарифм, вычисленный от среднего значения транскрипционной активности всех исследованных хлоропластных генов как минимум 3 независимых экспериментов (0.3 указывает на двойное увеличение, -0.3 указывает на двойное уменьшение в интенсивности хлоропластной транскрипции). Двукратные различия транскрипционной активности в экспериментах рассматривались как достоверные.

При обработке KCN растений линии XX2, напротив, наблюдалось достоверное повышение скорости транскрипции отдельных генов: *petA*, *psaB*, *psbE*, *clpP*, *rpoB*, *trnL*, *ycf1*, *ycf2* (рис. 15). В целом, была отмечена общая тенденция к повышению интенсивности транскрипции для большей части исследованных хлоропластных генов. При обработке смесью СГК и KCN наблюдалась тенденция к незначительному понижению скорости транскрипции хлоропластных генов, при этом достоверное снижение было отмечено лишь для отдельных генов, в частности генов, кодирующих компоненты фотосистемы II (*psbD*, *psbE*, *psbA*) (рис. 15). Таким образом, повышенная активность альтернативной оксидазы в растениях линии XX2 полностью снимает ингибирующее действие на хлоропластную транскрипцию, вызванное подавлением цитохромного пути дыхания при обработке KCN.

Ранее была показана зависимость экспрессии ряда генов, кодирующих хлоропластные белки, от активности альтернативной оксидазы (Giraud et al., 2008; Zubo et al., 2008). Однако все эти гены локализованы в ядерном геноме, и данная зависимость, по-видимому, опосредуется сложными механизмами ретроградной регуляции с участием ядерных транскрипционных факторов, таких как ABI4 (Giraud et al., 2009). В настоящей работе нами впервые получены данные, свидетельствующие о том, что транскрипционный аппарат хлоропластов способен напрямую реагировать на сигнал, связанный с изменением активности альтернативной оксидазы, локализованной в митохондриях. Наиболее вероятным кандидатом на роль такого сигнала представляется изменение концентрации восстановительных эквивалентов в хлоропластах. Роль альтернативной оксидазы и митохондриальной дыхательной цепи в целом в утилизации образующихся в хлоропластах восстановительных эквивалентов была предложена ранее (Noguchi et al., 2008). Полученные нами данные говорят в пользу этой гипотезы. Так, ингибирование как альтернативного, так и цитохромного пути дыхания (при работе каждого из которых расходуются восстановительные эквиваленты), и в особенности их обоих одновременно, приводит к снижению скорости транскрипции. Важно отметить, что повышенный уровень активности альтернативной оксидазы в трансгенных растениях, приводящий к возрастанию способности дыхательной цепи утилизировать восстановительные эквиваленты, нивелирует подавляющий эффект химического ингибирования цитохромного пути. В целом, полученные данные свидетельствуют в пользу существования механизма регуляции транскрипции хлоропластных генов, воспринимающего редокс-сигналы от альтернативного и основного путей митохондриального дыхания.

4. Изучение влияния ингибиторов электрон-транспортной цепи хлоропластов на транскрипцию хлоропластных генов

Принимая во внимание полученные результаты о влиянии митохондриальных ингибиторов на транскрипцию митохондриальных и хлоропластных генов, нам представилось интересным изучить влияние ингибиторов фотосинтетической электрон-транспортной цепи на транскрипцию хлоропластных генов и изменений транскрипции хлоропластных генов при нарушениях работы путей переноса электронов в хлоропластах и митохондриях одновременно.

В нашей работе инкубация растений арабидопсиса на растворе ДХФДММ приводила к достоверной активации транскрипции (в 2 раза) хлоропластных

генов, продукты которых необходимы для фотосинтеза. Скорость транскрипции генов, отвечающих за экспрессию хлоропластного генома, тоже повышалась, но не достигала 2-кратного уровня. Исключение составляет ген *ndhB*, на скорость транскрипции этого гена обработка ДХФДММ не повлияла (рис. 16). Эти данные могут указывать на работу ген-специфичных регулирующих механизмов. Инкубация растений арабидопсиса на растворе ДМИБ приводила к 2-кратному понижению скорости транскрипции хлоропластных генов. Наиболее сильное подавление (в 4 раза) показано для генов *ndhB* и *rnm16* (рис. 16).

