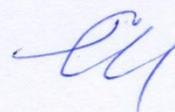


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ  
СИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



Горбенко Игорь Владимирович

**РОЛЬ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ДВОЙНОЙ АДРЕСАЦИИ PR0TMР  
*ARABIDOPSIS THALIANA* В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ  
ПЛАСТИД И МИТОХОНДРИЙ**

1.5.21 – физиология и биохимия растений

диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук,  
профессор  
Константинов Юрий  
Михайлович

Иркутск 2024

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ADP – аденозиндифосфат

AOX – альтернативная оксидаза (от Alternative Oxidase)

ATP – аденозинтрифосфат

BLRP – чувствительный к синему свету промотор гена psbD (от Blue Light Responsive psbD Promoter)

BN-PAGE – голубой нативный электрофорез в полиакриламидном геле (от Blue Native PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

CaMV – вирус мозаики цветной капусты (от Cauliflower Mosaic Virus)

CoQ – кофермент Q

cosRNA – кластеризованные органелльные короткие РНК (от clustered organellar short RNA)

FMN – флавинмононуклеотид

GLDH – глутаматдегидрогеназа

GO – генная онтология (от Gene Ontology)

GSEA – анализ обогащения наборов генов (от Gene Set Enrichment Analysis)

KEGG – энциклопедия генов и геномов Киото (от Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

LFC – логарифм по основанию 2 от кратности изменения уровня транскрипта относительно контрольного образца (от Log Fold Change)

NADH – никотинамидадениндинуклеотид

NEP – РНК-полимераза ядерного кодирования (от Nuclear-Encoded Polymerase)

NES – нормализованная оценка обогащения (от Normalized Enrichment Score)

OEM – митохондриальный гиперэкспрессор (от OverExpressor Mitochondrial)

OEP – пластидный гиперэкспрессор (от OverExpressor Plastid)

ORA – анализ избыточной представленности (от OverRepresentation Analysis)

ORF – открытая рамка считывания (от Open Reading Frame)

OXPPOS – окислительное фосфорилирование (от Oxidative PHOSphorylation)

PAP – 3'-фосфоаденозина-5'-фосфат

PEP – РНК-полимераза пластидного кодирования (от Plastid Encoded Polymerase)

ppGpp – гуанозин тетрафосфат

PPR – пентатрикопептидный повтор (от PentatrικοPeptide Repeat)

PTOX – пластидная терминальная оксидаза (от Plastid Terminal OXidase)

RPOT – РНК-полимераза фагового типа T3/T7 (от RNA-Polymerase of T3/T7 phage type)

RPOT<sub>m</sub> – РНК-полимераза фагового типа митохондриальной адресации

RPOT<sub>mp</sub> – РНК-полимераза фагового типа двойной направленности

RPOT<sub>p</sub> – РНК-полимераза фагового типа пластидной адресации

SDS – додецилсульфат натрия (от Sodium Dodecyl Sulphate)  
SDS-PAGE – электрофорез в денатурирующих условиях с SDS в полиакриламидном геле  
TPR – тетратрикопептидный повтор (от TetratrigoPeptide Repeat)  
АБК – абсцизовая кислота  
АТФ – аденозинтрифосфат  
АФК – активные формы кислорода  
ББВ – белок-белковые взаимодействия  
БД – база данных  
БС – brassinosteroids  
ГК – гибберелловая кислота  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены  
кПЦР – количественная полимеразная цепная реакция  
крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия  
КС – клеточная стенка  
логВР – логит-оценка взаимного ранга  
МКС – мембранные контактные сайты  
МОД – минимальное остовное древо  
МРС – митохондриальный ретроградный сигналинг  
мтДНК – митохондриальная ДНК  
МТЛ – митохондриальный трансмембранный липопротеидный комплекс  
мяРНК – малая ядрышковая РНК  
мяРНП – малый ядрышковый рибонуклеопротеид  
ОТ-кПЦР – обратнo-транскриптазная количественная полимеразная цепная реакция  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
рДНК – участок ДНК, кодирующий рибосомальные РНК  
рРНК – рибосомальная РНК  
РУБИСКО – рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа  
СВ – среда выделения  
СК – салициловая кислота  
СП – среда промывания  
тРНК – транспортная РНК  
ТФ – транскрипционный фактор  
ФЕП – фосфоенолпируват  
ФС – фотосинтез

хпДНК – хлоропластная ДНК

ХРС – хлоропластный ретроградный сигналинг

ЦМС – цитоплазматическая мужская стерильность

ЦПМ – цитоплазматическая мембрана

ЭТЦ – электронно-транспортная цепь

## СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	2
ВВЕДЕНИЕ .....	8
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	10
1.1 ДНК-содержащие органеллы растительной клетки.....	10
1.1.1 Функции митохондрий и хлоропластов в растительной клетке .....	10
1.1.2 Структурная организация митохондриального генома растений.....	11
1.1.3 Структурная организация пластидного генома растений .....	13
1.2 Особенности аппарата экспрессии генов растительных органелл.....	14
1.2.1 РНК-полимеразы фагового типа .....	14
1.2.2 Происхождение и эволюция РРОТ в различных организмах.....	15
1.3 Особенности транскрипции генов в растительных митохондриях.....	16
1.3.1 Митохондриальные промоторы .....	18
1.3.2 Транскрипционные факторы митохондрий .....	23
1.4 Особенности транскрипции генов в хлоропластах.....	24
1.4.1 Пластидные промоторы .....	26
1.4.2 Транскрипционные факторы хлоропластов.....	26
1.5 Роль NEP на ранних этапах развития растения.....	28
1.6 Взаимодействие генетических систем растительной клетки.....	29
1.6.1 Ядерный контроль экспрессии митогенома.....	29
1.6.2 Ядерный контроль экспрессии пластидного генома.....	33
1.6.3 Митохондриально-хлоропластные взаимодействия .....	34
1.6.4 Ретроградная регуляция экспрессии ядерных генов у растений .....	36
1.7 Особенности структурной организации и регуляции ЭТЦ митохондрий растений	39
1.7.1 Комплекс I .....	39
1.7.2 Комплекс II.....	43
1.7.3 Комплекс III .....	44
1.7.4 Комплекс IV и цитохром C.....	45
1.7.5 Комплекс V .....	45
1.7.6 Другие белки-участники ЭТЦ.....	46

1.7.7	Супрамолекулярная структура систем OXPHOS растений.....	47
1.7.8	Модели структурной организации дыхательной цепи .....	50
1.8	Трансгенные растения с измененной экспрессией RPOTmp .....	52
1.9	Заклучение обзора литературы .....	54
2.	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	56
2.1	Линии <i>Arabidopsis thaliana</i> использованные в работе.....	56
2.2	Биоинформатические методы .....	56
2.2.1	Получение данных методом ДНК-микрочипирования.....	56
2.2.2	Предварительная обработка данных.....	56
2.2.3	Визуализация диаграмм. ....	58
2.2.4	Анализ ко-экспрессии генов.....	58
2.2.5	Анализ избыточной представленности и обогащения наборов генов. ....	59
2.3	Выращивание стерильных растений на чашках Петри .....	59
2.4	Подготовка образцов, экстракция и оценка качества РНК .....	59
2.5	Обратно-транскриптазная ПЦР .....	60
2.5.1	Синтез первой цепи кДНК.....	60
2.5.2	Количественная ПЦР в реальном времени .....	60
2.6	Выделение митохондрий из зеленых проростков арабидопсиса .....	61
2.7	Выделение тилакоидных мембран .....	62
2.8	Солюбилизация митохондриальных и тилакоидных мембран.....	62
2.9	Электрофоретические методы .....	62
2.9.1	Электрофорез ДНК в агарозном геле .....	62
2.9.2	Белковый электрофорез .....	63
2.9.3	Определение активности дыхательных комплексов.....	63
2.10	Вестерн-блоттинг .....	63
2.11	Методы молекулярного клонирования .....	64
2.12	Статистическая обработка данных .....	66
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	67

3.1	Анализ транскриптома трансгенных линий с измененной экспрессией RPO <sub>Tmp</sub> ..	67
3.1.1	Характеристика профилей дифференциальной экспрессии исследуемых линий	67
3.1.2	Анализ обогащения Генной Онтологии (GO).....	69
3.1.3	Анализ обогащения метаболических путей KEGG.....	71
3.1.4	Экспрессия транскрипционных факторов.....	72
3.1.5	Экспрессия генов, кодирующих белки митохондрий.....	74
3.1.6	Экспрессия генов, кодирующих белки хлоропластов .....	79
3.1.7	Экспрессия маркерных генов органелльных нарушений.....	82
3.1.8	Экспрессия генов PPR-белков.....	83
3.1.9	Анализ ко-экспрессии генов.....	84
3.1.10	Анализ скоррелированной экспрессии сетевыми методами.....	89
3.1.11	Синтез комбинированных генных сетей .....	93
3.2	Характеристика прорастания растений линий с гиперэкспрессией RPO <sub>Tmp</sub> .....	94
3.3	Изучение супрамолекулярной организации дыхательной цепи митохондрий и хлоропластов в линиях с гиперэкспрессией RPO <sub>Tmp</sub> .....	97
3.3.1	Характеристика ЭТЦ митохондрий исследуемых линий методом голубого нативного электрофореза .....	97
3.3.2	Характеристика супрамолекулярной организаций ЭТЦ митохондрий исследуемых линий методом двумерного BN/SDS электрофореза .....	100
3.3.3	Характеристика состава суперкомплексов ЭТЦ митохондрий исследуемых линий методом иммуноблоттинга.....	102
3.4	Характеристика белковых комплексов тилакоидов исследуемых растительных линий методом голубого нативного электрофореза .....	104
3.5	Создание генетических конструкций.....	104
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	109
	ВЫВОДЫ .....	113
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	114
	ПРИЛОЖЕНИЯ.....	150

## ВВЕДЕНИЕ

У двудольных растений, включая арабидопсис, транскрипцию генов митохондриального и пластидного геномов осуществляют три импортируемые из цитозоля РНК-полимеразы фагового типа (NEP-полимеразы, от Nuclear Encoded Polymerase): RPOТm, RPOТp и RPOТmp (Tracy et al., 1995; Weihe, 2004). Первые две осуществляют транскрипцию исключительно митохондриальных либо пластидных генов соответственно. RPOТmp имеет двусмысленный транзитный пептид, позволяющий импорт фермента из цитозоля как в митохондрии, так и в хлоропласты, и участвует в транскрипции генов обеих органелл (Hedtke et al., 2000; Baba et al., 2004; Courtois et al., 2007; Kühn et al., 2009). Роль RPOТmp в митохондриальной транскрипции подтверждается многими исследованиями: нокаут RPOТmp приводит к снижению уровней транскриптов генов субъединиц дыхательных комплексов I и IV и характерному фенотипу (замедленный рост и развитие). В то же время, четкого разделения генов митохондрий на RPOТm-зависимые и RPOТmp-зависимые обнаружено не было (Kühn et al., 2009).

Функция RPOТmp в пластидах двудольных растений является предметом дискуссии (Baba et al., 2004; Hricova et al., 2006; Courtois et al., 2007; Borner et al., 2015). Гены пластидного генома низших растений, включая водоросли, за исключением *Physcomitrella*, транскрибируются с участием мультисубъединичного фермента эубактериального типа – PEP-полимеразы (от Plastid Encoded Polymerase). Является ли преимуществом использование РНК-полимераз фагового типа, дополнительно к PEP-полимеразе, для транскрипции генов пластидного генома покрытосеменных растений, остается неясным. Гены пластид и митохондрий часто находятся под управлением нескольких различных промоторов, что предполагает конкурирующую или совместную транскрипцию генов различными типами ферментов (Nagashima et al., 2004a; Loschelder et al., 2006; Courtois et al., 2007; Swiatecka-Hagenbruch et al., 2007; Kühn et al., 2009; Tan et al., 2010; Zhelyazkova et al., 2012). Поскольку локализация и активность RPOТmp связана с двумя несущими собственным геном органеллами, очень различающимися по своим структуре и функциям, выяснение роли RPOТmp в осуществлении ядерного контроля транскрипции органелльных генов представляет собой значительный интерес. В то же время, двойная локализация RPOТmp делает решение данной проблемы весьма затруднительным, в особенности на уровне *in vivo*.

Целью диссертационного исследования являлось изучение роли RPOТmp в регуляции экспрессии белков митохондриальной и пластидной адресации, с использованием трансгенных растений арабидопсиса, экспрессирующих РНК-полимеразу с адресацией в один из типов органелл, мутантной линии *rpotmp*, а также трансгенных линий с комплементацией функций RPOТmp в митохондриях или пластидах. Проведено изучение влияния повышенного содержания

РНК-полимеразы *RPOTmp* в митохондриях и хлоропластах растений арабидопсиса с гиперэкспрессией РНК-полимеразы *RPOTmp* на транскриптом, а также на рост и развитие растений. Исследована роль *RPOTmp* в регуляции раннего развития растений арабидопсиса под действием факторов, оказывающих влияние на прорастание семян (абсцизовая кислота, солевой стресс). Полученные результаты указывают на роль как самой РНК-полимеразы двойной направленности, так и продуктов транскрипции, образующихся с ее участием, в ретроградном/антероградном сигналинге. Результаты исследований состава и содержания митохондриальных дыхательных комплексов в линиях с измененной экспрессией *RPOTmp* с помощью BN-PAGE позволяют предположить, что роль *RPOTmp* может быть связана с экспрессией генов, участвующих в регуляции супрамолекулярной организации дыхательной цепи митохондрий. Результаты исследования могут стать основой для создания модельной системы трансформации митохондрий растений *in vivo*.

Трансформация митохондрий *in vivo* является одной из нерешенных, нетривиальных и важных задач, решение которой может явиться перспективным вкладом в такие научные направления, как контроль за распространением трансгенных растений в сельскохозяйственной практике посредством направленного введения в них признака цитоплазматической мужской стерильности. Одной из основных проблем трансформации митохондрий *in vivo* является отсутствие гена-репортера, позволяющего осуществлять селекцию трансформированных митохондрий. Использование мутанта по *RPOTmp* в качестве селективного реципиента генетических конструкций, содержащих ген *RPOT2* дикого типа и целевой ген, может стать перспективным подходом для решения этой сложной задачи.

Результаты работы были представлены на 4 международных научных конференциях (PlantGen2019, BGRS-SB 2020, PlantGen2021, Chromosoma2023), опубликованы в виде 3 статей (Tarasenko et al., 2019; Tarasenko et al., 2023; Gorbenko et al., 2024), представлены на отчетной сессии института (2023).

# 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 ДНК-содержащие органеллы растительной клетки

### 1.1.1 Функции митохондрий и хлоропластов в растительной клетке

Первичной функцией митохондрий растительной клетки является дыхание – катаболический процесс, при котором окисление субстрата сопряжено с синтезом АТФ, т.н. окислительное фосфорилирование. Помимо этого, митохондрии принимают участие в различных клеточных процессах, связанных с метаболизмом углерода, азота, фосфора и серы, а также в клеточном сигналинге и в реакции на стресс.

Функционирование митохондрий в процессе дыхания осуществляется в 3 этапа: (1) транслокация субстратов и кофакторов дыхания внутрь митохондрии из цитоплазмы (а также обратное высвобождение продуктов дыхания) посредством мембранных переносчиков и каналов; (2) окислительное декарбоксилирование органических кислот и восстановление NAD(P) и FAD до NAD(P)H и FADH<sub>2</sub> в ходе реакций цикла Кребса; (3) реакции окисления NAD(P)H и FADH<sub>2</sub> в электрон-транспортной цепи в сопряжении с восстановлением O<sub>2</sub> и формированием протонного градиента между матриксом и межмембранным пространством, который используется для синтеза АТФ.

Альтернативная оксидаза и ротенон-нечувствительные NAD(P)H-дегидрогеназы позволяют изменить связь цикла Кребса и ЭТЦ, что способствует осуществлению анаплеротической функции митохондрий – снабжению клетки промежуточными продуктами (например ФЕП) (Jacoby et al., 2012).

Растения получают азот, в основном, в форме NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, транспортируемый через плазмалемму в симпорте с H<sup>+</sup>, за счет энергии АТФ, производимого, в основном, митохондриями. NO<sub>3</sub><sup>-</sup> восстанавливается с участием NADH-зависимой нитратредуктазы, для работы которой NADH в основном поставляется в цитозоль митохондриями и хлоропластами. В митохондриях, в ходе реакций, катализируемых глициндекарбоксилазным комплексом и серингидроксиметилтрансферазой, высвобождаются NADH и NH<sub>3</sub>, при этом NH<sub>3</sub> подвергается реассимиляции с участием глутамин-синтетазы, фермента двойной адресации – митохондриальной и пластидной (Szal et al., 2012).

Митохондрии фотосинтетически-активных тканей принимают участие в фотодыхании, при котором поглощение кислорода происходит в хлоропластах (оксигеназная активность РУБИСКО), а CO<sub>2</sub> высвобождается в митохондриях с участием глициндекарбоксилазного комплекса (в данном случае происходит образование NADH). При этом цикл Кребса в значительной степени переходит в гемицикл и основным субстратом ЭТЦ становится именно NADH, синтезируемый глициндекарбоксилазным комплексом (Braun, 2020). При фотодыхании

может потребоваться повышенная способность митохондрий к окислению NADH, что частично достигается при помощи альтернативных NAD(P)H-дегидрогеназ (синтез части из них имеет свето-зависимый характер) (Rasmusson et al., 2008; Rasmusson et al., 2020).

В митохондриях происходит биосинтез *de novo* железо-серных кластеров (с использованием серы из молекул цистеина, а также атомов железа), которые входят в состав комплексов I, II и III, а также некоторых белков и комплексов матрикса (Przybyla-Toscano et al., 2020).

Также в митохондриях происходит катаболизм многих аминокислот, которые превращаются в прекурсоры и промежуточные продукты цикла Кребса (Hildebrandt et al., 2015).

Основной функцией хлоропластов является фотосинтез, однако они принимают участие и во многих других процессах: фотодыхание, биосинтез хлорофилла, каротиноидов, альфа-токоферола (вит. E), пластохинона и филлохинона (вит. K), жирных кислот и липидов, гормонов, ассимиляция азота и биосинтез аминокислот, метаболизм серы и кислорода, хлородыхание, а также разнообразный ретроградный сигналинг (Lancien et al., 2006; Pilon-Smits et al., 2006; Andersson et al., 2009; Suzuki, 2021).

Процесс фотосинтеза, протекающий в хлоропластах, состоит из светозависимых (световых) и светонезависимых (темновых) реакций. В ходе световых реакций происходит (1) улавливание фотонов антеннами светособирающего комплекса, возбуждение хлорофиллов и передача электронов по электрон-транспортной цепи тилакоидов, (2) фотолиз воды, восстановление NADP<sup>+</sup> и генерация протонного градиента, который используется для синтеза АТФ. В ходе темновых реакций происходит ассимиляция углекислого газа и синтез углеводов (цикл Кальвина) (Gloor et al., 2022).

В дополнение к фотосинтетической электрон-транспортной цепи, тилакоидные мембраны содержат дыхательные комплексы, способные к окислению/восстановлению пула пластохинонов и осуществляющие хлородыхание – NDH-комплекс, родственному комплексу I митохондрий, и РТОХ – пластидную терминальную оксидазу, родственную АОХ. В отличие от митохондриального дыхания, роль хлородыхания заключается не в синтезе АТФ, а в циклизации потока электронов вокруг фотосистемы I, фотопротекции и биосинтезе каротиноидов. Хлородыхание также происходит в нефотосинтезирующих пластидах (Nixon et al., 2006).

Растения способны синтезировать все 20 протеиногенных аминокислот, и большинство стадий их биосинтеза происходит в пластидах, для чего используются АТФ и восстановительные эквиваленты, непосредственно полученные от солнечного света с помощью фотосистем I и II.

### **1.1.2 Структурная организация митохондриального генома растений**

В отличие от других организмов, митохондриальная ДНК растений имеет гораздо

большие размеры и значительно большую вариабельность длины и структурной организации. Кроме того, митохондрии ряда растений содержат плазмиды, которые реплицируются независимо от основной митохондриальной ДНК. Скорость эволюции мтДНК у растений значительно ниже, чем у животных, вероятно по причине наличия активной системы рекомбинации ДНК. События обширной гомологичной рекомбинации мтДНК растений происходят с высокой частотой и способствуют ее реорганизации (Chevigny et al., 2020).

Размер митохондриального генома большинства цветковых растений составляет около 200-750 т.п.н. (в отличие от 15-17 т.п.н. у животных). Однако вследствие высокой пролиферации мобильных генетических элементов, увеличения количества и длины интронов, встройки чужеродной ДНК (ядерной, пластидной, вирусной или бактериальной) структура и размеры мтДНК растений достаточно вариативны – например у огурца *Cucumis sativus* имеется 3 митохондриальных хромосомы – 1156, 84 и 45 т.п.н. (Alverson et al., 2011), а у *Silene conica* размер митогенома – 11,3 м.п.н., и он организован в 128 кольцевых молекул. При этом основную массу растительной мтДНК составляют именно некодирующие последовательности (Sloan et al., 2012).

Копийность митогенома у растений значительно ниже, чем у животных, и сильно различается в зависимости от стадий развития или анализируемой ткани. Так, например, максимальная копийность гена *ATP1* у арабидопсиса была около 280 копий на клетку, что меньше, чем среднее количество митохондрий на клетку (около 450). Из чего следует, что в митохондриях растений митогеном может быть неполным или вовсе отсутствовать (Preuten et al., 2010).

Несмотря на то, что мтДНК, как правило, представляют в виде мастер-хромосомы, такая ее организация в живой клетке встречается редко (Gualberto et al., 2014; Kozik et al., 2019; Fuchs et al., 2020). Митогеном растений содержит крупные прямые и инвертированные повторы, по которым часто происходит рекомбинация и перестановки мтДНК (например, повторы 6,5 и 4,2 т.п.н. мтДНК арабидопсиса (Klein et al., 1994)). Рекомбинация происходит и по небольшим повторам, но значительно реже. Таким образом, митохондриальная ДНК, вероятнее всего, представлена совокупностью интермедиатов рекомбинаций, конкатемерами, субгеномными кольцевыми молекулами и плазмидами. Некоторая часть мтДНК существует в одноцепочечной форме (показано для *Chenopodium album*) (Backert et al., 1997).

Митогеном существует в виде нуклеоида – нуклеопротеидных частиц, заякоренных на внутренней мембране (Kucej et al., 2007). Роль нуклеоида – в компактизации ДНК, регуляции ее метаболизма и транскрипционной активности, а его внешние компоненты (например АТАD3, РНВ1, РНВ2) участвуют в сигнальных механизмах (Gilkerson et al., 2013). Причем нуклеоиды растительных митохондрий содержат много белков, связывающихся с одноцепочечной ДНК. Некоторые белки нуклеоида имеют двойную адресацию и функционируют также в пластидах.

Все белки нуклеоида митохондрий арабидопсиса имеют ядерное кодирование (Gualberto et al., 2014).

Генетический состав митогенома арабидопсиса приведен в Табл. 1. В мтДНК арабидопсиса содержится 32 белок-кодирующих гена, 254 нкРНК, 3 рРНК (5S, 18S, 26S), 14 тРНК (все, кроме тРНК Ala, Val, Leu, Phe, Thr, Arg), 109 повторов и 74 открытых рамки считывания (Sloan et al., 2018). Размер мтДНК арабидопсиса – 367808 п.н. Некодирующие РНК, в основном, представлены кластеризованными органелльными короткими РНК (clustered organellar short RNAs, cosRNAs), которые связаны с работой РНК-связывающих белков, защищающих органелльные мРНК от деградации (Ruwe et al., 2016).

Таблица 1

Генетический состав митогенома арабидопсиса

Система	Комплекс	Ген
Дыхательная цепь	I	<i>Nad1, Nad2, Nad3, Nad4, Nad4l, Nad5, Nad6, Nad7, Nad9</i>
	III	<i>CoB</i>
	IV	<i>Cox1, Cox2, Cox3</i>
	V	<i>Atp1, Atp4, Atp6, Atp8, Atp9</i>
		<i>CcmB, CcmC, CcmFn (1,2), CcmFc</i>
Трансляция	Рибосомальные белки	<i>Rps3, Rpl16, Rps7, Rps4, Rpl5, Rpl2, Rps12,</i>
Другие белки		<i>MatR, MttB</i>

### 1.1.3 Структурная организация пластидного генома растений

Пластидный геном растений имеет размеры в пределах 120 т.п.н. – 2 м.п.н. и содержит 80-100 генов (de Vries et al., 2018). Копийность пластидного генома варьирует в зависимости от типа ткани, конкретной локализации клеток и стадии развития. Например, в клетках мезофилла зеленых листьев она достигает 2-50 тыс. копий на клетку (Krupinska et al., 2013).

Как и в случае с митохондриальным геномом, пластидный геном редко представлен в виде кольцевой мастер-хромосомы, например у *Z. mays* 95% хпДНК существует в линейной разветвленной форме. Размеры и организация хпДНК неоднородны и вероятно регулируются в процессе развития растения (Kim et al., 2009a; Oldenburg et al., 2015).

Нуклеоиды хлоропластов высших растений высокодинамичны в отношении количества отдельных единиц, белкового состава и структуры. Нуклеоид состоит из собственно хпДНК, белков и РНК, и участвует в репарации, репликации, рекомбинации, транскрипции и пост-транскрипционном контроле экспрессии генов. Размеры и позиция субпопуляций нуклеоидов хорошо отражают их различную ферментативную активность. Нуклеоиды неоднородны и имеют слоистую структуру – около половины всей хпДНК упаковано в составе центрального тела нуклеоида, имеющего более плотную упаковку. Однако, даже плотно упакованная хпДНК может

активно транскрибироваться (Krupinska et al., 2013).

Одной из самых распространенных особенностей пластидных геномов является наличие повторов, содержащих гены рРНК (т.н. рДНК), которые формируют структуру, состоящую из двух инвертированных повторов, малой и большой неповторяющихся последовательностей. Обычно рДНК-содержащий повтор содержит 3 гена рРНК (*Rns*, *Rnl*, *Rrn5*) и 2 тРНК (*Trn-Ala*, *Trn-Phe*), но может содержать от 4 до 161 гена. Повторы редко идентичны, но очень похожи и в значительной степени подвержены коэволюции (Kim et al., 2009a; Oldenburg et al., 2015). Область рДНК имеет сложную регуляцию на транскрипционном и пост-транскрипционном уровнях.

Пластидный геном арабидопсиса имеет размер 154478 п.н. и содержит 87 белок-кодирующих генов, 4 рРНК, 37 генов тРНК, пару инвертированных повторов по 26264 п.н., малую и большую неповторяющиеся последовательности 17780 и 84170 п.н. соответственно (Sato et al., 1999). Состав белок-кодирующих генов пластидного генома приведен в таблице 2.

Таблица 2

Состав белок-кодирующих генов хлДНК арабидопсиса.

Система	Комплекс	Ген
Фотосинтез	ФСII	<i>PsbA, PsbK, PsbI, PsbM, PsbD, PsbC, PsbZ, PsbJ, PsbL, PsbF, PsbE, PsbB, PsbT, PsbN, Psbh</i>
	ФСI	<i>PsaA, PsaB, Ycf3, PsaI, Ycf4, PsaJ, Ycf2, YcfI, PsaC</i>
	Цитохром b6/f	<i>PetN, PetA, PetL, PetG, PetB, PetD</i>
Транскрипция	РНК-полимераза	<i>RpoC2, RpoC1, RpoB, RpoA</i>
Трансляция	Рибосомальные белки	<i>Rps16, Rps2, Rps14, Rps4, Rpl33, Rps18, Rpl20, Rps12, Rps11, Rpl36, Rps8, Rpl14, Rpl16, Rps3, Rpl22, Rps19, Rpl2, Rpl23, Rps7, Rps12, Rpl32, Rps15</i>
Фотофосфорилирование	АТФ-синтаза	<i>AtpA, AtpF, AtpH, AtpI, AtpE, AtpB</i>
Хлородыхание	NADH-дегидрогеназа	<i>NdhJ, NdhK, NdhC, NdhB, NdhF, NdhD, NdhE, NdhG, NdhI, NdhA, NdhH</i>
Другие белки		<i>CemA, ClpP, CcsA, AccD, RbcL, MatK</i>

## 1.2 Особенности аппарата экспрессии генов растительных органелл

### 1.2.1 РНК-полимеразы фагового типа

Экспрессия генов митохондриального и хлоропластного генома осуществляется достаточно сложными транскрипционными механизмами (Liere et al., 2011b). В хлоропластных геномах водорослей и высших растений присутствуют гены *RpoA*, *RpoB*, *RpoC1* и *RpoC2*, кодирующие основные субъединицы РНК-полимеразы цианобактериального типа, называемой сокращенно РЕР (Plastid Encoded Polymerase) (Lysenko et al., 2005; Shiina et al., 2005). В митохондриях всех эукариот, за исключением гетеротрофных эскаватных жгутиконосцев

(например *Reclinomonas americana*), РНК-полимераза бактериального типа в ходе эволюции была утрачена и замещена моносубъединичными ферментами ядерного кодирования, гомологичными РНК-полимеразам фагов типа Т3/Т7 (называемыми NEP-полимеразами, от nuclear encoded polymerase), обозначаемыми обычно RPOT (от RNA polymerase of the T-phage type) (Tracy et al., 1995; Weihe, 2004).

РНК-полимеразы RPOTm и RPOTp осуществляют транскрипцию только митохондриальных и хлоропластных генов соответственно, тогда как RPOTmp имеет двойную адресацию и участвует в транскрипции генов обеих органелл (Hedtke et al., 2000; Baba et al., 2004; Courtois et al., 2007; Kühn et al., 2009). Уровень транскрипции всех трех генов RPOT сравнительно невысок во всех органах, наибольшая экспрессия RPOT наблюдается в цветках (Emanuel et al., 2006).

### 1.2.2 Происхождение и эволюция RPOT в различных организмах

RPOT не родственны мультисубъединичным РНК-полимеразам, функционирующим у бактерий, архей и в ядре эукариот. Полагают, что изначально они произошли от ДНК-полимеразы или от обратной транскриптазы (Sermakian et al., 1997). Обнаружение в геномах некоторых альфа-протеобактерий криптических последовательностей профагов позволяет предположить, что уже эволюционные предки митохондрий могли содержать ген RPOT. В процессе симбиогенеза последовательность гена могла быть перемещена в ядро, после чего, возможно, произошла его реактивация и переадресация в митохондрии (Liere et al., 2011a). Появление пластидной адресации RPOT произошло значительно позже в результате дубликации гена RPOT митохондриальной адресации в процессе эволюции покрытосеменных растений (Sato, 2006). Гены, подобные RPOT, были также обнаружены в линейных митохондриальных плаزمиде высших растений, однако данные филогенетического анализа говорят о том, что эволюция этих генов и ядерных RPOT происходила индивидуально (Handa, 2008).

Последовательности RPOT эукариот похожи между собой и на РНК-полимеразы фагов типа Т3 и Т7. Структурно Т7-РНК-полимераза схожа с ДНК-зависимыми ДНК-полимеразами семейства POL1/POLA, с обратными транскриптазами (RT) и с РНК-зависимыми РНК-полимеразами (RdRP). Митохондриальные и пластидные РНК-полимеразы RPOT имеют широкие консервативные участки с фаговыми РНК-полимеразами, в то время как с ДНК-полимеразами, обратными транскриптазами и РНК/РНК-полимеразами их сходство ограничивается высококонсервативными аминокислотами в некоторых мотивах (Souza, 2013).

Последовательности RPOT длиннее последовательностей Т7 РНК-полимераз за счет N-концевых инсерций (но у *S. cerevisiae* имеется инсерция на С-конце). С-концевой домен определяет каталитическую активность фермента и достаточно консервативен (Рис. 1). В отличие

от Т7 РНК-полимераз, RPOT нуждаются в дополнительных белках (например ТФ пластидной рДНК – CDF2) (Liere et al., 2011a).

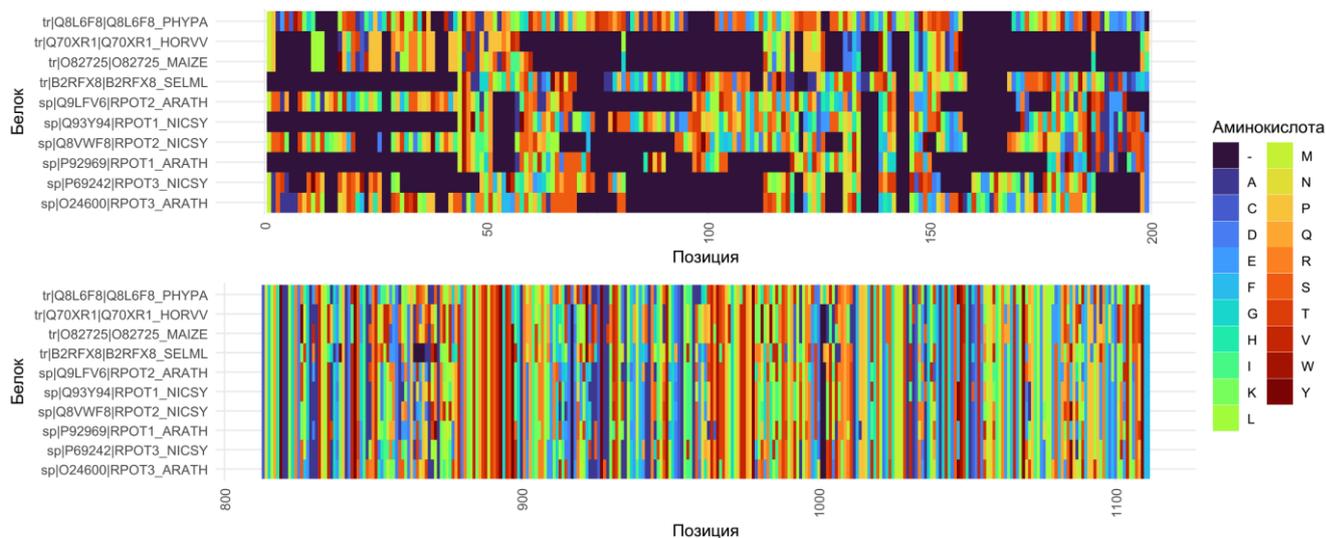


Рис. 1. Множественное выравнивание ClustalOmega последовательностей некоторых белков типа RPOT различных организмов. Показаны первые 200 аминокислот (N-конец) и последние 200 аминокислот (C-конец) выравнивания.

Гены RPOT представлены в ядерных геномах различных фотосинтезирующих организмов. Зеленые водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, *Ostreococcus tauri*, *Thalassiosira pseudonana* (Maier et al., 2008) и плауновидное растение *Selaginella moellendorffii* (Yin et al., 2009) обладают только одним ядерным геном RPOT, кодирующим митохондриальную РНК-полимеразу (RPOTm). Ядерные геномы злаковых содержат два гена RPOT (Chang et al., 1999b; Kusumi et al., 2004), один из которых кодирует митохондриальную РНК-полимеразу (RPOTm), другой – пластидную (RPOTp). Мох *Physcomitrella patens* обладает тремя генами RPOT – митохондриальной РНК-полимеразы (RPOTm) и двух ферментов двойной адресации – митохондриальной и пластидной (RPOTmp1, RPOTmp2) (Richter et al., 2014). РНК-полимеразы двойной адресации RPOTmp идентифицированы в настоящих двудольных растениях, таких как *Chenopodium album* (Weihe et al., 1997), *Arabidopsis thaliana* (Hedtke et al., 1997; Hedtke et al., 2000), *Nicotiana tabacum* (Hedtke et al., 2002), *Nicotiana glauca* (Kobayashi et al., 2001) и *Spinacia oleracea* (Azevedo et al., 2006). В настоящее время известно как минимум 43 вида, содержащие RPOTmp, включая также: *Beta vulgaris*, *Brassica rapa*, *Daucus carota*, *Malus domestica*, *Solanum tuberosum*, *S. lycopersicum*, *Cucurbita maxima* и *Theobroma cacao*. Всего на данный момент среди зеленых растений идентифицировано 362 гена RPOT (включая все известные изоформы, согласно БД UNIPROT ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org))).

### 1.3 Особенности транскрипции генов в растительных митохондриях

По данным исследований (Kühn et al., 2009) и (Tan et al., 2010) у настоящих двудольных в

качестве основной РНК-полимеразы, необходимой для транскрипции большинства митохондриальных генов, является *RPOTm*. Среди всех *RPOT*, уровень транскриптов *RPOTm* наиболее высок во всех органах растения, за исключением зрелых листьев, где уровень транскрипта *RPOTp* выше (Emanuel et al., 2006). В работе (Tan et al., 2010) были описаны мутанты *A. thaliana* по гену *RPOTm* с дефектами в мужском гаметофите, и было показано, что развитие мутантного эмбриона *rpotm* прекращается на глобулярной стадии. Авторы попытались повлиять на фенотип мутанта *rpotm* при помощи гиперэкспрессии в нем *RPOTmp* под контролем промотора *RPOTm* и обнаружили, что *RPOTmp* может частично восстанавливать потерю функции *RPOTm*, но ее активности недостаточно, чтобы поддерживать нормальное развитие гаметофита и эмбриона. Тем не менее, согласно анализу мутантов арабидопсиса по *RPOTm* (Tan et al., 2010), обе РНК-полимеразы, *RPOTm* и *RPOTmp*, могут играть свою роль в развитии растений, особенно важную при гаметогенезе: двойной мутант *rpotm rpotmp* отличался еще большим усилением фенотипа мутанта *rpotm* – он демонстрировал почти полное отсутствие женского гаметогенеза и критические нарушения образования пыльцы и прорастания (Tan et al., 2010).

О разделении в транскрипционной активности между *RPOTm* и *RPOTmp* в митохондриях известно немного. Анализ транскрипции *in vitro* (Kuhn et al., 2007) показал, что синтез мРНК с участием *RPOTm* и *RPOTmp* происходит с перекрывающегося набора промоторов. При этом именно рекомбинантная *RPOTm*, но не *RPOTmp* специфически распознает митохондриальные промоторы: РНК-полимераза *RPOTm* инициировала транскрипцию с большинства тестированных митохондриальных промоторов, в то время как *RPOTmp* лишь с трех из них (Kuhn et al., 2007), указывая на то, что в способности к инициации транскрипции с митохондриальных промоторов между *RPOTm* и *RPOTmp* существуют большие различия.

В работах по исследованию мутантов арабидопсиса по гену *RPOT2*, кодирующему *RPOTmp* (Baba et al., 2004; Kühn et al., 2009), было показано, что для них характерен ряд отличных от растений дикого типа фенотипических и молекулярно-биологических признаков. Растения мутантной линии арабидопсиса *rpotmp* проявляют фенотипические нарушения развития: замедленный рост, укорочение корней, изменение формы и размеров листьев, а также понижение уровня транскрипции ряда митохондриальных генов, *MatR*, *Nad1*, *Nad2*, *Nad6*, *Cox1*, *Rps4* и др. (Kühn et al., 2009). Различия в профилях митохондриальных транскриптов в растениях мутантной линии *rpotmp* и растениях дикого типа остаются стабильными при развитии растений от проростков до образования розеток листьев, а для некоторых мРНК, таких как *MatR*, различия оказываются даже более выраженными на более поздних стадиях развития растения (Kühn et al., 2009). Снижение количества ряда митохондриальных транскриптов приводит к снижению активности комплексов дыхательной цепи I и IV в мутантных растениях *rpotmp*, при этом аппарат

синтеза белка в митохондриях мутанта остается не нарушенным (Kühn et al., 2009). Эти результаты указывают на особую роль RPOTmp в экспрессии генов, участвующих в формировании комплексов I и IV в митохондриях. В работе (Kühn et al., 2009) показано также, что снижение транскрипции определенных митохондриальных генов в растениях *rpotmp* не связано с изменениями в частоте использования конкретных промоторов, что подтверждает установленное *in vitro* (Kuhn et al., 2007) отсутствие промоторной специфичности для активности RPOTmp в митохондриях. Транскрипция в мутантных растениях *rpotmp* инициировалась с тех же промоторов, что и в растениях дикого типа, а уменьшение количества транскриптов для всех генов со сниженной экспрессией в мутантах происходило со всех промоторов этих генов. Анализ промоторов генов, которые менее активно транскрибировались в *rpotmp*, сопоставление их с промоторами других митохондриальных генов не выявили в промоторных последовательностях каких-либо специфических мотивов для RPOTmp (Kühn et al., 2009). Исходя из этого, авторы высказали предположение, что функции RPOTmp, по крайней мере, в митохондриях, являются специфичными не в отношении промоторов, а в отношении генов.

### 1.3.1 Митохондриальные промоторы

#### *Вариативность размеров транскрипционных единиц.*

Большинство кодирующих областей в митохондриальных геномах растений разделены обширными участками последовательностей некодирующей ДНК (размерами до несколькими т.п.н.) (Leaver et al., 1982; Newton, 1988; Lonsdale, 1989; Bonen, 1991; Gray et al., 1992; Schuster et al., 1994). Такая организация подразумевает, что большая часть важной кодирующей информации экспрессируется в виде моноцистронных транскриптов с отдельных промоторов, например, генов *Atp6*, *Atp9*, *CoB*, *Cox1*, *Cox2* и *Cox3* у большинства растений. Фактические размеры мРНК, как правило, намного превышают размеры последовательностей кодирующих областей генов, и включают в себя расширенные некодирующие 5'- и 3'- транскрибируемые участки, содержащие нескольких сотен нуклеотидов. Частые рекомбинации в митохондриальных геномах растений приводят к тому, что гены, которые находятся далеко друг от друга в митогеноме одного вида, могут быть расположены в непосредственной близости у другого вида. Близко расположенные друг к другу гены почти всегда показывают ко-транскрипцию (Liu et al., 1992), такие как гены *Rrn18s* и *Rrn5s* или *Nad3* и *Rps12*. Транскрибируемые спейсеры, например, между генами, кодирующими 18S и 5S рРНК, различаются у разных видов растений, варьируя от 100 нт до более 500 нт (Wissinger et al., 1988; Maloney et al., 1990). В митохондриях *Oenothera* обнаружена одна из самых длинных полицистронных транскрипционных единиц *Rrn18s-Rrn5s-Nad5* включающая две рибосомальные РНК и первые два экзона гена *Nad5* (Wissinger et al., 1988). Митохондриальный геном печеночника *Marchantia*, имеющий размер всего 187 т.п.н. и типичные

для высших растений суммарные размеры кДНК, в значительной степени сохранил кластеры генов рибосомных белков прокариотического типа, которые, вероятно, транскрибируются в большие полицистронные пре-мРНК (Oda et al., 1992; Nozato et al., 1993).

Считается, что стабильно транскрибируемая фракция представляет собой лишь около трети митохондриального генома у высших растений, например, у *Brassicaceae* и *Curcubitaceae* (Makaroff et al., 1987). Эта популяция РНК со стабильной экспрессией представляет собой транскрипт митохондриальных генов, общих для всех растительных организмов. Оставшиеся 70% митохондриального генома растений, по-видимому, составляют последовательности, полученные частично из хлоропластной ДНК и ядерных последовательностей, частично, в результате дупликаций митохондриальных последовательностей, в различной степени дегенерированных, и не несут существенной информации. Эти последовательности иногда транскрибируются, но в популяции стабильных транскриптов, в основном, экспериментально не обнаруживаются (Fejes et al., 1988). Исключение составляют некоторые гены тРНК хлоропластного происхождения, в результате транскрипции и процессинга которых образуются функциональные тРНК, участвующие в митохондриальной трансляции (Wintz et al., 1988; Joyce et al., 1989; Marechal-Drouard et al., 1993).

#### *Структура митохондриальных промоторов растений.*

Анализ митохондриальных РНК кукурузы (Mulligan et al., 1988b), пшеницы (Covello et al., 1991), *Oenothera berteriana* (Binder et al., 1993) и сои (Brown et al., 1991) продемонстрировал, что инициация транскрипции в митохондриальном геноме происходит с множественных промоторов. По сравнению с промоторами митохондриальных генов грибов, растительные митохондриальные промоторы вариабельны, множественны и относительно слабо консервативны. До настоящего времени единственным идентифицированным сходным элементом митохондриальных промоторов всех видов растений является консенсусная последовательность CRTA, располагающаяся внутри или вблизи сайта инициации транскрипции, проявляющая у однодольных или двудольных растений несколько большую гомологию, очевидную при межвидовых сравнениях. Однако даже для этого правила были отмечены исключения (Mulligan et al., 1991; Lizama et al., 1994).

В исследовании экспрессии митохондриальных генов кукурузы была выявлена корреляция активности промотора с наличием в его структуре консенсусной последовательности CRTA, и высказано предположение о том, что первичная последовательность может быть важной детерминантой силы промотора, выполняющей регуляторную роль в экспрессии митохондриального гена (Mulligan et al., 1991). Выводы, полученные в результате тестирования последовательностей, были в значительной степени подтверждены экспериментами по транскрипции *in vitro*. Система митохондриальной транскрипции *in vitro* была разработана с

использованием промотора гена *Cox2* пшеницы (Hanic-Joyce et al., 1991) и, в дальнейшем, применена для детального анализа промотора митохондриального *Atp1* кукурузы (Rapp et al., 1992; Rapp et al., 1993). Исследование, проведенное с помощью замещения участков последовательности промотора линкерами, и точечный мутагенез позволили установить, что для проявления активности промотору *Atp1* необходим как минимум участок размером 17 п.н., и что мутации в этой области по-разному влияют на нее *in vitro*. В результате появилась модель, в которой промотор *Atp1* состоит из центрального домена размером 12 п. н., содержащим основной мотив CRTA (от -4 до +1) и иницирующий нуклеотид, и небольшого элемента, расположенного в позиции -12 (Рис. 2).

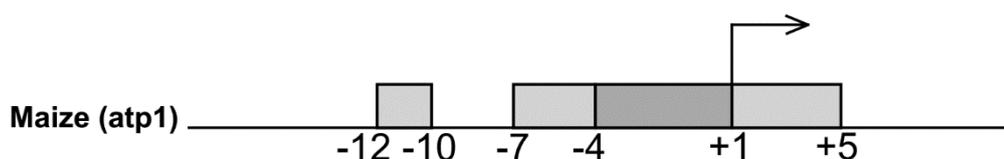


Рис. 2. Модель промоторной области гена *Atp1* из митохондриального генома кукурузы (по Tracy, Stern, 1995)

Важность последовательности корового элемента (основного мотива) была подтверждена мутагенезом промоторов кукурузы *Cox3* и *Atp6*. Компактная структура последовательности корового мотива напоминает таковую промоторов грибов, однако для центрального домена характерна значительная вариабельность, вследствие замен некоторых оснований, и ярко выраженная значимость элемента, расположенного в области (-12).

В митохондриальном гене *Cox2* из *Zea perennis*, дальнего родственника кукурузы (Newton et al., 1995), был обнаружен промотор иной структуры, инициация транскрипции с которого зависит от белка, кодируемого ядерным геном кукурузы *MCT*, являющегося, вероятно, транскрипционным фактором (Tracy et al., 1995).

Инициация транскрипции с генома митохондрий двудольных растений происходит как правило с консервативного нонануклеотида CRTAaGaGA, фланкированного вышестоящим пентануклеотидным АТ-богатым элементом. Необходимость этих элементов была доказана с использованием системы транскрипции *in vitro*, разработанной в митохондриях гороха (Binder et al., 1995). Тем не менее у однодольных и некоторых двудольных растений для нескольких сайтов инициации транскрипции мтДНК было отмечено небольшое или полное отсутствие сходства с вышеуказанными консенсусными последовательностями. При сравнении таких неконсенсусных промоторов не было выявлено каких-либо консервативных мотивов, предполагающих их узнавание другой РНК-полимеразой или участие консервативных вторичных структур ДНК для распознавания факторами РНК-полимеразы и/или ТФ. Такие различия в механизмах

транскрипции и использования промоторов между двудольными и однодольными растениями не удивительны, поскольку митохондриальный геном двудольных транскрибируется двумя РНК-полимеразами фагового типа (Hedtke et al., 1997; Hedtke et al., 2000; Hedtke et al., 2002), в то время как митохондриям однодольных требуется только один фермент этого типа (Chang et al., 1999a; Ikeda et al., 1999; Emanuel et al., 2004).

С помощью выравнивания последовательностей известных промоторов мтДНК однодольных и двудольных по отношению к первому транскрибируемому нуклеотиду, они были классифицированы в соответствии с наличием или отсутствием основного (CRTA, TRTA, YUTA или RRTA) элемента (Fey et al., 1999). Мотив YRTA был обнаружен у более половины исследованных промоторов однодольных (всего 46). Пять промоторных последовательностей составили минорный класс неконсенсусных промоторов, не содержащих какого-либо другого консервативного мотива. У двудольных 13 из 21 промоторных последовательностей содержали основной элемент CRTA, а одна имела последовательность AATA. Кроме того, для консенсусной области промотора характерна большая протяженность: 7 промоторов из 14 представляли собой последовательность, состоящую из 9 нт (CRTAaGaGA), оказавшейся высоко консервативной среди двудольных растений. Авторами также было отмечено, что у двудольных растений число промоторов, не имеющих ни консервативной последовательности промотора, ни какого-либо консервативного мотива, было больше (7 из 21), чем у однодольных (Fey et al., 1999).

#### *Структура и распределение митохондриальных промоторов Arabidopsis thaliana*

Около 50% сайтов инициации транскрипции мтДНК арабидопсиса было обнаружено в последовательностях, которые соответствовали нонануклеотидному консенсусу CRTAAGAGA, выявленному ранее в митохондриальных промоторах двудольных, или мотиву CGTATATAA (Kühn et al., 2005). Отличия структуры остальных промоторов были найдены как в коровом мотиве, в котором могли быть представлены тетрануклеотиды CRTA, ATTA или RGTA, так и в участке последовательности, окружающей начало транскрипции. Перед коровым мотивом обычно находится АТ-богатая последовательность, важная для функционирования *in vitro* промоторов ряда митохондриальных генов двудольных, а также кукурузы (Rapp et al., 1993; Dombrowski et al., 1999).

Определенные элементы промотора, такие как конкретные консенсусные участки последовательности или мотив ТАТАТА, по всей видимости, распределены в различных промоторах случайным образом. Таким образом, на основании одного лишь сравнения последовательностей митохондриальных промоторов в арабидопсисе невозможно осуществить их классификацию и вычленить группы, специфичные в отношении различных митохондриальных РНК-полимераз.

Логично полагать, что РНК-полимераза фагового типа двойной направленности

арабидопсиса RPOТmp распознает промоторы сходной структуры в обеих органеллах, митохондриях и хлоропластах. Многие из митохондриальных промоторов содержат коровый мотив CRTA, напоминающий мотив YRTA, который характерен для многих пластидных промоторов, по всей видимости, используемых РНК-полимеразами фагового типа (Hess et al., 1999; Liere et al., 2004). Для 9 из 12 генов *A. thaliana*, в работе (Kühn et al., 2005) были обнаружены множественные сайты инициации транскрипции (Рис. 3). Инициация транскрипции с нескольких сайтов ранее была описана для нескольких митохондриальных генов кукурузы, риса и сорго (Mulligan et al., 1988a; Nakazono et al., 1996a; Nakazono et al., 1996b; Yan et al., 1997; Lupold et al., 1999), а для двудольных растений – только для гена *Cox2* гороха (Kuhn et al., 2002).

Как показано в (Kuhn et al., 2005), транскрипция мтДНК в листьях и цветках растений арабидопсиса инициировалась с идентичных сайтов, указывая на то, что тканеспецифичная регуляция митохондриальных генов не зависит от селективности на уровне промоторов или же не существенна для данного растительного организма.

Этот вывод согласуется с данными о том, что регуляторные механизмы экспрессии митохондриальных генов, по-видимому, осуществляются преимущественно на посттранскрипционных стадиях, а сама транскрипция является регуляторно-релаксированной (Giege et al., 2000). Однако существует вероятность того, что промоторы с разной структурой могут различаться своей иницирующей активностью в зависимости от ткани или стадии развития растения (Kühn et al., 2005).

Транскрипция мтДНК инициируется с нескольких сайтов, которые не ограничены областями, расположенными 5' по отношению к аннотированным митохондриальным генам, что приводит к непрерывному появлению предположительно нефункциональных РНК и даже, иногда, вредных транскриптов, которые обычно эффективно удаляются в органелле с помощью механизмов РНК-деградации. Именно посттранскрипционные процессы определяют состав митохондриальных пулов РНК, поскольку количество отдельных транскриптов не всегда отражает скорость синтеза транскриптов (Giege et al., 2000). Считается, что транскрипционные механизмы в митохондриях не обеспечивают в достаточной мере регуляцию митохондриальных функций. Удивительно поэтому, что транскрипционный аппарат митохондрий двудольных растений включает две РНК-полимеразы, RPOТm и RPOТmp. Синтез митохондриальной РНК с участием RPOТmp имеет четко выраженный геноспецифический механизм и необходим для эффективной транскрипции ряда митохондриальных генов, которые не имеют распространенных промоторных последовательностей (Kühn et al., 2009).

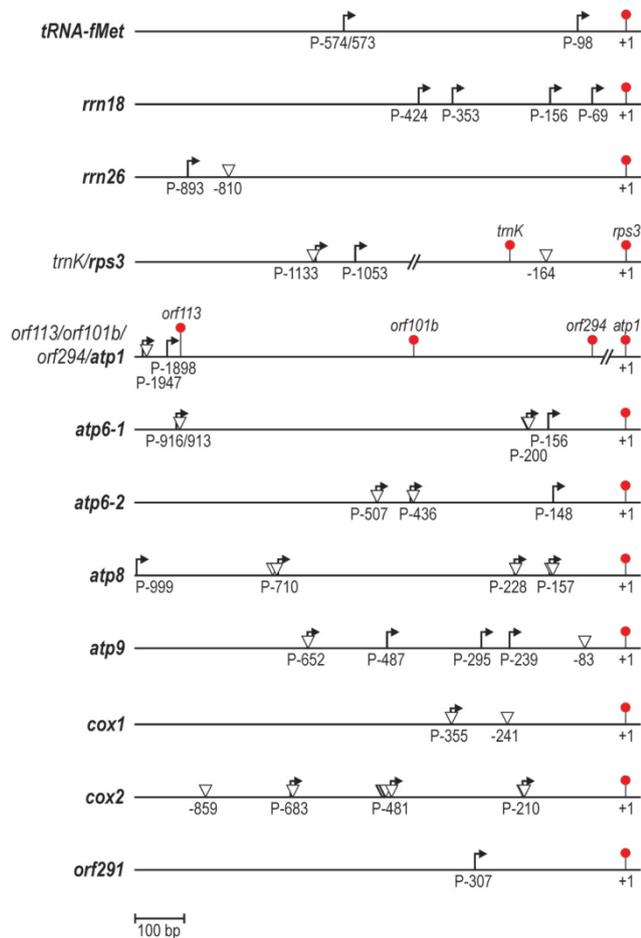


Рис. 3. Линейные диаграммы 5' областей митохондриальных генов *TrnM*, *Rrn18*, *Rrn26*, *Rps3*, *Cox1*, *Cox2*, *Atp1*, *Atp6-1*, *Atp6-2*, *Atp8*, *Atp9* и *Orf291* (Kuhn et al., 2005).

### 1.3.2 Транскрипционные факторы митохондрий

По последним данным, центральную роль в экспрессии митохондриальных генов различных эукариот играют митохондриальные факторы терминации транскрипции mTERF (от mitochondrial transcription TERmination Factor). У животных известными транскрипционными факторами (ТФ) митохондрий являются mTFA и mTFB. Функциональные гомологи таковых у растений неизвестны, а митохондриальные ТФ растений все еще недостаточно изучены. В ядерном геноме покрытосеменных растений идентифицировано около 30 различных генов mTERF, большинство из которых имеет митохондриальную или пластидную адресацию. У арабидопсиса известно 35 mTERF. Вероятно, часть из них регулирует не только терминацию, но и инициацию транскрипции.

Факторы mTERF22 (AT5G64950) (Shevtsov et al., 2018) и RUG2 (AT4G02990), белок семейства mTERF двойной адресации (пластиды, митохондрии) (Quesada et al., 2011) играют роль в экспрессии генов митохондрий арабидопсиса – у соответствующих мутантов значительно снижается уровень транскриптов многих митохондриальных генов. SHOT1 (AT3G60400) играет важную роль в регуляции экспрессии митохондриальных генов и копийности мтДНК –

взаимодействуя с SBA3 (AT2G18330), он участвует в организации нуклеоида митохондрий (Kim et al., 2012).

У кукурузы недавно было обнаружено, что ТФ ядерного кодирования семейства DREB, ZmDREB1,7, активирует экспрессию митохондриального *Orf355*, ответственного за ЦМС у растений с ЦМС (Xiao et al., 2020).

#### 1.4 Особенности транскрипции генов в хлоропластах

Транскрипция генов хпДНК осуществляется с помощью PEP и NEP-полимераз. PEP-полимераза имеет цианобактериальное происхождение, и ее каталитическое ядро состоит из 4 субъединиц: *RpoA*, *RpoB*, *RpoC1* и *RpoC2*, имеющих пластидное кодирование (но есть исключения – у мха, *Physcomitrella patens*, RpoA закодирована в ядре и имеет пластидную адресацию). У некоторых нефотосинтезирующих растений, например, *Epifagus virginiana*, PEP отсутствует вообще, и транскрипция хпДНК полностью осуществляется NEP. С помощью мутантов табака по генам *RpoA*, *RpoB* и *RpoC1* было выяснено, что PEP необходима для осуществления фотосинтеза, но не является для клеток жизненно важной (Legen et al., 2002).

То, что RPOTmp может играть какую-то роль и в хлоропластах, следует из исследований мутантов по RPOTp и RPOTmp (Hricova et al., 2006). В отличие от летального в гомозиготном состоянии мутанта *rpotm*, мутанты по основной NEP-полимеразе хлоропластов RPOTp жизнеспособны (Hricova et al., 2006). Нокаутирование генов *RPOT3* или *RPOT2*, кодирующих в арабидопсисе соответственно RPOTp и RPOTmp, приводило к измененному морфогенезу листьев и отставанию в росте (более выраженные у мутанта *rpotp*). Двойной мутант *rpotp rpotmp* имел более тяжелые нарушения фенотипа – дефицит хлорофилла и полную остановку роста на стадии проростков (Hricova et al., 2006). Данных о потенциальном разделении функций RPOTp и RPOTmp в хлоропластах немного. В работе (Baba et al., 2004) изучали эффект отсутствия RPOTmp на накопление транскриптов в органеллах при индукции светом: авторы провели анализ хлоропластной РНК в проростках, выращенных в темноте, и в проростках, помещенных после роста в темноте в условия непрерывного освещения в течение 6 дней. Выявленное снижение в уровнях мРНК было связано как с PEP-, так и с NEP-транскриптами, тем не менее, авторами было высказано предположение, что RPOTmp является ключевым ферментом в транскрипции пластидных генов во время раннего развития проростков, а RPOTp несет основную, наряду с PEP-полимеразой, транскрипционную функцию в хлоропластах на более поздних стадиях развития. Позднее, в работе (Courtois et al., 2007), было выявлено, что экспрессия генов, находящихся под контролем NEP-промоторов, во время раннего развития растений осуществляется RPOTp, указывая на эту РНК-полимеразу как на основную NEP-полимеразу в хлоропластах. К настоящему времени важная роль, которую RPOTp играет в хлоропластной

транскрипции, биогенезе и пролиферации клеток мезофилла, подтверждена многими исследованиями (Vorner et al., 2015).

