

СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
СИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ СО РАН
ОБЩЕСТВО ФИЗИОЛОГОВ РАСТЕНИЙ РОССИИ
ВАВИЛОВСКОЕ ОБЩЕСТВО ГЕНЕТИКОВ И СЕЛЕКЦИОНЕРОВ
ИРКУТСКАЯ ОБЛАСТНАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ УНИВЕРСАЛЬНАЯ НАУЧНАЯ
БИБЛИОТЕКА ИМЕНИ И. И. МОЛЧАНОВА-СИБИРСКОГО

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОРГАНЕЛЛ

Материалы Всероссийской научной конференции

Иркутск, 25–27 июня 2014 г.

ИРКУТСК
2014

УДК 575:581.1
М55

Механизмы регуляции функций растительных органелл: материалы Всероссийской научной конференции. 25–27 июня 2014 г. – Иркутск: НЦРВХ СО РАН, 2014. – 102 с.

ISBN 978-5-98277-175-9

В книге представлены материалы докладов Всероссийской научной конференции «Механизмы регуляции функций растительных органелл» (Иркутск, 25–27 июня 2014 г.), посвященной такой актуальной проблеме современной биологии, физиологии и биохимии растений как функционирование субклеточных органелл. Изложены результаты исследований молекулярных механизмов регуляции функций энерготрансформирующих и запасющих органелл растений. Значительное внимание уделено рассмотрению состояния исследований регуляции экспрессии митохондриальных и хлоропластных генов с использованием генно-инженерных подходов, а также исследований, направленных на модификацию геномов ядер, хлоропластов и митохондрий с целью решения фундаментальных и биотехнологических задач. Издание предназначено для специалистов в области физиологии и биохимии растений, молекулярной биологии и генетики, а также студентов и аспирантов биологических специальностей высших учебных заведений.

Конференция проводится при финансовой поддержке
компаний «СибЛабСервис», г. Иркутск
компаний «ОПТЭК» (Карл Цейсс), г. Новосибирск
и компании «Никко-Восток», г. Иркутск

 **СибЛабСервис**


ОПТЭК
Объединяя решения

 **НИККО-ВОСТОК**
(3952) 56-30-38 e-mail: nikko-vostok@irk.ru

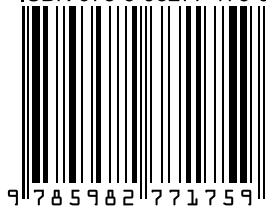
Редакционная коллегия:

Ю.М. Константинов (отв. редактор), Е.Ю. Гарник, В.Н. Нурминский

Издание осуществлено при финансовой поддержке компании «СибЛабСервис»,
г. Иркутск, компании «ОПТЭК» (Карл Цейсс), г. Новосибирск и
компаний «Никко-Восток», г. Иркутск

Материалы публикуются в авторской редакции

ISBN 978-5-98277-175-9



© Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, 2014
© ФГБУ «НЦРВХ» СО РАН, 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

В.И. Бельков, Е.Ю. Гарник, В.И. Тарасенко, Ю.М. Константинов. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕТРОГРАДНОЙ И АНТЕРОГРАДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ <i>GDH1</i> , <i>GDH2</i> <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	7
О.А. Боровик, О.И. Грабельных, Н.А. Королева, Т.П. Побежимова. РОЛЬ СВЕТА И НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ОКСИДАЗЫ И НАД(Ф)-Н-ДЕГИДРОГЕНАЗ II ТИПА В МИТОХОНДРИЯХ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ	9
Б.Ф. Ванюшин. МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК У РАСТЕНИЙ: СПЕЦИФИЧНОСТЬ, КОМПАРТМЕНТЫ И ФЕРМЕНТЫ	12
Е.В. Гармаш, О.И. Грабельных, И.О. Велегжанинов, О.А. Боровик, Е.В. Коковкина, И.В. Далькэ, В.К. Войников, Т.К. Головкин. РОЛЬ НЕФОСФОРИЛИРУЮЩИХ ПУТЕЙ ДЫХАНИЯ В ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ КЛЕТКЕ	13
Е.Ю. Гарник, М.А. Корзун, В.И. Тарасенко, В.И. Бельков, Ю.М. Константинов. РОЛЬ ОРГАНЕЛЬНЫХ И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ИЗОФОРМ ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗЫ АРАБИДОПСИСА В ОТВЕТЕ НА СТРЕСС, ВЫЗЫВАЕМЫЙ ИЗБЫТОЧНЫМ ОСВЕЩЕНИЕМ	15
Е.С. Глаголева, Д.А. Кнорре. ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА МИТОХОНДРИЙ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК <i>PANAX JAPONICUS</i>	18
Е.Л. Горбылева, Е.Г. Рихванов, Т.М. Русалева, А.В. Федяева, А.В. Степанов. БЛОКИРОВАНИЕ ПРИТОКА ИОНОВ КАЛЬЦИЯ ПОДАВЛЯЕТ СИНТЕЗ HSP101 И ИНДУЦИРУЕМУЮ ТЕРМОТОЛЕРАНТНОСТЬ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	20
В.В. Емельянов, Т.В. Чиркова. АКТИВНЫЕ ФОРМЫ ОКИСЛИТЕЛЕЙ: РОЛЬ В РАЗВИТИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ И СИГНАЛИНГЕ ПРИ СТРЕССЕ	23
И.В. Жигачева, Е.М. Миль, В.И. Бинюков, И.П. Генерозова, А.Г. Шугаев. ПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ФОСФОРГАНИЧЕСКОГО РЕГУЛЯТОРА РОСТА РАСТЕНИЙ НА МОРФОЛОГИЮ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА В УСЛОВИЯХ НЕДОСТАТОЧНОГО УВЛАЖНЕНИЯ И УМЕРЕННОГО ОХЛАЖДЕНИЯ ..	24
Б.Н. Иванов, М.М. Борисова-Мубаракшина, И.А. Найдов, М.А. Козулева, Н.Н. Руденко, Д.В. Ветошкина. ПРОДУКЦИЯ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В ХЛОРОПЛАСТАХ: МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ И ДИФФУЗИИ И СИГНАЛЬНАЯ РОЛЬ	27
М.В. Иванова, Г.Г. Суворова. ВЛИЯНИЕ КЛИМАТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА СОСТОЯНИЕ ПИГМЕНТНОГО АППАРАТА ХВОИ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (<i>PINUS SYLVESTRIS</i> L.) В БАЙКАЛЬСКОМ РЕГИОНЕ	29
Л.К. Игнатова, Е.М. Журикова, Н.Н. Руденко, Т.П. Федорчук, Б.Н. Иванов. УЧАСТИЕ КАРБОАНГИДРАЗ В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ ХЛОРОПЛАСТА	32
Е.С. Клименко, П.А. Гребнев, А. Дитриш, Ю.М. Константинов, М.В. Кулинченко. ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ МЕХАНИЗМОВ ИМПОРТА ДНК РАЗНОЙ ДЛИНЫ И СТРУКТУРЫ В МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ	34

Д.А. Кнорре, А.Н. Зырина, М.И. Сорокин, С.С. Соколов, Ф.Ф. Северин. РОЛЬ РЕТРОГРАДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ДРОЖЖЕЙ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	37
Е.В. Колесникова, Н.В. Озолина. РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССОВ АКТИВНОГО ТРАНСПОРТА ВАКУОЛЯРНОЙ МЕМБРАНЫ	38
М.А. Кондакова, И.В. Уколова, А.И. Антипина, Г.Б. Боровский, В.К. Войников. ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА СОСТАВ И АКТИВНОСТЬ СУПЕРКОМПЛЕКСОВ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА	41
А.В. Корсукова, О.И. Грабельных, О.А. Боровик, Н.В. Дорофеев, Т.П. Побежимова, В.К. Войников. ТЕБУКОНАЗОЛ ВЛИЯЕТ НА ДЫХАТЕЛЬНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ МИТОХОНДРИЙ И УСТОЙЧИВОСТЬ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ К НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ	43
В.И. Тарасенко, А.И. Катышев, В.В. Черникова, М.В. Кулинченко, Ю.М. Константинов. ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ РНК-ПОЛИМЕРАЗУ RROTMP МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ И ХЛОРОПЛАСТНОЙ	46
О.О. Майкова, С.И. Беликов, Д.Ю. Щербаков. ИНВЕРТИРОВАННЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ В МИТОХОНДРИАЛЬНОМ ГЕНОМЕ БАЙКАЛЬСКИХ ГУБОК СЕМЕЙСТВА <i>LUBOMIRSKIIDAE</i>	48
Л.Е. Макарова, Н.В. Озолина, Е.В. Колесникова, Л.В. Дударева. ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА И АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ВЫСВОБОЖДАЕМЫХ ПОСЛЕ КИСЛОТНОГОГИДРОЛИЗА ИЗ ВАКУОЛЯРНОГО СОКА СТОЛОВОЙ СВЕКЛЫ (<i>BETA VULGARIS L.</i>)	51
И.С. Нестеркина, Н.В. Озолина. РОЛЬ ЛИПИДОВ ТОНОПЛАСТА В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ ВАКУОЛИ	52
В.Н. Нурминский, Н.В. Озолина, И.С. Нестеркина, А.Л. Ракевич, А.А. Пилипченко. ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ БИОФИЗИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ТОНОПЛАСТА МЕТОДОМ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ	55
Н.В. Обручева, С.В. Литягина, И.А. Синькевич. ВАКУОЛИ В ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ: СОХРАННОСТЬ, БИОГЕНЕЗ, ВОДНЫЙ ТРАНСПОРТ	58
Н.В. Озолина. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ ВАКУОЛИ В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ	59
Н.В. Парамонова. СПОСОБЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ХЛОРОПЛАСТАМИ И МИТОХОНДРИЯМИ В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ	62
Н.В. Парамонова. УЛЬТРАСТРУКТУРА СЕМЯДОЛЕЙ ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЯН ГОРОХА В СВЯЗИ С МОБИЛИЗАЦИЕЙ ЗАПАСНЫХ ВЕЩЕСТВ	65
Я.О. Зубо, Т.В. Потапова, В.И. Тарасенко, Ю.М. Константинов, Т. Бернер. ВЛИЯНИЕ РЕДОКС-СОСТОЯНИЯ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ НА ТРАНСКРИПЦИЮ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ И ХЛОРОПЛАСТНЫХ ГЕНОВ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	67
Е.В. Прадедова, О.Д. Нимаева, Р.К. Салаяев. РЕДОКС-ФЕРМЕНТЫ ВАКУОЛЕЙ КЛЕТОК КОРНЕПЛОДОВ СТОЛОВОЙ СВЕКЛЫ (<i>BETA VULGARIS L.</i>)	69

Д.В. Пятрикас, И.В. Федосеева, Е.Л. Таусон, Н.Н. Варакина, А.В. Степанов, Т.М. Русалева, Е.Г. Рихванов, Г.Б. Боровский, В.К. Войников. МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ РЕТРОГРАДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ <i>HSP101 ARABIDOPSIS THALIANA</i>	72
Н.И. Рекославская, Р.К. Салаяев. СВЯЗЬ ИНДОЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА И РОСТА ТРАНС-ГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ АНТИГЕННЫЕ ВИРУСНЫЕ БЕЛКИ ПРИ ЯДЕРНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ	75
Е.Г. Рихванов, И.В. Федосеева. МЕХАНИЗМ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ РЕТРОГРАДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ И РАСТЕНИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ТЕПЛОВОГО СТРЕССА	78
Е.В. Романова, В.В. Алёшин, Р.М. Камалтынов, Д.Ю. Щербаков. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОМОВ ЭНДЕМИЧНЫХ БАЙКАЛЬСКИХ АМФИПОД	80
Р.К. Салаяев, Н.И. Рекославская. ОСОБЕННОСТИ ЯДЕРНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ ПРИ РАЗРАБОТКЕ МУКОЗАЛЬНЫХ ВАКЦИН	82
М.Г. Синявская, Л.Н. Сивицкая, А.М. Шимкевич, Н.Г. Даниленко, О.Г. Давыденко. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОМОВ ОРГАНЕЛЛ У АЛЛОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ ЯЧМЕНЯ	85
И.Ю. Субота, А.Ш. Арзиев, М.В. Кулинченко, Ю.М. Константинов. ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ/ДЕФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ КАК ОДИН ИЗ ВЕДУЩИХ МЕХАНИЗМОВ ТОНКОЙ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ МИТОХОНДРИЙ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ	87
В.И. Тарасенко, Е.Ю. Гарник, М.В. Кулинченко, Т.В. Потапова, Ю.М. Константинов. ХАРАКТЕРИСТИКА РАСТЕНИЙ АРАБИДОПСИСА, МУТАНТНЫХ ПО РАЗЛИЧНЫМ КОМПОНЕНТАМ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ	88
И.В. Федосеева, Е.Г. Рихванов, Н.Н. Варакина, Т.М. Русалева, А.В. Федяева, Д.В. Пятрикас, А.В. Степанов, Г.Б. Боровский, В.К. Войников. ГИБЕЛЬ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ПРИ УМЕРЕННОМ ТЕПЛОВОМ ШОКЕ ЗАВИСИТ ОТ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА	91
А.В. Федяева, И.В. Любушкина, А.В. Степанов, Т.П. Побежимова, Е.Г. Рихванов. РОЛЬ АФК В ПРОЦЕССЕ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУРАХ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ <i>TRITICUM AESTIVUM</i> L. И САХАРНОГО ТРОСТНИКА <i>SACCHARUM OFFICINARUM</i> L., ВЫЗВАННОЙ ДЕЙСТВИЕМ ПОВЫШЕННЫХ ТЕМПЕРАТУР	94
Е.К. Шематорова, И.Ю. Словохотов, М.Р. Халилуев, И.Н. Бердичевец, Е.Н. Баранова, Т.В. Манешина, О.Г. Бабак, В.Н. Клыков, Д.Г. Шпаковский, С.Г. Спивак, Г.В. Шпаковский. МИТОХОНДРИИ КАК ВОЗМОЖНОЕ МЕСТО СИНТЕЗА СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ В РАСТЕНИЯХ	97

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕТРОГРАДНОЙ И АНТЕРОГРАДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *GDH1*, *GDH2* *ARABIDOPSIS THALIANA*

В.И. Бельков, Е.Ю. Гарник, В.И. Тарасенко, Ю.М. Константинов

ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
E-mail: anvad.irk@rambler.ru

Ядерные гены *gdh1* и *gdh2* относятся к генам с циркадным типом регуляции – количество их продуктов возрастает в темное время суток и снижается в дневное [Turano et al., 2006]. Предполагается, что такой профиль экспрессии связан с присутствием глюкозы, которая образуется в ходе фотосинтетических реакций на свету [Miyashita, Good, 2008]. Наиболее хорошо изученным посредником, передающим сигналы, возникающие при изменении уровня глюкозы в клетке растений, является гексокиназа 1. Активированная глюкозой гексокиназа 1 входит в состав высокомолекулярного ядерного комплекса, регулирующего транскрипцию через прямое связывание с промоторами соответствующих генов [Ramon et al., 2008]. Однако мы предполагаем, что сахароиндуцируемые сигналы являются не единственными сигналами, которые влияют на экспрессию генов *gdh1* и *gdh2*. Ранее нами было показано, что в регуляции экспрессии гена *gdh2* могут принимать участие митохондриально-ядерные ретроградные сигнала

лы [Тарасенко, 2009]. Возможно, в регуляции этого гена задействованы также и хлоропластно-ядерные сигналы, в частности, редокс-состояние пластохинонового пула. В данной работе применение ингибиторов, вызывающих окисление (DCMU) или восстановление (DBMIB) пула пластохинонов, позволило нам проверить причастность этого пути к регуляции экспрессии исследуемых генов. Мы использовали линию растений арабидопсиса *gin2*, мутантную по гену гексокиназы 1 *hvk1*. У растений данной линии сохраняется остаточная экспрессия гена *hvk1* на уровне до 30 % по отношению к линии дикого типа. Мутант получен на основе экотипа *Langsberg erecta* (*Ler*).

Ген гексокиназы *hvk1* у линии дикого типа *Ler* интенсивнее экспрессировался на свету по сравнению с образцами, выдержанными в темноте, приблизительно на 70 % (рис. 1А). Обработка корней двухнедельных проростков линии *Ler* 2% раствором сахарозы приводила к повышению экспрессии гена *hvk1* приблизительно в 2 раза (рис. 1Б).

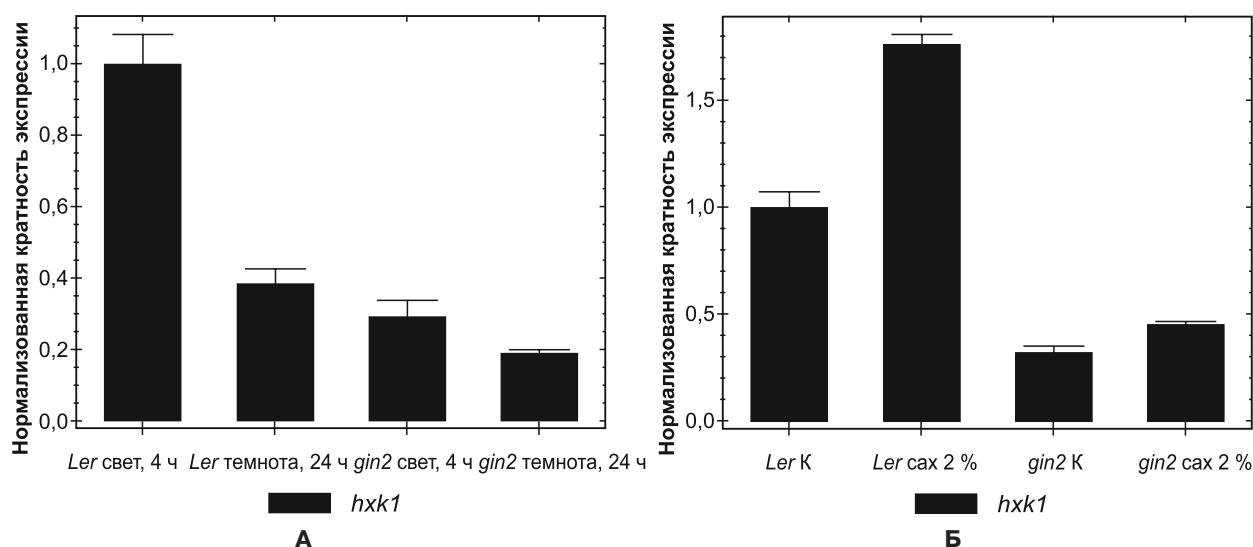


Рис. 1. Сравнение экспрессии гена гексокиназы 1 (*hvk1*) у линий *Ler* и *gin2* при экспонировании проростков 24 часа на свету и 4 часа в темноте (**А**), а также при обработке раствором экзогенной сахарозы 2 % (**Б**).

У мутанта *gin2* не отмечалось достоверных изменений в экспрессии гена *hvk1* при выдерживании проростков в темноте и на свету. Обработка проростков мутанта *gin2* 2% раствором сахарозы не приводила к достоверному изменению уровня экспрессии по сравнению с необработанным контролем (рис. 1Б). Поскольку известно, что гексокиназа как регуляторный фактор регулирует экспрессию собственного гена *hvk1*, мы сделали вывод, что регуляторная функция белка гексокиназы 1 у растений *gin2* утрачена. Экспрессия исследуемых генов *gdh1* и *gdh2* у проростков линии дикого типа *Ler* в темноте повышается примерно в 13 раз по сравнению с образцами, стоявшими на свету (рис. 2).

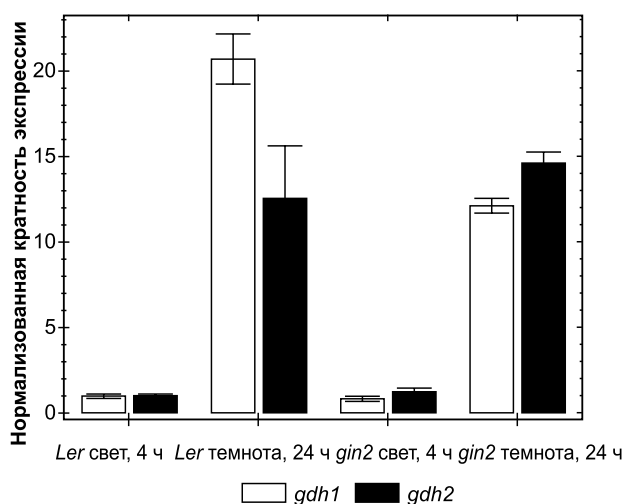


Рис. 2. Экспрессия генов *gdh1* и *gdh2* у линий *Ler* и *gin2* при выдерживании проростков на свету в течение 4 часов. Контрольные образцы выдерживали в темноте 24 часа.

Такой же уровень экспрессии исследуемых генов наблюдается и у образцов мутантной линии *gin2*. Таким образом, был отмечен схожий профиль экспрессии генов *gdh1* и *gdh2* у обеих линий. Из этого следует, что сахарозависимые сигналы, влияющие на экспрессию исследуемых генов, не опосредуются гексокиназой 1. Известно, что пластохиноновый пул функционирует не только как редокс-компонент в электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) хлоропластов, но и как инициатор каскада сигналов, приводящих к изменению экспрессии ядерных генов [Pfalz et al., 2012]. С целью изучения роли редокс-состояния пула пластохинона в регуляции экспрессии генов *gdh1* и *gdh2* листьев

двухнедельных проростков арабидопсиса линии дикого типа *Col-0* были обработаны ингибиторами ЭТЦ хлоропластов для искусственного создания окисленного (DCMU, 10 мкМ) или восстановленного (DBMIB, 2 мкМ) состояния пула пластохинона. Экспрессия исследуемых генов повышалась в образцах, обработанных DCMU и экспонированных на свету, в 7 (*gdh1*) и 25 раз (*gdh2*) по сравнению с контролем на свету. Обработка DBMIB приводила к снижению экспрессии генов *gdh1* и *gdh2* в 2 раза по сравнению с контролем на свету (рис. 3).