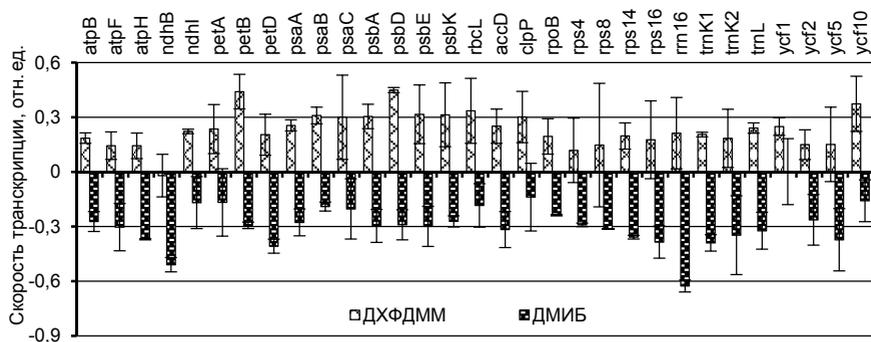


Рис. 16. Изменение скорости транскрипции хлоропластных генов при инкубировании срезанных растений на растворах ингибиторов ДМИБ (25 мкМ) и ДХФДММ (10 мкМ). 12-дневные растения, выращенные при 130 мкмоль квантах $m^{-2}c^{-1}$, инкубировали на растворах ДМИБ (25 мкМ) и ДХФДММ (10 мкМ). Эффекты ингибиторов показаны по сравнению с водным контролем как десятичный логарифм, вычисленный от среднего значения транскрипционной активности всех исследованных хлоропластных генов как минимум 3 независимых экспериментов (0.3 указывает на двойное увеличение, -0.3 указывает на двойное уменьшение в интенсивности хлоропластной транскрипции). Двукратные различия транскрипционной активности в экспериментах рассматривались как достоверные.

Противоположный эффект ингибиторов ДМИБ и ДХФДММ на экспрессию хлоропластных генов, по предположению T. Pfannschmidt с соавт., показывает, что редокс-состояние пула пластохинона является решающим фактором для регуляции экспрессии генов, кодирующих белки двух фотосистем (Pfannschmidt et al., 1999, 2001). Наши результаты согласуются с этими данными.

Обработка растений арабидопсиса смесью ингибиторов ДХФДММ+КСН приводила к 3-кратному подавлению скорости транскрипции хлоропластных генов, за исключением гена *psaC* (рис. 17). Наиболее сильное подавление (в 4 раза) показано для генов *ndh1*, *psaA*, *psaB*, *rps14*, *rps16*, *rnlL*, *ycf2*, *ycf5*. Ингибитор дыхательного комплекса VI митохондрий цианид калия нивелировал активизирующий эффект ДХФДММ, что может свидетельствовать о влиянии редокс-состояния митохондриальной электрон-транспортной цепи на транскрипцию хлоропластных генов.

Инкубация растений в смеси ингибиторов ДМИБ+КСН приводила к подавлению в 2 и более раз скорости транскрипции хлоропластных генов: *atpB*, *atpH*, *ndhB*, *psaA*, *psbK*, *rnlK2*, *rnlL*, *ycf5* и в 4 раза генов: *psbA*, *psbD*, *rps16* (рис. 18). Для генов *petA*, *psbE*, *rbcL*, *ycf1* показана тенденция к повышению скорости транскрипции (рис. 18). Скорость транскрипции хлоропластных генов понижена при обработке растений ДМИБ, и добавление цианида калия не меняет скорость транскрипции.

Интересно, что синергический эффект наблюдается только для генов *psbA* и *psbD*, кодирующих белки ФСII.

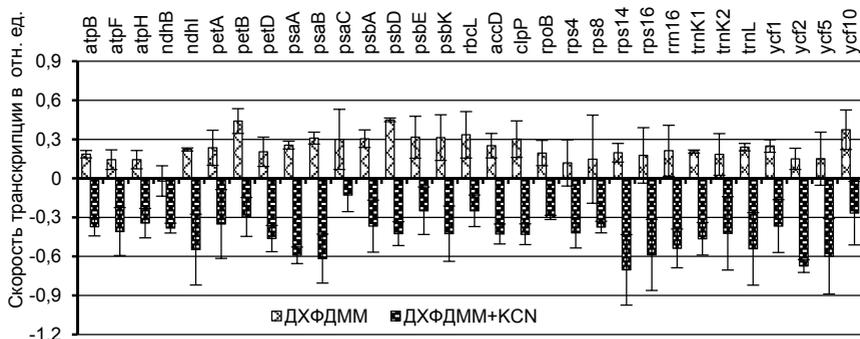


Рис. 17. Влияние ДХФДММ (10 мкМ) + KCN (1 мМ) на скорость транскрипции хлоропластных генов в 12-дневных проростках арабидопсиса. 12-дневные растения, выращенные при 130 мкмоль квантах $m^{-2}c^{-1}$, инкубировали на растворе ДХФДММ (10 мкМ) + KCN (1 мМ). Эффекты ингибиторов показаны по сравнению с водным контролем как десятичный логарифм, вычисленный от среднего значения транскрипционной активности всех исследованных хлоропластных генов как минимум 3 независимых экспериментов (0.3 указывает на двойное увеличение, -0.3 указывает на двойное уменьшение в интенсивности хлоропластной транскрипции). Двукратные различия транскрипционной активности в экспериментах рассматривались как достоверные.

