

На правах рукописи



БЕЛЬКОВ
Вадим Игоревич

**ИЗУЧЕНИЕ РЕТРОГРАДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ
ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ *GDH1* И *GDH2*
*ARABIDOPSIS THALIANA***

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иркутск-2015

Работа выполнена в Федеральном Государственном бюджетном учреждении науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Научный руководитель: **Константинов Юрий Михайлович**
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Шпаковский Георгий Вячеславович**
доктор биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), заведующий лабораторией механизмов генной экспрессии

Кирильчик Сергей Васильевич
кандидат биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук (ЛИН СО РАН), руководитель группы эволюционной генетики

Ведущая организация: ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

Защита диссертации состоится «02» марта 2016 года в 13³⁰ час. на заседании Диссертационного совета Д 003.047.01 при Федеральном Государственном бюджетном учреждении науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» Сибирского отделения РАН по адресу: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317. Факс (3952) 510-754; e-mail: matmod@sifibr.irk.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
Д 003.047.01, к.б.н.



Акимова Галина Петровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Растения имеют ядерный, митохондриальный и хлоропластный геномы, нуждающиеся в тесной координации экспрессии, что осуществляется благодаря сложной сети сигналов (Kleine, Leister, 2013). Сигналы, поступающие от ядра к органеллам, контролируют экспрессию генов органелл, их развитие и функционирование (антероградная регуляция). От органелл в ядро поступают сигналы, воздействующие на экспрессию ядерных генов (ретроградная регуляция) (Nott et al., 2006). Определено множество ядерных генов, экспрессия которых изменяется при смене условий «темнота-свет». Наиболее вероятными причинами таких изменений могут служить ретроградные (хлоропластно-ядерные) сигналы либо сигналы, связанные с изменением уровня сахаров в клетке (Blasing et al., 2005; Li et al., 2006; Chi et al., 2013). К числу генов, экспрессия которых зависит от условий освещенности, относятся гены НАД(Н)-зависимой глутаматдегидрогеназы (GDH) – фермента, участвующего в метаболизме углерода и азота, а также в регуляции скорости процессов дыхания, особенно в условиях углеводного голодания (Robinson et al., 1992; Miyashita, Good, 2008). Фермент состоит из 6 субъединиц одного или двух видов. Считается, что преобладающее значение имеют субъединицы α и β , кодирующиеся у арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) ядерными генами *GDH1* и *GDH2* соответственно. Исследуемый в настоящей работе фермент локализован в митохондриях и наиболее активен в клетках-спутницах флоэмы. Известно, что экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* максимальна в темное время суток и минимальна в светлое. В 2008 г. была сформулирована гипотеза, согласно которой такое изменение экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* зависит от доступности углерода в виде углеводов, уровень которых выше на свету, чем в темноте (Miyashita, Good, 2008). При этом в литературе отсутствуют работы, посвященные изучению конкретных светозависимых регуляторных сигналов в регуляции экспрессии генов глутаматдегидрогеназы.

Цель работы: изучить механизмы ретроградной регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* арабидопсиса.

Задачи исследования:

1. Исследовать роль гексокиназы 1 и транскрипционного фактора ABI4, ключевых компонентов сахарозависимых регуляторных путей, в регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*.
2. Изучить возможное участие хлоропластно-ядерных сигналов, связанных с синтезом тетрапирролов, в регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*.
3. Исследовать влияние хлоропластно-ядерных сигналов, связанных с изменением редокс-состояния пула пластохинона, в регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*.
4. Изучить роль активных форм кислорода в регуляции экспрессии исследуемых генов.

Научная новизна

В результате проведенной работы впервые показано участие хлоропластных сигналов в светозависимой регуляции экспрессии ядерных генов *GDH1* и

GDH2. Установлено, что изменения уровня транскриптов исследуемых генов на свету происходят при участии хлоропластно-ядерных сигналов, возникающих при изменении редокс-состояния пула пластохинона. Установлено, что гексокиназа 1 не участвует в сахарозависимой регуляции экспрессии гена *GDH2*, данный тип регуляции опосредуется транскрипционным фактором ABI4.

Полученные данные обогащают представления о регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* и ядерных генов в целом.

Научная и практическая ценность работы

Полученные в работе данные расширяют представления о механизмах регуляции метаболических процессов в растительной клетке и важны для понимания хлоропластно-ядерных взаимодействий на уровне экспрессии генов. Выяснение механизмов регуляции экспрессии генов глутаматдегидрогеназы способствует пониманию путей использования растениями молекул L-глутамата и дополняет данные о приспособлении растений к смене условий освещения.

Материалы диссертации могут быть использованы в образовательных учреждениях, а также специалистами-биологами научно-исследовательских институтов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Экспрессия гена *GDH2* подвержена сахарозависимой репрессии, которая не опосредуется гексокиназой 1, но передается через транскрипционный фактор ABI4. Сахарозависимые сигналы не являются единственным механизмом регуляции экспрессии гена *GDH2*.
2. Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* подчиняется хлоропластно-ядерным светозависимым сигналам, связанным с редокс-состоянием пула пластохинона. Окисленное состояние пула пластохинона приводит к повышению экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на 2-й Международной научной конференции «Генетика, геномика и биотехнология растений» (Иркутск, 2012), Международной конференции по биологии и биотехнологии растений (Казахстан, Алматы, 2014), научной сессии СИФИБР СО РАН (Иркутск, 2014), Всероссийской научной конференции «Механизмы регуляции функций растительных органелл» (Иркутск, 2014), 3-й Международной конференции "Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений" (Новосибирск, 2015).

Публикации

Основное содержание работы отражено в 11 публикациях, из них 4 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация изложена на 125 страницах, состоит из глав «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследований», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и списка использованной литературы, включающего 147 библиографических источников, 144 из которых на иностранном языке. Диссертация иллюстрирована 31 рисунком и 2 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили на 5- и 14-суточных растениях *Arabidopsis thaliana* L. [Heynh] экотип *Col-0* (дикий тип), экотип *Ler* (дикий тип) а также мутантных линий *gin2*, *gun1*, *gun1gun5*, *abi4* и *chl-1*. Все семена получены из *Arabidopsis* Biological Resource Center (The Ohio State University, USA), за исключением семян линий *gun1* и *gun1gun5*, любезно предоставленных нам Nobuyoshi Mochizuki. Семена стерилизовали в растворе, содержащем 70 % этанол и 0,05 % Triton X-100 в течение 8 минут. После промывки стерильной водой семена раскладывали на чашки Петри с плотной питательной средой следующего состава: минеральные соли по Murashige, Skoog (1962) – половинный состав фитогель («Sigma-Aldrich», США) – 0,8 %. Для экспериментов по изучению сахарозависимых сигналов и роли функционально активных хлоропластов среда содержала сахарозу («Helicon», Россия) – 2 %, норфлюразон («Sigma-Aldrich») – 5 мкМ. После стратификации при +4 °С в течение 3 суток чашки устанавливали в вертикальном или горизонтальном положении и выращивали растения при температуре +23 °С, освещенности 120 мкмоль*м⁻²*с⁻¹ или 10 мкмоль*м⁻²*с⁻¹ и длине светового дня 16 часов.

В экспериментах по изучению влияния ингибиторов дыхательной цепи все чашки выдерживали в темноте в течение 18 часов до начала эксперимента. Обработку ингибиторами фотосинтеза и перекисью водорода проводили путем опрыскивания листьев интактных растений растворами, содержащими: 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевину (DCMU) – 20 мкМ, 2,5-дибromo-3-метил-6-изопропил бензохинон (DBMIB) – 20 мкМ, H₂O₂ – 10 мМ. В качестве контроля использовали растения, обработанные деионизированной водой с соответствующими концентрациями растворителей; все растворы содержали 0,05 % Triton X-100. Время экспозиции растений на свету (120 мкмоль*м⁻²*с⁻¹), а также время обработки ингибиторами фотосинтеза составляло 4 часа, перекисью водорода – 2 и 4 часа, после чего немедленно выделяли РНК.