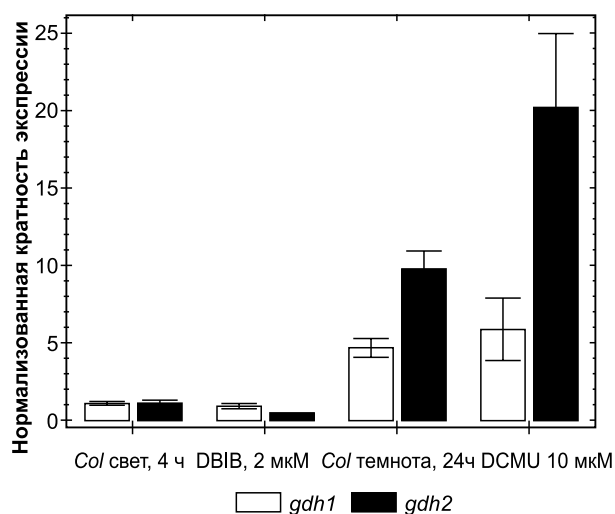


Рис. 3. Уровень экспрессии генов *gdh1* и *gdh2* при различном редокс-состоянии пластохинонового пула. Обработка DCMU приводит к окисленному состоянию пластохинонового пула, а обработка DBMIB – к восстановленному. Контроль – образцы, выдержанные сутки в темноте (окисленное состояние пластохинонового пула) или экспонированные на свету 4 часа (восстановленное состояние пластохинонового пула).

Таким образом, нами установлено, что светозависимая регуляция экспрессии генов *gdh1* и *gdh2* осуществляется при участии как сахарозависимых, так и хлоропластно-ядерных ретроградных сигналов. Мы показали, что сахарозависимая регуляция экспрессии данных генов не опосредуется гексокиназой 1. Нами впервые показано, что экспрессия генов *gdh1* и *gdh2* зависит от редокс-состояния пластохинонового пула фотосинтетической ЭТЦ, и мы предполагаем, что данный регуляторный механизм играет значительную роль в светозависимой регуляции данных генов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 12-04-01148-а.

ЛИТЕРАТУРА

- Тарасенко В.И., Гарник Е.Ю., Шмаков В.Н., Константинов Ю.М. Индукция экспрессии гена *gdh2* арабидопсиса при изменении редокс-состояния митохондриальной дыхательной цепи // Биохимия. – 2009. – Т. 74, № 1. – С. 62–69.
- Miyashita Y., Good A.G. NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation // Journal of Experimental Botany. – 2008. – Vol. 59. – P. 667–680.
- Moore B., Zhou L., Rolland F. et al. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling // Science. – 2003. – Vol. 300. – P. 332–336.
- Pfalz J., Liebers M., Hirth M. et al. Environmental control of plant nuclear gene expression by chloroplast redox signals // Frontiers in Plant Science. – 2012. – Vol. 3. – P. 1–9. (doi: 10.3389/fpls.2012.00257).
- Ramon M., Rolland F., Sheen J. Sugar sensing and signaling // American Society of Plant Biologists. – 2008. (doi: 10.1199/tab.0117).
- Restivo M. Molecular cloning of glutamate dehydrogenase genes of *Nicotiana glauca*: structure analysis and regulation of their expression by physiological and stress conditions // Plant Science. – 2003. – Vol. 166. – P. 971–982.
- Turano F., Thakkar S., Fang T., Weisemann J. Characterization and Expression of NAD(H)-Dependent Glutamate Dehydrogenase Genes in *Arabidopsis* // Plant physiology. – 1997. – Vol. 113. – P. 1329–1341.

РОЛЬ СВЕТА И НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ОКСИДАЗЫ И НАД(Ф)-Н-ДЕГИДРОГЕНАЗ II ТИПА В МИТОХОНДРИЯХ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

О.А. Боровик¹, О.И. Грабельных^{1,2}, Н.А. Королева¹, Т.П. Побежимова¹

¹ ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

² ФГБОУ ВПО Иркутский государственный университет, Иркутск

e-mail: ol.borovik@mail.ru

В растительных клетках существует тесная взаимосвязь между двумя энергопреобразующими органеллами – хлоропластами и митохондриями. Митохондрии могут регулировать баланс восстановительных эквивалентов от хлоропластов за счет функционирования в них альтернативных ферментов дыхания: ротенон-нечувствительных НАД(Ф)-Н-дегидрогеназ или альтернативных НАД(Ф)-Н-дегидрогеназ II типа (НАД(Ф)-Н-ДГ II типа) и альтернативной цианидрезистентной оксидазы (АО). Активация НАД(Ф)-Н-ДГ II типа и АО при интенсивном освещении способствует защите ЭТЦ хлоропластов от фотоингибирования, путем рассеивания избытка восстановительных эквивалентов от хлоропластов [Xu et al., 2011; Yoshida et al., 2011]. Сохранение фотосинтеза при низких температурах является одним из основных факторов, определяющих развитие устойчивости, как к холоду, так и морозу [Туманов, 1979]. Можно предположить, что, функционирование митохондриальных альтернативных ферментов дыхания в условиях низкотемпературного стресса будет способствовать

поддержанию фотосинтетической активности хлоропластов и адаптации растений к низким температурам. В связи с этим, целью настоящей работы явилось изучение функционирования альтернативных НАД(Ф)-Н-ДГ II типа и АО в митохондриях из листьев этиолированных и зеленых растений озимой пшеницы и выявление роли света в регуляции активности альтернативных ферментов при холодовом закаливании.

В качестве объекта исследования использовали этиолированные и зеленые растения озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Иркутская). Этиолированные растения выращивали в камере MIR-154 (Sanyo, Япония) при температуре 23 °С. Холодовое закаливание 7 суточных этиолированных растений осуществляли в течение 7 суток при 2 °С в темноте (на 12%-м растворе сахарозы или в ее отсутствие). Зеленые растения выращивали на опытной станции Фитотрон СИФИБР СО РАН в камере KBW 720 (BINDER, Германия) при 23/20 °С (день/ночь), 16 ч фотопериода и освещенности 250 мкмоль·м⁻²·с⁻¹. Холодовое закаливание 7 суточных зеленых растений проводили

в течение 7 дней или на свету при 5 °C (24 и 16 ч фотопериоды, освещенность 200 мкмоль·м⁻²·с⁻¹) или в темноте при 2 °C (на 12%-м растворе сахарозы или в ее отсутствие). Контрольные этиолированные растения использовали в возрасте 8 суток, а зеленые – в возрасте 9 суток. Количественное содержание водорастворимых углеводов (в процентном содержании от сухого веса) определяли с использованием антронового реактива и H₂SO₄. Митохондрии выделяли из листьев и очищали в градиенте перколлы. Энергетическую активность митохондрий анализировали полярографически с использованием ингибиторов цитохромного (1,2 мМ KCN) и альтернативного (3 мМ бензгидроксамовая кислота) путей дыхания. В качестве субстратов дыхания использовали 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата, 8 мМ сукцинат в присутствии 5 мМ глутамата, 1 мМ глицин в присутствии 0,2 мМ НАД⁺, 1 мМ НАД·Н или 1 мМ НАДФ·Н в присутствии 0,06 мМ CaCl₂. При окислении сукцината, НАД·Н и НАДФ·Н в среду инкубации добавляли 3 мкМ ротенон. Функционирование «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа оценивали по окислению малата в присутствии ротенона, функционирование «внешних» НАД·Н-ДГ или НАДФ·Н-ДГ II типа – по окислению экзогенного НАД·Н или НАДФ·Н в присутствии ротенона и CaCl₂, соответственно. Содержание белков АО и НАД(Ф)Н-ДГ определяли с помощью электрофореза в 12,5 % ПААГе с ДДС-На и вестерн-блоттинга.

Как оказалось, холодное закаливание этиолированных растений приводит к увеличению содержания углеводов в листьях. Наибольшее содержание сахаров наблюдалось при закаливании в темноте на растворе сахарозы (15,8 % по сравнению с 3,2 % в контроле). Содержание сахаров в листьях контрольных зеленых растений было в 1,6 раза меньше, чем в этиолированных листьях. Закаливание зеленых растений при разных условиях освещения по-разному влияло на накопление углеводов в листьях. Наибольшее содержание сахаров в зеленых листьях наблюдалось при закаливании растений в условиях непрерывного освещения и в темноте на 12%-м растворе сахарозы (22,5 и

26,4 %, соответственно, по сравнению с 2 % в контроле). Такое значительное накопление сахаров в условиях непрерывного освещения свидетельствует о сохранении высокой фотосинтетической активности хлоропластов при действии низкой температуры.

С использованием изолированных из листьев митохондрий после действия на растения низких закалывающих температур показаны изменения в активности альтернативных ферментов дыхания, которые согласуются с содержанием водорастворимых углеводов в листьях. В этиолированных растениях было отмечено повышенное функционирование «внешней» НАД·Н-ДГ II типа, при холодном закаливании её активность оставалась на довольно высоком уровне. Холодное закаливание в темноте приводило к снижению функционирования «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа, однако при закаливании растений на сахарозе ее активность оставалась на уровне контроля. Повышенная активность АО в этиолированных листьях озимой пшеницы в контрольных условиях выращивания сопряжена с функционированием «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа, а при холодном закаливании на растворе сахарозы – с «внешними» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа. Наибольшее увеличение вклада АО в дыхание в этиолированных листьях наблюдали при закаливании растений в темноте на растворе сахарозы (при окислении малата, сукцината, глицина, НАД·Н и НАДФ·Н в 1,5, 2,1, 1,5, 2,6 и 2,0 раз, соответственно). В этом же варианте закаливания наблюдали наибольшее содержание углеводов в этиолированных листьях. Как показал ингибиторный анализ, при закаливании этиолированных растений в темноте функционирование «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа было сопряжено с работой цитохромного пути (ЦП), а при закаливании на растворе сахарозы – с работой АО. Можно говорить о том, что функционирование «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в этиолированных листьях при холодном закаливании зависит от содержания водорастворимых углеводов, чем больше содержание сахаров, тем выше активность АО и НАД(Ф)·Н-ДГ II типа.

В зеленых листьях отмечена более высокая активность «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ

II типа и «внешних» НАДФ·Н-ДГ II типа в контрольных условиях. При этом функционирование «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа было сопряжено с повышенным вкладом АО в дыхание. Стоит отметить, что в зеленых листьях вклад АО, сопряженный с функционированием «внешних» и, особенно, «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа выше, чем в этиолированных. Это указывает на важную роль альтернативных ферментов дыхания в обеспечении фотосинтеза. Наибольший вклад АО в зеленых листьях наблюдали при закаливании в условиях непрерывного освещения и в темноте на 12%-м растворе сахарозы. При этих же вариантах закаливании наблюдали наибольшее содержание сахаров в листьях. Вклад АО в дыхание при закаливании в условиях непрерывного освещения увеличивался при окислении малата, сукцината, глицина и НАД·Н в 2,2, 1,6, 1,7 и 1,6 раз, соответственно. Вклад АО в этих условиях был сопряжен с функционированием «внешней» НАД·Н-ДГ II типа, функционирование «внешней» НАДФ·Н-ДГ II типа сопряжено с работой ЦП. При закаливании в темноте на 12%-м растворе сахарозы вклад АО увеличивался при окислении малата, малата в присутствии ротенона, сукцината и НАД·Н в 2,3, 1,6, 2,2 и 1,9 раз, соответственно. Вклад АО при закаливании в темноте на растворе сахарозы был сопряжен с функционированием как «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа, так и с функционированием «внешних» НАДФ·Н-ДГ II типа. При закаливании в условиях непрерывного освещения и в темноте на растворе сахарозы наблюдали увеличение содержания белков NDB («внешние» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа) и АО. Содержание белка NDA («внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа) снижалось при действии всех вариантов закаливании, кроме закаливании в темноте на растворе сахарозы.

Таким образом, распределение потока электронов от «внешней» НАДФ·Н-ДГ II типа через ЦП или АО при холодном закаливании в условиях доступности субстратов дыхания регулируется световым режимом. При холодном закаливании в темноте на растворе сахарозы как этиолированных, так и зеленых листьев транспорт электронов от

«внешней» НАДФ·Н-ДГ II типа осуществляется через АО, а при закаливании зеленых листьев в условиях непрерывного освещения – через ЦП. При закаливании в этиолированных и зеленых листьях активность АО и «внешней» НАД·Н-ДГ регулируется повышенным потоком субстратов дыхания независимо от светового режима. В отличие от «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ, в регуляции активности «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа при действии низкой температуры, по-видимому, задействованы другие механизмы, поскольку их активность и в этиолированных и зеленых листьях озимой пшеницы не меняется при холодном закаливании в темноте на растворе сахарозы и снижается при других вариантах закаливании. Повышенное функционирование АО и «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ в митохондриях в условиях низких температур, вероятно, способствует поддержанию фотосинтетической активности хлоропластов и повышению устойчивости растений озимой пшеницы к низким температурам. Функционирование альтернативных ферментов дыхания обеспечивает пластичность работы дыхательной цепи митохондрий при действии низких температур, поддерживает работу клеточного дыхания, регулируя не только работу НАД-зависимых ферментов и соотношение $[\text{НАД(Ф)}^+]/[\text{НАД(Ф)·Н}]$, но и энергетический баланс клетки в целом.

Можно заключить, что свет играет важную роль в регуляции активности альтернативной оксидазы и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ в митохондриях озимой пшеницы, однако при холодном закаливании растений функционирование этих систем регулируется как световым режимом, так и доступностью субстратов для дыхания митохондрий.

ЛИТЕРАТУРА

- Туманов И.И. Физиология закаливании и морозостойкости растений. – М.: Мир, 1979. – 351 с.
- Xu F., Yuan S., Lin H. Response of mitochondrial alternative oxidase (AOX) to light signals // Plant Signaling & Behavior. – 2011. – Vol. 6. – P. 55–58.
- Yoshida K., Terashima I., Noguchi K. How and why does the mitochondrial respiratory chain respond to light // Plant Signaling & Behavior. – 2011. – Vol. 6. – P. 864–866.

**МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК У РАСТЕНИЙ: СПЕЦИФИЧНОСТЬ,
КОМПАРТМЕНТЫ И ФЕРМЕНТЫ****Б.Ф. Ванюшин** ^{1, 2, 3}¹ Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва² МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва³ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, Москва
e-mail: vanyush@belozersky.msu.ru

Метилирование ДНК – эпигенетический контроль за генетическими функциями организма, включая транскрипцию, репликацию, репарацию ДНК, транспозицию генов и клеточную дифференцировку [Vanyushin, Ashapkin, 2011].

У высших растений ДНК сильно метилированы по остаткам цитозина; 5-метилцитозин (m^5C) локализован преимущественно в CG и CNG последовательностях. Метилирование ДНК видо-, ткане- и органоид- специфично, оно изменяется с возрастом и регулируется фитогормонами. Индуцированное 5-азациитидином уменьшение степени метилирования ДНК при формировании зерновки приводит к наследуемому увеличению белковости пшениц. Тем самым, избирательная регуляция метилирования ДНК – новое эффективное средство биотехнологического контроля за продуктивностью растений.

В растительных органеллах (митохондриях, пластидах) ДНК метилированы иначе, чем в ядре. Не исключено, что метилирование ДНК может участвовать в дифференцировке пластид. В митохондриальных ДНК растений найден N^6 -метиладенин, но не 5-метилцитозин, который свойственен животным мтДНК. В принципе, нами открыто адениновое метилирование ДНК у растений; N^6 -метиладенин (m^6A) найден как в митохондриальной, так и ядерной ДНК. У *Arabidopsis thaliana* ген цитозиновой ДНК-метилтрансферазы DRM2 метилирован как по цитозиновым (C $\overline{C}$ GG), так и адениновым (G $\overline{A}$ TC) остаткам (подчеркнуты). Индукция антисмысловых конструкций гена цитозиновой ДНК-метилтрансферазы (MET1) у трансгенных растений приводит к изменению характера метилирования адениновых остатков в гене DRM2. Значит, у растений существует взаимозависимый контроль между адениновым и цитозиновым мети-

лированиями яДНК. Это – новый механизм эпигенетического контроля сопряженными метилированиями ДНК за функциями генома у эукариот.

Из богатой митохондриями фракции вакуолярных везикул, возникающих при апоптозе у стареющих колеоптилей пшеницы, выделена **первая адениновая** ДНК-метилтрансфераза высших эукариот [Fedoreyeva, Vanyushin, 2002]. В присутствии S-аденозил-L-метионина (SAM) этот Ca^{2+}/Mg^{2+} -зависимый фермент (*wadmtase*) метилирует *de novo* остаток аденина в середине последовательности TG $\overline{A}$ TCA у одно- и двутяжевых ДНК, предпочитая одנותяжевые структуры. По-видимому, *wadmtase* участвует в регуляции репликации мтДНК.

Мы установили, что фитогормоны цитокинины – производные аденина – могут непосредственно включаться в ДНК растений. Природное включение цитокининов вместо аденина в узнаваемые ДНК-метилтрансферазами сайты ДНК должно препятствовать метилированию ДНК по соответствующим адениновым остаткам. Таким путем в клетке могут возникать недо-метилированные по адениновым остаткам ДНК. Контроль за метилированием адениновых остатков в ДНК цитокининами путем их включения в ДНК может служить одним из механизмов регуляции экспрессии генов и клеточной дифференцировки у растений.

Из колеоптилей пшеницы выделены SAM-зависимые эндонуклеазы WEN1 и WEN2, чувствительные к статусу метилирования ДНК [Fedoreyeva et al., 2008]. Эти свойства вообще не были известны для эндонуклеаз высших эукариот, а характерны для некоторых бактериальных рестриционных эндонуклеаз. Конкурентные ингибиторы метилирования ДНК S-аденозил-L-гомоцистеин и S-изобутиладенозин также

модулируют гидролиз ДНК этими ферментами. Таким образом, открыт **новый тип регуляции активности эукариотических (растительных) эндонуклеаз**, основанный на их модуляции донором метильных групп и (или) ингибиторами реакции метилирования. По-видимому, эндонуклеазы WEN1 и WEN2 участвуют в деградации яДНК при запрограммированной гибели растительной клетки. В отличие от эндонуклеазы WEN1, SAM не активирует, а ингибирует активность фермента WEN2. Это первый случай с эукариотическими эндонуклеазами, когда SAM подавляет их активность. Значит, у растений существует система сопряженной регуляции SAM-зависимых (в том числе и чувствительных к статусу метилирования ДНК) эндонуклеаз с разнонаправленным действием на них эффектора (модулятора) SAM. Это может указывать на существование систем рестрикции-модификации (или по крайней мере их элементов) у растений. Выделенные эндонуклеазы обладают выраженным

процессивным действием и гидролизуют ДНК по металл-зависимому и независимому механизмам. Mg^{2+} активирует и изменяет специфичность действия этих ферментов. Таким образом, открыта важная роль Mg^{2+} в регуляции действия растительных эндонуклеаз. Действие этих эндонуклеаз модулируется гистонами и короткими биологически активными пептидами. По-видимому, короткие сигнальные пептиды могут влиять и на метилирование ДНК в разных компартментах растительной клетки.

ЛИТЕРАТУРА

Vanyushin B.F., Ashapkin V.V. DNA methylation in higher plants: past, present and future // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1809. – P. 360–368.

Fedoreyeva L.I., Vanyushin B.F. N6-Adenine DNA-methyltransferase in wheat seedlings // *FEBS Lett.* – 2002. – Vol. 514. – P. 305–308.

Fedoreyeva L.I., Sobolev D.E., Vanyushin B.F. Wheat endonuclease WEN1 dependent on S-adenosyl-L-methionine and sensitive to DNA methylation status // *Epigenetics.* – 2007. – Vol. 2. – P. 50–53.

РОЛЬ НЕФОСФОРИЛИРУЮЩИХ ПУТЕЙ ДЫХАНИЯ В ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ КЛЕТКЕ

Е.В. Гармаш¹, О.И. Грабельных², И.О. Велегжанинов¹, О.А. Боровик², Е.В. Коковкина¹,
И.В. Далькэ¹, В.К. Войников², Т.К. Головкин¹

¹ ФГБУН Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар
e-mail: garmash@ib.komisc.ru

² ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

В растительных митохондриях помимо основного цитохромного пути, электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) содержит альтернативные нефосфорилирующие пути (НФП). Перенос электронов по НФП не связан с генерацией протонного градиента, необходимого для синтеза АТФ. Основными переносчиками электронов по НФП являются альтернативная оксидаза (АОХ), альтернативные внешняя и внутренняя НАДН-дегидрогеназы (НАДН-ДГ). К системам, рассеивающим протонный градиент, образуемый в ходе реакций ЭТЦ, относятся разобщающие белки (UCP). Благодаря активации НФП цепь способна диссипировать избыток восстановителей, в том числе, экс-

портируемых из хлоропластов [Noguchi, Yoshida, 2008]. Это способствует защите клетки от фотодеструкции и оптимизации условий для протекания фотосинтеза. Вместе с тем, механизмы регуляции светом вовлечения и физиологической роли компонентов нефосфорилирующего дыхания в фотосинтезирующей клетке являются слабо изученными [Igamberdiev et al., 2013].