Известно, что экспрессия одного и того же хлоропластного гена может происходить с нескольких промоторов, большая часть из которых транскрибируется РЕР-полимеразой, часть – NEP-полимеразой (Nagashima et al., 2004a; Loschelder et al., 2006; Courtois et al., 2007; Swiatecka-Hagenbruch et al., 2007; Zhelyazkova et al., 2012). Зачастую для одного и того же гена детектируется несколько транскриптов (Hajdukiewicz et al., 1997). РЕР-полимераза синтезирует большинство видов мРНК, транскрибирует большинство генов тРНК, и играет важную роль в синтезе рРНК. Однако NEP остается важной в хлоропластах для транскрипции гена *RpoB* (в составе оперона с генами *RpoC1* и *RpoC2*), *AccD* (у двудольных), и участвует наряду с РЕР в транскрипции ряда генов, включая *ClpP*, *AtpB*, *AtpI*, и нескольких генов, кодирующих рибосомальные белки и тРНК, а у двудольных *Ycf1* и *Ycf2* (Hajdukiewicz et al., 1997; Hess et al., 1999; Liere et al., 2004; Courtois et al., 2007; Swiatecka-Hagenbruch et al., 2007; Swiatecka-Hagenbruch et al., 2008; Zhelyazkova et al., 2012; Williams-Carrier et al., 2014). В листьях арабидопсиса обнаружен также активный NEP-промотор для гена *RbcL* (Chi et al., 2014). Большинство NEP-промоторов активны как в растениях *rpotp*, так и *rpotmp*, указывая на то, что обе RPOTr и RPOTmp могут их распознавать (Liere et al., 2004; Courtois et al., 2007; Swiatecka-Hagenbruch et al., 2007; Swiatecka-Hagenbruch et al., 2008).

Как показали авторы (Courtois et al., 2007), определенная функция RPOTmp в пропластидах / амилопластах связана с осуществлением транскрипционной активности с одного из промоторов (PC) оперона *Rrn* в период набухания / прорастания семян. Транскрипция оперона *Rrn* контролируется несколькими промоторными элементами, которые дифференциально используются в различных видах растений (Lerbs-Mache, 2000). В большинстве исследованных видов растений, транскрипция оперона начинается с РЕР-промотора эубактериального типа (обозначаемого P1 или P2 в различных исследованиях (Sriraman et al., 1998; Courtois et al., 2007)), который рассматривается в качестве основного промотора *Rrn*. Исключением являются шпинат и горчица, в которых PC представляет собой основной промотор *Rrn* (Pfannschmidt et al., 1997). В арабидопсисе, промотор PC используется в основном во время набухания и в незначительной степени на более поздних стадиях развития (Zoschke et al., 2007). Не ясно, является ли транскрипция *Rrn* с промотора PC единственной специфической функцией RPOTmp в хлоропластах двудольных растений, однако исследование (Courtois et al., 2007) позволило объяснить, почему для однодольных эта функция RPOTmp оказывается не существенной: до настоящего времени, промотор PC не был найден у таких растений, как рис (*Oryza sativa*; (Sriraman et al., 1998)), ячмень (*Hordeum vulgare*; (Hubschmann et al., 1998)), или кукуруза (*Zea mays*; (Strittmatter et al., 1985)). Как показывают (Swiatecka-Hagenbruch et al., 2008) в дополнение

к промотору РС, RPOТmр способна инициировать транскрипцию и с некоторых других пластидных промоторов (а именно с *PclpP-58*). В работе (Kühn et al., 2009), тем не менее, каких-либо изменений в экспрессии хлоропластных генов в мутанте с инактивированной функцией RPOТmр авторы не обнаружили.

Таким образом, при очевидной, хотя и не до конца изученной роли RPOТmр в митохондриальной транскрипции, функция данной NEP-полимеразы в хлоропластах двудольных растений по-прежнему обсуждается. Вполне обосновано предположение о том, что функции RPOТm и RPOТmр в митохондриях являются не взаимозаменяемыми, а дополняющими, а функции RPOТr и RPOТmр в пластидах могут быть частично избыточными и дублирующими. В настоящее время предполагается, что большинство NEP-промоторов распознается и используется NEP в недифференцированных пропластидах, в зрелых же хлоропластах те же промоторы становятся неактивными или малоактивными (Liere et al., 2001). Этому способствует, в частности, обнаруженная инактивация NEP в тилакоидах (Azevedo et al., 2006).

#### 1.4.1 Пластидные промоторы

Как и в бактериях, многие пластидные гены организованы в опероны и транскрибируются с одного или нескольких промоторов в полицистронные РНК. РЕР-промоторы имеют структуру, сходную с бактериальными промоторами  $\sigma^{70}$ -типа с консервативными областями  $-10$  (ТАТА) и  $-35$  (Prinbow box) (Liere et al., 2001). Пластидные NEP-промоторы отличаются от РЕР-промоторов и напоминают промоторы генов мтДНК растений и дрожжей (Masters et al., 1987; Brennicke et al., 1999). Их разделяют на 4 группы: 1) тип Ia - содержит мотив YRTA внутри АТ-богатого участка длиной в 15 нт; 2) тип Ib- мотив YRTA и GAA-box находящийся в позиции  $-18-20$  нт от него; 3) тип II- имеют размер около 30 нт, расположены, в основном, ниже сайта инициации транскрипции и не имеют определенных консенсусных мотивов. К этому типу относятся, например, промотор гена *ClpP* табака, расположенный в позициях от  $-5$  до  $+25$  от сайта инициации транскрипции, а также РС-промотор оперона *RRN*.

Примечательно, что в РЕР-нокаутных линиях происходит транскрипция всех пластидных генов с участием NEP-полимераз. Однако в растениях дикого типа 5'-концы всех транскриптов генов, синтезируемых РЕР, картируются именно на канонические РЕР-промоторы, указывая на то, что в транскрипции этих генов NEP не участвует (Cahoon et al., 2006).

#### 1.4.2 Транскрипционные факторы хлоропластов

Распознавание промоторов и транскрипционная специфичность РЕР в хлоропластах обеспечивается с помощью сигма-факторов, имеющих ядерное кодирование. Экспрессия сигма-факторов, как правило, ткане- и органоспецифична, а также зависит от стадии развития растения.

У арабидопсиса известно 6 сигма-факторов (AtSIG1-6), 4 из которых (AtSIG1-3, 6) имеют явную пластидную адресацию, а AtSIG5 (At5g24120) - пластидную или двойную (мт/хп) адресацию, в зависимости от варианта сплайсинга (Kanamaru et al., 1999; Homann et al., 2003; Yao et al., 2003).

AtSIG1 связывается с промоторами генов *RbcL* и *PsbA*. *In vivo* фактор подвергается фосфорилированию, причем степень фосфорилирования зависит от редокс-состояния пула пластохинона и определяет соотношение транскрипции *PsaA* к *PsaB* (Shimizu et al., 2010). Учитывая, что экспрессия AtSIG1 сильно индуцируется красным и синим светом, считается, что он участвует в регуляции стехиометрии фотосистем в зависимости от суточных изменений освещенности (Onda et al., 2008).

Распознавание промоторов *PsaJ*, *trnV*-UAC и *PpsbD*-256 специфически осуществляется сигма-фактором SIG2 (также он распознает промоторы *trnE*-UUC и *trnM*-CAU, но это выполняют и другие сигма-факторы) (Kanamaru et al., 2001; Privat et al., 2003). Также SIG2 может распознавать *PatpI*-229/225 и *PatpE*-431, координируя уровень транскриптов разных субъединиц АТФ-синтазы. Предполагается, что SIG2 участвует в переключении транскрипции большинства генов хпДНК с NEP на PEP в процессе развития растения: SIG2 стимулирует транскрипцию тРНК *trnE*-UUC, которая, как было показано, напрямую связывается с RPOTr и ингибирует транскрипцию (Hanaoka et al., 2005).

Для мутантов *sig3* и *sig4* характерен фенотип дикого типа, однако, профиль экспрессии их хпДНК изменяется. SIG3 распознает промоторы *PsbN* и *AtpH* (Zghidi et al., 2006). Инициация транскрипции с промотора *PSBN* также может влиять на экспрессию оперона *PsbB* (расположенного на противоположной цепи хпДНК), посредством синтеза антисмысловой РНК *PsbT* (Zghidi-Abouzid et al., 2011). SIG4 участвует в экспрессии *NdhF* (Favory et al., 2005).

SIG5 индуцируется стрессом, высокоинтенсивным синим светом или UV-A, и модулирует транскрипцию *PsbD* с промотора BLRP (от Blue Light Responsive *PsbD* Promoter) (Tsunoyama et al., 2002; Nagashima et al., 2004b). Оперон *PsbD/C* имеет несколько промоторов, но в зрелых листьях транскрибируется в основном с BLRP. Вероятно, SIG5 поддерживает высокий уровень активности фотосистемы II в условиях высокоинтенсивной освещенности, а также при стрессе (Thum et al., 2001; Onda et al., 2008).

SIG6 ответственен за накопление хлорофилла в семядолях, активируя транскрипцию мРНК, некоторых тРНК и рРНК на ранних стадиях развития (Ishizaki et al., 2005b; Loschelder et al., 2006). SIG6 также усиливает транскрипцию оперонов *AtpB/E* и *NdhC/PsbG/NdhJ* на более зрелых стадиях развития, вплоть до стадии образования розетки. Интересно, что для генерации транскрипта оперона *AtpB/E* в мутантах *sig6* во время развития хлоропластов активируется проксимальный NEP-промотор (Schweer et al., 2006).

У шпината известен транскрипционный фактор CDF2, ответственный за транскрипцию

оперона *RRN16* полимеразой RPOТmp, специфически связывающийся с РС-промотором. Белок существует в 2 формах, связывающихся с РС, при этом CDF2A репрессирует инициацию транскрипции PEP, а CDF2B способствует транскрипции оперона полимеразой RPOТmp. CDF2A продуцируется осенью и играет роль в выключении активности пластид при подготовке к зиме, а CDF2B – весной, способствуя усилению пластидной активности.

Рибосомальный белок ядерного кодирования RPL4, вероятно, содержится в составе активного транскрипционного комплекса с RPOТ и играет роль в регуляции пластидной транскрипции (Trifa et al., 1998).

Белок STF из *Nicotiana benthamiana*, как было показано, является фактором, стимулирующим транскрипцию, особенно важным во время светозависимого превращения этиопластов в фотосинтетически-активные хлоропласты. Отсутствие STF оказывает существенное влияние и на PEP- и на NEP-зависимые гены (Jeon et al., 2012).

Белки рТАС2, рТАС6 и рТАС12 являются компонентами активного транскрипционного комплекса с PEP-полимеразой – мутанты демонстрируют фенотип, сходный с таковым у мутантов по субъединицам PEP. У них было обнаружено снижение транскрипции с пластидных PEP-промоторов. Часть рТАС белков входит в группу PAP (от PEP-associated proteins), которые, ассоциируясь с PEP-полимеразой, позволяют ей эффективно выполнять транскрипцию пластидных генов (Pfalz et al., 2005).

Поскольку PAP, рТАС и сигма-факторы имеют ядерное кодирование, функционал PEP находится под ядерным контролем (Borner et al., 2015).

Идентифицированы также пластидные белки RHON, содержащие РНК-связывающие мотивы, подобные N-концевым первичным РНК-связывающим мотивам бактериального фактора терминации транскрипции Rho. RHON1, как было показано, помимо поддержки активности РНКазы E, участвует в терминации транскрипции *RbcL* (Stoppel et al., 2012; Chi et al., 2014). Бактериальный Rho требует для работы несколько дополнительных кофакторов, гомологи некоторых из которых были обнаружены у арабидопсиса. Гомолог NUSG – рТАС13 (AT3G09210), в частности, имеет двойную адресацию (хп/мт). Несколько митохондриальных mTERF имеют пластидную адресацию. Так, например, известно, что mTERF6 участвует в терминации транскрипции тРНК-Пс (Romani et al., 2015).

## **1.5 Роль NEP на ранних этапах развития растения**

При анализе мутанта *rpotmp* было выяснено, что отсутствие функциональной RPOТmp нарушает аккумуляцию некоторых пластидных мРНК, индуцируемых светом во время раннего развития растений, и приводит к снижению эффективности фотосинтеза (изучение производилось на 6-дневных проростках, выращенных в темноте, при экспозиции на свету). В

митохондриях же недостаток *RPOTmp*, по-видимому, компенсируется *RPOTm*. При этом *RPOTmp* в растениях дикого типа экспрессируется на одном уровне в разных тканях и на разных стадиях развития и, вероятно, регулируется посттранскрипционно (Baba et al., 2004).

В хлоропластах *RPOTmp* инициирует транскрипцию *Rrn16*-оперона с РС-промотора на стадии набухания семян. PEP также активна на этой стадии развития, но на более поздних полностью контролирует транскрипцию *Rrn16* (Courtois et al., 2007; Demarsy et al., 2011). *RPOTp* на ранних стадиях развития ответственна за транскрипцию других пластидных генов с NEP-промоторов типа I (например *AccD*, *RpoB*) и типа II (*ClpP*) (Courtois et al., 2007; Swiatecka-Hagenbruch et al., 2008).

Интересно, что уровень транскриптов *RPOTp* и *RPOTmp* в сухих семенах выше, чем во время развития семян. Уровень пластидных транскриптов многих генов домашнего хозяйства, включая *RpoA*, *RpoB*, *RpoC1* и *RpoC2*, а также некоторых ядерных генов – *SIG2*, *SIG6*, *RPOT3* и *RPOT2*, возрастает уже через 72 часа стратификации. Активность PEP увеличивается во время биогенеза хлоропластов, в то время как активность NEP возрастает только в течение короткого периода во время прорастания семян, что приводит к увеличению уровня транскриптов NEP-зависимых генов, а в дальнейшем экспрессия остается конститутивной (Hanaoka et al., 2005; Kusumi et al., 2010; Allorent et al., 2013).

Специфическая роль *RPOTmp* в митохондриях на ранних стадиях развития растения на данный момент не выяснена.

## **1.6 Взаимодействие генетических систем растительной клетки**

### **1.6.1 Ядерный контроль экспрессии митогенома**

Крупные митохондриальные комплексы содержат белки как митохондриального, так и ядерного кодирования. Для поддержания стехиометрического соотношения субъединиц в комплексах, их экспрессия должна быть скоординирована.

Метаболизм митохондриальных РНК наземных растений включает стадии: транскрипцию, редактирование, сплайсинг (интронов групп I и II), созревание 5' и 3' концов, процессы стабилизации/деградации РНК и трансляцию (Hammani et al., 2014; Schmitz-Linneweber et al., 2015; Tomal et al., 2019; Small et al., 2020). В этой системе, вероятнее всего, именно посттранскрипционные и посттрансляционные механизмы определяют итоговое количество продуктов митохондриальных генов (Giege et al., 2000; Giegé et al., 2005). Важную роль в этих процессах играют модульные белки со спиральным повтором, такие как, например, PPR-белки, участвующие практически на всех этапах экспрессии.

Исследования, проведенные на митохондриях *Zea mays in organello* (run-on), показали, что скорость транскрипции рРНК в 2-14 раз превышала таковую генов мтДНК, кодирующих белки

(Finnegan et al., 1990). Однако для арабидопсиса такой усиленной транскрипции рРНК обнаружено не было, более того, скорости транскрипции митохондриальных генов, кодирующих субъединицы одного и того-же комплекса, были различными (Mulligan et al., 1991; Giege et al., 2000). Такой дисбаланс, вероятно, компенсируется разной стабильностью транскриптов и посттранскрипционными процессами. В подтверждение данной гипотезы было обнаружено, что скорость транскрипции (run-on) в митохондриях арабидопсиса изменяется в течение суток, тогда как между световыми и темновыми фазами уровни транскриптов не меняются (Okada et al., 2006). Множественные промоторы митохондриальных генов, скорее всего, не играют роли в регуляции экспрессии, зависимой от типа ткани или от стадий развития (Kühn et al., 2005). Было обнаружено, что скорость транскрипции определенных митохондриальных генов является видоспецифичной и, вероятно, зависит от различной силы их промоторов у разных организмов (Leino et al., 2005a). Хотя у линии дикого типа и линии с аллоплазматической ЦМС, имеющих разный ядерный бэкграунд, транскрипция одних и тех-же генов с одинаковых промоторов происходила с разной скоростью. Таким образом, скорость транскрипции и посттранскрипционные механизмы зависят не только от митохондриальных цис-элементов, но и от ядерных транс-факторов (Edqvist et al., 2002). Посттранскрипционные механизмы предположительно вносят основной вклад в тканеспецифичные различия в уровнях транскрипции митохондриальных генов (Gagliardi et al., 1999).

В условиях недостатка сахаров экспрессия митохондриальных генов практически не изменялась на транскрипционном, посттранскрипционном и трансляционном уровнях, и снижение активности митохондриальных комплексов было обусловлено снижением экспрессии их субъединиц и компонентов, кодируемых ядерными генами. То есть регуляция происходила посттрансляционно, на уровне сборки комплексов (Giegé et al., 2005). Так как RPO<sub>Trp</sub>, предположительно, осуществляет транскрипцию геноспецифично, не исключено, что именно эта NER играет определенную роль в механизмах регуляции экспрессии митохондриальных генов (Kühn et al., 2009).

В целом, транскрипция мтДНК имеет релаксированный характер. Отсутствие жесткой структурной организации участков инициации транскрипции приводит к появлению криптических транскриптов, соответствующих некодирующим областям - практически весь митогеном транскрибируется (Holec et al., 2008). Примером релаксированной терминации являются транскрипты *Atp8* и *Atp9*, 3'-конец которых может в несколько раз превышать размеры зрелого транскрипта (Perrin et al., 2004).

Созревание транскриптов мт-мРНК вероятно происходит с участием эндонуклеаз. В созревании мт-тРНК арабидопсиса участвует 2 РНКазы Z (3'-концы), кодируемые ядерными генами TRZ<sup>L1</sup>, TRZ<sup>L2</sup>, и РНКазы Р (5'-концы), которые могут участвовать также и в процессинге

мРНК и рРНК. Об этом свидетельствует тот факт, что некоторые 3' и 5'-концы мт-мРНК образуются при процессинге ко-транскрибируемых тРНК. Помимо настоящих тРНК присутствуют т. н. т-элементы, способствующие процессингу 5' (*Cox1*, *ScmF<sub>N1</sub>*, *Rps4*) и 3'-концов (*ScmC*, *Nad6*) (Canino et al., 2009). Известно, что созревание 5'-конца *Atp9* и *Cox3* также происходит с участием эндонуклеаз, однако эти транскрипты не содержат т-элементов и других известных цис-элементов (Forner et al., 2007).

В созревании 5'-концов мт-мРНК могут быть задействованы и экзонуклеазы. Известны факторы RPF1 и RPF2: первый участвует в процессинге *Nad4*, второй – в процессинге 5'-конца *Nad9*, и в качестве энхансера процессинга 5'-конца *Cox3* (Jonietz et al., 2010). Во время процессинга нуклеазы могут работать совместно с белковыми факторами специфичности (Binder et al., 2011). В созревании 3'-концов участвуют две 3'-5' экзонуклеазы: полинуклеотидфосфорилаза (ПНФаза) и РНКазо-II-подобный фермент RNR1, который также функционирует и в хлоропластах (Perrin et al., 2004).

Стабильность РНК зависит от соотношения скоростей синтеза и деградации, а скорость деградации митохондриальных РНК зависит от различных параметров, по большей части неизвестных (кроме полиаденилирования). Именно стабильность вносит основной вклад в уровень митохондриальных транскриптов (Mulligan et al., 1991; Giege et al., 2000; Leino et al., 2005b). Стабильность транскриптов также находится под ядерным контролем. В деградации РНК, а, вероятно, и в 3'-процессинге и полиаденилировании (сигнал к деградации) участвует ПНФаза (Yehudai-Resheff et al., 2001).

Гены мтДНК арабидопсиса содержат интроны, относящиеся к группе II (самосплайсирующиеся), однако *in vitro* их способность к самосплайсингу не была показана. И хотя для некоторых из интронов характерна каноническая структура группы II, многие имеют атипичный фолдинг или не содержат необходимых элементов (Wopen, 2008). Молекулярный аппарат, осуществляющий сплайсинг, обычно находится в самом интроне. Например – ORF *MatR* из 4 интрона *Nad1* (*nad1i728*), имеющий обратно-транскриптазный и матуразный домены. Интересно, что у мутанта арабидопсиса *rpotmp* уровень транскрипта *MatR* заметно снижен (Kühn et al., 2009). У растений имеются гены ядерного кодирования, гомологичные *MatR* и имеющие митохондриальную адресацию (Mohr et al., 2003; Keren et al., 2009). Как было показано, у арабидопсиса NMAT2 (AT5G46920) играет роль в сплайсировании нескольких интронов, включая *cox2i691*, *nad1i477* и *nad7i209* (Keren et al., 2009), а NMAT1-a (At1g30010) необходим для накопления зрелых транскриптов *Nad4* (Nakagawa et al., 2006). Также в сплайсинге участвуют некоторые PPR-белки, например OTP43 в арабидопсисе необходим для сплайсинга (или стабилизации) *nad1i394* (de Longevialle et al., 2007). DEAD-бок РНК-хеликазы способны работать как РНК-шапероны, корректируя неправильный фолдинг интронов (Del Campo et al., 2009). У

арабидопсиса есть гены DEAD-бок РНК-хеликаз ядерного кодирования с митохондриальной адресацией (Matthes et al., 2007), и одна из них, РМН2, как было показано, важна для эффективного сплайсинга 15 из 23 мт-интронов арабидопсиса (Köhler et al., 2010).

У арабидопсиса в мтДНК имеется 456 сайтов C-to-U редактирования РНК, 441 из которых относятся к белок-кодирующим последовательностям (Giegé et al., 1999). РНК-редактирование является сугубо важным процессом ввиду потенциальной способности к созданию старт- и стоп-кодона, а также к изменению конкретных аминокислот. При этом редактирование – процесс видо- и геноспецифичный, и зависит от различных последовательностей. Также предполагают наличие у генов расположенного 5' сайта связывания транскрипт-специфичных первичных факторов редактирования (Staudinger et al., 2005). Известно несколько транс-факторов редактирования (все являются PPR-белками), MEF1, MEF11, OGR1 и MEF9, которые распознают и связывают РНК-мотивы на, как минимум, 3 разных сайтах редактирования (кроме MEF9) (Kim et al., 2009b; Takenaka, 2009; Zehrmann et al., 2009; Verbitskiy et al., 2010).

Редактирование играет очень важную роль в ядерном контроле экспрессии митогенома, поскольку влияет на накопление белковых продуктов, зависимое от разной стабильности отредактированных и неотредактированных транскриптов (Lu et al., 1996; Phreaner et al., 1996). Митохондриальные эдитосомы растений характеризуются разнообразием и различаются не только PPR-белками, обеспечивающими специфичность распознавания мишеней (Lu et al., 1996). Известные компоненты мт-эдитосомы арабидопсиса включают в себя белки RIP/MORF, ответственные за редактирование целого набора сайтов, из которых: RIP1/MORF8, участвует в редактировании 77% сайтов и является белком двойной адресации (Bentolila et al., 2012; Takenaka et al., 2012; Bentolila et al., 2013). Несколько белков ORRM (ORRM2, ORRM3 и ORRM4) также участвуют в редактировании множества сайтов, и, вероятно, ассоциируются с PPR-факторами специфичности взаимодействуя с RIP-белками (Shi et al., 2016).

Исследования с использованием крио-ЭМ показали, что рибосомы растительных митохондрий характеризуются очень большим разнообразием. Их можно описать, как белок/РНК-аугментированные рибосомы бактериального типа. Один из специфических для растений доменов митохондриальной рибосомы образован двумя параллельными двойными спиралями рРНК в контакте с 2 PPR-белками и имеет высокую подвижность. Было обнаружено, что некоторые PPR-белки (сотни из которых имеют митохондриальную адресацию) являются коровыми миторибосомными белками (обозначены как rPPR). Было обнаружено, что все rPPR стабилизируют специфичные для растительных миторибосом удлинение рРНК. Как и в митохондриях животных и дрожжей, миторибосомы растений связаны с внутренней митохондриальной мембраной (Waltz et al., 2020b).

В отличие от, например, млекопитающих, у которых митохондриальные мРНК

начинаются с иницирующего кодона AUG, растительные мт-мРНК имеют длинные 5'-UTR, которые могут содержать цис-элементы, участвующие в инициации трансляции (Hammani et al., 2014). У 17 из 33 мт-мРНК арабидопсиса в 5'-UTR в положении -19 от иницирующего кодона были обнаружены специфические AхAAA-мотивы, которые возможно играют роль отсутствующих у мт-мРНК растений последовательностей Шайна-Дальгарно, связываются с PPR-белками и участвуют в инициации трансляции. Таким образом, у арабидопсиса, вероятно, имеется как минимум 2 различных механизма инициации трансляции мт-мРНК (Waltz et al., 2020c). В частности, PPR-белок MTL1, возможно, необходим для трансляции гена *Nad7* и представляет собой мРНК-специфический фактор инициации трансляции (Haïli et al., 2015). Еще несколько PPR-белков, не являющихся коровыми белками рибосом, вероятно функционируют сходным образом и, таким образом, представляют собой альтернативный путь инициации трансляции растительных митохондрий (Waltz et al., 2019).

Трансляция на растительных миторибосомах – процесс динамический и может адаптироваться к различным условиям митохондриальной среды. Время пребывания в миторибосомах определенных мРНК коррелирует с присутствием соответствующих белков в митохондриях (а также со стехиометрическим соотношением субъединиц митохондриальных комплексов) (Waltz et al., 2020a). Механизм, посредством которого происходит анализ качества мРНК, поступающих в трансляционный аппарат митохондрий пока неизвестен. С помощью прямого секвенирования белков было показано, что в составе комплексов находятся исключительно белки, соответствующие полностью отредактированному и сплайсированному мРНК, что предполагает посттрансляционную регуляцию уровня продуктов трансляции – во время сборки белковых комплексов (Giegé et al., 2005). Однако, последние данные показывают, что не полностью редактированные мРНК транслируются, и это, по-видимому, является одной из ступеней регуляции активности кодируемых ими белков (Plachard et al., 2018).

### **1.6.2 Ядерный контроль экспрессии пластидного генома**

Наземные растения имеют очень высокую степень ядерного контроля над пластидными функциями. Наиболее ярко антероградная регуляция проявляется в том, что пластиды могут дифференцироваться во множество различных органелл, при этом изменяется пластидный транскрипционный профиль (Jarvis et al., 2013). NEP-полимеразы имеют ядерное кодирование, и с их помощью происходит активация PEP-полимеразы во время раннего развития растения. Модуляция уровней и/или активностей белков, ассоциированных с PEP, в частности сигма-факторов, также представляет собой инструмент ядерного контроля пластидной транскрипции. Активность пластидных сигма-факторов модулируется фосфорилированием (Schweer et al., 2010a). Известны некоторые белки, взаимодействующие с сигма-факторами, но они не подобны

анти-сигма-факторам бактерий и не имеют такой активности (Lerbs-Mache, 2011). Фосфорилирование сигма-факторов может оказывать как положительный, так и отрицательный эффект на транскрипцию – в зависимости от сигма-фактора и конкретного промотора (Schweer et al., 2010a). Предположительно, фосфорилирование сигма-факторов осуществляет ассоциированная с PEP киназа РТК (от Plastid Transcription Kinase) (Baginsky et al., 1997). Доказано, что РТК фосфорилирует SIG6, причем сам сайт фосфорилирования SIG6 киназой РТК, вероятно, создается некой другой “pathfinder”-киназой с помощью префосфорилирования, что придает данному пути контроля транскрипции большую гибкость (Schweer et al., 2010b).

В бактериях одним из способов контроля РНК-полимеразы является гуанозин тетрафосфат (ppGpp), повышенные концентрации которого ослабляют ассоциацию РНК-полимеразы с сигма-фактором (Österberg et al., 2011). В растениях был обнаружен ppGpp, а также гомологи ppGpp-синтазы, обозначаемые RSH, некоторые из которых имеют пластидную адресацию (Biezen et al., 2000; Kasai et al., 2004; Tozawa et al., 2007). Известно, что ppGpp синтезируется в пластидах в стрессовых условиях. В экспериментах *in vitro* ppGpp связывается с бета-субъединицей PEP и ингибирует транскрипцию, однако роль ppGpp в пластидах *in vivo* пока не определена (Takahashi et al., 2004; Sato et al., 2009).

В целом, транскрипция, редактирование транскриптов, созревание, процессинг и трансляция по большей части регулируются факторами ядерного кодирования (Choquet et al., 2002). Посттрансляционные процессы и сборка комплексов тилакоидных мембран требуют факторов сборки, имеющих ядерное кодирование (Vothknecht et al., 2001). Развитие пластид, и, в частности, их деление также контролируется белками ядерного кодирования (Osteryoung et al., 2003).

### **1.6.3 Митохондриально-хлоропластные взаимодействия**

Одним из ключевых компонентов клеточного метаболизма является цикл Кребса, осуществляемый в митохондриях, который помимо своей катаболической функции является источником метаболических предшественников для целого ряда жизненно важных немитохондриальных биосинтетических процессов, таких как фиксация азота, биосинтез аминокислот, тетрапирролов и витаминов (Sweetlove et al., 2007a). Несмотря на локализацию большинства процессов биосинтеза аминокислот в пластидах, митохондрии играют ключевую роль в их синтезе и деградации.

Самыми распространенными тетрапиррольными соединениями в клетке являются хлорофилл и гем, жизненно важные для процессов фотосинтеза и дыхания соответственно. Биосинтез этих соединений вплоть до протопорфирина IX локализован в пластидах, однако конечные ферменты биосинтеза гема – феррохелатаза и протопорфириноген-оксидаза имеют

адресацию как в пластиды, так и в митохондрии (Lermontova et al., 1997; Watanabe et al., 2001).

Взаимодействие хлоропластов и митохондрий зависит от обмена метаболитами, такими как АТФ, NAD(P)H, и соединениями с углеродным скелетом. Степень того, насколько митохондриальный АТФ необходим для фотосинтеза на свету, зависит от баланса продукции и поглощения АТФ в хлоропластах, который в свою очередь зависит от вклада циклического и псевдоциклического фосфорилирования в хлоропластах (Hoefnagel et al., 1998). В типичном растении содержится около 40 типов клеток, энергетические потребности которых значительно различаются, и поддерживаются разные пути энергетического обмена (Nunes-Nesi et al., 2010). При недостатке АТФ в хлоропластах, он импортируется из митохондрий, способность которых к синтезу АТФ гораздо выше – 3 АТФ/NAD(P)H, тогда как у хлоропластов - 1,5-2 АТФ/NAD(P)H (Hoefnagel et al., 1998).

Другая важная роль митохондрий на свету определяется их способностью к удалению избыточных фотосинтетических восстановительных эквивалентов, которые могут приводить к перевосстановлению пластидной ЭТЦ и повреждению тилакоидных мембран (Raghavendra et al., 2003). При этом избыток NAD(P)H в хлоропластах превращается в малат и экспортируется в митохондрии, где его окисление может приводить к образованию АФК в количествах, достаточных для активации сигнальных путей, модулирующих клеточный метаболизм (в некоторых случаях апоптоза) (Zhao et al., 2020).

Координация метаболической активности митохондрий и хлоропластов тесно связана и контролируется антероградными и ретроградными регуляторными путями (Pesaresi et al., 2007). Одним из примеров является значительное снижение экспрессии ядерных генов фотосинтеза в ответ на изменения скорости трансляции пластид и митохондрий – таким образом снижается способность клеток к поглощению света и предотвращается накопление АФК в условиях ограниченной способности клетки к энергообмену (Pesaresi et al., 2006).

Один из предположительных механизмов старения, требующий непосредственного контакта митохондрий и пластид, реализуется через белки WHIRLY. WHY1 локализован в пластидах и в ядре, в то время как WHY2 – в митохондриях. Предположительно WHY1 репрессирует транскрипцию WHY2, задерживая запуск старения вплоть до получения сигнала, вызывающего конформационные изменения WHY1, которые дерепрессируют WHY2. Транскрипция WHY2 приводит к накоплению WHY2 в митохондриях, где он, вероятно, работает как про-апоптотический фактор. При этом, предположительно, близкие контакты митохондрий и пластид приводят к перемещению WHY2 в пластиды (Krause et al., 2009).

Митохондрии накапливаются в тех областях клетки, в которых интенсивно происходит фотосинтез. Также, соотношение митохондрий к хлоропластам возрастает пропорционально интенсивности фотосинтеза (Wang et al., 2004).

Формирование стресс-индуцируемых митохондриальных выпячиваний и митохондриально-хлоропластных мембранных контактных сайтов (МКС) позволяет предположить, что мт-МКС могут играть роль в биогенезе и функционировании растительных мт-мембран. Было показано, что в условиях фосфатного голодания происходит перенос дигалактозилдиацилглицерола из хлоропластов в мембраны митохондрий. Перенос предположительно осуществляется через митохондриальный трансмембранный липопротеидный комплекс (МТЛ), содержащий MIC60 (Jouhet et al., 2004; Yamashita et al., 2016).

#### **1.6.4 Ретроградная регуляция экспрессии ядерных генов у растений**

Определенные пути пластидного ретроградного сигналинга идентифицировали, основываясь на источнике сигнала: интермедиаты биосинтеза тетрапирролов, экспрессия хлДНК, редокс-состояние пластид, АФК, а также пути, определяемые стресс-индуцируемыми метаболитами, такими как 3'-фосфоаденозин-5'-фосфат и метилэритритолциклодифосфат (Chi et al., 2013).

Роли SIG2 и SIG6 в пластидном ретроградном контроле экспрессии ядерных генов частично избыточны (Woodson et al., 2013). SIG2 стимулирует транскрипцию tPHK-Glu, что усиливает синтез тетрапирролов и усиливает экспрессию ядерных генов фотосинтетического аппарата. Интермедиат Mg-протопорфирин IX контролирует экспрессию как ядерных генов фотосинтеза, так и генов хлДНК, что, вероятно, осуществляется с участием сигма-факторов (Ankele et al., 2007).

Mg-протопорфирин IX и Fe-протопорфирин-IX (гем) могут связываться с транскрипционными факторами и модулировать их активность, изменяя экспрессию ядерных генов фотосинтеза (Mense et al., 2006; Kindgren et al., 2012). Токоферолы, синтезируемые в хлоропластах из тирозина, являются положительными регуляторами биогенеза ядерных мРНК: они необходимы для накопления 3'-фосфоаденозина-5'-фосфата (PAP), ретроградного ингибитора ядерных экзорибонуклеаз (XRN), который может защищать первичные транскрипты мРНК. Показано, что такая регуляция вовлечена в индуцируемую теплом аккумуляцию miR398 (Fang et al., 2019).

Примерно 60% интрон-содержащих генов в растениях в нормальных условиях подвергаются альтернативному сплайсингу (Syed et al., 2012). В стрессовых условиях альтернативный сплайсинг регулируется для усиления пластичности транскриптома и обеспечения адекватной стресс-реакции (Mastrangelo et al., 2012). Восстановленный пул пластохинона в хлоропластах арабидопсиса запускает ретроградный сигнал, регулирующий альтернативный сплайсинг ядерных генов в ответ на изменения редокс-состояния компонентов фотосинтетической ЭТЦ. Было обнаружено, что изменения освещенности влияют на

альтернативный сплайсинг генов, влияющих на процессинг РНК, в частности на *RS31* (Arginine/serine-rich Splicing Factor 31), усиливая аккумуляцию белок-кодирующей изоформы гена на свету (Petrillo et al., 2014a; Petrillo et al., 2014b). Конкретный механизм не выяснен, но известно, что световой контроль альтернативного сплайсинга регулируется изменением скорости элонгации, осуществляемой РНК-полимеразой II (Godoy Herz et al., 2019).

Изменения уровня редактирования многих сайтов хлоропластных РНК также вовлечены в ретроградный сигналинг (Zhao et al., 2019). Интегратором многих путей пластидного ретроградного сигналинга является ядерный ген *GUN1* (Genomes Uncoupled 1) – PPR-белок Р-подсемейства пластидной адресации, чье присутствие характеризуется низким количественным уровнем и очень высокой скоростью оборота (Wu et al., 2018). Функции GUN1 ассоциированы с гомеостазом пластидных белков (Tadini et al., 2016), импортом пластидных белков и цитозольным фолдинговым стрессом (Wu et al., 2019), с редактированием пластидных РНК (Zhao et al., 2019). GUN1 непосредственно связывается с MORF2, который участвует в редактировании хлоропластной РНК по практически всем существующим сайтам (Takenaka et al., 2012). Помимо этого, было обнаружено, что гены *QED1*, *OTP84* и *YS1*, также непосредственно взаимодействующие с MORF2, участвуют в ретроградном сигналинге и дополнительно контролируют редактирование РНК (Zhao et al., 2019). Механизм этого пути не ясен, но предполагается, что изменения в редактировании РНК субъединиц *RpoB* и *RpoC* изменяет активность РЕР и приводит к абнормальной транскрипции набора пластидных генов, зависимых, по всей видимости, от сигма-факторов SIG2 и SIG6, которые тоже участвуют в ретроградном сигналинге (Steiner et al., 2011; Woodson et al., 2013). Также было обнаружено, что GUN1 регулирует эффективность редактирования *ClpP1*, пластидной протеазы, что изменяет ее активность и может приводить к накоплению несвернутых белков и запуску ретроградного сигнала (Zhao et al., 2019). Учитывая, что ClpP вероятно принимает участие в обороте GUN1, между генами, кодирующими эти белки, возникает реципрокная регуляция, которая в поврежденных хлоропластах может создавать петлю обратной связи ретроградного сигналинга (Wu et al., 2018).

Хлоропласты и митохондрии тесно сопряжены через метаболизм, энергетический статус и редокс-статус (van Lis et al., 2004), что является одной из причин частичного перекрытия их путей ретроградного сигналинга. Самым ярким примером перекрытия является ТФ ABI4, компонент многих путей хлоропластного ретроградного сигналинга (ХРС) (Woodson et al., 2008), вовлеченный также и в митохондриальный ретроградный сигналинг (МРС) в качестве репрессора экспрессии ядерных генов, снимающего блокировку экспрессии при получении сигналов МРС (Giraud et al., 2009).

МРС, в основном, скоординирован вокруг ответа на дисфункцию ЭТЦ и индукцию генов,

ответственных за восстановление митохондриальных функций, таких как АOX, NDA/NDB, и генов, участвующих в контроле уровня АФК и редокс-гомеостазе, таких как глутатионтрансферазы, каталазы, аскорбат-пероксидазы и супероксид-дисмутазы (Rhoads, 2011). Известно, что МРС вовлечен в клеточный метаболизм при цитоплазматической мужской стерильности, биотическом и абиотическом стрессе (Yang et al., 2008). Как правило, мутации митохондриальных генов ведут к летальным дефектам дыхательной цепи, однако в тех случаях, когда в клетке химерных растений одновременно присутствуют популяции мутантных митохондрий и митохондрий дикого типа, развивается цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) (Karova et al., 2002). Считается, что любой аномальный фенотип, наблюдающийся при ЦМС, происходит в результате изменения экспрессии ядерных генов, в ответ на сигналы, посылаемые митохондриями, и которые, в свою очередь, регулируют гены, специфичные для ЦМС. Конкретный механизм передачи сигналов МРС в ядро при ЦМС не выяснен, однако известно, что у риса при ЦМС десятикратно возрастает экспрессия протеинкиназы, вероятно, индуцируемой АБК, и Ca-связывающего белка семейства EF-hand (Fujii et al., 2007).

МРС, предположительно, принимает участие в ответе на биотический стресс – имеются свидетельства, что сигналы, индуцируемые растительно-патогенными взаимодействиями, могут прямым или косвенным образом влиять на функциональные компоненты митохондрий, вызывая усиленную продукцию АФК и митохондриальную дисфункцию. АФК в свою очередь опосредованно индуцирует экспрессию генов защитного ответа и реакции гиперчувствительности (Amirsadeghi et al., 2007). Индуцируемый блокировкой трансляции или дыхания в митохондриях стресс запускает ретроградный сигнал, одним из целевых генов которого является *AOX1a*. *AOX1a*, в настоящее время, рассматривается в качестве маркерного гена МРС (Schwarzländer et al., 2011; Van Aken et al., 2016; Wang et al., 2016). Примечательно, что регуляторы экспрессии *AOX1a* (*RAO1/CDKE1* и *RAO2/ANAC017*) отвечают как на митохондриальные, так и на пластидные ретроградные сигналы (Blanco et al., 2014; Van Aken et al., 2016). По последним данным, в МРС участвует также GRF3, негативный регулятор экспрессии *AOX1a* (Li et al., 2022).

Митохондриальный разобщающий белок (UCP1) присутствует во внутренней митохондриальной мембране в больших количествах и участвует во многих процессах, включая транспорт аминокислот и разобщение дыхания, которые играют важную роль в процессе абиотического стрессового ответа (Ježek et al., 2018; Monné et al., 2018). Гиперэкспрессия UCP1 активирует экспрессию ядерных генов, ассоциированных с гипоксией (Barreto et al., 2015; Barreto et al., 2017). UCP1 воздействует на экспрессию ядерных генов через ингибирование ветви цитоплазматической цистеин-оксидазы (PCO) N-дегрон пути PRT6, основного механизма

клеточной чувствительности к кислороду и NO (Holdsworth et al., 2020; Barreto et al., 2022).

Очень интересным механизмом осуществления ретроградной регуляции является формирование у органелл особых выпячиваний оболочки, которые контактируют с ядром. Например, хлоропласты в условиях стресса образуют струмулы, контактные сайты которых с ядром позволяют напрямую транслоцировать пластидные белки в ядро (Caplan et al., 2015). Более того, известно, что многие ядерные белки, включая ТФ, изолированы в пластидах и транслоцируются в ядро при стрессе (Caplan et al., 2008; Foyer et al., 2014).

## **1.7 Особенности структурной организации и регуляции ЭТЦ митохондрий растений**

В растениях процессы окислительного фосфорилирования (OXPHOS) тесно связаны с фотосинтезом и реакциями на стресс. Практически во всех эукариотических клетках электрон-транспортная цепь (ЭТЦ), располагающаяся в митохондриальных мембранах, состоит из четырех белковых комплексов: комплекса NADH-дегидрогеназы (комплекс I), комплекса сукцинатдегидрогеназы (комплекс II), комплекса цитохром-с-редуктазы (комплекс III) и комплекса цитохром-с-оксидазы (комплекс IV).

### **1.7.1 Комплекс I.**

Самым крупным ферментным комплексом и значимым участком переноса электронов в ЭТЦ является комплекс I (Wirth et al., 2016). У эубактерий и митохондрий он состоит из двух доменов: мембранного плеча, и выступающего в матрикс (или бактериальный люмен) периферического плеча, которые образуют общую L-образную частицу. Минимальный субъединичный набор для бактерий – 7 коровых субъединиц в каждом домене. Помимо коровых, комплекс I включает, около 30 дополнительных субъединиц и имеет общую мол. массу около 1 МДа. На данный момент определены структуры с атомарным разрешением для комплекса I из бактерий (Baradaran et al., 2013), млекопитающих (Fiedorczuk et al., 2016; Zhu et al., 2016) и грибов (Parey et al., 2018).

Структура растительного комплекса I до недавнего времени была изучена только с низким разрешением, с помощью одночастичной электронной микроскопии (Dudkina et al., 2005a; Peters et al., 2008; Vultema et al., 2009). Первая структура растительного комплекса I с высоким разрешением (из *Brassica oleracea*) представлена в работе (Soufari et al., 2020) (Рис. 4). В отличие от комплексов NADH-дегидрогеназы из других групп эукариот, охарактеризованных к настоящему времени, растительный комплекс I имеет второй домен сферической формы, экспонированный в матрикс и прикрепленный к плечу мембраны в центральном положении. Кроме того, мембранное плечо растительного комплекса I немного длиннее. У *Arabidopsis*,

комплекс I состоит из 49 субъединиц: 14 - периферическое плечо, 30 - мембранное плечо и 5 - сферический растительный экстрадомен (Senkler et al., 2017a). Сравнение субъединичного состава комплекса I млекопитающих и *A. thaliana* показало, что 40 субъединиц являются консервативными (Cardol, 2011; Senkler et al., 2017a). Четыре субъединицы уникальны для комплекса I млекопитающих (одна из которых встречается в двух копиях на единицу комплекса I); для *Arabidopsis* уникальны девять: пять белков, напоминающих карбоангидразы гамма-типа, два небольших белка с неизвестной функцией (называемые P1 и P2), белок, напоминающий субъединицу препротейн-транслоказы внутренней митохондриальной мембраны (AT1G18320 и AT3G10110) и L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа (GLDH), конечный фермент пути биосинтеза аскорбиновой кислоты. Интересно, что большинство (но не все) белков, уникальных для комплекса I млекопитающих и растений, расположены на поверхности мембранного плеча, обращенной к матриксу. Из-за своего большого размера и уникальной биохимической среды этот участок, по-видимому, имеет специфические контактные сайты для белков, не связанных напрямую с функцией комплекса I в ЭТЦ. Функция комплекса I хорошо исследована, особенно для млекопитающих и грибов. Окисление NADH и восстановление убихинона происходят в двух разных функциональных доменах, каждый из которых является частью периферического плеча. Две реакции связаны между собой цепью переноса электронов, состоящей из флавиномононуклеотида (FMN) и семи-восьми железосерных кластеров. Транслокация протонов происходит с помощью мембранного плеча. В настоящее время нет данных о том, что функционирование растительного комплекса I при окислении/восстановлении NADH-убихинона и транслокации протонов отличается от механизма, предложенного для других групп эукариот.

**Карбоангидразный домен растительного комплекса I.** Сферический экстрадомен растительного комплекса I содержит субъединицы, подобные бактериальным карбоангидразам, и называется «карбоангидразным доменом» (Sunderhaus et al., 2006; Klodmann et al., 2010). Три из пяти белков этого небольшого семейства имеют консервативный с бактериальными гамма-карбоангидразами активный сайт и называются CA1, CA2 и CA3. Два других белка семейства являются более эволюционно удаленными и поэтому были названы белками, подобными карбоангидразе (CAL), CAL1 и CAL2 (Parisi et al., 2004; Perales et al., 2004). Экспериментальные данные показывают, что белки CA / CAL имеют перекрывающиеся функции и частично могут заменять друг друга (Perales et al., 2005; Sunderhaus et al., 2006). В то же время белки CA / CAL необходимы для сборки комплекса I. Если ген, кодирующий CA2, нокаутирован у *Arabidopsis*, количество комплекса I резко снижается (Perales et al., 2005). Если одновременно нокаутировать гены, кодирующие CA1 и CA2, комплекс I вообще не детектируется (Fromm et al., 2016). Были представлены доказательства того, что субъединицы карбоангидразного домена участвуют в очень ранних этапах сборки мембранного плеча комплекса I у растений (Meyer et al., 2011; Li et

al., 2013; Ligas et al., 2019; Meyer et al., 2019).

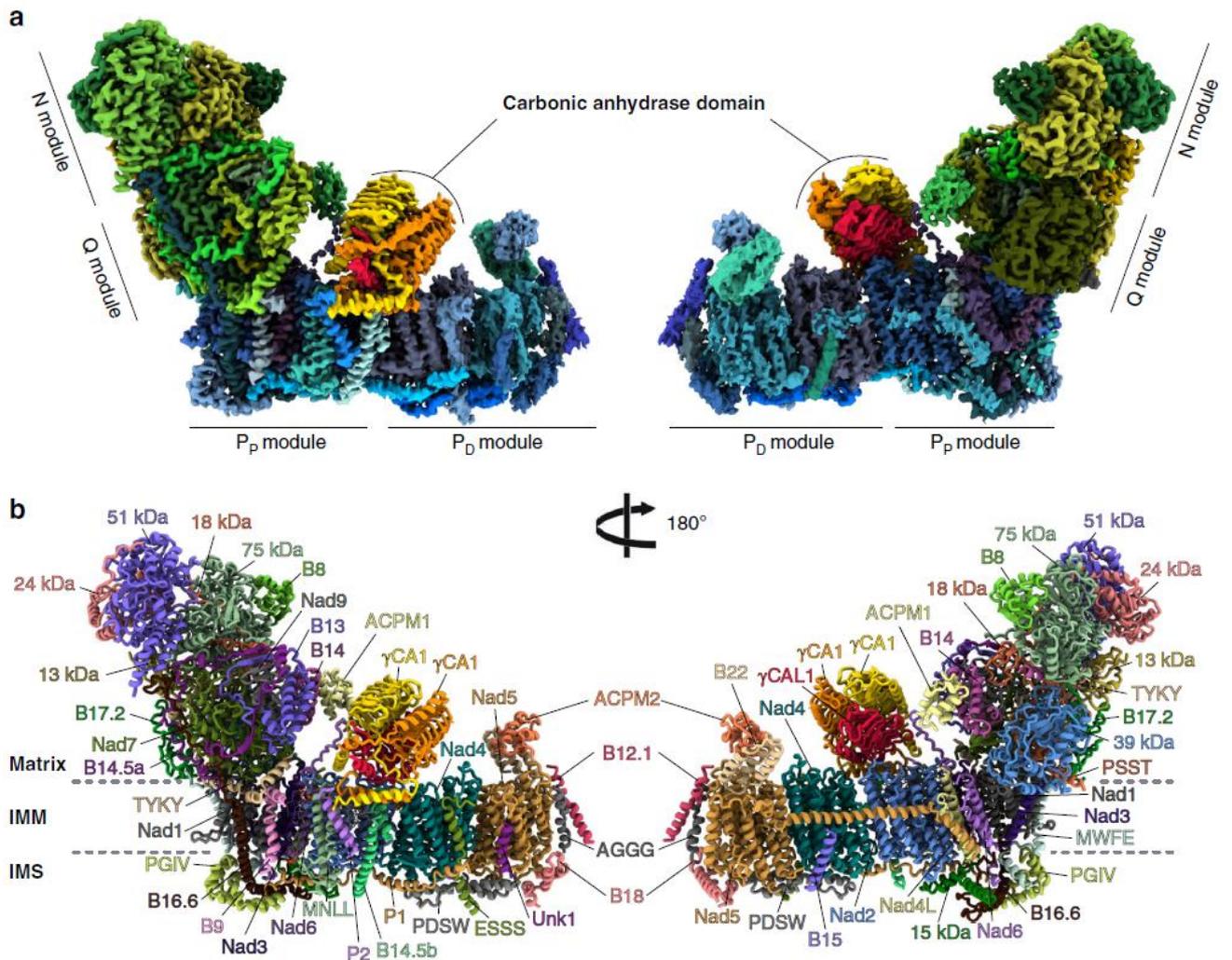


Рис. 4. Общая структура комплекса I митохондриальной ЭТЦ растений. а) Составная крио-ЭМ карта всего комплекса I. Мембранное плечо отображено синим цветом, периферическое - зеленым цветом, модуль  $\gamma$ -карбоангидразы - оранжевым цветом. б) Атомарная модель, в которой каждый из 45 белков аннотирован и показан своим цветом. IMM - внутренняя митохондриальная мембрана, IMS - межмембранное пространство (Soufari et al., 2020).

Функция карбоангидразного домена до сих пор не выяснена. Прямых доказательств карбоангидразной активности мономерных белков CA / CAL представлено не было. Предполагается, что карбоангидразы, интегрированные в комплекс I, являются частью внутриклеточного механизма переноса  $\text{CO}_2$  из митохондрий в хлоропласты для обеспечения ассимиляции митохондриального избытка  $\text{CO}_2$  в цикле Кальвина (Braun et al., 2007; Zabaleta et al., 2012).

Интересно, что карбоангидразный домен находится в тесном взаимодействии со своеобразным липидным комплексом, расположенным ниже последнего и между специфичным для растений доменом P2 и белками B14,5b и NAD2, близко к соединению NAD2-NAD4. Этот

липидный комплекс состоит из одного кардиолипина, координированного двумя фосфатидилинозитолами. Учитывая существенную роль липидов в активности комплекса I, этот липидный блок может быть критичным для эффективности и стабильности растительного комплекса I, и являться причиной сильного воздействия на СА-мутанты (Soufari et al., 2020). Было подтверждено, что GLDH представляет собой, скорее всего, фактор сборки именно мембранного плеча комплекса I у *Arabidopsis* (Schimmeyer et al., 2016).

У *Arabidopsis* была обнаружена минорная версия комплекса I со слегка уменьшенной молекулярной массой (850 вместо 1000 кДа), включающая GLDH (Heazlewood et al., 2003a). Было высказано предположение, что вариант комплекса I, содержащий GLDH может регулировать синтез аскорбата путем мониторинга скорости потока электронов, управляемого NADH, через комплекс I (Millar et al., 2003). При изучении особенностей мутанта *Arabidopsis* с дисфункцией GLDH было выяснено, что этот фермент, возможно, представляет собой фактор сборки, необходимый для образования комплекса I поскольку его функция ведет к накоплению комплекса (Pineau et al., 2008).

**Сборка комплекса I.** Как и в клетках млекопитающих и грибов, большинство субъединиц комплекса I кодируются ядерным геномом, синтезируются на цитоплазматических рибосомах и посттрансляционно транспортируются в митохондрии. Только семь сильно гидрофобных субъединиц мембранного плеча кодируются в митохондриальном геноме и транслируются на митохондриальных рибосомах. Однако у растений мтДНК кодирует дополнительно две субъединицы периферического плеча, Nad7 и Nad9. Необходимость согласованной экспрессии генов, кодирующих субъединицы комплекса, требует дополнительной координации между двумя генетическими компартментами. Более того, биосинтез субъединиц митохондриального кодирования сложен у растений из-за необходимости цис- и транс-сплайсинга во время созревания соответствующих транскриптов, а также обширного редактирования транскриптов перед трансляцией (Braun et al., 2014). Почти 200 нуклеотидных сайтов в девяти транскриптах митохондриального комплекса I подвергаются редактированию, что требует очень большого количества дополнительных белковых факторов, каждый из которых имеет ядерное кодирование. На заключительных этапах необходима реализация правильной сборки всех субъединиц в комплекс I. Из-за наличия карбоангидразного домена процесс сборки у растений, по крайней мере частично, происходит по уникальному механизму (Meyer et al., 2011; Li et al., 2013; Ligas et al., 2019; Meyer et al., 2019), а также включает дополнительные факторы, такие как GLDH.

**Регуляция функций комплекса I у растений.** Помимо своей основной функции в ЭТЦ, комплекс I растений имеет дополнительные, которые, возможно, способствуют переносу CO<sub>2</sub> из митохондрий в хлоропласты (карбоангидразный домен) или биосинтезу аскорбиновой кислоты

(GLDH). В то же время в митохондриях растений присутствуют ферменты с перекрывающейся активностью, такие как альтернативные (тип II) NADH-дегидрогеназы. Благодаря дополнительным NADH-дегидрогеназам растения могут существовать даже при дефиците комплекса I, хотя в мутантах, полностью лишенных комплекса I, резко нарушено развитие и фертильность (Kühn et al., 2015; Fromm et al., 2016). Регуляция многочисленных функций комплекса I у растений, в настоящее время изучена недостаточно. Время жизни субъединиц комплекса I находится в диапазоне нескольких суток (Nelson et al., 2014), и, в целом, их биосинтез протекает достаточно конститутивно. Однако, несмотря на общее постоянное содержание комплекса I, его активность определенно регулируется на посттрансляционном уровне. Идентифицированы многочисленные сайты посттрансляционных модификаций, включающие в себя тиолирование, фосфорилирование и ацетилирование (Braun et al., 2014). Физиологические последствия большинства этих модификаций экспериментально не изучены. Недавно было продемонстрировано, что тиоловые модификации нескольких определенных положений аминокислот в периферическом плече комплекса I имеют отношение к активации комплекса I во время самых первых стадий прорастания (Nietzel et al., 2020).

### 1.7.2 Комплекс II

Сукцинатдегидрогеназный комплекс - единственный компонент OXPHOS, который участвует как в цикле Кребса (катализируя превращение сукцината в фумарат), так и в ЭТЦ (Huang et al., 2013; Iverson, 2013; Huang et al., 2019). Электроны захватываются группой FAD и переносятся через короткую цепь переноса электронов, которая состоит из трех железосерных кластеров, на убихинон. Наконец, убихинол высвобождается комплексом II во внутреннюю мембрану митохондрий и впоследствии может окисляться комплексом III или альтернативной оксидазой. В отличие от комплексов I, III и IV, комплекс II не перемещает протоны через внутреннюю митохондриальную мембрану и не привносит электроны в ЭТЦ.

Субъединичный состав комплекса II высоко консервативен в бактериях и митохондриях животных и грибов. Характеристика комплекса II цветковых растений неожиданно выявила некоторые поразительные особенности (Eubel et al., 2003; Millar et al., 2004). У растений комплекс II особенно велик (около 160 кДа) и сравнительно хрупок (легко распадается при обработке детергентами). Он состоит из восьми субъединиц: основных белков SDH1-SDH4 и четырех дополнительных SDH5-SDH8. Некоторые субъединицы присутствуют в разных изоформах. Биохимический анализ комплекса II *Arabidopsis* и его белковых субъединиц показали, что SDH6 и SDH7 образуют часть якорного домена мембраны и, возможно, замещают мембранные спирали, которые отсутствуют в SDH3 и SDH4 растений (Schikowsky et al., 2017). SDH5, вероятно, находится на стыке сукцинатдегидрогеназного и якорного доменов, а расположение

маленькой субъединицы SDH8, массой в 4,9 кДа, в настоящее время неизвестно. Дополнительные субъединицы могут выполнять пока еще неизвестную активность в растительном комплексе II. Наличие дополнительных субъединиц позволяет предположить особенный или даже уникальный путь сборки комплекса II у растений (Huang et al., 2019).

### 1.7.3 Комплекс III

Комплекс цитохром С редуктазы является центральным сегментом дыхательной цепи митохондрий, сочетающий транспорт электронов от убихинола к цитохрому С и транспорт белка сквозь внутреннюю митохондриальную мембрану (Brandt et al., 1994). Обе активности комплекса III зависят от «Q-цикла», что включает окисление убихинола и повторное его восстановление на противоположных сторонах внутренней митохондриальной мембраны. У животных и грибов комплекс III состоит из 10 различных субъединиц от 6 до 50 кДа, которые можно разделить на три функциональные категории: (1) Три субъединицы, непосредственно участвующие в переносе электронов (железосерный белок Риске, гем-содержащий цитохром с1 и субъединица цитохрома b); (2) Две большие «коровые» субъединицы на поверхности комплекса III, обращенной в матрикс; (3) Пять мелких субъединиц <15 кДа (CQR6-CQR10), которые окружают субъединицы, непосредственно участвующие в переносе электронов. Комплекс всегда представляет собой димер из  $2 \times 10$  субъединиц с общей молекулярной массой около 500 кДа.

Для *Arabidopsis thaliana* была получена структура комплекса III с низким разрешением (Dudkina et al., 2005a). Растительный комплекс III также включает  $2 \times 10$  субъединиц и во многих отношениях напоминает комплекс III животных и грибов (Braun et al., 1995). Однако у растений комплекс III включает в себя вместо двух «коровых» субъединиц две субъединицы процессирующей митохондриальной пептидазы (MPP, которая в клетках животных и грибов представлена двумя растворимыми белками) (Braun et al., 1992; Eriksson et al., 1994). Матричный MPP, по-видимому, у растений отсутствует. Экспериментально доказано, что изолированный комплекс III растений эффективно удаляет транзитные пептиды митохондриальных белков ядерного кодирования, что продемонстрировано анализом процессинга белков *in vitro* (Braun et al., 1992; Eriksson et al., 1994; Braun et al., 1995). Таким образом, комплекс III растений представляет собой бифункциональный фермент.