Для экстрагирования РНК из растительного материала использовали TRI-Reagent («Sigma-Aldrich», США) согласно протоколу производителя. Гомогенизацию материала с TRI-Reagent проводили в гомогенизаторе TissueLyser II («QIAGEN», США) в течение 2 мин при частоте 30 колебаний в секунду. Для денатурации белков использовали бромхлорпропанол («Sigma-Aldrich»). Нуклеиновые кислоты осаждали 2,5 объемами 96 % этанола на холоду в течение ночи. Затем образцы центрифугировали при 14000 g и +4 °С в течение 10 мин, осадок нуклеиновых кислот высушивали при комнатной температуре, перерастворяли в 25-40 мкл деионизированной стерильной воды и использовали для синтеза первой цепи кДНК. Количество и качество выделенной РНК контролировали методом электрофореза в 1 % агарозном геле в неденатурирующих условиях.

Образцы выделенной РНК разделяли в 1 % агарозном геле в буфере Tris-ацетат-EDTA (ТАЕ, состав: 40 мМ Tris-ацетат, 0,1 мМ Na₂EDTA, pH 8,0) с окрашиванием бромистым этидием для предварительной визуальной оценки количества и качества выделенной РНК. Каждый образец для нанесения на гель

содержал 2 мкл раствора РНК в буфере Tris-EDTA (TE, состав: 10 мМ Tris-HCl, 1 мМ EDTA, pH 8,0), 5 мкл стерильной деионизированной воды и 1,5 мкл раствора бромфенолового синего в буфере TAE. Электрофорез вели при напряжении 80-100 V, силе тока до 50 мА. Бромистый этидий добавляли при приготовлении геля до чуть розоватой окраски. Визуализацию нуклеиновых кислот и фотографирование геля производили с помощью оборудования GelDoc («Bio-Rad», США).

Для синтеза первой цепи кДНК в качестве матрицы использовали РНК, предварительно обработанную ДНК-азой I («Fermentas», Литва). Синтез проводили с использованием oligo(dT)₁₅-праймера и обратной транскриптазы RevertAid H Minus M-MuLV («Fermentas») согласно протоколу производителя. Обратнo-транскриптазную ПЦР в реальном времени проводили с использованием готовой смеси реагентов SYBR Select Master Mix («Applied Biosystems», США) и оборудования C1000 Thermal Cycler CFX96 Real-Time System («Bio-Rad»). Объем реакционной смеси составлял 10 мкл. ПЦР проводили по следующему протоколу: прогревание до 50 °С, 2 мин (согласно рекомендации производителя), один цикл денатурации (95 °С, 3 мин), 36 циклов амплификации (95 °С, 20 с – 60 °С, 30 с – 72 °С, 30 с).

Подбор праймеров осуществляли с помощью программы Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Определение содержания супероксидного радикала проводили методом инфильтрации 14-суточных листьев арабидопсиса раствором нитросинего тетразолия (НСТ) согласно Meyer et al. (2009). При взаимодействии НСТ с супероксидным радикалом выпадает формазан в виде осадка темно-синего цвета. К раствору НСТ (1 мг/мл) в 10 мМ КН₂РO₄ (pH 7,8) добавляли DCMU (20 мкМ) или DBMIB (20 мкМ), после чего проводили инфильтрацию листьев. Контрольные образцы инфильтровали только раствором НСТ. Часть контрольных образцов экспонировали на свету (120 мкмоль*м⁻²с⁻¹), другую часть в темноте. Образцы, инфильтрованные смесью НСТ и ингибиторов фотосинтеза, экспонировали 40 минут на свету (120 мкмоль*м⁻²с⁻¹). Затем все образцы переносили в 70 % этиловый спирт, инкубировали при 80 °С до полной экстракции хлорофилла и фотографировали.

Определение уровня глюкозы в листьях проводили с использованием коммерческого набора Glucose (HK) Assay Kit («Sigma-Aldrich»), согласно протоколу производителя.

Для экстракции ферментов брали навеску (300-400 мг) зеленых тканей арабидопсиса, растирали при +4 °С до образования гомогенной массы в 400 мкл буфера (КН₂РO₄ – 50 мМ, поливинилпирролидон (PVP) – 4 %, Triton X-100 – 0,3 %, β-меркаптоэтанол – 14 мМ, PMSF – 1 мМ, ЭДТА – 1 мМ, аскорбиновая кислота – 2 мМ, pH 7,4). β-меркаптоэтанол, PMSF и аскорбиновую кислоту добавляли в буфер непосредственно перед началом экстракции. Гомогенат центрифугировали при +4 °С при ускорении 16000 g в течение восьми минут. Получившийся супернатант переносили в пластиковые пробирки и использовали для определения активности GDH в полиакриламидном геле. Электрофорез в поли-

акриламидном геле в нативных условиях проводили согласно методике Davis (Davis, 1964).

Все эксперименты были проведены не менее чем в трех биологических повторностях.

Построение диаграмм при количественном определении глюкозы осуществляли с помощью пакета программ Microsoft Excel. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента при уровне вероятности $p < 0,05$. Для обратнo-транскриптазной ПЦР в реальном времени статистическая обработка данных и построение диаграмм производились программой CFX ManagerTM Software Version 1,6 («Bio-Rad»). Бары на всех диаграммах означают стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Характер изменений экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* при изменении освещенности

Исследовали динамику изменения экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* при переносе растений со света в темноту и наоборот. 14-суточные растения арабидопсиса линии дикого типа *Col-0* выдерживали 18 часов на свету ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), затем убирали в темноту и отбирали образцы для выделения РНК каждые 2 часа (рис. 1, А).

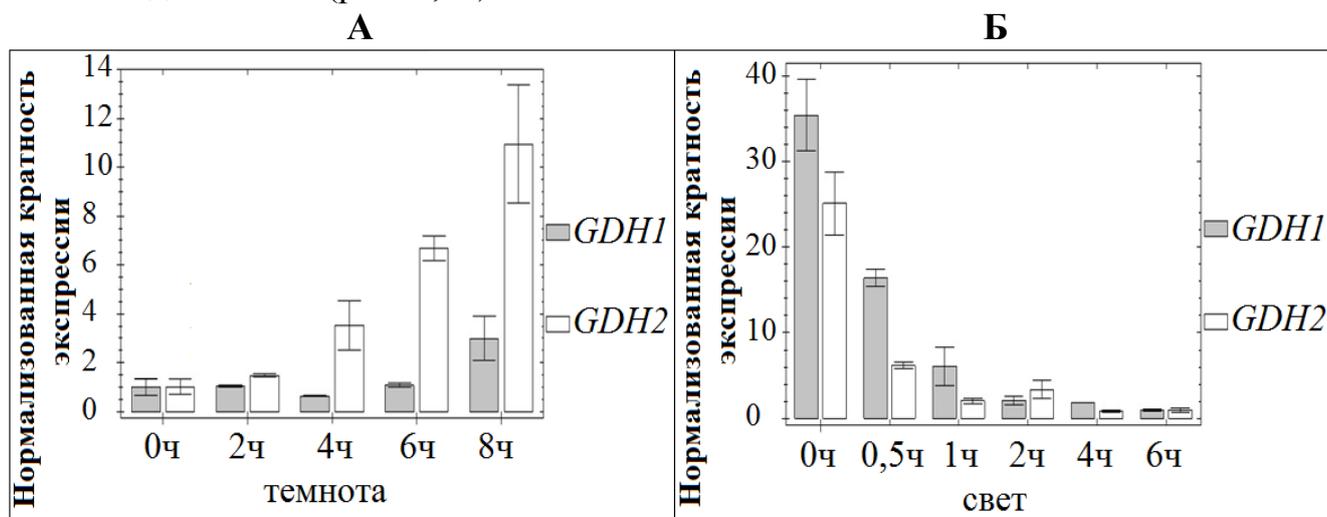


Рис. 1. Динамика изменения экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* после 18 ч непрерывного освещения ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) растений арабидопсиса и переноса их в темноту (А) и после переноса растений арабидопсиса из темноты (18 часов в темноте) на свет ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) (Б).

Уровень транскриптов гена *GDH2* повышался после 4 часов экспонирования в темноте и продолжал расти вплоть до последней точки 8 часов, в то время как экспрессия гена *GDH1* повышалась только к концу эксперимента.

Для исследования динамики снижения уровня транскриптов исследуемых генов на свету, 14-суточные растения арабидопсиса выдерживали 18 ч в темноте, а затем переносили на свет ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) (рис. 1, Б). При экспонировании растений на свету, экспрессия обоих исследуемых генов оказалась значи-

тельно сниженной уже через 30 минут после начала эксперимента, а через 2-4 часа на свету достигала значений, близких к минимальному.