Целью работы было выявить закономерности вовлечения и функционирования НФП митохондрий (от экспрессии генов до проявления активностей) в процессе становления фотосинтетической функции листа при деэтиоляции проростков яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L., с. Иргина) на

непрерывном свете ($190 \text{ мкмоль/м}^2 \text{ с}$) в течение 48 ч. Дезэтиоляция как светоиндуцируемый процесс биогенеза пластид и формирования тилакоидной системы хлоропластов, является удобной моделью для оценки роли дыхания в процессе фотосинтеза.

В процессе зеленения листа пшеницы установлена связь дыхания со степенью развития фотосинтетического аппарата. Максимальная скорость дыхания, измеренная по скорости выделения CO_2 и поглощения O_2 , обнаружена на более поздних этапах дезэтиоляции (4–12 ч освещения), когда проламеллярные тела реорганизованы в тилакоиды, но фотосинтетический аппарат полностью не развит [Garmash et al., 2013]. Повышение скорости дыхания сопровождалось индукцией альтернативного пути (АП). Доля АП возрастала и достигала наибольшего значения (50 % общего дыхания листа) в период от 4 до 6 ч зеленения. После 12 ч экспозиции проростков к свету скорость дыхания снижалась в 1,5 раза и поддерживалась на этом уровне до конца эксперимента.

Митохондрии в первые 6 ч дезэтиоляции характеризовались преимущественным окислением малата перед сукцинатом и возрастанием вклада АП при использовании малата как дыхательного субстрата. Включение механизма увода менее активной малатдегидрогеназы (МДГ) от конкуренции с более активной сукцинатдегидрогеназой (СДГ) [Абдрахимова и др., 1998] было, по-видимому, направлено на стимуляцию работы малатного челнока, обеспечивающего обмен НАДН между хлоропластами, цитозолем и митохондриями [Dinakar et al., 2010]. После 6 ч дезэтиоляции максимальные величины скорости дыхания митохондрий обнаружены в присутствии экзогенного НАДН, что свидетельствовало об активном функционировании внешней НАДН-ДГ в связи с усилением фотосинтетической активности. Скорость окисления глицина, отражающая активность внутренней НАДН-ДГ, и вовлечение АОХ в присутствии данного субстрата усиливались после 24 ч зеленения. Это коррелировало с динамикой развития фотодыхательной активности. В этот период регистрировали наличие достоверного послесветового выброса CO_2 .

Вовлечение АОХ, внешней и внутренней НАДН-ДГ достигалось за счет усиленной экспрессии генов. Экспрессия *АОХ1а* имела четкий светозависимый характер и совпадала с динамикой активности АП. Экспрессия второго идентифицированного в листе пшеницы гена, кодирующего АОХ – *АОХ1с* происходила комплементарно, т.е. в дополняющей к *АОХ1а* манере. Экспрессия генов, кодирующих белки внутренней и внешней НАДН-ДГ (*NDA2* и *NDB2* соответственно), усиливалась в процессе дезэтиоляции и имела схожий, но несколько запаздывающий характер по сравнению с экспрессией *АОХ1а*. Изменение относительного количества транскриптов разобщающих белков (*UCP1а*, *UCP1b*) не имело в процессе дезэтиоляции определенной временной динамики.

Обнаружено отсутствие явной корреляции между экспрессией *АОХ1а* и количеством АОХ. После 24 ч экспрессия *АОХ1а* и вклад АП в дыхание листа снижались, а количество АОХ возрастало. Это указывает на существование в клетке дополнительных механизмов регуляции активности фермента. Анализ субстратной регуляции вовлечения АОХ показал, что одной из основных причин снижения активности АП при увеличении количества белка АОХ в этот период было ограничение доступности субстрата (растворимых углеводов) [Гармаш и др., 2014]. Это могло отразиться на посттрансляционной модификации белка.

Важной функцией АП дыхания является предотвращение перевосстановления ЭТЦ и избыточной генерации АФК [Maxwell et al., 1999]. Обнаружено, что количество супероксида мало изменялось в процессе дезэтиоляции. Анализ изоформ СОД выявил усиление в первые 6 ч дезэтиоляции количества и активности митохондриальной Мп-СОД, что коррелировало с уровнем вовлечения АОХ. После 12 ч дезэтиоляции повышенному образованию O_2^- препятствовали Cu/Zn-изоформы СОД, которые преимущественно локализованы в хлоропластах и цитозоле. Стабилизация структуры фотосинтетического аппарата, развитие в хлоропластах собственных систем диссипации световой энергии [Garmash et al. 2013] и антиок-

сидантной защиты после 24 ч зеленения привело к снижению концентрации H_2O_2 и уровня ПОЛ. Эти данные указывают на эффективность работы клеточных систем защиты от окислительного стресса, частью которых является АОХ, в контроле уровня H_2O_2 [Juszczuk et al., 2012]. Возможно, уменьшение количества H_2O_2 было причиной ослабления экспрессии *АОХ1а* после 24 ч деэтиоляции.

Таким образом, выявлен дифференциальный характер вовлечения НФП в процессе деэтиоляции листа пшеницы. Свет напрямую индуцировал экспрессию *АОХ1а*, совпадающую с динамикой активности альтернативного дыхания. Вовлечение АОХ создавало дополнительную возможность неконкурентного функционирования МДГ, влияющей на функционирование малатного челнока для переноса восстановителей. Экспрессия генов внешних и внутренних НАДН-ДГ имела запаздывающий по сравнению с *АОХ1а* характер, что свидетельствует о роли АОХ в регуляции экспрессии генов других белков, участвующих в поддержании гомеостаза зеленеющей клетки. Активация альтернативных НАДН-ДГ на более позднем этапе деэтиоляции указывает на увеличение поставок в митохондриальную ЭТЦ восстановителей фотосинтетического и фотодыхательного происхождения. Полученные данные свидетельствуют об участии H_2O_2 в контроле уровня экспрессии *АОХ1а* по принципу обратной связи.

Работа поддержана грантом Уральского отделения РАН № 12-У-4-1008.

ЛИТЕРАТУРА

Абдрахимова Й.Р., Хохлова Л.П., Абрахимов Ф.А. Особенности дыхания и морфологии митохондрий узлов кущения озимой пшеницы при действии низких температур и картолина // Физиология растений. – 1998. – Т. 45. – С. 253–261.

Гармаш Е.В., Малышев Р.В., Шелякин М.А., Головкин Т.К. Активность дыхательных путей и фонд неструктурных углеводов в листе зеленеющих проростков яровой пшеницы // Физиология растений. – 2014. – Т. 61. – С. 177–186.

Dinakar C., Raghavendra A.S., Padmasree K. Importance of AOX pathway in optimizing photosynthesis under high light stress: Role of pyruvate and malate in activating of AOX // *Physiol. Plant.* – 2010. – Vol. 139. – P. 13–26.

Garmash E.V., Dymova O.V., Malyshev R.V., Plyusnina S.N., Golovko T.K. Developmental changes in energy dissipation in etiolated wheat seedlings during the greening process // *Photosynthetica.* – 2013. – Vol. 51. – P. 497–508.

Igamberdiev A.U., Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Popov V.N. Phytochrome-mediated regulation of plant respiration and photorespiration // *Plant Cell Environ.* – 2013. doi: 10.1111/pce.12155.

Juszczuk I.M., Szal B., Rychter A.M. Oxidation-reduction and reactive oxygen species homeostasis in mutant plants with respiratory chain complex I dysfunction // *Plant Cell Environ.* – 2012. – Vol. 35. – P. 296–307.

Maxwell D.P., Wang Y., McIntosh L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1999. – Vol. 96. – P. 8271–8276.

Noguchi K., Yoshida K. Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves // *Mitochondrion.* – 2008. – Vol. 8. – P. 887–899.

РОЛЬ ОРГАНЕЛЬНЫХ И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ИЗОФОРМ ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗЫ АРАБИДОПСИСА В ОТВЕТЕ НА СТРЕСС, ВЫЗЫВАЕМЫЙ ИЗБЫТОЧНЫМ ОСВЕЩЕНИЕМ

Е.Ю. Гарник¹, М.А. Корзун², В.И. Тарасенко¹, В.И. Бельков¹, Ю.М. Константинов¹

¹ ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

² ФГБОУ ВПО Иркутский государственный университет, Иркутск
e-mail: elga74@yandex.ru

Глутатионредуктаза (ГР, ЕС 1.6.4.2) и глутатион являются важными компонентами в системе поддержания редокс-гомеостаза растительной клетки. Глутатионредукта-

зы растений представлены белками разнообразной субклеточной локализации, однако все они кодируются двумя ядерными генами: *gr1* (цитозольные и перок-

сисомальные формы) и *gr2* (пластидные и митохондриальные формы) [Rao, 2008]. Целью настоящей работы было изучение характера регуляции экспрессии генов *gr1* и *gr2* арабидопсиса, а также роли соответствующих субклеточных форм фермента ГР в формировании ответов растительной клетки на изменения освещенности.

Нами показано, что спектр молекулярных форм ГР в различных тканях *Arabidopsis thaliana* может включать от двух до четырех анионных форм, различающихся по подвижности в полиакриламидном геле в неденатурирующих условиях. Наиболее подвижная форма 4 была идентифицирована нами как пластидно-митохондриальная. Формы 1–3, очевидно, являются цитозольно-пероксисомальными. Возникновение четырех субклеточных форм фермента при наличии всего двух кодирующих их генов обусловлено, по всей видимости, посттрансляционными модификациями.

При выращивании в условиях освещенности $200\text{--}250 \text{ мкмоль} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$ активность всех присутствующих изоформ ГР в листьях растений мутантной линии *rtn16*, характеризующейся светочувствительным фенотипом, была существенно выше, чем у линии дикого типа *Col-0*. Предположительно это отражает состояние фотоокислительного

стресса, возникающего у растений мутантной линии вследствие недостатка фотосинтетических пигментов [Tarasenko et al., 2012]. Повышенная активность общей клеточной ГР у растений линии *rtn16* была подтверждена нами спектрофотометрически.

Методом обратнотранскриптазной ПЦР в реальном времени проведена оценка уровня экспрессии генов глутатионредуктазы *gr1* и *gr2* в листьях растений арабидопсиса линий *Col-0* и *rtn16*. Показан более высокий и стабильный при изменении условий освещенности уровень экспрессии гена *gr2*, кодирующего пластидно-митохондриальные формы ГР. Экспрессия гена *gr1*, кодирующего цитозольные формы фермента, в условиях низкой освещенности ($150 \text{ мкмоль} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$) была в 4–5 раз ниже, чем *gr2*, и не изменялась существенно у растений дикого типа при изменении освещенности. Однако у растений линии *rtn16* экспрессия гена *gr1* повышалась в 4–5 раз после экспозиции растений при $650 \text{ мкмоль} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$ в течение 8 часов (рис. 1).

Таким образом, в условиях слабой и умеренной освещенности большая часть общей клеточной активности ГР в листьях арабидопсиса, по-видимому, обеспечивается за счет экспрессии гена, кодирующего митохондриально-хлоропластные формы

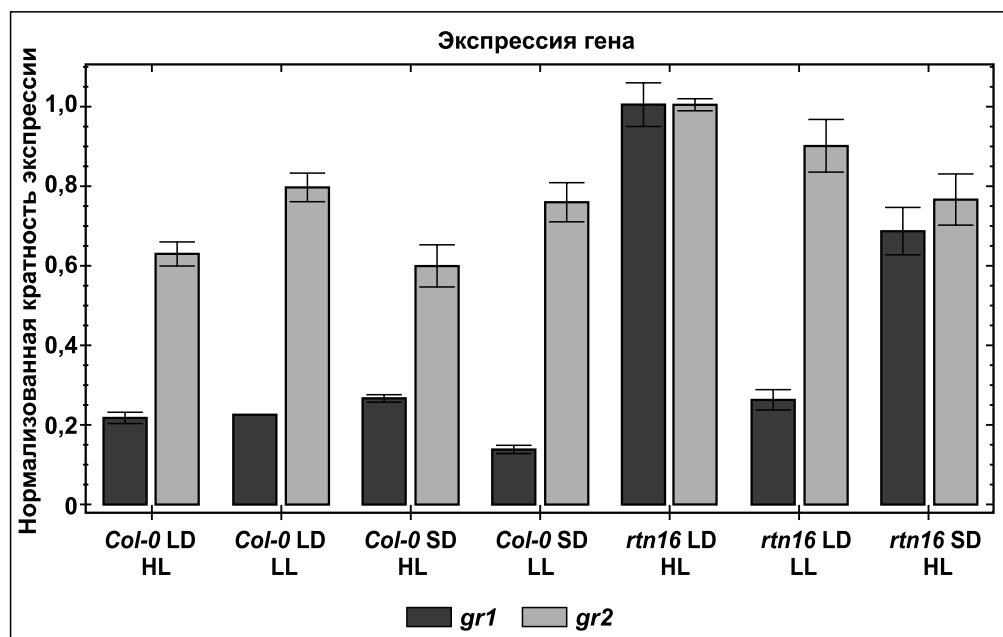


Рис. 1. Уровень транскриптов генов *gr1* и *gr2* в растениях линий *Col-0* и *rtn16* в различных условиях выращивания. LD – выращивание при длинном световом дне (18 ч), SD – выращивание при коротком световом дне (14 ч), HL – освещенность $650 \text{ мкмоль} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$, LL – освещенность $150 \text{ мкмоль} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$.

фермента, и активности соответствующих форм. Такое предположение выдвигалось ранее в литературе в связи с экспериментами по трансформации растений генами глутатионредуктазы [Aono et al., 1997]. В условиях стресса, связанного с избыточной освещенностью, экспрессия гена *gr2* не изменяется, и формирование стрессового ответа обеспечивается за счет повышения экспрессии гена *gr1*, кодирующего цитозольные и пероксисомальные изоформы. Растения светочувствительной линии *rtn16* отвечают повышением уровня транскриптов *gr2* в условиях, которые, вероятно, еще не являются стрессовыми для растений дикого типа. Однако необходимо отметить, что повышение активности всех форм фермента ГР, по-видимому, может осуществляться за счет посттрансляционных модификаций и не всегда связано с повышением уровня транскриптов соответствующих генов [Rao, 2008].

С целью выяснения природы сигнала, опосредующего изменения экспрессии генов глутатионредуктазы при изменении уровня освещенности, были использованы ингибиторы фотосинтеза DCMU (3-(3',4'-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина) и DBMIB (2,5-дибром-3-метил-6-изопропил-пара-бензохинон),

обработка которыми позволяет манипулировать редокс-состоянием пластохинового пула фотосинтетической ЭТЦ [Pfalz, 2012].

Уровень экспрессии генов *gr1* и *gr2* в листьях растений *Col-0* повышался на свету относительно контроля в темноте, причем уровень транскриптов гена *gr2* повышался в 4–5 раз, а гена *gr1* в 2 раза. Таким образом, стабильно высокая в различных условиях выращивания экспрессия гена *gr2* не является, однако, конститутивной. Экспрессия данного гена значительно индуцируется на свету. Можно предполагать, что даже умеренная освещенность индуцирует экспрессию гена *gr2* до максимальных значений, поэтому дальнейшей его индукции при возникновении стрессовых условий уже не происходит. Чувствительность экспрессии гена *gr1* к условиям освещенности, по всей видимости, несколько ниже, что позволяет клетке дополнительно индуцировать данный ген в условиях стрессов.

При действии ингибиторов DCMU и DBMIB уровень экспрессии обоих генов повышался в два и более раз относительно контроля в темноте. Это свидетельствует, во-первых, о неучастии сигналов, связанных с редокс-состоянием пластохинона, в регуляции экспрессии данных генов, по-

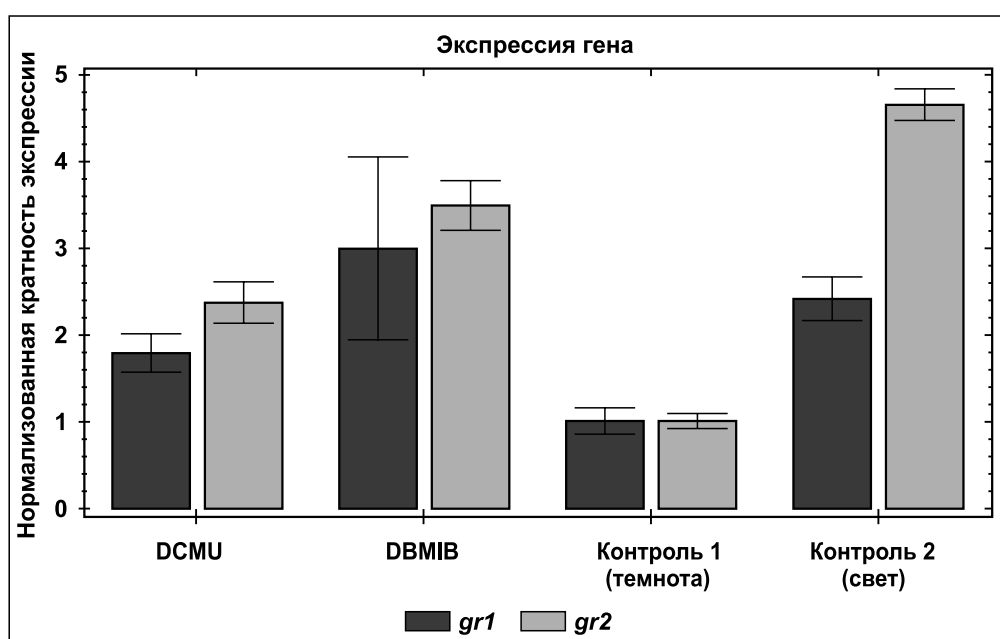


Рис. 2. Уровень транскриптов генов *gr1* и *gr2* в листьях растений линии *Col-0*, выдержанных в темноте, на свету либо обработанных ингибиторами фотосинтеза.

скольку в противном случае воздействие двух ингибиторов, приводящих к окисленному (DCMU) либо сверхвосстановленному (DBMIB) состоянию пластохинонового пула, было бы разнонаправленным. Изменения уровня продуктов фотосинтеза также не могут быть причиной повышения уровня экспрессии исследуемых генов, поскольку обработка ингибиторами фотосинтеза не отменяла индукции данных генов на свету. Нам представляется, что наиболее вероятным сигналом, приводящим к индукции экспрессии исследуемых генов, является повышение уровня АФК.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 12-04-01148-а и междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 59.

ЛИТЕРАТУРА

- Aono M., Saji H., Kondo N., Tanaka K. Paraquat tolerance of transgenic tobacco plants with altered activity of glutathione reductase // *Phyton* (Horn, Austria) – 1997. – Vol. 37. – P. 13–18.
- Pfalz J., Liebers M., Hirth M., Gruber B., Holtzegel U., Schroter Y., Dietzel L., Phannschmidt T. Environmental control of plant nuclear gene expression by chloroplast redox signals // *Frontiers in Plant Science*. – 2012. – Vol. 3. – P. 1–9. (Article 257, doi: 10.3389/fpls.2012.00257).
- Rao A.S.V., Reddy A.R. Glutathione Reductase: A Putative Redox Regulatory System in Plant Cells // Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2008. – P. 111–147.
- Tarasenko V.I., Garnik E.Yu., Katyshev A.I., Subota I.Yu., Konstantinov Yu.M. Disruption of arabidopsis reticulon gene *rtn16lb16* results in chloroplast dysfunction and oxidative stress // Abstract Book of the 2nd International Conference “Plant Genetics, Genomics, and Biotechnology”. PlantGen. Irkutsk, Russia (July 30 – August 3, 2012). – 2012. – P. 61.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА МИТОХОНДРИЙ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК *PANAX JAPONICUS*

Е.С. Глаголева¹, Д.А. Кнорре²

¹ Биологический факультет МГУ, Москва
e-mail: glagoleva.elena@gmail.com

² НИИ ФХБ имени Белозерского, Москва
e-mail: knorre@belozersky.msu.ru

Молекулярные основы механизмов слияния и деления митохондрий у растений изучены хуже, чем в случае животных и грибов. До сих пор остается неясным, какие белки отвечают за слияние наружных и внутренних митохондриальных мембран растений, так как в геномах растений отсутствуют гомологи митофузинов и генов, отвечающих за слияния внутренних мембран (Mgm1\Opa1) [Logan, 2006]. Также остается открытым вопрос о том, как различные функциональные параметры митохондрий (разность потенциалов на внутренней мембране, соотношение АТФ/АДФ в цитоплазме и матриксе митохондрий, степень восстановленности редокс кофакторов дыхательной цепи) влияют на процессы слияния и деления митохондрий. Считается, что снижение трансмембранного потенциала на внутренней мембране ингибирует процесс слияния митохондрий, так как добавление

разобщителей к клеткам мезофилла табака приводит к фрагментации митохондриального ретикулума [Sheahan et al., 2005]. Однако действие ингибитора АТФ-синтазы олигомицина D не приводит к обратному эффекту, что в определенной степени противоречит данному представлению.

Мы исследовали методами флуоресцентной микроскопии особенности изменений структуры митохондрий в суспензионной культуре клеток *Panax japonicus* С. А. Мей. var. *repens*, являющегося важным продуцентом различных биологически активных соединений. Было показано, что митохондрии в интактных клетках культуры *Panax japonicus* могут быть выявлены липофильными положительно заряженными катионами: тетраметилродамином (50 нМ), Mitotracker Red 580 (50 нг/мл), Mitotracker Green (50 нг/мл), JC-1 (2 мкМ), а также Mitotracker CMXROS (50 нг/мл). В

то же время использование нонилакридиноранджа, успешно использующегося для выявления мембран, богатых кардиолипином, в клетках животных [Maftah et al., 2006], оказалось невозможным, так как этот зонд не проникал в клетки *P. japonicus*, равномерно окрашивая лишь мертвые клетки. Это, по всей видимости, связано с тем, что данный зонд либо эффективно выкачивается помпами множественной лекарственной устойчивости, либо быстро деградирует в метаболически активных клетках.