Недавние исследования показали, что сборка комплекса III у растений происходит по уникальному пути (Schäfer et al., 2020). В митохондриях растений присутствует белок ТАТВ, который напоминает субъединицу белковой транслоказы бактериального типа и отсутствует в митохондриях животных и грибов. В отсутствие ТАТВ поздние интермедиаты сборки комплекса III накапливаются из-за нарушения транслокации субъединицы белка Риске.

#### 1.7.4 Комплекс IV и цитохром С

**Цитохром С** представляет собой небольшой гем-содержащий белок, расположенный в межмембранном пространстве митохондрий и осуществляющий перенос электронов с комплекса III на комплекс IV. У растений цитохром С дополнительно принимает электроны от других метаболических путей: биосинтеза аскорбата и митохондриальной конверсии лактата в пируват (Bartoli et al., 2000; Welchen et al., 2016a; Welchen et al., 2016b). У арабидопсиса существует две изоформы цитохрома С. Полагают что цитохром С, помимо функции в переносе электронов, также играет роль в стабилизации или сборке комплекса IV у растений (Mansilla et al., 2018).

**Комплекс IV** переносит электроны с цитохрома С на молекулярный кислород, который восстанавливается до воды. Перенос электронов сопряжен с перемещением протонов из митохондриального матрикса в межмембранное пространство (Wikström et al., 2018). Каталитическое ядро фермента образовано белками COX1, COX2 и COX3. COX1 несет три из четырех кофакторов, необходимых для реакции переноса электрона, гем а, гем а<sub>3</sub> и медьсодержащий центр Cu<sub>B</sub>. COX2 связывает медь-содержащий центр Cu<sub>A</sub>. Субъединичный состав растительного комплекса IV был проанализирован с помощью метода голубого нативного электрофореза в полиакриламидном геле (Blue Native PAGE) в сочетании с масс-спектрометрией в работах (Millar et al., 2004; Klodmann et al., 2011; Senkler et al., 2017b). Он состоит из трех коровых субъединиц (COX1, COX2 и COX3) и нескольких дополнительных более мелких субъединиц. Некоторые из этих небольших белков напоминают субъединицы COX животных и грибов (субъединицы COX5b, COX5c, COX6a, COX6b и COX6c), в то время как другие, по-видимому, специфичны для растений (COXX1, COXX2, COXX3, COXX4, COXX5 и COXX6), хотя доказательства этому пока ограничены (Senkler et al., 2017b).

#### 1.7.5 Комплекс V

Комплекс V (АТФ-синтаза) осуществляет синтез АТФ за счет электрохимического протонного градиента, генерируемого ЭТЦ. Комплекс V состоит из двух частей: мембранной части F<sub>0</sub>, и сферической части F<sub>1</sub>, которая выступает в митохондриальный матрикс. Статичные субъединицы F<sub>1</sub> и F<sub>0</sub> соединены и удерживаются на месте периферийным стержнем. С помощью электронной микроскопии одиночных частиц была получена с низким разрешением структура митохондриальной АТФ-синтазы из картофеля (Vultema et al., 2009). Он напоминает структуры митохондриальной АТФ-синтазы животных и грибов. Субъединичный состав АТФ-синтазы растений систематически исследовался с помощью BN-PAGE в сочетании с масс-спектрометрией (Heazlewood et al., 2003b; Meyer et al., 2008; Klodmann et al., 2011). Были описаны все пять субъединиц части F<sub>1</sub> и дополнительно десять различных субъединиц части F<sub>0</sub> (обозначенных a, b, c, d, g, FAD, OSCP, субъединица 8, ATP17 и субъединица 6 кДа

арабидопсиса). В настоящее время нельзя исключить наличие у растений дополнительных субъединиц F<sub>0</sub>. Несколько кандидатов были идентифицированы с помощью профилирования комплекса (Senkler et al., 2017b). У большинства растений субъединицы  $\alpha$ ,  $a$ ,  $b$  и  $c$ , а также субъединица 8 имеют митохондриальное кодирование (Unselde et al., 1997; Heazlewood et al., 2003b).

### 1.7.6 Другие белки-участники ЭТЦ

Альтернативные оксидоредуктазы являются специфической характеристикой ЭТЦ растений (и еще нескольких групп организмов). Альтернативные NAD(P)H-дегидрогеназы (altND) могут поставлять электроны в ЭТЦ, что способствует формированию протонного градиента. Точно так же альтернативная оксидаза (АОХ) может переносить электроны, происходящие из комплекса I, на молекулярный кислород. В случае, если электроны от альтернативных NAD(P)H-дегидрогеназ, переносятся АОХ на молекулярный кислород, транспортировка протонов полностью прекращается. Физиологическая роль альтернативных оксидоредуктаз важна, скорее, в качестве стресс-реакции растений, а не в функционировании классического OXPHOS.

У *Arabidopsis thaliana* и других цветковых растений небольшие семейства генов кодируют altND и АОХ. Обозначения белков отражают сходство в аминокислотной последовательности и функциональных свойствах (АОХ1А, АОХ1В, АОХ1С, АОХ1D, АОХ2 и NDA1, NDA2, NDB1, NDB2, NDB3, NDB4 и NDC1 у арабидопсиса). АОХ имеет молекулярную массу около 30 кДа и может формировать димеры размером 60 кДа. с Димеры АОХ, по всей видимости, взаимодействуют с другими белками в условиях *in vivo*, о чем свидетельствуют данные профилированием комплекса с помощью BN-PAGE, которые показывают массу АОХ около 140–150 кДа (Senkler et al., 2017b) Так, белки altND массой около 50-60 кДа могут образовывать белковые комплексы с димерами АОХ, поскольку в профиле на BN-PAGE обнаруживаются в районе 150 кДа (Senkler et al., 2017b). Некоторые altND являются частью структур, обнаруживаемых в диапазоне 600-700 кДа (Rasmusson et al., 2001). Однако свидетельств в пользу того, что altND или АОХ могут ассоциировать с основными комплексами ЭТЦ растений в настоящий момент не обнаружено.

Растительная ЭТЦ разветвляется благодаря присутствию ряда альтернативных ферментов и сайтов привнесения электронов (Schertl et al., 2014). Электроны от биосинтеза аскорбиновой кислоты и митохондриальной конверсии лактата в пируват попадают в ЭТЦ через цитохром С. Помимо этого, электроны, появляющиеся в ходе деградации аминокислот с разветвленной цепью частично переносятся через систему электронотранспортный флавопротеин / электронно-транспортный флавопротеин-убихинооксидоредуктаза (ETF / ETFQO) в ЭТЦ (Ishizaki et al.,

2005a), а электроны от окисления пролина привносятся в ЭТЦ пролиндегидрогеназой (Launay et al., 2019). Окислительное фосфорилирование, вызванное катаболизмом аминокислот, очень важно для растений в определенных стрессовых условиях, например в темноте и при нехватке воды (Pires et al., 2016). Другие ферменты вносят электроны со стороны межмембранного пространства, например глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа и дигидрооротатдегидрогеназа (Schertl et al., 2014).

### 1.7.7 Супрамолекулярная структура систем ОХРНОС растений

Биогенез систем окислительного фосфорилирования (ОХРНОС) у различных организмов отличается достаточной сложностью. Помимо структурных субъединиц, биогенез пяти гетеро-олигомерных ферментативных комплексов требует большого количества вспомогательных факторов для координации созревания субъединиц, включения простетических групп и сборки в холоферменты. Открытие того, что некоторые ферменты ЭТЦ физически взаимодействуют с образованием различных супрамолекулярных структур, называемых суперкомплексами (СК) и респирасомами, а также существование СК-специфических факторов сборки, участвующих в их сборке, привлекло внимание к структурным и функциональным свойствам СК и регуляторным путям, участвующим в их биогенезе.

Впервые особые ассоциаты комплексов ОХРНОС были обнаружены для млекопитающих и грибов с помощью BN-PAGE (Arnold et al., 1998; Schägger et al., 2000). Структуры некоторых растительных СК были изучены с помощью криоэлектронной микроскопии одиночных частиц с атомарным разрешением (Wu et al., 2020). Все респираторные СК включали димерный комплекс III, который связывался латерально с мембранным плечом комплекса I, или с одной-двумя копиями мономерного комплекса IV. Оба типа связывания могут присутствовать одновременно. Суперкомплексы, включающие комплексы I, III<sub>2</sub> и IV, также называют «респирасомами», поскольку они автономно могут катализировать перенос электронов от NADH на молекулярный кислород (при наличии цитохрома C и убихинона). Для млекопитающих описаны два типа респирасом, состава I + III<sub>2</sub> + IV<sub>(1-2)</sub> или I<sub>2</sub> + III<sub>2</sub> + IV<sub>2</sub>. Физиологическая роль респираторных СК и респирасом все еще обсуждается (Acin-Perez et al., 2014; Milenkovic et al., 2017; Hirst, 2018; Wu et al., 2020). Предполагается, что респирасомы связаны с еще более крупными структурами, называемыми респираторными мегакомплексами, которые, помимо других функций, должны иметь отношение к формированию структуры крист. В частности, было продемонстрировано, что димеризация мономеров АТФ-синтазы вызывает изгиб внутренней митохондриальной мембраны, что имеет большое значение для образования крист (Raumard et al., 2002).

Дыхательные суперкомплексы растений также впервые были описаны с помощью BN-PAGE (Eubel et al., 2003; Dudkina et al., 2006). Наиболее стабильное взаимодействие происходит

между комплексами I и III<sub>2</sub> (Рис. 5). Именно структура респираторного суперкомплекса I + III<sub>2</sub> арабидопсиса была исследована самой первой.

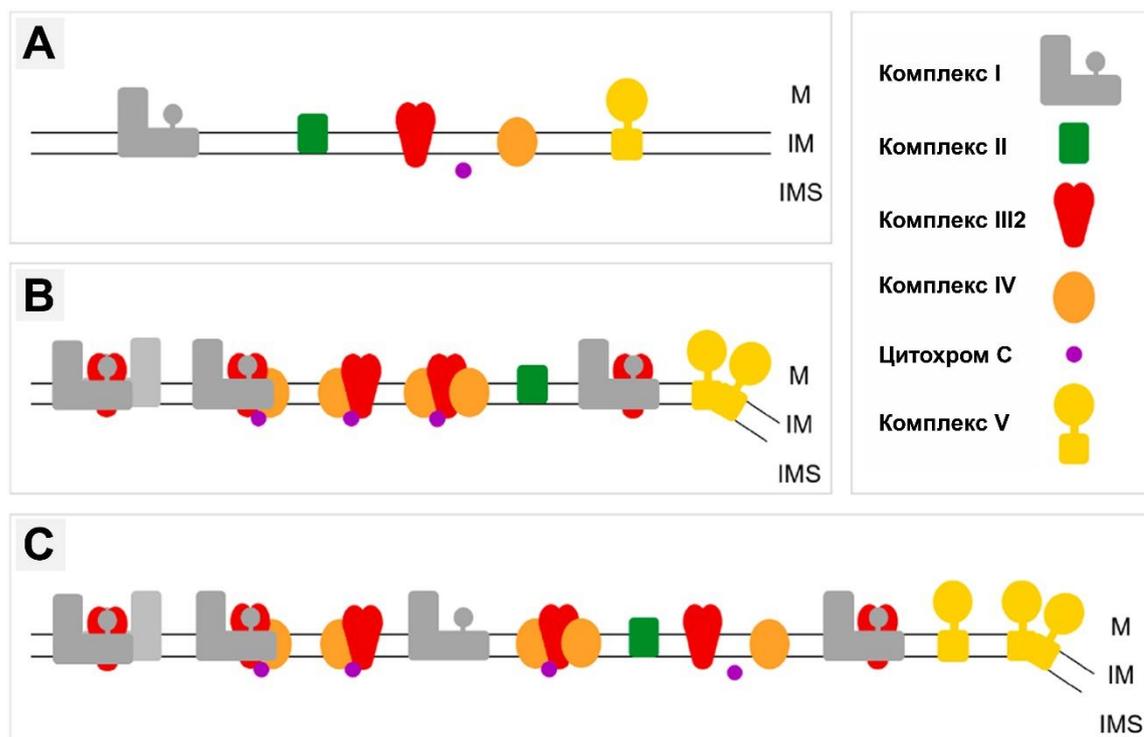


Рис. 5. Состав системы OXPHOS в растениях. А: мономерные компоненты OXPHOS (за исключением комплекса III<sub>2</sub>). В: респираторные СК, описанные для митохондрий растений. С: сосуществование мономерных комплексов и СК, предполагаемая ситуация *in vivo*. М: матрикс, IM: внутренняя митохондриальная мембрана, IMS: межмембранное пространство (по Braun et al, 2020).

Если смотреть со стороны митохондриального матрикса, мембранное плечо комплекса I изогнуто, и вогнутая сторона является сайтом ассоциации с комплексом III<sub>2</sub>. Ассоциация комплексов III<sub>2</sub> и IV у растений сравнительно слаба. Однако суперкомплексы состава III<sub>2</sub> + IV<sub>(1-2)</sub> и I + III<sub>2</sub> + IV<sub>(1-4)</sub> были описаны с помощью BN-PAGE для картофеля и шпината (Eubel et al., 2004; Krause et al., 2004), и некоторых других растений. Димеры АТФ-синтазы относительно хрупки у цветковых растений, но, как сообщалось, были обнаружены у арабидопсиса и картофеля (Eubel et al., 2003). Чрезвычайно стабильные димеры АТФ-синтазы были обнаружены у зеленых водорослей *Polytomella* и использованы для первого структурного анализа (Dudkina et al., 2005b). Предполагается, что мономерные комплексы ЭТЦ и СК сосуществуют *in vivo*. Полная сборка мономерных комплексов в СК потребовала бы определенных стехиометрических соотношений вовлеченных комплексов, однако такие соотношения не соблюдаются (Fuchs et al., 2020). В отличие от большинства цветковых растений, ассоциация комплексов III<sub>2</sub> и IV очень стабильна у европейской омелы (*Viscum album*), облигатного гемипаразитического цветкового растения, что может являться следствием отсутствия у него комплекса I (Maclean et al., 2018; Senkler et al., 2018; Petersen et al., 2020). Однако поскольку мутанты *Arabidopsis*, в которых отсутствует

комплекс I, не проявляют повышенного взаимодействия комплексов III<sub>2</sub> и IV, интенсивность взаимодействия III<sub>2</sub>-IV, вероятно, видоспецифична. Точно так же, стабильность суперкомплекса I + III<sub>2</sub> варьирует у разных растений. Особенно крупный респираторный СК был обнаружен для нескольких растений и описан как I<sub>2</sub> + III<sub>4</sub> (Eubel et al., 2003), однако детальный анализ с помощью одночастичной электронной микроскопии выявил, что он содержит только один димер III<sub>2</sub>, и имеет состав I<sub>2</sub>+III<sub>2</sub> (Bultema et al., 2009).

Альтернативные оксидоредуктазы также собираются в малые и большие комплексы, состав которых пока не установлен. Свидетельств в пользу связывания их с классическими комплексами ЭТЦ нет, и предполагается, что они формируют «альтернативные респирасомы», служащие для повышения эффективности разобщения дыхательной цепи (Senkler et al., 2017b).

В работе (Ukolova et al., 2020) исследовали ассоциации комплексов ЭТЦ *Pisum sativum* с помощью MALDI-TOF, иммунохимическими и электрофоретическими методами. Помимо отдельных компонентов ЭТЦ авторами были идентифицированы: респирасомы I<sub>1-2</sub>III<sub>2-4</sub>IV<sub>n</sub>, суперкомплексы I+III<sub>2</sub>, III<sub>2</sub>IV, III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>, ко-мигрирующая ассоциация IV<sub>1</sub>Va<sub>2</sub> / I+III<sub>2</sub>, димеры комплекса IV и двух форм комплекса V (Va<sub>2</sub>, Vb<sub>2</sub>), продукты деградации/интермедиаты сборки комплекса II, а также впервые обнаружен мегакомплекс очень большой массы (до 10 МДа), состава (II<sub>x</sub>III<sub>y</sub>IV<sub>z</sub>)<sub>n</sub> (Рис. 6). В качестве структурно-функциональных единиц ЭТЦ предлагаются оксфосомы состава I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>4</sub>V<sub>6</sub> и I<sub>2</sub>III<sub>4</sub>IV<sub>8</sub>V<sub>6</sub> (с двойным респирасомным ядром).

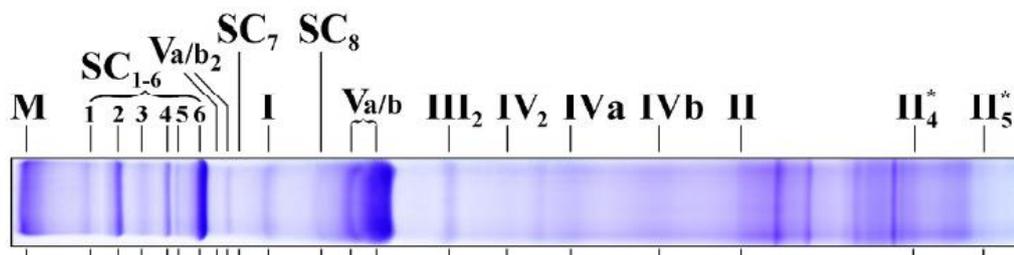


Рис. 6. Идентифицированные компоненты ЭТЦ *Pisum sativum*, направление BN-PAGE слева-направо, окраска кумасси (фрагмент из Ukolova et al., 2020)

Массы наблюдаемых на BN-PAGE солюбилизированных митохондрий арабидопсиса белковых комплексов приведены в Табл. 3 (Klodmann et al., 2011).

Массы наблюдаемых на BN-PAGE солюбилизованных митохондрий арабидопсиса  
белковых комплексов

Единица ЭТЦ	Наблюдаемая масса, кДа
СК I <sub>2</sub> +III <sub>2</sub>	3000
СК I+III <sub>2</sub>	1500
Комплекс I	1000
Мембранное плечо к. I	660
Комплекс V	
Комплекс III <sub>2</sub>	500
F <sub>1</sub>	300
F <sub>0</sub>	260
Комплекс IV	207
Комплекс II	160
Альтернативные NADH-дегидрогеназы	160

### 1.7.8 Модели структурной организации дыхательной цепи

*Твердотельная модель.* Согласно этой модели, CoQ постоянно связан с единицами ЭТЦ (Chance et al., 1955). Доказательства в пользу «жесткой» или «твердотельной» модели были основаны на выделении активных единиц I-III и II-III в стехиометрическом молярном соотношении 1:1 во время промежуточных стадий очистки отдельных ферментов, что было интерпретировано как вторичные ферментативно-активные комплексы (Fowler et al., 1961), а также на воссоздании «повторяющейся единицы переноса электрона», содержащей все комплексы ЭТЦ митохондрий бычьего сердца (Blair, 1967).

*Модель жидкого состояния.* Модель «случайного столкновения», «жидкости» или «жидкого состояния» была предложена Hackenbrock и коллегами и характеризовала все мембранные белки и окислительно-восстановительные компоненты ЭТЦ в постоянном и независимом диффузионном движении, при котором перенос электронов осуществляется посредством диффузионных столкновений между окислительно-восстановительными партнерами (Höchli et al., 1976). Доказательства в пользу «модели жидкого состояния» возникли из анализов кинетики, предполагающих что не только перенос электронов в областях CoQ и цитохрома C характеризуется пул-подобным поведением в митохондриях, но также и то, что он следует кинетике насыщения в отношении концентраций CoQ и цитохрома C (KrÖGer et al., 1973; Gupte et al., 1988). Кроме того, ферментативная активность сохранялась при выделении индивидуальных комплексов OXPHOS (Hatefi et al., 1962), а использование флуоресцентных антител против комплексов III<sub>2</sub> и IV вызывало независимую агрегацию этих комплексов, давая основание предположить, что они диффундируют латерально в плоскости мембраны независимо

друг от друга (Höchli et al., 1985).

*Модель динамического агрегата (пластичности).* Исследования Ferguson-Miller и соавторов, которые исследовали роль латеральной диффузии цитохрома С при электронном транспорте в нативных митохондриальных мембранах, привели к созданию модели «динамического агрегата» (Hochman et al., 1982). В рамках этой модели существует динамическое равновесие между свободными и ассоциированными формами компонентов ЭТЦ, причем все они активны при переносе электронов. Это новое представление о дыхательной цепи согласовало две классические модели, так как оно включало в себя переходные агрегаты, а также свободную боковую диффузию окислительно-восстановительных компонентов, модулирующих скорости переноса электронов. Обратимое образование специфических агрегатов ЭТЦ дополнительно подразумевало механизм локализованного протонного потока и возможность регулирования направления и эффективности переноса электронов (Hochman et al., 1985; Ferguson-Miller et al., 1986). Эта гипотеза оставалась в тени «жидкой» модели до тех пор, пока не появились данные двух групп исследователей, основанные на использовании метода голубого нативного электрофореза в полиакриламидном геле (BN-PAGE), разработанного Schägger et al, продемонстрировавшие сосуществование отдельных комплексов ЭТЦ вместе с их внутренними ассоциациями в супрамолекулярных ансамблях, которые были названы суперкомплексами (СК) (Cruciat et al., 2000; Schägger et al., 2000). Экспериментальные данные продемонстрировали, что СК являются эволюционно консервативными стабильными структурами как у прокариот, так и у эукариот, а не случайными ассоциациями комплексов ЭТЦ (Chaban et al., 2014; Melo et al., 2016), а исследования с помощью криоэлектронной микроскопии высокого разрешения (крио-ЭМ) показали детальный структурный анализ архитектуры дыхательных СК млекопитающих (Gu et al., 2016; Letts et al., 2016; Wu et al., 2016). Сосуществование индивидуальных комплексов и СК ЭТЦ, таким образом, подтверждает основные принципы модели «динамического агрегата», переименованную впоследствии в модель «пластичности» (Acín-Pérez et al., 2008; Acín-Pérez et al., 2014). В своей нынешней форме эта модель предполагает, что переключение между свободно перемещающимися комплексами и фиксированными СК оптимизирует поток электронов от различных субстратов (NADH и FADH<sub>2</sub>), адаптируя эффективность дыхательной цепи к изменениям клеточного метаболизма через распределение пулов CoQ и цитохрома С (Lapiente-Brun et al., 2013). Повышение каталитической эффективности ЭТЦ в рамках этой гипотезы предполагалось на основании данных BN-PAGE и потребления кислорода в клетках мыши, обедненных комплексами ЭТЦ. Однако данная гипотеза была подвергнута сомнению в результате более прямых спектроскопических и кинетических экспериментов на субмитохондриальных частицах дрожжей и крупного рогатого скота, показавших, что: (1) Окисление NADH и сукцината происходит через единый и общедоступный пул CoQ (Blaza et al.,

2014); (2) Цитохром С не встречает значительных препятствий на пути его свободной диффузии (Trouillard et al., 2011).

Более того, эта модель была предложена на основе разделения структур дыхательной цепи на гелях BN-PAGE и, следовательно, существование обратимых динамических событий ассоциации/диссоциации, так называемой «пластичности», между отдельными комплексами и SC еще предстоит доказать. Перспективная эволюция модели «пластичности», таким образом, будет опираться на обширную характеристику структурных, функциональных и кинетических свойств СК в различных физиологических условиях (Barrientos et al., 2013; Milenkovic et al., 2017).

### 1.8 Трансгенные растения с измененной экспрессией RPOТmр

Ранее сотрудниками ЛГИР СИФИБР СО РАН на основе мутантной линии *rpotmp* были получены трансгенные растения с комплементацией митохондриальных или хлоропластных функций RPOТmр (линии Tmp-M и Tmp-P, соответственно), а на основе линии дикого типа – трансгенные растения с гиперэкспрессией RPOТmр в митохондриях или хлоропластах (линии OEM и OEP, соответственно).

С помощью ОТ-ПЦР тотальной РНК, экстрагированной из 12-дневных проростков *A. thaliana* Col-0 были получены фрагменты кДНК генов арабидопсиса *RPOТ1* и *RPOТ3*, кодирующие транзитные пептиды RPOТm (NM\_105571,3:212-338, “mt”) и RPOТр (Y08463,1:59-179, “pt”), соответственно, а также кДНК гена *RPOТ2*, кодирующая RPOТmр без последовательности транзитного пептида (NM\_121574,2:545-3267). Последовательности транзитных пептидов были клонированы в составе бинарного вектора pBI121 (Chen et al., 2003) между последовательностями промотора 35S из вируса мозаики цветной капусты (CaMV) и геном *GUS*. кДНК, кодирующая каталитическую часть RPOТmр (“Tmp”) была клонирована в составе плазмид mt-pBI121 (содержащей транзитный пептид RPOТm) и pt-pBI121 (содержащей транзитный пептид RPOТр) в позиции удаленного гена *GUS*, перед последовательностью терминатора гена нопалин-синтетазы (Рис. 7). Полученные конструкции были использованы для агробактериальной трансформации (Zhang et al., 2006) растений арабидопсиса дикого типа (Col-0) и инсерционного мутанта *rpotmp* (GABI\_286E07) методом погружения цветков (Clough et al., 1998). Отбор трансформантов проводился на питательных средах, содержащих канамицин (Tarasenko et al., 2016).

Для линий трансформантов OEM не было обнаружено выраженных отличий по сравнению с линией дикого типа при выращивании на искусственных и естественных средах: скорость прорастания семян, рост и развитие, внешний облик растений были подобны растениям дикого типа. Линии трансформантов OEP проявляли некоторые отличия от Col-0.

Для линии хлоропластного гиперэкспрессора ОЕР12 был характерен несколько ускоренный рост на чашках Петри и на почве, и значимо ( $P < 0,05$ ) более раннее начало цветения по сравнению с линией дикого типа. Согласно данным кПЦР, уровень транскрипта рекомбинантной RPO<sub>Tmp</sub> в этой линии был наиболее высоким среди всех трансгенных линий с гиперэкспрессией RPO<sub>Tmp</sub> в хлоропластах.

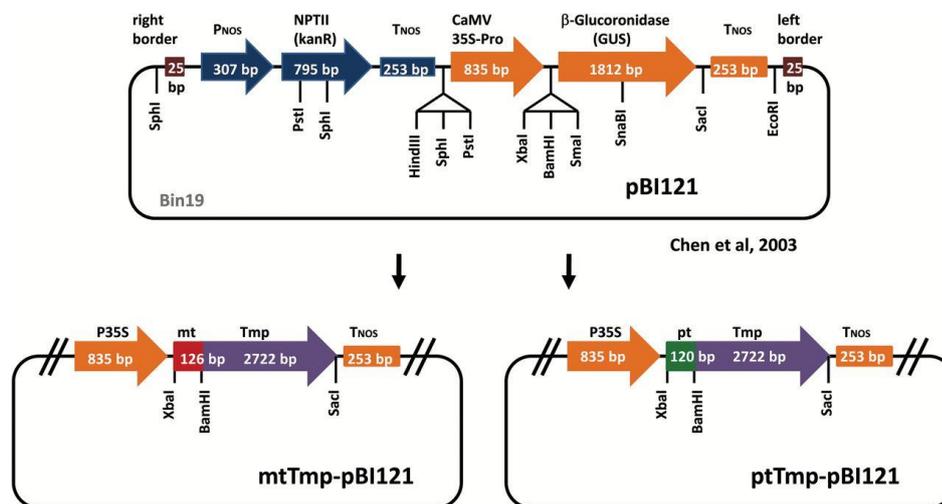


Рис. 7. Схема генетических конструкций, использованных для получения растений с гиперэкспрессией и комплементацией функций RPO<sub>Tmp</sub> в митохондриях и хлоропластах (Tarasenko et al., 2016).

Для трех линий (ОЕР5, ОЕР8, ОЕР18) напротив, была выявлена тенденция к замедленному росту на плотной среде. Подобные признаки (у линии ОЕР5 в особенности) могли бы свидетельствовать о происходящих в данных линиях нарушениях функционирования хлоропластов. В работе (Baba et al., 2004) представлены данные, указывающие на то, что RPO<sub>Tmp</sub> может играть определенную роль в хлоропластах. В работах (Emanuel et al., 2006; Courtois et al., 2007) было выявлено, что эта роль ограничивается преимущественно ранними стадиями развития растений. В пользу данного предположения свидетельствуют и данные, полученные ранее в лаборатории генетической инженерии СИФИБР СО РАН с использованием линий Tmp-P, в которых белок RPO<sub>Tmp</sub> присутствует только в хлоропластах, но не митохондриях (Tarasenko et al., 2016).

При изучении фенотипа, роста и развития растений с комплементацией функций RPO<sub>Tmp</sub> (Tmp-M и Tmp-P) и анализе их молекулярно-генетических характеристик было установлено, что восстановление активности РНК-полимеразы RPO<sub>Tmp</sub> в хлоропластах не приводит к компенсации дефекта в мутантном по функциям RPO<sub>Tmp</sub> растениям (Tarasenko et al., 2016). Напротив, растения *rpotmp*, экспрессирующие RPO<sub>Tmp</sub> митохондриальной адресации, проявляют фенотип, в большей степени напоминающий растения дикого типа.

## 1.9 Заключение обзора литературы

Таким образом, РНК-полимераза RPOТmp представляет собой фермент, появившийся в результате дупликации ядерного гена *RPOТ* у двудольных растений, который произошел от фаговой РНК-полимеразы T7. RPOТmp локализуется как в митохондриях, так и хлоропластах, но основные ее функции связаны с митохондриями. В митохондриях RPOТmp производит геноспецифическую транскрипцию определенной группы генов, предположительно в комплексе с дополнительными белковыми факторами, так как *in vitro* RPOТmp инициирует транскрипцию только с 3 промоторов. Мутанты *rpotmp* проявляют задержку развития, сниженный уровень транскриптов генов мтДНК и, как следствие, недостаточность по комплексам I и IV ЭТЦ митохондрий. При этом частота использования промоторов у мутанта и растения дикого типа одинакова, что показывает отсутствие у RPOТmp промоторной специфичности. В хлоропластах, как установлено, RPOТmp принимает участие в транскрипции *Rrn*-оперона с РС-промотора во время прорастания, но на более поздних стадиях развития ее роль в этих органеллах не определена.

По последним данным, транскрипция мтДНК носит релаксированный характер, и регуляция экспрессии генов мтДНК осуществляется, по большей части, посттранскрипционно - в процессе редактирования, сплайсинга и стабилизации транскриптов, а содержание функционально-активных компонентов ЭТЦ митохондрий регулируется в основном на уровне сборки целых белковых комплексов. Тем не менее, этих механизмов недостаточно для компенсации дефекта, обусловленного отсутствием функциональной RPOТmp.

Целью диссертационного исследования являлось изучение особенностей функций RPOТmp в митохондриях и хлоропластах, с использованием трансгенных растений арабидопсиса с измененной экспрессией данной РНК-полимеразы: мутантной линии *rpotmp*, у которой отсутствует функциональная RPOТmp; линий с комплементацией функций RPOТmp в митохондриях (линии Tmp-M) и хлоропластах (линии Tmp-P), и линий с гиперэкспрессией RPOТmp в митохондриях (линии OEM) и хлоропластах (линии OEP).

Задачи:

1) Провести обработку данных транскриптома растений *Arabidopsis thaliana*, полученных методом ДНК-микрочипирования, определить гены с дифференциальной экспрессией относительно линии растений дикого типа, провести анализ обогащения функциональных категорий генов, проанализировать гены на ко-экспрессию. Проанализировать возможные связи модулей ко-экспрессии с транскрипционными факторами.

2) Выявить гены, дифференциальная экспрессия которых может являться характерным следствием ретроградного ответа на изменение количества активной RPOТmp в митохондриях и хлоропластах.

3) Исследовать всхожесть семян трансгенных растений на средах с добавлением экзогенной абсцизовой кислоты и NaCl.

4) Изучить супрамолекулярную организацию белковых комплексов мембран митохондрий и тилакоидов в линиях Арабидопсиса с измененной экспрессией RPO<sub>Tmp</sub>.

5) Создать генетические конструкции, содержащие репортерный ген GFP под управлением промоторных областей генов *Cox1* и *Rrn26*, транскрипцию которых *in vivo* производят RPO<sub>Tmp</sub> и RPO<sub>Tm</sub>, с целью исследования транскрипционной активности промоторов с импортированных конструкций в изолированных митохондриях *in organello*.

**Положения, выносимые на защиту:**

1) На основе анализа генных сетей выявлена роль RPO<sub>Tmp</sub> в клетке *Arabidopsis thaliana*, связанная с регуляторными ансамблями, причастными к регуляции состояния покоя семян, рецепции и метаболизма АБК, ГК, БС и ауксинов, к регуляции роста растений и цветения.

2) Отсутствие функциональной RPO<sub>Tmp</sub> приводит к развитию стрессового состояния, проявляющегося в повышении чувствительности к АБК и солевому стрессу, модуляциям метаболизма и рецепции фитогормонов, вероятно, вследствие изменения активности группы транскрипционных факторов семейства NAC.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Линии *Arabidopsis thaliana* использованные в работе

В настоящем исследовании были использованы растения дикого типа (экотип Columbia-0), мутантная линия *rpotmp* с отсутствующей функциональной RPO<sub>Tmp</sub>, линии с гиперэкспрессией RPO<sub>Tmp</sub> митохондриальной (OEM1, OEM7, OEM15, OEM20) и пластидной (OEP5, OEP8, OEP12, OEP15) адресации, полученные ранее сотрудниками ЛГИР СИФИБР СО РАН методом агробактериальной трансформации растений дикого типа Col-0 (Tarasenko et al., 2016). Также были использованы растения с комплементацией функций RPO<sub>Tmp</sub> в митохондриях (Tmp-M3, Tmp-M11) и хлоропластах (Tmp-P1), полученные ранее сотрудниками ЛГИР СИФИБР СО РАН методом агробактериальной трансформации растений мутанта *rpotmp* (Tarasenko et al., 2016). Семена растений дикого типа были получены из Ноттингемского банка семян Арабидопсиса (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, Великобритания). Семена инсерционного мутанта *rpotmp* (GABI\_286E07) были получены из коллекции инсерционных мутантов GABI-Kat (Rosso et al., 2003).

### 2.2 Биоинформатические методы

#### 2.2.1 Получение данных методом ДНК-микрочипирования

Эксперимент ДНК-микрочипирования был произведен ранее сотрудниками ЛГИР СИФИБР СО РАН. Для ДНК-микрочипирования использовали препараты РНК, которые были получены из листьев розеток 12-дневных растений с помощью мини-набора QIAGEN RNeasy plant (Qiagen). Образцы РНК метили с использованием наборов Low Input Quick Amp labeling kit two-color (Agilent Technologies) и Agilent RNA Spike-In kit two-color (Agilent Technologies). Образцы кДНК из Col-0 и трансгенных линий метили флуоресцентными красителями Cy3 и Cy5, соответственно. Анализ микрочипов проводили путем гибридизации четырех образцов на одном слайде (Arabidopsis (V4) Gene Expression Microarray slide 4×44K; Agilent Technologies) со смесью кДНК, меченых Cy3 и Cy5. После гибридизации с помощью набора для гибридизации Gene Expression Hybridization kit (Agilent Technologies) слайд микрочипа сканировали с помощью сканера модели G2539A (Agilent SureScan) с контролем сканирования A. 8.5.1 (Agilent Technologies). Анализ ДНК-микрочипов проводился с использованием программного обеспечения Agilent Feature Extraction 10.10.1.1 (Agilent Technologies). Все написанные в ходе исследования функции и скрипты находятся в открытом репозитории GitHub: <https://github.com/ivg-git/Gorbenko-IV-PhD-thesis-public-data.git>.

#### 2.2.2 Предварительная обработка данных.

Имеющиеся файлы сканирований чипов были маркированы в соответствии с

исследуемыми образцами. Обработка производилась в среде языка программирования R (R Development Core Team, 2022), при помощи RStudio, с использованием пакета limma (Ritchie et al., 2015), Bioconductor.org (Huber et al., 2015).

Для анализа использовались значения `rDyeNormSignal` и `gDyeNormSignal`, полученные при помощи ПО Feature Extraction, и представляющие собой коэффициенты, пропорциональные количеству олигонуклеотидных зондов каждой точки ДНК-микрочипа, по которым произошла гибридизация с кДНК образца, помеченного  $Cy5$  и  $Cy3$ , соответственно, с вычетом значений фоновой флуоресценции чипа, а также нормализацией значений относительно контрольных проб, флуоресценция которых не зависит от нанесенного на чип образца.

Для того, чтобы сделать одинаковыми эмпирические распределения интенсивностей всех микрочипов, нормализацию значений проводили методом “Gquantile”, производящим квантильную нормализацию значений средней экспрессии (с нормировкой на зеленый канал, так как в каждом чипе в зеленом канале были растения дикого типа Col-0). Распределения плотности флуоресценции оценивали по графикам визуально.

Была построена дизайн-матрица эксперимента, согласно которой значения экспрессии генов исследуемых линий нормировались на экспрессию соответствующих генов дикого типа Col-0. Применяли функцию `eBayes()`, чтобы, с учетом соответствия линейной модели, вычислить модерированную *t*-статистику, модерированную *F*-статистику и логарифмические ошибки дифференциального выражения путем эмпирической байесовской модерации стандартных ошибок к общему значению (Smyth, 2005).

С помощью функции `topTable()` из объекта `MArrayLM` (MicroArray Linear Model) извлекали данные LFC (Log Fold Change, логарифм по основанию 2 кратности изменения экспрессии относительно Col-0), для получения таблиц экспрессии дифференциально экспрессирующихся генов. Таблицы получали для отдельных линий с использованием разных пределов обнаружения. В качестве метода коррекции *P*-значений использовали метод Бенджамини-Хохберга. Загруженные с сайта компании Agilent файлы аннотации олигонуклеотидных зондов для чипа G2519F-021169 (Arabidopsis V4, 4x44k) помещали в программную среду R. Аннотацию проводили согласно данным с сайта Agilent.com (доступ 18.07.24), пакету `Org.At.tair.db` (Carlson, 2019), семействам белков и функциональной аннотации БД TAIR (<https://www.arabidopsis.org>, доступ 18.07.24).

Для получения таблиц множественного сравнения экспрессии - информацию извлекали из `MArrayLM` с пределом обнаружения только по LFC ( $LFC \geq 1$ ,  $P = 1$ ), при этом значения экспрессии, не представленные в ДЭГ отдельных линий, обращали в нуль. После аннотации для случаев множественных мишеней на зонд, или множества зондов на мишень (не являющихся преднамеренными техническими повторностями) вычисляли среднее значение экспрессии на ген

и данную таблицу использовали в дальнейшем анализе (таблица `exp_true.xlsx`, [https://github.com/ivg-git/Gorbenko-IV-PhD-thesis-public-data/blob/be140ed043f9914fdd17546b15d1ba7da0b53150/exp\\_true.xlsx](https://github.com/ivg-git/Gorbenko-IV-PhD-thesis-public-data/blob/be140ed043f9914fdd17546b15d1ba7da0b53150/exp_true.xlsx)).

Транскриптомные данные были загружены в БД NCBI Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) под номером GSE251661.

### 2.2.3 Визуализация диаграмм.

Визуализацию тепловых карт производили с помощью пакета `complexHeatmap` (Gu, 2022). Визуализацию графиков с помощью пакета `ggplot2` (Wickham et al., 2016). Диаграммы Венна – с помощью пакета `venn` (Dusa, 2022).

### 2.2.4 Анализ ко-экспрессии генов.

Анализ ко-экспрессии проводили с помощью пакета `CEMiTool` (Russo et al., 2018), с использованием генетических характеристик исследуемых линий для оценки обогащения модулей ко-экспрессии. Гены модулей были аннотированы с использованием БД `Agilent ArrayElement`, а также вручную, используя BLAST поиск по референсному транскриптому *Arabidopsis thaliana* (Zhang et al. 2017) или сборке генома TAIR10.1 ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF\\_000001735.4/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000001735.4/)). Для построения сетей белок-белковых взаимодействий (ББВ) использовался интерактом из работы Yilmaz et al. (2022) и пакет `igraph` для R (Csardi et al., 2024). Для визуализации сетей использовались пакеты `GGally` (Schloerke et al., 2024) и `ggraph` (Pedersen, 2024). Для определения топ-центральных узлов сетей ББВ использовали комбинацию пяти метрик центральности: степень центральности (`degree`), центральность посредничества (`betweenness`), центральность близости (`closeness`), центральность локальной эффективности (`local efficiency`) и гармоническую центральность (`harmonic`), с помощью созданной функции `select_top_n_nodes.R` ([https://github.com/ivg-git/Gorbenko-IV-PhD-thesis-public-data/blob/2dd1cff3d18eca32bcf75dc793c56a44091e64c4/select\\_top\\_n\\_nodes.R](https://github.com/ivg-git/Gorbenko-IV-PhD-thesis-public-data/blob/2dd1cff3d18eca32bcf75dc793c56a44091e64c4/select_top_n_nodes.R)).

Для анализа ассоциации модулей ко-экспрессии с известными мишенями транскрипционных факторов была использована функция `enricher` пакета `ClusterProfiler` (Wu et al., 2021) и данные БД `Plant GSAD` (набор данных TFT, <http://systemsbiology.cau.edu.cn>) и `PlantRegMap` (<https://plantregmap.gao-lab.org>) для построения таблицы “TERM2GENE”.

Для анализа скоррелированной экспрессии использовали попарные корреляции Пирсона между лог-экспрессией для разных зондов ДНК-микрочипа, которые были определены в модули ко-экспрессии, отбирали корреляции с  $R > 0.8$  и строили взвешенный граф, используя значения “ $1 - \text{abs}(R)$ ” в качестве весов ребер. Из полученного графа получали минимальное остовное древо (МОД) с помощью взвешенного алгоритма Прима. МОД кластеризовали с помощью функции

кластеризации по посредничеству (`cluster_edge_betweenness`) пакета `igraph`. Для определения интересных кластеров рассчитывали обогащение наборов генов (`clusterProfiler::enricher`) с использованием данных дифференциальной экспрессии соответствующих генов. Результаты сравнивали с данными БД ATTED-II (Obayashi et al. 2022).

### **2.2.5 Анализ избыточной представленности и обогащения наборов генов.**

Анализ избыточной представленности и обогащения наборов генов категорий генной онтологии проводили с помощью пакетов `clusterProfiler` (Wu et al., 2021) и `Org.At.tair.db` (Carlson, 2019), в обоих случаях используя в качестве входных данных гены с дифференциальной экспрессией, рассчитанные для каждой линии отдельно.

## **2.3 Выращивание стерильных растений на чашках Петри**

Для приготовления стерильных сред использовали метод кипячения: в термостойкие колбы объемом 500 мл помещали 40 мл  $H_2O$ , 0,8% фитагеля (Sigma Aldrich), 0,5х питательной среды Мурасиге-Скуга (Murashige et al., 1962), отмечали на колбе объем раствора и добавляли дополнительно 50 мл  $H_2O$  для кипячения. Среды готовили из расчета 40 мл среды на 1 чашку Петри. После кипячения среды оставляли остыть до температуры  $\sim 40$  °С. Все дальнейшие операции проводили в стерильном ламинарном боксе. Использовали чашки Петри, стерилизованные в сухожаровом шкафу при температуре 300 °С в течение 3 часов. Производили розлив сред по чашкам Петри при помощи градуированной склянки объемом 50 мл. Для розлива сред с АБК предварительно готовили стоковый спиртовой раствор АБК 7,9 мг/мл (30 мМ), который хранили в морозильной камере при  $-20$  °С. Непосредственно перед экспериментом стоковый раствор АБК разводили в 15 раз – до концентрации 2 мМ. Во время розлива сред в градуированную склянку вначале добавляли 4 или 2 мкл разведенного стокового раствора (для получения концентрации АБК в среде 0,2 и 0,5 мкМ соответственно), затем саму среду и производили заливку чашек Петри.

Перед посадкой семена стерилизовали следующим методом: помещали семена в пробирку, добавляли 500 мкл смеси 80% EtOH + 0,05% TRITON X-100 и перемешивали в течение 8 минут. Промывали семена стерильной водой – 2 раза по 500 мкл.

Стерилизованные семена наносили на среды, закрепляли крышки чашек Петри, стратифицировали при 4 °С в темноте не менее 2 суток. Затем помещали чашки в световую комнату и выращивали при 22 °С, интенсивности освещения  $150 \text{ мкМоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  и фотопериоде 16 ч света / 8 часов темноты.

## **2.4 Подготовка образцов, экстракция и оценка качества РНК**

Розетки проростков помещали в круглодонные пластиковые пробирки, добавляли по 2

стерильных металлических шарика, 500 мкл TRIzol Reagent (Thermo) и гомогенизировали при помощи аппарата Qiagen TissueLyser II (30 Hz, 2 минуты). К гомогенату добавляли 50 мкл 1-бром-3-хлорпропана (Sigma) и вортиксировали в течение 10 минут. Гомогенат переносили в чистые пробирки на 1,5 мл и центрифугировали 10 минут при 4 °С, 14000g (центрифуга Eppendorf 5415 R). Обрезанным наконечником отбирали 170 мкл водной фазы в чистые пробирки, добавляли 500 мкл 96% EtOH и выдерживали ночь при –20 °С. Пробирки центрифугировали с ускорением 16000g при 4 °С, 25 мин. Супернатант отбрасывали. Осадок дважды промывали в 500 мкл ледяного 70% этанола, сушили в ламинарном боксе при комнатной температуре в течение 10 мин и растворяли в 40 мкл стерильной воды. Для оценки качества полученной РНК пользовались следующими методами: спектрофотометрия на приборе Implen Nanophotometer, денситометрия гельдокументации (Bio Rad Gel Doc XR+, Image Lab 6.0.1) агарозных гелей электрофореза с бромистым этидием (Bio Rad PowerPac, 60 V).

## **2.5 Обратнo-транскриптазная ПЦР**

### **2.5.1 Синтез первой цепи кДНК**

Процедуру проводили на аппарате Eppendorf MasterCycler Personal. РНК разводили для выравнивания концентраций образцов. Для удаления возможных примесей ДНК, к 6 мкл препарата РНК добавляли 1 мкл 10x буфера DNase I (Thermo Scientific), 0,5 мкл ДНКазы (Thermo Scientific). Инкубировали 30 минут при 37 °С (согласно инструкции производителя). Фермент инактивировали добавлением к раствору 1 мкл EDTA (Thermo Scientific) и прогревали 10 мин при 65 °С (согласно инструкции производителя). Добавляли 5 мкл растворов праймера Random primer (Evrogen, 80 пМоль), прогревали 5 мин при 70 °С. Помещали на лед на 5 мин. Добавляли по 6,5 мкл предварительно смешанного раствора (на 1 пробу: 4 мкл 5x буфера RevertAid RT (Thermo Scientific), 0,5 мкл RiboLock (Thermo Scientific), 2 мкл смеси dNTP), инкубировали 10 мин при 25 °С (согласно инструкции производителя). Добавляли 0,7 мкл RevertAid RT (Thermo Scientific), инкубировали 60 мин при 42 °С (согласно инструкции производителя). Инактивировали фермент инкубацией при 70 °С в течение 10 мин (согласно инструкции производителя).

### **2.5.2 Количественная ПЦР в реальном времени**

Процедуру производили на аппарате Bio Rad C1000 Thermal Cycler, CFX96 Real-Time System. Препарат кДНК разводили в 3 раза. На льду к 2 мкл кДНК добавляли 2 мкл qPCR Premix (Evrogen, краситель SYBR-Green), по 0,4 мкл правого и левого праймера (Evrogen), 5,2 мкл H<sub>2</sub>O.

Режим контроля температуры: Рассчитанный. Температура крышки: 105 °С.

Протокол:

- 1) Первичная денатурация 95 °С – 5:00
- 2) Денатурация 95 °С – 0:20
- 3) Отжиг 60 °С – 0:30
- 4) Элонгация 72 °С – 0:30, чтение плашки
- 5) Переход к 2), 40 циклов
- 6) Кривая плавление 65 – 95 °С: Инкремент 0,5 °С – 0:05. Чтение плашки.

Использованные пары праймеров приведены в Табл. 4.

Таблица 4

Список пар праймеров, использованных в работе

Ген	Левый праймер	Правый праймер
<i>YLS8</i>	GAGGTGCTTGCCTGTGTTGCT	TGTCCTTGAGAGCCCAGTTGAT
<i>RPOT2</i>	GCGTTGGTTTGGTGAATGTGC	AAGCGATAGGGTCTGGAGGGA
<i>Cox1</i>	AGTCATTCTGGAGGAGCAGTTGA	ACGGACCACACA AATAGGGGTA A
<i>Nad3</i>	ACSTTTTCTTTCCCTGGGCAGT	CGAAGCACCCCTTTCCATTCA
<i>Nad4</i>	GCATTTCA GTGGGTGGTCTGGT	AGGGATTGGCACGCTTTCGG
<i>Nad6</i>	AGCCGTTTCATTCCTTTTCGTTG	GAGGTCGTATTTCTTTGGGTTGGT
<i>AccD</i>	GCCCTTGGGGTTATGGATTTTCG	TCCTTCTTGCATTCGTGCTCCT
<i>ClpP</i>	AACTCTCCTGGTGGATGGGT	ATTCTCCCGTTTGTGCCTCATAA
<i>PetB</i>	TGACTTTTATTACCGTCCAACCGT	ACCATCATACTTGCCGACCATCG
<i>PsbA</i>	CGGTGCCATTATTCCTACTTCTGC	AGTCCCACCTCACGACCCAT
<i>RbcL</i>	TGCCGTAGCCAACCGAGT	TCTTTCCATACTTCACAAGCAGCA
<i>RpoB</i>	GGCAGCGGGTAGGCGAAAT	CGGAGCATCTTCTGGTTTAGGT
<i>Rrn16</i>	AAGTCCGCCGTC A AATCCCA	AGTGCTTTCGCCGTTGGTGT
<i>Ycf3</i>	ACGAAACCCCTTTTACCACAAGC	CGAACCAAGCCTCCGCCAT

## 2.6 Выделение митохондрий из зеленых проростков арабидопсиса

Для выделения митохондрий использовали протокол из работы (Sweetlove et al., 2007b), модифицированный сотрудниками лаборатории. Для выделения митохондрий использовали 10-20 г 3,5-4 недельных проростков. За сутки до эксперимента готовили среды следующего состава:

1. СВ: 0,3 М сахараза, 25 мМ Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 10 мМ КН<sub>2</sub>Р<sub>0</sub><sub>4</sub>, 2мМ ЭДТА, 0,5% БСА, 1% РVP-40
2. СП: 0,3 М сахараза, 10 мМ MOPS, 1 мМ ЭГТА, 0,2% БСА, рН = 7,2

Формировали в центрифужных пробирках трехступенчатый градиент 50% - 28% - 20% Percoll (Cytiva) в СП. В день эксперимента добавляли в СВ до 20 мМ аскорбиновой кислоты, 5 мМ цистеина, 1 мМ ДТТ, доводили рН до 7,8.

Ткань Miracloth смачивали в 10-20 мл СВ, помещали в воронку. Проростки гомогенизировали в ступке с СВ в соотношении 12 мл СВ на 1 г проростков, по 2-3 подхода, фильтровали гомогенат через 2 слоя ткани Miracloth и распределяли в двух-трех 80 мл центрифужных пробирках. Центрифугировали при 2400 g (Beckman Coulter Allegra 64R), 5 мин, супернатант переносили в свежие пробирки. Затем центрифугировали при 17400 g, 17 мин,

осадок ресуспендировали в 1 мл СП в плюмбере и переносили в две пробирки на 80 мл, разбавляли СП. Повторяли вышеописанные стадии центрифугирования. Осадок ресуспендировали в 500 мкл СП в плюмбере, наносили на градиент и центрифугировали при 40000 g, 40 мин. Верхнюю часть градиента убрали насосом, слой с митохондриями в нижней части градиента отбирали пипеткой, распределяли по 2 пробиркам и разбавляли СП. Центрифугировали при 31000 g, 15 мин. Осадки собирали в одной пробирке, разбавляли СП. Центрифугировали при 31000 g, 15 мин, осадок ресуспендировали в 1 мл СП. Центрифугировали при 11000 g, 5 мин, осадок ресуспендировали в 1 мл СП без БСА и отбирали 10 мкл для определения количества белка методом Бредфорда. Аликвотировали митохондрии по 100 мкг в эппендорфах, солибилизировали дигитонином, замораживали в жидком азоте и хранили при –80 °С.

## **2.7 Выделение тилакоидных мембран**

Для выделения тилакоидов использовали методику из работы (Casazza et al., 2021) с изменениями. Около 1 г листовых пластинок арабидопсиса охлаждали на льду и помещали в стакан блендера, приливали 25 мл среды выделения состава: 0,4 М сорбитол, 40 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EDTA, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH = 7,8 (KOH). Разрушали листья с помощью блендера (3-4 включения по 5 сек), фильтровали полученный гомогенат через 4 слоя Miracloth. Центрифугировали при 500 g, 7 мин. Супернатант отбрасывали, осадок ресуспендировали в 1 мл СВ и переносили в пластиковую пробирку. Аликвотировали пробы по содержанию хлорофилла, которое определяли спектрофотометрически: хлорофилл экстрагировали ледяным раствором 80% ацетона в соотношении 5 г/г к пробе, оценивали оптическую плотность раствора при длине волны 652 нм (Arnon, 1949). Осаждали центрифугированием при 14200 g, удаляли супернатант, солибилизировали, замораживали в жидком азоте и хранили солибилизиат при –80 °С.

## **2.8 Солюбилизация митохондриальных и тилакоидных мембран**

Осаждали митохондрии (тилакоиды) при 14200 g, 10 мин, затем ресуспендировали в буфере солибилизации (30 mM HEPES, 150 mM H<sub>3</sub>CCOOK, 10% глицерин, 2 mM PMSF, дигитонин – 5 мг на 1 мг белка, объем – 30 мкл на 100 мкг митохондрий (аликвоты тилакоидов)), инкубировали на льду, периодически помешивая, 30 мин. Центрифугировали при 16100 g, 30 мин, супернатант отбирали и использовали для нанесения на гель, или замораживали в жидком азоте и хранили при –80 °С.

## **2.9 Электрофоретические методы**

### **2.9.1 Электрофорез ДНК в агарозном геле**

Готовили стоковый раствор 50x буфера TAE: смешивали 242 г Tris-base (Sigma), 57,1 мл

ледяной уксусной кислоты, 100 мл 0,5 М Na-EDTA, доводили бидистиллированной водой до 1 л.

Готовили 1% агарозный гель: смешивали 2 г агарозы с 4 мл 50x буфера TAE, доводили водой до 200 мл и разогревали до полного растворения агарозы. Затем остужали до 50 °С. К 80 мл раствора добавляли раствор бромистого этидия до финальной концентрации 0,5 мкг/мл, перемешивали и заливали в столик камеры Wide Mini Sub-Cell GT (Bio-Rad).

Пробы ДНК смешивали с загрузочным буфером (3 мкл 50x буфера TAE, 1 мг бромфенолового синего, 80% глицерина на 1 мл раствора) и наносили в карманы геля. Электрофорез проводили под напряжением в 70-150 В. Гель-документирование проводили с помощью Gel Doc XR+ (Bio-Rad) с использованием ПО ImageLab (Bio-Rad).

### **2.9.2 Белковый электрофорез**

Голубой нативный электрофорез в полиакриламидном геле (BN-PAGE) проводили в камерах для белкового электрофореза с размером стекол 15 x 15 см (Helicon) и 16 x 20 см (Biorad Protean II xi) согласно методике, описанной в работе (Wittig et al., 2006). Использовали градиентный гель 4-13% акриламида. Условия электрофореза: 4 °С, 110 В, ночь.

Вторую меру электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с додецил-сульфатом натрия (BN/SDS-PAGE) проводили в камере для белкового электрофореза с размером стекол 15 x 15 см (Helicon) согласно методике, описанной в работе (Lasserre et al., 2012). Использовали градиентный гель с концентрациями 10-20% акриламида. Условия электрофореза: 4 °С, 150 В, ночь.

Окрашивали гель коллоидным Кумасси (8%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,6%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 0,08% Coomassie G-250, 20% EtOH), нагревая в микроволновой печи в герметичном контейнере до кипения раствора, затем оставляли до остывания. Отмывали от избытка красителя трижды, горячей водой.

### **2.9.3 Определение активности дыхательных комплексов**

После электрофореза вырезали нужные дорожки из геля и определяли активность комплекса I по методике из работы (Sabar et al., 2005). Гель инкубировали в буфере состава 0,1 М Трис-HCl, 0,225 мМ NADH, 157 мкг/мл NBT в течение 10 мин. Реакцию останавливали в растворе, содержащем 40% метанола, 10%  $\text{H}_3\text{CCOOH}$ .

Активность комплекса IV определяли по методике из работы (Nijtmans et al., 2002). Гель инкубировали в буфере состава 50 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1% DAB, 1 мг/мл цитохрома C, 7,5% сахарозы, pH 7,4 в течение 60 минут. Реакцию останавливали фиксацией в растворе 7%  $\text{H}_3\text{CCOOH}$ .

### **2.10 Вестерн-блоттинг**

Вестерн-блоттинг проводили по методике, разработанной в лаборатории. Для вестерн-блоттинга использовали гель, полученный после второго измерения (2D) BN/SDS-PAGE.

Перенос производили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad Transblot transfer medium) в буфере (48 мМ Трис, 35 мМ глицин, 10% метанол, pH 9,2), с использованием камеры Bio-rad Mini Trans-blot Cell в течение 3 часов при 4 °С, при постоянной силе тока 400 мА. Камеру дополнительно обкладывали льдом.

Контроль качества переноса осуществляли инкубацией мембраны в растворе Ponceau S (0,55% Ponceau S, 1% H<sub>3</sub>CCOOH). Инкубировали мембрану в блокирующем растворе, содержащем 200 мМ Трис, 500 мМ NaCl, 0,4% NaN<sub>3</sub>, 5% обезжиренного сухого молока, pH 7,5, в течение ночи при 4 °С.

Гибридизационные растворы антител готовили на основе блокирующего раствора. Используемые в работе антитела к белкам дыхательной цепи Арабидопсиса (коммерческие антитела фирмы PhytoAB Inc, США) приведены в Табл. 5.

Таблица 5

Используемые в работе антитела

Серийный номер	Субъединица	Комплекс	Ожидаемый вес
PHY0523S	75 kDa	I	75 кДа
PHY1408S	SDH1-1	II	70 кДа
PHY0566S	CYC1	III	34/30 кДа
PHY0578S	COXX6	IV	26/24 кДа
PHY0595A	ATP3	V	35/30 кДа
PHY1080A	NAD9	I	23 кДа
PHY1116S	COB	III	44/43 кДа
PHY0587S	ATP4	V	22/20 кДа

Инкубацию мембраны с гибридизационными растворами антител проводили в течение ночи при перемешивании, при 4 °С. Затем мембрану отмывали трижды по 10 мин в растворе TTBS (200 мМ Трис, 500 мМ NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,5) и проводили гибридизацию с раствором вторичных антител (Anti-Rabbit IgG, Invitrogen), при 4 °С в течение ночи. Отмывали мембрану трижды по 10 мин в TTBS и инкубировали в растворе для окрашивания (1М Трис, 0,1М NaCl, 0,01М MgCl<sub>2</sub>, 0,02% BCIP, 0,033% NBT, pH 9,5). После визуализации белковых пятен, промывали мембрану бидистиллированной водой и инкубировали в стоп-растворе (20 мМ Трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 2,9) 5 мин. После гельдокументации мембрану отмывали от антител инкубацией в растворе TTBS-SDS (TTBS с 10% SDS) в течение 2 ч при комнатной температуре, после чего гибридизовали повторно с другими антителами.