Таким образом, повышение уровня транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* в темноте происходит медленнее, чем снижение на свету. Достаточно 30 минут экспонирования образцов на свету, чтобы увидеть значительную разницу в экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* с образцами, выдержанными в темноте. Подобные данные в литературе отсутствуют и получены нами впервые.

В дальнейших экспериментах время непрерывного экспонирования растений на свету после обработки действующими агентами составляло 4 часа.

2. Изучение механизмов регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*

2.1. Сахарозависимая регуляция экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*

Влияние экзогенной сахарозы на экспрессию генов *GDH1* и *GDH2*

Изменение экспрессии генов со светозависимой регуляцией часто связано с изменением уровня сахаров. Исследования Blasing с коллегами (Blasing et al., 2005) показали, что экспрессия 40% исследуемых генов со светозависимой регуляцией подчиняется сигналам, связанным с изменением уровня сахаров.

Наиболее изученным посредником при передаче сахарозависимых сигналов у растений является гексокиназа 1 (НХК1) (Ramon et al., 2008). Нами была исследована роль НХК1 в регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*. Использовали две линии арабидопсиса: линия дикого типа *Landsberg erecta* (*Ler*) и мутантная линия *glucose insensitive 2* (*gin2*), полученная на основе линии *Ler*. 14-суточные растения линий *Ler* и *gin2*, выращенные вертикально на чашках Петри при освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, выдерживали 18 часов в темноте, после чего часть образцов экспонировали 4 часа на свету, а часть – в темноте (рис. 2).

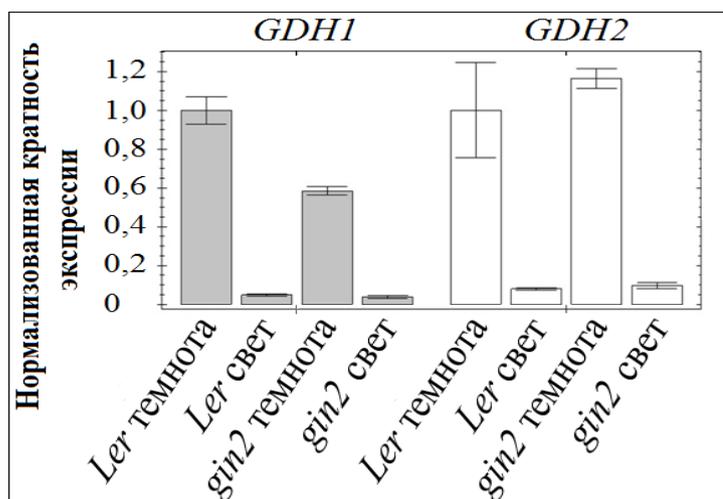


Рис. 2. Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* в розетках растений линий *Ler* и *gin2*, выращенных без сахарозы, на свету и в темноте. Темнота – растения выдерживали 22 (18+4) часа в темноте; свет – растения выдерживали 4 часа при освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* в растениях линии *Ler* была значительно выше в темноте, чем на свету. Экспрессия исследуемых генов у растений мутантной линии *gin2* существенно не отличалась от их экспрессии у линии дикого типа: экспрессия была выше в темноте и ниже на свету (рис. 2). Полученные данные указывают на непричастность НХК1 к регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*.

С целью изучения влияния сахарозы на экспрессию исследуемых генов у мутанта, лишённого сигнальной функции НХК1, 14-суточные растения линий *Ler* и *gin2* выдерживали 18 часов в темноте, затем опрыскивали корни 3 % раствором сахарозы. Контролем служили растения линии *Ler*, обработанные 3 % раствором маннитола и выдержанные 4 часа на свету. Маннитол использовали для контроля осмотического стресса, который могут испытывать растения при действии сахарозы (рис. 3).

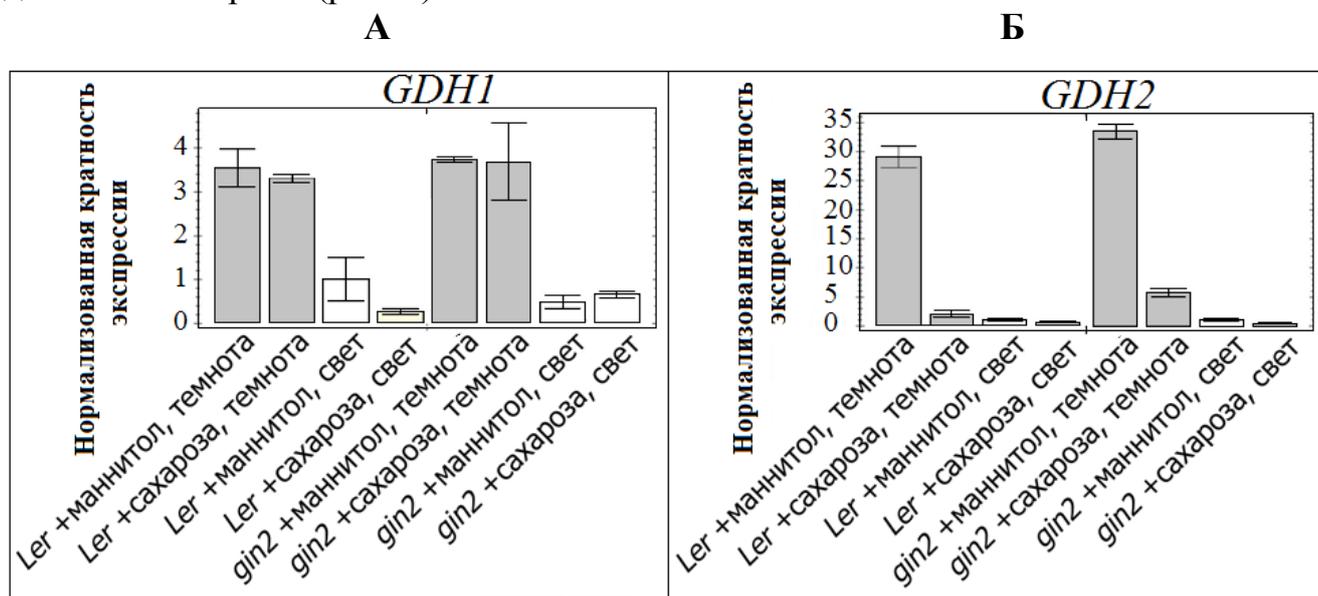


Рис. 3. Влияние сахарозы на экспрессию генов *GDH1* (А) и *GDH2* (Б) в розетках арабидопсиса линии дикого типа *Ler* и мутантов *gin2*. Маннитол – листья обработаны 3 % маннитолом; сахароза – листья обработаны 3 % сахарозой; темнота – экспозиция в темноте в течение 21 (18+3) часа; свет – экспозиция при $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ в течение 3 часов.

Характер экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* у мутанта *gin2* при обработке растений сахарозой на свету существенно не отличался от экспрессии у линии дикого типа (рис. 3). Обработка сахарозой приводила к снижению экспрессии гена *GDH2* у обеих линий.

Таким образом, мы наблюдали снижение уровня транскриптов гена *GDH2* под действием сахарозы (рис. 3). Это согласуется с высказанной ранее гипотезой о сахарозависимом характере регуляции генов глутаматдегидрогеназы (Miyashita, Good, 2008). Достоверного снижения уровня транскриптов для гена *GDH1* не наблюдали.

Следовательно, ни сахарозависимое, ни светозависимое снижение уровня транскриптов гена *GDH2* арабидопсиса не зависит от гексокиназы 1. Можно

сделать вывод, что, хотя экспрессия данного гена может зависеть от уровня сахаров в клетке, однако при этом сахарозависимая репрессия гена *GDH2* арабидопсиса опосредуется механизмами, независимыми от гексокиназы 1. Для гена *GDH1* не наблюдали сахарозависимого снижения уровня транскриптов.

Роль транскрипционного фактора ABI4 в сахарозависимой регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*

Фактор регуляции транскрипции abscisic acid insensitive 4 (ABI4) является связующим звеном между различными типами регуляторных сигналов, в том числе сахарозависимых и хлоропластно-ядерных сигналов (Leon et al., 2013).

Мы исследовали возможное участие ABI4 в светозависимой регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*. Использовали 14-суточные розетки арабидопсиса линий *Col-0* и мутантов *abi4* (имеют нарушения в работе гена *ABI4*), которые выдерживали 18 часов в темноте, после чего часть образцов выставляли на свет ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) на 4 часа, остальные растения оставляли в темноте. Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* была выше в темноте и ниже на свету как у растений линии *Col-0*, так и у мутантов *abi4* (рис. 4).