Наблюдение за клетками культуры *P. japonicus* на разных стадиях цикла субкультивирования показало, что их митохондрии не образуют единую, электрически сопряженную сеть. В то же время мы обнаружили, что в большей части клеток отдельные митохондрии накапливают потенциал-зависимый флуоресцентный зонд JC-1 в значительно более высоких концентрациях, чем остальные митохондрии в той

же клетке. Известно, что при достижении пороговой концентрации JC-1 агрегирует, что приводит к заметному изменению его спектра флуоресценции [Smiley et al., 1991], поэтому, наблюдая за флуоресценцией этого зонда с использованием разного набора фильтров, можно судить о трансмембранном потенциале каждой отдельной митохондрии в клетке. Аналогичный результат был получен при использовании Mitotracker Green, который копится в митохондриях вне зависимости от трансмембранного потенциала, совместно с потенциалзависимым зондом – тетраметилродамином. Таким образом, наши данные показывают, что клетки суспензионной культуры *P. japonicus* содержат митохондрии с различным трансмембранным потенциалом. В чем может быть причина такого различия? Мы предположили, что в основе этой гетерогенности могут лежать по крайней мере два принципиально различных механизма: отдельные

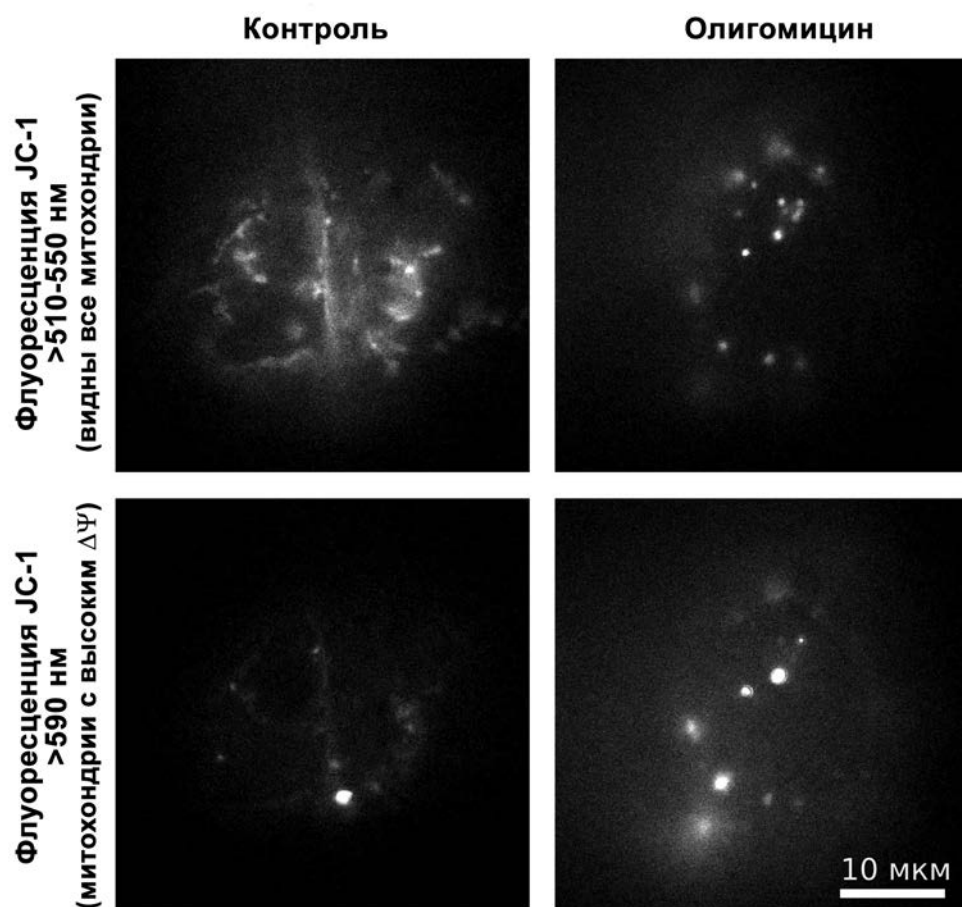


Рис. 1. Флуоресценция JC-1 в клетках *P. japonicus*. Для каждого из условий приведена фотография одной и той же репрезентативной клетки, снятой с использованием разных наборов фильтров. Концентрация олигомицина – 5 мкг/мл.

митохондрии значительно различаются по (1) активности ферментов дыхательной цепи или (2) интенсивности расходования образующегося в ходе дыхания АТФ. Чтобы различить эти два варианта, мы обрабатывали клетки *P. japonicus*, окрашенные JC-1, ингибитором АТФ-синтазы олигомицином D. В присутствии олигомицина возрастал сигнал JC-1 в длинноволновой области, что говорит об увеличении трансмембранного потенциала в митохондриях, но при этом все равно в пределах каждой отдельной клетки содержались митохондрии с сильно различающимися значениями трансмембранного потенциала (рис. 1). Этот результат свидетельствует в пользу первого варианта, то есть о том, что гетерогенность трансмембранного потенциала связана с различиями в активности ферментов дыхательной цепи. Также мы не наблюдали в присутствии олигомицина снижения уровня фрагментации митохондриальной

сети, что говорит о том, что повышение трансмембранного потенциала митохондрий является недостаточным условием для индукции слияния митохондрий в растительных клетках.

ЛИТЕРАТУРА

- Logan D.C. Plant mitochondrial dynamics // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2006. – Vol. 1763. – P. 430–441.
- Maftah A. et al. 10-n nonyl-acridine orange: a fluorescent probe which stains mitochondria independently of their energetic state // *Biochemical and biophysical research communications*. – 1989. – Vol. 164, No. 1. – P. 185–190.
- Sheahan M.B. et al. Mitochondria as a connected population: ensuring continuity of the mitochondrial genome during plant cell dedifferentiation through massive mitochondrial fusion // *The Plant Journal*. – 2005. – Vol. 44. – P. 744–755.
- Smiley S.T. et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1 // *Cell Biology*. – 1991. – Vol. 88. – P. 3671–3675.

БЛОКИРОВАНИЕ ПРИТОКА ИОНОВ КАЛЬЦИЯ ПОДАВЛЯЕТ СИНТЕЗ HSP101 И ИНДУЦИРУЕМУЮ ТЕРМОТОЛЕРАНТНОСТЬ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК *ARABIDOPSIS THALIANA*

Е.Л. Горбылева, Е.Г. Рихванов, Т.М. Русалева, А.В. Федяева, А.В. Степанов

ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
e-mail: dzubina@sifibr.irk.ru

Индукцируемая термотолерантность (ИТ) – способность организма выдерживать летальную температуру при предварительной обработке умеренно высокими температурами [Queitsch et al., 2000]. Развитие ИТ во многом определяется белками теплового шока (БТШ). У растений развитие ИТ определяется HSP101 и низкомолекулярными БТШ, например, HSP17.6 [Queitsch et al., 2000].

Структура и функции БТШ на сегодняшний день изучены довольно хорошо, однако, в механизмах регуляции их синтеза до сих пор остается много неясного.

Митохондрии играют важную роль в развитии устойчивости к тепловому стрессу. Такие неспецифические стрессовые реакции, как повышение уровня цито-

зольного кальция во время стресса также происходит отчасти за счет этих органелл, поскольку митохондрии являются одним из депо ионов кальция. Известно, что при мягком тепловом стрессе также происходит увеличение уровня цитозольного кальция [Saidi et al., 2009; Wu, Jinn, 2010]. Предполагается, что этот процесс участвует в активации экспрессии генов БТШ. На животных показана связь между повышением уровня цитозольного кальция и повышением потенциала на внутренней митохондриальной мембране (mt $\Delta\Psi$) [Balogh et al., 2005]. На растительных объектах (*A. thaliana*, *N. tabaccum*, *Physcomitrella patens*) ранее уже было показано, что искусственное предотвращение притока внеклеточного кальция в цитозоль снижало ИТ [Saidi et al.,

2009; Liu et al., 2005]. На дрожжах недавно было показано участие кальция в синтезе БТШ, в том числе Hsp104 (аналог растительного Hsp101) [Федосеева и др., 2010]. Saidi с соавт. показали, что прединкубация с 7 мМ ЭГТА полностью подавляла тепловую индукцию синтеза Hsp70 у мха [Saidi et al., 2009].

Таким образом, на сегодняшний день показана важная роль участия ионов кальция в развитии устойчивости к стрессовым факторам [Медведев, 2005; Тарчевский, 2002].

Одним из способов изучения влияния изменения уровня Ca^{2+} на биохимические процессы является применение хелаторов кальция – соединений его связывающих. В литературе имеются данные, где показана зависимость между уровнем цитозольного кальция и индукцией синтеза Hsp70 при действии теплового стресса [Saidi et al., 2009], однако, для Hsp101 таких данных нет. В связи с этим, целью данной работы является изучение влияния хелатора кальция ЭГТА (этилендиоксидиэтилендинитротетраацетат) на синтез белка Hsp101 в культуре клеток *Arabidopsis thaliana*.

В первую очередь изучали влияние разных концентраций ЭГТА (5, 7, 10 и 15 мМ) на развитие ИТ культуры клеток *A. thaliana* с помощью восстановления ТТХ (рис. 1). Обработка ЭГТА пропорционально концен-

трации угнетала развитие индуцированной термотолерантности. Поскольку развитие ИТ определяется индукцией синтеза БТШ, поэтому следующим шагом было изучение влияния ЭГТА на их синтез.

Исследование влияния ЭГТА на синтез БТШ с помощью иммуноблоттинга с соответствующими антителами (рис. 2) показало значительное повышение уровня БТШ Hsp101, Hsp70 и Hsp17.6Cl при инкубировании в условиях мягкого теплового стресса. Уровень синтеза Hsp60 не менялся во всех пробах. Присутствие ЭГТА вызывало снижение синтеза БТШ Hsp101, Hsp70 и Hsp17.6Cl пропорционально концентрации.

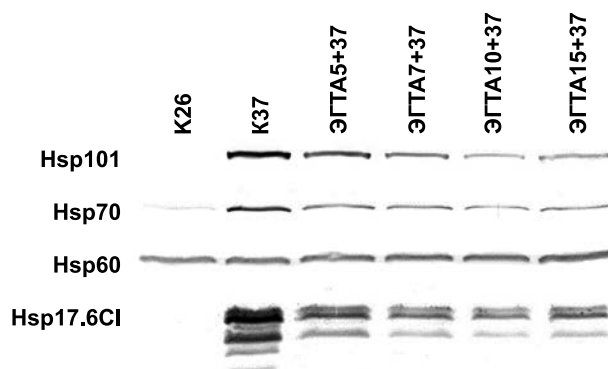


Рис. 2. Влияние ЭГТА на синтез БТШ в условиях теплового стресса. Клетки предварительно инкубировали в течение 30 мин с 5, 7, 10 и 15 мМ ЭГТА и подвергали тепловому стрессу 2 часа при 37 °C, затем отмывали от агента и отбирали для выделения белка. $n = 6$.

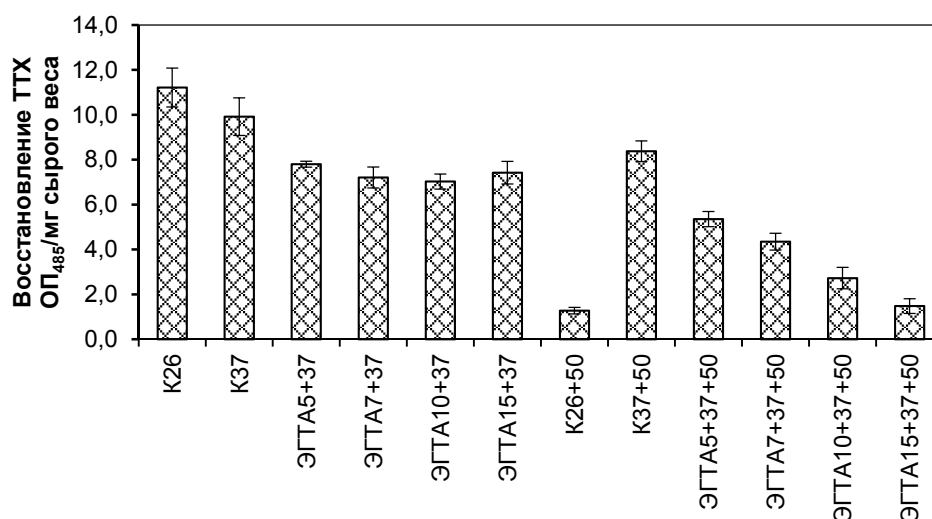


Рис. 1. Влияние ЭГТА на ИТ. Клетки предварительно инкубировали в течение 30 мин с 5, 7, 10 и 15 мМ ЭГТА, подвергали тепловому стрессу 2 часа при 37 °C, затем клетки отмывали и подвергали жесткому тепловому шоку 50 °C 10 мин. Жизнеспособность определяли спустя 48 ч инкубации при 26 °C. $n = 3$.

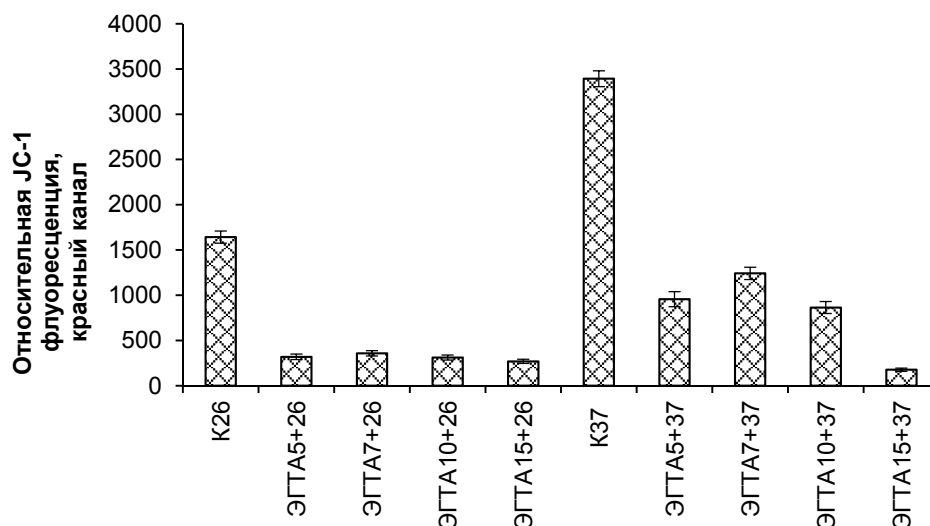


Рис. 3. Влияние ЭГТА на потенциал внутренней митохондриальной мембраны. Клетки предварительно инкубировали в течение 30 мин с 5, 7, 10 и 15 мМ ЭГТА, инкубировали 2 часа при 26 °С или 37 °С. Потенциал внутренней митохондриальной мембраны оценивали по окрашиванию клеток 10 мкМ JC-1 в течение 10 мин. $n = 3$.

Поскольку уровень цитозольного кальция во многом зависит от митохондрий, особенно интересно было посмотреть влияние ЭГТА на $mt\Delta\Psi$. Это было осуществлено с использованием потенциал-зависимого флуоресцентного красителя JC-1. Как видно из рисунка 3, предобработка ЭГТА значительно снижала $mt\Delta\Psi$, как при 26 °С, так и при 37 °С.

Таким образом, полученные результаты, показали, что блокирование притока ионов кальция с помощью ЭГТА ингибировало ИТ в целом, синтез Hsp101 и других БТШ, а также вызывало снижение $mt\Delta\Psi$, что свидетельствует о важной роли кальция в активации синтеза БТШ при тепловом стрессе, развитии ИТ в целом. Следует также отметить, что ЭГТА является хелатором кальция, не проникающим внутрь клетки, следовательно, препятствующим поступлению кальция из вне. Это несколько ограничивает исследования, поскольку источником повышения уровня цитозольного кальция при стрессе могут быть органеллы. Возможно, этим объясняется неполное ингибирование синтеза БТШ обработкой ЭГТА.

ЛИТЕРАТУРА

Медведев С.С. Кальциевая сигнальная система растений // Физиология растений. – 2005 – Т. 52. – С. 1–24.

Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. – М.: Наука, 2002. – 294 с.

Федосеева И.В., Варакина Н.Н., Русалева Т.М., Боровский Г.Б., Рихванов Е.Г., Войников В.К. Эффект ионов кальция на синтез Hsp104 и термотолерантность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Микробиология. – 2010. – Т. 79. – С. 173–179.

Balogh G., Horvath I., Nagy E., Hoyk Z., Benko S., Bensaude O., Vigh L. The hyperfluidization of mammalian cell membranes acts as a signal to initiate the heat shock protein response // FEBS J. – 2005. – Vol. 272. – P. 6077–6086.

Liu H.T., Un D.Y., Zhou R.G. Ca^{2+} and AtCaM3 are involved in the expression of heat shock protein gene in Arabidopsis // Plant Cell Environ. – 2005. – Vol. 28. – P. 1276–1284.

Saidi Y., Finka A., Muriset M., Bromberg Z., Weiss Y.G., Maathuis F.J., Goloubinoff P. The heat shock response in moss plants is regulated by specific calcium-permeable channels in the plasma membrane // Plant Cell. – 2009. – Vol. 21. – P. 2829–2843.

Queitsch C., Hong S.W., Vierling E., Lindquist S. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis // Plant Cell. – 2000. – Vol. 12. – P. 479–492.

Wu H.-C., Jinn T.-L. Heat shock-triggered Ca^{2+} mobilization accompanied by pectin methylesterase activity and cytosolic Ca^{2+} oscillation are crucial for plant thermotolerance // Plant Sign. Behav. – 2010. – Vol. 5 – P. 1252–1256.

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ ОКИСЛИТЕЛЕЙ: РОЛЬ В РАЗВИТИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ И СИГНАЛИНГЕ ПРИ СТРЕССЕ

В.В. Емельянов, Т.В. Чиркова

ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
e-mail: bootika@mail.ru

Окислительные процессы развиваются в растительных тканях при действии разнообразных негативных факторов окружающей среды. «Окислительный стресс» является неотъемлемым компонентом стрессорной реакции растений и других организмов независимо от природы действующего стрессирующего начала. Особенно сильно окислительные процессы развиваются под действием непосредственных окислителей, таких как озон, компоненты фотохимического смога и различные генераторы свободных радикалов, подобные виологену. Любые другие факторы, изменяющие нормальное протекание окислительно-восстановительных процессов в клетке, будут способствовать формированию активных форм окислителей (АФО) – кислорода, азота, карбонила

и серы. В субтоксических концентрациях АФО участвуют в метаболических реакциях, трансдукции сигналов и индукции защитных механизмов. Превышение токсических концентраций этих продуктов будет стимулировать постепенное развитие деструктивных процессов: свободно-радикальных реакций, окислительного повреждения пигментов, липидов, углеводов, белков и нуклеиновых кислот. Продукты взаимодействия АФО и внутриклеточных метаболитов также участвуют в работе сигнальных систем и развитии защитных механизмов, но аккумуляция все больших окислительных повреждений вызывает гибель клетки. Более того, гибель клетки от старости в естественных условиях также сопровождается усиленной продукцией АФО и развитием окислительного стресса.



Рис. 1. Действие активных форм окислителей на растения.

Для предотвращения окислительного стресса растения располагают многоуровневой системой антиоксидантной защиты, состоящей из низкомолекулярных антиоксидантов и антиоксидантных ферментов. Водорастворимые низкомолекулярные антиоксиданты (аскорбиновая кислота, глутатион, фенольные соединения и полиамины) защищают гидрофильные компартменты клетки, жирорастворимые антиоксиданты (токоферолы, каротиноиды в пластидах) предотвращают окислительные процессы в клеточных мембранах. В защите активно участвуют и антиоксидантные ферменты, главными из которых являются ферменты биосин-

теза низкомолекулярных антиоксидантов и ферменты аскорбат-глутатионового цикла (цикла Халливела-Асады), которые обеспечивают согласованную работу и эффективное восстановление важнейших низкомолекулярных антиоксидантов – аскорбата и глутатиона.

Обычно устойчивые к неблагоприятным факторам растения обладают мощной системой антиоксидантной защиты, а различные манипуляции, увеличивающие антиоксидантный статус организма, приводят к его большей стрессоустойчивости.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 12-04-01029 и 13-04-00945).

ПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ФОСФОРОРГАНИЧЕСКОГО РЕГУЛЯТОРА РОСТА РАСТЕНИЙ НА МОРФОЛОГИЮ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА В УСЛОВИЯХ НЕДОСТАТОЧНОГО УВЛАЖНЕНИЯ И УМЕРЕННОГО ОХЛАЖДЕНИЯ

И.В. Жигачева¹, Е.М. Миль¹, В.И. Бинюков¹, И.П. Генерозова², А.Г. Шугаев²

¹ ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва
e-mail: zhigacheva@mail.ru

² ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва
e-mail: igenerozova@mail.ru

Энергетический обмен играет важную роль в адаптивных реакциях организма. При этом митохондриям отводится ключевая роль в энергетических, окислительно-восстановительных и метаболических процессах в клетке. Устойчивость организмов к стрессовым факторам, вероятно, зависит от соответствия функционального состояния митохондрий энергетическим потребностям клетки и всего организма. Отметим, что митохондрии являются чрезвычайно функционально-зависимыми органеллами. В клетках животных и дрожжей эти органеллы объединены в разветвленную сеть, именуемую «митохондриальным ретикулумом» [Bakeeva L.E. et al., 1978]. У высших растений митохондрии одиночны и имеют либо сферическую, либо цилиндрическую форму [Logan D.C., Leaver C.J., 2000]. При стрессовых воздействиях ми-

тохондрии образуют разветвленные сети (аноксия) [Vartapetian B.B. et al., 1977], либо происходит агрегация митохондрий и образование плотных кластеров, расположенных вблизи хлоропластов или в других областях цитозоля (тепловой шок, УФ облучение, действие сильных окислителей). Формирование «гигантских митохондрий» сопровождается увеличением генерации АФК и предотвращается антиоксидантами [Scott I., Logan D.C., 2008]. Стандартная процедура выделения митохондрий в растворе сахарозы приводит к полному разрушению межмитохондриальных контактов. По этой причине, митохондрии представлены в виде отдельных везикул, размер которых не превышает 1,20 мкм в диаметре. При этом морфология изолированных митохондрий, возможно, отражает их функциональное состояние.

Известно, что регуляторы роста и развития растений повышают устойчивость растений, как к биотическому, так и к абиотическому стрессу, в том числе и к водному дефициту. Одним из таких регуляторов роста растений является мелафен, повышающий устойчивость растений к стрессовым воздействиям в концентрациях 10^{-12} – 10^{-9} М.

В нашей работе мы исследовали совместное влияние дефицита влаги, умеренного охлаждения до 10 – 14 °С, и обработки семян гороха 2×10^{-12} М раствором регулятора роста растений мелафеном (меламиновой солью бис (гидроксиметил) фосфиновой кислоты) на интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и АСМ имиджи изолированных митохондрий 5 дневных проростков гороха (*Pisum sativum*), сорт Флора-2.

Метод АСМ позволяет провести количественную оценку параметров имиджей митохондрий, а затем обработать их статистическими методами

Материалы и методы

Семена гороха (*Pisum sativum* L.), сорт Альфа замачивали в течение 60 мин либо в воде, либо в 2×10^{-12} М растворе мелафена. Длительность замачивания – 1 ч. Далее семена переносили в закрытые кюветы на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в темноте. Спустя 1 сутки половину проростков контрольной группы (НУ+Холод) и половину проростков, обработанных мелафеном, переносили на сухую фильтровальную бумагу в открытые кюветы, где они находились при 14 °С в течение двух суток (МФ+НУ+Холод). Вторая половина семян, обработанных мелафеном, и половина контрольных семян в течение этого же времени находилась в закрытых кюветах с периодически увлажняемой фильтровальной бумагой при 14 °С. Через двое суток все проростки переносили в помещение с температурой воздуха 22 °С и помещали в закрытые кюветы с периодически увлажняемой бумагой. Контрольная группа проростков в течение всего эксперимента находилась при температуре 22 °С.

Выделение митохондрий из 5-дневных эпикотилей проростков гороха проводили

по методу [Попов В.Н с соавт., 2003] в нашей модификации.

Образцы митохондрий для АСМ готовили на полированной силиконовой подложке. Промытые буфером без БСА митохондрии на подложке фиксировали 2% глутаровым альдегидом в течение 2 мин с последующей промывкой водой и воздушной сушкой. Исследование проводили на приборе SOLVER P47 SMENA на частоте 150 кГц в полуконтактном режиме. Использовался кантилевер NSG11 с радиусом кривизны 10 нм. Анализ АСМ изображений исследуемых митохондрий на подложке позволяет определять объем отдельных митохондрий. Объем имиджа митохондрий соответствует произведению площади сечения имиджа митохондрии на среднюю высоту данного имиджа в области сечения и определяется с помощью программы Image Analyzis по координатным данным и шагу сканирования. Сечение производили на высоте 30 нм. При этом можно получить и другие параметры – среднюю высоту и площадь АСМ имиджа в области сечения митохондрий. При анализе и обработке массива данных использовали Statistica 6. Для расчета брались одиночные митохондрии.

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали флуоресцентным методом [Fletcher B.I. et al., 1973]. Регистрацию флуоресценции проводили в десятимиллиметровых кварцевых кюветах на спектрофлуориметре FluoroMax-HoribaYvon GmbH (Германия). Результаты выражали в условных единицах флуоресценции пересчитанных на мг белка.

Результаты и обсуждение

Совместное действие недостаточного увлажнения и умеренного охлаждения приводило к существенному изменению АСМ имиджей митохондрий проростков гороха. Статистический анализ одиночных митохондрий с помощью Image Analyzis и их статистическая обработка, свидетельствуют, что совместное действие недостаточного увлажнения и умеренного охлаждения, приводило к увеличению среднего объема АСМ имиджей митохондрий проростков гороха. Предварительная обработка семян гороха 2×10^{-12} М мелафеном предотвраща-

ла изменение геометрических параметров АСМ имиджей митохондрий, находящихся в этих условиях и исследуемые параметры оставались близкими к соответствующим показателям в контрольной группе. Аналогичные данные были получены I. Scott, D.C. Logan при обработке листьев *Arabidopsis thaliana* метил-виологеном [Scott I., Logan D.C., 2008]. Сопоставляя литературные данные с данными, полученными в нашем эксперименте, можно предположить, что совместное действие умеренного охлаждения и недостаточного увлажнения приводило к набуханию митохондрий с последующим увеличением генерации АФК [Zhan L. et al., 2009]. Действительно, в мембранах митохондрий этой группы проростков наблюдалась активация ПОЛ. При этом интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий возрастала в 2,5–3 раза. Замачивание семян в 2×10^{-12} М растворе мелафена приводило к снижению интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ почти до контрольного уровня. Такая обработка предотвращала изменения морфологии митохондрий. Размеры митохондрий были сопоставимы с контрольными. При этом происходило увеличение числа делящихся митохондрий, как это наблюдалось в контроле. При этом препарат на 12–15 % увеличивал скорости окисления пары аскорбат + ТМФД (тетраметил-п-фенилендиамина). Отметим, что это ускорение не было связано с активацией альтернативной оксидазы митохондрий, т.к. перенос электронов полностью подавлялся цианидом. Рост скоростей транспорта электронов на конечном участке дыхательной цепи митохондрий, возможно, приводил к снижению генерации АФК этими органеллами и вносил вклад в защиту клетки от оксидативного стресса. Снижение интенсивности ПОЛ, а, следовательно, и сохранение морфологических характеристик митохондрий проростков гороха, вероятно, также связано с антирадикальной и антиокислитель-

ной активностью препарата, поскольку константа взаимодействия мелафена с супероксидным радикалом составляла $1,67 \times 10^4$ (Мс)⁻¹ и была сопоставима с нитросиним тетразолием, а эффективная константа скорости взаимодействия мелафена с пероксильными радикалами (k_7) при окислении этилбензола (600) составляла $1,64 \times 10^6$ (Мс)⁻¹ [Жигачева И.В. с соавт., 2007]. Кроме того, протекторные свойства препарата, возможно, связаны с его влиянием на активность ферментов антиоксидантной системы: каталазы и пероксидазы [Платонова Т.А. с соавт., 2011].

ЛИТЕРАТУРА

- Жигачева И.В., Фаткуллина Л.Д., Русина И.Ф., Шугаев А.Г., Генерозова И.П., Фаттахов С.Г., Коновалов А.И. Антистрессовые свойства препарата мелафен // ДАН. – 2007. – Т. 414, № 2. – С. 263–265.
- Платонова Т.А., Евсюнина А.С., Кораблёва Н.П. Влияние мелафена на митохондриальный аппарат клеток апикальных меристем при регуляции ростовых процессов в клубнях картофеля // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47, № 4. – С. 484–489.
- Попов В.Н., Руге Э.К., Старков А.А. Влияние ингибиторов электронного транспорта на образование активных форм кислорода при окислении сукцината митохондриями гороха // Биохимия. – 2003. – Т. 68, № 7. – С. 910–916.
- Bakeeva L.E., Chentsov Yu.S., Skulachev V.P. Mitochondrial framework in rat diaphragm muscle // Biochim. et biophys. acta. – 1978. – Vol. 501, No 3. – P. 349–369.
- Scott I., Logan D.C. Mitochondrial morphology transition is an early indicator of subsequent cell death in Arabidopsis // New Phytologist. – 2008. – Vol. 177. – P. 90–101.
- Vartapetian B.B., Andreeva I.N., Kozlova G.I., Agapova L.P. Mitochondrial Ultrastructure in Roots of Mesophyte and Hydrophyte at Anoxia and after Glucose Feeding // Protoplasma. – 1977. – Vol. 93. – P. 243–256.
- Zhang L., Li. Yinshu, Da-Xing, Caiji Gao. Characterization of mitochondrial dynamics and subcellular localization of ROS reveal that HsfA2 alleviates oxidative damage caused by heat stress in Arabidopsis // Journal of Experimental Botany. – 2009. – Vol. 60. – P. 2073–2091.

ПРОДУКЦИЯ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В ХЛОРОПЛАСТАХ: МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ И ДИФФУЗИИ И СИГНАЛЬНАЯ РОЛЬ

Б.Н. Иванов, М.М. Борисова-Мубаракшина, И.А. Найдов, М.А. Козулева, Н.Н. Руденко,
Д.В. Ветошкина

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино
e-mail: ivboni@rambler.ru

Освещение листьев вызывает значительное увеличение поглощения ими кислорода O_2 ; скорость этого поглощения линейно зависит от интенсивности света. При освещении отдельной клетки возрастание содержания перекиси водорода наблюдается, прежде всего, в хлоропластах. Полученные результаты показывают, что основной процесс образования перекиси водорода в растениях на свету – восстановление молекул O_2 компонентами фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ФЭТЦ). Освещение листьев приводит также к возрастанию содержания перекиси водорода и в митохондриях; последнее может отражать инициацию фотодыхания.

Первичным продуктом восстановления молекул O_2 в ФЭТЦ является супероксидный анион-радикал, который может превращаться в перекись водорода в результате восстановления или дисмутации. Обнаружено, что при умеренных и высоких интенсивностях света образование как супероксидного радикала, так и H_2O_2 происходит, в основном, внутри тилакоидной мембраны. Наиболее вероятный путь образования молекул H_2O_2 внутри тилакоидной мембраны – восстановление супероксидных радикалов молекулами пластогидрохинона [Mubarakshina & Ivanov, 2010].

Скорость накопления перекиси водорода в хлоропластах на свету может зависеть не только от скорости ее продукции, но и от мощности системы ее утилизации. Найдено, что накопление H_2O_2 на свету в хлоропластах мутанта арабидопсиса с пониженным содержанием аскорбата происходит значительно быстрее, чем в хлоропластах растений дикого типа [Найдов и др., 2010]. Это свидетельствует о важной роли аскорбата в регулировании накопления перекиси водорода в хлоропластах.

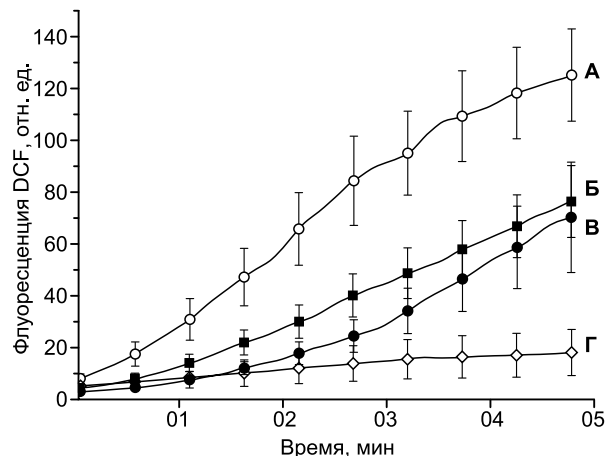


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции DCF, образующегося в реакции H_2O_2 с H_2 -DCF-DA, в хлоропластах арабидопсиса при освещении. А – мутант *vtc2-2*; Б – растения экотипа Col-0; В – мутант *vtc2-2* в присутствии 10 мМ аскорбата; Г – растения экотипа Col-0 в присутствии 12 мМ DCMU.

Мы обнаружили, что при освещении листьев растений происходит значительное увеличение количества H_2O_2 в межклеточном пространстве и сосудах. Очевидно, что процесс ее появления там начинается с выхода из хлоропластов. Выход H_2O_2 из интактных хлоропластов был зарегистрирован с помощью ЭПР. Появление H_2O_2 вне хлоропластов существенно возрастало при подавлении в присутствии KCN ферментов системы утилизации H_2O_2 . Резкое возрастание выхода H_2O_2 наблюдалось в присутствии разобщителя [Mubarakshina et al., 2010]. Нам удалось зарегистрировать выход перекиси водорода из интактных хлоропластов внутри клетки [Найдов и др., 2012]. Было замечено, что резкое ускорение этого выхода совпадало с остановкой движения цитоплазмы.

Исследование влияния ингибитора растительных аквапоринов, ацетазоламида, на появление перекиси водорода в среде инкубации изолированных интактных хлоропластов показало, что молекулы H_2O_2 выходят из хлоропластов через аквапори-

ны [Mubarakshina et al., 2012]. Данный факт свидетельствует, что выход H_2O_2 из хлоропластов может регулироваться на уровне биосинтеза этих белков.

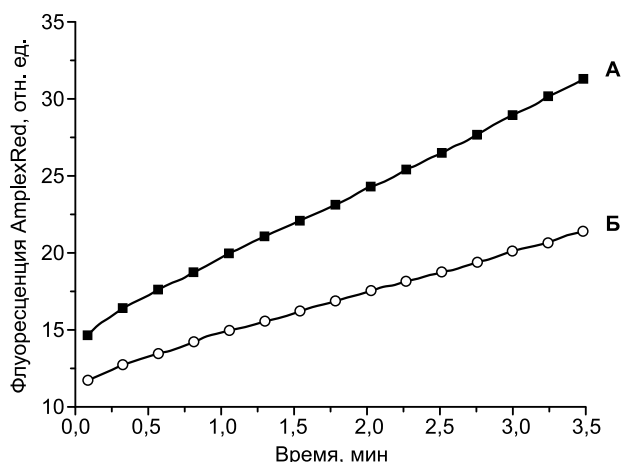


Рис. 2. Светоиндуцируемые изменения флуоресценции резорурфина (продукта реакции H_2O_2 с Amplex red) вне изолированных интактных хлоропластов в отсутствие (А) и в присутствии (Б) 1 мМ ацетазоламида.

Известно, что в фотосинтезирующих клетках, в их фотосинтетическом аппарате при адаптации к условиям повышенной освещенности происходят значительные изменения; при увеличении освещенности в большинстве видов растений уменьшается размер светособирающей антенны Фотосистемы 2, что отражается в увеличении соотношения хлорофиллов *a* и *b* в листьях. Опыты с растениями арабидопсиса показали, что при увеличении освещенности растений уменьшение размера антенны происходит вследствие уменьшения содержания белков светособирающих комплексов. Было обнаружено, что содержание белков изменилось вследствие уменьшения скорости транскрипции генов этих белков (рис. 3) [Борисова-Мубаракшина и др., 2014].

В литературе предполагается, что размер светособирающей антенны Фотосистемы 2 зависит от редокс-состояния пула пластохинона хлоропластов. При увеличении интенсивности света, действующего на листья, сформировавшиеся при относительно более низкой освещенности, пул пластохинона оказывается более восстановленным. Как осуществляется влияние этого пула, расположенного в хлоропластах, если белки светособирающих пигмент-белковых комплексов кодируются ядерным геномом?

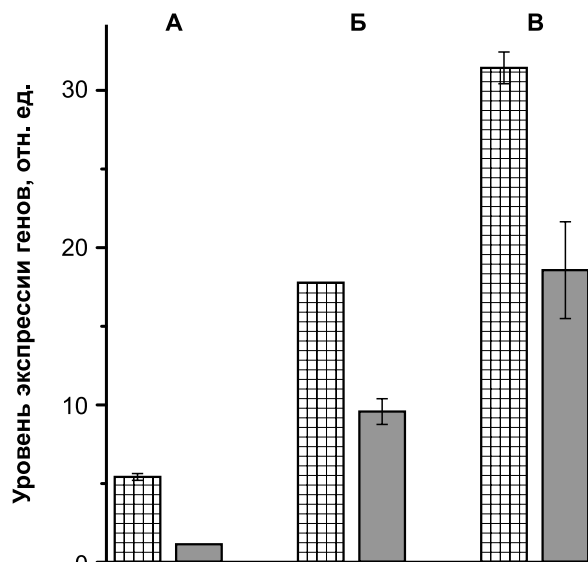


Рис. 3. Уровень экспрессии генов *At2g05070* (А), *At5g54270* (Б) и *At1g115820* (В), кодирующих, соответственно, белки Lhcb2.2, Lhcb3 и Lhcb6 в *Arabidopsis thaliana*. Штриховые столбики – интенсивность света 70 мкмоль квантов $m^{-2} \cdot s^{-1}$; серые столбики – через 5 дней после переноса на свет интенсивностью 360 мкмоль квантов $m^{-2} \cdot s^{-1}$.

Мы нашли, что увеличение освещенности растений приводит к возрастанию в них содержания перекиси водорода. Как показано выше, увеличение образования перекиси водорода в хлоропластах при увеличении интенсивности света происходит, в основном, за счет ускорения этого процесса в тилакоидной мембране, где пул пластохинона непосредственно участвует в этом образовании.

Известно, что молекулы H_2O_2 являются одними из важнейших сигнальных молекул в растительных клетках. Роль молекул H_2O_2 как инициатора сигнальных путей, ведущих при увеличении интенсивности действующего света к уменьшению размера светособирающей антенны фотосистемы 2, выявилась как при действии каталазы, так и при искусственном увеличении содержания перекиси водорода в листьях. Обработка каталазой приводила к исчезновению эффекта увеличения интенсивности освещения на отношение $Hl\ a / Hl\ b$, а искусственное увеличение содержания H_2O_2 в листьях ячменя при низкой освещенности имитировало увеличение освещенности. Было также найдено, что в последнем случае происходило уменьшение содержания белков светособирающей антенны.

Уменьшение размера светособирающей антенны в процессе адаптации растений к повышенной освещенности совпадало с воз-

растением эффективности преобразования световой энергии при фотосинтезе, которая существенно снижалась в начальный период после увеличения освещенности [Борисова-Мубаракшина и др., 2014].

ЛИТЕРАТУРА

Борисова-Мубаракшина М., Ветошкина Д., Руденко Н. и др. Размер светособирающей антенны фотосистемы 2 высших растений при изменении освещенности регулируется на уровне транскрипции генов антенных белков // Биохимия. – 2014. – Т. 79. – (в печати).

Найдов И., Мудрик В., Иванов Б.Н. Динамика содержания пероксида водорода на свету в протопластах из листьев арабидопсиса и его мутанта с нарушенным биосинтезом аскорбата // Доклады Академии Наук. – 2010. – Т. 432. – С. 834–837.

Найдов И., Мубаракшина М., Иванов Б.Н. Кинетика образования и распределения H_2O_2 в хлоропластах и протопластах фотосинтезирующих клеток листьев высших растений при освещении // Биохимия. – 2012. – Т. 77. – С. 179–189.

Mubarakshina M.M., Ivanov B.N. The production and scavenging of reactive oxygen species in the plastoquinone pool of chloroplast thylakoid membranes // Physiol. Plantarum. – 2010. – Vol. 140. – P. 103–110.

Mubarakshina M.M., Ivanov B.N., Naydov I.A. et al. Production and diffusion of chloroplastic H_2O_2 and its implication to signaling // J. Exp. Botany. – 2010. – Vol. 61. – P. 3577–3587.

Mubarakshina M.M., Kozuleva M.A., Rudenko N.N. et al. The photosynthetic electron flow to oxygen and diffusion of hydrogen peroxide through the chloroplast envelope via aquaporins // Biochimica et Biophysica Acta. – 2012. – Vol. 1817. – P. 1314–1321.

ВЛИЯНИЕ КЛИМАТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА СОСТОЯНИЕ ПИГМЕНТНОГО АППАРАТА ХВОИ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PINUS SYLVESTRIS* L.) В БАЙКАЛЬСКОМ РЕГИОНЕ

М.В. Иванова, Г.Г. Суворова

ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
e-mail: omaria-84@yandex.ru

Одним из важнейших физиолого-биохимических процессов, протекающих в растительном организме, является фотосинтез. Изменения содержания пигментов, участвующих в процессе фотосинтеза, показывают уровень адаптивных реакций организма на стрессовое воздействие условий среды. Известно, что максимальная скорость фотосинтеза в оптимальных условиях («потенциальный фотосинтез») определяется в основном количеством молекул хлорофилла, участвующих в восстановлении одной молекулы CO_2 . Потенциальные энергетические возможности электронного транспорта наиболее тесно связаны с особенностями организации пигментсодержащих мембранных комплексов тилакоидов, а их реализация – с активностью энергопотребляющих процессов растения [Борзаев и др., 2011]. Устойчивость фотосинтетического аппарата растений формируется за счет изменения концентрации и перераспределения зеленых и

желтых пигментов в ССК и/или РЦ фотосистем [Бухов, 2004]. Фотосинтетический аппарат очень чувствителен к световым условиям выращивания растений: при высокой интенсивности света (выше 400 мкЕ/(м²с)) возрастает скорость транспорта электронов в тилакоидной мембране, что является результатом большего вклада ФС II-комплексов и уменьшения вклада ССК антенн. В этих условиях увеличивающийся уровень Рубиско ускоряет фиксацию CO_2 и, соответственно, скорость фотосинтеза. Напротив, при низкой интенсивности света в листе содержится максимальное количество антенного хлорофилла и пониженный уровень реакционных центров [Иванов, 2010; Bailey, 2001].