## 2.11 Методы молекулярного клонирования

Среду LBA готовили в термостойкой колбе на 500 мл, растворяя 6,25 г смеси LB (Broth, Miller Luria-Bertani Tissue Culture Grade, AMRESCO) и 3,75 г агара (Agar Bacteriological, Helicon) в 250 мл бидистиллированной воды, автоклавировали и хранили в холодильнике при +4 °С.

Чашки Петри стерилизовали в сухожаровом шкафу при 120 °С. Использовали штаммы *E. coli* DH5α и XL-Blue. После посева бактериальные культуры выдерживали ночь в термостате при 37 °С. Для ночных культур готовили жидкую среду LB (без агара), автоклавировали. Консервацию бактерий для длительного хранения проводили добавлением 150 мкл стерильного глицерина (Sigma) к 850 мкл ночной культуры в пластиковой пробирке и хранили при –80 °С.

Плазмидную ДНК выделяли из ночных культур при помощи набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit #K0503 (Thermo) согласно инструкции производителя.

Рестрикцию ДНК проводили в 20 мкл раствора используя 1-2,5 мкг ДНК, добавляли 4 мкг BSA, 2 мкл буфера (SE Buffer, SibEnzyme) и 10000 ед. фермента. Инкубировали в термостате при 37 °С в течение 2 часов, с последующим прогреванием образца при 60 °С в течение 20 минут.

Аmplification фрагментов ДНК проводили с помощью ПЦР. Состав реакционной смеси: 5 мкл Taq Buffer + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – MgCl<sub>2</sub> (Thermo), 4 мкл MgCl<sub>2</sub>, 25 mM (Thermo), 1 мкл dNTPs mix (Evrogen), по 2 мкл растворов прямого и обратного праймера, 1-15 нг ДНК-матрицы, 0,5 мкл Taq DNA-Polymerase (5 ед/мкл (Thermo)), объем 50 мкл. Протокол ПЦР: 94 °С, 3 мин; 94 °С, 45 с; 55 °С, 45 с; 68 °С, 1 мин на 1 т.п.н. продукта; 26 циклов повторения стадий 2-4; 72 °С, 10 мин.

ПЦР-продукт исследовали электрофоретически и очищали с помощью набора GeneJET PCR Purification Kit #K0702 (Thermo) согласно инструкции производителя. Очищенный ПЦР-продукт хранили при –20 °С.

Лигирование фрагментов ДНК проводили с помощью набора Thermo Scientific T4 DNA Ligase, согласно инструкции производителя. Полученный продукт использовали для трансформации бактерий.

Трансформацию бактериальных клеток производили при помощи набора TransformAid™ Bacterial Transformation Kit (Fermentas), согласно инструкции производителя.

Для элюции фрагментов ДНК использовали гель без добавления бромистого этидия. Элюцию проводили с помощью набора Cleanup Mini (Evrogen), согласно инструкции производителя.

Список пар праймеров, использованных при получении генетических конструкций, приведен в Таблица 6.

Таблица 6

Праймеры, использованные для получения генетических конструкций

Праймер	Последовательность	Размер фрагмента, п.н.	Позиция в NC_037304.1
Prrn26-EcoRI-For	cagataatctgttgtaattcAGGCGTTAT TGCTGTGCTTCC	449 (413 - вставка)	144369
Prrn26-NcoI-ApaI-Rev	aattacagttaattaccatgggcccTCAGGG TACACTGAACACCAC		143966

<i>PcoxI</i> -EcoRI-For	cagataatctgttgaattcGAGTTTGCA CCTGTTTCTCT	525 (489 - вставка)	116345
<i>PcoxI</i> -NcoI-ApaI- Rev	aattacagttaattaccatgggcccAAATTT GAGATTCTTTCGTTTATTACC		116748

## 2.12 Статистическая обработка данных

Все эксперименты имели не менее 3 биологических повторностей. Статистическая обработка данных проводилась в среде языка R. Для построения столбчатых диаграмм использовались средние значения и стандартные отклонения. Для построения диаграмм типа «ящик с усами» - медианы и межквартильные размахи. Значимость различий нормально распределенных данных оценивали с помощью дисперсионного анализа и попарного теста Стьюдента. Для данных с распределением, отличным от нормального, использовали тест Краскела-Уоллиса и попарный тест Манна-Уитни-Вилкоксона. Для коррекции *P*-значений на множественную проверку гипотез использовали метод Бенджамини-Хохберга. Различия считали значимыми при  $P < 0,05$ .

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1 Анализ транскриптома трансгенных линий с измененной экспрессией RPO<sub>Tmp</sub>

##### 3.1.1 Характеристика профилей дифференциальной экспрессии исследуемых линий

Массив данных, полученных методом ДНК-микрочипирования, содержал информацию об уровнях 43603 транскриптов. Существует несколько способов определения дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ, т.е. генов, экспрессия которых достоверно отличается от референсного образца): только через LFC (учет логарифмической кратности изменения экспрессии относительно растения дикого типа, без учета статистической достоверности изменений), только по *P*-значениям (статистически достоверные изменения, но без учета силы этих изменений) и комбинированный (учет статистической достоверности и силы изменений, при этом требуется снижение предела обнаружения по *P*-значениям). Подсчет проводился с использованием идентификаторов зондов ДНК-микрочипа, без учета множественной аннотации некоторых генов. На гистограмме представлено 2 варианта предела обнаружения: комбинированный ( $LFC > 1$  при  $P < 0,2$ , Рис. 8А) и только по *P*-значениям ( $P < 0,05$ , Рис. 8В). При учете силы изменения экспрессии генов и статистической значимости наибольшее число ДЭГ имела линия митохондриального гиперэкспрессора с единственной вставкой трансгена (ОЕМ15). При определении ДЭГ только по статистическим параметрам линия ОЕР5 имела наибольшее число ДЭГ. В обоих случаях минимальным числом ДЭГ обладала линия Tmp-M3. Для дальнейших расчетов выбран массив генов, полученных комбинированным методом, так как он сочетает в себе статистическую достоверность изменений и достаточную силу этих изменений, что соответствует биологическому смыслу исследования.

Состав ДЭГ с усиленной и подавляемой экспрессией для разных линий существенно отличался (Рис. 9). Как в случае усиленной, так и в случае подавляемой экспрессии самым большим числом уникальных ДЭГ обладала линия гиперэкспрессора ОЕМ15 (330 и 457 соответственно), а самым меньшим – линия комплементанта Tmp-M3 (92 и 59 соответственно). Линия комплементанта Tmp-M3 имела 23 ДЭГ (13 усиливаемых и 10 подавляемых), общих с мутантной линией *rpotmp*, в то время как линия с комплементацией функций RPO<sub>Tmp</sub> в хлоропластах (Tmp-P1) имела 147 (66 усиливаемых и 81 подавляемых). Таким образом, митохондриальная комплементация сильнее сблизила профиль экспрессии генов мутантного растения с растением дикого типа, чем комплементация в хлоропластах, свидетельствуя в пользу того, что основная роль RPO<sub>Tmp</sub> сосредоточена в митохондриях.



ДЭГ они имели только 187 (119 усиливаемых и 70 подавляемых), свидетельствуя в пользу того что транскриптомные изменения вызваны в основном ответом на гиперэкспрессию в митохондриях или хлоропластах (а также на разную позицию вставки трансгена), и в гораздо меньшей степени – на присутствие большого количества рекомбинантного белка RPOTmp непосредственно в цитозоле (Gorbenko et al., 2024).

### 3.1.2 Анализ обогащения Генной Онтологии (GO)

Анализ избыточной представленности позволяет определить категории функциональной аннотации, представленные в достаточной степени для ассоциации с анализируемым набором генов. Для выполнения анализа использовались аннотации наборов ДЭГ с усиленной или подавляемой экспрессией. Данные представлены на Рис. 10.

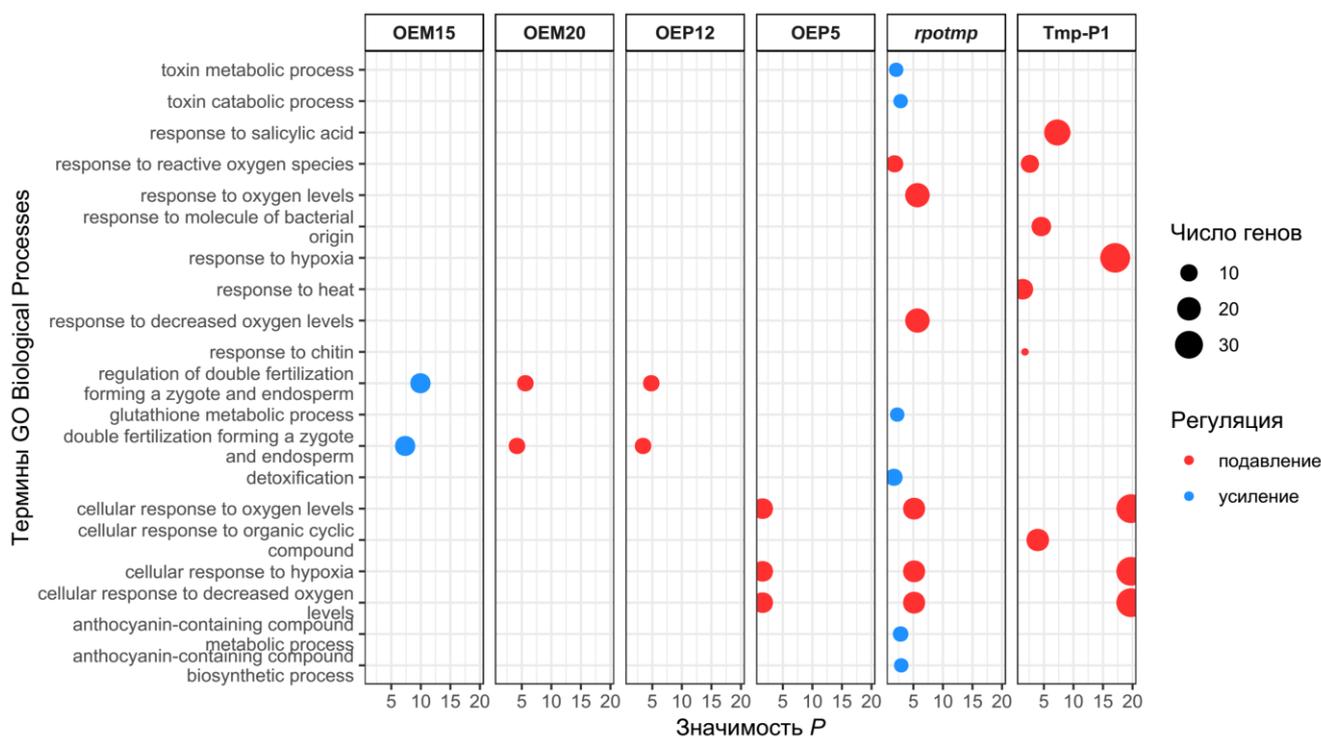


Рис. 10. Анализ избыточной представленности терминов Генной Онтологии (GO). Значимость  $P$  представляет собой отрицательный десятичный логарифм от  $P$ -значений, скорректированных методом Бенджамини-Хохберга (BH) и является в данном случае оценкой избыточной представленности.

ДЭГ OEM15, экспрессия которых усиливалась, преимущественно ассоциированы с процессами полового размножения. В то же время для OEP12 данные процессы были избыточно представлены в подавляемых ДЭГ. Для мутанта *rpotmp* была обнаружена избыточная представленность генов ответа на гипоксию в подавляемых ДЭГ и катаболизма токсинов и синтеза вторичных метаболитов в ДЭГ, экспрессия которых усиливалась.

Анализ обогащения наборов генов (GSEA) позволяет применять иной подход – обогащение оценивается с помощью анализа скоординированной экспрессии генов категорий

функциональных аннотаций, при этом используется полный набор транскриптомных данных, без учета дифференциальной экспрессии. Топ 5 обнаруженных обогащенных категорий (по модулю оценки обогащения,  $P < 0.05$ ) представлены на Рис. 11, полная таблица доступна в репозитории GitHub ([https://github.com/ivg-git/Gorbenko-IV-PhD-thesis-public-data/blob/63c9638d5b99bbd3a22741baabd74a947ce4a056/full\\_gsea\\_go.xlsx](https://github.com/ivg-git/Gorbenko-IV-PhD-thesis-public-data/blob/63c9638d5b99bbd3a22741baabd74a947ce4a056/full_gsea_go.xlsx)).

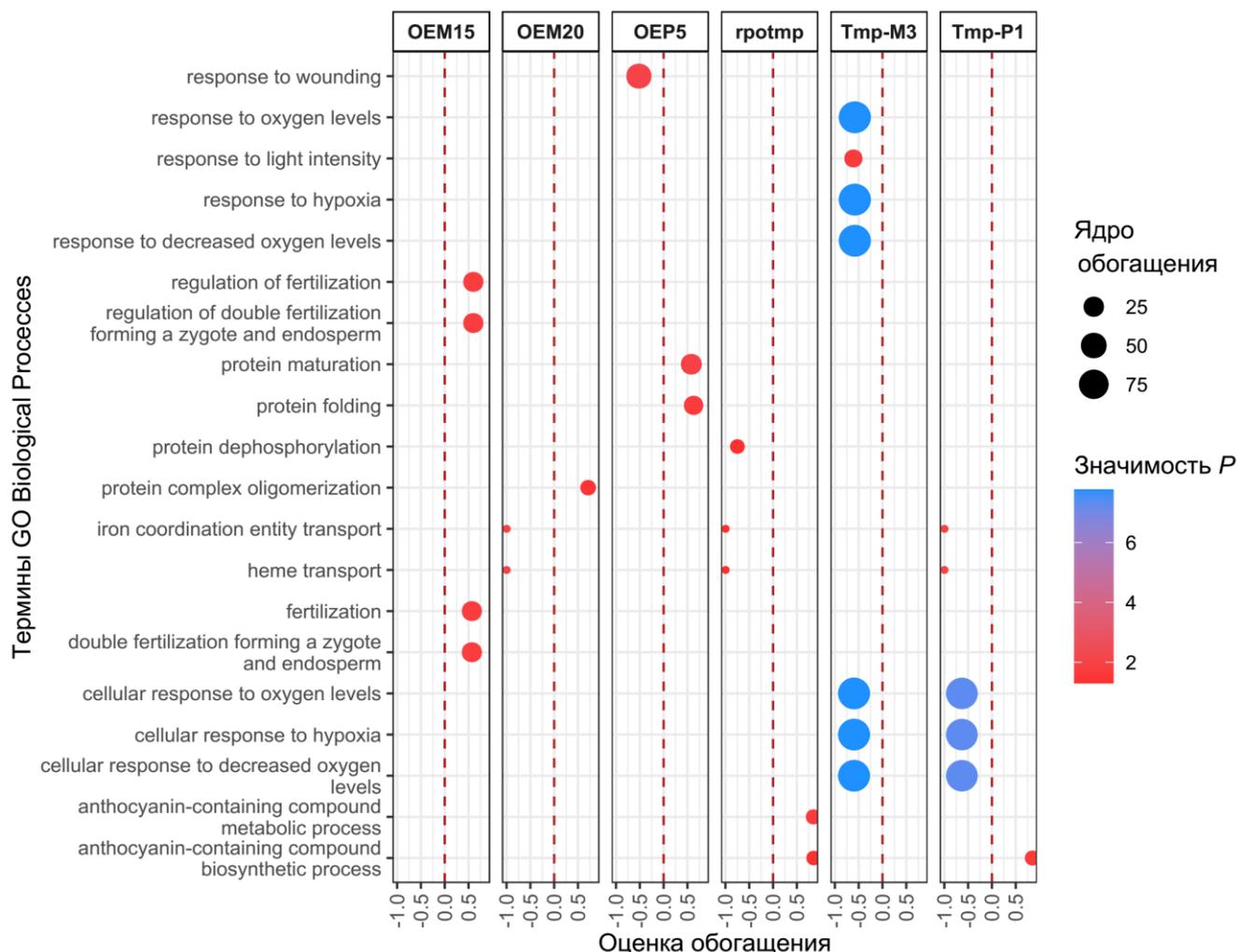


Рис. 11. Анализ обогащения наборов генов терминов GO. Представлены данные с  $P < 0,05$ . Ядро обогащения представляет собой число генов, внесших вклад в обогащение термина. Значимость  $P$  представляет собой отрицательный десятичный логарифм от  $P$ -значений, скорректированных методом Бенджамини-Хохберга (BH).

Как и в результате анализа избыточной представленности, для линии OEM15 обнаружено статистически значимое обогащение процессов, связанных с половым размножением. Отмечено подавление процессов транспорта гема и комплексов координационно-связанного железа у линий OEM20, *rpotmp* и Tmp-P1. Линии комплементантов Tmp-P1 и Tmp-M3 характеризовались подавлением процессов, связанных с ответом на гипоксию, для комплементанта Tmp-M3 также подавлялись процессы ответа на интенсивность света.

### 3.1.3 Анализ обогащения метаболических путей KEGG

Результаты анализа избыточной представленности метаболических путей KEGG среди ДЭГ исследуемых линий растений представлены на Рис. 12.

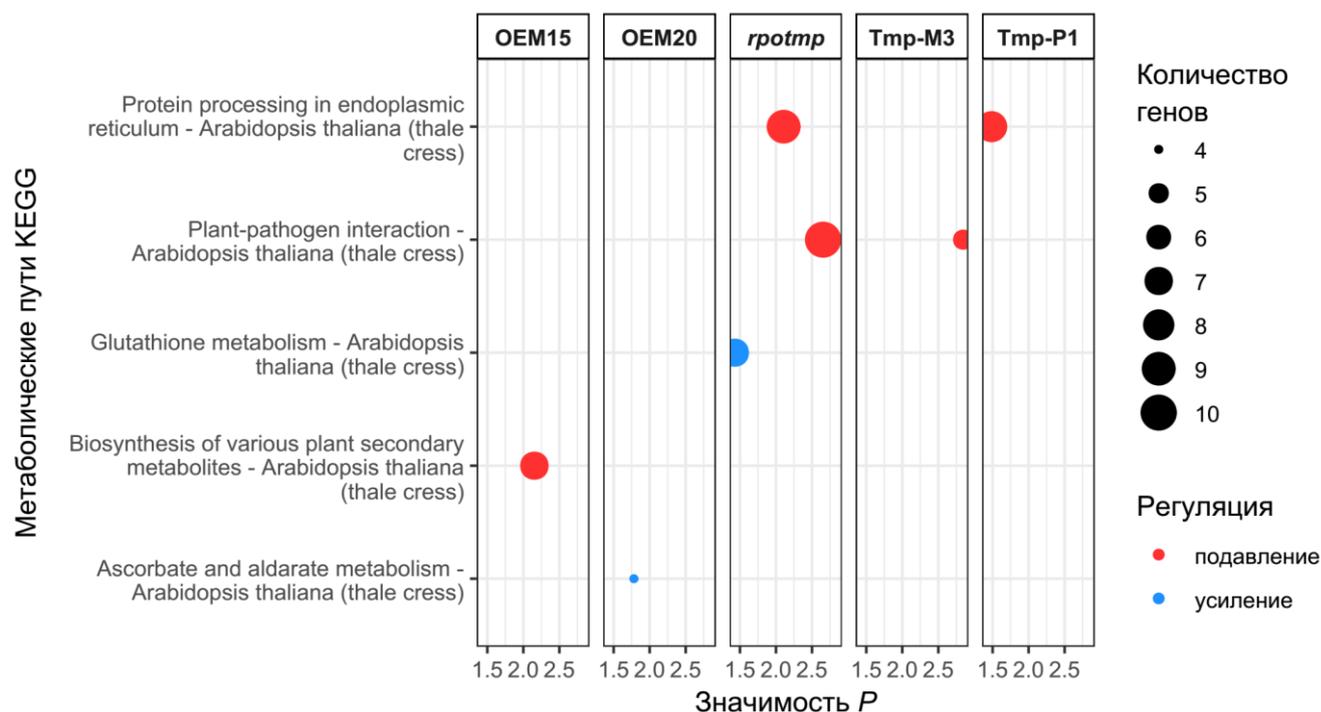


Рис. 12. Анализ избыточной представленности метаболических путей KEGG. Значимость  $P$  представляет собой отрицательный десятичный логарифм от  $P$ -значений, скорректированных методом Бенджамини-Хохберга (BH) и является в данном случае оценкой избыточной представленности.

Наиболее представленными среди генов с подавляемой экспрессией были гены пути растительно-патогенных взаимодействий у линий *rpotmp* и Tmp-M3. Также были представлены процессы созревания белков в ЭПР у линий *rpotmp* и Tmp-P1, и процессы биосинтеза вторичных метаболитов у линии OEM15. Среди генов с усиленной экспрессией обнаружена избыточная представленность процессов метаболизма глутатиона у линии *rpotmp* и метаболизма аскорбата и альдаровых кислот у линии OEM20.

Пути вторичного метаболизма, избыточно представленные в подавляемых ДЭГ линии OEM15 (вероятно в ответ на митохондриальную гиперэкспрессию RPOTmp) содержат 7 генов: 4 гена бета-гликозидаз (*BGLU2*, *BGLU4*, *BGLU46*, *BGLU47*), 2 гена семейства цитохрома P450 (*CYP82C2* – биосинтез фитоалексинов, *CYP82C4* – синтез 5-гидроксифрактетина) и ген 2-оксоглутарат-зависимой диоксигеназы (*F6'H1* – биосинтез кумаринов).

Обогащение у линии *rpotmp* путей метаболизма глутатиона обусловлено повышением уровней транскриптов 7 генов глутатион-S-трансфераз: *GSTU1*, *GSTU3*, *GSTU24*, *GSTU25*, *GSTF5*, *GSTF6*, *GSTF12*.

### 3.1.4 Экспрессия транскрипционных факторов

Всего в массиве ДЭГ было обнаружено 234 транскрипционных фактора (ТФ), принадлежащих к 38 семействам, самым крупным из которых было семейство MYB (28 факторов). Сокращенная версия данных, отфильтрованная по LFC > 1.5 и содержащая 62 ТФ, представлена в виде тепловой карты на Рис. 13 (полная версия доступна в репозитории GitHub: <https://github.com/ivg-git/Gorbenko-IV-PhD-thesis-public-data/tree/7cb88d75886602a1faa408131edbc0d063c2dd1/TF>). Самое большое число уникальных ТФ с усиленной экспрессией имели линии OEM15 (17) и OEP12 (16), девять ТФ были общими для этих линий. Среди ТФ с подавляемой экспрессией самое большое число уникальных ТФ имели линии OEM15 (31) и Tmp-P1 (18; общих с OEM15 - 1), OEP12 в данном случае имела всего 10 уникальных ДЭГ ТФ, при этом общих с OEM15 было 4 (Gorbenko et al., 2024).

У всех линий, кроме OEM15, Tmp-M11 и OEP12, были обнаружены повышенные уровни транскриптов *ERF071* (AT2G47520), *NAC044* (AT3G01600) и ТФ семейства RAV (AT1G50680). *ERF071* активируется в ответ на гипоксию и аноксию, а также участвует в процессе развития корней, регулируя рост клеток растяжением (Licausi et al., 2010; Gibbs et al., 2011; Eysholdt-Derzso et al., 2017). *NAC044* является медиатором ответа на повреждения ДНК у растений (Lang et al., 2021).

С помощью данных полученных из БД PlantRegMap (<https://plantregmap.gao-lab.org/download.php>, доступ 19.07.2024) были построены регуляторные сети из ТФ и их предполагаемых мишеней (файл доступен в GitHub: <https://github.com/ivg-git/Gorbenko-IV-PhD-thesis-public-data/blob/ce6ae37ad8811f275e47a2f647c9d6d9be0529ef/TF/tfreg.rds>). На основании знака дифференциальной экспрессии генов, ребрам графов присваивались значения «активация» (ДЭ ТФ и мишени с одинаковыми знаками) или «репрессия» (ДЭ ТФ и мишени с противоположными знаками). Размеры сетей очень сильно различались для разных линий, что обусловлено неполнотой имеющихся данных по мишеням ТФ (Рис. 14). В линии OEM15 ТФ DOF4.7 (AT4G38000) имел самое большое число потенциальных мишеней – 183, экспрессия 138 из которых активировалась, а 79 подвергалась репрессии. Как было показано в работе Wei et al., 2010, данный фактор оказывает репрессирующее действие на механизм отмирания органов цветка после опыления. В линии OEP12 самое большое число потенциальных мишеней с ДЭ имел фактор DOF4.2 (AT4G21030) – 44 мишени, 22 из которых активировались фактором, и 22 подвергались репрессии. DOF4.2 является положительным регулятором ветвления побега (через активацию экспрессии *AtSTM*, *AtTFL1* и *AtCYP83B1*), а также участвует в формировании оболочки семени (Zou et al., 2012). Для мутантной линии *rpotmp* самое большое число потенциальных мишеней с ДЭ имел фактор ABF1 (AT1G49720) – 69 мишеней, 35 из которых активировались, а 45 подвергались репрессии. Экспрессия *ABF1* была повышена у линии OEM15

и подавлялась у линии *rpotmp*, что представляет интерес, т.к. AFB1 – один из трех основных факторов, вовлеченных в трансдукцию АБК-сигнала при осмотическом стрессе (Kang et al., 2002).

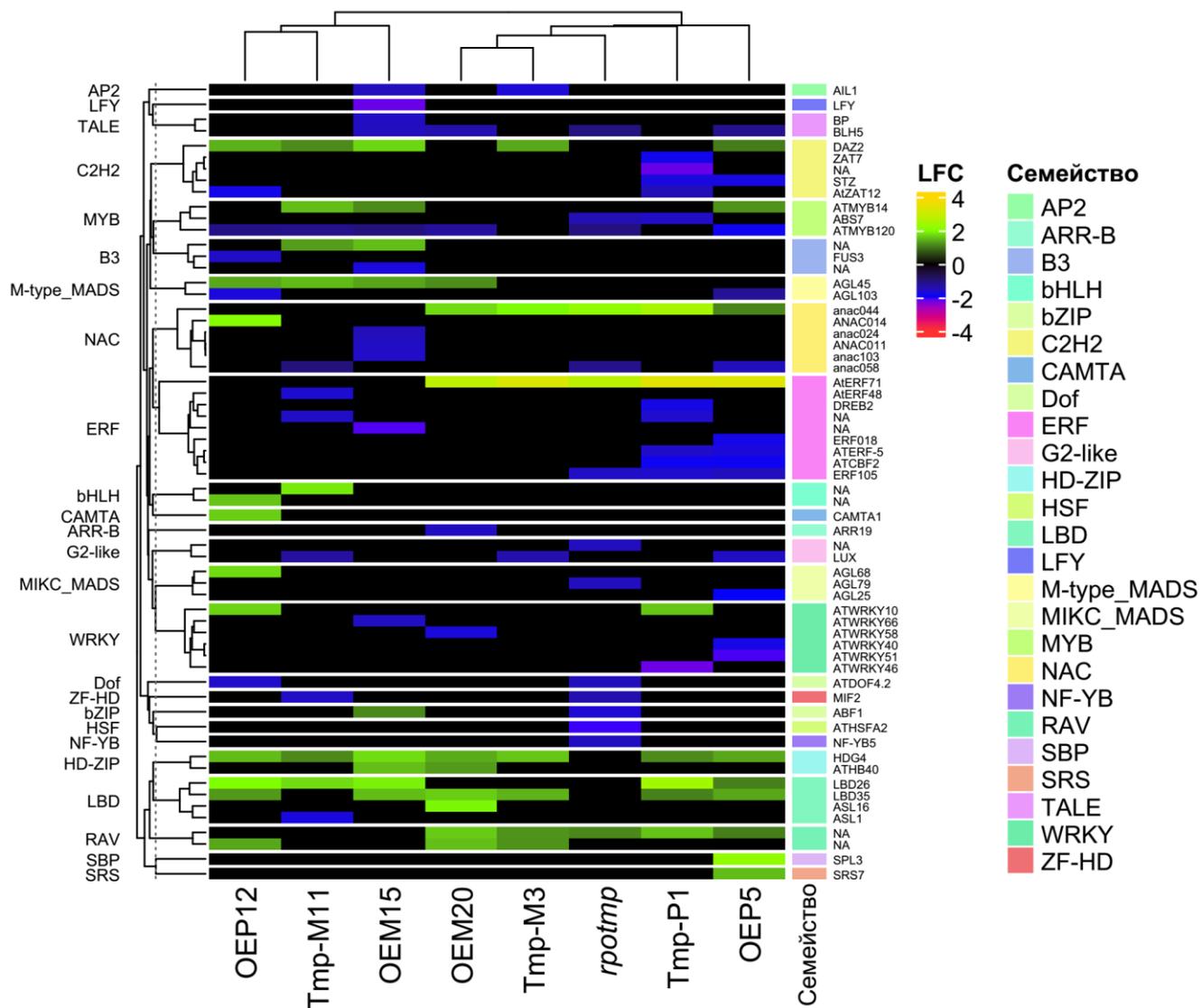


Рис. 13. Экспрессия транскрипционных факторов исследуемых линий.

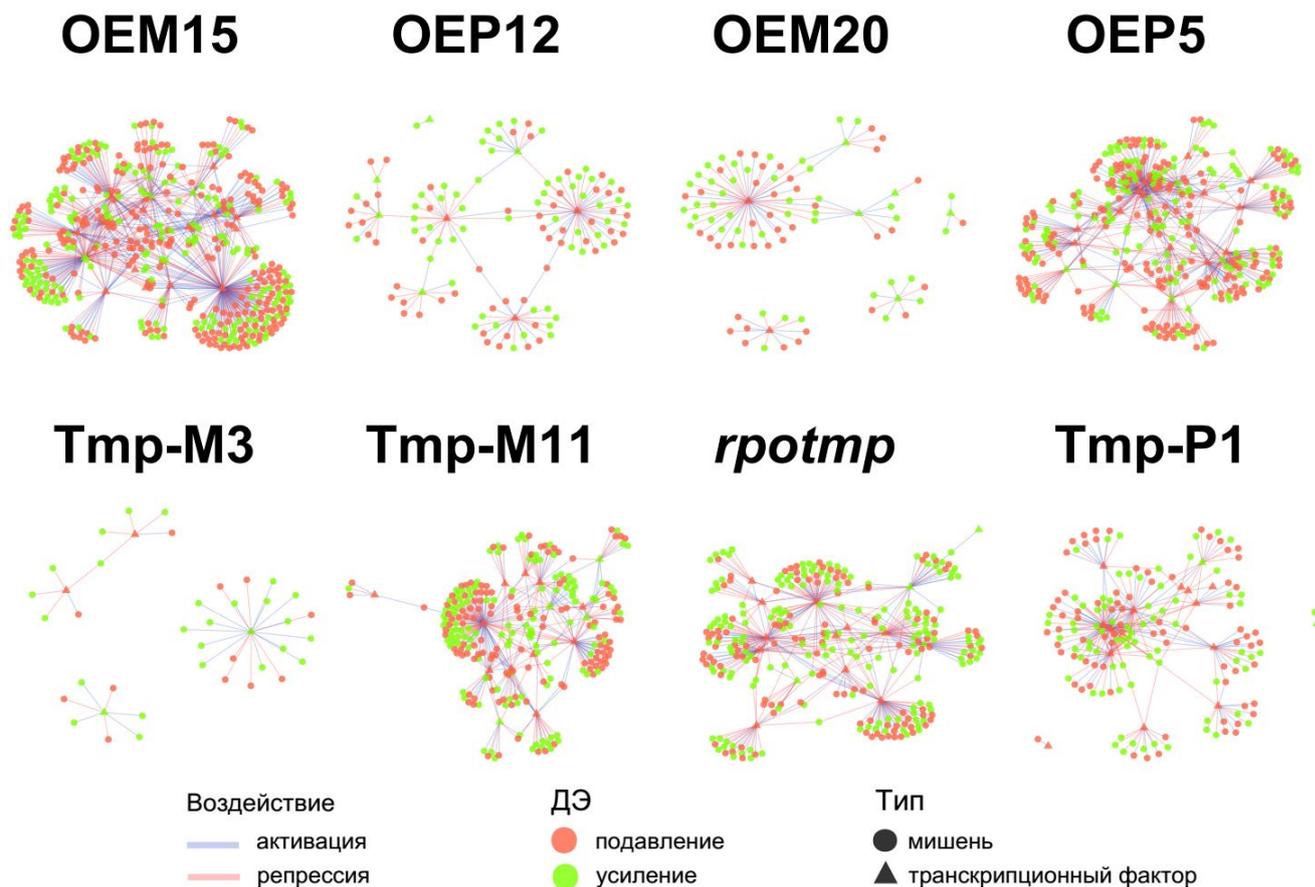


Рис. 14. Графы предполагаемых регуляторных сетей транскрипционных факторов и их известных мишеней, воссозданных на основании транскриптомных данных и регулома из БД PlantRegMap.

### 3.1.5 Экспрессия генов, кодирующих белки митохондрий

Уровни транскриптов генов мтДНК с дифференциальной экспрессией в растениях изучаемых линий представлены на Рис. 15. У линии OEM15 наблюдался повышенный уровень 25 митохондриальных транскриптов, экспрессию которых *in vivo* производит RPOTmp. По-видимому, RPOTmp производит транскрипцию 15 ORF (*Orf109*, *Orf153A*, *Orf106D*, *Orf164*, *Orf143*, *Orf100C*, *Orf157*, *Orf187*, *Orf184*, *Orf120*, *Orf240A*, *Orf145C*, *Orf204*, *Orf101A*, *Orf102B*) (Gorbenko et al., 2024). *Orf240A* предположительно кодирует субъединицу Fo-АТФ-синтазы (arabidopsis.org), однако, по данным Plachard et al. (2018), ни один из ORF (кроме *OrfX - MttB*) не транслируется. В настоящий момент функции транскриптов ORF неизвестны. У линий Tmp-P1 и *rpotmp* с недостатком RPOTmp в митохондриях повышались уровни транскриптов генов, транскрибируемых RPOtm, что предположительно является следствием повышенной копияности мтДНК. Профиль экспрессии генов мтДНК позволяет предположить, что вследствие множественной вставки трансгена в разных ориентациях у линий OEM20 и OEP5 активируются механизмы РНК-интерференции, которые приводят к деградации транскрипта (Eamens et al., 2008). Как следствие – содержание активной RPOTmp в митохондриях этих линий снижено, что вероятно повлекло за собой повышение копияности мтДНК для компенсации этого дефекта.

В целом, у линий, дефицитных по RPO<sub>Tmp</sub> в митохондриях, наблюдалось снижение уровней транскриптов субъединиц комплексов IV (*Cox1*) и I (*Nad1A*, *Nad1C*, *Nad2*, *Nad5*, *Nad6*), *MatR*, *CcmC* и нескольких ORF.

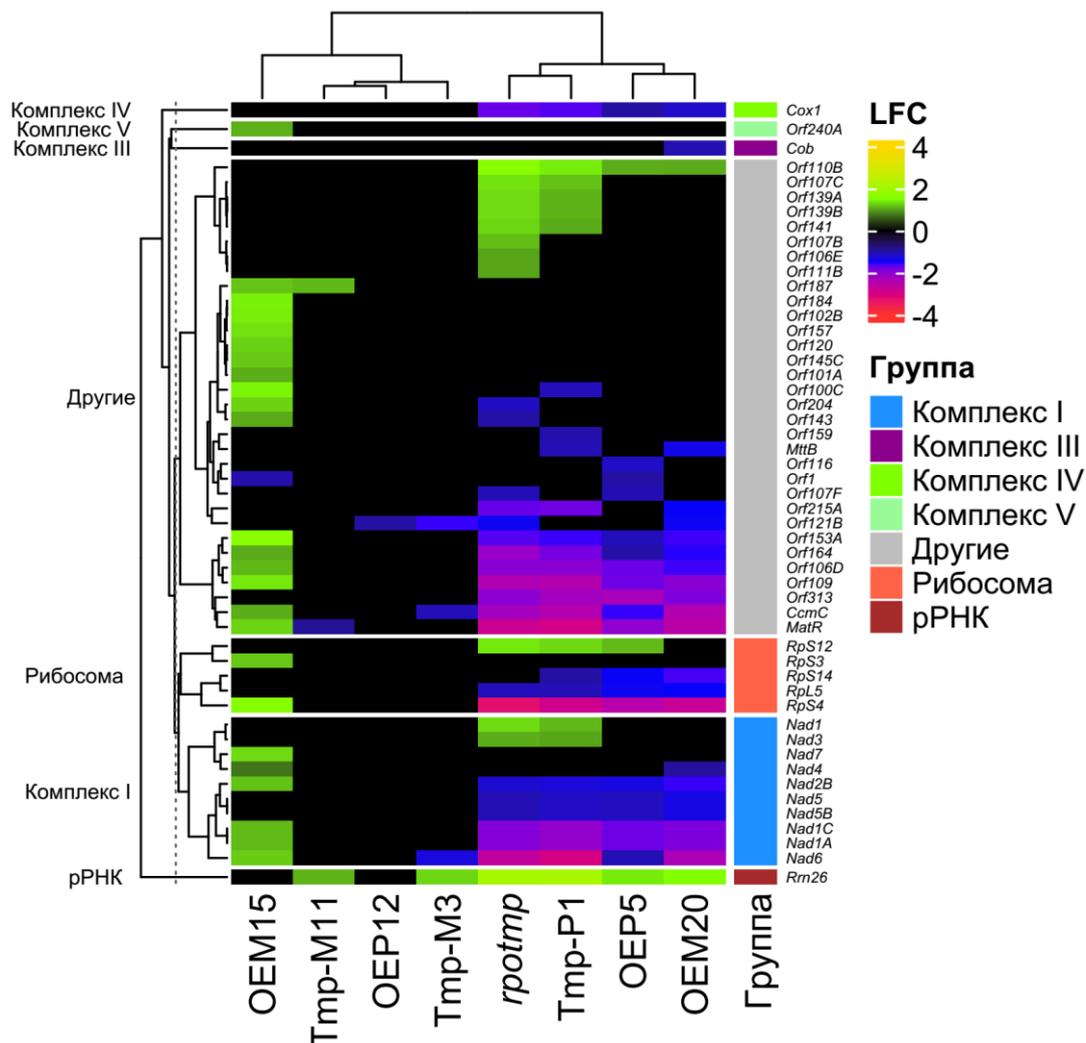


Рис. 15. Уровни транскриптов генов мтДНК исследуемых линий.

Дополнительно экспрессию некоторых генов мтДНК у исследуемых линий измеряли с помощью ОТ-кПЦР (Рис. 16). Было обнаружено статистически значимое повышение уровней транскриптов *Cox1* у линий с гиперэкспрессией RPO<sub>Tmp</sub> в митохондриях (Gorbenko et al., 2024). В данном контексте некоторое разночтение с данными ДНК-микрочипирования объясняется слишком малой разницей в экспрессии – повышение уровня транскрипта *Cox1* происходило всего в полтора раза, что меньше выбранного порога обнаружения ДЭГ. Экспрессия остальных генов хорошо согласовывалась с данными ДНК-микрочипирования.

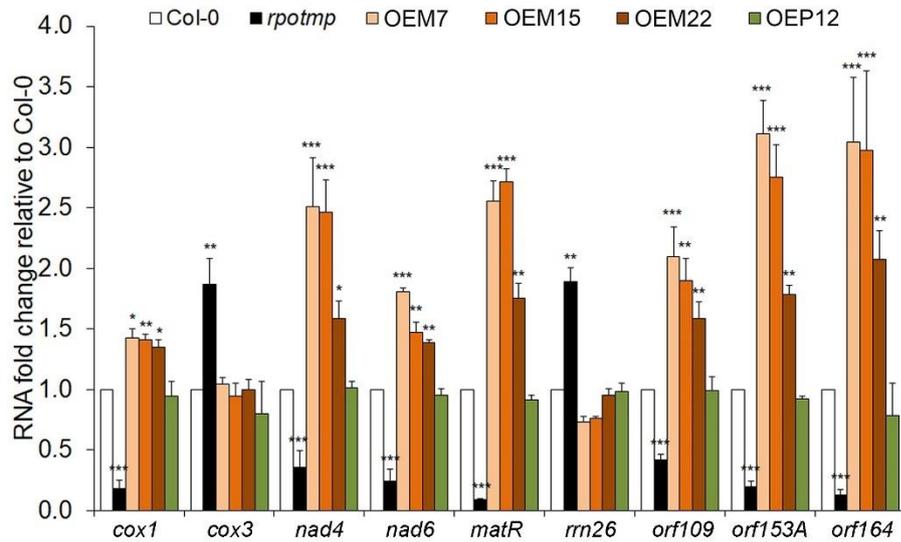


Рис. 16. Экспрессия некоторых генов мтДНК, измеренная с помощью кПЦР (Gorbenko et al. 2024). Приведены уровни значимости изменений относительно Col-0 (тест Стьюдента): \*\* -  $P < 0,01$ , \*\*\* -  $P < 0,001$ .

Белки ядерного кодирования митохондриальной адресации были определены с помощью совмещения данных нескольких БД (AtSubP и TargetP с сайта Arabidopsis.org (доступ 06.09.2023) и GO Cellular Component по термину GO:0005739) за вычетом белков митохондриального кодирования и псевдогенов. Данные об уровнях транскриптов митохондриальных белков ядерного кодирования приведены на Рис. 17А, диаграммы Венна на Рис. 17В. Дифференциальная экспрессия была обнаружена для 439 генов митохондриальной адресации ядерного кодирования, принадлежащих 27 семействам, самым крупным из которых было семейство белков ацил-липидного метаболизма (10 генов).

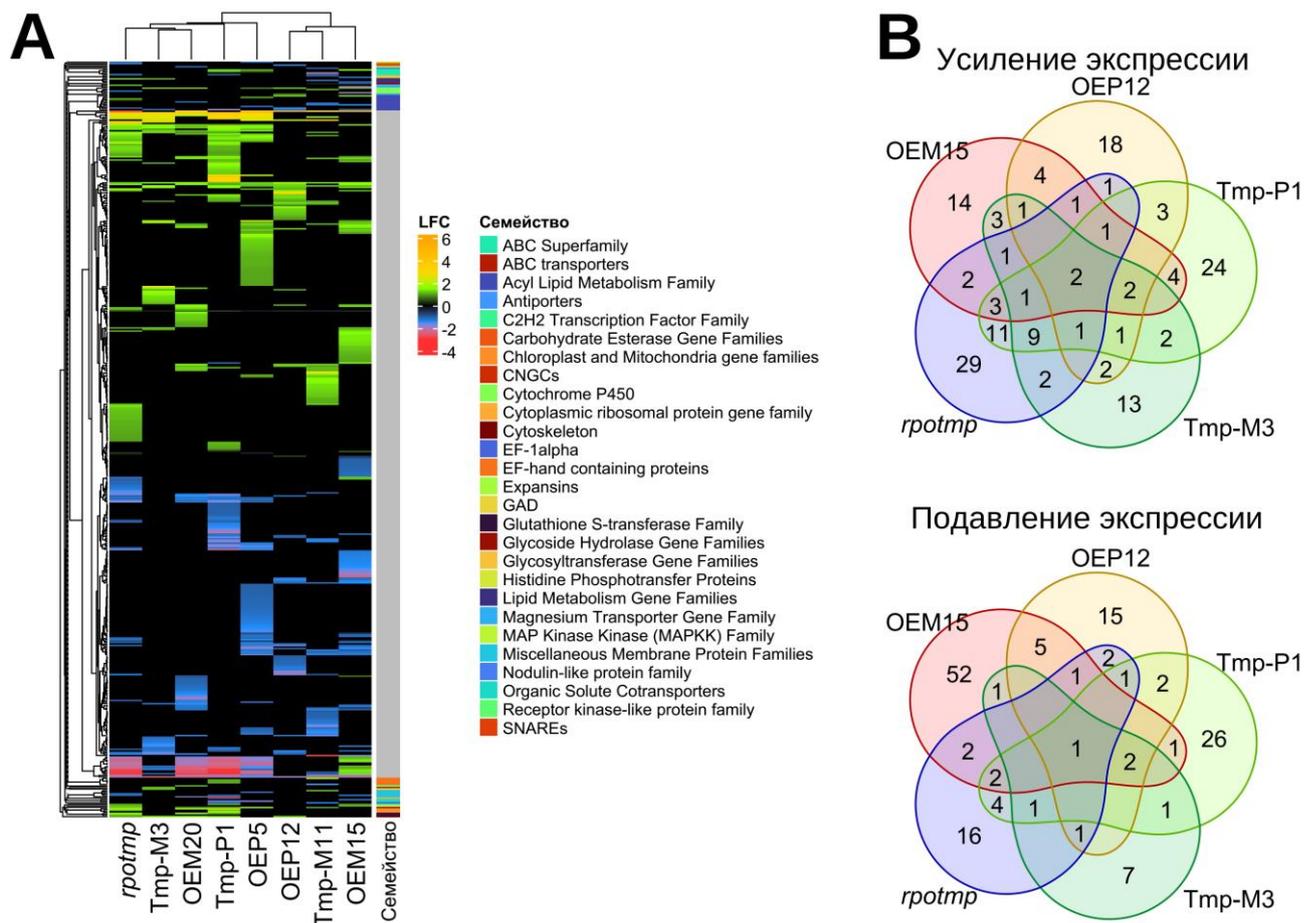


Рис. 17. А: Экспрессия митохондриальных белков ядерного кодирования; В: диаграммы Венна.

Возможно, существует специфический ретроградный ответ на изменение уровня RPOTmp-зависимых транскриптов в органеллах. Для детекции генов, предположительно участвующих в ретроградном ответе на избыток RPOTmp в митохондриях, из ДЭГ с митохондриальной адресацией линии OEM15 были отфильтрованы общие ДЭГ с линиями OEP12, Tmp-P1 и *rpotmp*. Таким образом был получен набор из 53 генов с подавляемой, и 17 генов с усиливающейся экспрессией (Рис. 18). Для определения возможного ретроградного ответа на отсутствие RPOTmp в митохондриях наоборот - от общих ДЭГ линий *rpotmp* и Tmp-P1 отфильтровывались общие ДЭГ с линиями OEP12 и OEM15. Полученный набор данных содержал 20 генов с усиливающейся (15 избыточно представленных категорий GO, объединяющиеся в категории импорта белков в митохондрии и окисления NADH) и 5 с подавляемой экспрессией (25 избыточно представленных категорий GO, объединяющиеся в категории ответа на гипоксию, ответа на СК, биосинтеза вторичных метаболитов и лигнина, катаболизм ароматических органических веществ) (Рис. 18).

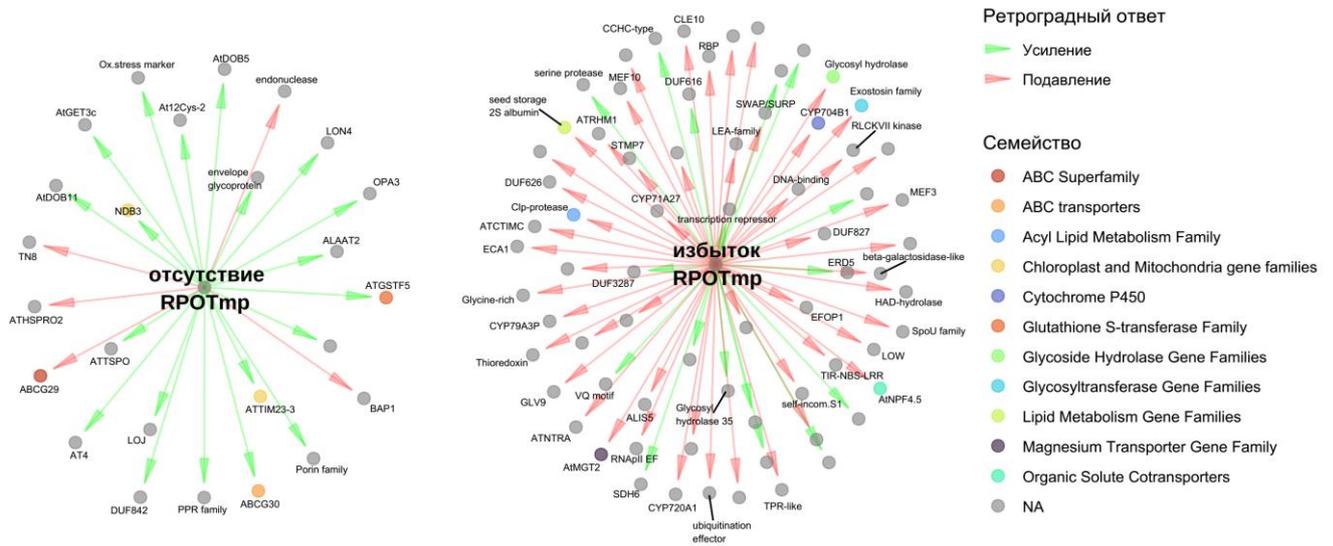


Рис. 18. Сетевое представление транскриптомных изменений вследствие ретроградного ответа на изменение количества RPO1mp в митохондриях.

Отсутствие RPO1mp в митохондриях приводило к усилению экспрессии ротенон-нечувствительной NADH-дегидрогеназы *NDB3* (вероятно таким образом несколько компенсируется недостаточность по комплексу I), *TIM23-3* (импорт белка в митохондрии), *PDR2* (ABC-транспортер), порина *TOM40*, PPR-белка *LOJ*, протеазы *LON4*, аланинаминотрансферазы *ALAAT2* (фермент гликолиза), сенсорного белка *TSPO* (находится во внешней мембране митохондрий и участвует в ответе на АБК, солевой и осмотический стресс, в связи с чем может усиливаться чувствительность к данным факторам), маркера фосфатного голодания *ATIPS2* (Wang et al., 2019), а также *At12Cys-2*. В работе (Wang et al., 2016) указывается что данный белок индуцируется в ответ на недостаточность по комплексу I дыхательной цепи митохондрий, вызванную генетическими нарушениями. Вероятно, индукция и множественная локализация данного белка является частью механизма передачи сигнала митохондриальной дисфункции в цитозоль и другие органеллы. При этом подавлялась экспрессия 5 генов: *BAP1* (ответ на температуру и на салицилат), *PDR1* (ABC-транспортер), *HSPRO2* (ответ на окислительный стресс и салицилат), *AT2G38365* (эндонуклеаза) и *TN8* (передача сигнала иммунного ответа).

Гиперэкспрессия RPO1mp в митохондриальной адресации приводила к подавлению экспрессии 53 генов, в том числе: транспортера магния *MRS2-1*, генов метаболизма липидов *SDE3* и *AT2G30660*, белков семейства цитохрома P450 - *CYP720A1* (биосинтез brassinosteroids, Chaturvedi et al., 2020), *CYP71A27* (синтез фитоалексина камалексина, Корнилова et al., 2023) и *CYP79A3P*, *MEF3* – фактора редактирования РНК *atp4-89* (Verbitskiy et al., 2011), *MEF10* – фактора редактирования РНК *Nad2* (Härtel et al., 2013), и ряда неохарактеризованных белков. При этом происходило усиление экспрессии пролиндегидрогеназы *ERD5* (которая привносит электроны от окисления пролина в ЭТЦ

митохондрий, Launay et al., 2019), сериновой протеазы AT1G74140, гликозилгидролазы AT3G44070, *SDH6* (с/е комплекса II) и ряда неохарактеризованных белков (Gorbenko et al., 2024).

Полученные наборы генов были проанализированы на избыточную представленность мишеней ТФ (полученных с сайта plantRegMap: <http://plantregmap.gao-lab.org>, доступ 06.09.2023). Значимое обогащение было обнаружено только для набора генов «Отсутствие RPOТmp в митохондриях» (Рис. 19). Возможно, данная группа генов регулируется группой транскрипционных факторов семейства NAC, из которых *NAC016* (AT1G34180) имел самое значимое обогащение.

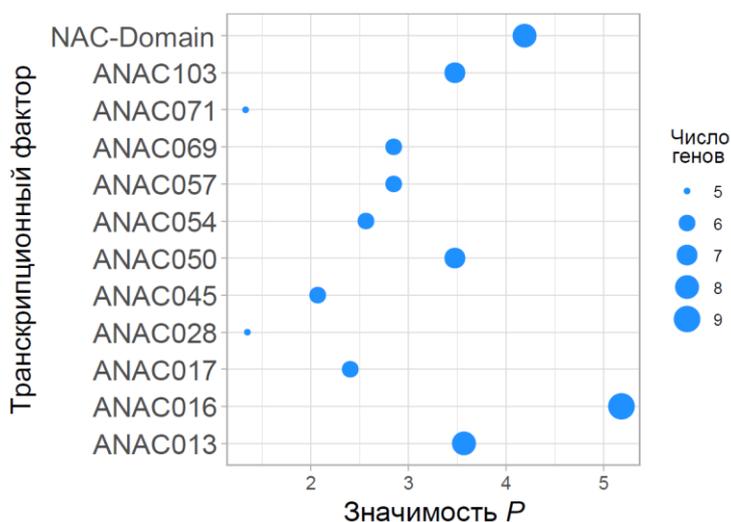


Рис. 19. Оценка обогащения генов митохондриальной адресации, экспрессия которых усиливается только при недостатке RPOТmp в митохондриях, мишенями транскрипционных факторов. Значимость  $P = -\text{Log}_{10}(P)$ . P-значения скорректированы методом Бенджамини-Хохберга.

Из данного списка факторов среди ДЭГ был обнаружен только *NAC103*, экспрессия которого подавлялась только в ответ на гиперэкспрессию RPOТmp в митохондриях, а в остальных случаях оставалась неизменной. С помощью базы данных пост-трансляционных модификаций (с сайта <https://www.psb.ugent.be/webtools/ptm-viewer/>, доступ 07.09.2023) было определено, что четыре фактора из данного списка потенциально регулируются с помощью фосфорилирования (*NAC103*, *NAC069*, *NAC050* и *NAC016*), что позволяет предположить изменение их активности без изменения уровней транскриптов.

### 3.1.6 Экспрессия генов, кодирующих белки хлоропластов

Среди ДЭГ исследуемых линий не было обнаружено ни одного гена, кодируемого хпДНК, что согласуется с литературными данными (Kühn et al., 2009; Tarasenko et al., 2016) и предполагает что RPOТmp не играет существенной роли в транскрипции генов хпДНК у 12-дневных проростков Арабидопсиса.

С помощью кПЦР было установлено что у линий с гиперэкспрессией RPOТmp в

пластидной адресации (OEP6, OEP8, OEP12) происходило значимое усиление экспрессии трех генов: *accD* (с/е ацетил-коА-карбоксилазы, участвующая в биосинтезе ЖК), *clpP* (компонент протеазного комплекса Clp, который участвует в контроле качества неправильно свернутых или неполных пептидов) и *rpoB* (субъединица РЕР-полимеразы). Данные представлены на Рис. 20.

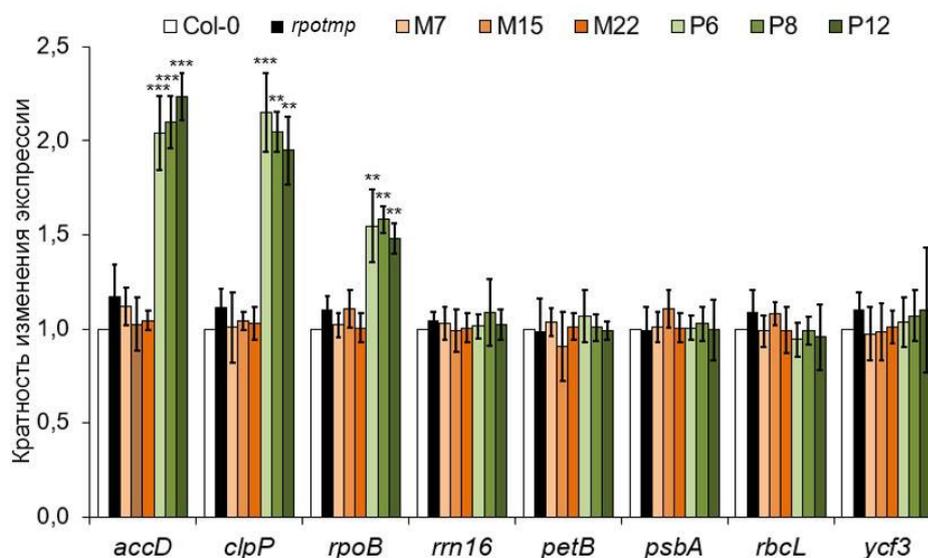


Рис. 20. Профиль экспрессии некоторых генов хлДНК у исследуемых линий трансгенных растений (Gorbenko et al., 2024). Приведены уровни значимости изменений относительно Col-0 (тест Стьюдента): \*\* -  $P < 0,01$ , \*\*\* -  $P < 0,001$ .

Выборка уровней транскриптов ДЭГ белков ядерного кодирования пластидной адресации приведена на Рис. 21А, диаграммы Венна на Рис. 21В. Для определения ДЭГ, ответственных за ретроградный ответ на гиперэкспрессию RPO<sub>Tmp</sub> в хлоропластах, от ДЭГ линии OEP12 отфильтровывали ДЭГ, общие с линиями OEM15, Tmp-M3 и *rpotmp*. Полученный набор содержал 26 генов с подавляемой, и 20 генов с усиливающейся экспрессией (GO анализ избыточно представленных категорий не выявил). Гены с усиленной экспрессией включали в себя депонирующийся в хлоропластах ТФ *WRI4*, TPR-белок *OTP82* (участвующий в редактировании пластидных РНК), ядерную протеинкиназу *PERK6* (депонируется в хлоропластах), шаперонин *HSP90,5*, тиоредоксин *WCRK1* (редокс гомеостаз) и *PGL1* (фермент пентозофосфатного пути). При этом была снижена экспрессия белка активации РУБИСКО *RCA*, белка внешней мембраны *OMP85*, РНК-связывающего белка *ALY1*, белка фотосистемы *PSAH-1*. Также в числе генов с измененной экспрессией был ряд белков биосинтеза вторичных метаболитов и неохарактеризованных белков (Gorbenko et al., 2024).