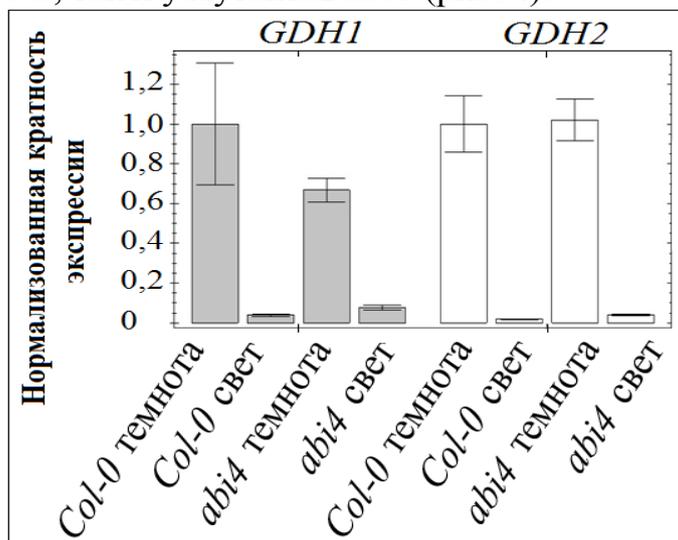


Рис. 4. Уровень транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* в 14-суточных розетках линий *Col-0* и *abi4*, выращенных на среде без сахарозы. Темнота – растения экспонировали 22 (18+4) часа в темноте; свет – растения экспонировали 4 час при освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Профиль экспрессии на свету и в темноте практически не отличался у обеих линий. Следовательно, транскрипционный фактор ABI4 не участвует в светозависимой регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*. Полученные данные не исключают возможное участие ABI4 в сахарозависимой регуляции экспрессии исследуемых генов.

Снижение уровня транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* на свету может быть вызвано одновременным действием двух факторов: хлоропластно-ядерных сигналов, не связанных с изменением уровня сахаров, и изменениями уровня сахаров в клетке. Все известные сахарозависимые регуляторные сигнала-

лы, не опосредуемые НХК1, передаются через ABI4 (Ramon et al., 2008). С целью оценки вклада сахарозависимых сигналов в регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* мы оценивали возможное участие транскрипционного фактора ABI4 в снижении уровня транскриптов исследуемых генов на свету. Для этого 14-суточные растения арабидопсиса линии *Col-0* и мутанта *abi4* выдерживали 18 часов в темноте, затем корни растений обрабатывали 3% р-ром сахарозы и переносили на свет на 30 минут. Контрольные образцы обрабатывали водой в тех же условиях (рис. 5).

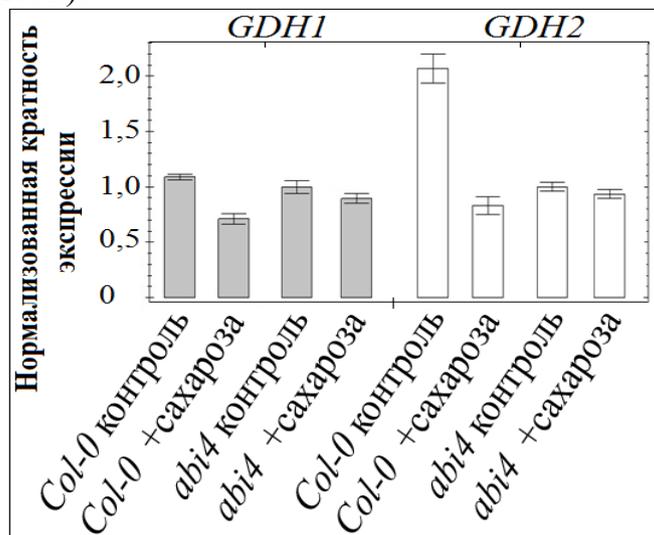


Рис. 5. Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* на свету в розетках 14-суточных растений линий *Col-0* и *abi4*, выдержанных 18 часов в темноте с последующей обработкой и экспонированием 30 минут на свету ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). Контроль – без обработки; сахароза – обработка листьев 3% р-ром сахарозы.

Экспрессия исследуемых генов у растений линии *Col-0* снижалась под действием сахарозы, причем это снижение было значительно сильнее выражено для гена *GDH2*. Экспрессия гена *GDH1* имела схожую тенденцию с экспрессией гена *GDH2*, но менее выраженную. У растений мутантной линии *abi4* отменяется снижение транскриптов исследуемых генов в присутствии сахарозы. Следовательно, снижение экспрессии исследуемых генов у растений линии *Col-0* при обработке сахарозой опосредуется транскрипционным фактором ABI4.

2.2. Хлоропластно-ядерная регуляция экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*

Изучение участия сигналов, возникающих при синтезе тетрапирролов, в регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*

Классическим примером пути передачи хлоропластно-ядерного сигнала являются сигналы, образующиеся при синтезе тетрапирролов, предшественников хлорофиллов а и b. Передача сигналов данного типа нарушена у т.н. *gun*-мутантов (*genome uncoupled*). Белок GUN1 представляет собой PPR-белок, другие гены группы *GUN* кодируют ферменты биосинтеза тетрапирролов: хлорофиллов а и b (*GUN2-5*) и гема (*GUN6*) (Chi et al., 2013). Значение GUN-белков в передаче хлоропластно-ядерных сигналов удалось установить, выращивая рас-

тения арабидопсиса на средах, содержащих ингибитор фитоендесатуразы норфлюразон, что сопровождается фотодеструкцией хлоропластов и значительным снижением экспрессии генов группы *light harvesting complex b (LHCB)*. Показано, что *gun*-мутанты, выращенные на средах с добавлением норфлюразона, продолжают экспрессировать гены *LHCB*, что описано в литературе как *gun*-фенотип (Woodson, Chory, 2008).

С целью проверки гипотезы о возможном участии сигналов, возникающих при синтезе тетрапирролов, в регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*, использовали 14-суточные растения линий *gun1* и *gun1gun5*, выращенные при умеренной освещенности ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). Все растения выдерживали 18 часов в темноте, после чего часть растений переносили на свет ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) на 4 ч, остальные оставляли в темноте (рис. 6).

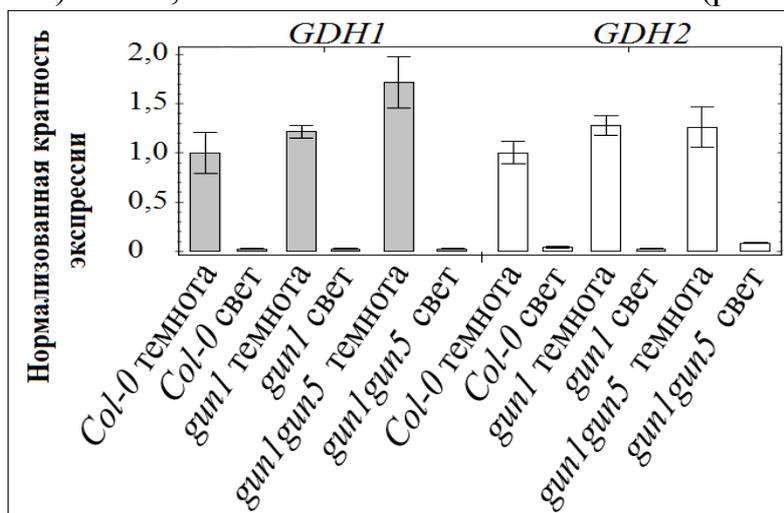


Рис. 6. Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* на свету и в темноте у 14-суточных растений линий *Col-0*, *gun1* и *gun1gun5*. Темнота – растения выдерживали 22 (18+4) ч в темноте; свет – растения выдерживали 4 ч при освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* была выше в темноте и ниже на свету как у образцов линии *Col-0*, так и у мутантов *gun1* и *gun1gun5* (рис. 6). Характер изменений экспрессии исследуемых генов у растений обеих линий *gun*-мутантов на свету и в темноте не отличался от линии дикого типа. Таким образом, светозависимая регуляция экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* у растений линий *gun1* и *gun1gun5* не изменена.

Особый интерес представляло изучение роли сахарозависимой регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* при функционально неактивных хлоропластах. Для этого использовали 5-суточные растения линии *Col-0* и линий мутантов *gun1* (рис. 7). Часть образцов выращивали на средах с добавлением норфлюразона, сахарозы, норфлюразона и сахарозы, либо без добавок. Растения линии *Col-0*, выращенные на среде без норфлюразона и сахарозы при освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, служили контролем. Выращивание в присутствии норфлюразона приводило к повышению экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* у линии *Col-0*, подобно тому, как это происходит в темноте (рис. 1 и 7).

