

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иркутск – 2024

Работа выполнена в лаборатории генетической инженерии растений
ФГБУН Сибирского Института Физиологии и Биохимии Растений СО РАН.

Научный руководитель: Доктор биологических наук, профессор
Константинов Юрий Михайлович

Официальные оппоненты: **Щербаков Дмитрий Юрьевич**, доктор
биологических наук, ФГБУН
«Лимнологический Институт» СО РАН,
заведующий лабораторией геносистематики

Землянская Елена Васильевна, кандидат
биологических наук, ФГБУН «ФИЦ Институт
Цитологии и Генетики» СО РАН, в.н.с.
лаборатории молекулярно-генетических
систем

Ведущая организация: ФГБУН «Институт Молекулярной и
Клеточной Биологии» СО РАН, г.
Новосибирск

Защита состоится «24» декабря 2024 г. в «14:00» часов на заседании
диссертационного совета 24.1.210.01 (Д003.047.01) на базе ФГБУН «Сибирский
Институт Физиологии и Биохимии Растений» СО РАН по адресу: 664033, г.
Иркутск, ул. Лермонтова, 132.

Факс: (3952) 51-07-54. E-mail: matmod@sifibr.irk.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке СО РАН и
на сайте ФГБУН «Сибирского Института Физиологии и Биохимии Растений» СО
РАН: <http://www.sifibr.irk.ru/>.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах с заверенными подписями
просим направлять по адресу: 664033, г. Иркутск, улица Лермонтова, 132 ученому
секретарю диссертационного совета.

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Коротаева Н.Е.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

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 (Hedtkе et al., 2000; Bаbа 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 (Bаbа 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 собственный 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*. 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, позволяющего осуществлять селекцию трансформированных митохондрий. Использование мутанта по

RPOТmp в качестве селективного реципиента генетических конструкций, содержащих ген *RPOТ2* дикого типа и целевой ген, может стать перспективным подходом для решения этой сложной задачи.

Цели и задачи исследования

Цель работы – изучение особенностей функций RPOТmp в митохондриях и хлоропластах, с использованием трансгенных растений арабидопсиса с измененной экспрессией данной РНК-полимеразы: мутантной линии *grotmp*, 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 RPOТmp.

5. Создать генетические конструкции, содержащие репортерный ген GFP под управлением промоторных областей генов *Cox1* и *Rrn26*, транскрипцию которых *in vivo* производят RPOТmp и RPOТm, с целью исследования транскрипционной активности промоторов с импортированных конструкций в изолированных митохондриях *in organello*.

Научная новизна

Впервые исследован полный транскриптом растений с гиперэкспрессией RPOТmp в митохондриях (OEM15) и хлоропластах (OEP12). Впервые проанализирована ко-экспрессия генов, вызываемая гиперэкспрессией или отсутствием функциональной RPOТmp у Арабидопсиса, таким образом показывая процессы и регуляторные пути, в которых потенциально участвует данный фермент. Впервые для анализа сетей белок-белковых взаимодействий было применено одновременно несколько метрик центральности. Впервые с помощью методов анализа сетей проанализированы связи между скоррелированной экспрессией, белок-белковыми взаимодействиями и мишенями транскрипционных факторов. Впервые показано, что мутантное

растение *rpotmp* содержит функциональный комплекс I в форме суперкомплекса I-III₂. Впервые получены генетические конструкции и показана дифференциальная экспрессия с них чужеродного гена в системе импорта ДНК в митохондрии *in organello*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Впервые исследованы транскриптомные данные, полученные методом ДНК-микрочипирования трансгенных растений с отсутствующей функциональной *RPO2mp* и с измененной экспрессией *RPO2mp*: с адресной гиперэкспрессией *RPO2mp* в митохондрии или хлоропласты – на основе растений дикого типа *Col-0*, и с комплементацией функций *RPO2mp* в митохондриях или хлоропластах – на основе мутантов по гену *rpotmp*.

Подтверждена и дополнена информация об изменениях в транскрипции генов мтДНК – впервые выявлено, что *in vivo* *RPO2mp* производит транскрипцию 25 генов мтДНК.

Связь *RPO2mp* с клеточными процессами исследована методами системной биологии – с помощью комбинации анализа транскриптома и баз данных по белок-белковым взаимодействиям и мишеням транскрипционных факторов, электрофоретических методов анализа ЭТЦ митохондрий и вестерн-блоттинга, в результате чего сделаны выводы о роли *RPO2mp* в поддержании клеточных процессов.

Сделано заключение, что растения с гиперэкспрессией *RPO2mp* характеризуются ранним прорастанием, ускоренным ростом и ранним цветением, что позволяет рассматривать гиперэкспрессию *RPO2mp* как способ получения новых трансгенных растений с улучшенными хозяйственно-ценными свойствами.

Выявленная роль *RPO2mp*, а также связь данного фермента с различными клеточными процессами, позволяют предложить ген *RPO2* в качестве репортерного гена для решения на данный момент пока недостигнутой задачи – трансформации митохондрий – с использованием системы импорта ДНК в митохондрии.