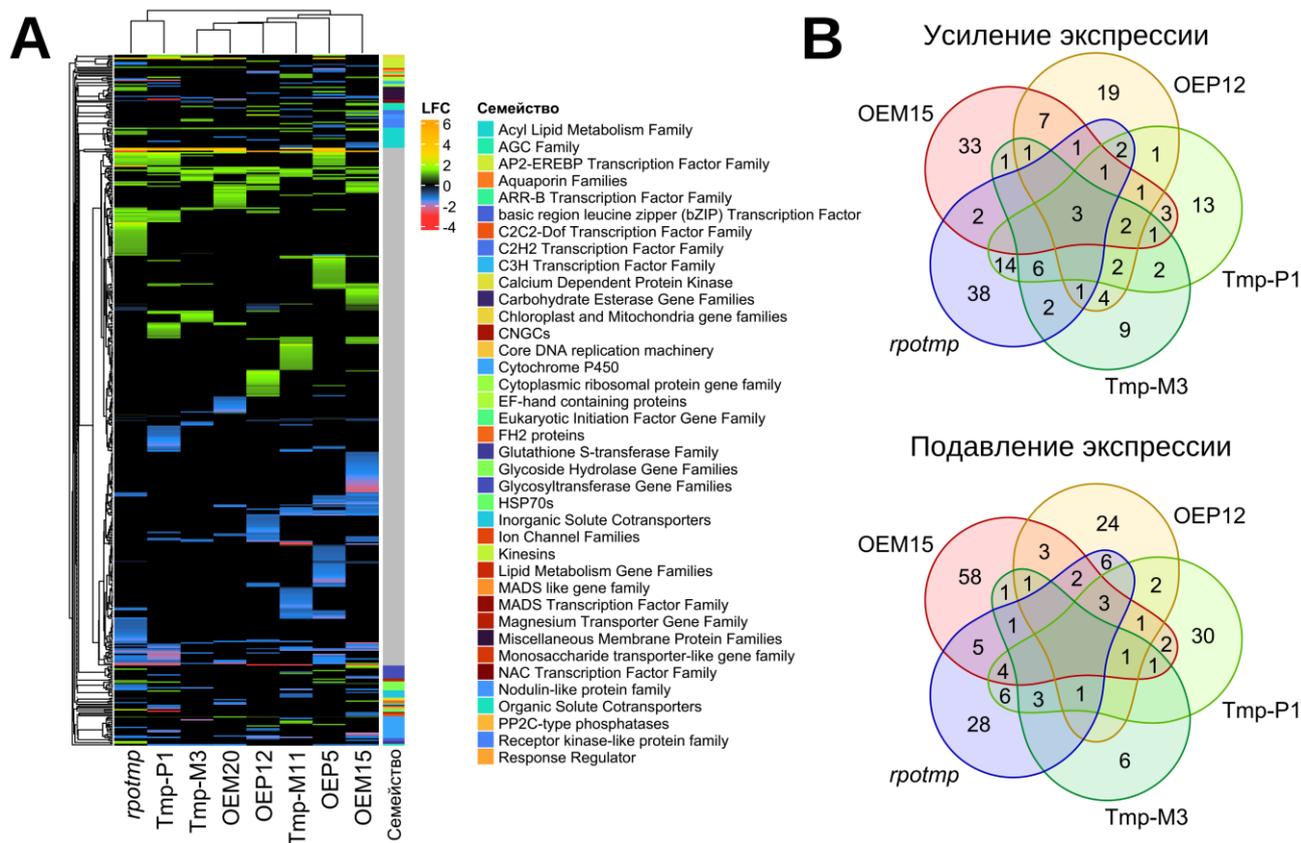


Рис. 21. А: Уровни транскриптов белков ядерного кодирования пластидной адресации; В: Диаграммы Венна.

Для выявления предположительного ретроградного ответа на отсутствие RPO<sub>Tmp</sub> в пластидах – от общих ДЭГ линий *rpotmp* и Tmp-M3 отфильтровывались ДЭГ, общие с линиями OEP12 и OEM15. Полученный набор содержал 8 генов с усиливающейся (избыточно представлена категория GO организации митохондрий) и 3 гена с подавляемой экспрессией (25 избыточно представленных категорий GO, объединяющиеся в категории катаболизма крахмала, биосинтеза дисахаридов, транспорта железа, развития цветка и старения листа) у линий *rpotmp* и Tmp-M3. Отсутствие RPO<sub>Tmp</sub> в хлоропластах приводит к усилению экспрессии ТФ этиленового ответа *ERF071*, кинезин-подобного белка *KIN-14P*, белка иммунитета AT3G24020, протеазы семейства ClpS и РНКазы-Н *RNH1C*, а также к подавлению экспрессии 3 генов: бета-амилазы *BMU3*, ТФ *AGL42* и *ABC14* – фактора сборки цитохрома С. Данные представлены на схеме (Рис. 22). Обогащения данных наборов генов мишенями транскрипционных факторов обнаружено не было.

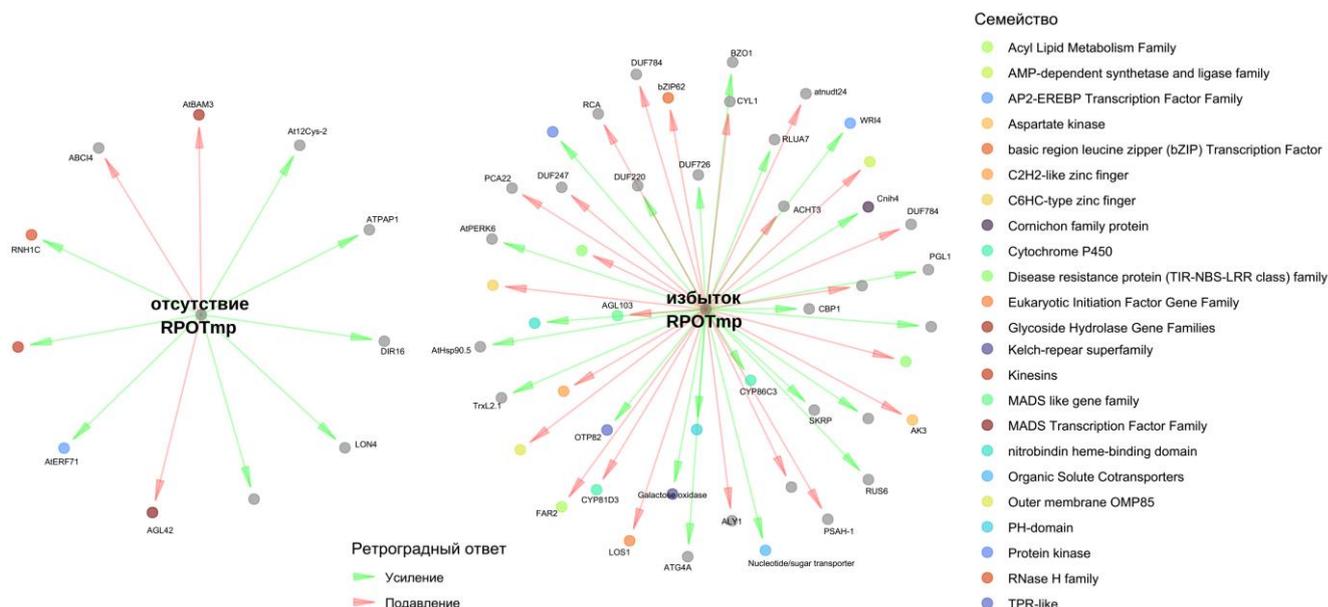


Рис. 22. Сетевое представление транскриптомных изменений вследствие ретроградного ответа на изменение количества RPOtpr в пластидах.

### 3.1.7 Экспрессия маркерных генов органелльных нарушений

В работе (Van Aken et al., 2012) были выявлены гены, повышенная экспрессия которых является маркерами митохондриальных и/или пластидных нарушений. Шесть из них были представлены среди ДЭГ исследуемых линий (Рис. 23).

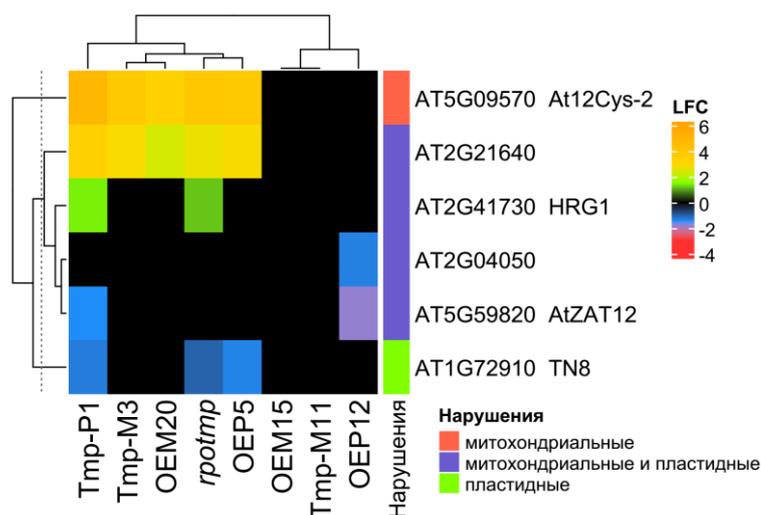


Рис. 23. Экспрессия маркерных генов нарушений у исследуемых линий.

У линий OEM15 и Tmp-M11 экспрессия маркерных генов не отличалась от уровня дикого типа. Экспрессия *At12CYS-2* была значительно повышена у дефицитных по митохондриальной RPOtpr линий и комплементанта Tmp-M3. AT12CYS-2 локализован в межмембранном пространстве митохондрий. Его транскрипция индуцируется в случае стресса различной природы, однако увеличение количества белка было обнаружено только у мутантов дефицитных по комплексу I (Wang et al., 2016). Данный белок представляет собой один из вероятных

кандидатов на роль медиатора ретроградного сигнала митохондриальной дисфункции. Вероятной причиной индукции данного белка у исследуемых линий являются: у *rpotmp*, OEP5, OEM20, Tmp-P1 – дефицитность по комплексу I; Tmp-M3 имеет низкий уровень транскрипта рекомбинантной RPOTmp и комплементация ее функций в митохондриях может быть недостаточной; OEP12 – подавление экспрессии нативного гена RPOTmp и как следствие некоторая недостаточность по RPOTmp в митохондриях (хотя среди генов мтДНК OEP12 экспрессия была снижена только у *Orf121B*).

### 3.1.8 Экспрессия генов PPR-белков

Белки с пентатрикопептидным повтором (PPR-белки) способны специфически связываться с определенными последовательностями РНК и участвовать в редактировании органелльных РНК. В работе (Liu et al., 2016) авторы рассматривали экспрессию PPR-белков подгруппы E, вовлеченную в редактирование органелльных РНК при стрессе. Данные об экспрессии PPR-белков подгруппы E в исследуемых линиях растений представлены на Рис. 24.

Среди ДЭГ исследуемых линий из 105 белков PPR подклассов E2 и E+ было обнаружено 9. При этом ярких изменений в экспрессии PPR обнаружено не было, тогда как в работе Liu et al. (2016) изменения экспрессии достигали LFC = 6. У линий *rpotmp* и Tmp-M11 была повышена экспрессия AT3G47840, практически до тех-же значений, что и через 6 часов после теплового стресса (Liu et al., 2016). У линии Tmp-P1 повышалась экспрессия AT5G42450 со значениями, сходными для таковых при окислительном стрессе (Liu et al., 2016). У линии OEP5 был повышен уровень экспрессии гена AT3G18970 до значений, близких к наблюдаемым в работе Liu et al. (2016) при окислительном стрессе.

Отмечен сниженный уровень транскриптов факторов редактирования РНК *MEF3* (AT1G06140), *MEF10* (AT3G11460) и AT3G15930 у линии OEM15. AT3G15930 ко-экспрессируется с экзоном *Nad5B* (данные из БД String: <https://string-db.org/>), MEF10 отвечает за редактирование РНК *Nad2* (Härtel et al., 2013), а MEF3 участвует в редактировании *atp4-89* (Verbitskiy et al., 2011). Вероятно, таким образом компенсируется избыток первичных митохондриальных транскриптов, вызванный гиперэкспрессией RPOTmp в митохондриях (Gorbenko et al., 2024).

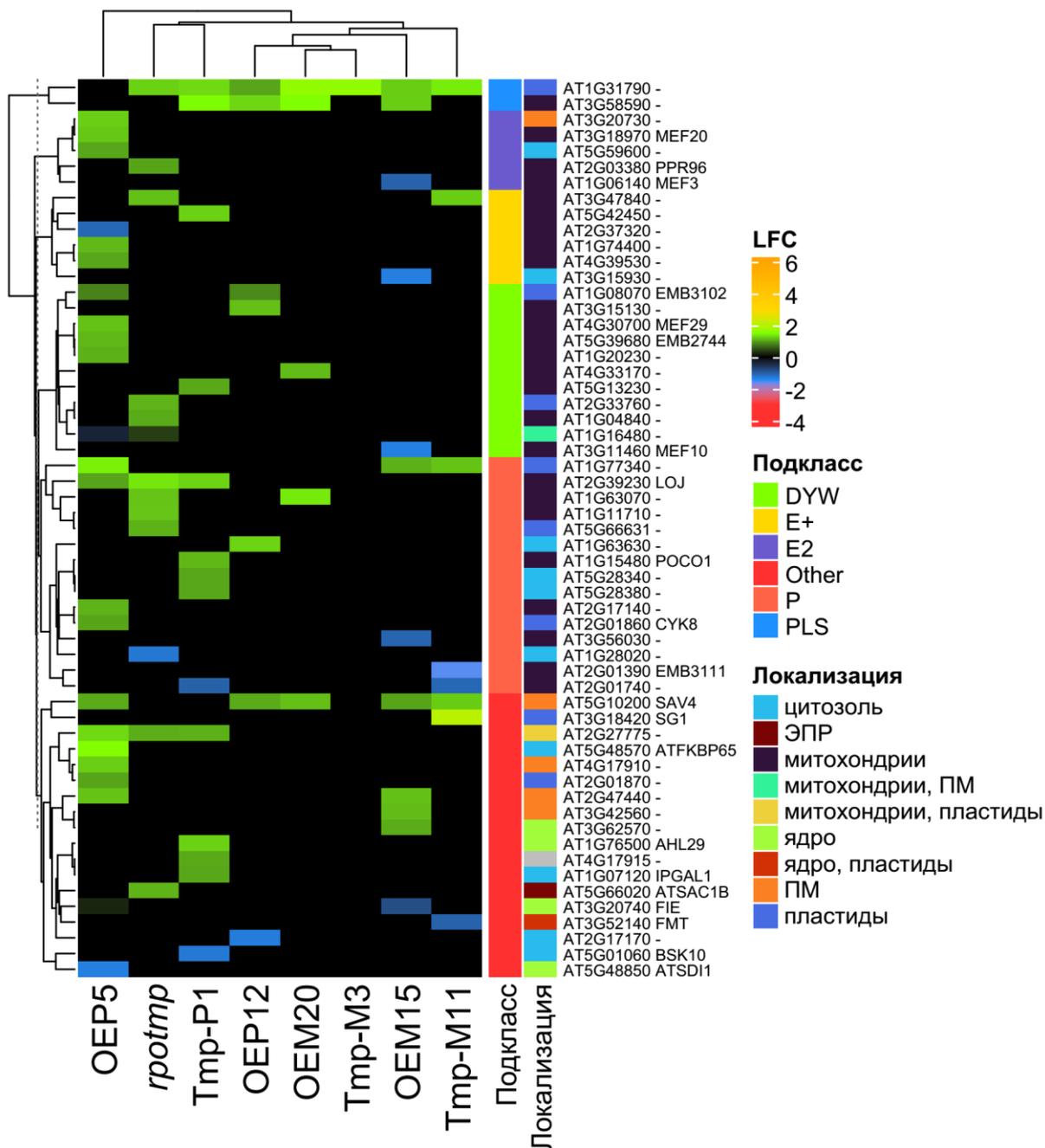


Рис. 24. Экспрессия белков с пентатрикопептидным повтором у исследуемых линий. Данные о локализации взяты из БД SUBA5 (Hooper et al., 2022).

### 3.1.9 Анализ ко-экспрессии генов

Анализ ко-экспрессии позволяет получить информацию о скоординированной экспрессии групп генов – модулей ко-экспрессии – на основании данных о лог-экспрессии транскриптов образцов (значениях флуоресценции ДНК-микрочипа). Часто в модули ко-экспрессии объединяются гены, которые имеют общую, или тесно связанную регуляцию, принадлежат к одному или тесно взаимодействующим регуляторным путям. В сочетании с анализом дифференциальной экспрессии генов данный метод позволяет обнаруживать потенциальные неизвестные взаимосвязи в сетях генной регуляции. В настоящем анализе были использованы

значения лог-экспрессии с 24 слайдов двухканальных ДНК-микрочипов - по три биологических повторности каждой из 8 исследуемых трансгенных линий и 24 соответствующих биологических повторности дикого типа Col-0 (данные доступны в NCBI GEO: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE251661>). В результате анализа было определено 5 модулей ко-экспрессии, содержание которых приведено на Рис. 25А.

Оценка обогащения модулей ко-экспрессии позволяет определить – наблюдался ли для экспрессии значительной части генов модуля скоординированный «перевес» в одном или нескольких классах образцов. Для определения нормализованных оценок обогащения была отобрана часть образцов: «comp-M» - Tmp-M3, Tmp-M11; «comp-P» - Tmp-P1; «OEM» - OEM15; «OEP» - OEP12; «*rpotmp*» - *rpotmp*; «Col-0» - растения дикого типа. Результаты представлены на Рис. 25В.

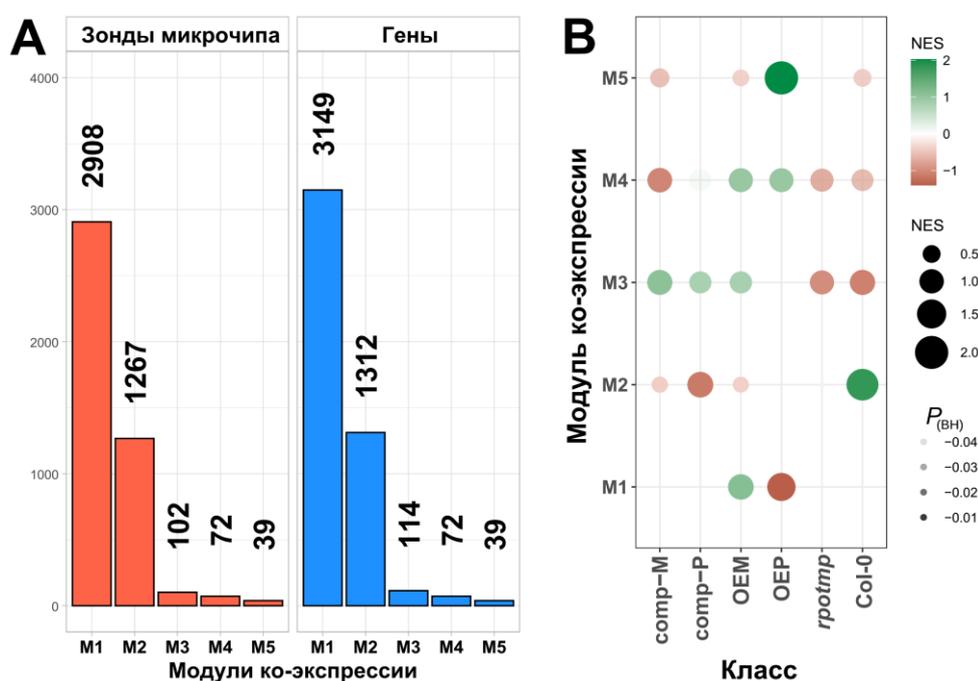


Рис. 25. А: Количество зондов ДНК-микрочипа и ассоциированных генов в выявленных модулях ко-экспрессии. В: Нормализованная оценка обогащения модулей по классам образцов.  $P_{(BH)}$  –  $P$ -значения, скорректированные методом Бенджамини-Хохберга. NES – Normalized Enrichment Score, нормализованная оценка обогащения.

Было обнаружено, что модуль M1 был обогащен у OEM15 и подавлялся у OEP12. M2 обогащен у дикого типа, значит сильно подавлялся у исследуемых линий (т.к. оценка относительная). M3 был относительно обогащен у всех трансгенных линий, кроме мутантной. M4 был обогащен только у гиперэкспрессоров, а M5 очень сильно обогащен у линии OEP12.

Анализ обогащения терминов Генной Онтологии (Биологические Процессы) показал, что гены модуля M1 тесно связаны с процессом ответа на интенсивность света, M2 – с ответом на гипоксию, а M4 – с ауксиновым ответом (Рис. 26).

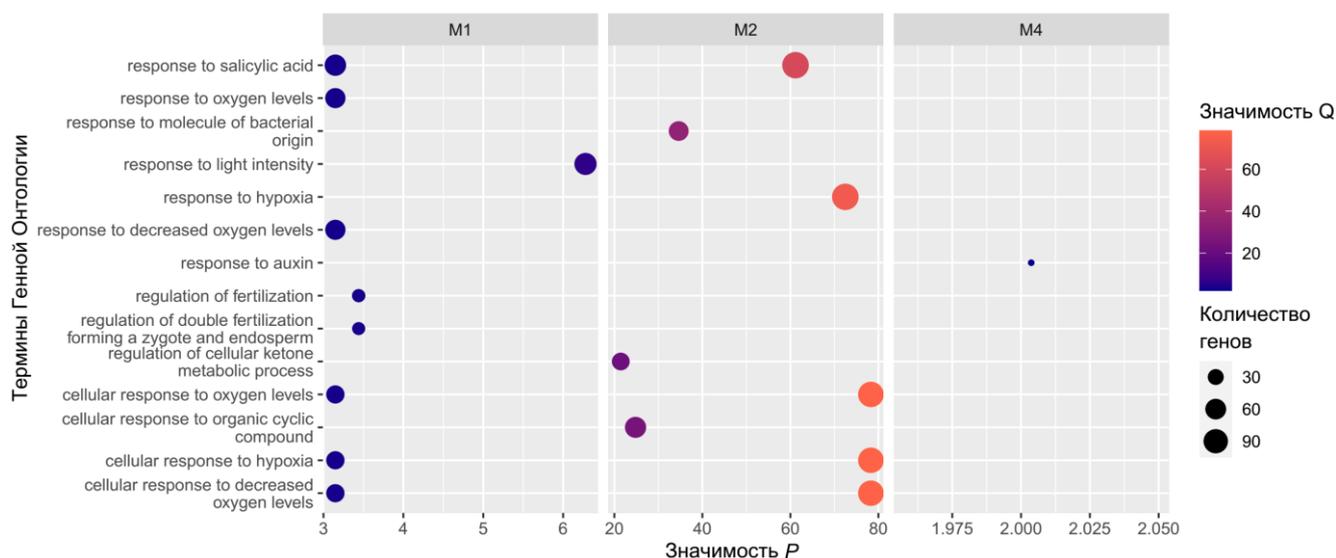


Рис. 26. Результаты анализа избыточной представленности терминов Генной Онтологии (Биологические Процессы) в модулях ко-экспрессии.

Для детального исследования модулей, из них была извлечена информация о главных хабах модулей, то есть узлах взвешенных сетей ко-экспрессии с самой высокой центральностью, изменения экспрессии которых коррелируют с экспрессией большого числа генов модуля. С помощью интерактома из работы (Yilmaz et al. 2022) были проанализированы белок-белковые взаимодействия (ББВ) с участием генов модулей. В качестве меры достоверности связей ББВ в интерактоме применяется логит-оценка взаимного ранга (лоВР), которая зависит от наблюдаемых в экспериментах явлениях ко-экспрессии обоих узлов, показывая тем самым вероятность положительной или отрицательной корреляции генов узлов *in vivo*.

#### Модуль M1

Среди хабов, координирующих экспрессию модуля M1 были обнаружены гены, не представленные в ДЭГ: UDP-глюкозоэпимераза *UGE1* (AT1G12780), натриевый ионный канал (AT5G59960) и 3 неохарактеризованных гена. M1 был значимо обогащен только у образцов OEM и подавлялся у образцов OEP, возможно в силу содержания ДЭГ, индуцированных разной адресацией рекомбинантной RPOTrp.

С помощью интерактома (Yilmaz et al. 2022) была собрана ББВ-сеть модуля M1, содержащая 5097 узлов (1012 принадлежат M1) и 15052 ребер (4413 с положительной лоВР, 3141 с отрицательной). Анализ избыточной представленности полученной сети ББВ показал обогащение терминов GO: регуляция транскрипции РНК-полимеразой II (209 генов), регуляция сигналинга (192 гена) и регуляция постэмбрионального развития (196 генов). Топ-10 узлов, определенных с помощью пяти метрик центральности, были обогащены терминами GO, ассоциированными с биогенезом клеточной стенки, регуляцией состояния покоя семян и регуляции постэмбрионального развития.

### *Модуль M2*

Модуль M2 (подавляющийся в линиях комплементантов и OEM) был обогащен терминами GO, ассоциированными с ответом на соленость и стрессовым ответом. Хабы модуля содержали транскрипты рецепторной киназы *SOBIR1* (AT2G31880), AT5G59550 (положительного регулятора ответа на засуху через метаболизм АБК), *ERF4* (AT3G15210) и неидентифицированный ген. Термины GO ассоциированные ответом на СК и на уровни кислорода были сильнее всего ассоциированы с группой хабов модуля. Сеть ББВ модуля содержала 2680 узлов (432 принадлежащих M2) и 6886 ребер (1782 с положительной лoBP и 1821 с отрицательной). Топ 10 центральных узлов были обогащены терминами GO, связанными с СК- и ЖК-ответом.

### *Модуль M3*

Хабами модуля M3 (подавляющийся у *rpotmp*, и обогащенный в линиях комплементантов и OEM) были исключительно RPOTmp-зависимые митохондриальные гены, экспрессия которых была усилена в линии OEM15. Анализ обогащения GO Cellular Component выявил термины, связанные с люменом органелл и межмембранным пространством митохондрий. Сеть ББВ модуля содержала 174 узла (22 гена M3) и 172 ребра (40 с положительной лoBP и 36 с отрицательной).

### *Модуль M4*

Экспрессия M4 координировалась уровнями транскриптов генов ответа на фосфор – *EXL3* и 5 (AT5G51550 и AT2G17230, соответственно), PAR1 (AT2G42870, транскрипционный фактор), *SAUR46* (AT2G37030, фактор этиленового ответа) и полигалактуроназы (AT1G48100). Сеть ББВ модуля содержала 309 узлов (22 гена M4) и 325 ребер (108 с положительной лoBP, 116 с отрицательной). Топ-10 центральных узлов сети были обогащены терминами GO, связанными с ответом на красный и дальний красный свет.

### *Модуль M5*

M5, обогащенный у OEP12, координировался уровнями транскриптов *NAC014* и *SAMTA1* (AT1G33060 и AT5G09410, соответственно; экспрессия усиливалась в OEP12), *LIN37A* (AT1G04930) и MIM (AT5G61460, транскрипционный фактор). Сеть ББВ содержала 146 узлов (18 генов модуля) и 132 ребра (40 с положительной лoBP, 30 с отрицательной). Топ-10 центральных узлов сети были обогащены термином GO передачи сигнала с помощью фосфорилирования.

### *Сети белок-белковых взаимодействий*

При анализе сетей ББВ обнаруженных модулей ко-экспрессии были выявлены узлы с наивысшей центральностью (с использованием комбинации пяти метрик центральности), представленные в ДЭГ исследуемых линий (Таблица 1 Приложения). Некоторые из этих генов

представляют значительный интерес в контексте исследования. У линий OEM15 и OEP12 подавлялась экспрессия гена *GASA5*, который вовлечен в ответ на АБК, что может быть связано со сниженной чувствительностью этих линий к экзогенной АБК (Gorbenko et al., 2024). У *rpotmp* подавлялась экспрессия *FLA14*, который участвует в эмбриогенезе и развитии семян.

#### Контроль модулей ко-экспрессии транскрипционными факторами

С помощью данных из БД PlantGSAD (TFT) и PlantRegMap была проанализирована избыточная представленность мишеней транскрипционных факторов в наборах генов модулей ко-экспрессии (Рис. 27). Было обнаружено, что гены М1 обогащены мишенями 75 ТФ, ассоциированных в основном с циркадными ритмами, М2 – мишенями 70 ТФ, ассоциированных с БС-сигналингом, М3 – мишенями 13 ТФ, каждый из которых имеет НАС-домен.

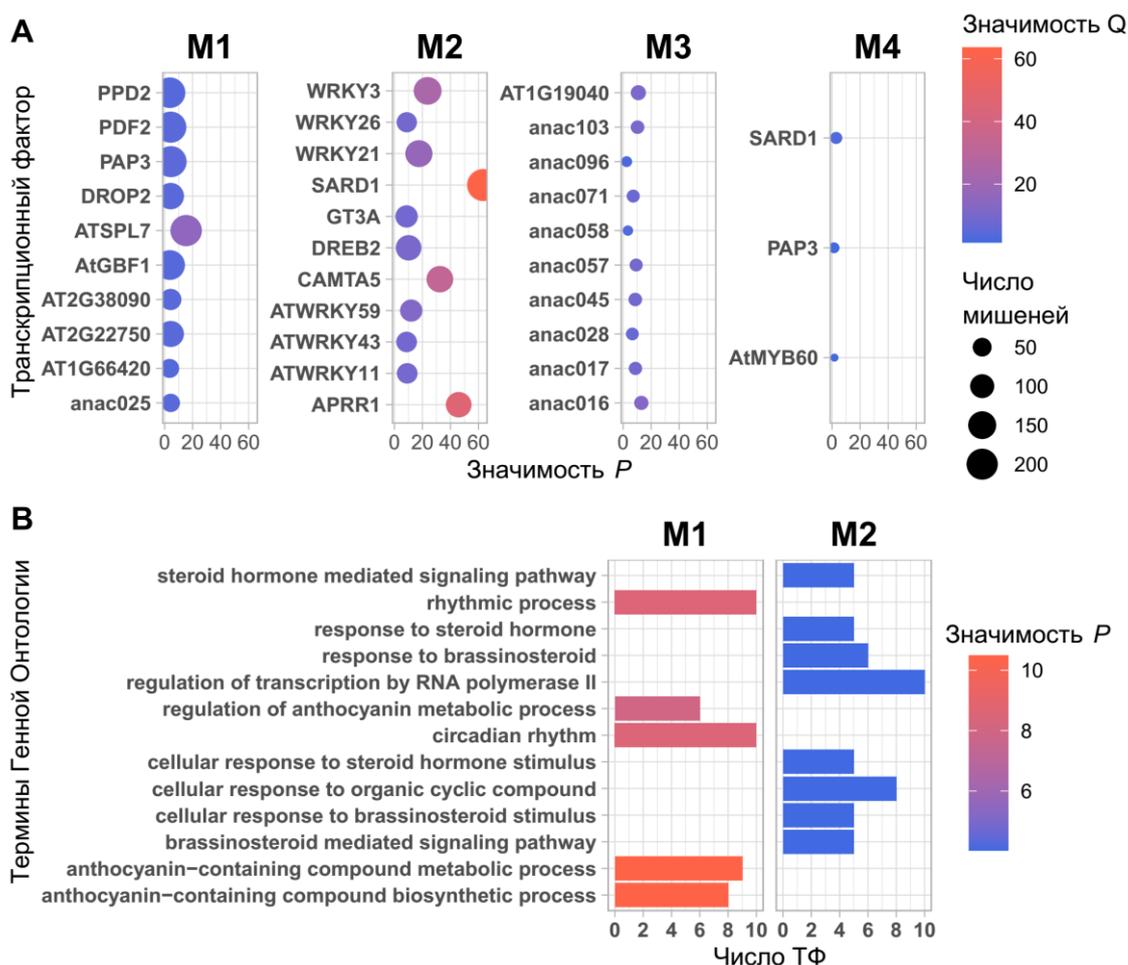


Рис. 27. Избыточная представленность мишеней транскрипционных факторов в наборах генов модулей ко-экспрессии (А; Для М1 и М2 представлены по топ-10 категорий), и избыточная представленность терминов Генной Онтологии в обнаруженных наборах транскрипционных факторов (Б).

Фактор SARD1 (AT1G73805), мишени которого сильнее всего избыточно представлены в наборах генов М2 и М4, является одним из двух ключевых регуляторов биосинтеза СК, ассоциированного с приобретением системной устойчивости (Zhang et al. 2010). Среди избыточно представленных в М2 были мишени APRR1 (TOC1, AT5G61380) – «часового» гена,

который подавляет активность ТФ PIF (мишени PIF1, PIF3 и PIF7 также избыточно представлены в M1 и M2), и регулируется в основном пост-транскрипционно (Yan et al. 2021).

### 3.1.10 Анализ скоррелированной экспрессии сетевыми методами

Уровни лог-экспрессии генов, содержащихся в модулях ко-экспрессии, исследовали попарным корреляционным анализом (Пирсон), отфильтровывали низкие корреляции ( $R < 0.8$ ), строили взвешенный граф и получали на его основе минимальное остовное дерево (МОД) с помощью взвешенного алгоритма Прима. Полученное МОД имело скелетоподобную топологию и содержало 3415 узлов, 465 из которых экспрессировались дифференциально хотя бы у одной из исследуемых линий (Рис. 28).

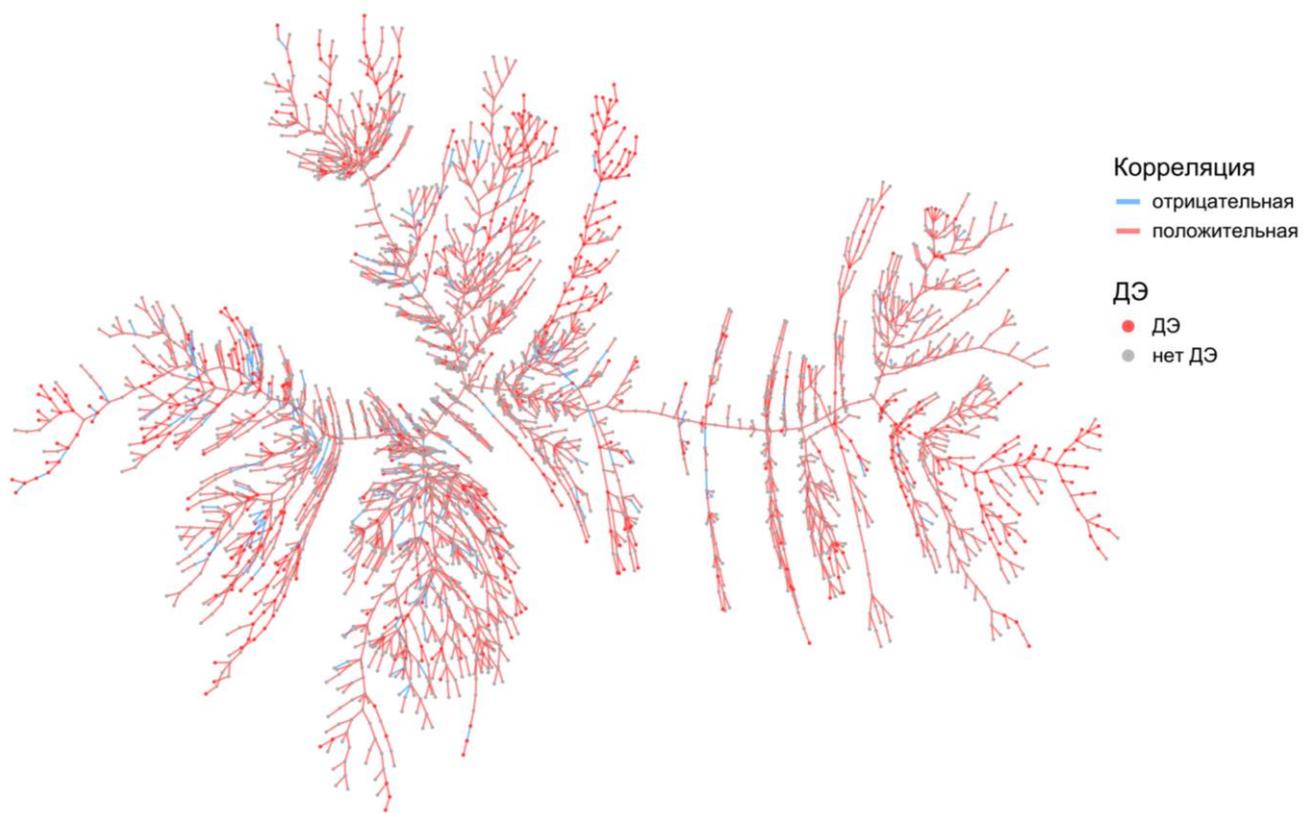


Рис. 28. Минимальное остовное дерево, построенное на основе корреляционного анализа значений лог-экспрессии мишеней ДНК-микрочипирования исследуемых линий растений. Цвет связей показывает знак корреляции: красный – положительная, синий – отрицательная. Красным выделены узлы, представленные в массиве ДЭГ.

Древо разделили с помощью кластеризации по посредничеству (`cluster_edge_betweenness`) и провели анализ обогащения наборов генов кластеров с данными о ДЭГ соответствующих генов по исследуемым образцам – таким образом получили группу из 13 интересующих участков МОД (Рис. 29). Кластеры, находящиеся в тесном контакте друг с другом, были объединены в суперкластеры (36--43; 8--15--48).

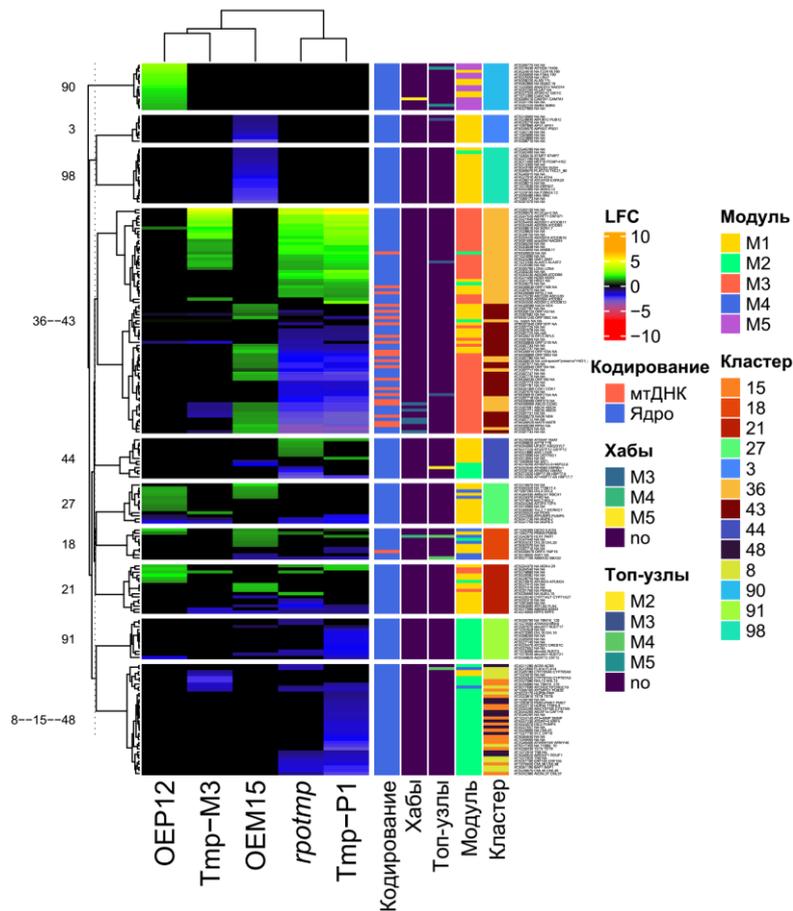


Рис. 29. Дифференциальная экспрессия генов, содержащихся в кластерах МОД, обогащенных у исследуемых линий растений. Хабы – узлы сети наивысшей центральности. Топ-узлы – топ-узлы сетей ББВ, определенные с помощью комбинации 5 метрик центральности. Модуль – модули ко-экспрессии.

Наиболее интересным являлся суперкластер 36--43, т.к. именно он содержал RPOTmp-зависимые митохондриальные гены. Корреляционная сеть суперкластера показана на Рис. 30. Обнаруженная отрицательная корреляция (располагается непосредственно в левой части «хребта» участка древа), вероятно является отражением существующего механизма регуляции экспрессии митохондриальных генов. Данная корреляционная связь соединяет узлы *Nad4* и *MatR* с геном *DCCI* (AT1G24095), кодирующим белок, который регулирует активность комплекса I за счет редокс-модификации карбоангидразы CA2 (Zhang et al., 2018). Экспрессия практически всех связанных с ними узлов имела положительную корреляцию и повышалась у *rpotmp*. Экспрессия *ABCG30* (AT4G15230) повышается при фосфатном голодании и ингибирует рост корней (Naumann et al. 2019), что может иметь эффект на *rpotmp*, т. к. у этой линии рост корней замедлен (Gorbenko et al. 2024). Сериновая протеаза *LON4* (AT3G05790) двойной направленности (митохондрии и тилакоиды) вовлечена в процесс утилизации поврежденных белков (Ostersetzer et al. 2007). *GMI1* (AT5G24280) вовлечен в репарацию двуцепочечных разрывов (Böhmdorfer et al. 2011; Mondal et al. 2016).

Для линии OEM15 не было обнаружено изменений экспрессии ядерных генов,

скоррелированных с повышенной экспрессией генов мтДНК, свидетельствуя о том, что в данном случае ретроградная регуляция происходит через некоторый опосредованный механизм, поэтому линейных зависимостей не наблюдается.

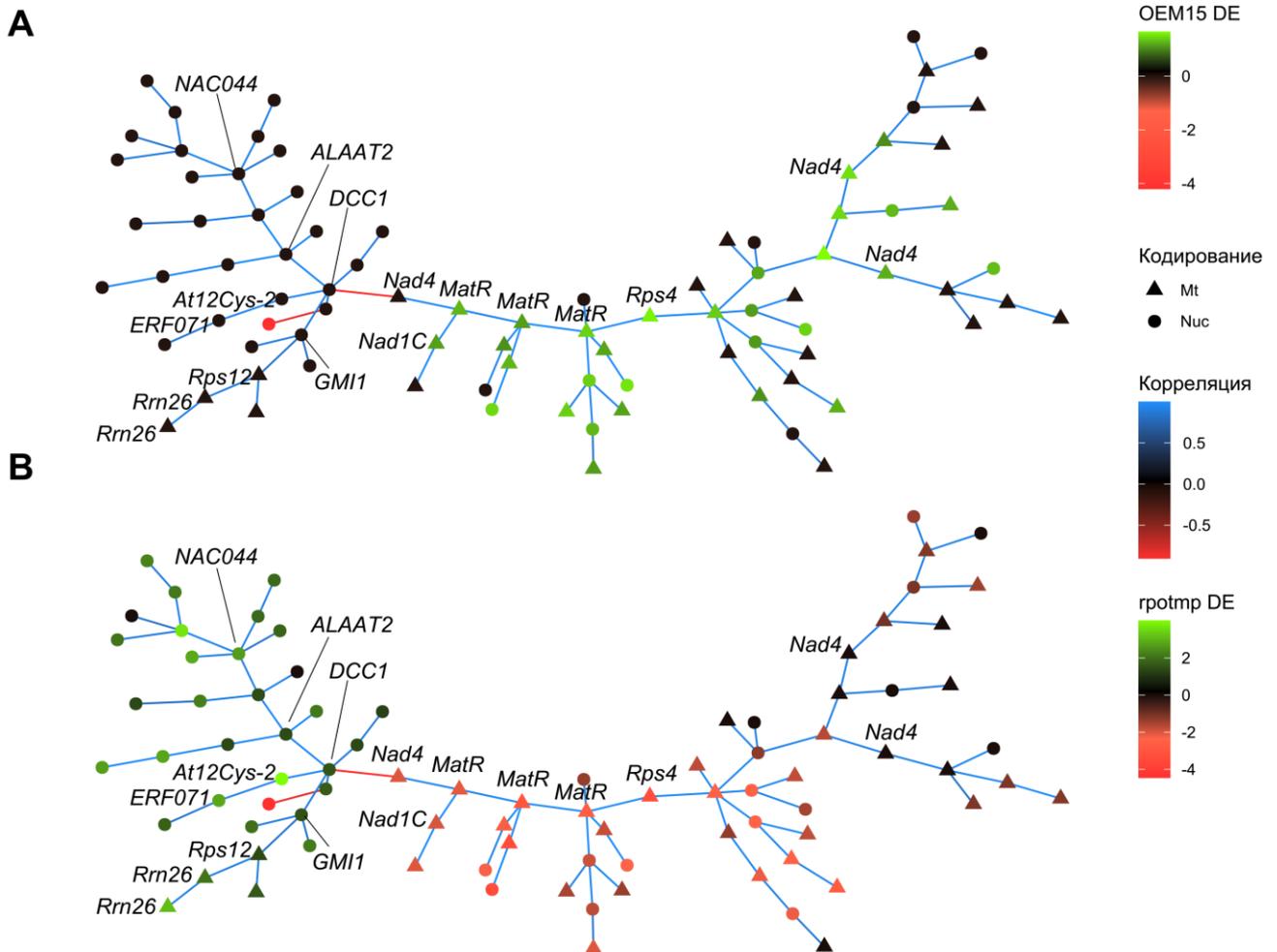


Рис. 30. Дифференциальная экспрессия генов суперкластера 36--43 у линий OEM15 и *rpotmp*.

Экспрессия некоторых генов кластеров 3 и 98 подавлялась исключительно у OEM15 (Рис. 29). *CLE18* (AT1G66173) – секретлируемый малый пептидный гормон, модулирующий программы роста и развития корней (Meng et al., 2012). *SUS4* (AT3G43190) – индуцируемая при гипоксии сахарозсинтаза, необходимая для выживания растения при стрессе (Santaniello et al., 2014). Белок семейства *G3H* (AT5G13360) – участник ауксинового ответа, экспрессия которого подавляется при ответе на ауксин (Kloth et al. 2016). *APX1* (AT1G07890) – аскорбатпероксидаза, которая аккумулируется при стрессе в ответ на АБК (Zandalinas et al. 2016), и экспрессия которой подавляется в присутствии параквата – индуктора фотооксидативного стресса (NCBI Gene). Играет ключевую роль в ответе на комбинацию различных стрессовых факторов (Koussevitzky et al. 2008). Возможно, ее подавление связано с измененной чувствительностью растений OEM15 к АБК. G-субъединица АТФ-синтазы (AT4G26210), по литературным данным, ко-регулируется с *Nad9*, *Cox1* и другими субъединицами комплекса V митохондриального кодирования (Leister et

al. 2011). Однако, в данном случае наблюдается пониженный уровень транскриптов *g*-субъединицы, при повышенном уровне митохондриальных транскриптов, предполагая отсутствие обратной регуляции. Также известно, что данная субъединица необходима для поддержания структуры крист за счет димеризации комплекса V (Boyle et al. 2001). Возможно, некоторое повышение эффективности работы митохондриальной ЭТЦ у OEM15 (за счет повышенного количества комплекса I) повлекло за собой снижение экспрессии данного гена. PUB12 (AT2G28830) – убиквитинлигаза, принимающая участие в деградации АБК (Kong et al. 2015), а также осуществляющая убиквитинирования BRI1 после рецепции БС (Zhou et al. 2018), что потенциально связывает последствия гиперэкспрессии RPO1mp в митохондриальной адресации с сигнальными путями АБК и БС.

*ERF027* (AT1G12630) скоррелирован с фактором редактирования транскрипта *Nad2* *MEF10* (AT3G11460), который является вероятной мишенью *ERF027* (PlantTFDB). Также данный фактор скоррелирован с *ATX4* (AT4G27910) – фактором эпигенетической регуляции, который изменяет степень метилирования тысяч локусов в ответ на АБК и засуху (Liu et al. 2018). Потенциально, снижение экспрессии всего кластера 98 может быть связано с подавлением экспрессии *ATX4*.

Большинство генов кластера 85 (данные не показаны) не принадлежали к ДЭГ исследуемых линий, однако в их составе были обнаружены 2 скоррелированных гена, экспрессия которых была повышена у OEM15 и OEP12 – *UMAMIT33* и *AtRbcX1*. *UMAMIT33* (AT4G28040) – транспортный белок, обеспечивающий импорт/экспорт аминокислот в апопластное пространство и играет важную роль в прорастании семян (Müller et al. 2015). *AtRbcX1* (AT4G04330) – фактор сборки РУБИСКО, локализованный в тилакоидах (Kolesiński et al. 2011), который принимает участие в ответе на водный дефицит, холодовой и солевой стресс (Zhou et al. 2013), что очень интересно, поскольку OEM15 и OEP12 имеют пониженную чувствительность к солевому стрессу (Gorbenko et al., 2024).

Группа генов кластера 90 (Рис. 29) имела повышенный уровень транскриптов у линии OEP12. *SAMTA1* (AT5G09410) – кальмодулин-связывающий транскрипционный активатор, который регулирует восстановление после засухи с помощью активации экспрессии ТФ семейства AP2 и АБК-ответа (Pandey et al. 2013). *SAMTA1* был положительно скоррелирован с *RLUA7* (AT3G52260) – псевдоуридинсинтазой, сильно индуцируемой АБК (Joseph et al. 2014). *THO6* (AT2G19430) – негативный регулятор ответа на АБК (Lee et al. 2010) – был скоррелирован через *CHIN4* (AT1G12390; грузовой рецептор ЭПР) с *ALNS* (AT5G58220) – участником пути ответа на БС и мишенью BRI1, которая способствует росту растения (Nam and Li, 2004). *ALNS* в свою очередь был скоррелирован с *GID1C* - рецептором гибберелловой кислоты (Voegelé et al. 2011).

### 3.1.11 Синтез комбинированных генных сетей

В результате анализа ко-экспрессии и корреляционных генных сетей были обнаружены гены, которые могут вносить вклад в различия гиперэкспрессоров от растений дикого типа. Однако, не смотря на фенотипическую и физиологическую близость OEM15 и OEP12, обнаруженные факторы в подавляющем большинстве случаев разные. Можно предположить, что регуляторной ступенью, непосредственно влияющей на такой фенотип растений, является не транскрипционная, а посттранскрипционная регуляция. Тогда, при наличии глобальной сети белок-белковых взаимодействий, становится возможным определение вероятных эффекторов этой регуляторной ступени – ими могут быть общие узлы в сетях белок-белковых взаимодействий ко-регулируемых генов. Некоторые узлы сетей могут оказаться транскрипционными факторами, поэтому с помощью БД PlantGSAD и PlantRegMap были определены ТФ и их мишени, из списка мишеней отфильтрованы только те, экспрессия которых является дифференциальной у линий OEM15 и OEP12. Пересечение двух полученных наборов мишеней, а также связи с ТФ, которые вероятно их контролируют, были добавлены к обеим сетям. Полученные комбинированные сети для линий OEM15 и OEP12 представлены на Рис. 31.

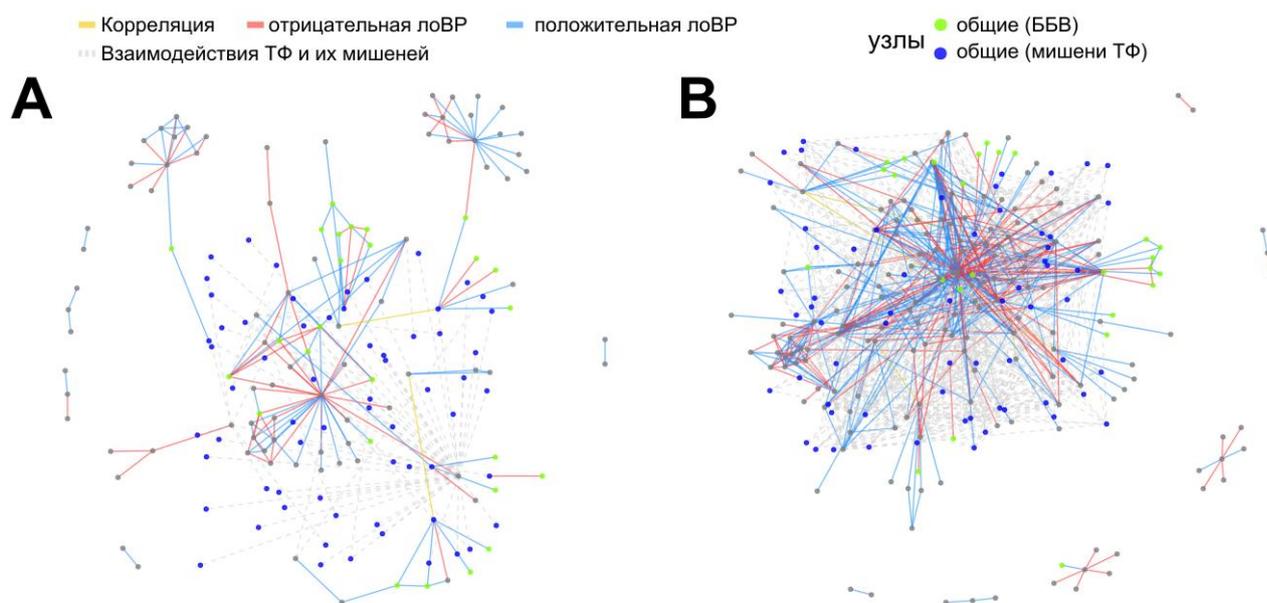


Рис. 31. Комбинированные сети для OEM15 (А) и OEP12 (В). Цветом отмечены совпадающие узлы: зеленым – узлы сети ББВ, непосредственно взаимодействующие с ДЭГ из МОД, общие для обеих линий, синим – мишени транскрипционных факторов, общие для обеих линий. лоВР – логит-оценка взаимного ранга, показатель ко-экспрессии. Корреляционные связи между узлами показаны желтым, отрицательная лоВР – красным, положительная лоВР – синим, связи ТФ-мишень серым пунктиром.

Обнаружено, что 26 узлов, с высокой достоверностью взаимодействующих с генами-узлами минимального остовного древа из числа ДЭГ OEM15 и OEP12, общие для обеих полученных сетей. Среди них были обнаружены 6 ТФ (TCP4, TCP7, TCP13, MYB56, NAC089, NAC001), протеинкиназа (KINbeta3), компонент brassиностероидного сигнального пути (BEE2),

2 белка семейства PP2C, сильно индуцируемых АБК (НАИ2, НАИ3), а также компонент ССК хлоропластов – LHCB5. Кроме того, сети содержали 64 общих дифференциально экспрессирующихся мишени различных транскрипционных факторов (Таблица 2 Приложения). Анализ избыточной представленности терминов GO не выявил. Наличие этих общих мишеней может говорить о том, что гиперэкспрессия RPO7mp, вызывая повышение уровней разных транскриптов, в разных органеллах, приводит к задействованию разных схем ретроградного сигналинга, которые приводят к активации (или репрессии) разных транскрипционных факторов, имеющих общие мишени. Таким образом, это позволяет получить частичный ответ на вопрос – почему гиперэкспрессия RPO7mp в митохондриальной или хлоропластной адресации вызывает сходные отличия от дикого типа. С другой стороны, транзитный пептид нативной RPO7mp – двусмысленный, то есть любой метод регуляции экспрессии этого фермента будет изменять его количество одновременно в митохондриях и в хлоропластах, подозревая что механизм его ретроградной регуляции из пластид или из митохондрий может также быть общим. В пользу данной гипотезы также говорит наличие в хлоропластах белков NIP1 и NIP2, которые индуцируются на свету и связывают RPO7mp с тилакоидной мембраной, таким образом инактивируя фермент (Azevedo et al., 2008), как дополнительная ступень регуляции внутри пластид.

### **3.2 Характеристика прорастания растений линий с гиперэкспрессией RPO7mp**

Ранее сотрудниками лаборатории было выявлено, что линии арабидопсиса с гиперэкспрессией RPO7mp в митохондриальной (ОЕМ) либо пластидной (ОЕР) адресации, имели пониженную чувствительность к репрессирующему действию повышенных концентраций сахарозы при прорастании семян, из чего было сделано предположение о возможном нарушении у растений-гиперэкспрессоров RPO7mp регуляции состояния покоя (Gorbenko et al., 2024). Для проверки данной гипотезы исследовали прорастание семян без световой стимуляции.

Семена исследуемых растительных линий высаживали на питательные среды и после стратификации помещали в условия нормального освещения или в темноту. На 6-е сутки от окончания стратификации подсчитывали процент проросших семян от числа высаженных. Проростки, выросшие в темноте, имели обычную для этиолированных проростков морфологию (сильно удлинённые бесхлорофилльные гипокотили, нераскрывшиеся семядоли). Результаты анализа всхожести в контрольных условиях и в темноте приведены на Рис. 32.

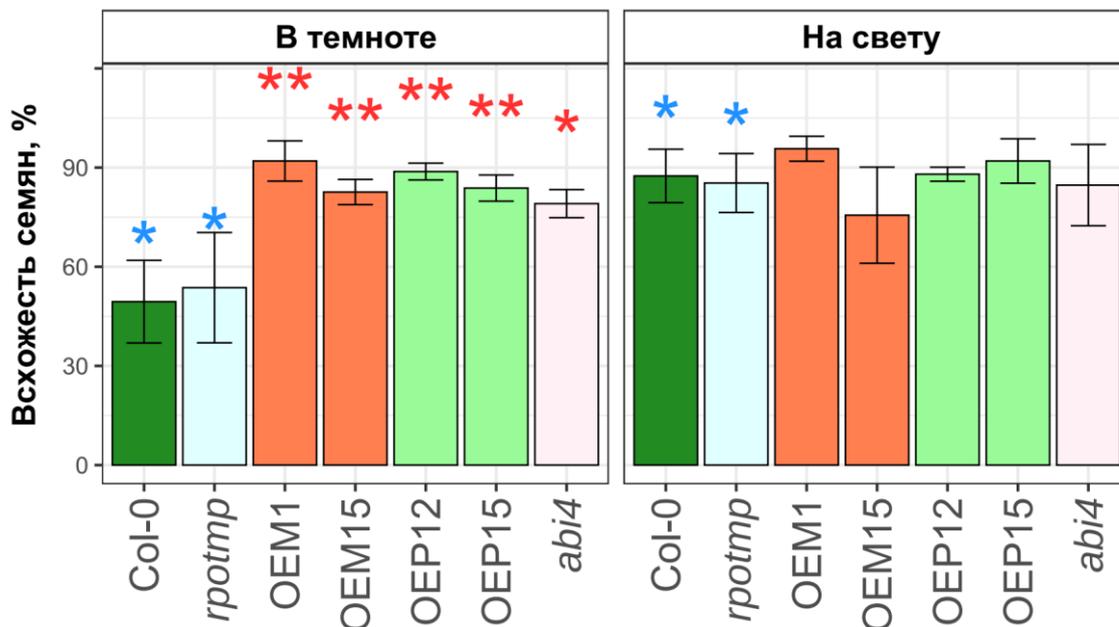


Рис. 32. Всхожесть семян арабидопсиса дикого типа Col-0, мутанта *rpotmp* и трансгенных линий с гиперэкспрессией RPOТmp в митохондриях (OEM1, OEM15) или хлоропластах (OEP12, OEP15) на свету и в темноте (Gorbenko et al., 2024). Значимость различий от растения дикого типа в тех же условиях показана красными звездочками, от растения той же линии в других условиях – синими: \* –  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,01$ .

Значимость различий между всхожестью отдельных линий растений на свету и в темноте оценивали по критерию Манна-Уитни-Вилкоксона: всхожесть линий OEM и OEP в темноте значимо отличалась от всхожести Col-0 ( $P < 0,05$ ), и была на уровне мутанта по гену *abi4*. В отличие от Col-0, всхожесть семян гиперэкспрессоров и линии *abi4* на свету и в темноте не различалась (Рис. 32).

Проращение без световой стимуляции у арабидопсиса представляет собой один из вариантов нарушения состояния покоя семян, которое зависит от баланса АБК и ГК. Нарушение состояния покоя возможно при изменении процессов, регулирующих данный баланс. У мутантных растений по гену *abi4*, известному положительному регулятору состояния покоя и репрессору катаболизма АБК, было снижено количество АБК и повышено количество ГК в сухих семенах, что приводило к более быстрому проращению в экспериментах без световой стимуляции (Shu et al., 2013). Гиперэкспрессия RPOТmp, вероятно, может приводить к нарушению глубины состояния покоя семян, возможно вследствие нарушения чувствительности к АБК. В пользу данной гипотезы также свидетельствует, что при экзогенном воздействии рядом фитогормонов уровни митохондриальных транскриптов повышались, вероятно, вследствие усиления экспрессии RPOТmp и RPOТm (Bychkov et al., 2023). Для проверки данной гипотезы мы провели эксперименты по изучению проращения семян линий-гиперэкспрессоров непосредственно в присутствии двух концентраций АБК.