При одновременном присутствии норфлуразона и сахарозы уровень экспрессии *GDH1* и *GDH2* у растений *Col-0* был несколько ниже, чем у растений, выращенных на среде с норфлуразоном, но оставался значительно выше, чем у растений, выращенных на среде без добавок или на среде, содержащей сахарозу. Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* у растений линии *gun1* существенно не отличалась от экспрессии у линии дикого типа.

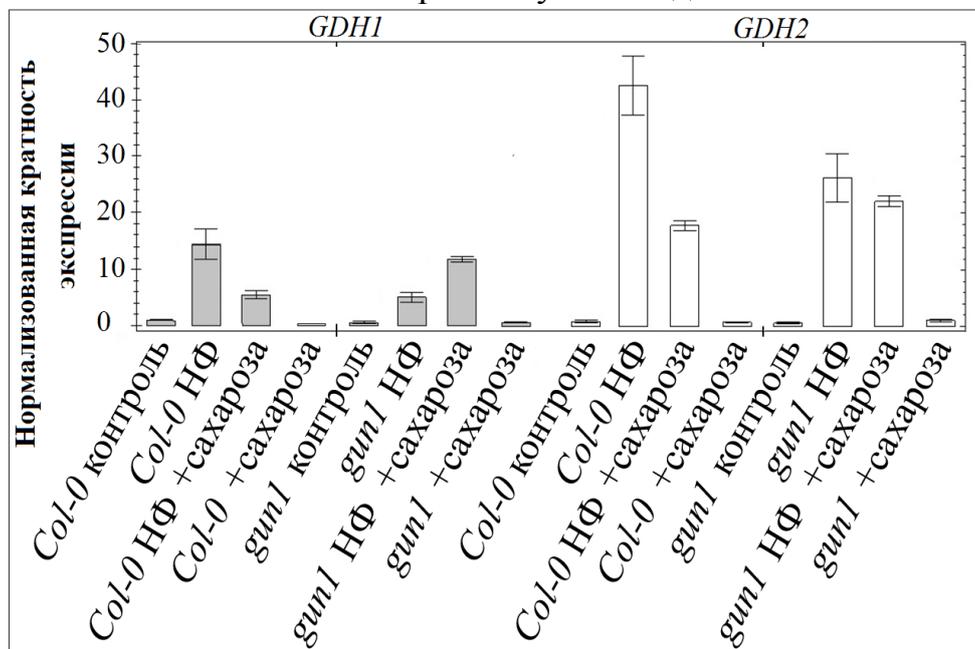


Рис. 7. Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* в 5-суточных розетках линий *Col-0* и *gun1* в присутствии норфлуразона и сахарозы. Контроль – растения, выращенные на среде без добавок; сахароза – в среде присутствует 2% сахарозы; HF – в среде присутствует 5 мкМ норфлуразона. Освещенность в эксперименте – $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Таким образом, отсутствие функционально активных хлоропластов (в присутствии норфлуразона) отменяет снижение экспрессии исследуемых генов на свету. Следовательно, светозависимая репрессия генов *GDH1* и *GDH2* с большой вероятностью опосредуется хлоропластно-ядерными сигналами, а не фитохромами и криптохромами, сигнальная функция которых не требует наличия дифференцированных хлоропластов.

Роль редокс-сигналов пула пластохинона в регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*

Помимо сигналов, связанных с синтезом тетрапирролов, к светозависимым хлоропластно-ядерным сигналам относят: активные формы кислорода (АФК), продукты экспрессии генов пластид, продукты катаболизма каротиноидов и др. Особый интерес представляют редокс-сигналы, поскольку даже незначительные колебания в уровне освещенности вызывают изменения редокс-состояния компонентов электрон-транспортной цепи хлоропластов (хлЭТЦ). Так, изменения редокс-состояния пула пластохинона (PQ-пула) приводят к по-

явлению сигналов, влияющих на экспрессию большого числа хлоропластных и ядерных генов (Pfannschmidt et al., 1999; Pfannschmidt et al., 2001; Fey et al., 2005).

С целью изучения роли редокс-состояния PQ-пула в светозависимой регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*, 14-суточные растения линии *Col-0* выдерживали 18 ч в темноте, после чего розетки обрабатывали растворами ингибиторов фотосинтетического транспорта электронов DCMU или DBMIB. Затем одну чашку Петри с растениями убирали в темноту на 4 ч, а три других (контроль на свету и растения, обработанные ингибиторами DCMU и DBMIB) – переносили на свет ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) на 4 ч.

В темноте PQ-пул находится в окисленном состоянии, а на свету – в восстановленном (Pfannschmidt et al., 2001). При переносе растений из темноты на свет уровень транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* снижался (рис. 8).

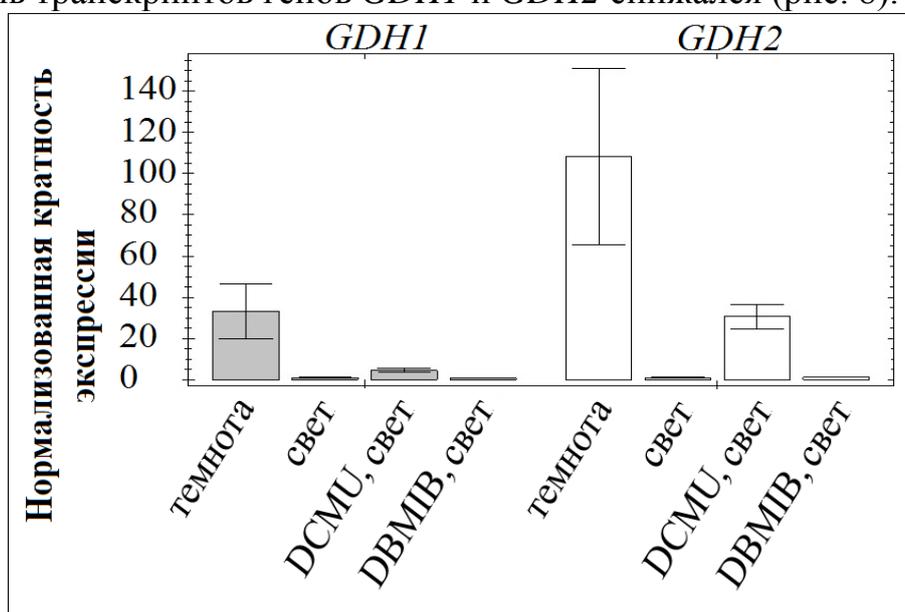


Рис. 8. Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* в розетках растений линий *Col-0* при изменении редокс-состояния пула пластохинона. DCMU – 3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметилмочевина (20 мкМ), DBMIB – 2,5-дибromo-3-метил-6-изопропилбензохинон (20 мкМ). Темнота – растения выдерживали в темноте в течение 22 (18+4) часов; свет – растения выдерживали при освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ в течение 4 часов.

При обработке растений ингибитором DCMU на свету пул пластохинона становится окисленным (как в темноте), а при обработке ингибитором DBMIB на свету – более восстановленным, чем на свету без обработки. В наших экспериментах отмечалось повышение уровня транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* на свету при обработке ингибитором DCMU относительно контроля на свету. Обработка ингибитором DBMIB на свету не вызывала значительных изменений уровня транскриптов исследуемых генов относительно контроля. Таким образом, уровень транскриптов исследуемых генов изменялся в соответствии с редокс-состоянием пула пластохинона: при окислении пула (в темноте и при об-

работке DCMU) – повышался, а при восстановлении пула (на свету) – снижался.