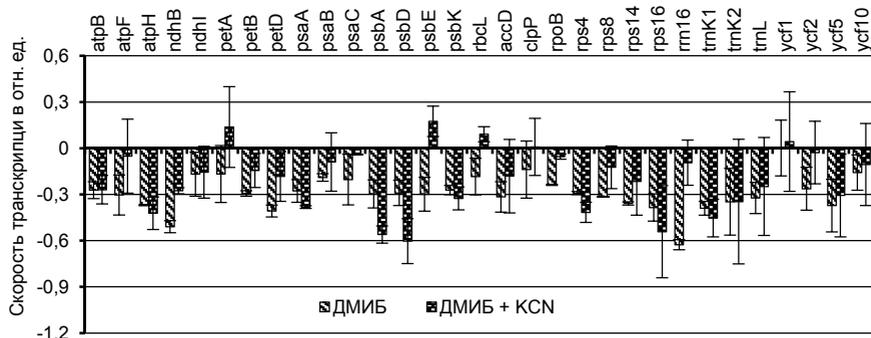


Рис. 18. Влияние ДМИБ (25 мкМ) + KCN (1 мМ) на скорость транскрипции хлоропластных генов в 12-дневных проростках арабидопсиса. 12-дневные растения, выращенные при 130 мкмоль квантах $m^{-2}c^{-1}$, инкубировали на растворах ДМИБ (25 мкМ) + KCN (1 мМ). Эффекты ингибиторов показаны по сравнению с водным контролем как десятичный логарифм, вычисленный от среднего значения транскрипционной активности всех исследованных хлоропластных генов как минимум 3 независимых экспериментов (0.3 указывает на двойное увеличение, -0.3 указывает на двойное уменьшение в интенсивности хлоропластной транскрипции). Двукратные различия транскрипционной активности в экспериментах рассматривались как достоверные.

На сегодняшний день существует достаточно много примеров редокс-регуляции экспрессии фотосинтетических генов, как ядерного, так и хлоропластного кодирования. Редокс-состояние пула пластохинона и АФК являются редокс-сигналами, которые управляют ядерной и хлоропластной экспрессией генов

(Pfannschmidt et al., 2001, Dietz, 2003). В нашей работе ингибирование ДХФДММ транспорта электронов через ФСII приводило к окислению всех следующих компонентов транспортной цепи и повышало скорость транскрипции хлоропластных генов. Подавление же комплекса цитохром b_6/f_6 в хлоропластах ДМИБ приводило к восстановлению пула пластохинона и понижало транскрипцию хлоропластных генов. Таким образом, наши данные подтверждают результаты более ранних работ и свидетельствуют о влиянии редокс-состояния пластохинона на транскрипцию хлоропластных генов.

Однако добавление KСN, ингибирующего перенос электронов в митохондриальной электрон-транспортной цепи, вместе с ДХФДММ снимало активирующий эффект хлоропластного ингибитора. Данная обработка приводила к понижению скорости транскрипции хлоропластных генов в 2–4 раза. Эти результаты могут говорить о том, что регуляция генов, ассоциированных с фотосинтезом, зависит как от фотосинтетического, так и от дыхательного транспорта электронов. При этом нарушение переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий имеет большее влияние на транскрипцию хлоропластных генов, нежели нарушение электронного транспорта в фотосинтетической электрон-транспортной цепи хлоропластов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе показано, что изменение редокс-состояния основного пути транспорта электронов, вызванное обработкой проростков арабидопсиса ингибиторами дыхания, влияет на экспрессию митохондриальных генов. В отличие от значительного снижения скорости транскрипции под влиянием ингибиторов цитохромного пути дыхания, обработка растений ингибитором альтернативной оксидазы салицилгидроксамовой кислотой, напротив, приводила к существенному возрастанию скорости транскрипции большинства генов. Примечательно, что ответы транскрипционных уровней и скорости транскрипции митохондриальных генов на ингибирование электрон-транспортной цепи отличались друг от друга во многих случаях. В то время как обработка салицилгидроксамовой кислотой положительно влияла на скорость транскрипции, она почти не влияла на содержание мРНК. Обработка цианидом калия сильно подавляла транскрипцию, но либо не имела эффекта, либо оказывала только слабое отрицательное влияние на содержание транскриптов. Обработка антимицином А подавляла скорость транскрипции всех митохондриальных генов, но приводила к увеличению содержания большей части мРНК, вызывая в то же время уменьшение уровня тРНК в 2–3 раза. Таким образом, мы показали существование двух механизмов, регулирующих митохондриальную экспрессию генов. Во-первых, скорость транскрипции и содержание транскриптов регулируются редокс-состоянием цитохромного пути переноса электронов, что приводит к различиям между действием антимицина А и цианида калия. Во-вторых, по-видимому, экспрессия митохондриальных генов регулируется через тесное взаимодействие цитохромного пути переноса электронов и альтернативного пути.