Положения, выносимые на защиту

1. На основе анализа генных сетей выявлена роль *RPO2mp* 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 *RPO2mp* 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.

Степень достоверности результатов

Все результаты были получены с применением не менее 3 биологических повторностей, оценку значимости различий проводили с помощью пакетов для R

(rstatix, limma, ggpubr, performanceAnalytics, psych, ClusterProfiler) с использованием современных параметрических и непараметрических критериев: Байесовский статистический анализ, критерий Стьюдента, критерий Манна-Уитни-Вилкоксона, критерий Фишера, критерий Краскела-Уоллиса, гипергеометрический тест.

Апробация работы и публикации

Результаты работы были представлены на 4 международных научных конференциях (PlantGen2019, BGRS-SB2020, 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).

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка использованной литературы и приложений. Работа изложена на 154 страницах, иллюстрирована 46 рисунками и содержит 6 таблиц. Приложения состоят из 2 таблиц. Список использованной литературы насчитывает 444 наименования.

Благодарности

Автор выражает благодарность за помощь в работе и ценные советы:

Всему коллективу ЛГИР СИФИБР СО РАН, особенно **Ю.М. Константинову, Е.Ю. Гарник, В.И. Тарасенко** за ценные советы и активное участие в обсуждении результатов

Н.Е. Коротаевой за консультирование в вопросах использования антител

И.В. Уколовой за консультирование в вопросах белкового электрофореза

Сотрудникам ИЦИГ СО РАН за валидацию применяемых методов на ранних этапах исследований

Кулинченко М.В. за создание подходящих условий для самостоятельного освоения и внедрения новых методов исследований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы отражены современные данные об РНК-полимеразе фагового типа *RPOtmp*, а также об особенностях экспрессии генов митохондрий и хлоропластов высших растений. Особенное внимание уделяется особенностям многоуровневой регуляции экспрессии генов митохондрий и хлоропластов: на уровне транскрипции, редактирования, сплайсинга и стабилизации транскриптов. Также освещаются особенности функционала митохондрий и хлоропластов в растительной клетке. Описывается организация и функционирование ЭТЦ митохондрий растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии *Arabidopsis thaliana* использованные в работе

В настоящем исследовании были использованы растения дикого типа (экотип Columbia-0), мутантная линия *rpotmp* с отсутствующей функциональной

RPO_Tmp, линии с гиперэкспрессией RPO_Tmp 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_Tmp 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).

Биоинформатические методы

Эксперимент ДНК-микрочипования был произведен ранее сотрудниками ЛГИР СИФИБР СО РАН. Для ДНК-микрочипования 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>. Данные депонированы в NCBI GEO под номером GSE251661.

Данные rDyeNormSignal и gDyeNormSignal (нормализованные с помощью контрольных проб в Agilent FE) обрабатывались в среде R с использованием нормализации “G-quantile” (пакет limma). Гены с дифференциальной экспрессией определяли комбинированным методом ($|\text{LogFoldChange}| \geq 1, p < 0.2$). Аннотация проведена по данным производителя и дополнена результатами BLAST по референсному транскриптому Арабидопсиса и геному сборки TAIR10.1. Анализ обогащения выполнен с помощью пакетов ClusterProfiler и org.At.tair.db. Визуализация диаграмм выполнена с помощью пакетов venn, ggplot2, complexHeatmap. Анализ ко-экспрессии выполнен с помощью пакета CEMiTool, основанном на WGCNA. Для анализа белок-белковых взаимодействий использовался интерактом из работы Yilmaz et al. (2022) и пакеты igraph и ggraph

для R. Были использованы 5 метрик центральности: степень, посредничества, близости, локальной эффективности, гармоническая. Анализ скоррелированной экспрессии проводился с помощью минимального остовного дерева, построенного по взвешенному алгоритму Прима.

Выращивание стерильных растений на чашках Петри

Перед посадкой семена стерилизовали смесью 80% EtOH + 0,05% TRITON X-100. Семена наносили на среду состава: фитагель 0,8%, 0,5х питательной среды Мурасиге-Скуга, стерилизованную кипячением. Стратификация проводилась при 4 °С в темноте не менее 2 суток. Выращивание проводилось при 22 °С, интенсивности освещения 150 мкМоль·м⁻²·с⁻¹ и фотопериоде 16 ч света / 8 часов темноты.

Выделение митохондрий и тилакоидных мембран

Митохондрии были выделены из образцов по 10-20 г 4-недельных проростков Арабидопсиса по модифицированному протоколу из работы Sweetlove et al. (2007), с помощью дифференциального центрифугирования и ступенчатого градиента плотности Percoll (50% - 28% - 20%).

Тилакоидные мембраны были выделены по методу, описанному в работе Casazza et al. (2021).