Резко континентальный климат Байкальского региона характеризуется высоким уровнем инсоляции, 80-градусной амплитудой колебания температуры воздуха в течение года и периодически экстремальными летними засухами.

Особый комплекс климатических условий способствует формированию на этой территории устойчивых высокопродуктивных древостоев с явным преобладанием хвойных пород.

В связи с этим, **целью** данной работы было изучение динамики хлорофиллов хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в различные по климатическим условиям вегетационные периоды в Байкальском регионе.

Материал для изучения пигментов хвои сосны обыкновенной отбирался на экспериментальном участке, заложенном на окраине г. Иркутска (территория СИФИБР СО РАН) в 1984 г. Содержание зеленых пигментов в хвое определяли с помощью спектрофотометра СФ 56 (ЛОМО, Россия) в вытяжке с ацетоном [Шлык, 1971]. Долю хлорофиллов, включенных в состав светособирающих комплексов (ССК) от общей суммы зеленых пигментов рассчитывали с учетом того, что весь хлорофилл *b* находится в ССК и соотношение хлорофиллов *a/b* в ССК равно 1,2 [Maslova, Popova, 1993]. Параллельно с исследованиями пигментного фонда хвои проводили наблюдения за факторами среды. Температуру воздуха регистрировали 12-точечным регистратором КСМ с медными термодатчиками. Интенсивность радиации измеряли пиранометром Янишевского с регистрацией показаний потенциометром КСП-4. Температуру почвы на глубине 20 см измеряли термометрами Савинова.

Характерные особенности климата исследуемого региона – неравномерность увлажнения по годам и на протяжении вегетационного сезона, возврат холодов в весенне-раннелетний период с заморозками до -8°C и активное иссушение почвы сильными ветрами. Вследствие этого динамика увлажненности вегетационного сезона часто складывается неблагоприятно для растительности [Суворова, 2009]. Вегетационный период 2003 г. был охарактеризован как засушливый. Вегетационный сезон 2004 г. отличался уникальным сочетанием высокой увлажненности и оптимальными температурами воздуха и почвы на всем протяжении вегетационного периода. Ве-

гетационный период 2009 г. отличался относительно равномерным уровнем осадков. Среднемесячные значения температуры почвы были ниже среднемноголетних значений. Период вегетации 2011 г. можно охарактеризовать как умеренно влажный и теплый. По уровню солнечной радиации этот период отличался наибольшими значениями по сравнению со среднемноголетними данными. Вегетационный период 2012 г. был влажным и теплым.

Ранее было показано, что у хвойных, произрастающих на холодных и подвергающихся летней засухе почвах Байкальского региона, уровень содержания зеленых пигментов в хвое регулируется непосредственно динамикой температуры почвы и опосредованно, через оводненность хвои – динамикой влагообеспеченности почвы [Оскорбина, 2010].

Динамика содержания хл. *a* в периоды вегетации исследуемых лет была преимущественно типична, имела куполообразный вид и достигала своего максимального значения в июле. В целом, наибольшие значения содержания хл *a* отмечались в вегетационный период 2004 г., который по сравнению с условиями исследуемых лет отличался уникальным сочетанием высокой увлажненности и оптимальными температурами воздуха и почвы на всем протяжении вегетационного периода.

Сезонная динамика содержания в хвое сосны обыкновенной хл *b* имеет более сложный характер по сравнению с хл *a*. Было выявлено, что куполообразная динамика содержания хл *b* (с одним максимумом) наблюдалась в 2004, 2009 и 2011 гг., два достоверных максимума содержания хл *b* отмечалось в 2003 и 2012 гг.

Было исследовано процентное содержание хлорофилла (*a+b*) в ССК ФСЕ от общего содержания хлорофилла (*a+b*). Выявили, что динамика содержания хлорофилла в ССК ФСЕ имеет схожий характер, отличающийся тремя максимумами, для вегетационных периодов 2003, 2009 и 2012 гг. и с одним максимумом для 2004 и 2011 гг. Следует отметить, что в период вегетации 2004 г. сложно выделить максимальные значения в содержании хлорофиллов в ССК, т.к. их

динамика имеет очень слабовыраженный куполообразный характер.

Известно, что динамика зеленых пигментов и структура мембран хлоропластов в течение вегетации и в годичном цикле определяются уровнем инсоляции и температурными условиями [Гамалей, 1980; Котеева, 2002; Кочубей, 2005; Мирославов, 1996; Lichtenthaler, 1982]. Результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что пигментный пул хвои сосны обыкновенной в условиях Байкальского региона обладает высокой пластичностью, что определяет высокие адаптивные свойства фотосинтетического аппарата к условиям произрастания. В периоды вегетации с высоким уровнем инсоляции при различных условиях температуры и увлажнения динамика хл *a* остается практически неизменной. Основные изменения претерпевает динамика содержания хлорофилла *b*, влияя на количество ССК. В данной работе впервые показано, что динамика содержания хлорофилла в ССК может иметь до трех максимумов в течение вегетации в зависимости от климатических условий среды. Весенний максимум содержания хлорофилла в ССК вероятнее всего объясняется защитой фотосинтетического аппарата от негативного действия высокого уровня радиации и низких температур. Летний максимум содержания хлорофилла в ССК, вероятно, связан с перестройкой ФСА в связи с новообразованием хлорофилла в условиях температурного оптимума, о чем свидетельствует одновременное увеличение как общего содержания хл *a*, *b*, так и хлорофилла в ССК. Осенний максимум содержания хлорофилла в ССК, возможно, свидетельствует о подготовке фотосинтетического аппарата к зиме и/или увеличении функции светосбора в связи с двух-трехкратным уменьшением уровня освещенности при активном фотосинтезе. Это прямое свидетельство пластичности фотосинтетического аппарата, который осуществляет оперативные перестройки в связи с условиями среды.

ЛИТЕРАТУРА

- Борзаев Р.Б., Батукаев А.А., Умаров М.У., Маторин Д.Н. Потенциальный фотосинтез детерминированный структурой пигментного аппарата у клоновых мутантов яблони различающихся первичной продуктивностью // VII Съезд Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий: Материалы докладов. 4–10 июля, 2011 г. – Нижний Новгород, 2011. – Ч. 1. – 410 с.
- Бухов Н.Г. Динамическая световая регуляция фотосинтеза // Физиология растений. – 2004. – Т. 51. – С. 825–837.
- Гамалей Ю.В. Мезофилл // Атлас ультраструктуры растительных тканей. – Петрозаводск, 1980. – С. 97–127.
- Иванов А.А. Влияние световых условий выращивания пшеницы на чувствительность фотосинтетического аппарата к солевому стрессу // Физиология растений. – 2010. – Т. 57, № 6. – С. 826–834.
- Котеева Н.К. Особенности сезонной ритмики ультраструктуры клеток апикальной меристемы побега и мезофилла хвои *Pinus silvestris* // Ботанический журнал. – 2002. – Т. 87, № 11. – С. 50–60.
- Кочубей С.М., Шевченко В.В., Бондаренко О.Ю. Особенности организации гран хлоропластов гороха // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 4. – С. 499–506.
- Мирославов Е.А. Вознесенская Е.В. Буболо Л.С. Структура хлоропластов северных растений в связи с адаптацией фотосинтетического аппарата к условиям Арктики // Физиология растений. – 1996. – Т. 43, № 3. – С. 374–379.
- Оскорбина М.В. Структурные и функциональные особенности фотосинтетического аппарата хвойных в условиях Верхнего Приангарья: автореф. дис. ... канд. биол. наук. 03.01.05. – Иркутск: СИФИБР СО РАН, 2010. – 19 с.
- Суворова Г.Г. Фотосинтез хвойных деревьев в условиях Сибири. – Новосибирск: Изд-во «Гео», 2009. – 194 с.
- Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев. Биохимические методы в физиологии растений. – М.: Наука, 1971. – С. 154–169.
- Bailey S., Wers R.G., Jansson S., Horton P. Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses // Planta. – 2001. – Vol. 213. – P. 794–801.
- Lichtenthaler H.K., Burgstahler R., Buschmann C., Meier D., Prenzel U., Schonthal A. Effect of high light and high light stress on composition, function and structure of the photosynthetic apparatus // Stress effects on photosynthesis. The Hague: Dr. W. Junk Publ., 1982. – P. 352–370.
- Maslova T.G., Popova I.A. Adaptive properties of the plant pigment systems // Photosynthetica. – 1993. – Vol. 29. – P. 195–203.

УЧАСТИЕ КАРБОАНГИДРАЗ В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ ХЛОРОПЛАСТА

Л.К. Игнатова, Е.М. Журикова, Н.Н. Руденко, Т.П. Федорчук, Б.Н. Иванов

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино
e-mail: lkign@rambler.ru

Карбоангидраза (КА) ускоряет обратимую гидратацию углекислого газа согласно уравнению $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. Фермент встречается у всех живых организмов от прокариот до млекопитающих. Вся совокупность карбоангидраз классифицирована по консервативным нуклеотидным последовательностям в несколько генных семейств. У высших растений, в частности у *Arabidopsis thaliana*, чей геном расшифрован, установлено присутствие 19 генов, кодирующих КА, принадлежащие к трем семействам: α -, β - и γ -КА. В хлоропласте, кроме известной с 40-х годов прошлого столетия весьма значительной по количеству белка β -КА1, обнаружены α -КА1 [Villarejo et al., 2005] (обе в строме), β -КА5 [Fabre et al., 2007] и α -КА4 в тилакоидных мембранах [Frizo et al., 2004] (название КА приводится по номенклатуре [Fabre et al., 2007]). С другой стороны, исследовательские группы в разных странах мира обнаруживают присутствие КА активности в двух местах пигмент-белкового комплекса фотосистемы 2 (ФС2) [Lu, Stemler, 2002], одной КА вблизи комплекса фотосистемы 1 (ФС1) [Пронина и др. 2002, Игнатова и др., 2006] и одной в люменальном пространстве тилакоидов [Rudenko et al., 2007]. Природа этих КА неизвестна.

Главной функцией хлоропластов является фотосинтез, то есть осуществление синтеза органических веществ с помощью энергии света. Все компоненты реакции, катализируемой КА, тем или иным образом принимают участие в процессе фотосинтеза. CO_2 – субстрат ключевой реакции включения неорганического углерода в органическое вещество, вода расщепляется в ФС2 и при этом обязательно присутствие иона бикарбоната как на акцепторной, так и на донорной сторонах фотосистемы, протонный градиент служит движущей силой образования АТФ, используемой в темновых процессах. Для оценки показателей фотосинтеза исполь-

зовали метод РАМ-флуориметрии, который позволяет оценить практически все стороны фотосинтеза на целом растении без расхода растительного материала. Созданная в лаборатории установка позволяет измерять показатели фотосинтеза, изменяя содержание углекислого газа. Регистрировали квантовый выход (Y), фотохимическое тушение флуоресценции (qp) и нефотохимическое тушение (НФТ) (qN), позволяющее оценить величину протонного градиента, фосфорилирование светособирающего комплекса ФС2 и фотоингибирование, характеризующиеся коэффициентами НФТ qE, qT и qI, соответственно. Исследовали растения арабидопсиса экотипа Columbia (ДТ) и нокаутные мутантные по генам КА хлоропластов растения (семена предоставлены Д.В. Морони, Луизианский государственный университет, США).

Предполагается, что роль двух стромальных КА может сводиться к обеспечению субстратом (CO_2) ключевого фермента фиксации – рибулезобисфосфат-карбоксилазы/оксигеназы (РБФК/О), поскольку запасющей формой неорганического углерода в клетке служит ион бикарбоната, однако, при помещении растений арабидопсиса в условия повышенного освещения, приводившие к возрастанию фотосинтеза, не происходило изменение уровня экспрессии гена *At3g01500*, кодирующего β -КА1, тогда как уровень экспрессии гена *At3g52720*, кодирующего α -КА1, возрос [Ветошкина и др., 2013]. Показатели фотосинтеза мутантных по α -КА1 и β -КА1 растений не отличались от дикого типа. По-видимому, поставку CO_2 к РБФК/О осуществляет α -КА1, роль β -КА1 остается неясной.

Точное местонахождение в тилакоидной мембране α -КА4, кодируемое геном *At4g20990* неизвестно. При выращивании арабидопсиса в условиях высокой освещенности увеличивалась экспрессия гена *At4g20990*. Эта КА предохраняет каким-то

Таблица 1

Содержание крахмала в листьях растений дикого типа и нокаутных мутантах по гену *At4g20990*, кодирующему α -КА4.

Вариант	Содержание крахмала, мг/г сырого веса
Columbia	5,57 $\pm$ 0,61
Нокаут по гену <i>At4g20990</i> (линия 9–12)	9,37 $\pm$ 0,98
Нокаут по гену <i>At4g20990</i> (линия 8–8)	14,17 $\pm$ 1,24

образом хлоропласты от действия высокого света, параллельно с увеличением ее уровня экспрессии снижался уровень экспрессии генов, кодирующих белки светособирающего комплекса [Ветошкина и др., 2013], а у мутантных по этой КА растений происходило накопление крахмала. Они превышали по весу дикий тип на 5–20 %, по-видимому, за счет значительно большего содержания крахмала (табл. 1). При выращивании мутантных растений в условиях высокой освещенности происходило снижение уровня экспрессии цитоплазматических β -КА2 и β -КА3, митохондриальной β -КА6 и α -КА2 (данные не показаны). По квантовому выходу ФС2 и фотохимическому тушению флуоресценции мутанты почти не отличались от ДТ, но коэффициент qE , характеризующий протонный градиент, у мутантов был на 30–50 % ниже на высоком свете и при 850 ppm CO_2 .

Местонахождение α -КА2 в клетке неизвестно, однако нокаутные мутанты по гену *At2g28210*, кодирующему эту КА (две линии), при высокой интенсивности света и

высокой концентрации CO_2 проявляли более низкий квантовый выход и фотохимическое тушение, чем ДТ (рис. 1А), после выхода на стационарный уровень фотосинтеза эта разница сохранялась. Коэффициент НФТ был выше у мутанта на 30–40 %, чем у ДТ за счет компонента qE , компоненты qT и qI практически не отличались от ДТ (рис. 1Б). Представленные данные, свидетельствующие об изменении важных показателей фотосинтеза у мутантных по α -КА2 растений, позволяют думать, что этот фермент расположен в хлоропласте.

Высокое содержание фермента в органелле не всегда коррелирует с его важностью: так снижение содержания самой обильной карбоангидразы β -КА1 до 1 % не привело к снижению фотосинтеза [Price et al., 1994], тогда как нокаут β -КА5, уровень экспрессии которой, по нашим предварительным данным, на три порядка ниже, приводит к сильному отставанию в росте растений (личное сообщение Д.В. Морони). Это свидетельствует о том, что β -КА5

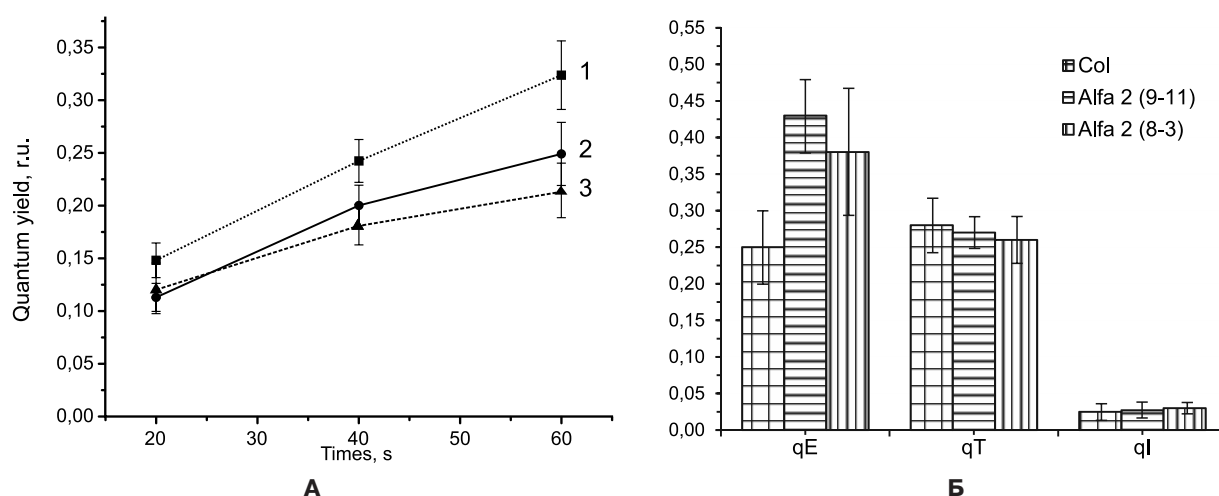


Рис. 1. Квантовый выход ФС2 (А) в первую минуту освещения и компоненты нефотохимического тушения флуоресценции (Б) на стационарном уровне фотосинтеза нокаутного мутанта по гену *At2g28210*, кодирующему α -КА2, при интенсивности действующего света 500 мкмоль квантов/м²с и концентрации CO_2 850 ppm.

является одним из ключевых ферментов и необходима для нормального физиологического развития растений. Точное местонахождение ее в структуре хлоропласта неизвестно. Нами установлено, что в люмене тилакоидов гороха [Rudenko et al., 2007] и арабидопсиса присутствует КА, принадлежащая к β -семейству, судя по действию специфических ингибиторов КА, однако, ген, кодирующий её, еще не установлен.

Присутствие значительного количества различающихся по природе и свойствам карбоангидраз в разных компонентах сложной структуры хлоропласта свидетельствует об их участии в процессе фотосинтеза. Точное их количество и роль каждой из них еще предстоит выяснить.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-32323.

ЛИТЕРАТУРА

- Ветошкина Д.В., Борисова-Мубаракшина М.М., Руденко Н.Н., Иванов Б.Н. Влияние освещенности растений на уровень экспрессии генов белков светособирающего комплекса и карбоангидразы // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2013. – Т. 12. – С. 21–23.
- Игнатова Л.К., Руденко Н.Н., Христин М.С., Иванов Б.Н. Гетерогенная природа карбоангидразной активности тилакоидных мембран // Биохимия. – 2006. – Т. 71. – С. 651–659.
- Fabre N., Reiter I.M., Becuwe-Linkan N., Genty B., Rumeau D. Characterization and expression analysis of genes encoding α and β carbonic anhydrases in *Arabidopsis* // Plant, Cell and Environment. – 2007. – Vol. 30. – P. 617–629.
- Friso G., Giacomelli L., Ytterberg A.J., Peltier J.-B., Rudella A., Sun Q., van Wijk K.J. In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions and a plastid proteome database // The Plant Cell. – 2004. – Vol. 16. – P. 478–499.
- Lu Y.-K., Stemler A.J. Extrinsic photosystem II carbonic anhydrase in maize mesophyll chloroplasts // Plant Physiology. – 2002. – Vol. 128. – P. 643–649.
- Пронина Н.А., Аллахвердиев С.И., Куприянова Е.В., Клячко-Гурвич Г.Л., Климов В.В. Локализация карбоангидразы в субхлоропластных частицах гороха // Физиология растений. – 2002. – Т. 49. – С. 341–349.
- Price G.D., von Cammerer S., Evans J.R., Yu J.-W., Lloide J., Oja V., Kell P., Harrison K., Gallagher A., Badger M.R. Specific reduction of chloroplast carbonic anhydrase activity by anti-sense RNA in transgenic tobacco plants has a minor effect on photosynthetic CO_2 assimilation // Planta. – 1994. – Vol. 193. – P. 331–340.
- Rudenko N.N., Ignatova L.K., Ivanov B.N. Multiple sources of carbonic anhydrases activity in pea thylakoids: soluble and membrane-bound forms // Photosynthesis Research. – 2007. – Vol. 91. – P. 81–89.
- Villarejo A., Buren S., Larsson S., Dejardin A., Monne M., Rudhe C. et al. Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast // Nature Cell Biology. – 2005. – Vol. 7. – P. 1224–1231.

ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ МЕХАНИЗМОВ ИМПОРТА ДНК РАЗНОЙ ДЛИНЫ И СТРУКТУРЫ В МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ

Е.С. Клименко¹, П.А. Гребнев², А. Дитриш³, Ю.М. Константинов¹, М.В. Кулинченко¹

¹ ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

² ФГБОУ ВПО Иркутский государственный университет, Иркутск

³ Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, CNRS, Strasbourg, France
e-mail: katia.klimenko@gmail.com

Общеизвестно, что горизонтальный перенос генов играет важную роль в эволюции геномов бактерий. Однако позднее установлено, что горизонтальный перенос генов достаточно активно происходит и в растительных митохондриях (частота этого процесса намного выше по сравнению с другими органеллами у высших эукариот) [Mower et al., 2012]. Нами предположено, что в горизонтальном переносе генов в митохондри

активную роль играет обнаруженный нами природный механизм активного поглощения ДНК митохондриями («импорт ДНК»), который распространен не только у растений, но также у млекопитающих и дрожжей [Koulintchenko et al., 2003; Koulintchenko et al., 2006; Weber-Lotfi et al., 2009]. Важно подчеркнуть, что импортируемая в митохондрии ДНК может транскрибироваться, подвергаться репарации и интегрироваться в

геном, т.е. активно включается в генетические процессы в этих органеллах [Boesch et al., 2009, 2010; Mileshina et al., 2011]. Наличие феномена «природной компетентности митохондрий к поглощению чужеродной ДНК» у высших организмов в случае детального выяснения его молекулярно-биологических механизмов открывает широкие перспективы его использования не только в фундаментальных исследованиях по выяснению функций митохондриального генома у организмов разных видов, но также (что не менее важно) в исследованиях по биотехнологии (клонирование целевых генов в митохондриях) и биомедицине (генотерапия митохондриальных болезней и болезней

пожилого возраста). Реализации этих планов мешает отсутствие эффективных подходов для целенаправленной доставки ДНК в митохондрии организмов разных видов в условиях *in vivo*. Целью настоящего проекта является выяснение молекулярной природы факторов, обеспечивающих специфичность импорта ДНК в митохондрии. Одним из факторов, определяющих, по всей вероятности, механизм переноса ДНК в митохондрии, является длина молекулы нуклеиновой кислоты. К числу других важных факторов следует отнести, по-видимому, наличие структурных особенностей молекулы ДНК в виде концевых инвертированных повторов (характерная особенность строения линей-

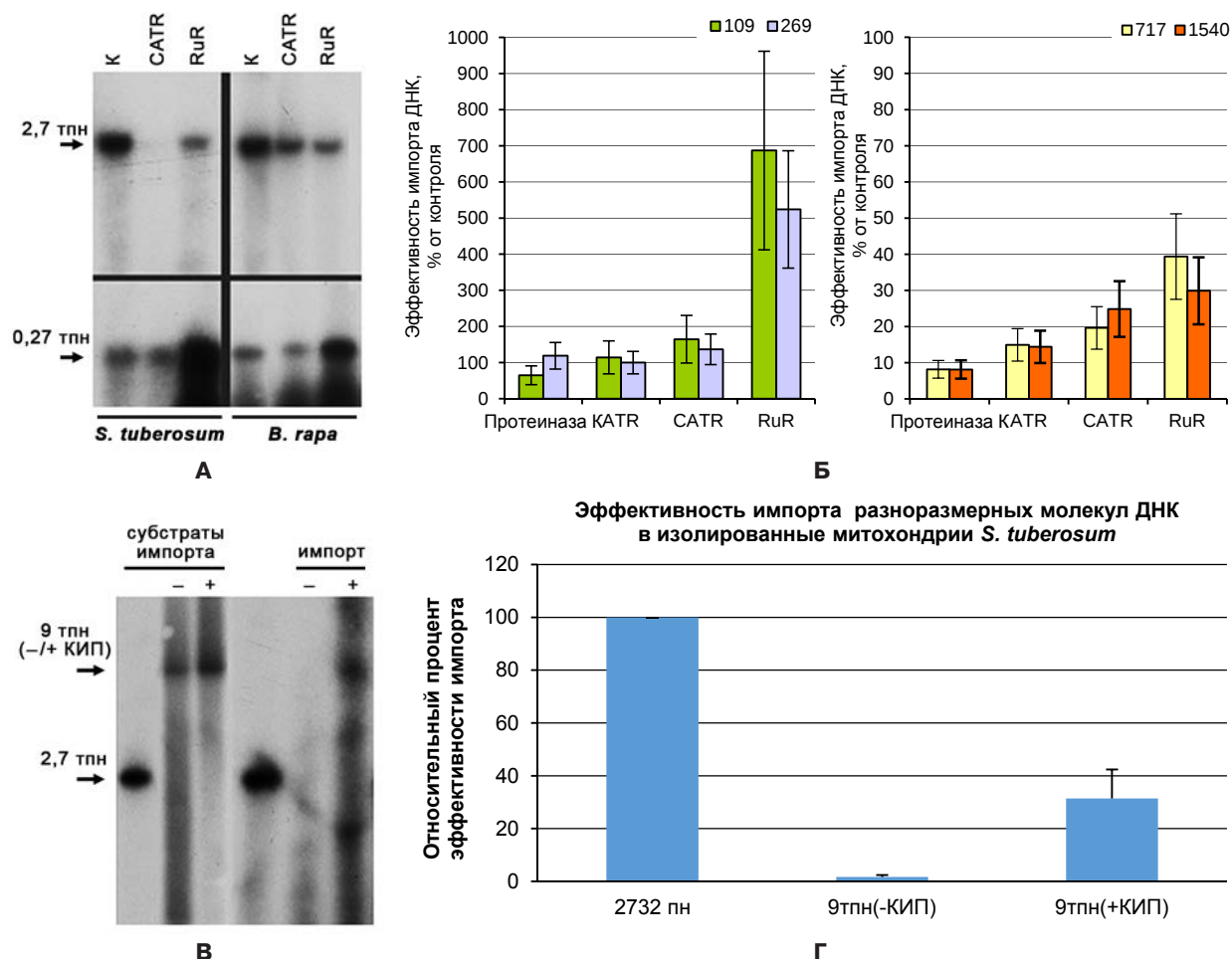


Рис. 1. Импорт ДНК разной длины в изолированные митохондрии *S. tuberosum* (А и Б) и *B. rapa* (А) имеет различающуюся чувствительность к влиянию ингибиторов митохондриальных мембранных переносчиков (VDAC и АНТ). В качестве субстратов ДНК использовали фрагменты ДНК длиной 109 (Б), 269 (А и Б), 717 (Б), 1589 (Б) и 2732 п.н. (А). Анализ эффективности импорта проводили с использованием радиоактивно меченых субстратов (А) или методом ПЦР в реальном времени (Б). Использованные ингибиторы: для АНТ – карбоксиатрактилозид, 10 μ M (KA, CATR), атрактилозид, 100 μ M (ATR), для VDAC – рутений красный, 5 μ M (KR, RuR); Н – необработанные митохондрии. В и Г. Митохондрии, изолированные из клубней картофеля, импортируют ДНК длиной 9 т.п.н., имеющую в структуре своей последовательности концевые инвертированные повторы (КИП) линейной митохондриальной плазмиды 11,6 т.п.н из *B. napus*. Анализ эффективности импорта проводили с использованием радиоактивно меченых субстратов.

ных митохондриальных плазмид некоторых видов растений [Handa H. 2008]) и «видоспецифического характера импорта», природа которого до настоящего времени остается неизвестной. Исследования эффективности импорта ДНК разной длины и структуры в различных условиях были проведены с использованием митохондрий из клубней картофеля (*Solanum tuberosum*) и корнеплодов репы (*Brassica rapa*). Анализ импорта ДНК небольшой (100–300 п.н.) средней (700–6000 п.н.) и большой (от 9000 п.н.) длины проводили с использованием двух методов детекции: ПЦР в реальном времени [Клименко и др., 2011] и радиоактивно меченой ДНК [Koulintchenko et al., 2003].

Получены данные в поддержку гипотезы о существовании множественных путей переноса ДНК разной длины в митохондрии растительного происхождения. Один из этих путей трансмембранного переноса проявляет сходство с таковым, показанным ранее для импорта ДНК длиной от 1 до 3 т.п.н., и происходит с участием классических митохондриальных переносчиков: (1) зависимого от напряжения анионного канала (VDAC, от «voltage dependent anion channel») наружной мембраны и (2) переносчика адениновых нуклеотидов (АНТ) внутренней мембраны митохондрий (рис. 1А, Б). ДНК небольшой и средней длины импортируется в митохондрии частично перекрывающимися, но не совпадающими полностью путями. Транспорт в митохондрии коротких ДНК может эффективно осуществляться с участием ряда альтернативных белковых переносчиков и/или мембранных каналов, природа которых остается пока неизвестной.

Установлено, что растительные митохондрии обладают специфичным транспортным механизмом в отношении длинных молекул ДНК (от 9 т.п.н. и выше), обладающих такими структурными особенностями как наличие концевых инвертированных повторов (327 п.н.) плазмиды 11,6 т.п.н. из *B. napus*. Митохондрии *B. rapa* импортируют длинные молекулы (порядка 9 т.п.н.), различающиеся в своей структуре наличием или отсутствием концевых инвертированных повторов, с большей эффективностью по

сравнению с митохондриями *S. tuberosum*. При этом импорт молекул большой длины в митохондрии обоих растительных видов имеет сходную специфичность: наличие на концах фрагментов молекул концевых инвертированных повторов обуславливает большую эффективность импорта ДНК (рис. 1В, Г)).

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 12-00-01027 и 12-04-01400, а также междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 59.

ЛИТЕРАТУРА

Клименко Е.С., Милейко В.А., Морозкин Е.С., Лактионов П.П., Константинов Ю.М. Характеристика импорта и экспорта ДНК в митохондрии картофеля (*Solanum tuberosum*) с использованием метода количественной ПЦР // Биологические мембраны. – 2011. – Т. 28, № 3. – С. 199–205.

Boesch P., Ibrahim N., Paulus F., Cosset A., Tarasenko V., Dietrich A. Plant mitochondria possess a short-patch base excision DNA repair pathway // Nucleic Acids Res. – 2009. – Vol. 37, No 17. – P. 5690–5700.

Boesch P., Ibrahim N., Dietrich A., Lightowers R.N. Membrane association of mitochondrial DNA facilitates base excision repair in mammalian mitochondria // Nucleic Acids Res. – 2010. – Vol. 38, No 5. – P. 1478–1488.

Handa H. Linear plasmids in plant mitochondria: Peaceful coexistence or malicious invasions? // Mitochondrion. – 2008. – Vol. 8. – P. 15–25.

Koulintchenko M., Konstantinov Y., Dietrich A. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex // EMBO J. – 2003. – Vol. 22, No 6. – P. 1245–1254.

Koulintchenko M., Temperley R.J., Mason P.A., Dietrich A., Lightowers R.N. Natural competence of mammalian mitochondria allows the molecular investigation of mitochondrial gene expression // Human Mol. Genetics. – 2006. – Vol. 1, No 1. – P. 143–154.

Mileshina D., Koulintchenko M., Konstantinov Yu., Dietrich A. Transfection of plant mitochondria and in organello gene integration // Nucleic Acid Res. – 2011. – Vol. 39, No17. – P. 115.

Mower J.P., Jain K., Hepburn N.J. The role of horizontal transfer in shaping the plant mitochondrial genome // Advances in Botanical Res. – 2012. – Vol. 63. – P. 41–64.

Weber-Lotfi F., Ibrahim N., Boesch P., Paulus F., Cosset A., Konstantinov Y., Lightowers R.N., Dietrich A. Developing a genetic approach to investigate the mechanism of mitochondrial competence for DNA import // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – Vol. 1787. – P. 320–327.

**РОЛЬ РЕТРОГРАДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ
ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*****Д.А. Кнорре¹, А.Н. Зырина², М.И. Сорокин², С.С. Соколов¹, Ф.Ф. Северин¹**¹ НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва
e-mail: knorre@belozersky.msu.ru² Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

Митохондрии играют важную роль в регуляции жизненного цикла дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Так, например, функциональные митохондрии необходимы для инициации редукционного деления [Jambhekar & Amon, 2008]. В условиях дефицита источника азота дрожжи способны к дифференцировке: они образуют удлинённые клетки – псевдогифы. Этот процесс позволяет данному виду грибов эффективнее пролиферировать на бедных средах и удерживаться на субстрате (см. [Dickinson, 2008]). Из литературы известно, что клетки, лишённые митохондриальной ДНК (мтДНК), не способны образовывать псевдогифы [Kang & Jiang, 2005]. В таких клетках постоянно включена система ретроградной сигнализации, передающая информацию в ядро от митохондрий с низким трансмембранным потенциалом. Однако полное отключение системы ретроградной сигнализации предотвращает образование псевдогиф в других экспериментальных системах [Chen et al., 2010]. Эти данные на первый взгляд противоречат друг другу, так как предполагают одновременное наличие энергизованных митохондрий и активированную систему ретроградной сигнализации. Мы предположили, что такая ситуация все же возможна, если в клетке одновременно есть митохондрии как с высоким, так и с низким трансмембранным потенциалом.

Для того, чтобы проверить эту гипотезу, мы исследовали образование псевдогиф под действием сивушных спиртов, имитирующих условия дефицита азота. Добавление разобщителя FCCP предотвращало образование псевдогиф клетками дрожжей контрольного лабораторного штамма W303. Однако снижение уровня экспрессии гена протеинфосфатазы *MIN1* восстанавливало способность клеток образовывать псевдо-

гифы в присутствии FCCP, а также в отсутствие мтДНК. Результат этого эксперимента говорит о том, что действие FCCP связано не столько с истощением энергетических ресурсов клетки, сколько с ролью митохондрий в каскаде внутриклеточной сигнализации, включающей в себя также белок Mif1p. Таким образом, мы показали, что митохондрии с высоким значением трансмембранного потенциала необходимы для образования псевдогиф. Далее мы подтвердили, что инактивация генов, отвечающих за ретроградную сигнализацию (*RTG1*, *RTG2* или *RTG3*), подавляет образование псевдогиф в наших экспериментальных условиях [Starovoytova et al., 2013]. Это указывало на то, что наличие дезэнергизованных митохондрий также является сигналом для начала псевдомицелиального роста. На заключительном этапе работы мы окрасили клетки дрожжей, образовавшие псевдогифы, флуоресцентным зондом JC-1 и обнаружили субпопуляцию гиперполяризованных митохондрий, в апикальных участках гиф. Таким образом было показано, что удлинённые клетки содержат две фракции митохондрий, различающиеся по значению трансмембранного потенциала, и наличие обеих фракций необходимо для дифференцировки. Мы предполагаем, что взаимодействие двух сигнальных каскадов, один из которых запускается в митохондриях с высоким $\Delta\Psi$, а другой – в митохондриях с низким $\Delta\Psi$, включает особый режим функционирования клетки. Интересно, что в процессе репликативного старения дрожжей также возрастает вероятность появления одновременно энергизованных и дезэнергизованных митохондрий в пределах одной клетки [Sorokin et al., 2014].

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-5802.2013.4 и гранта РФФИ 12-04-01412-а.

ЛИТЕРАТУРА

- Chen S., Liu D., Finley R.L.J., Greenberg M.L. Loss of mitochondrial DNA in the yeast cardiolipin synthase *crd1* mutant leads to up-regulation of the protein kinase Swe1p that regulates the G2/M transition // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 285. – P. 10397–10407.
- Dickinson J.R. Filament formation in *Saccharomyces cerevisiae* // Folia Microbiol (Praha). – 2008. – Vol. 53. – P. 3–14.
- Jambhekar A., Amon A. Control of meiosis by respiration // Curr Biol. – 2008. – Vol. 18 – P. 969–975.
- Kang C.M., Jiang Y.W. Genome-wide survey of non-essential genes required for slowed DNA synthesis-induced filamentous growth in yeast // Yeast. – 2005. – Vol. 22. – P. 79–90.
- Sorokin M.I., Knorre D.A., Severin F.F. Early manifestations of replicative aging in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Microbial Cell. – Vol. 1 – P. 37–42.
- Starovoytova A.N., Sorokin M.I., Sokolov S.S., Severin F.F., Knorre D.A. Mitochondrial signaling in *Saccharomyces cerevisiae* pseudohyphae formation induced by butanol // FEMS Yeast Res. – 2013. – Vol. 13. – P. 367–374.

РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССОВ АКТИВНОГО ТРАНСПОРТА ВАКУОЛЯРНОЙ МЕМБРАНЫ

Е.В. Колесникова, Н.В. Озолина

ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
e-mail: yatakol@mail.ru

Для поддержания высокого осмотического потенциала вакуоли в нее должны постоянно поступать соли и/или другие соединения. Транспорт этих соединений происходит активно, за счет электрохимического градиента протонов на тонопласте. Градиент ионов H^+ в свою очередь создается и поддерживается за счет работы двух электрогенных протонных насосов: H^+ -АТФазы V-типа (от англ. vacuolar) и H^+ -ПФазы, которые являются главными компонентами вакуолярной мембраны в клетках растений [Silva, Geros, 2009].

H^+ -АТФаза представляет собой самый большой комплекс на тонопласте с молекулярной массой около 750 кДа, который состоит из двух структурных доменов: мембраносвязанного домена V_0 и растворимого домена V_1 . Комплекс V_0 отвечает за перенос протонов через мембрану, а V_1 предназначен для гидролиза АТФ [Maeshima, 2001], который осуществляется в каталитических сайтах, локализованных на поверхности А и В субъединиц [Toei et al., 2010]. Специфическими ингибиторами для H^+ -АТФазы являются нитрат, конкамицин С [Maeshima, 2001], бафиломицин A_1 [Youmans, Barry, 2001].

Другая протонная помпа H^+ -ПФаза использует неорганический пирофосфат в качестве источника энергии, и выглядит как одиночный полипептид с 14 трансмембран-

ными доменами. В среднем молекулярная масса этого транспортера от 80 до 81 кДа, но в зависимости от объекта исследований может изменяться. В результате сравнения H^+ -ПФазы разнообразных организмов, выявили три высококонсервативных участка CS1, CS2 и CS3 [Maeshima, 2001]. CS1 участок включает последовательность DVGADLVGKVE, необходимую для гидролиза субстрата [Takasu et al., 1997] и играет критическую роль в каталитической функции вместе с CS1 и CS2. Кроме того, шестой трансмембранный домен является наиболее значимым в вакуолярной H^+ -ПФазе, вероятно, опосредуя протонный транспорт и поддержание ферментативной структуры [Pan et al., 2011].

При сравнении двух протонных помп, стало известно, что активность H^+ -ПФазы выше в молодых тканях, в то время как активность H^+ -АТФазы остаётся сравнительно постоянной в периоды роста и развития до достижения взрослого состояния [Martinoia et al., 2007]. Кроме общей локализации H^+ -ПФазы и H^+ -АТФазы на тонопласте обе протонные помпы имеют одинаковый оптимум рН 8.0 и обе Mg^{2+} -зависимы. В отличие от H^+ -АТФазы, H^+ -ПФаза стимулируется катионами и нитратом [Wagner, Milready, 1983]. Вместе с H^+ -АТФазой H^+ -ПФаза катализирует электрогенный транспорт протона из цитозоля в ва-

куоль, создавая на тонопласте электрический (от +20 до +50 мВ) и химический (от 1,5 до 4,5) потенциалы, необходимые для вторичного активного транспорта ионов и органических молекул в режиме унипорта или антипорта.

Регулирование активности протонных помп тонопласта может происходить как на транскрипционном уровне (на уровне экспрессии соответствующих генов), так и на посттрансляционном уровне (регулирование активаторами/ингибиторами, фосфорилирование и дефосфорилирование, обращенная диссоциация каталитического и мембраносвязанного доменов, обращенное окисление цистеина, регулирование сигнальными молекулами и т.д.) [Merzendorfer et al., 1997].

В растениях транскрипционная регуляция является важным механизмом для регулирования активности протонных помп. Стимулирование экспрессии генов H^+ -АТФазы и H^+ -ПФазы является хорошо известной реакцией к стрессовым условиям [Kabała et al., 2014]. Кроме того, отмечается регуляция экспрессии H^+ -АТФазы фитогормонами [Cooley et al., 1999].

Одним из самых хорошо охарактеризованных механизмов посттрансляционной регуляции H^+ -АТФазы является разобщение V_1 и V_0 доменов, что приводит к подавлению гидролиза АТФ и прекращению транспорта протонов через мембрану [Qi et al., 2007]. В настоящее время этот регуляторный механизм интенсивно изучается [Beuvenbach, Wiczorek, 2006]. Свободные гидрофильные домены (V_1) не могут самостоятельно осуществлять гидролиз АТФ [Puorolo et al., 1992]. А свободные гидрофобные домены (V_0) не могут функционировать как переносчики протонов через тонопласт [Zhang et al., 1992]. Кроме того, важную роль в контроле диссоциации H^+ -АТФазы *in vivo* оказывает внутриклеточное окружение [Qi, Forgas, 2007]. Вероятно, обратимая диссоциация регулирует активность H^+ -АТФазы и в других системах [Toei et al., 2010].

В литературе встречаются сообщения и о том, что активность H^+ -АТФазы тонопласта может регулироваться низкомолекулярными белками [Stevens, Forgas, 1997]. Однако роль этих регуляторных белков *in vivo* пока не изучена.

Регулирование активности H^+ -АТФазы модификацией редокс-состояния фермента происходит за счет окисления и восстановления сульфгидрильных групп на субъединицах А и В [Feng, Forgas, 1994]. Вместе с тем, при работе с микросомальной фракцией мембран, выделенной из листьев ячменя, было установлено, что в редокс-зависимое изменение активности вакуолярной H^+ -АТФазы вовлечены не только дисульфидные связи, субъединицы А, но и сульфгидрильные группы, обнаруженные на субъединице Е [Tavakoli et al., 2001].

Работы последних лет показали существенную роль мембранных липидов в регуляции активности протонных помп тонопласта [Лось, 2007]. Липидная регуляция мембранных ферментов осуществляется посредством изменения физических свойств бислоя или пограничного слоя фосфолипидов, непосредственно окружающих молекулу интегральных белков, что приводит к перестройке их конформации и сказывается на активности [Палладина, 1999]. О важной роли липидов говорит и тот факт, что делипидированная очищенная H^+ -АТФаза была практически не способна к гидролизу АТФ [Yamaguchi, Kasamo, 2001].

Не менее важный механизм регулирования активности H^+ -АТФазы заключается в изменении связывания транспорта протонов и гидролиза АТФ. Разнообразные изменения, включающие ограниченный протеолиз, повышенную концентрацию АТФ и мутации ряда субъединиц, включая субъединицу D и негомологичные области субъединицы А, являются причиной частичного несвязывания транспорта протонов с гидролизом АТФ. Активность протонных помп также регулируется взаимодействием с активаторными и ингибиторными белками.