Для проведения экспериментов использовали концентрации АБК 0,2 и 0,5 мкМ, подсчет

числа проросших семян проводили на 4 и 8 сутки после стратификации соответственно. Данные представлены на Рис. 33.

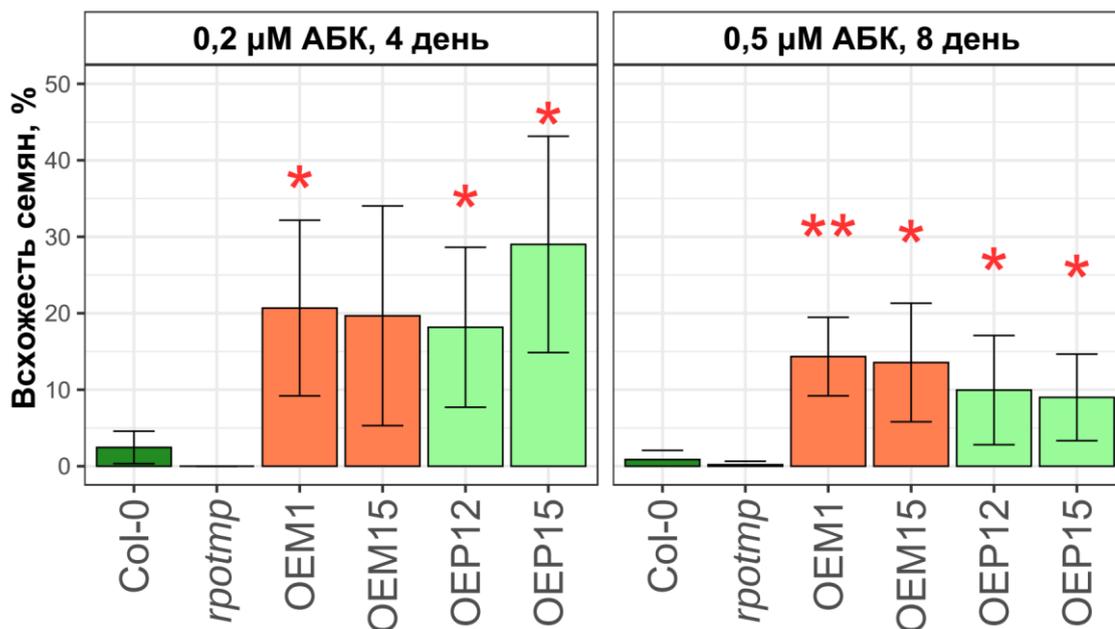


Рис. 33. Влияние АБК на всхожесть семян исследуемых линий (Gorbenko et al., 2024). Показаны различия от Col-0 (критерий Манна-Уитни-Вилкоксона): \* –  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,01$ . Эксперимент проводили в условиях фотопериода 16 ч свет / 8 ч темнота.

При концентрации АБК 0,2 мкМ на 4 день всхожесть всех семян гиперэкспрессоров, кроме OEM15, значимо ( $P < 0,05$ ) отличалась от всхожести семян дикого типа. Самый высокий процент всхожести имел пластидный гиперэкспрессор OEP15. При концентрации АБК 0,5 мкМ на 8 день после стратификации семена всех исследуемых гиперэкспрессоров проросли значительно лучше, чем семена растения дикого типа. Семена мутантного растения *rpotmp*, напротив, демонстрировали очень высокую чувствительность к экзогенной АБК и ко времени измерения проросшими обнаруживались не более 1 % семян.

Исследовали прорастание семян в условиях солевого стресса – на средах, содержащих 150 мМ NaCl. Результаты приведены на Рис. 34. Было обнаружено, что в условиях солевого стресса всхожесть семян линий гиперэкспрессоров снижалась в той же степени что и у семян дикого типа. Всхожесть семян *rpotmp* снижалась сильнее, и значимо (критерий Манна-Уитни-Вилкоксона,  $P < 0,05$ ) отличалась от растений дикого типа, что говорит о повышенной чувствительности мутанта к солевому стрессу (Gorbenko et al., 2024).

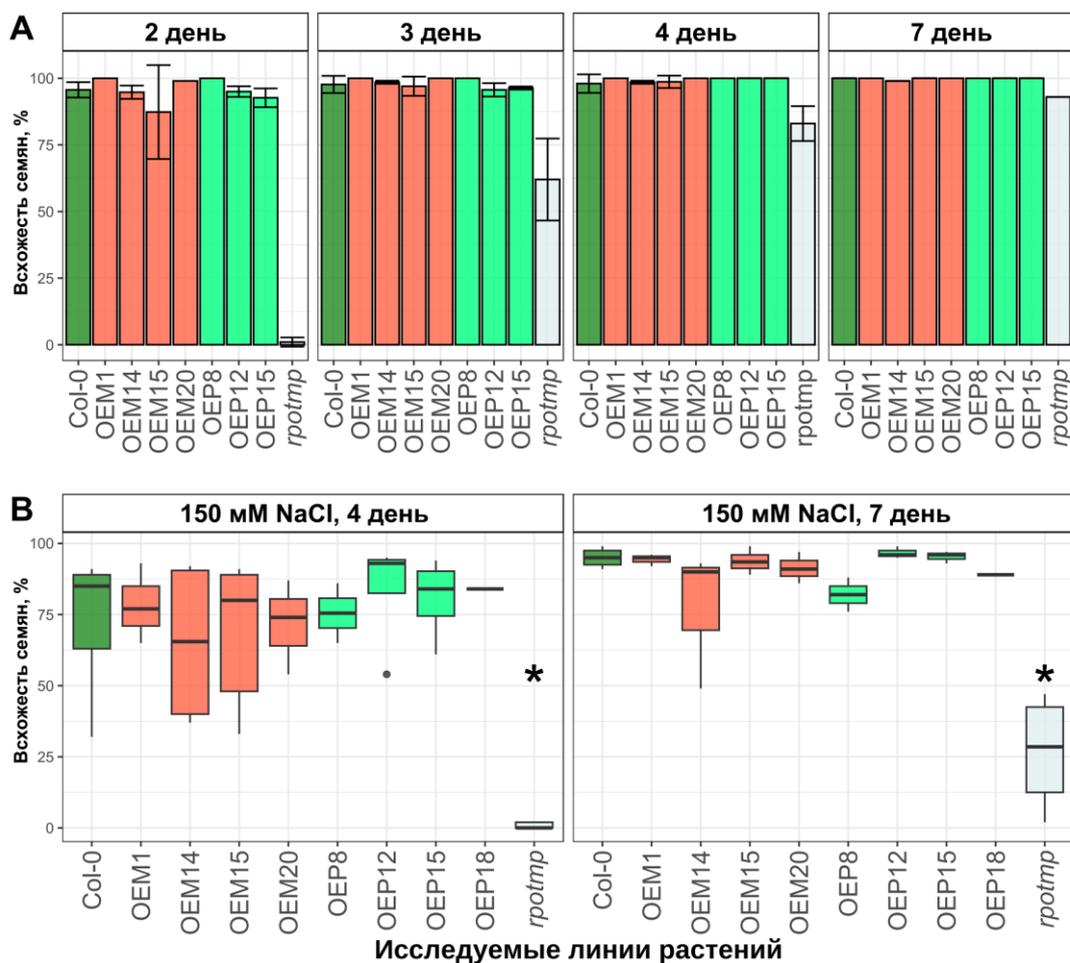


Рис. 34. Всхожесть семян исследуемых линий в контрольных условиях (А), и на средах, содержащих 150 мМ NaCl (В) (Gorbenko et al., 2024). Показаны различия от растения дикого типа Col-0: \* –  $P < 0,05$ . Эксперимент проводили в условиях фотопериода 16 ч свет / 8 ч темнота.

### 3.3 Изучение супрамолекулярной организации дыхательной цепи митохондрий и хлоропластов в линиях с гиперэкспрессией RPO<sub>Tmp</sub>

#### 3.3.1 Характеристика ЭТЦ митохондрий исследуемых линий методом голубого нативного электрофореза

Изолированные и очищенные митохондрии линий Col-0, *rpotmp* и OEM15 аликвотировали по 100 мкг и солюбилизировали с помощью дигитонина в соотношении 5 мг дигитонина на 1 мг белка, в объеме 30 мкл. Солюбилизиат исследовали с помощью голубого нативного электрофореза (BN-PAGE) в градиентном полиакриламидном геле (3,5-13% акриламида) по методике, описанной в работе Wittig et al. (2006). Электрофореграмма митохондриальных белков растения дикого типа Col-0 представлена на Рис. 35.

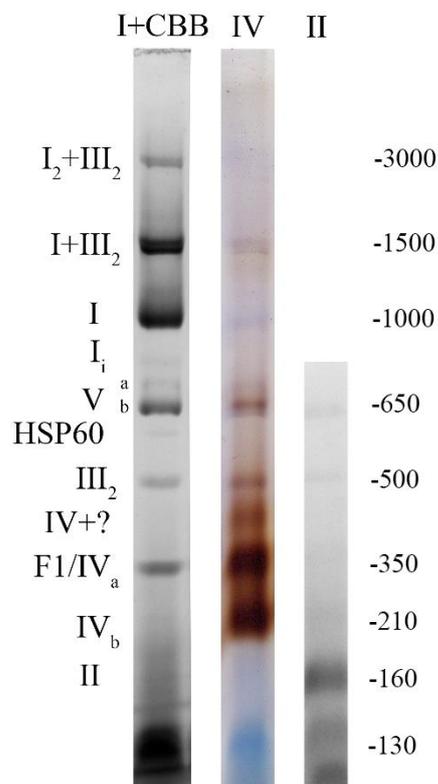


Рис. 35. Электрофореграмма BN-PAGE Col-0, окрашенная с помощью: I+CBV - гистохимического определения активности комплекса I с последующей окраской коллоидным кумасси; IV – гистохимического определения активности комплекса IV; II – гистохимического определения активности комплекса II.

При определении активности комплекса IV было обнаружено помимо IV<sub>a</sub> и IV<sub>b</sub> (форма комплекса с отсутствующей субъединицей COX6b) несколько дополнительных полос: 500 кДа – возможный димер IV<sub>2</sub>, комигрирующий с комплексом III<sub>2</sub>; 650 кДа – вероятно III<sub>2</sub>+IV, комигрирующий с комплексом V; слабая полоса в районе 1500 кДа – возможно I+III<sub>2</sub> имеет состав I+III<sub>2</sub>+IV, или с ним комигрировал суперкомплекс III<sub>x</sub>+IV<sub>y</sub>. Однако, иммунохимически присутствие комплекса IV (с антителом анти-COX6) в районе 1500 кДа подтверждено не было, предполагая, что данная полоса – неспецифическое окрашивание. Возможно, произошло некоторое окрашивание комплекса III, что упоминается в литературе (Mitsubishi et al., 2011). Стехиометрический состав суперкомплекса I<sub>2</sub>+III<sub>2</sub> с кажущейся массой около 3 МДа доподлинно неизвестен, так как информация в литературе несколько противоречива – на основании криоэлектронных микроскопических исследований крупных суперкомплексов митохондрий человека, быка и картофеля можно предполагать состав I<sub>2</sub>+III<sub>2</sub> (Jha et al., 2016; Bultema et al., 2009), на основании исследования *Pisum sativum* – I<sub>2</sub>+III<sub>4</sub> (Ukolova et al., 2020). Выяснение точного стехиометрического состава суперкомплексов выходит за рамки данной работы, однако на основании второй меры электрофореза (Рис. 38) и вестерн-блоттинга (Рис. 40) можно утверждать, что он содержит комплексы I и III и не содержит субъединиц других дыхательных комплексов.

Сравнение электрофореграмм BN-PAGE линий *rpotmp* и Col-0 представлено на Рис. 36. У линии мутанта *rpotmp* был обнаружен активный комплекс I в свободном виде, а также в составе суперкомплекса I+III<sub>2</sub>, однако количество его было сильно снижено. Также исследовали активность комплекса II – различий между *rpotmp* и Col-0 обнаружено не было.

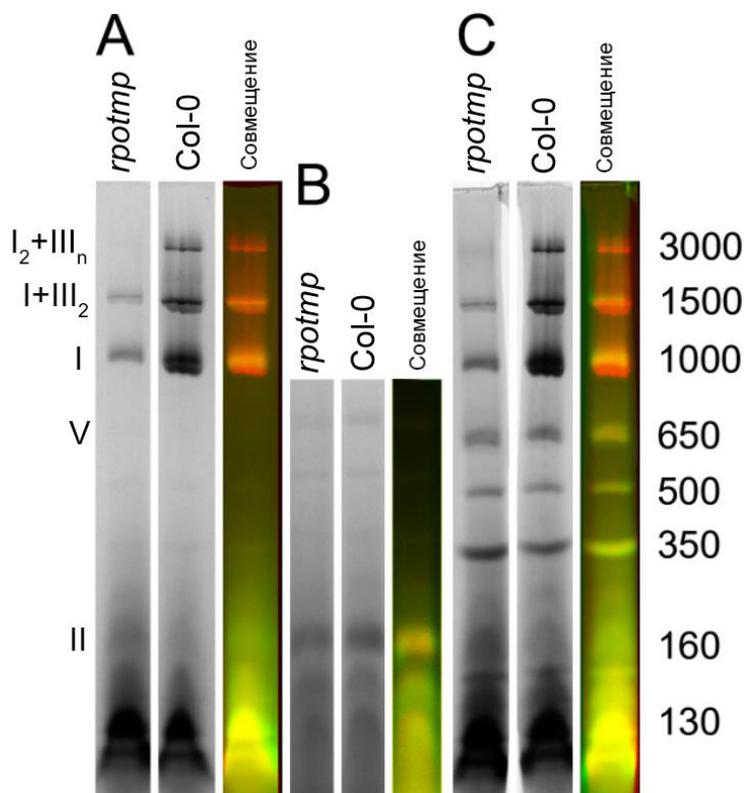


Рис. 36. Сравнение электрофореграмм BN-PAGE *rpotmp* и Col-0. А – окраска с помощью гистохимического определения активности комплекса I, В – окраска с помощью гистохимического определения комплекса II, С – окраска коллоидным кумасси после определения активности комплекса I. Третьей линией в каждой части рисунка расположены совмещения электрофореграмм, Col-0 в красном канале, *rpotmp* – в зеленом.

Сравнение электрофореграмм BN-PAGE линий Col-0 и митохондриального гиперэкспрессора OEM15 представлено на Рис. 37. Содержание суперкомплексов I+III<sub>2</sub> и I<sub>2</sub>+III<sub>2</sub> в линии OEM15 было несколько повышено. При измерении активности комплексов IV и II различия между линиями Col-0 и OEM15 обнаружено не было (данные не показаны).

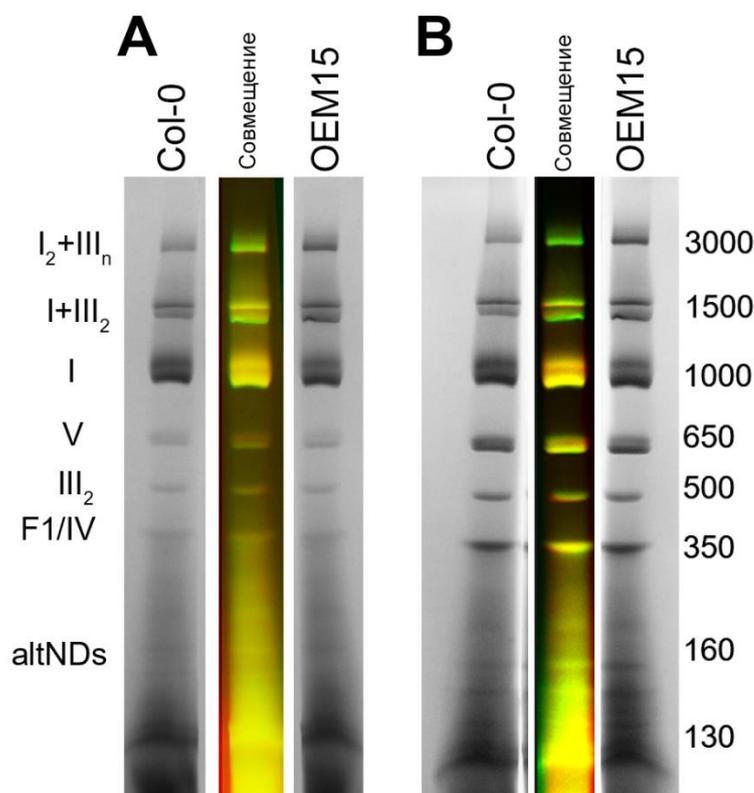


Рис. 37. Электрофореграммы BN-PAGE Col-0 и OEM15: А – гистохимическое определение активности комплекса I, В – окраска коллоидным кумасси после определения активности комплекса I (Gorbenko et al., 2024). По центру обеих частей рисунка показано совмещение электрофореграмм: Col-0 в красном канале, OEM15 – в зеленом.

### 3.3.2 Характеристика супрамолекулярной организаций ЭТЦ митохондрий исследуемых линий методом двумерного BN/SDS электрофореза

Для первой меры голубого нативного электрофореза использовали пробы по 300 мкг митохондриального белка, которые наносились на 3 дорожки градиентного геля (3,5-13% акриламид). После проведения первой меры электрофореза отделяли области от 1000 кДа и выше и использовали для второй меры в градиентном геле (10-20% акриламид) в денатурирующих условиях с SDS. Электрофореграмма двумерного электрофореза Col-0 и *rpotmp* представлена на Рис. 38. Количество белка субъединиц комплекса I у линии *rpotmp* существенно снижено, в то время как количество белка в пятнах с массой около 30 кДа (1000-1500 кДа в первом измерении), соответствующих вероятно компонентам прохибитинового комплекса (Klodmann et al., 2011), было сравнимо с таковым у Col-0. У *rpotmp* было обнаружено повышенное количество белка в пятнах с массами около 34 и 44 кДа (Рис. 38). Предположительно, данные белки являются компонентами пируватдегидрогеназного, или оксоглутаратдегидрогеназного комплексов, а их повышенное содержание в митохондриях *rpotmp* объясняется следующим: для эксперимента митохондрии нормируются по количеству белка; комплекс I, будучи самым крупным и основным компонентом суперкомплексов, вносит существенный вклад в общий уровень белка

митохондрий; снижение количества комплекса I в митохондриях приводит к увеличению доли белков матрикса в 1 мкг суммарного митохондриального белка.

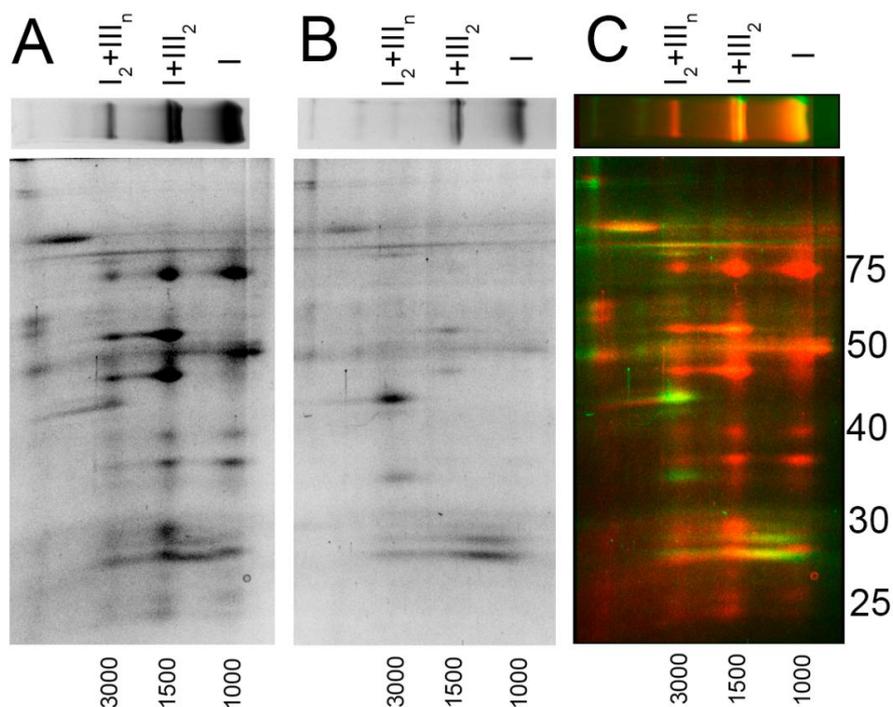


Рис. 38. Электрофореграммы 2D BN/SDS-PAGE суммарного митохондриального белка. А: Col-0; В: *rptmp*; С: наложение электрофореграмм (Col-0 – красный канал, *rptmp* - зеленый). Снизу указаны массы белков в первом измерении (BN-PAGE), справа – во втором измерении (BN/SDS-PAGE), кДа.

Электрофореграмма 2D BN/SDS-PAGE Col-0 и OEM7 представлена на Рис. 39. В данном эксперименте выявлено некоторое повышение количества субъединиц комплексов I и III в составе СК  $I+III_2$  (1500 кДа).

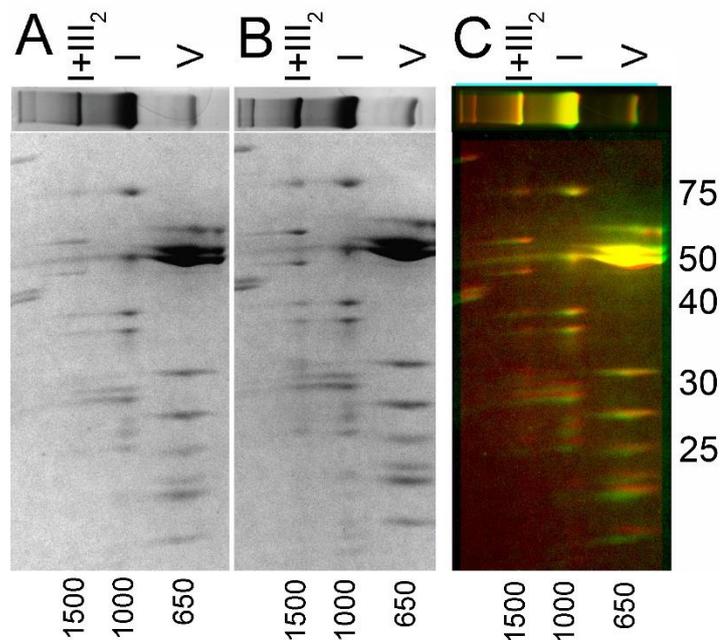


Рис. 39. Электрофореграммы 2D BN/SDS-PAGE. А: Col-0; В: OEM7; С: наложение электрофореграмм (Col-0 – зеленый канал, OEM7 – красный). Снизу указаны массы белков в первом измерении (BN-PAGE), справа – во втором измерении (BN/SDS-PAGE), кДа.

### 3.3.3 Характеристика состава суперкомплексов ЭТЦ митохондрий исследуемых линий методом иммуноблоттинга

С пробами по 300 мкг митохондриального белка проводили 2D BN/SDS-PAGE, переносили область суперкомплексов на нитроцеллюлозную мембрану и проводили иммуноблоттинг со специфическими антителами к субъединицам дыхательных комплексов I (анти-75 kDa, анти-Nad9), II (анти-SDH1-1), III (анти-CoB), IV (анти-COXX6) и V(анти-ATP3). Обработанный снимок мембраны, а также совмещение части мембраны с *rpotmp* с 2D BN/SDS-PAGE представлены на Рис. 40. Отмечено существенно меньшее количество белка 75 kDa у мутантной линии. Детекция субъединицы COB у линии Col-0 прошла успешно, и ее позиция соответствует суперкомплексам I+III<sub>2</sub> и I<sub>2</sub>+III<sub>2</sub>, однако у *rpotmp* она детектирована не была. Субъединица NAD9 также была детектирована только у линии Col-0.

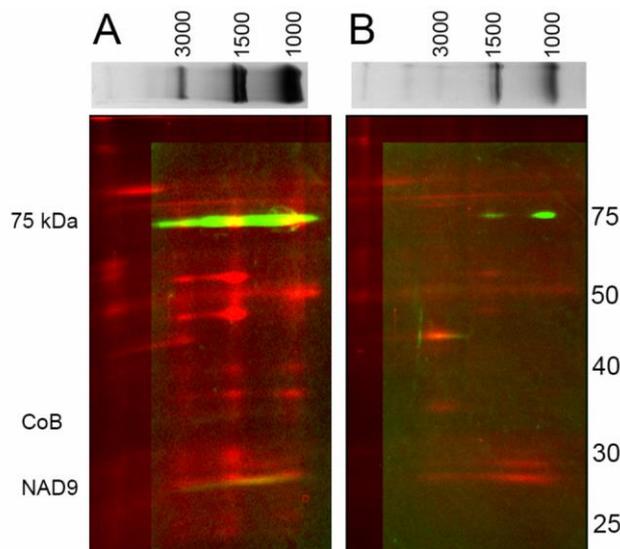


Рис. 40. Нитроцеллюлозная мембрана после иммуноблоттинга Col-0 (A) и *rpotmp* (B) в зеленом канале, совмещенная с электрофореграммами 2D BN/SDS-PAGE (Рис. 38) в красном канале. Массы белков указаны справа (кДа). Слева указаны соответствующие антитела. Сверху указаны массы белков в первом измерении (BN-PAGE), справа – во втором измерении (BN/SDS-PAGE), кДа.

Пробы, содержащие по 200 мкг митохондриального белка линий дикого типа Col-0 и митохондриального гиперэкспрессора OEM15, также были проанализированы методом 2D BN/SDS-PAGE с последующим иммуноблоттингом. Область суперкомплексов была перенесена на нитроцеллюлозную мембрану и подвергнута гибридизации со специфическими антителами к субъединицам дыхательных комплексов I (75 kDa, NAD9), III (COB, CYC1), IV (COXX6) и V (АТР3) (Рис. 41). Все использованные при обработке антитела, кроме COXX6, позволили провести детекцию соответствующих белков. Наблюдаемая разница в составе белковых пятен обусловлена разной степенью образования субкомплексов при проведении второй меры электрофореза. Отсутствие в области суперкомплексов антигена COXX6 позволяет предположить, что комплекс IV не входит в состав суперкомплексов Арабидопсиса, или они настолько слабо связаны, что разделяются еще при воздействии дигитонина во время первой меры электрофореза. Разницы в составе суперкомплексов Col-0 и OEM15 обнаружено не было.

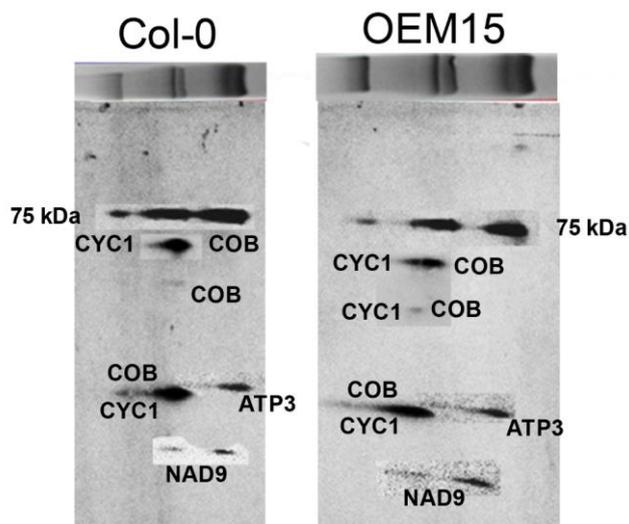


Рис. 41. Смонтированные фрагменты сканирований последовательных инкубаций мембран Col-0 и OEM15 с антителами к комплексам I (75 kDa, NAD9), III (COB, CYC1) и V (ATP3).

### 3.4 Характеристика белковых комплексов тилакоидов исследуемых растительных линий методом голубого нативного электрофореза

Супрамолекулярная организация белков тилакоидов была проанализирована с помощью голубого нативного электрофореза. Результаты представлены на Рис. 42. Никаких различий в организации белковых комплексов тилакоидов между растением дикого типа и плазмидными гиперэкспрессорами OEP8 и OEP12 обнаружено не было.

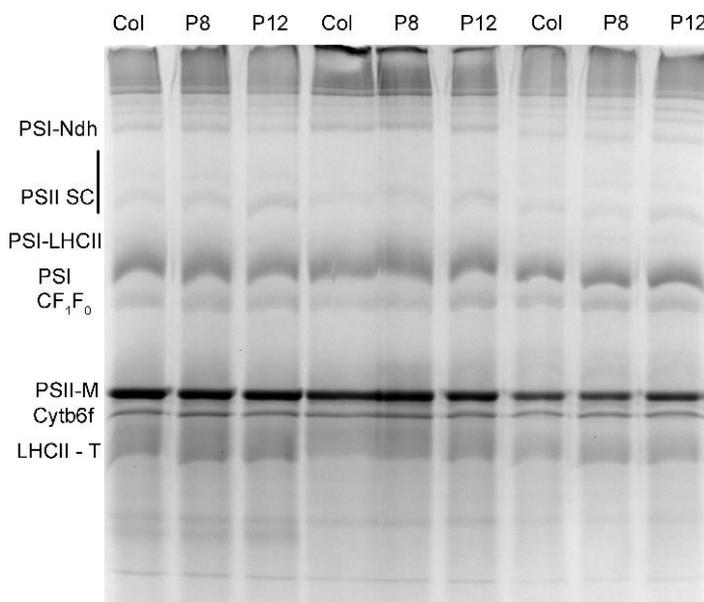


Рис. 42. Электрофореграмма BN-PAGE тилакоидов Col-0, OEP8, OEP12 в 3 биологических повторностях. LHCII – светособирающий комплекс II, Cytb6f – цитохром b6f, PSII-M – мономер фотосистемы II, CF1F0 – АТФ-синтаза, PSI – фотосистема I, PSII SC – суперкомплексы фотосистемы II, Ndh – NADH-дегидрогеназный комплекс хлоропластов.

### 3.5 Создание генетических конструкций

Трансформация митохондрий *in vivo* является одной из нерешенных на данный момент

задач. Одной из основных проблем трансформации митохондрий *in vivo* является отсутствие гена-репортера, позволяющего осуществлять селекцию трансформированных митохондрий. Использование мутанта по гену *rpotmp* в качестве селективного реципиента генетических конструкций, содержащих ген *RPOT2* дикого типа и целевой ген, может стать перспективным подходом для решения этой сложной задачи. Одним из первых этапов разработки этой проблемы является создание генетических конструкций, несущих чужеродный ген под управлением промотора из митогенома Арабидопсиса.

Конструкции создавали на основе плазмиды рСК-GFP-PRmt, содержащей ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) из медузы *Aequorea victoria* (Koulintchenko et al., 2003). ДНК плазмиды рСК-GFP-PRmt, в количестве 1 мкг, подвергали одновременной обработке эндонуклеазами рестрикции NcoI и EcoRI. Полученную ДНК разделяли электрофоретически в 1% агарозном геле и элюировали из геля фрагмент 5635 п.н., получая таким образом линейаризованную плазмиду с удаленным промотором рРНК 18S *S. tuberosum*.

Фрагменты промоторных последовательностей генов *Cox1* и *Rrn26* из митохондриального генома арабидопсиса получали методом ПЦР с использованием в качестве матрицы мтДНК арабидопсиса и праймеров к соответствующим участкам (Таблица 6). Полученные фрагменты были затем очищены с помощью набора GeneJET PCR Purification Kit и подвергнуты одновременной рестрикции с помощью ферментов NcoI и EcoRI. Рестрицированные фрагменты очищали с помощью элюции из агарозного геля.

Для лигирования использовали ДНК линейаризованной плазмиды и ДНК промоторов в молярном соотношении 1:3. Полученные продукты лигирования использовали для трансформации штамма *E. coli* DH5 $\alpha$ . Трансформанты выращивали на чашках Петри со средой LBA. С каждой чашки были отобраны и пересажены по 30 колоний трансформантов, которые затем были подвергнуты скринингу с помощью ПЦР с праймерами к промоторным участкам, встроенным в плазмиду рСК-GFP-PRMT. Для дальнейшей работы были отобраны и пересажены по 4 колонии, для которых в результате ПЦР прошла самая эффективная амплификация. Отобранные колонии были высаживали в ночные культуры и затем выделяли плазмидную ДНК, которую исследовали с помощью рестриционного анализа, ПЦР, секвенирования и электрофоретически.

Рестрикцию полученных конструкций проводили последовательно по сайту EcoRI, затем по сайтам NcoI и BamHI. В результате рестрикции по сайту EcoRI были получены линейаризованные ДНК: размер линейаризованных конструкций превышал размер линейаризованной плазмиды рСК-GFP-PRmt, как и предполагалось теоретически, поскольку удаленный фрагмент промоторного участка гена *Rrn18* из *S. tuberosum* имел размер в 140 п.н., встроенные последовательности промоторных участков *Pcox1* и *Prrn26* – размер в 450 п.н.

При обработке плДНК EcoRI и NcoI образовалось 2 фрагмента, размером ~7000 п.н. и ~500 п.н., доказывая, что фрагмент, содержащий промоторный участок, был успешно вырезан. При обработке плДНК EcoRI и BamHI были получены 2 фрагмента ~6000 п.н. и ~1100 п.н., что соответствует успешному вырезанию участка промотора и гена *GFP*.

ПЦР-анализ проводили с использованием прямых праймеров к промоторным областям и двух обратных праймеров к *GFP* (164 нт и 619 нт от сайта начала транскрипции). Продуктами реакций являлись 2 вида фрагментов – промотор + 164 нт *GFP* (614 п.н.) и промотор + 619 нт *GFP* (1069 п.н.). Также производили ПЦР-анализ с использованием пары праймеров к фрагментам плазмиды S3 (X13704.1) из *Z. mays*, с помощью чего было показано что фрагменты кукурузной S3 в полученных конструкциях были сохранены, а совпадение длин полученных фрагментов с предполагаемыми (2943 п.н. для рСК-Рсох1 и рСК-Prm26) говорит об успешном введении вставок промоторных последовательностей в пределах двух фрагментов S3, разделенных геном *GFP*.

С целью амплификации полных последовательностей вставок из полученных конструкций были поставлены реакции ПЦР с универсальными праймерами M13, в результате чего было выяснено, что конструкция рСК-GFP-PRMT вследствие многолетнего использования и клонирования накопила значительное количество нуклеотидных замен – из-за чего был нарушен отжиг праймера M13-R (определено с помощью использования разных комбинаций прямых и обратных праймеров). Вследствие этого было принято решение клонировать полную вставку (содержащую 2 участка плазмиды S3 *Z. mays*, разделенных геном *GFP* под управлением *Prm26/Рсох1*) в составе плазмиды рBlueScript KS (+). Для этого была проведена многократная амплификация с использованием праймеров M13. Продукты были очищены, сконцентрированы, подвергнуты рестрикции с использованием ферментов XbaI и XhoI и клонированы в составе рBlueScript (операции по тестированию полученных конструкций были аналогичны вышеописанным для конструкций рСК-GFP-PRMT). Схемы полученных конструкций представлены на Рис. 43.

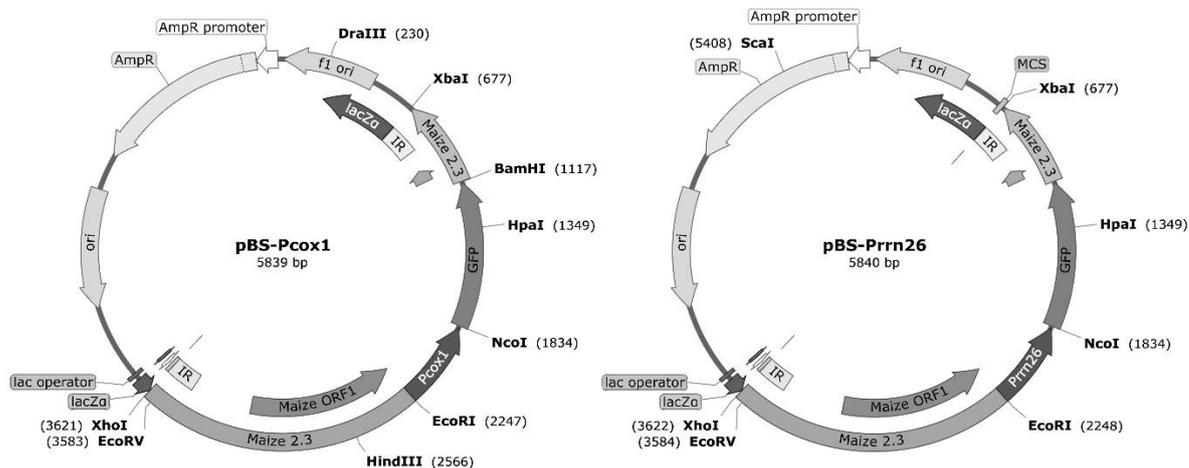


Рис. 43. Схемы полученных на основе плазмиды pBlueScript генетических конструкций pBS-Pcox1 и pBS-Prrn26.

В результате секвенирования участков промоторных областей, интегрированных в генетические конструкции, было выяснено, что вставка *Pcox1* идентична участку промотора из мтДНК Арабидопсиса Col-0 (NC\_037304.1) на 100%, *Prrn26* – на 99%. Несовпадения последовательности вставки и промотора *Prrn26* не затрагивают важные для эффективности транскрипции позиции (Рис. 44).

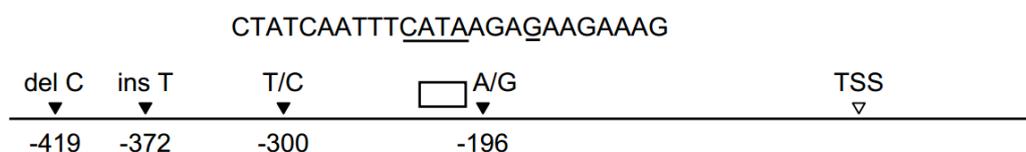


Рис. 44. Позиции инсерций, делеций и замен, обнаруженных в последовательности *Prrn26*, интегрированной в плазмиду pBlueScript. Ins – инсерция, del – делеция, T/C и A/G – замены, TSS – позиция старта транскрипции, белым прямоугольником обозначен промоторный мотив, последовательность которого указана выше (ключевые нуклеотиды подчеркнуты). Позиции инсерций, делеций и замен указаны относительно сайта старта транскрипции.

Сотрудниками лаборатории были поставлены эксперименты по импорту фрагментов конструкций, содержащих ген *GFP* под управлением промоторов *Prrn26* и *Pcox1* и фланкированных тРНК-Trp из плазмиды S3, в изолированные митохондрии арабидопсиса и экспрессии гена *GFP in organello*, в результате которых было выяснено что в изолированных митохондриях происходит транскрипция гена *GFP*, причем интенсивность транскрипции под управлением промоторов была значимо выше уровня неспецифической транскрипции гена *GFP* (без промотора), а уровень транскриптов *Prrn26-GFP* значительно выше, чем *Pcox1-GFP* (Tarasenko et al., 2023), что согласуется с литературными данными об активности этих промоторов. Личный вклад автора в данной работе заключался в осуществлении всех описанных экспериментов по созданию генетических конструкций.

Дальнейшая работа предполагает получение растений с митохондриями,

трансформированными с помощью системы импорта ДНК методом трансфекции протопластов. Планируется трансфекция протопластов линии мутанта *rpotmp* конструкциями, содержащими чужеродный ген, а также ген *RPOTmp* под управлением промотора *Prm26* и фланкированных тРНК-Тгр из линейной плазмиды S3, с последующей регенерацией растений из культуры. Ген RPOTmp в таком случае будет выступать в роли репортерного гена, обеспечивая более высокую живучесть трансформированных протопластов в культуре, которые должны подавлять нетрансформированные протопласты мутанта.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате анализа транскриптома линий *Arabidopsis thaliana* с измененной экспрессией RPO<sub>Tmp</sub> были определены гены с дифференциальной экспрессией относительно растений дикого типа. Эти гены были проанализированы методами анализа избыточной представленности и обогащения наборов генов с использованием терминов GO и метаболических путей KEGG.

Транскриптомные данные были суммированы и составлены предположительные схемы событий, повлекших те или иные физиологические проявления на уровне целого растения. Схема событий для растений-гиперэкспрессоров представлена на Рис. 45.

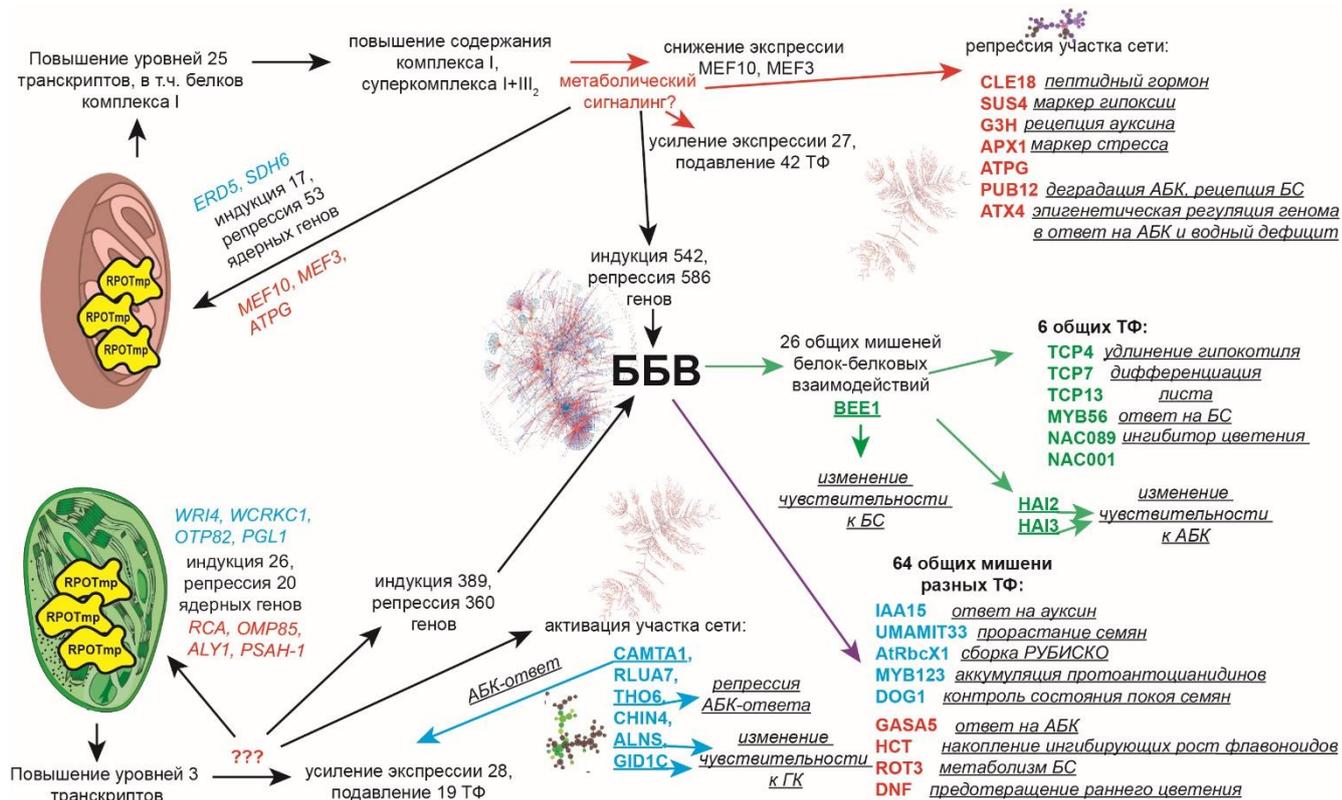


Рис. 45. Схема клеточных событий, которые происходят в ответ на изменение количества активной RPO<sub>Tmp</sub> в хлоропластах и митохондриях. Синим цветом обозначены гены с усиливающейся экспрессией, красным – с подавляющейся, зеленым – гены, дифференциальная экспрессия которых не учитывалась.

При митохондриальной гиперэкспрессии RPO<sub>Tmp</sub> происходит повышение уровней ряда митохондриальных транскриптов, что приводит к некоторому повышению количества активного комплекса I в виде суперкомплекса I+III<sub>2</sub>. В ядро поступает сигнал о повышенной эффективности работы комплекса I, что ведет к подавлению экспрессии MEF10 и MEF3 (факторов редактирования РНК белков комплекса I), а также ATPG – субъединицы комплекса V, необходимой для его димеризации, которая приводит к стабилизации изгибов мембраны крист. Возможно, подавление MEF3 и MEF10 оказало эффект, поскольку по последним данным, частично отредактированные транскрипты транслируются в митохондриях – и это одна из ступеней

регуляции активности комплексов (Plachard et al., 2018). Произошла репрессия участка сети скоррелированной экспрессии, причем, судя по полученным данным, эта группа генов действительно ко-регулируется, о чем в литературе данные отсутствуют. Самым значимым звеном этого участка сети является АТХ4, который производит модификацию хроматина в ответ на АБК, модулируя экспрессию тысяч генов. Его подавление без сомнения должно влиять на чувствительность к АБК.

При гиперэкспрессии RPO7mp в пластидной адресации происходит повышение уровней пластидных транскриптов – *AccD*, *ClpP*, *RpoB*. В ответ произошла активация участка регуляторной сети, среди которых были САМТА1 и ТНО6 – участвующие в ответе на АБК, ALNS и GID1C – участвующие в ответе на ГК.

Гиперэкспрессия RPO7mp в митохондриальной или пластидной адресации приводит к изменению экспрессии сотен генов, для многих из которых известны белок-белковые взаимодействия. С помощью анализа сетей ББВ обнаружено, что имеется 26 общих мишеней непосредственных ББВ для OEM15 и OEP12. Среди них: ВЕЕ1 – участник ответа на БС, 6 ТФ – участвующих в удлинении гипокотилия, дифференциации листа, цветении, и гены НАИ2 и НАИ3 – участники ответа на АБК. Помимо этого, в сети ББВ участвует большое количество транскрипционных факторов, многие из которых при этом активируются, или ингибируются. Анализ мишеней этих факторов показал, что у групп ТФ OEM15 и OEP12 имеется 64 общих мишени с дифференциальной экспрессией (одинаковой и для OEM15 и для OEP12), влияющие на ауксиновый ответ, прорастание семян, ответ на АБК и метаболизм БС. Особенно интересно подавление у обеих линий гиперэкспрессоров экспрессии фермента *HCT*, ответственного за синтез флавоноидов, замедляющих рост растения. В целом, полученный результат позволяет судить о том, что комбинация транскриптомных, эпигенетических изменений и белок-белковых взаимодействий с участием разных генов и факторов, приводит у гиперэкспрессоров к похожему фенотипу, который характеризуется сниженной чувствительностью к экзогенной АБК и ускоренным ростом.

Исследованы транскриптомные изменения и белковый профиль митохондрий мутанта *rpotmp* (Рис. 46). Отсутствие RPO7mp в митохондриях приводит к снижению уровней транскриптов субъединиц комплексов I и IV, что приводит к снижению количества этих комплексов. В результате индуцируемого дисбаланса ЭТЦ, в митохондриях происходит запуск механизмов ретроградного сигналинга – как неспецифического стрессового, так и специфического. Обнаружено, что уровни транскриптов мтДНК, подавляемых у *rpotmp*, приводят к активации ко-регулируемой группы генов (Рис. 29 – кластер 36--43, Рис. 30А), которая включает в себя *DCC1*, регулирующий активность комплекса I, фермент гликолиза *ALAAT2*, ингибитор роста корней *ABCG30*, митохондриальную и пластидную протеазу *LON4*,

кандидатный трансдуктор сигнала дефицита митохондрий по комплекса I – *At12Cys-2*, а также альтернативную NADH-дегидрогеназу *NDB3*, которая частично компенсирует дефицит по комплексу I. В результате стресс-реакции у мутанта *rpotmp* происходит увеличение копийности митохондриального генома, что увеличивает уровни транскриптов *Rps2*, *Nad1*, *Nad3*, *Rrn26*. Механизмы данной стресс-реакции по-видимому включают в себя активацию экспрессии генов ответа на водный дефицит (*GSTF6*, *ABR*), на АБК (*TSPO*), на ГК (*BT4*) и метаболизма глутатиона (*GSTU1*), и репрессию генов синтеза КС (*TBL18*), эмбриогенеза (*FLA14*), развития цветка (*BBX32*), передачи сигнала стрессового ответа (*MKK9*).

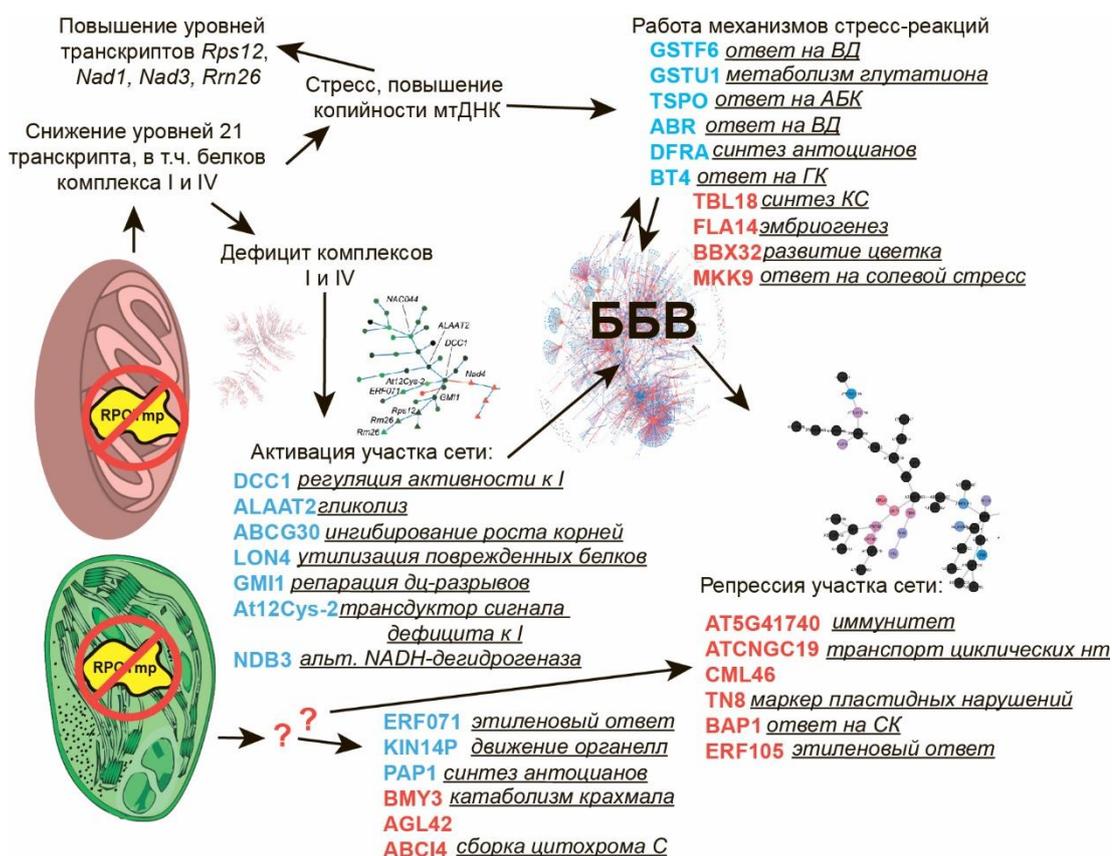


Рис. 46. Схема клеточных событий, вызывающих фенотип мутанта *rpotmp*. Синим цветом обозначены гены с усиливающейся экспрессией, красным – с подавляющейся.

Согласно полученным данным, отсутствие *RPOmp* в пластидах приводило к усилению экспрессии *ERF071* (этиленовый ответ) и *PAP1* (синтез антоцианов), репрессии *VMY3* (катаболизм крахмала) и *ABC14* (сборка цитохрома C). Однако нужно отметить, что данное утверждение является спорным – изменений уровней транскриптов хпДНК при этом не происходит, поэтому не ясно, как именно происходит рецепция и передача сигнала отсутствия *RPOmp* в пластидах. Одной из возможностей является недостаточная комплементация функций *RPOmp* в линии *Tmp-M3* (которая наряду с *rpotmp* использовалась для выявления генов ответа на недостаток *RPOmp* в пластидах). А учитывая двусмысленность транзитного пептида *RPOmp* и как следствие его одновременную регуляцию в обоих компартментах, разделение

ретроградного ответа на составляющие представляет сложную задачу, требующую дальнейших исследований. Тем не менее, один из участков регуляторной сети, содержащий TN8 (маркерный ген пластидных нарушений) был репрессирован, подразумевая участие пластид в его контроле.

В целом, обнаруженные транскриптомные изменения и взаимосвязи хорошо согласуются с данными, полученными при проведении физиологических тестов и анализе организации ЭТЦ митохондрий исследуемых линий.

Среди нерешенных на данный момент проблем в вопросе генетической трансформации митохондрий существуют проблемы отсутствие подходящего вектора и репортерного гена. Характеристика *RPOТmp*, полученная в настоящей работе, говорит в пользу того, что *RPOТmp* потенциально является хорошим репортерным геном для этой задачи (Gorbenko et al., 2024). Вектором могут служить конструкции на основе линейной плазмиды S3 кукурузы, т.к. они хорошо импортируются в митохондрии (Ibrahim et al., 2011). В ходе работы были созданы генетические конструкции *pBS-Pcox1* и *pBS-Prrn26*, содержащие ген *GFP* под управлением промоторов митохондриальных генов *Cox1* и *Rrn26* соответственно. Конструкции были использованы в экспериментах по импорту ДНК в митохондрии Арабидопсиса и экспрессии гена *GFP in organello*, в результате чего выяснено, что в изолированных митохондриях происходит транскрипция *GFP* с интенсивностью значительно выше уровня неспецифической транскрипции, а уровень транскриптов *GFP* под управлением *Prrn26* (*RPOТm*-зависимый) выше, чем для транскрипта под управлением *Pcox1* (*RPOТmp*-зависимый) (Tarasenko et al., 2023). Таким образом, система, состоящая из вектора на основе плазмиды S3 кукурузы, содержащая ген *RPOТmp* под управлением промотора *Prrn26* (*RPOТm*-зависимый) потенциально позволяет провести трансформацию митохондрий *rpotmp* методом трансфекции протопластов.

## ВЫВОДЫ

Исследование роли RPO<sub>Tmp</sub> в экспрессии органелльных белков с использованием линий с измененной экспрессией данной РНК-полимеразы: (i) мутантной линии *rpotmp*, у которой отсутствует функциональная RPO<sub>Tmp</sub>; (ii) линий с комплементацией функций RPO<sub>Tmp</sub> в митохондриях (линии Tmp-M) и хлоропластах (линии Tmp-P), и (iii) линий с гиперэкспрессией RPO<sub>Tmp</sub> в митохондриях (OEM15) и хлоропластах (OEP12) позволяет сделать следующие основные выводы:

1. РНК-полимераза RPO<sub>Tmp</sub> *in vivo* производит транскрипцию 15 митохондриальных генов (*Orf109*, *Orf153A*, *Orf106D*, *Orf164*, *Orf143*, *Orf100C*, *Orf157*, *Orf187*, *Orf184*, *Orf120*, *Orf240A*, *Orf145C*, *Orf204*, *Orf101A*, *Orf102B*) и 3 пластидных (*AccD*, *ClpP*, *RpoB*), в дополнение к известным RPO<sub>Tmp</sub>-зависимым генам.

2. Гиперэкспрессия гена RPO<sub>Tmp</sub> в *Arabidopsis thaliana* в мт-адресации приводит к повышенному содержанию комплекса I в митохондриях в форме суперкомплекса I+III<sub>2</sub>.

3. Гиперэкспрессия RPO<sub>Tmp</sub> в митохондриальной или пластидной адресации приводит к запуску разных ансамблей регуляторных программ и транскрипционных факторов, которые тем не менее через белок-белковые взаимодействия и модуляцию экспрессии, затрагивают одинаковые (или одинакового эффекта) регуляторные элементы, приводящие к ускорению выхода семян из состояния покоя (*DOG1*, *UMAMIT33*), модуляциям в рецепции или метаболизме фитогормонов: АБК (*PUB12*, *ATX4*, *SAMTA1*, *THO6*, *GASA5*, *HAI2*, *HAI3*), ГК (*ALNS*, *GID1C*), БС (*BEE1*, *PUB12*, *MYB56*, *ROT3*) и ауксинов (*G3H*, *IAA15*), к ускорению роста растений (*HCT*, группа факторов *TCP*), и к раннему цветению (*DNF*, *NAC089*).

4. Гены мутантной линии *rpotmp*, экспрессия которых изменяется вследствие ретроградного ответа на недостаток RPO<sub>Tmp</sub> в митохондриях, находятся под контролем группы ТФ семейства NAC.

5. Отсутствие функциональной RPO<sub>Tmp</sub> приводит к развитию стрессового состояния, проявляющегося в повышении чувствительности к АБК (*MKK9*, *GSTF6*, *ABR*) и солевому стрессу (*TSPO*), модуляциям метаболизма и рецепции фитогормонов (*TSPO*, *BT4*, *VAP1*).