Белковый электрофорез

Голубой нативный электрофорез в полиакриламидном геле был проведен по методу, описанному в работе Wittig et al. (2016). Использовался градиентный гель 4-13% акриламида, условия электрофореза: 4 °С, 110 В, ночь. Вторая мера электрофореза проводилась по методу из работы Lasserre et al. (2012), в градиентном геле 10-20% акриламида, условия электрофореза: 4 °С, 150 В, ночь. Активность комплекса I в геле определялась по методике из работы Sabar et al. (2005), активность комплекса IV - по методу из работы Nijtmans et al. (2002).

Молекулярное клонирование

Для клонирования использованы штаммы *E. coli* DH5a и XL-Blue, культивируемые на среде LB. Трансформация проводилась с помощью набора TransformAid Bacterial Transformation Kit (Fermentas). Рестрикция - с помощью ферментов и буфера SibEnzyme. Выделение плазмидной ДНК - с помощью набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit #K0503 (Thermo). Амплификация фрагментов - с помощью ПЦР: 5 мкл Taq Buffer + (NH₄)₂SO₄ – MgCl₂ (Thermo), 4 мкл MgCl₂, 25 mM (Thermo), 1 мкл dNTPs mix (Evrogen), по 2 мкл растворов праймеров, 1-15 нг ДНК-матрицы, 0,5 мкл Taq DNA-Polymerase (Thermo), в объеме 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. Лигирование - с помощью набора Thermo Scientific T4 DNA Ligase. Элюция фрагментов ДНК из агарозного геля проводилась с помощью набора Cleanup Mini (Evrogen).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровни транскриптов генов мтДНК с дифференциальной экспрессией в

растениях изучаемых линий представлены на Рис. 1. У линии OEM15 наблюдался повышенный уровень 25 митохондриальных транскриптов, экспрессию которых *in vivo* производит RPO_{Tmp}. По-видимому, RPO_{Tmp} производит транскрипцию 15 ORF (*Orf109*, *Orf153A*, *Orf106D*, *Orf164*, *Orf143*, *Orf100C*, *Orf157*, *Orf187*, *Orf184*, *Orf120*, *Orf240A*, *Orf145C*, *Orf204*, *Orf101A*, *Orf102B*) (Gorbenko et al., 2024). У линий Tmp-P1 и *rpotmp* с недостатком RPO_{Tmp} в митохондриях повышались уровни транскриптов генов, транскрибируемых RPO_{Tm}, что предположительно является следствием повышенной копийности мтДНК. У линий, дефицитных по RPO_{Tmp} в митохондриях, наблюдалось снижение уровней транскриптов субъединиц комплексов IV (*Cox1*) и I (*Nad1A*, *Nad1C*, *Nad2*, *Nad5*, *Nad6*), *MatR*, *CcmC* и нескольких ORF. Эти данные также были подтверждены экспериментально с помощью кПЦР.

С помощью кПЦР было установлено что у линий с гиперэкспрессией RPO_{Tmp} 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. 2.

Анализ ко-экспрессии позволил выделить 5 модулей ко-экспрессии в транскриптомных данных. Выяснено, что модуль M1, сильнее всего ассоциированный с ответом на интенсивность света, был обогащен у линии OEM15 и подавлялся у линии OEP12. Анализ сети белок-белковых взаимодействий выявил, что узлы наивысшей центральности этого модуля ассоциированы с биогенезом клеточной стенки, регуляцией состояния покоя семян и регуляцией постэмбрионального развития. Модуль M4, ассоциированный с ответом на ауксин, был обогащен у обеих линий гиперэкспрессоров (OEM15 и OEP12). Топ-10 узлов наивысшей центральности сети белок-белковых взаимодействий модуля ассоциированы с ответом на красный и дальний красный свет. С помощью анализа обогащения модулей ко-экспрессией мишенями транскрипционных факторов выяснено, что M1 вероятно регулируется ТФ, ассоциированными с циркадными ритмами, M2 – ТФ, ассоциированными с brassinостероидным сигнальным путем, M3 – ТФ с NAC-доменом. Фактор SARD1 (AT1G73805), мишени которого сильнее всего избыточно представлены в наборах генов M2 и M4, является одним из двух ключевых регуляторов биосинтеза СК, ассоциированного с приобретением системной устойчивости (Zhang et al. 2010). Среди избыточно представленных в M2 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).