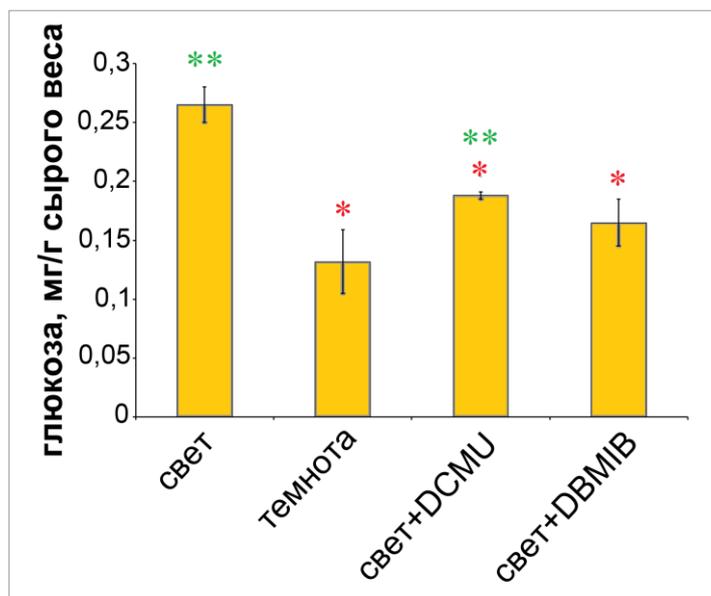


Рис. 9. Уровень глюкозы в листьях растений *Col-0*, обработанных ингибиторами DCMU и DBMIB. Одинарной звездочкой (*) показаны достоверные отличия от контроля на свету ($p < 0,05$), двойной звездочкой (**) показаны достоверные отличия от контроля в темноте ($p < 0,05$). DCMU – 3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметил-мочевина (20 мкМ), DBMIB – 2,5-дибромо-3-метил-6-изопро-пилбензохинон (20 мкМ). Темнота – растения выдерживали в темноте в течение 22 (18+4) часов; свет – растения выдерживали при освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ в течение 4 часов.

Обработка ингибиторами DCMU и DBMIB в равной степени приводила к снижению уровня глюкозы на свету (рис. 9). При этом экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* повышалась только при обработке ингибитором DCMU и не изменялась при обработке ингибитором DBMIB (рис. 8). Следовательно, изменения экспрессии исследуемых генов в экспериментах с ингибиторами фотосинтеза не являются следствием сахаропосредованных сигналов.

Уровень АФК в условиях экспериментов с ингибиторами фотосинтеза

Блокирование электрон-транспортных цепей приводит к изменению уровня АФК в соответствующих органеллах, а затем и в клетке в целом. В хлоропластах на свету источником АФК могут быть не только различные участки электрон-транспортной цепи, но и компоненты стромы (Иванов и др., 2013). Чтобы выяснить, не были ли связаны изменения экспрессии исследуемых генов с уровнем АФК, мы провели оценку уровня АФК при обработке листьев арабидопсиса DCMU и DBMIB.

С целью оценки возможной роли АФК в изменении экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* под действием ингибиторов фотосинтеза листья 14-суточных растений арабидопсиса линии *Col-0*, выдерживали 18 часов в темноте, затем инфильтровали раствором НСТ с добавлением DCMU, DBMIB, либо без ингибиторов фотосинтеза. Контрольные образцы экспонировали на свету (50

мкмоль*м⁻²с⁻¹) либо в темноте до выпадения формазана в осадок (30-40 минут) в контроле на свету. Образцы, инфильтрованные DCMU или DBMIB экспонировали на свету такое же время.

Количество выпавшего в осадок формазана (темно-синего цвета) пропорционально уровню супероксидного радикала в тканях листа. Как видно из рисунка 10, уровень супероксидного радикала был выше в образцах на свету, чем в темноте. Обработка ингибитором DCMU вызывала снижение уровня супероксидного радикала на свету. В присутствии DBMIB, уровень супероксидного радикала существенно не отличался от его уровня в контроле на свету (рис. 10).

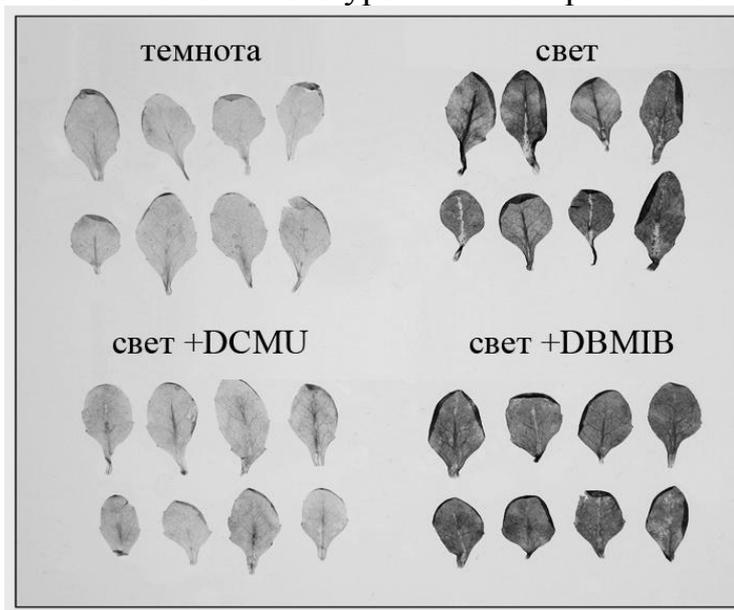


Рис. 10. Качественная оценка уровня супероксидного радикала в листьях растений *Col-0* в присутствии DCMU и DBMIB. Темнота – растения выдерживали 18 часов в темноте; свет – растения выдерживали 40 минут на свету; свет+DCMU – растения выдерживали 40 минут на свету в присутствии (20 мкМ) DCMU; свет+DBMIB – растения выдерживали 40 минут на свету в присутствии (20 мкМ) DBMIB. Освещенность в эксперименте – 120 мкмоль*м⁻²с⁻¹.

Из полученных данных следует, что обработка ингибитором DCMU приводила к снижению уровня супероксидного радикала на свету до значений, близких к контролю в темноте (рис. 10), а обработка ингибитором DBMIB существенных отличий от контроля на свету не вызывала. При этом экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* повышается только при обработке растений ингибитором DCMU и не изменяется при обработке ингибитором DBMIB (рис. 8). Из этого следует, что изменения уровня экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* в экспериментах с ингибиторами фотосинтеза могут быть вызваны не только изменением редокс-состояния пула пластохинона, но и изменением уровня АФК в клетке.

С целью более подробного изучения этого вопроса было проведено исследование роли АФК в регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*.

Роль активных форм кислорода в регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*

Одним из наиболее хорошо изученных типов ретроградных редокс-сигналов являются сигналы, опосредуемые АФК, которые могут участвовать в регуляции экспрессии ядерных генов. Поскольку обработка ингибиторами DCMU и DBMIB стимулирует генерацию АФК в электрон-транспортной цепи хлоропластов (Suzuki et al., 2012), следующей задачей являлось изучение вопроса о влиянии АФК в светозависимой регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*. Для этого 14-суточные растения, выращенные вертикально на чашках Петри, которые выдерживали 18 часов в темноте, после чего обрабатывали перекисью водорода (10 мкМ) и экспонировали 2 и 4 часа на свету или в темноте.

Экспрессия гена *GDH2* повышалась при обработке перекисью водорода на свету (рис. 11, А) и в темноте (рис. 11, Б) относительно контроля. Достоверных изменений в уровне транскриптов гена *GDH1* не наблюдали.