Кроме того, нами показано, что обработка срезанных растений арабидопсиса ингибиторами митохондриальной электрон-транспортной цепи приводит к снижению скорости транскрипции хлоропластных генов, причем данный эффект

наблюдается только в условиях освещения. Таким образом, в отсутствии световых реакций фотосинтеза, ингибирование дыхательной цепи митохондрий не влияет на скорость транскрипции хлоропластных генов. По-видимому, функции митохондрий в предотвращении сверхвосстановления фотосинтетической электрон-транспортной цепи во время темновых реакций фотосинтеза для хлоропластов не представляют значения. При этом степень понижения скорости транскрипции зависит от степени восстановленности дыхательной цепи митохондрий. Важно отметить, что ингибирование цитохромного и альтернативного путей в митохондриях приводило к разнонаправленным эффектам на скорость транскрипции митохондриальных генов, тогда как на скорость транскрипции хлоропластных генов эффект был однонаправленным.

Мы исследовали также интенсивность транскрипции ряда хлоропластных генов в трансгенных растениях арабидопсиса с пониженным и повышенным содержанием АОХ1а. В результате показано, что обработка этих растений ингибиторами основного и альтернативного путей переноса электронов приводит к разнонаправленным изменениям скорости транскрипции. Впервые получены данные, свидетельствующие о том, что транскрипционный аппарат хлоропластов способен напрямую реагировать на сигнал, связанный с изменением активности альтернативной оксидазы, локализованной в митохондриях. Наиболее вероятным кандидатом на роль такого сигнала представляются изменения концентрации восстановительных эквивалентов в хлоропластах. Полученные нами данные говорят в пользу этой гипотезы. Так, ингибирование как альтернативного, так и цитохромного пути дыхания (при работе каждого из которых расходуются восстановительные эквиваленты), и в особенности их обоих одновременно, приводит к снижению скорости транскрипции. Важно отметить, что повышенный уровень активности альтернативной оксидазы в трансгенных растениях, приводящий к возрастанию способности дыхательной цепи утилизировать восстановительные эквиваленты, нивелирует подавляющий транскрипцию эффект химического ингибирования цитохромного пути. В целом, полученные данные свидетельствуют в пользу существования механизма регуляции транскрипции хлоропластных генов, воспринимающего редокс-сигналы от альтернативного и основного путей митохондриального дыхания.

ВЫВОДЫ

1. Изменение редокс-состояния основного пути транспорта электронов, вызванное обработкой проростков арабидопсиса ингибиторами дыхания, влияет на экспрессию митохондриальных генов. Это влияние зависит от точки приложения ингибитора (комплекс III или IV) и отражается принципиально разным образом на скорости транскрипции и на содержании транскриптов тех же генов. Степень подавления транскрипции в ответ на ингибирование цитохромного пути существенно варьирует между генами, что говорит в пользу существования достаточно сложного механизма регуляции транскрипции в митохондриях арабидопсиса.

2. Интенсивность транскрипции большинства митохондриальных генов зависит от активности альтернативной оксидазы. В то время как ингибирование основного пути переноса электронов в митохондриях приводит к снижению скорости транс-

крипции, ингибирование альтернативной оксидазы митохондрий ведет к увеличению скорости транскрипции митохондриальных генов. Предполагается, что ингибирование потока электронов по цитохромному пути служит сигналом для подавления транскрипции генов, в то время как усиление этого потока, происходящее при ингибировании альтернативного пути, вызывает активацию транскрипции.