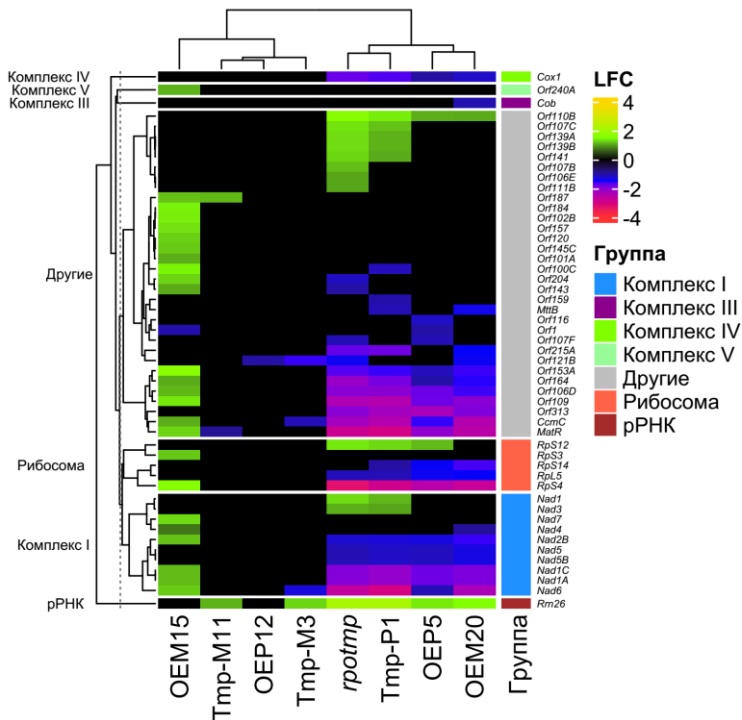


Рис. 1. Уровни транскриптов генов мтДНК исследуемых линий.

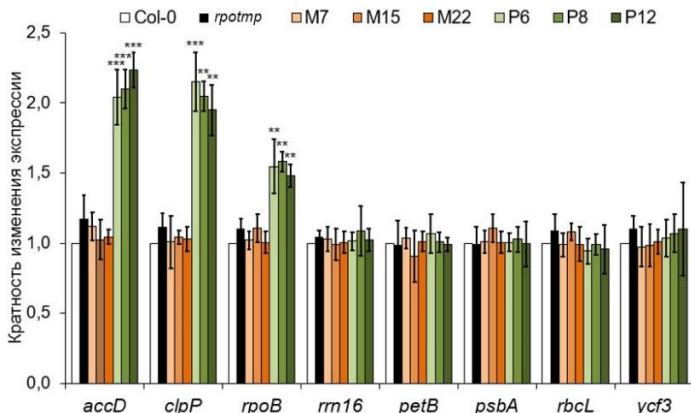


Рис. 2. Профиль экспрессии некоторых генов хлДНК у исследуемых линий трансгенных растений (Gorbenko et al., 2024). Приведены уровни значимости изменений относительно Col-0 (тест Стьюдента): ** - $P < 0,01$, *** - $P < 0,001$.

Уровни лог-экспрессии генов, содержащихся в модулях ко-экспрессии, исследованы попарным корреляционным анализом (Пирсон), из данных с сильной корреляционной связью ($R \geq 0,8$) построен взвешенный граф, на основе которого построено 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. 3).

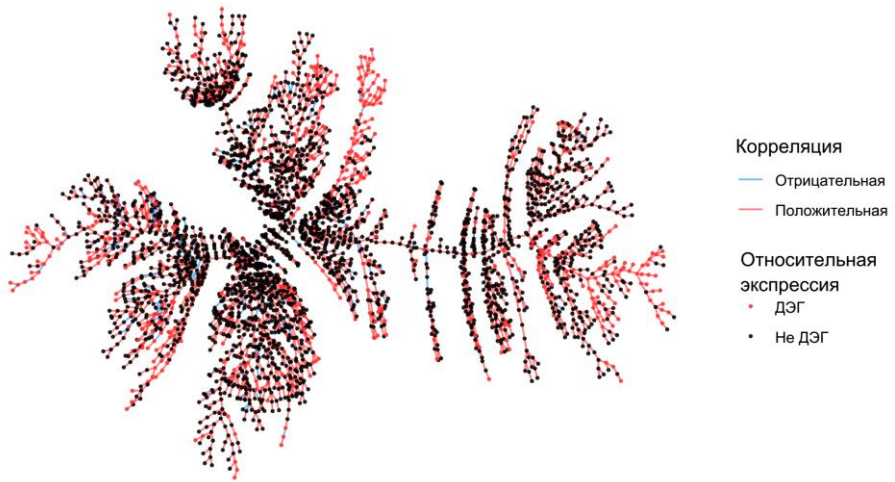


Рис. 3. Минимальное остовное дерево скоррелированной экспрессии генов. Синие ребра соответствуют обратной корреляции, красные – прямой. Красные узлы соответствуют генам с дифференциальной экспрессией (хотя бы в одной исследуемой линии), черные – генам, экспрессия которых у дикого типа и исследуемых линий растений достоверно не различалась.

МОД было поделено на кластеры, из которых с помощью анализа обогащения наборов генов по данным о дифференциальной экспрессии были отобраны кластеры, обогащенные у исследуемых линий. Один из обогащенных кластеров содержал митохондриальные *RPO*mp-зависимые ДЭГ (экспрессия которых повышена у линии *OEM15*, и подавлялась у мутанта *rpotmp*), и обратно скоррелированную с ними группу генов ядерного кодирования. Причем экспрессия этих ядерных генов повышалась в ответ на недостаток митохондриальных транскриптов (*rpotmp*), но не реагировала на повышение их уровней (*OEM15*). В составе этой группы генов находились *DCC1* (регулирующий активность комплекса I), *ALAAT2* (гликолиз), *At12Cys-2* (предположительный трансдуктор ретроградного сигнала недостаточности по комплексу I) и транскрипционные факторы *NAC044* и *ERF071*.