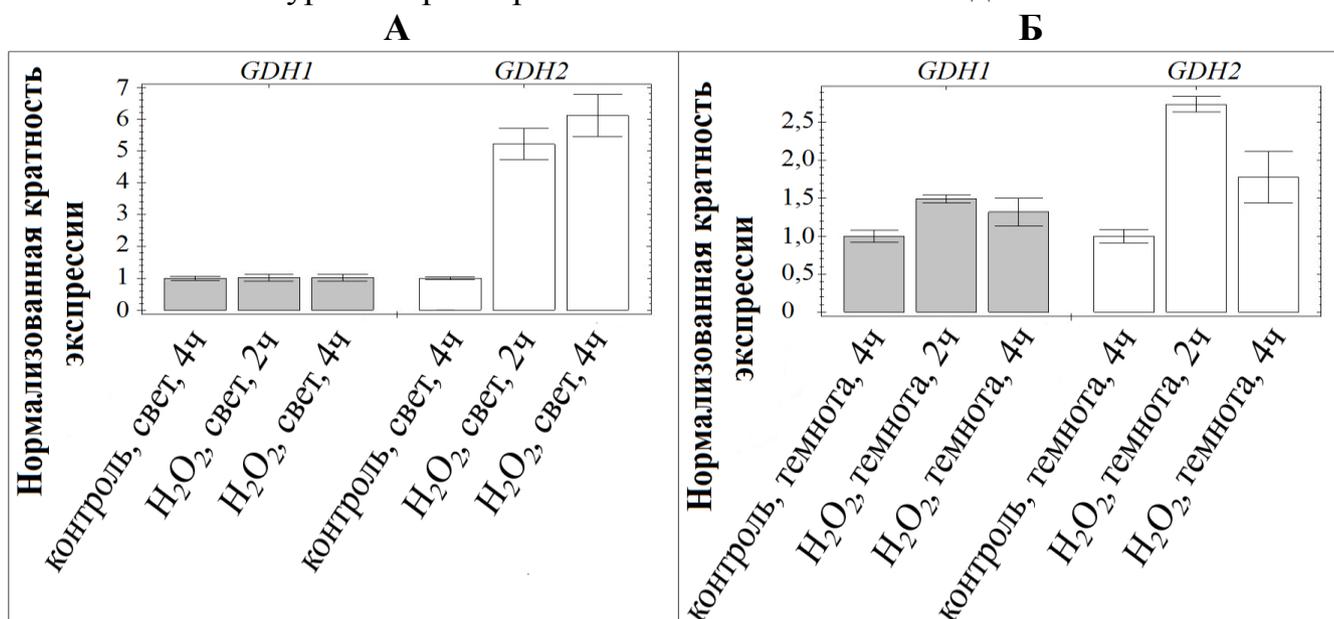


Рис. 11. Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* у 14-суточных растений линии *Col-0* на свету (А) и в темноте (Б) после обработки листьев 10 мМ перекисью водорода. Контроль – без обработки; H₂O₂ – листья опрысканы 10 мМ раствором перекиси водорода; темнота – экспозиция в темноте; свет – экспозиция на свету. Освещенность в эксперименте составляла 120 мкмоль*м⁻²*с⁻¹.

Таким образом, повышение уровня АФК вызывает повышение экспрессии гена *GDH2* и не может служить причиной снижения экспрессии этого гена на свету. Следовательно, изменения экспрессии исследуемых генов в экспериментах с ингибиторами фотосинтеза (рис. 8) действительно были вызваны изменением редокс-состояния пула пластохинона, а не уровня АФК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы получены принципиально новые данные о характере регуляции экспрессии ядерных генов *GDH1* и *GDH2*, кодирующих НАД(Н)-зависимую глутаматдегидрогеназу. Ранее в литературе было

высказано предположение, что светозависимые изменения экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* обусловлены действием сигналов, которые зависят от доступности углерода в виде углеводов, уровень которых выше на свету, чем в темноте, возникающих при изменении уровня сахаров в клетке растений (Miyashita, Good, 2008). В рамках данной работы предпринята попытка определить ключевые компоненты молекулярного механизма сахарозависимой регуляции генов *GDH1* и *GDH2*. Исследовали возможное участие НХК1 как наиболее изученного посредника передачи глюкозозависимых сигналов и транскрипционного фактора ABI4, координирующего множество различных сигнальных путей в растительной клетке, в том числе разнообразные сахарозависимые сигналы. По полученным данным установлено, что НХК1 не причастна к регуляции экспрессии гена *GDH2*, транскрипционный фактор ABI4 участвует в передаче сахарозависимого сигнала, приводящего к репрессии гена *GDH2*.

Выращивание растений арабидопсиса на средах, содержащих норфлуразон (ингибитор фитоендесатуразы), приводит к обесцвечиванию проростков вследствие фотодеструкции хлоропластов. У этих растений нарушена хлоропластно-ядерная координация экспрессии генов. В данной работе впервые описано изменение экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* в присутствии норфлуразона: установлено, что добавление норфлуразона в среду для выращивания приводит к повышению уровня транскриптов генов *GDH1* и *GDH2*. Следовательно, для светозависимого снижения экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* растениям необходимы функционально активные хлоропласты, что указывает на участие ретроградных сигналов. Полученные данные позволяют предположить, что причиной светозависимых изменений экспрессии исследуемых генов не являются сигналы, передаваемые через криптохромы и фитохромы, которые локализованы вне хлоропластов. Использование мутантов *gun1* и *gun1gun5* позволило установить, что сигналы, возникающие при синтезе тетрапирролов в хлоропластах, не являются причиной светозависимой регуляции экспрессии исследуемых генов.

Одним из механизмов, приводящим к регуляции экспрессии исследуемых генов на свету, может служить изменение редокс-состояния компонентов фотосинтетической цепи. В своих исследованиях мы применили ингибитор DCMU, который приводит к окислению пула пластохинона на свету, имитируя состояние пула в темноте. Растения арабидопсиса, обработанные ингибитором DCMU, имели более высокий уровень транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* на свету по сравнению с растениями, которые не были обработаны данным ингибитором. Обработка растений ингибитором DBMIB (приводит к сверхвосстановлению пула пластохинона) не приводила к такому повышению. Это указывает на причастность сигналов от пула пластохинона в светозависимой регуляции экспрессии исследуемых генов.

Поскольку при переходе «темнота-свет» в растительной клетке неизбежно повышается уровень АФК, мы также исследовали возможное участие АФК в светозависимой регуляции экспрессии генов глутаматдегидрогеназы. Для этого мы обрабатывали растения арабидопсиса линии дикого типа раствором перекиси водорода (10 мМ). Экспрессия гена *GDH2* повышалась при обработке пере-

кисью водорода на свету и в темноте. Экспрессия гена *GDH1* существенно не изменялась. По-видимому, экспрессия гена *GDH1* в меньшей степени подвергается регуляции, чем *GDH2*. Таким образом, сигналы, образующиеся при обработке растений перекисью водорода приводят к повышению экспрессии гена *GDH2*.

Нами показано, что обработка листьев ингибитором DBMIB на свету приводит к повышению, а DCMU – к понижению уровня супероксидного радикала в листьях арабидопсиса. Поскольку, согласно нашим данным, повышение уровня АФК вызывает повышение экспрессии гена *GDH2* (на свету и в темноте), оно не может служить причиной снижения экспрессии этого гена на свету. Следовательно, изменения экспрессии исследуемых генов в экспериментах с ингибиторами фотосинтеза (рис. 8 и 10) действительно были вызваны изменением редокс-состояния пула пластохинона, а не уровня АФК.

Полученные результаты можно суммировать в виде схемы (рис. 12).