6. Созданы генетические конструкции pBS-P<sub>cox1</sub> и pBS-P<sub>rnm26</sub>, содержащие ген *GFP* под управлением промоторов митохондриальных генов *Cox1* и *Rrn26* соответственно, и произведен их успешный импорт в изолированные митохондрии *Arabidopsis thaliana*. Показана транскрипция *GFP* в митохондриях *in organello* под управлением промоторов P<sub>cox1</sub> и P<sub>rnm26</sub> с импортированной ДНК, причем уровень транскрипта *GFP* зависит от промотора и коррелирует с уровнями транскриптов *Cox1* и *Rrn26*, соответственно.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Acin-Perez R. The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model / R. Acin-Perez, J. A. Enriquez. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2014. – V. 1837, N 4. – P. 444-450.
2. Acín-Pérez R. Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes / R. Acín-Pérez, P. Fernández-Silva, M. L. Peleato [et al.] // *Molecular Cell*. – 2008. – V. 32, N 4. – P. 529-539.
3. Allorent G. Plastid gene expression during chloroplast differentiation and dedifferentiation into non-photosynthetic plastids during seed formation / G. Allorent, F. Courtois, F. Chevalier [et al.] // *Plant Molecular Biology*. – 2013. – V. 82, N 1. – P. 59-70.
4. Alverson A. J. Origins and Recombination of the Bacterial-Sized Multichromosomal Mitochondrial Genome of Cucumber / A. J. Alverson, D. W. Rice, S. Dickinson [et al.] // *The Plant Cell*. – 2011. – V. 23, N 7. – P. 2499-2513.
5. Amirsadeghi S. The role of the mitochondrion in plant responses to biotic stress / S. Amirsadeghi, C. A. Robson, G. C. Vanlerberghe. // *Physiologia Plantarum*. – 2007. – V. 129, N 1. – P. 253-266.
6. Andersson M. X. Chloroplast Membrane Lipid Biosynthesis and Transport / M. X. Andersson, Dörmann P. // *The Chloroplast: Interactions with the Environment* / Sandelius A. S., Aronsson H. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. – P. 125-158.
7. Ankele E. In Vivo Visualization of Mg-ProtoporphyrinIX, a Coordinator of Photosynthetic Gene Expression in the Nucleus and the Chloroplast / E. Ankele, P. Kindgren, E. Pesquet [et al.] // *The Plant Cell*. – 2007. – V. 19, N 6. – P. 1964-1979.
8. Arnold I. Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits / I. Arnold, K. Pfeiffer, W. Neupert [et al.] // *Embo j*. – 1998. – V. 17, N 24. – P. 7170-8.
9. Arnon D. I. COPPER ENZYMES IN ISOLATED CHLOROPLASTS. POLYPHENOLOXIDASE IN BETA VULGARIS / D. I. Arnon // *Plant Physiol*. – 1949. – V. 24, N 1. – P. 1-15.
10. Azevedo J. Sub-plastidial localization of two different phage-type RNA polymerases in spinach chloroplasts / J. Azevedo, F. Courtois, S. Lerbs-Mache. // *Nucleic Acids Res*. – 2006. – V. 34, N 2. – P. 436-44.
11. Baba K. Organellar gene transcription and early seedling development are affected in the *rpoT;2* mutant of *Arabidopsis* / K. Baba, J. Schmidt, A. Espinosa-Ruiz [et al.] // *Plant J*. – 2004. – V. 38, N 1. – P. 38-48.
12. Backert S. High content, size and distribution of single-stranded DNA in the mitochondria

- of *Chenopodium album* (L.) / S. Backert, R. Lurz, O. A. Oyarzabal [et al.] // *Plant Molecular Biology*. – 1997. – V. 33, N 6. – P. 1037-1050.
13. Baginsky S. Transcription factor phosphorylation by a protein kinase associated with chloroplast RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba*) / S. Baginsky, K. Tiller, G. Link. // *Plant Mol Biol*. – 1997. – V. 34, N 2. – P. 181-9.
  14. Baradaran R. Crystal structure of the entire respiratory complex I / R. Baradaran, J. M. Berrisford, G. S. Minhas [et al.] // *Nature*. – 2013. – V. 494, N 7438. – P. 443-448.
  15. Barreto P. Mitochondrial retrograde signaling through UCP1-mediated inhibition of the plant oxygen-sensing pathway / P. Barreto, C. Dambire, G. Sharma [et al.] // *Current Biology*. – 2022.
  16. Barreto P. Overexpression of mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1) induces a hypoxic response in *Nicotiana tabacum* leaves / P. Barreto, V. Okura, I. A. Pena [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2015. – V. 67, N 1. – P. 301-313.
  17. Barreto P. Mitochondrial Uncoupling Protein 1 Overexpression Increases Yield in *Nicotiana tabacum* under Drought Stress by Improving Source and Sink Metabolism / P. Barreto, J. E. C. T. Yassitepe, Z. A. Wilson [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2017. – V. 8, N 1. – P. e01836.
  18. Barrientos A. I Function, Therefore I Am: Overcoming Skepticism about Mitochondrial Supercomplexes / A. Barrientos, C. Ugalde. // *Cell Metabolism*. – 2013. – V. 18, N 2. – P. 147-149.
  19. Bartoli C. G. Ascorbate Biosynthesis in Mitochondria Is Linked to the Electron Transport Chain between Complexes III and IV / C. G. Bartoli, G. M. Pastori, C. H. Foyer. // *Plant Physiology*. – 2000. – V. 123, N 1. – P. 335-344.
  20. Baruah A. *Arabidopsis* mutants reveal multiple singlet oxygen signaling pathways involved in stress response and development / A. Baruah, K. Šimková, K. Apel [et al.] // *Plant Molecular Biology*. – 2009. – V. 70, N 5. – P. 547-563.
  21. Bentolila S. RIP1, a member of an *Arabidopsis* protein family, interacts with the protein RARE1 and broadly affects RNA editing / S. Bentolila, W. P. Heller, T. Sun [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – V. 109, N 22. – P. E1453-E1461.
  22. Bentolila S. Comprehensive High-Resolution Analysis of the Role of an *Arabidopsis* Gene Family in RNA Editing / S. Bentolila, J. Oh, M. R. Hanson [et al.] // *PLOS Genetics*. – 2013. – V. 9, N 6. – P. e1003584.
  23. Bertrand E. The snoRNPs and related machines: ancient devices that mediate maturation of rRNA and other RNAs // *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Landes Bioscience, 2013.
  24. Biezen E. A. v. d. *Arabidopsis* RelA/SpoT homologs implicate (p)ppGpp in plant signaling / E. A. v. d. Biezen, J. Sun, M. J. Coleman [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2000. – V. 97, N 7. – P. 3747-3752.
  25. Binder S. Transcription initiation sites in mitochondria of *Oenothera berteriana* / S.

Binder, A. Brennicke. // J Biol Chem. – 1993. – V. 268, N 11. – P. 7849-55.

26. Binder S. RNA Processing and RNA Stability in Plant Mitochondria // Plant Mitochondria / Kempken F. – New York, NY: Springer New York, 2011. – P. 107-130.

27. Blair P. V. Preparation and properties of repeating units of mitochondrial electron transfer // Methods in Enzymology. Academic Press, 1967. – P. 208-212.

28. Blanco N. E. Interaction between plastid and mitochondrial retrograde signalling pathways during changes to plastid redox status / N. E. Blanco, M. Guinea-Díaz, J. Whelan [et al.] // Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences. – 2014. – V. 369, N 1640. – P. 20130231-20130231.

29. Blaza J. N. Kinetic evidence against partitioning of the ubiquinone pool and the catalytic relevance of respiratory-chain supercomplexes / J. N. Blaza, R. Serreli, A. J. Y. Jones [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2014. – V. 111, N 44. – P. 15735.

30. Böhmendorfer, G. GMI1, a structural-maintenance-of-chromosomes-hinge domain-containing protein, is involved in somatic homologous recombination in Arabidopsis / G. Böhmendorfer, A. Schleiffer, R. Brunmeir [et al.] // The Plant Journal. – 2011. – V. 67, N 1. – P. 420-433.

31. Bonen L. Cis- and trans-splicing of group II introns in plant mitochondria / L. Bonen. // Mitochondrion. – 2008. – V. 8, N 1. – P. 26-34.

32. Bonen L. The mitochondrial genome: so simple yet so complex / L. Bonen. // Curr Opin Genet Dev. – 1991. – V. 1, N 4. – P. 515-22.

33. Borner T. Chloroplast RNA polymerases: Role in chloroplast biogenesis / T. Borner, A. Y. Aleynikova, Y. O. Zubo [et al.] // Biochim Biophys Acta. – 2015. – V. 1847, N 9. – P. 761-9.

34. Boyle G.M. Identification of subunit g of yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase, a protein required for maximal activity of cytochrome c oxidase / G. M. Boyle, X. Roucou, P. Nagley [et al.] // Eur J Biochem. – 1999. – V. 262, N 2. – P. 315-323.

35. Brandt U. The Protonmotive Q Cycle in Mitochondria and Bacteria / U. Brandt, B. Trumpower. // Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. – 1994. – V. 29, N 3. – P. 165-197.

36. Braun H.-P. The Oxidative Phosphorylation system of the mitochondria in plants / H.-P. Braun. // Mitochondrion. – 2020. – V. 53. – P. 66-75.

37. Braun H. P. The general mitochondrial processing peptidase from potato is an integral part of cytochrome c reductase of the respiratory chain / H. P. Braun, M. Emmermann, V. Krufft [et al.] // The EMBO journal. – 1992. – V. 11, N 9. – P. 3219-3227.

38. Braun H. P. The bifunctional cytochromec reductase/processing peptidase complex from plant mitochondria / H. P. Braun, U. K. Schmitz. // Journal of Bioenergetics and Biomembranes. – 1995. – V. 27, N 4. – P. 423-436.

39. Braun H.-P. The life of plant mitochondrial complex I / H.-P. Braun, S. Binder, A. Brennicke [et al.] // *Mitochondrion*. – 2014. – V. 19, N 1. – P. 295-313.
40. Braun H.-P. Carbonic anhydrase subunits of the mitochondrial NADH dehydrogenase complex (complex I) in plants / H.-P. Braun, E. Zabaleta. // *Physiologia Plantarum*. – 2007. – V. 129, N 1. – P. 114-122.
41. Brennicke A. Transcription signals of mitochondrial and nuclear genes for mitochondrial proteins in dicot plants / A. Brennicke, E. Zabaleta, S. Dombrowski [et al.] // *Journal of Heredity*. – 1999. – V. 90, N 3. – P. 345-350.
42. Brown G. G. Characterization of transcription initiation sites on the soybean mitochondrial genome allows identification of a transcription-associated sequence motif / G. G. Brown, A. H. Auchincloss, P. S. Covello [et al.] // *Mol Gen Genet*. – 1991. – V. 228, N 3. – P. 345-55.
43. Bultema J. B. Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato / J. B. Bultema, H.-P. Braun, E. J. Boekema [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2009. – V. 1787, N 1. – P. 60-67.
44. Bychkov, I.A. Phytohormones as Regulators of Mitochondrial Gene Expression in *Arabidopsis thaliana* / I. A. Bychkov, E. S. Pojidaeva, A. S. Doroshenko [et al.] // *Int. J. Mol. Sci*. – 2023. – V. 24, N 23. – P. 16924.
45. Leaver C. J. Mitochondrial Genome Organization and Expression in Higher Plants / C. J. Leaver, M. W. Gray. // *Annual Review of Plant Physiology*. – 1982. – V. 33, N 1. – P. 373-402.
46. Caarls L. *Arabidopsis* JASMONATE-INDUCED OXYGENASES down-regulate plant immunity by hydroxylation and inactivation of the hormone jasmonic acid / L. Caarls, J. Elberse, M. Awwanah [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – V. 114, N 24. – P. 6388-6393.
47. Cahoon A. B. Plastid Transcription: Competition, Regulation and Promotion by Plastid- and Nuclear-Encoded Polymerases // *The Structure and Function of Plastids* / Wise R. R., Hooper J. K. – Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. – C. 167-181.
48. Canino G. *Arabidopsis* encodes four tRNase Z enzymes / G. Canino, E. Bocian, N. Barbezier [et al.] // *Plant physiology*. – 2009. – V. 150, N 3. – P. 1494-1502.
49. Caplan J. L. Chloroplast Stromules Function during Innate Immunity / J. L. Caplan, A. S. Kumar, E. Park [et al.] // *Developmental Cell*. – 2015. – V. 34, N 1. – P. 45-57.
50. Caplan J. L. Chloroplastic Protein NRIP1 Mediates Innate Immune Receptor Recognition of a Viral Effector / J. L. Caplan, P. Mamillapalli, T. M. Burch-Smith [et al.] // *Cell*. – 2008. – V. 132, N 3. – P. 449-462.
51. Cardol P. Mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) in eukaryotes: A

- highly conserved subunit composition highlighted by mining of protein databases / P. Cardol. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2011. – V. 1807, N 11. – P. 1390-1397.
52. Casazza, A.P. Preparation and functional characterization of thylakoids from *Arabidopsis thaliana* / A. P. Casazza, D. Tarantino, C. Soave. // *Photosynthesis Research*. – 2001. – V. 68, N 1. – P. 175-180.
53. Cermakian N. On the evolution of the single-subunit RNA polymerases / N. Cermakian, T. M. Ikeda, P. Miramontes [et al.] // *J Mol Evol*. – 1997. – V. 45, N 6. – P. 671-81.
54. Chaban Y. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation / Y. Chaban, E. J. Boekema, N. V. Dudkina. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2014. – V. 1837, N 4. – P. 418-426.
55. Chance B. A Method for the Localization of Sites for Oxidative Phosphorylation / B. Chance, G. R. Williams. // *Nature*. – 1955. – V. 176, N 4475. – P. 250-254.
56. Chang C. C. Functional analysis of two maize cDNAs encoding T7-like RNA polymerases / C. C. Chang, J. Sheen, M. Bligny [et al.] // *The Plant cell*. – 1999. – V. 11, N 5. – P. 911-926.
57. Chaturvedi R. *CYP720A1* function in roots is required for flowering time and systemic acquired resistance in the foliage of *Arabidopsis* / R. Chaturvedi, M. Giri, Z. Chowdhury, [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2020. – V. 71, N 20. – P. 6612-6622.
58. Chen P.-Y. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants / P.-Y. Chen, C.-K. Wang, S.-C. Soong [et al.] // *Molecular Breeding*. – 2003. – V. 11, N 4. – P. 287-293.
59. Chèneby J. ReMap 2020: a database of regulatory regions from an integrative analysis of Human and *Arabidopsis* DNA-binding sequencing experiments / J. Cheneby, Z. Ménétrier, M. Mestdagh [et al.] // *Nucleic Acids Res*. – 2020. – V. 8, N 48. – P. D180-D188.
60. Chevigny N. DNA Repair and the Stability of the Plant Mitochondrial Genome / N. Chevigny, D. Schatz-Daas, F. Lotfi [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2020. – V. 21, N 1. – P. 328.
61. Chi W. RHON1 mediates a Rho-like activity for transcription termination in plastids of *Arabidopsis thaliana* / W. Chi, B. He, N. Manavski [et al.] // *Plant Cell*. – 2014. – V. 26, N 12. – P. 4918-32.
62. Chi W. Intracellular Signaling from Plastid to Nucleus / W. Chi, X. Sun, L. Zhang. // *Annual Review of Plant Biology*. – 2013. – V. 64, N 1. – P. 559-582.
63. Choquet Y. Translational regulations as specific traits of chloroplast gene expression / Y. Choquet, F. A. Wollman. // *FEBS Lett*. – 2002. – V. 529, N 1. – P. 39-42.
64. Clough S. J. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* / S. J. Clough, A. F. Bent. // *The plant journal*. – 1998. – V. 16, N 6. – P. 735-118

65. Courtois F. Phage-type RNA polymerase RPOTmp transcribes the *rrn* operon from the PC promoter at early developmental stages in *Arabidopsis* / F. Courtois, L. Merendino, E. Demarsy [et al.] // *Plant Physiol.* – 2007. – V. 145, N 3. – P. 712-21.
66. Covello P. S. Sequence analysis of wheat mitochondrial transcripts capped in vitro: definitive identification of transcription initiation sites / P. S. Covello, M. W. Gray. // *Curr Genet.* – 1991. – V. 20, N 3. – P. 245-51.
67. Cruciat C. M. The cytochrome bc1 and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria / C. M. Cruciat, S. Brunner, F. Baumann [et al.] // *J Biol Chem.* – 2000. – V. 275, N 24. – P. 18093-8.
68. Csárdi G. *igraph: Network Analysis and Visualization in R* / G. Csardi, , Nepusz T, V. Traag, Sz. Horvát [et al.] // R package version 2.0.3.9046. – 2024. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=igraph>.
69. de Longevialle A. F. The Pentatricopeptide Repeat Gene *OTP43* Is Required for trans-Splicing of the Mitochondrial *nad1* Intron 1 in *Arabidopsis thaliana* / A. F. de Longevialle, E. H. Meyer, C. Andrés [et al.] // *The Plant Cell.* – 2007. – V. 19, N 10. – P. 3256-3265.
70. de Vries J. Plastid genomes / J. de Vries, J. M. Archibald. // *Current Biology.* – 2018. – V. 28, N 8. – P. R336-R337.
71. Del Campo M. Unwinding by Local Strand Separation Is Critical for the Function of DEAD-Box Proteins as RNA Chaperones / M. Del Campo, S. Mohr, Y. Jiang [et al.] // *Journal of Molecular Biology.* – 2009. – V. 389, N 4. – P. 674-693.
72. Demarsy E. Characterization of the plastid-specific germination and seedling establishment transcriptional programme / E. Demarsy, F. Buhr, E. Lambert [et al.] // *Journal of Experimental Botany.* – 2011. – V. 63, N 2. – P. 925-939.
73. Dombrowski S. Continuous primary sequence requirements in the 18-nucleotide promoter of dicot plant mitochondria / S. Dombrowski, M. Hoffmann, C. Guha [et al.] // *J Biol Chem.* – 1999. – V. 274, N 15. – P. 10094-9.
74. Doner N. M. *Arabidopsis thaliana* EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 7 Localizes to Lipid Droplets via Its Senescence Domain / N. M. Doner, D. Seay, M. Mehling [et al.] // *Frontiers in Plant Science.* – 2021. – V. 12, N 1. – P. e658961.
75. Dudkina N. V. Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III / N. V. Dudkina, H. Eubel, W. Keegstra [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2005a. – V. 102, N 9. – P. 3225-3229.
76. Dudkina N. V. Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: An angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane / N. V. Dudkina, J.

Heinemeyer, W. Keegstra [et al.] // FEBS Letters. – 2005b. – V. 579, N 25. – P. 5769-5772.

77. Dudkina N. V. Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane / N. V. Dudkina, J. Heinemeyer, S. Sunderhaus [et al.] // Trends in Plant Science. – 2006. – V. 11, N 5. – P. 232-240.

78. Dusa A. venn: Draw Venn Diagrams / A. Dusa // R package version 1,11. – 2022. – URL: <https://CRAN.R-project.org/package=venn>

79. Eamens A. RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow / A. Eamens, M. B. Wang, N. A. Smith, P. M. Waterhouse. // Plant Physiology. – 2008. – V. 147, N 2. – P. 456-468.

80. Edqvist J. Nuclear identity specifies transcriptional initiation in plant mitochondria / J. Edqvist, P. Bergman. // Plant Molecular Biology. – 2002. – V. 49, N 1. – P. 59-68.

81. Emanuel C. Development- and tissue-specific expression of the RpoT gene family of Arabidopsis encoding mitochondrial and plastid RNA polymerases / C. Emanuel, U. von Groll, M. Muller [et al.] // Planta. – 2006. – V. 223, N 5. – P. 998-1009.

82. Emanuel C. Chloroplast development affects expression of phage-type RNA polymerases in barley leaves / C. Emanuel, A. Weihe, A. Graner [et al.] // The Plant Journal. – 2004. – V. 38, N 3. – P. 460-472.

83. Eriksson A. The ubiquinol cytochrome c oxidoreductase complex of spinach leaf mitochondria is involved in both respiration and protein processing / A. Eriksson, S. Sjöling, E. Glaser. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. – 1994. – V. 1186, N 3. – P. 221-231.

84. Eubel H. Identification and Characterization of Respirasomes in Potato Mitochondria / H. Eubel, J. Heinemeyer, H.-P. Braun. // Plant Physiology. – 2004. – V. 134, N 4. – P. 1450-1459.

85. Eubel H. New Insights into the Respiratory Chain of Plant Mitochondria. Supercomplexes and a Unique Composition of Complex II / H. Eubel, L. Jänsch, H.-P. Braun. // Plant Physiology. – 2003. – V. 133, N 1. – P. 274-286.

86. Eysholdt-Derzsó E. Root Bending Is Antagonistically Affected by Hypoxia and ERF-Mediated Transcription via Auxin Signaling / E. Eysholdt-Derzsó, M. Sauter. // Plant Physiol. – 2017. – V. 175, N 1. – P. 412-423.

87. Fang X. Chloroplast-to-Nucleus Signaling Regulates MicroRNA Biogenesis in Arabidopsis / X. Fang, G. Zhao, S. Zhang [et al.] // Developmental Cell. – 2019. – V. 48, N 3. – P. 371-382.

88. Fatica A. Naf1p is a box H/ACA snoRNP assembly factor / A. Fatica, M. Dlakić, D. Tollervey. // Rna. – 2002. – V. 8, N 12. – P. 1502-1514.

89. Favory J.-J. Specific function of a plastid sigma factor for ndh F gene transcription / J.-J. Favory, M. Kobayashi, K. Tanaka [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2005. – V. 33, N 18. – P. 5991-5999.

90. Fejes E. Sequence and transcriptional analysis of a chloroplast insert in the mitochondrial genome of *Zea mays* / E. Fejes, B. S. Masters, D. M. McCarty [et al.] // *Curr Genet.* – 1988. – V. 13, N 6. – P. 509-15.
91. Ferguson-Miller S. Aggregation and diffusion in the mitochondrial electron-transfer chain: role in electron flow and energy transfer / S. Ferguson-Miller, J. Hochman, M. Schindler. // *Biochemical Society Transactions.* – 1986. – V. 14, N 5. – P. 822-824.
92. Fey J. Compilation and analysis of plant mitochondrial promoter sequences: An illustration of a divergent evolution between monocot and dicot mitochondria / J. Fey, L. Marechal-Drouard. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1999. – V. 256, N 2. – P. 409-14.
93. Fiedorczuk K. Atomic structure of the entire mammalian mitochondrial complex I / K. Fiedorczuk, J. A. Letts, G. Degliesposti [et al.] // *Nature.* – 2016. – V. 538, N 7625. – P. 406-410.
94. Finnegan P. M. Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation of RNA Levels in Maize Mitochondria / P. M. Finnegan, G. G. Brown. // *The Plant cell.* – 1990. – V. 2, N 1. – P. 71-83.
95. Forner J. Mapping of mitochondrial mRNA termini in *Arabidopsis thaliana*: t-elements contribute to 5' and 3' end formation / J. Forner, B. Weber, S. Thuss [et al.] // *Nucleic acids research.* – 2007. – V. 35, N 11. – P. 3676-3692.
96. Fowler L. R. Reconstitution of the electron transport system III. Reconstitution of DPNH oxidase, succinic oxidase, and DPNH, succinic oxidase / L. R. Fowler, Y. Hatefi. // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* – 1961. – V. 5, N 3. – P. 203-208.
97. Foyer C. H. The functions of WHIRLY1 and REDOX-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1 in cross tolerance responses in plants: a hypothesis / C. H. Foyer, B. Karpinska, K. Krupinska. // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 2014. – V. 369, N 1640. – P. 20130226.
98. Fromm S. Life without complex I: proteome analyses of an *Arabidopsis* mutant lacking the mitochondrial NADH dehydrogenase complex / S. Fromm, J. Senkler, H. Eubel [et al.] // *Journal of Experimental Botany.* – 2016. – V. 67, N 10. – P. 3079-3093.
99. Fuchs P. Single organelle function and organization as estimated from *Arabidopsis* mitochondrial proteomics / P. Fuchs, N. Rugen, C. Carrie [et al.] // *The Plant Journal.* – 2020. – V. 101, N 2. – P. 420-441.
100. Fujii S. Retrograde regulation of nuclear gene expression in CW-CMS of rice / S. Fujii, S. Komatsu, K. Toriyama. // *Plant Molecular Biology.* – 2007. – V. 63, N 3. – P. 405-417.
101. Gagliardi D. Polyadenylation accelerates the degradation of the mitochondrial mRNA associated with cytoplasmic male sterility in sunflower / D. Gagliardi, C. J. Leaver. // *The EMBO journal.* – 1999. – V. 18, N 13. – P. 3757-3766.
102. Gorbenko I.V. Overexpression of RPOTmp Being Targeted to Either Mitochondria or

- Chloroplasts in Arabidopsis Leads to Overall Transcriptome Changes and Faster Growth / I. V. Gorbenko, V. I. Tarasenko, E. Y. Garnik [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2024. – V. 25, N 15. – P. 8164.
103. Gibbs D. J. Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants / D. J. Gibbs, S. C. Lee, N. M. Isa [et al.] // *Nature*. – 2011. – V. 479, N 7373. – P. 415-8.
104. Giegé P. RNA editing in Arabidopsis mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs / P. Giegé, A. Brennicke. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1999. – V. 96, N 26. – P. 15324-15329.
105. Giege P. RNA degradation buffers asymmetries of transcription in Arabidopsis mitochondria / P. Giege, M. Hoffmann, S. Binder [et al.] // *EMBO Rep*. – 2000. – V. 1, N 2. – P. 164-70.
106. Giegé P. Coordination of nuclear and mitochondrial genome expression during mitochondrial biogenesis in Arabidopsis / P. Giegé, L. J. Sweetlove, V. Cognat [et al.] // *The Plant cell*. – 2005. – V. 17, N 5. – P. 1497-1512.
107. Gilkerson R. The mitochondrial nucleoid: integrating mitochondrial DNA into cellular homeostasis // R. Gilkerson, L. Bravo, I. Garcia [et al.] // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2013. – V. 5, N 5. – P. a011080.
108. Giraud E. The Transcription Factor ABI4 Is a Regulator of Mitochondrial Retrograde Expression of ALTERNATIVE OXIDASE1a / E. Giraud, O. Van Aken, L. H. M. Ho [et al.] // *Plant Physiology*. – 2009. – V. 150, N 3. – P. 1286-1296.
109. Gloor E. Chapter 11 - Photosynthesis in action: The global view // *Photosynthesis in Action* / Ruban A. [et al.]. Academic Press, 2022. – P. 243-269.
110. Godoy Herz M. A. Light Regulates Plant Alternative Splicing through the Control of Transcriptional Elongation / M. A. Godoy Herz, M. G. Kubaczka, G. Brzyżek [et al.] // *Molecular Cell*. – 2019. – V. 73, N 5. – P. 1066-1074.
111. Gray M. W. Transcription, Processing and Editing in Plant Mitochondria / M. W. Gray, P. J. Hanic-Joyce, P. S. Covello. // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. – 1992. – V. 43, N 1. – P. 145-175.
112. Gu J. The architecture of the mammalian respirasome / J. Gu, M. Wu, R. Guo [et al.] // *Nature*. – 2016. – V. 537, N 7622. – P. 639-643.
113. Gu, Z. Complex Heatmap Visualization. / Z. Gu // *iMeta*. – 2022. – V. 1, N 1. – P. e43.
114. Gualberto J. M. DNA-binding proteins in plant mitochondria: Implications for transcription / J. M. Gualberto, K. Kühn. // *Mitochondrion*. – 2014. – V. 19, N 1. – P. 323-328.
115. Gupte S. S. The role of cytochrome c diffusion in mitochondrial electron transport / S. S. Gupte, C. R. Hackenbrock. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1988. – V. 263, N 11. – P. 5248-5253.
116. Häili N. The MTL1 Pentatricopeptide Repeat Protein Is Required for Both Translation

- and Splicing of the Mitochondrial NADH DEHYDROGENASE SUBUNIT7 mRNA in Arabidopsis / N. Haïli, N. Planchard, N. Arnal [et al.] // Plant Physiology. – 2015. – V. 170, N 1. – P. 354-366.
117. Hajdukiewicz P. T. J. The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids / P. T. J. Hajdukiewicz, L. A. Allison, P. Maliga. // The EMBO Journal. – 1997. – V. 16, N 13. – P. 4041.
118. Hammani K. RNA metabolism in plant mitochondria / K. Hammani, P. Giegé. // Trends in Plant Science. – 2014. – V. 19, N 6. – P. 380-389.
119. Hanaoka M. Glutamyl-tRNA mediates a switch in RNA polymerase use during chloroplast biogenesis / M. Hanaoka, K. Kanamaru, M. Fujiwara [et al.] // EMBO reports. – 2005. – V. 6, N 6. – P. 545-550.
120. Hanic-Joyce P. J. Accurate transcription of a plant mitochondrial gene in vitro / P. J. Hanic-Joyce, M. W. Gray. // Mol Cell Biol. – 1991. – V. 11, N 4. – P. 2035-9.
121. Härtel B. MEF10 is required for RNA editing at *nad2-842* in mitochondria of *Arabidopsis thaliana* and interacts with MORF8 / B. Härtel, A. Zehrmann, D. Verbitskiy [et al.] // Plant Mol Biol. – 2013. – V. 81, N 1. – P. 337-346.
122. Hatefi Y. Studies on the Electron Transfer System: XLII. RECONSTITUTION OF THE ELECTRON TRANSFER SYSTEM / Y. Hatefi, A. G. Haavik, L. R. Fowler [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 1962. – V. 237, N 8. – P. 2661-2669.
123. Heazlewood J. L. Mitochondrial complex I from Arabidopsis and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits / J. L. Heazlewood, K. A. Howell, A. H. Millar. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. – 2003a. – V. 1604, N 3. – P. 159-169.
124. Heazlewood J. L. The products of the mitochondrial Orf25 and OrfB genes are FO components in the plant F1FO ATP synthase / J. L. Heazlewood, J. Whelan, A. H. Millar. // FEBS Letters. – 2003b. – V. 540, N 1. – P. 201-205.
125. Hedtke B. Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in Arabidopsis / B. Hedtke, T. Borner, A. Weihe. // Science. – 1997. – V. 277, N 5327. – P. 809-811.
126. Hedtke B. One RNA polymerase serving two genomes / B. Hedtke, T. Borner, A. Weihe. // EMBO Rep. – 2000. – V. 1, N 5. – P. 435-440.
127. Hedtke B. Six active phage-type RNA polymerase genes in *Nicotiana tabacum* / B. Hedtke, J. Legen, A. Weihe [et al.] // The Plant Journal. – 2002. – V. 30, N 6. – P. 625-637.
128. Hess W. R. Organellar RNA polymerases of higher plants / W. R. Hess, T. Borner. // Int Rev Cytol. – 1999. – V. 190, N 1. – P. 1-59.
129. Hildebrandt Tatjana M. Amino Acid Catabolism in Plants / Tatjana M. Hildebrandt, A. Nunes Nesi, Wagner L. Araújo [et al.] // Molecular Plant. – 2015. – V. 8, N 11. – P. 1563-1579.

130. Hirst J. Open questions: respiratory chain supercomplexes—why are they there and what do they do? / J. Hirst. // *BMC Biology*. – 2018. – V. 16, N 1. – P. 111.
131. Höchli M. Fluidity in mitochondrial membranes: thermotropic lateral translational motion of intramembrane particles / M. Höchli, C. R. Hackenbrock. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1976. – V. 73, N 5. – P. 1636.
132. Höchli M. Independent lateral diffusion of cytochrome bc<sub>1</sub> complex and cytochrome oxidase in the mitochondrial inner membrane / M. Höchli, L. Höchli, C. R. Hackenbrock. // *Eur J Cell Biol*. – 1985. – V. 38, N 1. – P. 1-5.
133. Hochman J. Mobility in the mitochondrial electron transport chain / J. Hochman, S. Ferguson-Miller, M. Schindler. // *Biochemistry*. – 1985. – V. 24, N 10. – P. 2509-2516.
134. Hochman J. H. Lateral mobility of cytochrome c on intact mitochondrial membranes as determined by fluorescence redistribution after photobleaching / J. H. Hochman, M. Schindler, J. G. Lee [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1982. – V. 79, N 22. – P. 6866.
135. Hoefnagel M. N. H. Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark / M. N. H. Hoefnagel, O. K. Atkin, J. T. Wiskich. // *Biochimica et biophysica acta = International journal of biochemistry and biophysics*. – 1998. – V. 1366, N 3. – P. 235-255.
136. Holdsworth M. J. The plant N-degron pathways of ubiquitin-mediated proteolysis / M. J. Holdsworth, J. Vicente, G. Sharma [et al.] // *Journal of Integrative Plant Biology*. – 2020. – V. 62, N 1. – P. 70-89.
137. Holec S. Coping with cryptic and defective transcripts in plant mitochondria / S. Holec, H. Lange, J. Canaday [et al.] // *Biochim Biophys Acta*. – 2008. – V. 1779, N 9. – P. 566-73.
138. Homann A. DNA-binding and transcription characteristics of three cloned sigma factors from mustard (*Sinapis alba* L.) suggest overlapping and distinct roles in plastid gene expression / A. Homann, G. Link. // *Eur J Biochem*. – 2003. – V. 270, N 6. – P. 1288-300.
139. Hooper M. C. Subcellular Localisation database for Arabidopsis proteins version 5 / M. C. Hooper, I. Castleden, S. K. Tanz [et al.] // URL: <https://suba.live/> (date of request: 20.07.2024). – 2022.
140. Hricova A. The SCABRA3 nuclear gene encodes the plastid RpoTp RNA polymerase, which is required for chloroplast biogenesis and mesophyll cell proliferation in Arabidopsis / A. Hricova, V. Quesada, J. L. Micol. // *Plant Physiol*. – 2006. – V. 141, N 3. – P. 942-56.
141. Huang S. Mitochondrial complex II of plants: subunit composition, assembly, and function in respiration and signaling / S. Huang, H.-P. Braun, R. M. R. Gawryluk [et al.] // *The Plant Journal*. – 2019. – V. 98, N 3. – P. 405-417.
142. Huang S. Succinate dehydrogenase: the complex roles of a simple enzyme / S. Huang, A. H. Millar. // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2013. – V. 16, N 3. – P. 344-349.

143. Huang T. Abscisic acid-regulated protein degradation causes osmotic stress-induced accumulation of branched-chain amino acids in *Arabidopsis thaliana* / T. Huang, G. Jander. // *Planta*. – 2017. – V. 246, N 4. – P. 737-747.
144. Huber W. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor / W. Huber, V. J. Carey, R. Gentleman [et al.] // *Nat Methods*. – 2015. – V. 12, N 2. – P. 115-21.
145. Hubschmann T. Characterisation of transcript initiation sites in ribosome-deficient barley plastids / T. Hubschmann, T. Borner. // *Plant Mol Biol*. – 1998. – V. 36, N 3. – P. 493-6.
146. Ibrahim N. DNA Delivery to Mitochondria: Sequence Specificity and Energy Enhancement / N. Ibrahim, H. Handa, A. Cosset [et al.] // *Pharm Res*. – 2011. – V. 28, N 1. – P. 2871-2882.
147. Ikeda T. M. Identification and characterization of T3/T7 bacteriophage-like RNA polymerase sequences in wheat / T. M. Ikeda, M. W. Gray. // *Plant Mol Biol*. – 1999. – V. 40, N 4. – P. 567-78.
148. Ishizaki K. The Critical Role of *Arabidopsis* Electron-Transfer Flavoprotein:Ubiquinone Oxidoreductase during Dark-Induced Starvation / K. Ishizaki, T. R. Larson, N. Schauer [et al.] // *The Plant Cell*. – 2005a. – V. 17, N 9. – P. 2587-2600.
149. Ishizaki Y. A nuclear-encoded sigma factor, *Arabidopsis* SIG6, recognizes sigma-70 type chloroplast promoters and regulates early chloroplast development in cotyledons / Y. Ishizaki, Y. Tsunoyama, K. Hatano [et al.] // *Plant J*. – 2005b. – V. 42, N 2. – P. 133-44.
150. Iverson T. M. Catalytic mechanisms of complex II enzymes: A structural perspective / T. M. Iverson. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2013. – V. 1827, N 5. – P. 648-657.
151. Jacoby R. P. Mitochondrial Composition, Function and Stress Response in PlantsF / R. P. Jacoby, L. Li, S. Huang [et al.] // *Journal of Integrative Plant Biology*. – 2012. – V. 54, N 11. – P. 887-906.
152. Jarvis P. Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids / P. Jarvis, E. López-Juez. // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2013. – V. 14, N 12. – P. 787-802.
153. Jeon Y. S1 domain-containing STF modulates plastid transcription and chloroplast biogenesis in *Nicotiana benthamiana* / Y. Jeon, H. J. Jung, H. Kang [et al.] // *New Phytologist*. – 2012. – V. 193, N 2. – P. 349-363.
154. Ježek P. Mitochondrial Uncoupling Proteins: Subtle Regulators of Cellular Redox Signaling / P. Ježek, B. Holendová, K. D. Garlid [et al.] // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2018. – V. 29, N 7. – P. 667-714.
155. Jha P. Analysis of Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes Using Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) / P. Jha, X. Wang, J. Auwerx // *Current Protocols in*

Mouse Biology. – 2016. – V. 6, N 1. – P. 1-14.

156. Jonietz C. RNA PROCESSING FACTOR2 is required for 5' end processing of nad9 and cox3 mRNAs in mitochondria of Arabidopsis thaliana / C. Jonietz, J. Forner, A. Hölzle [et al.] // The Plant cell. – 2010. – V. 22, N 2. – P. 443-453.

157. Joseph M. P. The Arabidopsis ZINC FINGER PROTEIN3 Interferes with Abscisic Acid and Light Signaling in Seed Germination and Plant Development / M. P. Joseph, C. Papdi, L. Kozma-Bognár [et al.] // Plant Physiology. – 2014. – V. 165, N 3. – P. 1203-1220.

158. Jouhet J. Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria / J. Jouhet, E. Maréchal, B. Baldan [et al.] // Journal of Cell Biology. – 2004. – V. 167, N 5. – P. 863-874.

159. Joyce P. B. Chloroplast-like transfer RNA genes expressed in wheat mitochondria / P. B. Joyce, M. W. Gray. // Nucleic acids research. – 1989. – V. 17, N 14. – P. 5461-5476.

160. Kanamaru K. Plastidic RNA polymerase sigma factors in Arabidopsis / K. Kanamaru, M. Fujiwara, M. Seki [et al.] // Plant Cell Physiol. – 1999. – V. 40, N 8. – P. 832-42.

161. Kanamaru K. An Arabidopsis Sigma Factor (SIG2)-Dependent Expression of Plastid-Encoded tRNAs in Chloroplasts / K. Kanamaru, A. Nagashima, M. Fujiwara [et al.] // Plant and Cell Physiology. – 2001. – V. 42, N 10. – P. 1034-1043.

162. Kang J. Y. Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling / J. Y. Kang, H. I. Choi, M. Y. Im [et al.] // Plant Cell. – 2002. – V. 14, N 2. – P. 343-57.

163. Karpova O. V. Differential expression of alternative oxidase genes in maize mitochondrial mutants / O. V. Karpova, E. V. Kuzmin, T. E. Elthon [et al.] // The Plant cell. – 2002. – V. 14, N 12. – P. 3271-3284.

164. Kasai K. Guanosine tetra- and pentaphosphate synthase activity in chloroplasts of a higher plant: association with 70S ribosomes and inhibition by tetracycline / K. Kasai, T. Kanno, Y. Endo [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2004. – V. 32, N 19. – P. 5732-5741.

165. Keren I. AtnMat2, a nuclear-encoded maturase required for splicing of group-II introns in Arabidopsis mitochondria / I. Keren, A. Bezawork-Geleta, M. Kolton [et al.] // RNA (New York, N.Y.). – 2009. – V. 15, N 12. – P. 2299-2311.

166. Kilian J. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses / J. Kilian, D. Whitehead, J. Horak [et al.] // The Plant Journal. – 2007. – V. 50, N 2. – P. 347-363.

167. Kim E. Diversity and Evolution of Plastids and Their Genomes // The Chloroplast: Interactions with the Environment / Sandelius A. S., Aronsson H. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009a. – P. 1-39.

168. Kim M. Mutations in an Arabidopsis mitochondrial transcription termination factor-related protein enhance thermotolerance in the absence of the major molecular chaperone HSP101 / M. Kim, U. Lee, I. Small [et al.] // *Plant Cell*. – 2012. – V. 24, N 8. – P. 3349-65.
169. Kim S.-R. Rice OGR1 encodes a pentatricopeptide repeat-DYW protein and is essential for RNA editing in mitochondria / S.-R. Kim, J.-I. Yang, S. Moon [et al.] // *The Plant Journal*. – 2009b. – V. 59, N 5. – P. 738-749.
170. Kindgren P. Interplay between HEAT SHOCK PROTEIN 90 and HY5 Controls PhANG Expression in Response to the GUN5 Plastid Signal / P. Kindgren, L. Norén, J. d. D. Barajas López [et al.] // *Molecular Plant*. – 2012. – V. 5, N 4. – P. 901-913.
171. Klein M. Physical mapping of the mitochondrial genome of Arabidopsis thaliana by cosmid and YAC clones / M. Klein, U. Eckert-Ossenkopp, I. Schmiedeberg [et al.] // *The Plant Journal*. – 1994. – V. 6, N 3. – P. 447-455.
172. Klepikova A. V. A high resolution map of the Arabidopsis thaliana developmental transcriptome based on RNA-seq profiling / A. V. Klepikova, A. S. Kasianov, E. S. Gerasimov [et al.] // *The Plant Journal*. – 2016. – V. 88, N 6. – P. 1058-1070.
173. Klodmann J. Defining the protein complex proteome of plant mitochondria / J. Klodmann, M. Senkler, C. Rode [et al.] // *Plant physiology*. – 2011. – V. 157, N 2. – P. 587-598.
174. Klodmann J. Internal Architecture of Mitochondrial Complex I from *Arabidopsis thaliana* / J. Klodmann, S. Sunderhaus, M. Nimtz [et al.] // *The Plant Cell*. – 2010. – V. 22, N 3. – P. 797.
175. Kloth K. J. AtWRKY22 promotes susceptibility to aphids and modulates salicylic acid and jasmonic acid signalling / K. J. Kloth, G. L. Wieggers, J. Busscher-Lange [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2016. – V. 67, N 11. – P. 3383-3396.
176. Kobayashi Y. Genomic organization and organ-specific expression of a nuclear gene encoding phage-type RNA polymerase in *Nicotiana sylvestris* / Y. Kobayashi, Y. Dokiya, M. Sugiura [et al.] // *Gene*. – 2001. – V. 279, N 1. – P. 33-40.
177. Köhler D. The DEAD-box protein PMH2 is required for efficient group II intron splicing in mitochondria of Arabidopsis thaliana / D. Köhler, S. Schmidt-Gattung, S. Binder. // *Plant Molecular Biology*. – 2010. – V. 72, N 4. – P. 459-467.
178. Kolesiński P. Initial characteristics of RbcX proteins from Arabidopsis thaliana / P. Kolesiński, J. Piechota, A. Szczepaniak // *Plant Mol Biol*. – 2011. – V. 77, N 1. – P. 447-459.
179. Kong L. Degradation of the ABA co-receptor ABI1 by PUB12/13 U-box E3 ligases / L. Kong, Cheng J., Zhu Y. [et al.] // *Nat Commun*. – 2015. – V. 6, N 1. – P. 8630.
180. Konstantinov Yu. M. The elements of CRISPR-Cas-like system in genome of Arabidopsis thaliana: possible origin and some evidence on their functionality / Yu. M. Konstantinov, I.

- S. Petrushin, I. V. Gorbenko // *Cognitive Sciences, Genomics and Bioinformatics (CSGB)*. – 2020. P. 250-252.
181. Koprivova A. Shoot-root interaction in control of camalexin exudation in *Arabidopsis* / A. Koprivova, M. Schwier, V. Volz, [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2023. – V. 74, N 8. – P. 2667-2679.
182. Koulintchenko M. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex / M. Koulintchenko, Y. Konstantinov, A. Dietrich // *EMBO J*. – 2003. – V. 22, N 2. – P. 1245-54.
183. Koussevitzky S. Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination / S. Koussevitzky, N. Suzuki, S. Huntington [et al.] // *J Biol Chem*. – 2008. – V. 283, N 49. – P. 34197-34203.
184. Kozik A. The alternative reality of plant mitochondrial DNA: One ring does not rule them all // A. Kozik, B. A. Rowan, D. Lavelle [et al.] // *PLoS Genet*. – 2019. – V. 15, N. 8. – P. e1008373.
185. Krause F. “Respirasome”-like Supercomplexes in Green Leaf Mitochondria of Spinach / F. Krause, N. H. Reifschneider, D. Vocke [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – V. 279, N 46. – P. 48369-48375.
186. Krause K. Nuclear regulators with a second home in organelles / K. Krause, K. Krupinska. // *Trends in Plant Science*. – 2009. – V. 14, N 4. – P. 194-199.
187. Kröger A. The Kinetics of the Redox Reactions of Ubiquinone Related to the Electron-Transport Activity in the Respiratory Chain / A. Kröger, M. Klingenberg. // *European Journal of Biochemistry*. – 1973. – V. 34, N 2. – P. 358-368.
188. Krupinska K. New insights into plastid nucleoid structure and functionality / K. Krupinska, J. Melonek, K. Krause. // *Planta*. – 2013. – V. 237, N 3. – P. 653-664.
189. Kubeš M. The *Arabidopsis* concentration-dependent influx/efflux transporter ABCB4 regulates cellular auxin levels in the root epidermis / M. Kubeš, H. Yang, G. L. Richter [et al.] // *Plant J*. – 2012. – V. 69, N 4. – P. 640-54.
190. Kucej M. Evolutionary tinkering with mitochondrial nucleoids / M. Kucej, R. A. Butow // *Trends Cell Biol*. – 2007. – V. 17, N 12. – P. 586-92.
191. Kuhn J. RT-PCR analysis of 5' to 3'-end-ligated mRNAs identifies the extremities of *cox2* transcripts in pea mitochondria / J. Kuhn, S. Binder. // *Nucleic acids research*. – 2002. – V. 30, N 2. – P. 439-446.
192. Kuhn K. *Arabidopsis* phage-type RNA polymerases: accurate in vitro transcription of organellar genes / K. Kuhn, A. V. Bohne, K. Liere [et al.] // *Plant Cell*. – 2007. – V. 19, N 3. – P. 959-71.
193. Kühn K. Complete Mitochondrial Complex I Deficiency Induces an Up-Regulation of

- Respiratory Fluxes That Is Abolished by Traces of Functional Complex I / K. Kühn, T. Obata, K. Feher [et al.] // *Plant Physiology*. – 2015. – V. 168, N 4. – P. 1537.
194. Kühn K. Phage-type RNA polymerase RPOTmp performs gene-specific transcription in mitochondria of *Arabidopsis thaliana* / K. Kühn, U. Richter, E. H. Meyer [et al.] // *Plant Cell*. – 2009. – V. 21, N 9. – P. 2762-79.
195. Kühn K. Multiple promoters are a common feature of mitochondrial genes in *Arabidopsis* / K. Kühn, A. Weihe, T. Börner. // *Nucleic acids research*. – 2005. – V. 33, N 1. – P. 337-346.
196. Kusumi K. Chloroplast biogenesis during the early stage of leaf development in rice / K. Kusumi, Y. Chono, H. Shimada [et al.] // *Plant Biotechnology*. – 2010. – V. 27, N 1. – P. 85-90.
197. Kusumi K. Characterization of a rice nuclear-encoded plastid RNA polymerase gene *OsRpoTp* / K. Kusumi, A. Yara, N. Mitsui [et al.] // *Plant Cell Physiol*. – 2004. – V. 45, N 9. – P. 1194-201.
198. Lancien M. Amino Acid Synthesis in Plastids // *The Structure and Function of Plastids* / Wise R. R., Hooper J. K. – Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. – P. 355-385.
199. Lang L. The DREAM complex represses growth in response to DNA damage in *Arabidopsis* / L. Lang, A. Pettkó-Szandtner, H. T. Elbasi [et al.] // *Life Science Alliance*. – 2021. – V. 4, N 12. – P. e202101141.
200. Lapuente-Brun E. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain / E. Lapuente-Brun, R. Moreno-Loshuertos, R. Acín-Pérez [et al.] // *Science*. – 2013. – V. 340, N 6140. – P. 1567-70.
201. Lasserre J. P. Two-Dimensional Blue Native/SDS Gel Electrophoresis of Multiprotein Complexes // *Protein Electrophoresis: Methods and Protocols* / Kurien B. T., Scofield R. H. – Totowa, NJ: Humana Press, 2012. – P. 317-337.
202. Launay A. Proline oxidation fuels mitochondrial respiration during dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* / A. Launay, C. Cabassa-Hourton, H. Eubel [et al.] // *Journal of experimental botany*. – 2019. – V. 70, N 21. – P. 6203-6214.
203. Lee J. H. DWA1 and DWA2, Two *Arabidopsis* DWD Protein Components of CUL4-Based E3 Ligases, Act Together as Negative Regulators in ABA Signal Transduction / J. H. Lee, H.-J. Yoon, W. Terzaghi [et al.] // *The Plant Cell*. – 2010. – V. 22, N 6. – P. 1716-1732.
204. Legen J. Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries / J. Legen, S. Kemp, K. Krause [et al.] // *The Plant Journal*. – 2002. – V. 31, N 2. – P. 171-188.
205. Leino M. Alloplasmic effects on mitochondrial transcriptional activity and RNA turnover result in accumulated transcripts of *Arabidopsis* Orfs in cytoplasmic male-sterile *Brassica napus* / M. Leino, M. Landgren, K. Glimelius. // *Plant J*. – 2005. – V. 42, N 4. – P. 469-80.

206. Leister D. Intracompartamental and Intercompartmental Transcriptional Networks Coordinate the Expression of Genes for Organellar Functions / D. Leister, X. Wang, G. Haberer [et al.] // *Plant Physiology*. – 2011. – V. 157, N 1. – P. 386-404.
207. Lerbs-Mache S. Function of plastid sigma factors in higher plants: regulation of gene expression or just preservation of constitutive transcription? / S. Lerbs-Mache. // *Plant Molecular Biology*. – 2011. – V. 76, N 3. – P. 235-249.
208. Lerbs-Mache S. Regulation of rDNA transcription in plastids of higher plants / S. Lerbs-Mache. // *Biochimie*. – 2000. – V. 82, N 6. – P. 525-535.
209. Lermontova I. Cloning and characterization of a plastidal and a mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase / I. Lermontova, E. Kruse, H. P. Mock [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1997. – V. 94, N 16. – P. 8895-8900.
210. Letts J. A. The architecture of respiratory supercomplexes / J. A. Letts, K. Fiedorczuk, L. A. Sazanov. // *Nature*. – 2016. – V. 537, N 7622. – P. 644-648.
211. Li L. Subcomplexes of Ancestral Respiratory Complex I Subunits Rapidly Turn Over in Vivo as Productive Assembly Intermediates in Arabidopsis / L. Li, C. J. Nelson, C. Carrie [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – V. 288, N 8. – P. 5707-5717.
212. Li X. General regulatory factor 3 regulates the expression of alternative oxidase 1a and the biosynthesis of glucosinolates in cytoplasmic male sterile Brassica juncea / X. Li, W. Lyu, Q. Cai [et al.] // *Plant Science*. – 2022. – V. 319, N 1. – P. 111244.
213. Licausi F. HRE1 and HRE2, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in Arabidopsis thaliana / F. Licausi, J. T. van Dongen, B. Giuntoli [et al.] // *Plant J*. – 2010. – V. 62, N 2. – P. 302-15.
214. Liere K. Transcription in Plant Mitochondria // *Plant Mitochondria* / Kempken F. – New York, NY: Springer New York, 2011a. – P. 85-105.
215. Liere K. Overexpression of phage-type RNA polymerase RpoTp in tobacco demonstrates its role in chloroplast transcription by recognizing a distinct promoter type / K. Liere, D. Kaden, P. Maliga [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2004. – V. 32, N 3. – P. 1159-1165.
216. Liere K. Plastid RNA Polymerases in Higher Plants // *Regulation of Photosynthesis* / Aro E.-M., Andersson B. – Dordrecht: Springer Netherlands, 2001. – P. 29-49.
217. Liere K. The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: composition, function, and regulation / K. Liere, A. Weihe, T. Börner. // *Journal of plant physiology*. – 2011b. – V. 168, N 12. – P. 1345-1360.
218. Ligas J. The assembly pathway of complex I in Arabidopsis thaliana / J. Ligas, E. Pineau, R. Bock [et al.] // *The Plant Journal*. – 2019. – V. 97, N 3. – P. 447-459.

219. Liu A. W. Co-transcription of Orf25 and coxIII in rice mitochondria / A. W. Liu, K. K. Narayanan, C. P. Andre [et al.] // *Curr Genet.* – 1992. – V. 21, N 6. – P. 507-13.
220. Liu J.-M. The E-Subgroup Pentatricopeptide Repeat Protein Family in *Arabidopsis thaliana* and Confirmation of the Responsiveness PPR96 to Abiotic Stresses / J.-M. Liu, J.-Y. Zhao, P.-P. Lu [et al.] // *Frontiers in Plant Science.* – 2016. – V. 7, N 1. – P. e1825.
221. Liu Y. Trithorax-group proteins *ARABIDOPSIS TRITHORAX4* (ATX4) and ATX5 function in abscisic acid and dehydration stress responses / Y. Liu, A. Zhang, H. Yin [et al.] // *New Phytol.* – 2018. – V. 217, N 1. – P.1582-1597.
222. Lizama L. Transcription initiation sites for the potato mitochondrial gene coding for subunit 9 of ATP synthase (atp9) / L. Lizama, L. Holuigue, X. Jordana. // *FEBS Lett.* – 1994. – V. 349, N 2. – P. 243-8.
223. Lonsdale D. M. The plant mitochondrial genome / D. M. Lonsdale. // *The Biochemistry of Plants.* – 1989. – V. 15, N 1. – P. 229-295.
224. Loschelder H. Dual Temporal Role of Plastid Sigma Factor 6 in *Arabidopsis* Development / H. Loschelder, J. Schweer, B. Link [et al.] // *Plant Physiology.* – 2006. – V. 142, N 2. – P. 642.
225. Lu B. Protein polymorphism generated by differential RNA editing of a plant mitochondrial rps12 gene / B. Lu, R. K. Wilson, C. G. Phreaner [et al.] // *Molecular and Cellular Biology.* – 1996. – V. 16, N 4. – P. 1543-1549.
226. Lupold D. S. The maize mitochondrial cox2 gene has five promoters in two genomic regions, including a complex promoter consisting of seven overlapping units / D. S. Lupold, A. G. Caoile, D. B. Stern. // *J Biol Chem.* – 1999. – V. 274, N 6. – P. 3897-903.
227. Lysenko E. A. Plastid RNA Polymerases / E. A. Lysenko, V. V. Kuznetsov. // *Molecular Biology.* – 2005. – V. 39, N 5. – P. 661-674.
228. Maclean A. E. Absence of Complex I Is Associated with Diminished Respiratory Chain Function in European Mistletoe / A. E. Maclean, A. P. Hertle, J. Ligas [et al.] // *Curr Biol.* – 2018. – V. 28, N 10. – P. 1614-1619.
229. Maier U. G. Complex chloroplast RNA metabolism: just debugging the genetic programme? / U. G. Maier, A. Bozarth, H. T. Funk [et al.] // *BMC biology.* – 2008. – V. 6, N 1. – P. 36-36.
230. Makaroff C. A. Extensive mitochondrial specific transcription of the *Brassica campestris* mitochondrial genome / C. A. Makaroff, J. D. Palmer. // *Nucleic Acids Res.* – 1987. – V. 15, N 13. – P. 5141-56.
231. Maloney A. P. Structural analysis of mature and dicistronic transcripts from the 18 S and 5 S ribosomal RNA genes of maize mitochondria / A. P. Maloney, V. Walbot. // *J Mol Biol.* – 1990. –

V. 213, N 4. – P. 633-49.

232. Maloney G. S. Characterization of the Branched-Chain Amino Acid Aminotransferase Enzyme Family in Tomato / G. S. Maloney, A. Kochevenko, D. M. Tieman [et al.] // *Plant Physiology*. – 2010. – V. 153, N 3. – P. 925-936.

233. Mansilla N. The Complexity of Mitochondrial Complex IV: An Update of Cytochrome c Oxidase Biogenesis in Plants / N. Mansilla, S. Racca, D. E. Gras [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2018. – V. 19, N 3. – P. 662.

234. Marechal-Drouard L. Transfer RNAs and Transfer RNA Genes in Plants / L. Marechal-Drouard, J. H. Weil, A. Dietrich. // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. – 1993. – V. 44, N 1. – P. 13-32.

235. Masters B. S. Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7 / B. S. Masters, L. L. Stohl, D. A. Clayton. // *Cell*. – 1987. – V. 51, N 1. – P. 89-99.

236. Mastrangelo A. M. Alternative splicing: Enhancing ability to cope with stress via transcriptome plasticity / A. M. Mastrangelo, D. Marone, G. Laidò [et al.] // *Plant Science*. – 2012. – V. 185-186. – P. 40-49.

237. Matthes A. Two DEAD-Box Proteins May Be Part of RNA-Dependent High-Molecular-Mass Protein Complexes in Arabidopsis Mitochondria / A. Matthes, S. Schmidt-Gattung, D. Köhler [et al.] // *Plant Physiology*. – 2007. – V. 145, N 4. – P. 1637-1646.

238. Melo A. M. P. Supramolecular organization of bacterial aerobic respiratory chains: From cells and back / A. M. P. Melo, M. Teixeira. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2016. – V. 1857, N 3. – P. 190-197.

239. Mense S. M. Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases / S. M. Mense, L. Zhang. // *Cell Research*. – 2006. – V. 16, N 8. – P. 681-692.

240. Meyer E. H. Insights into the Composition and Assembly of the Membrane Arm of Plant Complex I through Analysis of Subcomplexes in Arabidopsis Mutant Lines / E. H. Meyer, C. Solheim, S. K. Tanz [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – V. 286, N 29. – P. 26081-26092.

241. Meyer E. H. Resolving and Identifying Protein Components of Plant Mitochondrial Respiratory Complexes Using Three Dimensions of Gel Electrophoresis / E. H. Meyer, N. L. Taylor, A. H. Millar. // *Journal of Proteome Research*. – 2008. – V. 7, N 2. – P. 786-794.

242. Meyer E. H. Assembly of the Complexes of the Oxidative Phosphorylation System in Land Plant Mitochondria / E. H. Meyer, E. Welchen, C. Carrie. // *Annual Review of Plant Biology*. – 2019. – V. 70, N 1. – P. 23-50.

243. Milenkovic D. The Enigma of the Respiratory Chain Supercomplex / D. Milenkovic, J.

N. Blaza, N.-G. Larsson [et al.] // *Cell Metabolism*. – 2017. – V. 25, N 4. – P. 765-776.

244. Millar A. H. Mitochondrial cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plant specific subunits / A. H. Millar, H. Eubel, L. Jänsch [et al.] // *Plant Molecular Biology*. – 2004. – V. 56, N 1. – P. 77-90.

245. Millar A. H. Control of Ascorbate Synthesis by Respiration and Its Implications for Stress Responses / A. H. Millar, V. Mittova, G. Kiddle [et al.] // *Plant Physiology*. – 2003. – V. 133, N 2. – P. 443.

246. Mitsuhashi S. Muscle choline kinase beta defect causes mitochondrial dysfunction and increased mitophagy / S. Mitsuhashi, H. Hatakeyama, M. Karahashi [et al.] // *Human Molecular Genetics*. – 2011. – V. 20, N 19. – P. 3841–3851.

247. Mohr G. Putative proteins related to group II intron reverse transcriptase/maturases are encoded by nuclear genes in higher plants / G. Mohr, A. M. Lambowitz. // *Nucleic acids research*. – 2003. – V. 31, N 2. – P. 647-652.

248. Mondal S. Characterization of histone modifications associated with DNA damage repair genes upon exposure to gamma rays in Arabidopsis seedlings / S. Mondal, Y. S. Go, S. S. Lee [et al.] // *Journal of Radiation Research*. – 2016. – V. 57, N 6. – P. 646-654.

249. Monné M. Uncoupling proteins 1 and 2 (UCP1 and UCP2) from Arabidopsis thaliana are mitochondrial transporters of aspartate, glutamate, and dicarboxylates / M. Monné, L. Daddabbo, D. Gagneul [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2018. – V. 293, N 11. – P. 4213-4227.

250. Müller B Amino Acid Export in Developing Arabidopsis Seeds Depends on UmamiT Facilitators / B. Müller, A. Fastner, J. Karmann [et al.] // *Curr Biol*. – 2015. – V. 25, N 23. – P.3126-3131.

251. Mulligan R. M. Numerous transcription initiation sites exist for the maize mitochondrial genes for subunit 9 of the ATP synthase and subunit 3 of cytochrome oxidase / R. M. Mulligan, G. T. Lau, V. Walbot. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1988a. – V. 85, N 21. – P. 7998-8002.

252. Mulligan R. M. Transcriptional and posttranscriptional regulation of maize mitochondrial gene expression / R. M. Mulligan, P. Leon, V. Walbot. // *Mol Cell Biol*. – 1991. – V. 11, N 1. – P. 533-43.

253. Mulligan R. M. RNA processing and multiple transcription initiation sites result in transcript size heterogeneity in maize mitochondria / R. M. Mulligan, A. P. Maloney, V. Walbot. // *Mol Gen Genet*. – 1988b. – V. 211, N 3. – P. 373-80.