Комбинированные сети были получены совмещением сетей скоррелированной экспрессии генов (только ДЭГ), белок-белковых

взаимодействий, и взаимодействий транскрипционных факторов с их мишенями (Рис. 4). Анализом комбинированных сетей выявлено, что корреляционные сети OEM15 и ОЕР12 имели 26 общих узлов белок-белковых взаимодействий, а также 64 общих дифференциально экспрессирующихся мишени разных транскрипционных факторов. Таким образом, гиперэкспрессия RPO1mp, 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.

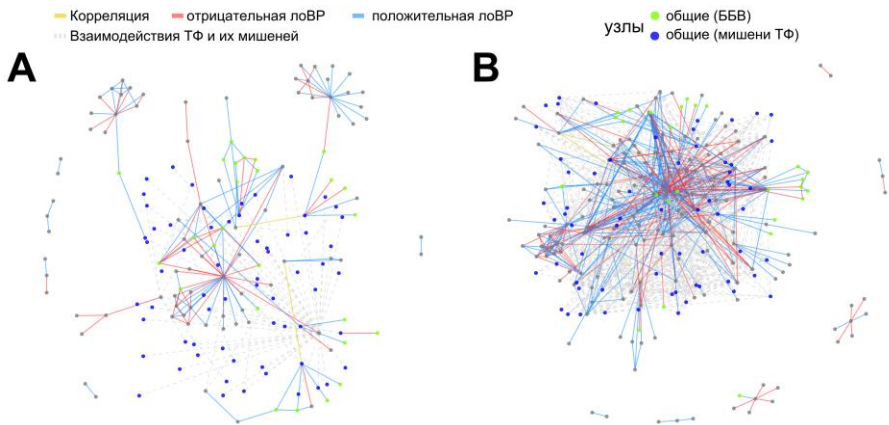


Рис. 4. Комбинированные сети для OEM15 (А) и ОЕР12 (В). Цветом отмечены совпадающие узлы: зеленым – узлы сети ББВ, непосредственно взаимодействующие с ДЭГ из МОД, общие для обеих линий, синим – мишени транскрипционных факторов, общие для обеих линий. лoBP – логит-оценка взаимного ранга, показатель ко-экспрессии. Корреляционные связи между узлами показаны желтым, отрицательная лoBP – красным, положительная лoBP – синим, связи ТФ-мишень серым пунктиром.

Ранее сотрудниками лаборатории было выявлено, что семена гиперэкспрессоров RPO1mp менее подвержены ингибированию прорастания повышенными концентрациями сахарозы в питательной среде, из чего была сделана гипотеза о нарушении состояния покоя семян у этих линий. Для проверки данной гипотезы у растений-гиперэкспрессоров RPO1mp исследована всхожесть семян без световой стимуляции (Gorbenko et al., 2024). Всхожесть линий OEM и ОЕР 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, сигнализируя о нарушении состояния покоя (Рис. 5).

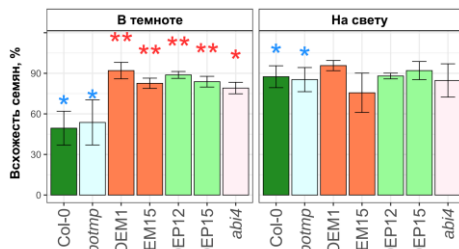


Рис. 5. Всхожесть семян арабидопсиса дикого типа Col-0, мутанта *protmp* и трансгенных линий с гиперэкспрессией RPO $_{tmp}$ в митохондриях (OEM1, OEM15) или хлоропластах (OEP12, OEP15) на свету и в темноте (Gorbenko et al., 2024). Значимость различий от растения дикого типа в тех же условиях показана красными звездочками, от растения той же линии в других условиях – синими: * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$.

Одной из причин нарушения состояния покоя семян может быть снижение чувствительности к АБК. Для проверки данной гипотезы была исследована всхожесть семян на средах с добавленной АБК (Рис. 6).

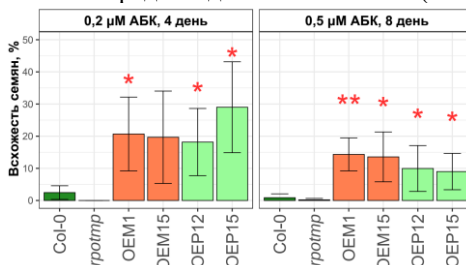


Рис. 6. Влияние АБК на всхожесть семян исследуемых линий (Gorbenko et al., 2024). Показаны различия от Col-0 (критерий Манна-Уитни-Вилкоксона): * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$. Эксперимент проводили в условиях фотопериода 16 ч свет / 8 ч темнота.

Семена практически всех исследуемых гиперэкспрессоров прорастали в присутствии АБК значительно лучше, чем семена растения дикого типа. Семена мутантного растения *protmp*, напротив, демонстрировали гиперчувствительность к экзогенной АБК и ко времени измерения проросшими обнаруживались не более 1 % семян.