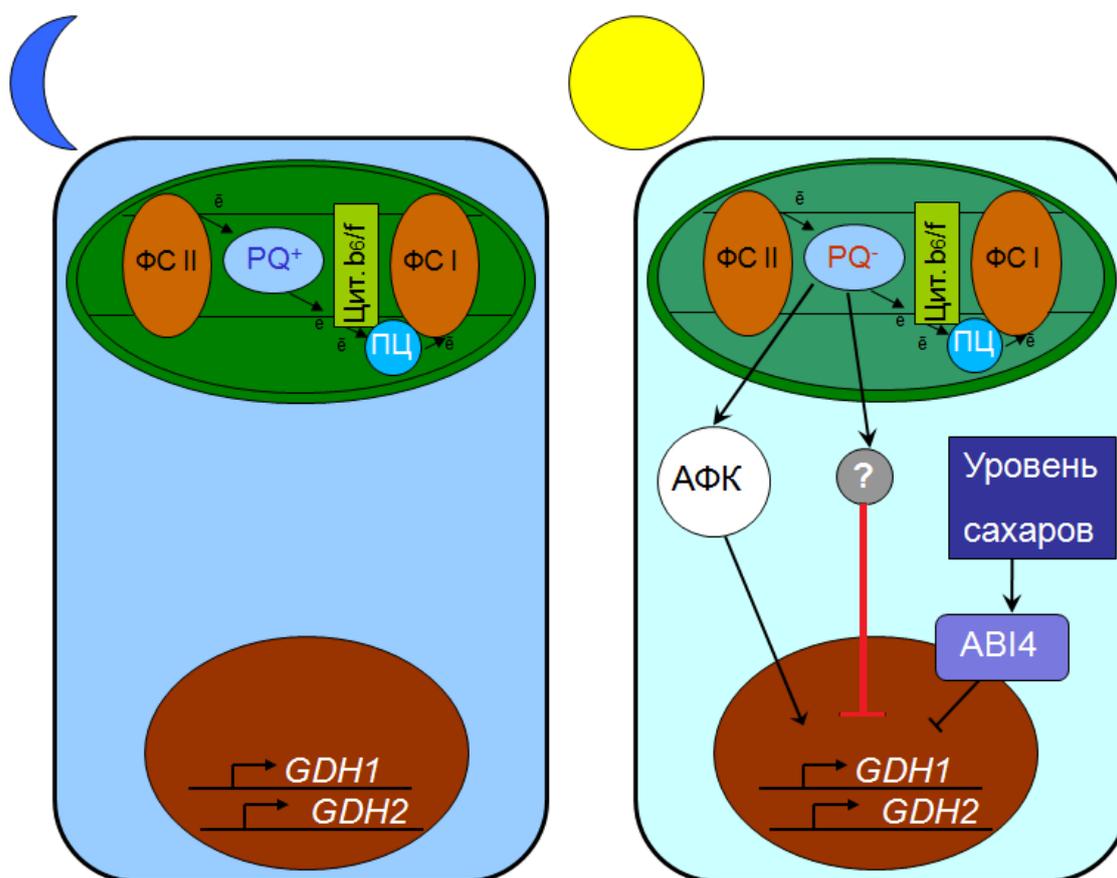


Рис.12. Схема светозависимой хлоропластно-ядерной регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*. ФС I – фотосистема 1. ФС II – фотосистема 2. PQ^+ – пул пластохинона в окисленном состоянии. PQ^- – пул пластохинона в восстановленном состоянии. *ABI4* – транскрипционный фактор. АФК – активные формы кислорода. ПЦ – пластоцианин. Цит.*b₆/f* – комплекс цитохромов.

На схеме показаны механизмы регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* на свету. Восстановление редокс-состояния пула пластохинона приводит к возникновению редокс-сигналов, которые приводят к снижению экспрессии исследуемых генов. Накопление сахаров на свету приводит к возникновению сигнала, который передается через транскрипционный фактор ABI4 и вызывает снижение экспрессии гена *GDH2*. Неизбежное образование АФК на свету в разных участках хлЭТЦ могло бы вызывать повышение экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*, однако репрессирующие сигналы, обусловленные восстановленным состоянием пула пластохинона и высоким уровнем сахаров, по-видимому, оказываются более значимыми. Низкий уровень транскриптов исследуемых генов на свету в конечном итоге определяется совокупностью всех трех упомянутых выше сигналов.

В темноте происходит повышение уровня экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* вследствие окисления пула пластохинона и снижения уровня сахаров.

Хотя повышение уровня АФК на свету, вероятно, оказывает некоторое индуцирующее действие на экспрессию исследуемых генов, их влияние, по-видимому, незначительно при низкой и умеренной освещенности. Индуцирующий эффект АФК можно наблюдать при освещенности порядка $900-1000 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

ВЫВОДЫ

1. Экспрессия гена *GDH2* подвержена сахарозависимой репрессии, которая не опосредуется гексокиназой 1, но осуществляется с участием транскрипционного фактора ABI4. Сахарозависимые сигналы не являются единственным механизмом регуляции экспрессии ядерного гена *GDH2*.

2. Светозависимая регуляция экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* не связана с сигналами, возникающими при синтезе тетрапирролов, и возможна только при функционально активных хлоропластах.

3. Окисленное состояние пула пластохинона в темноте или в присутствии ингибитора фотосинтеза DCMU на свету приводит к повышению экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*, что указывает на хлоропластно-ядерную регуляцию экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*, связанную с редокс-состоянием пула пластохинона тилакоидных мембран.

4. АФК, образующиеся при обработке перекисью водорода, либо вследствие экспозиции растений в условиях избыточной освещенности ($920 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), вызывают повышение экспрессии гена *GDH2* и являются, по-видимому, отдельным типом сигналов, регулирующих экспрессию исследуемых генов независимо от сигналов, возникающих при изменении редокс-состояния пула пластохинона.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Е.Ю. Гарник, В.И. Бельков, В.И. Тарасенко, Т.В. Потапова, М.А. Корзун, Ю.М. Константинов. Экспрессия гена глутаматдегидрогеназы *gdh2* арабидоп-

сиса индуцируется под влиянием ингибитора синтеза тетрапирролов норфлура- зона // Журнал стресс-физиологии и биохимии. – 2013. – Т. 9, № 4. – С. 299-309.

2. Е.Ю. Гарник, В.И. Бельков, В.И. Тарасенко, Ю.М. Константинов. Роль сахарозависимой регуляции в светозависимых изменениях экспрессии генов *gdh1* и *gdh2* арабидопсиса // Журнал стресс-физиологии и биохимии. – 2014. – Т. 10, № 4. – С. 67-76.

3. E.Yu. Garnik, D.V. Deeva, V.I. Belkov, V.I. Tarasenko, Yu.M. Konstantinov. Effects of light intensity on development and chlorophyll content in the *Arabidopsis* mutant plants with defects in photosynthesis // Journal of Stress Physiology and Biochemistry. – 2015. – Vol. 10, No 4. – P. 58-67.

4. Е.Ю. Гарник, В.И. Бельков, В.И. Тарасенко, М.А. Корзун, Ю.М.Константинов. Экспрессия генов глутатионредуктазы *Arabidopsis thaliana* зависит от хлоропластных сигналов // Биохимия. – 2015. – (принята в печать).

5. E.Yu. Garnik, V.I. Tarasenko, V.N. Shmakov, V.I. Bel'kov., Yu.M. Konstantinov. Regulation of *Arabidopsis gdh2* nuclear gene expression depends of functional state of mitochondria and chloroplasts // Journal of Stress Physiology and Biochemistry. – 2012. – Vol. 8, № 3. – P. S32.

6. E.Yu. Garnik, V.I. Tarasenko, V.N. Shmakov, V.I. Bel'kov, Yu.M. Konstantinov. Regulation of *Arabidopsis gdh2* nuclear gene expression depends of functional state of mitochondria and chloroplasts // 2-я международная научная конференция «Генетика, геномика и биотехнология растений», Иркутск, Россия, 30 июля – 03 августа 2012 г., материалы конференции, стр. 31.

7. В.И. Бельков, Е.Ю. Гарник, В.И. Тарасенко, Ю.М. Константинов. Изучение механизмов ретроградной и антероградной регуляции экспрессии генов *gdh1* и *gdh2 Arabidopsis thaliana* // Всероссийская научная конференция, Иркутск, Россия, 25-26 июня 2014 г., Материалы конференции, стр. 7-9.

8. Е.Ю. Гарник, М.А. Корзун, В.И. Тарасенко, В.И. Бельков, Ю.М. Константинов. Роль оргanelльных и цитоплазматических изоформ глутатионредуктазы арабидопсиса в ответе на стресс, вызываемый избыточным освещением // Всероссийская научная конференция, Иркутск, Россия, 25-26 июня 2014 г., Материалы конференции, стр. 15-18.

9. E.Yu. Garnik, T.V. Potapova, V.I. Tarasenko, V.I. Belkov, V.N. Shmakov, Yu.M. Konstantinov. The interactions of plant organelles on gene level: retrograde regulation and redox signaling // Материалы международной конференции по биологии и биотехнологии растений (28-30 мая, 2014, Алматы, Казахстан). – Алматы: ИББР, 2014 г., стр. 193.

10. V.I. Belkov, E.Y. Garnik, V.I. Tarasenko, Y.M. Konstantinov. Expression of *gdh1* and *gdh2* genes is regulated by redox signals of plastoquinone pool // 3-я Международная конференция "Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений", Новосибирск, Россия, 17-21 июня 2015 г., тезисы докладов, стр. 8.

11. E.Y. Garnik, M.A. Korzun, V.I. Belkov, V.I. Tarasenko, T.V. Yakovleva, Y.M. Konstantinov. The light depended regulation of glutation reductase genes in *Arabidopsis thaliana* // 3-я Международная конференция "Генетика, геномика,

биоинформатика и биотехнология растений", Новосибирск, Россия, 17-21 июня 2015 г., тезисы докладов, стр. 17.

Список условных сокращений

АФК – активные формы кислорода

НСТ – нитросиний тетразолий

НФ – норфлюразон

НХК1 – гексокиназа 1

хлЭТЦ – электрон-транспортная цепь хлоропластов

ABI4 – *abscisic insensitive 4* – транскрипционный фактор, чувствительный к абсцизовой кислоте

DBMIB – 2,5-дибромо-3-метил-6-изопропилбензохинон

DCMU – 3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметилмочевина

GDH – глутаматдегидрогеназа

H₂O₂ – пероксид водорода

PQ-пул – пул пластохинона, участок электрон-транспортной цепи хлоропластов

qRT-PCR – обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция в реальном времени