3. Изменение редокс-состояния основного пути транспорта электронов в митохондриях при обработке проростков ингибиторами дыхания приводит к снижению скорости транскрипции хлоропластных генов. Данный эффект наблюдается только в условиях освещения и полностью отсутствует в темноте, что свидетельствует в пользу роли этого регуляторного механизма в предотвращении сверхвосстановленного состояния хлоропластов на свету.

4. Одновременное ингибирование основного и альтернативного путей дыхания приводит к существенно более выраженному подавлению транскрипции хлоропластных генов. Повышенная активность альтернативной оксидазы в трансгенных растениях арабидопсиса полностью снимает подавляющий эффект ингибиторов цитохромного пути на хлоропластную транскрипцию. Полученные данные говорят об участии обоих путей дыхания в регуляции транскрипции хлоропластных генов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Катъшев А.И., Милешина Д.В., Шмаков В.Н., Черникова В.В., Потапова Т.В., Сидорчук Ю.В., Кулинченко М.В., Дейнеко Е.В., Дитриш А., Вайхе А., Бернер Т., Константинов Ю.М. Перенос генов в митохондрии табака в системах *in vitro* и *in vivo* // Материалы докладов в 2-х частях VII съезда Общ. физиол. раст. России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных технологий». – Нижний Новгород, 2011. – Ч. I. – С. 322–323.

2. Потапова Т.В., Зубо Я.О., Тарасенко В.И., Невинский Г.А., Бернер Т., Константинов Ю.М. Транскрипция митохондриальных генов арабидопсиса при нарушении работы дыхательной цепи митохондрий // Матер. Всероссийской научн. конф. «Факторы устойчивости растений в экстремальных условиях и техногенной среде» (10–13 июня 2013 г.). – Иркутск, 2013. – С. 197–200.

3. Потапова Т.В., Зубо Я.О., Тарасенко В.И., Невинский Г.А., Бернер Т., Константинов Ю.М. Изучение влияния окислительного стресса на транскрипцию митохондриальных генов у *Arabidopsis thaliana* // В сб. научн. тр. «Факторы экспериментальной эволюции организмов». – Киев: Логос, 2013. – Т. 12. – С. 157–161.

4. Потапова Т.В., Зубо Я.О., Ямбуренко М.В., Константинов Ю.М., Бернер Т. Влияние редокс-состояния дыхательной цепи митохондрий *Arabidopsis thaliana* на транскрипцию митохондриальных генов // Всеросс. научн. конф. с междунар. участием «Инновационные направления современной физиологии растений. Годичное собрание Общества физиологов растений России»: тез. докл. – М., 2013. – С. 126.

5. Константинов Ю.М., Потапова Т.В., Зубо Я.О., Тарасенко В.И., Гарник Е.Ю., Бернер Т. Редокс-сигналинг в регуляции экспрессии митохондриальных и ядерных генов растений // Матер. I Международного симп. «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений». – Казань, 2013. – С. 42.

6. Гарник Е.Ю., Бельков В.И., Тарасенко В.И., Потапова Т.В., Корзун М.А., Константинов Ю.М. (Garnik E.Yu., Belkov V.I., Tarasenko V.I., Potapova T.V., Korzun M.A.,

Konstantinov Yu.M.). Экспрессия гена глутаматдегидрогеназы *gdh2* арабидопсиса индуцируется под влиянием ингибитора синтеза тетрапирролов норфлуразона // Журнал стресс-физиологии и биохимии. – 2013. – Vol. 9, N 4. – P. 299–309.

7. Зубо Я.О., Потапова Т.В., Тарасенко В.И., Бернер Т., Константинов Ю.М. Интенсивность транскрипции хлоропластных генов арабидопсиса зависит от уровня активности альтернативной оксидазы в митохондриях // ДАН. – 2013 (принята к печати).

8. Zubo Y.O., Potapova T.V., Yamburenko M.V., Konstantinov M.V., Börner Th. Dysfunction of the electron transport strongly affects transcription and transcript levels in *Arabidopsis* mitochondria // Mitochondrion. – 2013 (submitted).

9. Потапова Т.В., Зубо Я.О., Тарасенко В.И., Бернер Т., Константинов Ю.М. Эффекты различных редокс-состояний дыхательной цепи митохондрий на транскрипцию митохондриальных генов *Arabidopsis thaliana* // Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология». – 2013 (в печати).

Подписано в печать ##.##.2013. Бумага офсетная. Формат 60x84¹/₁₆.

Гарнитура Таймс. Усл. печ. л. 1,4

Тираж 100 экз. Заказ № 086-13.

РИО НЦРВХ СО РАМН

(Иркутск, ул. Борцов Революции, 1. Тел 29–03–37. E-mail: arleon58@gmail.com)