Сравнение электрофореграмм BN-PAGE линий Col-0 и митохондриального гиперэкспрессора OEM15 представлено на Рис. 7. Содержание суперкомплексов I+III $_2$ и I $_2$ +III $_2$ в линии OEM15 было несколько повышено.

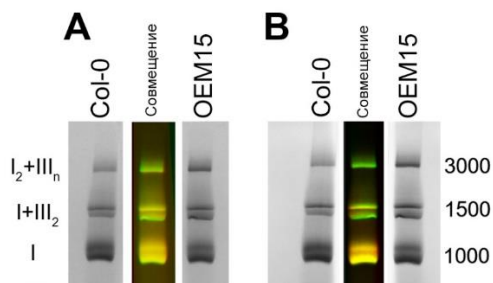


Рис. 7. Электрофореграммы BN-PAGE Col-0 и OEM15: А – гистохимическое определение активности комплекса I, В – окраска коллоидным кумасси после определения активности комплекса I (Gorbenko et al., 2024). По центру обеих частей рисунка показано совмещение электрофореграмм: Col-0 в красном канале, OEM15 – в зеленом.

Трансформация митохондрий *in vivo* является одной из нерешенных на данный момент задач. Одной из основных проблем трансформации митохондрий *in vivo* является отсутствие гена, позволяющего осуществлять селекцию трансформированных митохондрий. Использование мутанта по гену *rpmr* в качестве селективного реципиента генетических конструкций, содержащих ген *RPT2* дикога 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. Созданные генетические конструкции pBS-Pcox1 и pBS-Prrn26 содержат ген *GFP* из *Aequoria victoria* под управлением промоторов генов *Cox1* и *Rrn26* из мтДНК Арабидопсиса (Рис. 8).

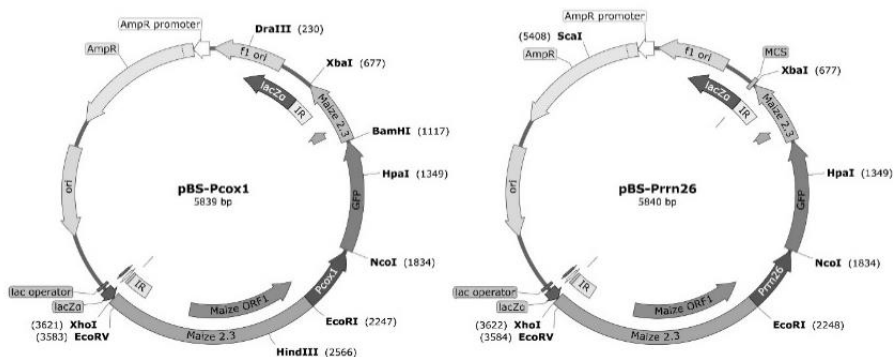


Рис. 8. Схемы полученных на основе плазмиды pBlueScript генетических конструкций pBS-Pcox1 и pBS-Prrn26.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате анализа транскриптома линий *Arabidopsis thaliana* с измененной экспрессией RPO1mp 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. 9.

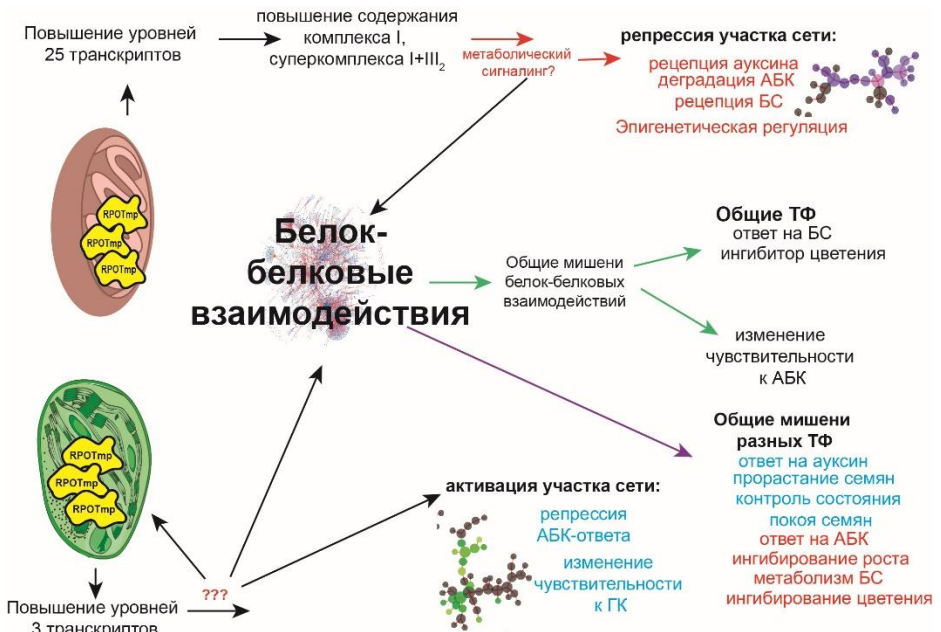


Рис. 9. Схема клеточных событий, которые происходят в ответ на изменение количества активной RPO1mp в хлоропластах и митохондриях. Синим цветом обозначены процессы, к которым принадлежали соответствующие ДЭГ с усиленной экспрессией, красным – процессы, к которым принадлежали ДЭГ с подавляемой экспрессией, зелеными стрелками – группы генов, активность которых изменяется вследствие белок-белковых взаимодействий.