254. Murashige T. A. Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures / T. Murashige, F. Skoog. // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – V. 15, N 3. – P. 473-497.

255. Murcha M. W. Evidence for interactions between the mitochondrial import apparatus and

- respiratory chain complexes via Tim21-like proteins in Arabidopsis / M.W. Murcha, S. Kubiszewski-Jakubiak, Y. Wang, et al. // *Front Plant Sci.* – 2014. V. 5, N 82. – P. 2014.00082.
256. Nagashima A. DNA Microarray Analysis of Plastid Gene Expression in an Arabidopsis Mutant Deficient in a Plastid Transcription Factor Sigma, SIG2 / A. Nagashima, M. Hanaoka, R. Motohashi [et al.] // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* – 2004. – V. 68, N 3. – P. 694-704.
257. Nagashima A. The Multiple-Stress Responsive Plastid Sigma Factor, SIG5, Directs Activation of the psbD Blue Light-Responsive Promoter (BLRP) in Arabidopsis thaliana / A. Nagashima, M. Hanaoka, T. Shikanai [et al.] // *Plant and Cell Physiology.* – 2004. – V. 45, N 4. – P. 357-368.
258. Nakagawa N. A Mutation in At-nMat1a, Which Encodes a Nuclear Gene Having High Similarity to Group II Intron Maturase, Causes Impaired Splicing of Mitochondrial NAD4 Transcript and Altered Carbon Metabolism in Arabidopsisthaliana / N. Nakagawa, N. Sakurai. // *Plant and Cell Physiology.* – 2006. – V. 47, N 6. – P. 772-783.
259. Nakazono M. Multiple initiation sites for transcription of a gene for subunit 1 of F1-ATPase (atp1) in rice mitochondria / M. Nakazono, M. Ishikawa, K. T. Yoshida [et al.] // *Curr Genet.* – 1996a. – V. 29, N 5. – P. 417-22.
260. Nakazono M. A chloroplast-derived sequence is utilized as a source of promoter sequences for the gene for subunit 9 of NADH dehydrogenase (nad9) in rice mitochondria / M. Nakazono, S. Nishiwaki, N. Tsutsumi [et al.] // *Mol Gen Genet.* – 1996b. – V. 252, N 4. – P. 371-8.
261. K. H. Nam, J. Li. The Arabidopsis Transthyretin-Like Protein Is a Potential Substrate of BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 // *The Plant Cell.* – 2004. – V. 16, N 9. – P. 2406-2417.
262. Naulin P. A. Nitrate Induction of Primary Root Growth Requires Cytokinin Signaling in Arabidopsis thaliana / P. A. Naulin, G. I. Armijo, A. S. Vega [et al.] // *Plant Cell Physiol.* – 2020. – V. 61, N 2. – P. 342-352.
263. Naumann C. The Local Phosphate Deficiency Response Activates Endoplasmic Reticulum Stress-Dependent Autophagy / C. Naumann, J. Müller, S. Sakhonwasee [et al.] // *Plant Physiology.* – 2019. – V. 179, N 2. – P.460-476.
264. Nelson C. J. Quantitative analysis of protein turnover in plants / C. J. Nelson, L. Li, A. H. Millar. // *PROTEOMICS.* – 2014. – V. 14, N 4-5. – P. 579-592.
265. Newton K. J. Plant Mitochondrial Genomes: Organization, Expression and Variation / K. J. Newton. // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* – 1988. – V. 39, N 1. – P. 503-532.
266. Newton K. J. Evidence for a novel mitochondrial promoter preceding the cox2 gene of perennial teosintes / K. J. Newton, B. Winberg, K. Yamato [et al.] // *Embo j.* – 1995. – V. 14, N 3. – P. 585-93.

267. Nietzel T. Redox-mediated kick-start of mitochondrial energy metabolism drives resource-efficient seed germination / T. Nietzel, J. Mostertz, C. Ruberti [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – V. 117, N 1. – P. 741-751.
268. Nijtmans L. G. J. The mitochondrial PHB complex: Roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease / L. G. J. Nijtmans, M. Artal Sanz, L. A. Grivell [et al.] // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2002. – V. 59, N 1. – P.143-155.
269. Nixon P. J. Chlororespiratory Pathways and Their Physiological Significance // *The Structure and Function of Plastids* / Wise R. R., Hooper J. K. – Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. – C. 237-251. P. J. Nixon, P. R. Rich. Chlororespiratory Pathways and Their Physiological Significance // *The Structure and Function of Plastids* / Wise R. R., Hooper J. K. – Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. – P. 237-251.
270. Nozato N. Cotranscriptional expression of mitochondrial genes for subunits of NADH dehydrogenase, nad5, nad4, nad2, in *Marchantia polymorpha* / N. Nozato, K. Oda, K. Yamato [et al.] // *Mol Gen Genet.* – 1993. – V. 237, N 3. – P. 343-50.
271. Nunes-Nesi A. Targeting Mitochondrial Metabolism and Machinery as a Means to Enhance Photosynthesis / A. Nunes-Nesi, W. L. Araújo, A. R. Fernie. // *Plant Physiology*. – 2010. – V. 155, N 1. – P. 101-107.
272. Oda K. Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA. A primitive form of plant mitochondrial genome / K. Oda, K. Yamato, E. Ohta [et al.] // *J Mol Biol.* – 1992. – V. 223, N 1. – P. 1-7.
273. Okada S. Transcript levels in plant mitochondria show a tight homeostasis during day and night / S. Okada, A. Brennicke. // *Molecular Genetics and Genomics*. – 2006. – V. 276, N 1. – P. 71-78.
274. Oldenburg D. J. DNA maintenance in plastids and mitochondria of plants / D. J. Oldenburg, A. J. Bendich. // *Frontiers in Plant Science*. – 2015. – V. 6, N 1. – P. 883.
275. Onda Y. Light induction of *Arabidopsis* SIG1 and SIG5 transcripts in mature leaves: differential roles of cryptochrome 1 and cryptochrome 2 and dual function of SIG5 in the recognition of plastid promoters / Y. Onda, Y. Yagi, Y. Saito [et al.] // *The Plant Journal*. – 2008. – V. 55, N 6. – P. 968-978.
276. Österberg S. Regulation of Alternative Sigma Factor Use / S. Österberg, T. d. Pesosantos, V. Shingler. // *Annual Review of Microbiology*. – 2011. – V. 65, N 1. – P. 37-55.
277. Ostersetzer O. Multiple Intracellular Locations of Lon Protease in *Arabidopsis*: Evidence for the Localization of AtLon4 to Chloroplasts / O. Ostersetzer, Y. Kato, Z. Adam [et al.] // *Plant and Cell Physiology*. – 2007. – V. 48, N 6. – P. 881-885.
278. Osteryoung K. W. The Division of Endosymbiotic Organelles / K. W. Osteryoung, J. Nunnari. // *Science*. – 2003. – V. 302, N 5651. – P. 1698-1704.

279. Pandey N. CAMTA 1 regulates drought responses in *Arabidopsis thaliana* / N. Pandey, A. Ranjan, P. Pant [et al.] // *BMC Genomics*. – 2013. – V. 14, N 1. – P. 216.
280. Parey K. Cryo-EM structure of respiratory complex I at work / K. Parey, U. Brandt, H. Xie [et al.] // *eLife*. – 2018. – V. 7, N 1. – P. e39213.
281. Parisi G. Gamma carbonic anhydrases in plant mitochondria / G. Parisi, M. Perales, M. S. Fornasari [et al.] // *Plant Mol Biol*. – 2004. – V. 55, N 2. – P. 193-207.
282. Paumard P. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology / P. Paumard, J. Vaillier, B. Couлары [et al.] // *Embo j*. – 2002. – V. 21, N 3. – P. 221-230.
283. Pedersen T. ggraph: An Implementation of Grammar of Graphics for Graphs and Networks / T. Pedersen // R package version 2.2.1.9000. – 2024. URL: <https://ggraph.data-imaginist.com>.
284. Perales M. Disruption of a Nuclear Gene Encoding a Mitochondrial Gamma Carbonic Anhydrase Reduces Complex I and Supercomplex I+III2 Levels and Alters Mitochondrial Physiology in *Arabidopsis* / M. Perales, H. Eubel, J. Heinemeyer [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 2005. – V. 350, N 2. – P. 263-277.
285. Perales M. Gamma carbonic anhydrase like complex interact with plant mitochondrial complex I / M. Perales, G. Parisi, M. S. Fornasari [et al.] // *Plant Molecular Biology*. – 2004. – V. 56, N 6. – P. 947-957.
286. Perrin R. Two Exoribonucleases Act Sequentially to Process Mature 3'-Ends of *atp9* mRNAs in *Arabidopsis* Mitochondria / R. Perrin, E. H. Meyer, M. Zaepfel [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – V. 279, N 24. – P. 25440-25446.
287. Pesaresi P. Nuclear Photosynthetic Gene Expression Is Synergistically Modulated by Rates of Protein Synthesis in Chloroplasts and Mitochondria / P. Pesaresi, S. Masiero, H. Eubel [et al.] // *The Plant Cell*. – 2006. – V. 18, N 4. – P. 970-991.
288. Pesaresi P. Interorganellar communication / P. Pesaresi, A. Schneider, T. Kleine [et al.] // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2007. – V. 10, N 6. – P. 600-606.
289. Peters K. A structural investigation of complex I and I+III2 supercomplex from *Zea mays* at 11–13 Å resolution: Assignment of the carbonic anhydrase domain and evidence for structural heterogeneity within complex I / K. Peters, N. V. Dudkina, L. Jansch [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2008. – V. 1777, N 1. – P. 84-93.
290. Petersen G. Mitochondria in parasitic plants / G. Petersen, B. Anderson, H.-P. Braun [et al.] // *Mitochondrion*. – 2020. – V. 52, N 1. – P. 173-182.
291. Petrillo E. Let there be light: Regulation of gene expression in plants / E. Petrillo, M. A. Godoy Herz, A. Barta [et al.] // *RNA Biology*. – 2014a. – V. 11, N 10. – P. 1215-1220.
292. Petrillo E. A Chloroplast Retrograde Signal Regulates Nuclear Alternative Splicing / E.

Petrillo, M. A. G. Herz, A. Fuchs [et al.] // *Science*. – 2014b. – V. 344, N 6182. – P. 427-430.

293. Pfalz J. pTAC2, -6, and -12 Are Components of the Transcriptionally Active Plastid Chromosome That Are Required for Plastid Gene Expression / J. Pfalz, K. Liere, A. Kandlbinder [et al.] // *The Plant Cell*. – 2005. – V. 18, N 1. – P. 176-197.

294. Pfannschmidt T. The A and B forms of plastid DNA-dependent RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba* L.) transcribe the same genes in a different developmental context / T. Pfannschmidt, G. Link. // *Molecular and General Genetics MGG*. – 1997. – V. 257, N 1. – P. 35-44.

295. Phreaner C. G. Incomplete editing of rps12 transcripts results in the synthesis of polymorphic polypeptides in plant mitochondria / C. G. Phreaner, M. A. Williams, R. M. Mulligan. // *The Plant Cell*. – 1996. – V. 8, N 1. – P. 107-117.

296. Pilon-Smits E. A. H. Sulfur Metabolism in Plastids // *The Structure and Function of Plastids* / Wise R. R., Hooper J. K. – Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. – C. 387-402. E. A. H. Pilon-Smits, M. Pilon. Sulfur Metabolism in Plastids // *The Structure and Function of Plastids* / Wise R. R., Hooper J. K. – Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. – P. 387-402.

297. Pineau B. l-Galactono-1,4-lactone Dehydrogenase Is Required for the Accumulation of Plant Respiratory Complex I / B. Pineau, O. Layoune, A. Danon [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – V. 283, N 47. – P. 32500-32505.

298. Pires M. V. The influence of alternative pathways of respiration that utilize branched-chain amino acids following water shortage in *Arabidopsis* / M. V. Pires, A. A. Pereira Júnior, D. B. Medeiros [et al.] // *Plant, Cell & Environment*. – 2016. – V. 39, N 6. – P. 1304-1319.

299. Planchard N. The translational landscape of *Arabidopsis* mitochondria / N. Planchard, P. Bertin, M. Quadrado [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – V. 46, N 12. – P. 6218-6228.

300. Preuten T. Fewer genes than organelles: Extremely low and variable gene copy numbers in mitochondria of somatic plant cells / T. Preuten, E. Cincu, J. Fuchs [et al.] // *Plant Journal*. – 2010. – V. 64, N 6. – P. 948-959.

301. Privat I. Characterization of *Arabidopsis* plastid sigma-like transcription factors SIG1, SIG2 and SIG3 / I. Privat, M. A. Hakimi, L. Buhot [et al.] // *Plant Mol Biol*. – 2003. – V. 51, N 3. – P. 385-99.

302. Przybyla-Toscano J. Iron-sulfur proteins in plant mitochondria: roles and maturation / J. Przybyla-Toscano, L. Christ, O. Keech [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2020. – V. 72, N 6. – P. 2014-2044.

303. Quesada V. *Arabidopsis* RUGOSA2 encodes an mTERF family member required for mitochondrion, chloroplast and leaf development / V. Quesada, R. Sarmiento-Mañús, R. González-Bayón [et al.] // *The Plant Journal*. – 2011. – V. 68, N 4. – P. 738-753.

304. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. //

- Book R: A language and environment for statistical computing. – Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2022.
305. Raghavendra A. S. Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation / A. S. Raghavendra, K. Padmasree. // Trends in Plant Science. – 2003. – V. 8, N 11. – P. 546-553.
306. Rapp W. D. Architecture of the maize mitochondrial atp1 promoter as determined by linker-scanning and point mutagenesis / W. D. Rapp, D. S. Lupold, S. Mack [et al.] // Molecular and Cellular Biology. – 1993. – V. 13, N 12. – P. 7232-7238.
307. Rapp W. D. A conserved 11 nucleotide sequence contains an essential promoter element of the maize mitochondrial atp1 gene / W. D. Rapp, D. B. Stern. // Embo j. – 1992. – V. 11, N 3. – P. 1065-73.
308. Rashid A. PELPK1 (At5g09530) contains a unique pentapeptide repeat and is a positive regulator of germination in Arabidopsis thaliana / A. Rashid, M. K. Deyholos. // Plant Cell Reports. – 2011. – V. 30, N 9. – P. 1735-1745.
309. Rasmusson A. G. Rotenone-insensitive NAD(P)H dehydrogenases in plants: Immunodetection and distribution of native proteins in mitochondria / A. G. Rasmusson, S. C. Agius. // Plant Physiology and Biochemistry. – 2001. – V. 39, N 12. – P. 1057-1066.
310. Rasmusson A. G. Mitochondrial NAD(P)H oxidation pathways and nitrate/ammonium redox balancing in plants / A. G. Rasmusson, M. A. Escobar, M. Hao [et al.] // Mitochondrion. – 2020. – V. 53, N 1. – P. 158-165.
311. Rasmusson A. G. The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria / A. G. Rasmusson, D. A. Geisler, I. M. Møller. // Mitochondrion. – 2008. – V. 8, N 1. – P. 47-60.
312. Rhoads D. M. Plant Mitochondrial Retrograde Regulation // Plant Mitochondria / Kempken F. – New York, NY: Springer New York, 2011. – C. 411-437. D. M. Rhoads. Plant Mitochondrial Retrograde Regulation // Plant Mitochondria / Kempken F. – New York, NY: Springer New York, 2011. – P. 411-437.
313. Richter U. A third mitochondrial RNA polymerase in the moss Physcomitrella patens / U. Richter, B. Richter, A. Weihe [et al.] // Curr Genet. – 2014. – V. 60, N 1. – P. 25-34.
314. Ritchie M. E. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies / M. E. Ritchie, B. Phipson, D. Wu [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2015. – V. 43, N 7. – P. e47-e47.
315. Rodriguez-Corona U. Novel Ribonuclease Activity Differs between Fibrillarins from Arabidopsis thaliana / U. Rodriguez-Corona, A. Pereira-Santana, M. Sobol [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2017. – V. 8, N 1. – P. 1878.

316. Romani I. A Member of the Arabidopsis Mitochondrial Transcription Termination Factor Family Is Required for Maturation of Chloroplast Transfer RNA<sub>leu(GAU)</sub> / I. Romani, N. Manavski, A. Morosetti [et al.] // *Plant Physiology*. – 2015. – V. 169, N 1. – P. 627-646.
317. Rook F. Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression / F. Rook, S. A. Hadingham, Y. Li [et al.] // *Plant, Cell & Environment*. – 2006. – V. 29, N 3. – P. 426-434.
318. Rosso M. G. An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reversegenetics / M. G. Rosso, Y. Li, N. Strizhov, [et al.] // *Plant Mol Biol*. – 2003. – V. 53, N 1. – P. 247-259.
319. Russo P. S. T. CEMiTool: a Bioconductor package for performing comprehensive modular co-expression analyses / P. S. T. Russo, G. R. Ferreira, L. E. Cardozo [et al.] // *BMC Bioinformatics*. – 2018. – V. 19, N 1. – P. 56.
320. Ruwe H. Systematic analysis of plant mitochondrial and chloroplast small RNAs suggests organelle-specific mRNA stabilization mechanisms / H. Ruwe, G. Wang, S. Gusewski [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – V. 44, N 15. – P. 7406-7417.
321. Sabar M. Histochemical staining and quantification of plant mitochondrial respiratory chain complexes using blue-native polyacrylamide gel electrophoresis / M. Sabar, J. Balk, C. J. Leaver // *The Plant Journal*. – V. 44, N 1. – P. 893-901.
322. Santaniello A. A reassessment of the role of sucrose synthase in the hypoxic sucrose-ethanol transition in Arabidopsis / A. Santaniello, E. Loreti, S. Gonzali [et al.] // *Plant Cell Environ*. – 2014. – V. 37, N 10. – P. 2294-2302.
323. Sato M. Bacterial Alarmone, Guanosine 5'-Diphosphate 3'-Diphosphate (ppGpp), Predominantly Binds the  $\beta'$  Subunit of Plastid-Encoded Plastid RNA Polymerase in Chloroplasts / M. Sato, K. Takahashi, Y. Ochiai [et al.] // *ChemBioChem*. – 2009. – V. 10, N 7. – P. 1227-1233.
324. Sato N. Origin and Evolution of Plastids: Genomic View on the Unification and Diversity of Plastids // *The Structure and Function of Plastids* / Wise R. R., Hooper J. K. – Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. – P. 75-102.
325. Sato S. Complete Structure of the Chloroplast Genome of Arabidopsis thaliana / S. Sato, Y. Nakamura, T. Kaneko [et al.] // *DNA Research*. – 1999. – V. 6, N 5. – P. 283-290.
326. Schäfer K. The Plant Mitochondrial TAT Pathway Is Essential for Complex III Biogenesis / K. Schäfer, P. Künzler, K. Schneider [et al.] // *Curr Biol*. – 2020. – V. 30, N 5. – P. 840-853.e5.
327. Schägger H. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria / H. Schägger, K. Pfeiffer. // *Embo j*. – 2000. – V. 19, N 8. – P. 1777-83.
328. Schertl P. Respiratory electron transfer pathways in plant mitochondria / P. Schertl, H. P. Braun. // *Front Plant Sci*. – 2014. – V. 5, N 1. – P. 163.

329. Schikowsky C. SDH6 and SDH7 Contribute to Anchoring Succinate Dehydrogenase to the Inner Mitochondrial Membrane in *Arabidopsis thaliana* / C. Schikowsky, J. Senkler, H.-P. Braun. // *Plant Physiology*. – 2017. – V. 173, N 2. – P. 1094-1108.
330. Schimmeyer J. 1-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase is an assembly factor of the membrane arm of mitochondrial complex I in *Arabidopsis* / J. Schimmeyer, R. Bock, E. H. Meyer. // *Plant Molecular Biology*. – 2016. – V. 90, N 1. – P. 117-126.
331. Schmid M. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development / M. Schmid, T. S. Davison, S. R. Henz [et al.] // *Nat Genet*. – 2005. – V. 37, N 5. – P. 501-6.
332. Schmitz-Linneweber C. Organellar maturases: A window into the evolution of the spliceosome / C. Schmitz-Linneweber, M.-K. Lampe, L. D. Sultan [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2015. – V. 1847, N 9. – P. 798-808.
333. Schwarzländer M. The impact of impaired mitochondrial function on retrograde signalling: a meta-analysis of transcriptomic responses / M. Schwarzländer, A.-C. König, L. J. Sweetlove [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2011. – V. 63, N 4. – P. 1735-1750.
334. Schweer J. A promoter switch that can rescue a plant sigma factor mutant / J. Schweer, H. Loschelder, G. Link. // *FEBS Letters*. – 2006. – V. 580, N 28. – P. 6617-6622.
335. Schweer J. Role and regulation of plastid sigma factors and their functional interactors during chloroplast transcription – Recent lessons from *Arabidopsis thaliana* / J. Schweer, H. Türkeri, A. Kolpack [et al.] // *European Journal of Cell Biology*. – 2010a. – V. 89, N 12. – P. 940-946.
336. Schweer J. AtSIG6, a plastid sigma factor from *Arabidopsis*, reveals functional impact of cpCK2 phosphorylation / J. Schweer, H. Türkeri, B. Link [et al.] // *The Plant Journal*. – 2010b. – V. 62, N 2. – P. 192-202.
337. Sengupta D. Plant aldo-keto reductases (AKRs) as multi-tasking soldiers involved in diverse plant metabolic processes and stress defense: A structure-function update / D. Sengupta, D. Naik, A. R. Reddy. // *J Plant Physiol*. – 2015. – V. 179, N 1. – P. 40-55.
338. Senkler J. Absence of Complex I Implicates Rearrangement of the Respiratory Chain in European Mistletoe / J. Senkler, N. Rugen, H. Eubel [et al.] // *Current Biology*. – 2018. – V. 28, N 10. – P. 1606-1613.
339. Senkler J. Structure and function of complex I in animals and plants – a comparative view / J. Senkler, M. Senkler, H.-P. Braun. // *Physiologia Plantarum*. – 2017a. – V. 161, N 1. – P. 6-15.
340. Senkler J. The mitochondrial complexome of *Arabidopsis thaliana* / J. Senkler, M. Senkler, H. Eubel [et al.] // *Plant J*. – 2017b. – V. 89, N 6. – P. 1079-1092.
341. Shevtsov S. Control of organelle gene expression by the mitochondrial transcription termination factor mTERF22 in *Arabidopsis thaliana* plants / S. Shevtsov, K. Nevo-Dinur, L. Faigon [et al.] // *PloS one*. – 2018. – V. 13, N 7. – P. e0201631-e0201631.

342. Shi X. Organelle RNA recognition motif-containing (ORRM) proteins are plastid and mitochondrial editing factors in Arabidopsis / X. Shi, S. Bentolila, M. R. Hanson. // *Plant Signaling & Behavior*. – 2016. – V. 11, N 5. – P. e1167299.
343. Shiina T. Plastid RNA Polymerases, Promoters, and Transcription Regulators in Higher Plants // *International Review of Cytology*. Academic Press, 2005. – T. Shiina, Y. Tsunoyama, Y. Nakahira [et al.] Plastid RNA Polymerases, Promoters, and Transcription Regulators in Higher Plants // *International Review of Cytology*. Academic Press, 2005. – P. 1-68.
344. Shimizu M. Sigma factor phosphorylation in the photosynthetic control of photosystem stoichiometry / M. Shimizu, H. Kato, T. Ogawa [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – V. 107, N 23. – P. 10760-10764.
345. Schloerke B. GGally: Extension to 'ggplot2' / B. Shloerke, D. Cook, J. Larmarange [et al.] // R package version 2.2.1. – 2024. URL: <https://github.com/ggobi/ggally>.
346. Shu K. ABI4 regulates primary seed dormancy by regulating the biogenesis of abscisic acid and gibberellins in Arabidopsis / K. Shu, H. Zhang, Sh. Wang [et al.] // *PLOS Genetics*. – 2013. – V. 9, N 6. – P. e1003577.
347. Sloan D. B. Rapid Evolution of Enormous, Multichromosomal Genomes in Flowering Plant Mitochondria with Exceptionally High Mutation Rates / D. B. Sloan, A. J. Alverson, J. P. Chuckalovcak [et al.] // *PLOS Biology*. – 2012. – V. 10, N 1. – P. e1001241.
348. Sloan D. B. Correction of Persistent Errors in Arabidopsis Reference Mitochondrial Genomes / D. B. Sloan, Z. Wu, J. Sharbrough. // *The Plant Cell*. – 2018. – V. 30, N 3. – P. 525-527.
349. Small I. D. Plant organellar RNA editing: what 30 years of research has revealed / I. D. Small, M. Schallenberg-Rüdinger, M. Takenaka [et al.] // *The Plant Journal*. – 2020. – V. 101, N 5. – P. 1040-1056.
350. Smirnova E. Jasmonic Acid Oxidase 2 Hydroxylates Jasmonic Acid and Represses Basal Defense and Resistance Responses against Botrytis cinerea Infection / E. Smirnova, V. Marquis, L. Poirier [et al.] // *Molecular Plant*. – 2017. – V. 10, N 9. – P. 1159-1173.
351. Smyth G. K. limma: Linear Models for Microarray Data // *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor* / Gentleman R. и др. – New York, NY: Springer New York, 2005. – C. 397-420. G. K. Smyth. limma: Linear Models for Microarray Data // *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor* / Gentleman R. и др. – New York, NY: Springer New York, 2005. – P. 397-420.
352. Song Y. The direct targets of CBFs: In cold stress response and beyond / Y. Song, X. Zhang, M. Li [et al.] // *Journal of Integrative Plant Biology*. – 2021. – V. 63, N 11. – P. 1874-1887.
353. Soufari H. Specific features and assembly of the plant mitochondrial complex I revealed by cryo-EM / H. Soufari, C. Parrot, L. Kuhn [et al.] // *Nature Communications*. – 2020. – V. 11, N 1. –

P. 5195.

354. Sousa R. T7 RNA Polymerase // Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition) / Lennarz W. J., Lane M. D. – Waltham: Academic Press, 2013. – P. 355-359.

355. Sriraman P. The phage-type PclpP-53 plastid promoter comprises sequences downstream of the transcription initiation site / P. Sriraman, D. Silhavy, P. Maliga. // Nucleic Acids Research. – 1998. – V. 26, N 21. – P. 4874-4879.

356. Staudinger M. Mitochondrial electroporation and in organello RNA editing of chimeric atp6 transcripts / M. Staudinger, N. Bolle, F. Kempken. // Molecular Genetics and Genomics. – 2005. – V. 273, N 2. – P. 130-136.

357. Steiner S. Identification of Essential Subunits in the Plastid-Encoded RNA Polymerase Complex Reveals Building Blocks for Proper Plastid Development / S. Steiner, Y. Schröter, J. Pfalz [et al.] // Plant Physiology. – 2011. – V. 157, N 3. – P. 1043-1055.

358. Stoppel R. RHON1 is a novel ribonucleic acid-binding protein that supports RNase E function in the Arabidopsis chloroplast / R. Stoppel, N. Manavski, A. Schein [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2012. – V. 40, N 17. – P. 8593-8606.

359. Strittmatter G. Identification of an rRNA operon promoter from Zea mays chloroplasts which excludes the proximal tRNAValGAC from the primary transcript / G. Strittmatter, A. Gozdzicka-Jozefiak, H. Kossel. // Embo j. – 1985. – V. 4, N 3. – P. 599-604.

360. Sunderhaus S. Carbonic Anhydrase Subunits Form a Matrix-exposed Domain Attached to the Membrane Arm of Mitochondrial Complex I in Plants / S. Sunderhaus, N. V. Dudkina, L. Jansch [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2006. – V. 281, N 10. – P. 6482-6488.

361. Suzuki A. Chapter Four - Glutamate synthase and amino acid synthesis in higher plants // Advances in Botanical Research / Jacquot J.-P. Academic Press, 2021. – P. 129-144.

362. Sweetlove L. J. The Mitochondrion: An Integration Point of Cellular Metabolism and Signalling / L. J. Sweetlove, A. Fait, A. Nunes-Nesi [et al.] // Critical Reviews in Plant Sciences. – 2007a. – V. 26, N 1. – P. 17-43.

363. Sweetlove L. J. Isolation of Intact, Functional Mitochondria From the Model Plant Arabidopsis thaliana. Mitochondria: Practical Protocols / L. J. Sweetlove, N. L. Taylor, C. J. Leaver // Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2007b; pp. 125–136.

364. Swiatecka-Hagenbruch M. Impaired function of the phage-type RNA polymerase RpoTp in transcription of chloroplast genes is compensated by a second phage-type RNA polymerase / M. Swiatecka-Hagenbruch, C. Emanuel, B. Hedtke [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2008. – V. 36, N 3. – P. 785-92.

365. Swiatecka-Hagenbruch M. High diversity of plastidial promoters in Arabidopsisthaliana / M. Swiatecka-Hagenbruch, K. Liere, T. Börner. // Molecular Genetics and Genomics. – 2007. – V.

277, N 6. – P. 725-734.

366. Syed N. H. Alternative splicing in plants – coming of age / N. H. Syed, M. Kalyna, Y. Marquez [et al.] // Trends in Plant Science. – 2012. – V. 17, N 10. – P. 616-623.

367. SZAL B. The role of mitochondria in leaf nitrogen metabolism / B. SZAL, A. PODGÓRSKA. // Plant, Cell & Environment. – 2012. – V. 35, N 10. – P. 1756-1768.

368. Tadini L. GUN1 Controls Accumulation of the Plastid Ribosomal Protein S1 at the Protein Level and Interacts with Proteins Involved in Plastid Protein Homeostasis / L. Tadini, P. Pesaresi, T. Kleine [et al.] // Plant Physiology. – 2016. – V. 170, N 3. – P. 1817-1830.

369. Takahashi K. Identification of the bacterial alarmone guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) in plants / K. Takahashi, K. Kasai, K. Ochi. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – V. 101, N 12. – P. 4320-4324.

370. Takenaka M. MEF9, an E-Subclass Pentatricopeptide Repeat Protein, Is Required for an RNA Editing Event in the nad7 Transcript in Mitochondria of Arabidopsis / M. Takenaka. // Plant Physiology. – 2009. – V. 152, N 2. – P. 939-947.

371. Takenaka M. Multiple organellar RNA editing factor (MORF) family proteins are required for RNA editing in mitochondria and plastids of plants / M. Takenaka, A. Zehrmann, D. Verbitskiy [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – V. 109, N 13. – P. 5104-5109.

372. Tan X. Y. Mutations in the Arabidopsis nuclear-encoded mitochondrial phage-type RNA polymerase gene RPOtm led to defects in pollen tube growth, female gametogenesis and embryogenesis / X. Y. Tan, X. L. Liu, W. Wang [et al.] // Plant Cell Physiol. – 2010. – V. 51, N 4. – P. 635-49.

373. Tarasenko V. I. RPOtmp, an Arabidopsis RNA polymerase with dual targeting, plays an important role in mitochondria, but not in chloroplasts / V. I. Tarasenko, A. I. Katyshev, T. V. Yakovleva [et al.] // Journal of experimental botany. – 2016. – V. 67, N 19. – P. 5657-5669.

374. Tarasenko V. I. Overexpression of RPOtmp, an Arabidopsis RNA-polymerase with dual-targeting, influences plant growth and transcriptome / V. I. Tarasenko, A. I. Katyshev, I. V. Gorbenko [et al.] // Current Challenges in Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology: Proceedings of the Fifth International Scientific Conference PlantGen2019 (June 24–29, 2019, Novosibirsk, Russia) / Eds. A. Kochetov, E. Salina / Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2019. – 252 pp. – P. 169-172

375. Tarasenko V. I. Differential Expression of a Foreign Gene in Arabidopsis Mitochondria In Organello / V. I. Tarasenko, T. A. Tarasenko, I. V. Gorbenko [et al.] // Mol Biol. – 2023. – V. 57, N 1. – P. 447-456.

376. Thum K. E. Analysis of barley chloroplast psbD light-responsive promoter elements in

- transplastomic tobacco / K. E. Thum, M. Kim, D. T. Morishige [et al.] // *Plant Mol Biol.* – 2001. – V. 47, N 3. – P. 353-66.
377. Tomal A. An Update on Mitochondrial Ribosome Biology: The Plant Mitoribosome in the Spotlight / A. Tomal, M. Kwasniak-Owczarek, H. Janska. // *Cells.* – 2019. – V. 8, N 12. – P. 1562.
378. Tracy R. L. Mitochondrial transcription initiation: promoter structures and RNA polymerases / R. L. Tracy, D. B. Stern. // *Current genetics.* – 1995. – V. 28, N 3. – P. 205-216.
379. Trouillard M. Questioning the functional relevance of mitochondrial supercomplexes by time-resolved analysis of the respiratory chain / M. Trouillard, B. Meunier, F. Rappaport. // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2011. – V. 108, N 45. – P. E1027.
380. Tsunoyama Y. Blue light specific and differential expression of a plastid  $\sigma$  factor, Sig5 in *Arabidopsis thaliana* / Y. Tsunoyama, K. Morikawa, T. Shiina [et al.] // *FEBS Letters.* – 2002. – V. 516, N 1. – P. 225-228.
381. Ukolova I. V. New insights into the organisation of the oxidative phosphorylation system in the example of pea shoot mitochondria / I. V. Ukolova, M. A. Kondakova, I. G. Kondratov [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* – 2020. – V. 1861, N 11. – P. 148264.
382. Unseld M. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides / M. Unseld, J. R. Marienfeld, P. Brandt [et al.] // *Nat Genet.* – 1997. – V. 15, N 1. – P. 57-61.
383. Van Aken O. Retrograde signalling caused by heritable mitochondrial dysfunction is partially mediated by ANAC017 and improves plant performance / O. Van Aken, E. Ford, R. Lister [et al.] // *The Plant Journal.* – 2016. – V. 88, N 4. – P. 542-558.
384. Van Aken O. Comparison of Transcriptional Changes to Chloroplast and Mitochondrial Perturbations Reveals Common and Specific Responses in *Arabidopsis* / O. Van Aken, J. Whelan. // *Frontiers in Plant Science.* – 2012. – V. 3, N 1. – P. 281.
385. van Lis R. Control of Mitochondrial Function via Photosynthetic Redox Signals / R. van Lis, A. Atteia. // *Photosynthesis Research.* – 2004. – V. 79, N 2. – P. 133-148.
386. Verbitskiy D. The E-Class PPR Protein MEF3 of *Arabidopsis thaliana* Can Also Function in Mitochondrial RNA Editing With an Additional DYW Domain / D. Verbitskiy, J. A. v. d. Merwe, A. Zehrmann [et al.] // *Plant and Cell Physiology.* – 2011. – V. 53, N 2. – P. 358-367.
387. Verbitskiy D. The PPR protein encoded by the LOVASTATIN INSENSITIVE 1 gene is involved in RNA editing at three sites in mitochondria of *Arabidopsis thaliana* / D. Verbitskiy, A. Zehrmann, J. A. Van Der Merwe [et al.] // *The Plant Journal.* – 2010. – V. 61, N 3. – P. 446-455.
388. Voegelé A. Members of the gibberellin receptor gene family GID1 (GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1) play distinct roles during *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana* seed germination / A. Voegelé, A. Linkies, K. Müller [et al.] // *Journal of Experimental Botany.* – 2011. – V.

62, N 14. – P. 5131-5147.

389. Vothknecht U. C. Biogenesis and origin of thylakoid membranes / U. C. Vothknecht, P. Westhoff. // *Biochim Biophys Acta*. – 2001. – V. 1541, N 1-2. – P. 91-101.

390. W Schuster a. The Plant Mitochondrial Genome: Physical Structure, Information Content, RNA Editing, and Gene Migration to the Nucleus / a. W Schuster, A. Brennicke. // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. – 1994. – V. 45, N 1. – P. 61-78.

391. Waltz F. Specificities of the plant mitochondrial translation apparatus / F. Waltz, N. Corre, Y. Hashem [et al.] // *Mitochondrion*. – 2020a. – V. 53, N 1. – P. 30-37.

392. Waltz F. Striking Diversity of Mitochondria-Specific Translation Processes across Eukaryotes / F. Waltz, P. Giegé. // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2020b. – V. 45, N 2. – P. 149-162.

393. Waltz F. Small is big in Arabidopsis mitochondrial ribosome / F. Waltz, T.-T. Nguyen, M. Arrivé [et al.] // *Nature Plants*. – 2019. – V. 5, N 1. – P. 106-117.

394. Waltz F. Cryo-EM structure of the RNA-rich plant mitochondrial ribosome / F. Waltz, H. Soufari, A. Bochler [et al.] // *Nat Plants*. – 2020c. – V. 6, N 4. – P. 377-383.

395. Wang T. Histone acetyltransferase GCN5-mediated regulation of long non-coding RNA At4 contributes to phosphate starvation response in Arabidopsis / T. Wang, J. Xing, Z. Liu, M. Zheng, Y. Yao, Z/ Hu, H. Peng, M. Xin, D. Zhou, Z. Ni // *Journal of Experimental Botany*. – 2019. – V. 70, N.21. – P. 6337–6348.

396. Wang X. Chloroplast numbers, mitochondrion numbers and carbon assimilation physiology of *Nicotiana sylvestris* as affected by CO<sub>2</sub> concentration / X. Wang, O. R. Anderson, K. L. Griffin. // *Environmental and Experimental Botany*. – 2004. – V. 51, N 1. – P. 21-31.

397. Wang Y. Inactivation of Mitochondrial Complex I Induces the Expression of a Twin Cysteine Protein that Targets and Affects Cytosolic, Chloroplastidic and Mitochondrial Function / Y. Wang, W. Lyu, O. Berkowitz [et al.] // *Molecular Plant*. – 2016. – V. 9, N 5. – P. 696-710.

398. Wei P.C. Overexpression of AtDOF4.7, an Arabidopsis DOF Family Transcription Factor, Induces Floral Organ Abscission Deficiency in Arabidopsis / P.C. Weng, T. Feng, T. Xin-Qi [et al.] // *Plant Physiology*. – 2010. – V. 153, N 3. – P. 1031-1045.

399. Weihe A. The Transcription of Plant Organelle Genomes // *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles: Chloroplasts and Mitochondria* / Daniell H., Chase C. – Dordrecht: Springer Netherlands, 2004. – P. 213-237.

400. Weihe A. Cloning and characterization of a cDNA encoding a bacteriophage-type RNA polymerase from the higher plant *Chenopodium album* / A. Weihe, B. Hedtke, T. Börner. // *Nucleic acids research*. – 1997. – V. 25, N 12. – P. 2319-2325.

401. Welchen E. Cytochrome c, a hub linking energy, redox, stress and signaling pathways in mitochondria and other cell compartments / E. Welchen, D. H. Gonzalez. // *Physiol Plant*. – 2016a. – V.

157, N 3. – P. 310-21.

402. Welchen E. d-Lactate Dehydrogenase Links Methylglyoxal Degradation and Electron Transport through Cytochrome c / E. Welchen, J. Schmitz, P. Fuchs [et al.] // *Plant Physiol.* – 2016b. – V. 172, N 2. – P. 901-912.

403. Wickham H., Navarro D., Pedersen T. L. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis: Use R!* N.-Y.: Springer-Verlag, 2016. 268 p.

404. Wikström M. Proton pumping by cytochrome c oxidase – A 40 year anniversary / M. Wikström, V. Sharma. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* – 2018. – V. 1859, N 9. – P. 692-698.

405. Williams-Carrier R. A Major Role for the Plastid-Encoded RNA Polymerase Complex in the Expression of Plastid Transfer RNAs / R. Williams-Carrier, R. Zoschke, S. Belcher [et al.] // *Plant Physiology.* – 2014. – V. 164, N 1. – P. 239.

406. Wintz H. Location and nucleotide sequence of two tRNA genes and a tRNA pseudo-gene in the maize mitochondrial genome: evidence for the transcription of a chloroplast gene in mitochondria / H. Wintz, J. M. Grienberger, J. H. Weil [et al.] // *Curr Genet.* – 1988. – V. 13, N 3. – P. 247-54.

407. Wirth C. Structure and function of mitochondrial complex I / C. Wirth, U. Brandt, C. Hunte [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* – 2016. – V. 1857, N 7. – P. 902-914.

408. Wissinger B. The NADH-dehydrogenase subunit 5 gene in *Oenothera* mitochondria contains two introns and is co-transcribed with the 5 S rRNA gene / B. Wissinger, R. Hiesel, W. Schuster [et al.] // *Mol Gen Genet.* – 1988. – V. 212, N 1. – P. 56-65.

409. Wittig I. Blue native PAGE / I. Wittig, H.-P. Braun, H. Schägger. // *Nature Protocols.* – 2006. – V. 1, N 1. – P. 418-428.

410. Woodson J. D. Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes / J. D. Woodson, J. Chory. // *Nature Reviews Genetics.* – 2008. – V. 9, N 5. – P. 383-395.

411. Woodson J. D. Sigma factor-mediated plastid retrograde signals control nuclear gene expression / J. D. Woodson, J. M. Perez-Ruiz, R. J. Schmitz [et al.] // *The Plant Journal.* – 2013. – V. 73, N 1. – P. 1-13.

412. Wu G.-Z. Control of Retrograde Signaling by Rapid Turnover of GENOMES UNCOUPLED1 / G.-Z. Wu, C. Chalvin, M. Hoelscher [et al.] // *Plant Physiology.* – 2018. – V. 176, N 3. – P. 2472-2495.

413. Wu G.-Z. Control of retrograde signalling by protein import and cytosolic folding stress / G.-Z. Wu, E. H. Meyer, A. S. Richter [et al.] // *Nature Plants.* – 2019. – V. 5, N 5. – P. 525-538.

414. Wu M. Structure of Mammalian Respiratory Supercomplex I(1)III(2)IV(1) / M. Wu, J. Gu, R. Guo [et al.] // *Cell.* – 2016. – V. 167, N 6. – P. 1598-1609.e10.

415. Wu M. Research journey of respirasome / M. Wu, J. Gu, S. Zong [et al.] // *Protein & Cell*. – 2020. – V. 11, N 5. – P. 318-338.
416. Wu T. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. / T. Wu, E. Hu, S. Xu, [et al.] // *Innovation (Camb)*. – 2021. V. 2, N 3. – P. 100-141.
417. Xiao S. Activation of Mitochondrial Orf355 Gene Expression by a Nuclear-Encoded DREB Transcription Factor Causes Cytoplasmic Male Sterility in Maize / S. Xiao, J. Zang, Y. Pei [et al.] // *Molecular Plant*. – 2020. – V. 13, N 9. – P. 1270-1283.
418. Yahalom A. Arabidopsis eIF3e is regulated by the COP9 signalosome and has an impact on development and protein translation / A. Yahalom, T.-H. Kim, B. Roy [et al.] // *The Plant Journal*. – 2008. – V. 53, N 2. – P. 300-311.
419. Yamashita A. Formation of Mitochondrial Outer Membrane Derived Protrusions and Vesicles in Arabidopsis thaliana / A. Yamashita, M. Fujimoto, K. Katayama [et al.] // *PLOS ONE*. – 2016. – V. 11, N 1. – P. e0146717.
420. Yan B. Transcriptional initiation sites in sorghum mitochondrial DNA indicate conserved and variable features / B. Yan, D. R. Pring. // *Curr Genet*. – 1997. – V. 32, N 4. – P. 287-95.
421. Yan J. TOC1 clock protein phosphorylation controls complex formation with NF-YB/C to repress hypocotyl growth / J. Yan, S. Li, Y. J. Kim [et al.] // *EMBO J*. – 2021. – V. 40, N 24. – P.e108684.
422. Yang J. Mitochondrial retrograde regulation tuning fork in nuclear genes expressions of higher plants / J. Yang, M. Zhang, J. Yu. // *Journal of Genetics and Genomics*. – 2008. – V. 35, N 2. – P. 65-71.
423. Yao J. AtSig5 is an essential nucleus-encoded Arabidopsis sigma-like factor / J. Yao, S. Roy-Chowdhury, L. A. Allison. // *Plant physiology*. – 2003. – V. 132, N 2. – P. 739-747.
424. Yehudai-Resheff S. Polynucleotide Phosphorylase Functions as Both an Exonuclease and a Poly(A) Polymerase in Spinach Chloroplasts / S. Yehudai-Resheff, M. Hirsh, G. Schuster. // *Molecular and Cellular Biology*. – 2001. – V. 21, N 16. – P. 5408-5416.
425. Yilmaz M. Interactome of Arabidopsis Thaliana / M. Yilmaz, M. Paulic, T. Seidel // *Plants*. – 2022. – V. 11, N 3. – P. 350.
426. Yin C. Evolution of phage-type RNA polymerases in higher plants: characterization of the single phage-type RNA polymerase gene from Selaginella moellendOrffii / C. Yin, U. Richter, T. Borner [et al.] // *J Mol Evol*. – 2009. – V. 68, N 5. – P. 528-38.
427. Zabaleta E. A basal carbon concentrating mechanism in plants? / E. Zabaleta, M. V. Martin, H.-P. Braun. // *Plant Science*. – 2012. – V. 187. – P. 97-104.
428. Zandalinas S. I. ABA is required for the accumulation of APX1 and MBF1c during a combination of water deficit and heat stress / S. I. Zandalinas, D. Balfagón, V. Arbona [et al.] // *Journal*

of Experimental Botany. – 2016. – V. 67, N 18. – P. 5381-5390.

429. Zehrmann A. A DYW domain-containing pentatricopeptide repeat protein is required for RNA editing at multiple sites in mitochondria of *Arabidopsis thaliana* / A. Zehrmann, D. Verbitskiy, J. A. van der Merwe [et al.] // *The Plant cell*. – 2009. – V. 21, N 2. – P. 558-567.

430. Zghidi W. Nucleus-encoded plastid sigma factor SIG3 transcribes specifically the *psb N* gene in plastids / W. Zghidi, L. Merendino, A. Cottet [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2006. – V. 35, N 2. – P. 455-464.

431. Zghidi-Abouzid O. Characterization of plastid *psb T* sense and antisense RNAs / O. Zghidi-Abouzid, L. Merendino, F. Buhr [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2011. – V. 39, N 13. – P. 5379-5387.

432. Zhao X. GUN1 interacts with MORF2 to regulate plastid RNA editing during retrograde signaling / X. Zhao, J. Huang, J. Chory. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2019. – V. 116, N 20. – P. 10162-10167.

433. Zhao Y. Malate Circulation: Linking Chloroplast Metabolism to Mitochondrial ROS / Y. Zhao, H. Yu, J.-M. Zhou [et al.] // *Trends in Plant Science*. – 2020. – V. 25, N 5. – P. 446-454.

434. Zhang R. A high quality *Arabidopsis* transcriptome for accurate transcript-level analysis of alternative splicing / R. Zhang, P. G. C. Calixto, Y. Marquez [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2017. – V. 45, N 9. – P. 5061-5073.

435. Zhang H. Thioredoxin-Mediated ROS Homeostasis Explains Natural Variation in Plant Regeneration / H. Zhang, , T. T. Zhang, Hю Liu [et al.] // *Plant Physiology*. – 2018. – V. 176, N 3. –P. 2231-2250.

436. Zhang Y. Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcription factors / Y. Zhang, S. Xu, P. Ding [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2010. – V. 107, N 42. – P. 18220-5.

437. Zhang Y. The translocase of the inner mitochondrial membrane 22-2 is required for mitochondrial membrane function during *Arabidopsis* seed development / Y. Zhang, Y. Hu, Z. Wang [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2023. – V. 74, N 15. – P. 4427-4448.

438. Zhang X. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method / X. Zhang, R. Henriques, S. Lin [et al.] // *Nat Protoc*. – 2006. – V. 1, N 1. – P. 641-646.

439. Zhelyazkova P. The Primary Transcriptome of Barley Chloroplasts: Numerous Noncoding RNAs and the Dominating Role of the Plastid-Encoded RNA Polymerase / P. Zhelyazkova, C. M. Sharma, K. U. Förstner [et al.] // *The Plant Cell*. – 2012. – V. 24, N 1. – P. 123.

440. Zhou X. F. CYCLIN H;1 Regulates Drought Stress Responses and Blue Light-Induced Stomatal Opening by Inhibiting Reactive Oxygen Species Accumulation in *Arabidopsis* / X. F. Zhou, ,

H. J. Yin, C. Y. Yoo [et al.] // *Plant Physiology*. – 2013. – V. 162, N 2. – P. 1030-1041.

441. Zhou J. Regulation of Arabidopsis brassinosteroid receptor BRI1 endocytosis and degradation by plant U-box PUB12/PUB13-mediated ubiquitination / J. Zhou, D. Liu, P. Wang [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2018. – V. 115, N 8. – P. E1906-E1915.

442. Zhu J. Structure of mammalian respiratory complex I / J. Zhu, K. R. Vinothkumar, J. Hirst. // *Nature*. – 2016. – V. 536, N 7616. – P. 354-358.

443. Zoschke R. From seedling to mature plant: Arabidopsis plastidial genome copy number, RNA accumulation and transcription are differentially regulated during leaf development / R. Zoschke, K. Liere, T. Börner. // *The Plant Journal*. – 2007. – V. 50, N 4. – P. 710-722.

444. Zou H. F. The transcription factor AtDOF4.2 regulates shoot branching and seed coat formation in Arabidopsis / H. F. Zou, Y. Q. Zhang, W. Wei [et al.] // *Biochem J*. – 2013. – V. 449, N 2. – P. 373-88.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

Таблица 1

Топ узлы сетей ББВ модулей ко-экспрессии с дифференциальной экспрессией у исследуемых линий растений.

Символ	ID	Описание	Локализация	Связанный процесс	ДЭ
<b>Модуль М1</b>					
TBL18	AT4G25360	Trichome birefringence-like 18	Пластиды	Cell wall biosynthesis	Подавляется у <i>grotmp</i>
RVE2	AT5G37260	ТФ с MYB-доменом	Ядро	Seed germination and circadian regulation	Подавляется у OEP12 и Tmp-P1
GSTF6	AT1G02930	Глутатионтрансфераза	Цитозоль	Response to water deprivation	Усиливается у <i>grotmp</i>
AIR9	AT2G34680	–	Внеклеточное пространство	Auxin response	Усиливается у OEP12
TIFY3B	AT5G20900	Белок с ZIM-доменом	Цитозоль	Response to wounding	Усиливается у <i>grotmp</i>
<b>Модуль М2</b>					
ASK11	AT4G34210	–	Цитозоль	Убиквитин-зависимый катаболизм белков	Подавляется у <i>grotmp</i> и Tmp-P1
HSP90-1	AT5G52640	Взаимодействует с сигнальными белками иммунитета SGT1b и RAR1	Цитозоль	Ответ на мышьяк	Подавляется у <i>grotmp</i>
-	AT2G40140	Белок с доменом «цинковый палец» (CCCH-типа)	Ядро	Ответ на биотический стресс (грибы)	Подавляется у <i>grotmp</i> и Tmp-P1
GASA5	AT3G02885	Вовлечен в регуляцию термотолерантности проростков	Внеклеточное пространство	Ответ на АБК	Подавляется у OEM15 и OEP12
GSTU1	AT2G29490	Глутатионтрансфераза Тау-класса	Цитозоль	Метаболизм глутатиона	Усиливается у <i>grotmp</i>
<b>Модуль М3</b>					
CRF6	AT3G61630	Фактор ответа на цитокинин	Ядро	Развитие семядолей	Подавляется у OEP12
MAF5	AT5G65080	ТФ семейства MADS-box	Ядро	Регуляция короткого фотопериода, цветения	Усиливается у OEP12
TSPO	AT2G47770	Сенсорный белок, индуцируемый осмотическим, солевым стрессом и АБК	ЭПР, Комплекс Гольджи	Метаболизм порфирина-содержащих соединений	Усиливается у <i>grotmp</i> и Tmp-P1
-	AT2G07773	Цитохром В/В6	ЭПР	Транспорт гема	Подавляется у <i>grotmp</i> и Tmp-P1
ABR	AT3G02480	Белок семейства LEA	Цитозоль	Ответ на водный дефицит	Усиливается у <i>grotmp</i>
AGL45	AT3G05860	ТФ семейства MADS-box	Ядро	Регуляция транскрипции РНК-полимеразой II	Усиливается у OEM15 и OEP12
IQD6	AT2G26180	Белок с IQ67-доменом	Ядро	Цитокинез	Подавляется у <i>grotmp</i>

Символ	ID	Описание	Локализация	Связанный процесс	ДЭ
DFRA	AT5G42800	Дигидрофлавонол редуктаза	Цитозоль, Комплекс Гольджи	Биосинтез антоцианов	Усиливается у <i>rpotmp</i>
PUB12	AT2G28830	PLANT U-BOX 12	Цитозоль	Защитный ответ на бактерии	Подавляется у OEM15
<b>Модуль М4</b>					
FLA14	AT3G12660	Фасцилин-подобный арабиногалактанопроteid	Внеклеточное пространство	Эмбриогенез и развитие семени	Подавляется у <i>rpotmp</i>
<b>Модуль М5</b>					
THO6	AT2G19430	DDB1-связывающий белок WD40	Цитозоль	Передача такиРНК, вовлеченных в РНКи	Усиливается у OEP12
RHM1	AT1G78570	UDP-L-рамнозосинтаза	Цитозоль	Биосинтез UDP- рамнозы	Усиливается у OEM15
NAC014	AT1G33060	ТФ с NAC-доменом	Ядро	Регуляция транскрипции	Усиливается у OEP12
SAMTA1	AT5G09410	Кальмодулин-связывающий белок, индуцируемый этиленом	Ядро	Ответ на заморозку	Усиливается у OEP12

Таблица 2

64 общих для OEM15 и OEP12 мишени разных ТФ, которые возможно активируются в ходе ББВ

Локус	Регуляция	Символ	Локализация	Описание
AT4G37900	Активация	GRDP2	ПМ	
AT4G35280	Активация	DAZ2	Ядро	Белок с цинковым пальцем
AT4G28040	Активация	UMAMIT33	ПМ	Белок семейства транспортеров, нодулин
AT1G80390	Активация	IAA15	Ядро	ИУК-индуцируемый белок 15
AT5G55430	Активация		Ядро	
AT3G06090	Активация	prePIPL2	Внеклеточное пространство	
AT2G48060	Активация	PZO1	ПМ	
AT5G45090	Активация	AtPP2-A7	Цитозоль	
AT1G31072	Активация			
AT5G07500	Активация	AtC3H54	Ядро	ТФ с цинковым пальцем, специфичный для эмбриона, необходимый для формирования стадии "сердце"
AT3G25490	Активация		ПМ	Протеинкиназа
AT1G47300	Активация		Цитозоль	белок семейства F-box
AT1G60095	Активация		Цитозоль	Белок суперсемейства манноза-связывающих лектинов

Локус	Регуляция	Символ	Локализация	Описание
AT5G63085	Активация		Внеклеточное пространство	Белок семейства тионинов
AT2G05370	Активация		Цитозоль	
AT3G54802	Активация		Цитозоль	
AT5G37910	Активация		Ядро	Белок с доменами RING/U-box и TRAF-like
AT3G50010	Активация		Ядро	Белок семейства с C1-доменом
AT1G67265	Активация	DVL3;RTFL21	Цитозоль	
AT1G19900	Активация	RUBY	Внеклеточное пространство	семейство связанных с глиоксаль-оксидазами
AT4G04330	Активация	AtRbcX1	Пластиды	Шаперонин, сборка РУБИСКО
AT5G35550	Активация	MYB123;TT2	Ядро	ТФ с MYB-доменом, ключевая детерминанта накопления проантоцианидина в развивающемся семени.
AT1G56300	Активация	DjC53	Ядро	Шаперон суперсемейства белков с DnaJ-доменом
AT3G16680	Активация		Ядро	Компонент РНК-полимераз I, II и III
AT1G26773	Активация		ПМ	
AT2G20380	Активация		Цитозоль	Галактозооксидаза
AT3G29370	Активация	P1R3	Митохондрии	
AT1G44085	Активация		Цитозоль, ПМ	глицин-богатый белок
AT4G02830	Активация		Ядро	
AT1G35270	Активация			
AT1G08890	Активация	ESL3.05	Вакуоль	белок семейства Major facilitator
AT2G24660	Активация			
AT5G09795	Активация			
AT2G47550	Активация	PMEI-PME20	Внеклеточное пространство	Инвертаза
AT4G08850	Активация	MIK2	ПМ	Рецепторная киназа с лейцин-богатым повтором
AT1G10070	Активация	BCAT2	Пластиды, митохондрии, цитозоль	Хлоропластная аминотрансфераза
AT2G14870	Активация		Ядро	РНК-связывающий белок
AT5G10200	Активация	SAV4	ПМ	TPR
AT3G02100	Активация		Цитозоль	UDP-Гликозилтрансфераза

Локус	Регуляция	Символ	Локализация	Описание
AT5G45830	Активация	DOG1	Ядро	DOG1 (DELAY OF GERMINATION 1). Локус количественных признаков, вовлеченный в контроль состояния покоя семян. Экспрессия специфична для семян.
AT5G28673	Активация			
AT1G76930	Активация	EXT4	Внеклеточное пространство	Экстенсин 4, компонент клеточной стенки
AT5G02600	Активация	AtHMP42	Пластиды, ядро	Транспортер тяжелых металлов
AT4G14465	Активация	AHL20	Ядро	белок с AT-hook-мотивом
AT4G23560	Активация	AtGH9B15	Внеклеточное пространство	Гликозилгидролаза
AT2G22750	Репрессия		Ядро	ТФ семейства bHLH
AT5G55020	Репрессия	MYB120	Ядро	ТФ с MYB-доменом
AT2G02490	Репрессия		Внеклеточное пространство	
AT3G02885	Репрессия	GASA5	Внеклеточное пространство	Гомолог GAST1 5
AT4G36580	Репрессия	SBA4	Митохондрии	АТФаза AAA-типа
AT2G37700	Репрессия		ПМ, вакуоль, ПМ	Белок семейства ЖК-гидроксилаз
AT5G48930	Репрессия	НСТ	Цитозоль	гидроксисиннамонил-СоА шикимат/хинат гидроксисиннамонилтрансфераза. Влияет на накопление флавоноидов, которые ингибируют транспорт ауксина и угнетают рост растения.
AT1G48640	Репрессия		ПМ	Трансмембранный транспортер лизина и гистидина
AT3G61270	Репрессия		ПМ	
AT1G61820	Репрессия	BGLU46	Внеклеточное пространство, вакуоль	Бета-гликозидаза 46
AT4G36370	Репрессия		Цитозоль	
AT4G36380	Репрессия	ROT3	ПМ	Цитохром P450, вовлеченный в расширение листовой пластинки через контроль растяжения полярных клеток. Катализирует гидроксилирование брассиностероидов.

Локус	Регуляция	Символ	Локализация	Описание
AT1G11610	Репрессия	CYP71A18	ЭПР	цитохром P450
AT4G31970	Репрессия	CYP82C2	ПМ	цитохром P450, семейства 82, подсемейства C
AT3G19140	Репрессия	DNF	ЭПР	DAY NEUTRAL FLOWERING (DNF) мембранная лигаза, вовлеченная в регуляцию времени цветения. Предотвращает раннее цветение в условиях короткого светового дня
AT4G33905	Репрессия		Митохондрии	Пероксисомальный мембранный белок 22 кДа
AT4G01975	Репрессия			
AT2G11405	Репрессия		Внеклеточное пространство	
AT4G25200	Репрессия	ATHSP23.6-МИТО	Митохондрии	Малый БТШ