При митохондриальной гиперэкспрессии RPO1mp происходит повышение уровней ряда митохондриальных транскриптов, что приводит к некоторому повышению количества активного комплекса I в виде суперкомплекса I+III₂. 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 *ATX4*, который производит модификацию хроматина в ответ на АБК, модулируя экспрессию тысяч генов. Его подавление без сомнения должно влиять на чувствительность к АБК.

При гиперэкспрессии *RPOTrp* в пластидной адресации происходит повышение уровней пластидных транскриптов – *AccD*, *ClpP*, *RpoB*. В ответ произошла активация участка регуляторной сети, среди которых были *SAMTA1* и *TNO6* – участвующие в ответе на АБК, *ALNS* и *GID1C* – участвующие в ответе на ГК.

Гиперэкспрессия *RPOTrp* 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: *VEE1* – участник ответа на БС, 6 ТФ – участвующих в удлинении гипокотыля, дифференциации листа, цветении, и гены *NAI2* и *NAI3* – 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 *roptrp* (Рис. 10). Отсутствие *RPOTrp* 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 *roptrp*, приводят

к активации ко-регулируемой группы генов, 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*).

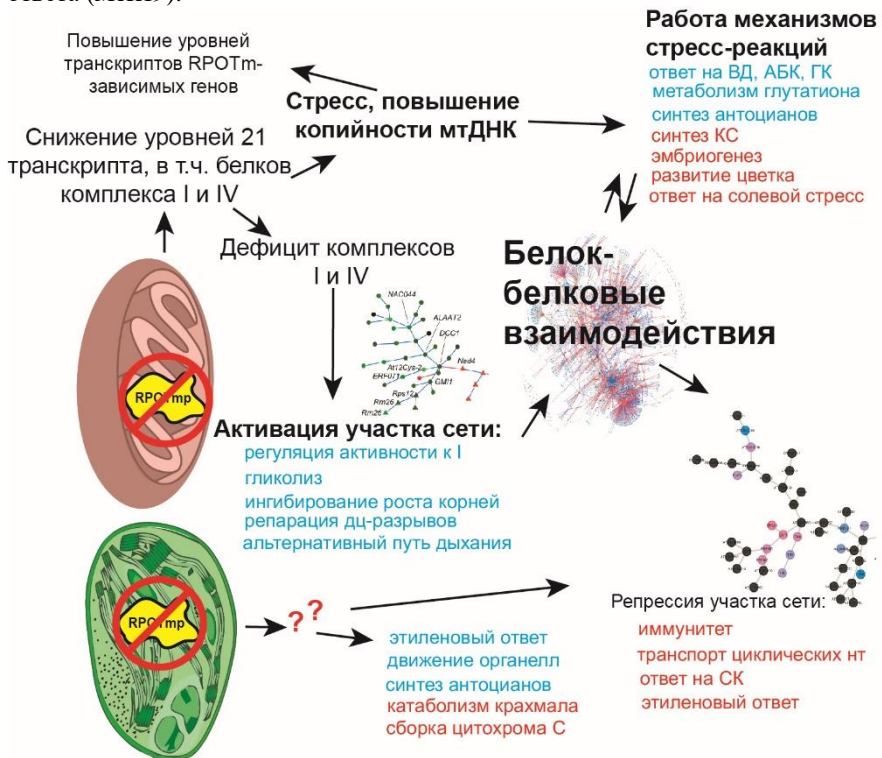


Рис. 10. Схема клеточных событий, вызывающих фенотип мутанта *rpotmp*. Синим цветом обозначены процессы, к которым принадлежали соответствующие ДЭГ с усиленной экспрессией, красным – процессы, к которым принадлежали ДЭГ с подавляемой экспрессией.

Согласно полученным данным, отсутствие RPOmp в пластидах

приводило к усилению экспрессии *ERF071* (этиленовый ответ) и *PAP1* (синтез антоцианов), репрессии *BMY3* (катаболизм крахмала) и *ABC14* (сборка цитохрома C). Однако нужно отметить, что данное утверждение является спорным – изменений уровней транскриптов хлДНК при этом не происходит, поэтому не ясно, как именно происходит рецепция и передача сигнала отсутствия RPO_{Tmp} в пластидах. Одной из возможностей является недостаточная комплементация функций RPO_{Tmp} в линии Tmp-M3 (которая наряду с *rpotmp* использовалась для выявления генов ответа на недостаток RPO_{Tmp} в пластидах). А учитывая двусмысленность транзитного пептида RPO_{Tmp} 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 RPO_{Tmp}, полученная в настоящей работе, говорит в пользу того, что RPO_{Tmp} 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-Prn26, 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 *Prn26* (RPO_{Tm}-зависимый) выше, чем для транскрипта под управлением *Pcox1* (RPO_{Tmp}-зависимый) (Tarasenko et al., 2023). Таким образом, система, состоящая из вектора на основе плазмиды S3 кукурузы, содержащая ген *RPO_{Tmp}* под управлением промотора *Prn26* (RPO_{Tm}-зависимый) потенциально позволяет провести трансформацию митохондрий *rpotmp* методом трансфекции протопластов.

ВЫВОДЫ

1. РНК-полимераза RPO_{Tmp} *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_{Tmp}-зависимым генам.

2. Гиперэкспрессия гена RPOТmp в *Arabidopsis thaliana* в мт-адресации приводит к повышенному содержанию комплекса I в митохондриях в форме суперкомплекса I+III₂.

3. Гиперэкспрессия RPOТmp 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*), модуляциях в рецепции или метаболизме фитогормонов: АБК (*PUB12, ATX4, CAMTA1, 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 RPOТmp в митохондриях, находятся под контролем группы ТФ семейства NAC.

5. Отсутствие функциональной RPOТmp приводит к развитию стрессового состояния, проявляющегося в повышении чувствительности к АБК (*MKK9, GSTF6, ABR*) и солевому стрессу (*TSP0*), модуляциям метаболизма и рецепции фитогормонов (*TSP0, BT4, BAP1*).

6. Созданы генетические конструкции pBS-Pcox1 и pBS-Prn26, 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 *Pcox1* и *Prn26* с импортированной ДНК, причем уровень транскрипта *GFP* зависит от промотора и коррелирует с уровнями транскриптов *Cox1* и *Rrn26*, соответственно.

СПИСОК ОСНОВНЫХ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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.

2. **Gorbenko I.V.** Overexpression of RPOТmp 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.

СПИСОК ДРУГИХ СТАТЕЙ

1. **Gorbenko, I.V.**; Petrushin, I.S.; Shcherban, A.B.; Orlov, Y.L.; Konstantinov, Y.M. Short Interrupted Repeat Cassette (SIRC)—Novel Type of Repetitive DNA Element Found in Arabidopsis thaliana. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 11116. <https://doi.org/10.3390/ijms24131116>

2. Makarova, L.E., Markova, Y.A., Zaytseva, Y.V., Bychkova, A.A., **Gorbenko, I.V.**, Konstantinov, Yu. M., Vasiliev, I. A., Morits, A. S. & Bizikov, P. A. Phylogeny and Characterization of Endophytic Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Pea Seedlings (*Pisum Sativum* L.). *Appl Biochem Microbiol* 60, 715–721 (2024). <https://doi.org/10.1134/S0003683824604426>

3. Korotaeva, N.; Shmakov, V.; Bel'kov, V.; Pyatrikas, D.; Moldavskaya, S.; **Gorbenko, I.** The Influence of Water Deficit on Dehydrin Content in Callus Culture Cells of Scots Pine. *Plants* 2024, 13, 2752. <https://doi.org/10.3390/plants13192752>

МАТЕРИАЛЫ И ТЕЗИСЫ КОНФЕРЕНЦИЙ

1. Tarasenko V. I. Overexpression of RPO_{Tmp}, 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

2. Gorbenko I. V. Study of the role of Arabidopsis thaliana RNA-polymerase with dual-targeting RPO_{Tmp} in plant early development and stress response / I. V. Gorbenko, V. I. Tarasenko, E. Yu. Garnik, V. I. Belkov, Yu. M. Konstantinov, M. V. Koulintchenko // *Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2019) : The Fifth International Scientific Conference (June 24–29, 2019, Novosibirsk, Russia); Abstracts* / Eds. A.V. Kochetov, E.A. Salina. Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2019. – 255 pp. – P. 81.

3. Gorbenko I.V. The meta-analysis of transcriptomes of Arabidopsis thaliana transgenic plants with altered expression of dual-targeting RNA-polymerase RPO_{Tmp} / I.V. Gorbenko, V.I. Tarasenko, A.I. Katyshev, V.I. Belkov, Yu.M. Konstantinov, M.V. Koulintchenko // *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2020) : The Twelfth International Multiconference (06–10 July 2020, Novosibirsk, Russia); Abstracts* / Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Novosibirsk State University. – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2020. – P. 315-316.

4. Gorbenko I.V. The mitochondrial plasmids as a new type of mobile genetic elements in higher plants / I.V. Gorbenko, I.S. Petrushin, Yu.M. Konstantinov // *The 6th international scientific conference "Plant genetics, genomics, bioinformatics and biotechnology" PlantGen2021 (Novosibirsk, Russia); Abstracts* / Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Novosibirsk State University. – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2021. – P. 83.

Горбенко Игорь Владимирович
РОЛЬ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ДВОЙНОЙ АДРЕСАЦИИ РРОТМР *ARABIDOPSIS*
THALIANA В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ ПЛАСТИД И МИТОХОНДРИЙ
Автореф. дис. на соискание ученой степени кандидата биологических наук