В последнее время наиболее изучаемым способом регуляции активности транспортных систем является регуляция сигнальными молекулами. Механизмы воздействия этих молекул на растительные организмы начали изучать сравнительно недавно, но уже стало понятно, что эти соединения обладают ключевыми функциями в физиологии растений, принимающие активное

участие в росте и развитии корней, а также модулирующие многие адаптивные реакции к абиотическим стрессам [García-Mata and Lamattina, 2013]. Наиболее исследованной молекулой в этом плане является оксид азота, поскольку он был первым на пути выяснения роли сигнальных молекул в биологических объектах. Что же касается исследований по изучению роли сигнальных молекул в механизмах регуляции мембранных транспортных систем, связанных с переносом протонов, то таких работ сравнительно немного [He et al., 2006; Dawood et al., 2012]. Являются ли эти молекулы регуляторами активности протон-транспортирующих систем на тонопласте до сих пор не известно. Однако было установлено, что монооксид азота увеличивает активность протонных помп тонопласта в условиях солевого стресса [Shi et al., 2007].

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 14-04-31080.

ЛИТЕРАТУРА

- Лось Д.А. Восприятие стрессовых сигналов биологическими мембранами. В кн.: Проблемы регуляции в биологических системах. Биофизические аспекты. Ред. А.Б. Рубин – М.–Ижевск: НИЦ «Регуляторная и хаотичная динамика», Институт компьютерных исследований, 2007. – С. 329–360.
- Палладина Т.А. Роль протонных насосов плазмалеммы и тонопласта в устойчивости растений к солевому стрессу // Успехи современной биологии. – 1999. – 119. – С. 451–461.
- Beyenbach K.W., Wieczorek H. The V-type H⁺-ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation // Journal of experimental biology. – 2006. – Vol. 209. – P. 577–589.
- Cooley M.B., Yang H., Dahal P., Mella R.A., Downie A.B., Haigh A.M., Bradford K.J. Vacuolar H⁺-ATPase is expressed in response to gibberellin during tomato seed germination // Plant Physiology. – 1999. – Vol. 121. – P. 1339–1348.
- Dawood M., Cao F., Jahangir M.M., Zhang G., Wu F. Alleviation of aluminum toxicity by hydrogen sulfide is related to elevated ATPase, and suppressed aluminum uptake and oxidative stress in barley // J Hazard Mater. – 2012. – Vol. 30. – P. 209–210.
- Feng Y., Forgac M. Inhibition of vacuolar H⁺-ATPase by disulfide bond formation between cysteine 254 and cysteine 532 in subunit A // Journal of Biological Chemistry. – 1994. – Vol. 259. – P. 13224–13230.
- García-Mata C., Lamattina L. Gasotransmitters are emerging as new guard cell signaling molecules and regulators of leaf gas exchange // Plant Sci. – 2013. – Vol. 201–202. – P. 66–73.
- He H.Y., He L.F., Li X.F., Gu M.H. Effects of sodium nitroprusside on mitochondrial function of rye and wheat root tip under aluminum stress // Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao. – 2006. – Vol. 32, No 2. – P. 239–244.
- Jefferies K.C., Forgac M. Subunit H of the V-ATPase Inhibits ATP Hydrolysis by the Free V1 Domain by Interaction with the Rotary Subunit F // J. Biol. Chem. – 2008. – Vol. 283, No 8. – P. 4512–4519.
- Kabata K., Janicka-Russak M., Reda M., Migocka M. Transcriptional regulation of the V-ATPase subunit c and V-PPase isoforms in Cucumis sativus under heavy metal stress // Physiologia Plantarum. – 2014. – Vol. 150. – P. 32–45.
- Maeshima M. Tonoplast transporters: organization and function // Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 2001. – Vol. 52. – P. 469–497.
- Martinoia E., Maeshima M., Neuhaus H.E. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism // Journal of Experimental Botany. – 2007. – Vol. 58, No 1. – P. 83–102.
- Merzendorfer H., Graf R., Huss M., Hapvey W.R., Wieczorek H. Regulation of proton-translocating V-ATPases // The Journal of Experimental Biology. – 1997. – Vol. 200. – P. 225–235.
- Pan Y.J., Lee C.H., Hsu S.H., Huang Y.T., Lee C.H., Liu T.H., Chen Y.W., Lin S.M., Pan R.L. The transmembrane domain 6 of vacuolar H⁺-pyrophosphatase mediates protein targeting and proton transport // Biochim Biophys. – 2011. – Vol. 1807, No 1. – P. 59–67.
- Puopolo K., Szczekan M., Magner R., Forgac M. The 40 kDa subunit enhances but is not required for activity of the coated vesicle proton pump // J. Biol. Chem. – 1992. – Vol. 267. – P. 5171–5176.
- Qi J., Wang Y., Forgac M. The vacuolar (H⁺)-ATPase: subunit arrangement and in vivo regulation // Bioenerg Biomembr. – 2007. – Vol. 39. – P. 423–426.
- Qi J., Forgac M. Cellular environment is important in controlling V-ATPase dissociation and its dependence on activity // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282, No 34. – P. 24743–24751.
- Shi Q., Ding F., Wang X., Wei M. Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress // Plant Physiol. Biochem. – 2007. – Vol. 45. – P. 542–550.
- Silva P., Geros H. Regulation by salt of vacuolar H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase activities and Na⁺/H⁺ exchange // Plant Signaling & Behavior. – 2009. – Vol. 4, No 8. – P. 718–726.
- Stevens T., Forgac M. Structure, function and regulation of the vacuolar H⁺-ATPase // Cell Dev. Biol. – 1997. – Vol. 13. – P. 779–808.
- Takasu A., Nakanishi Y., Yamauchi T., Maeshima M. Analysis of the substrate binding site and carboxyl terminal region of vacuolar H⁺-pyrophosphatase of Mung bean with peptide antibodies // J. Biochem. – 1997. – Vol. 122. – P. 883–889.
- Tavakoli N., Kluge C., Gollmack D., Mimura T., Dietz K.J. Reversible redox control of plant vacuolar H⁺-ATPase activity related to disulfide bridge formation

in subunit E as well as subunit A // *Plant J.* – 2001. – Vol. 28, No 1. – P. 28–51.

Toei M., Saum R., Forgac M. Regulation and isoform function of the V-ATPases // *Biochemistry.* – 2010. – Vol. 49. – P. 4715–4723.

Wagner G., Milready P. Characterization and solubilization of nucleotide-specific, Mg^{2+} -ATPase and Mg^{2+} -pyrophosphatase of tonoplast // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1983. – Vol. 728, No 2. – P. 267–280.

Youmans S., Barry C. Bafilomycin A1 at nanomolar concentrations saturably inhibit portion of turtle bladder acidification current // *J. Exp. Biol.* – 2001. – Vol. 16. – P. 2911–2919.

Yamaguchi M., Kasamo K. Modulation of activity of purified tonoplast H^+ -ATPase by tonoplast glycolipids prepared from cultured rice (*Oryza sativa* L. var. Boro) cells // *Plant Cell Physiol.* – 2001. – Vol. 42. – P. 516–523.

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА СОСТАВ И АКТИВНОСТЬ СУПЕРКОМПЛЕКСОВ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА

М.А. Кондакова, И.В. Уколова, А.И. Антипина, Г.Б. Боровский, В.К. Войников

ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
e-mail: irina@sifibr.irk.ru

В настоящее время при помощи современных методов электронной микроскопии, одномерного и двумерного гелевого нативного фореа в градиентном полиакриламидном геле (Blue Native PAGE), масс-спектрометрического анализа (LC-MS/MS, ESI, MALDI и др.) активно изучается организация и состав суперкомплексов дыхательной цепи митохондрий животных, грибов, бактерий, растений. В результате этих исследований и по мере накопления данных представление об организации электрон-транспортной цепи митохондрий эволюционировало от модели «текучего состояния» (fluid state model), согласно которой дыхательные комплексы располагаются отдельно друг от друга, и перенос электронов в такой ситуации возможен только в результате их случайных взаимодействий, до современной интегральной объединенной модели.

Согласно последней модели, в дыхательной цепи митохондрий присутствуют как отдельные комплексы, так и ассоциации этих комплексов [Welchen et al., 2011; Lenaz et Genova, 2012]. По последним данным, их стехиометрия может быть различной и представлена комбинацией либо 2-х комплексов, например, I и III или III и IV (I + III₂, I₂ + III₂, III₂ + IV₁₋₂), либо различными соотношениями 3-х комплексов – I, III и IV (I + III₂ + IV₁₋₄), так называемыми респирасомами,

и даже целыми дыхательными участками, мегакомплексами, представляющими ассоциации суперкомплексов. Однако помимо объединения дыхательных комплексов в суперкомплексы значительная популяция комплексов I и IV присутствует во внутренней митохондриальной мембране в виде отдельных монокомплексов [Ramirez-Aguilar et al., 2011]. Согласно литературным данным, комплекс II в большинстве исследуемых объектов не ассоциирует с другими комплексами, хотя отмечены случаи, когда ассоциация наблюдалась [Acin-Perez et al., 2008]. Помимо представленных выше комбинаций дыхательных комплексов в митохондриях присутствуют и другие надмолекулярные структуры, такие как ассоциации димерных АТФ-синтетаз (комплекс V₂) [Bultema et al., 2009], формиат-дегидрогеназный комплекс, ТОМ комплекс, прохитиновый комплекс и др. [Klodmann et al., 2011]. Совершенно очевидно, что ассоциация дыхательных комплексов в суперкомплексы и мегакомплексы открывает новые свойства дыхательной цепи митохондрий по сравнению с отдельно функционирующими монокомплексами.

В настоящее время активно изучается организация и состав суперкомплексов в различных видах и даже на разных фазах развития растения, но есть пока единичные исследования по влиянию

факторов среды на их состав [Peters et al., 2012; Ramirez-Aguilar et al., 2011]. Так, показано, что при гипоксии и низком pH происходит диссоциация I комплекса из суперкомплексов, что, по предположению авторов, может являться регуляторным механизмом вовлечения альтернативных НАДН-дегидрогеназ, которые, как известно, активируются низкими значениями pH [Ramirez-Aguilar et al., 2011]. Вместе с тем данные по влиянию гипотермии на состав и активность суперкомплексов в растительных митохондриях, и тем более по защите этих структур стрессовыми белками пока отсутствуют. В связи с этим было интересно изучить влияние низких температур на состав и активность надмолекулярных структур, а также выявить возможную ассоциацию с ними стрессовых белков, таких как дегидрины.

Работа по изучению влияния гипотермии на состав и активность суперкомплексов дыхательной цепи растительных митохондрий проводилась на этиолированных проростках гороха, которые подвергались различным низкотемпературным обработкам, – закаливанию, мягкому и жесткому стрессам. Согласно тесту на выживаемость растений после промораживания при -7°C , закалывание проростков гороха приводило к увеличению устойчивости, в то время как мягкий и жесткий стрессы существенно снижали процент выживших растений.

Одномерный BN-PAGE и последующее гистохимическое окрашивание ферментативной активности отдельных комплексов в геле показали, что дыхательная цепь митохондрий проростков гороха представлена главным образом 5-ю суперкомплексами, а именно: мажорным суперкомплексом, состоящим из одной копии I комплекса и димерного III комплекса; 3-х суперкомплексов, представляющих собой респирасомы, которые включают I, III и IV комплексы, а так же 1 мегакомплекс с предполагаемой молекулярной массой более 10 000 кДа. Последний включает в себя II, III и IV комплексы дыхательной цепи. Этот факт интересен, так как согласно литературным данным II комплекс чаще всего присутствует во внутренней митохондриальной мембране

в виде отдельного комплекса и есть лишь единичные упоминания о том, что он может входить в состав суперкомплексов. Помимо вышеупомянутых суперкомплексов, дыхательные комплексы I, II и IV присутствуют в виде отдельных монокомплексов.

Показано, что низкотемпературный стресс не приводит к формированию новых надмолекулярных структур дыхательной цепи, но вызывает снижение активности I-го и IV-го комплексов в составе некоторых высокомолекулярных суперкомплексов. Интересно, что под действием повреждающих отрицательных и низких положительных температур происходит диссоциация I-го комплекса из суперкомплексов и увеличение активности отдельного I монокомплекса. Данные гистохимического окрашивания предполагают также, что закалывание и мягкий стресс приводят к повышению НАДН-дегидрогеназной активности ротеон-резистентных альтернативных НАДН-дегидрогеназ.

Для изучения механизмов защиты и стабилизации надмолекулярных структур дыхательной цепи митохондрий, исследовали возможную ассоциацию дегидринов с суперкомплексами ЭТЦ этих органелл в условиях гипотермии различной интенсивности. По данным SDS-PAGE и иммуноблоттинга с антителами на дегидрины, а также по результатам дот-блоттинга с нативными митохондриальными белками было установлено, что под действием низких температур в проростках гороха происходит накопление дегидринов в митохондриях, причем максимальное увеличение содержания происходит в период холодового закалывания. По результатам BN-PAGE с последующим иммуноблоттингом с антителами на дегидрины, нами впервые была обнаружена ассоциация дегидринов с суперкомплексами дыхательной цепи митохондрий, причем во время закалывания происходило более активное связывание дегидринов с этими комплексами. Мы предполагаем, что дегидрины могут стабилизировать надмолекулярные структуры дыхательной цепи.

В целом полученные данные говорят о сложной картине изменений в составе и

активности суперкомплексов дыхательной цепи митохондрий растений при низкой температуре. Их характер связан с тем, находится ли растение в температурной зоне адаптации или в зоне повреждения и гибели. Вместе с тем, требует дальнейшего изучения вопрос о том, какой вклад в термостойкость растения вносит образование и дезагрегация суперкомплексов дыхательной цепи митохондрий.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-01233 а.

ЛИТЕРАТУРА

- Acin-Perez R., Fernandez-Silva P., Peleato M.L., Perez-Martos A., Enriquez J.A. Respiratory active mitochondrial supercomplexes // *Mol. Cell.* – 2008. – Vol. 32. – P. 529–539.
- Bultema J.B., Braun H.P., Boekema E.J., Kouril R. Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2009. – Vol. 1787. – P. 60–67.
- Klodmann J., Senkler M., Rode C., Braun H.-P. Defining the Protein Complex Proteome of Plant Mitochondria // *Plant Physiology.* – 2011. – Vol. 157. – P. 587–598.
- Lenaz G., Genova M.L. Supramolecular Organisation of the Mitochondrial Respiratory Chain: A New Challenge for the Mechanism and Control of Oxidative Phosphorylation // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* – 2012. – Vol. 748. – P. 107–144.
- Peters K., Nießen M., Peterhansel C., Spath B., Holzle A., Binder S., Marchfelder A., Braun H.P. Complex I-complex II ratio strongly differs in various organs of *Arabidopsis thaliana* // *Plant. Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 79. – P. 273–284.
- Ramirez-Aguilar S.J., Keuthe M., Rocha M., Fedyaev V.V., Kramp K., Gupta K.J., Rasmusson A.G., Schulze W.X., van Dongen J.T. The composition of plant mitochondrial supercomplexes changes with oxygen availability // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, No 50. – P. 43045–43053.
- Welchen E., Klodmann J., Braun H.-P. Biogenesis and Supramolecular Organization of the Oxidative Phosphorylation System in Plants // *Plant Mitochondria, Advances in Plant Biology.* – 2010. – Vol. 1. – P. 325–355.

ТЕБУКОНАЗОЛ ВЛИЯЕТ НА ДЫХАТЕЛЬНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ МИТОХОНДРИЙ И УСТОЙЧИВОСТЬ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ К НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

А.В. Корсукова^{1,2}, О.И. Грабельных^{1,2}, О.А. Боровик¹, Н.В. Дорофеев¹, Т.П. Побежимова¹, В.К. Войников¹

¹ ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

² ФГБОУ ВПО Иркутский государственный университет, Иркутск
e-mail: avkorsukova@gmail.com

В настоящее время в сельском хозяйстве активно используются системные фунгициды – ингибиторы C14-деметилирования. Среди фунгицидов этого класса ведущие позиции занимают азолы, содержащие в своей молекуле триазольную или имидазольную группы. Наибольшее применение получили производные триазола – ингибиторы синтеза стероидов, стеролов и терпеноидов [Попов и др., 2003]. Производные триазола – ретарданты, которые не только подавляют биосинтез гиббереллина, но и увеличивают содержание эндогенной абсцизовой кислоты, оказывая, таким образом, ингибирующее влияние на прорастание семян и рост осевых органов растений, имеют ростостимулирующее

действие на корневую систему, ускоряют цветение, улучшают качество плодов и повышают устойчивость растений к стрессам. Триазолы характеризуются низкой фитотоксичностью по сравнению с другими ретардантами, эффективны в малых дозах, экологически безопасны [Прусакова, Чижова, 1998]. Одним из представителей соединений триазолиевого ряда является тебуконазол (1-(4-хлорфенил)-4,4-диметил-3-(1H-1,2,4-триазол-1-илметил)-3-пентанол). Тебуконазол, обладающий профилактическим и лечебным системным действием, эффективен против всех видов ржавчины зерновых культур, подавляет головнёвые грибы, возбудителей корневых гнилей и плесневения семян [Попов и др.,

2003]. Учитывая, что производные триазола обладают ярко выраженным ретардантным действием, можно предположить, что эти вещества будут влиять на холодо- и зимостойкость растений.

Начальный рост и развитие ранних яровых культур обычно проходит в неблагоприятных температурных условиях. В период их прорастания и всходов температура в почве и окружающем воздухе находится на уровне 5–10 °С с частыми понижениями в ночное время до отрицательных значений. Это одна из главных причин низкой полевой всхожести зерновых культур, что особенно характерно для условий Сибири. Формирование и поддержание устойчивости растений к низким температурам сопряжено с различными физиолого-биохимическими изменениями, в том числе изменением интенсивности дыхания. В связи с этим целью данной работы явилось изучение влияния тебуконазола на дыхание митохондрий и параметры устойчивости проростков яровой пшеницы к низкой температуре. В экспериментах был использован тебуконазол (Tebuconazol PESTANAL, Sigma-Aldrich, Германия) и тебуконазол-содержащий препарат «Бункер» (содержание тебуконазола в нём равно 60 г/л), который является системным фунгицидом профилактического и лечебного действия для протравливания семян зерновых культур против семенной и почвенной инфекции (производитель ЗАО Фирма «Август»).

В работе использовали этиолированные проростки яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Новосибирская 29), выращенные при 26 °С. Холодовое закаливание 3-х суточных проростков проводили в течение 7 суток при +2 °С. Обработку семян «Бункером» (0,5–5 литров на тонну, л/т) проводили непосредственно перед их посевом (замачиванием). О влиянии «Бункера» судили по его действию на длину и жизнеспособность клеток coleoptилей. Для определения жизнеспособности клеток использовали метод восстановления 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида. Для характеристики угнетения ростовых процессов определяли степень ингибирования роста 5-суточных этиолированных про-

ростков яровой пшеницы, выращенных из обработанных «Бункером» семян, по сравнению с проростками из необработанных семян. Скорость поглощения кислорода отрезками coleoptилей и изолированными митохондриями регистрировали полярографически с платиновым электродом Кларка закрытого типа в ячейке объёмом 1,4 мл при температуре 26 °С на полярографе ОН-105 (Венгрия). Для оценки устойчивости к низкой температуре холодозакалённые растения промораживали при температуре –7 °С в течение суток, после чего температуру повышали до +2 °С (на 24 часа), затем растения отращивали в течение 3-х суток при 26 °С. Количество выживших после промораживания растений выражали в процентах от общего числа проростков. В незакалённых и закалённых проростках до и после промораживания с помощью антронового реактива определяли содержание растворимых сахаров.

Изучение влияния тебуконазола на окислительную и фосфорилирующую активность митохондрий, изолированных из 3-х суточных этиолированных проростков яровой пшеницы, выявило его явный концентрационно-зависимый ингибирующий эффект на дыхание митохондрий и сопряжение в них процессов окисления и фосфорилирования. При использовании малата в качестве субстрата окисления (транспорт электронов начинается с комплекса I дыхательной цепи) ингибирование скорости фосфорилирующего дыхания (состояние 3) составило 7, 16, 41 и 66 % при концентрациях тебуконазола 29, 87, 203 и 348 мкМ, соответственно. Ингибирование скорости фосфорилирующего дыхания при неизменной скорости нефосфорилирующего дыхания (состояние 4) сопровождалось снижением коэффициента дыхательного контроля и отношения АДФ:О.

При изучении жизнеспособности клеток coleoptилей 5-суточных этиолированных проростков яровой пшеницы, выращенных из необработанных семян («контроль»), и проростков, выращенных из семян, обработанных «Бункером» различной концентрации (1,5, 3, 4 и 5 л/т), было показано, что обработка семян «Бункером» не приводит к

гибели клеток. При этом проявлялось концентрационно-зависимое ингибирующее действие «Бункера» на длину coleoptилей. Так, в концентрации 0,5 л/т «Бункер» ингибировал длину coleoptилей на 28 %, а в концентрации 5 л/т – на 56 %.

Обработка семян «Бункером» приводила к увеличению содержания растворимых сахаров в побегах. Как известно, растворимые сахара обладают криопротекторной функцией, они предотвращают или резко замедляют рост кристаллов льда при действии отрицательных температур на растения. Содержание сахаров увеличивается при холодовом закаливании, при котором возрастает устойчивость растений к неблагоприятной низкой температуре и другим стрессовым факторам [Туманов, 1979]. Содержание сахаров в побегах незакалённых проростков, выращенных из семян обработанных «Бункером» в концентрации 1,5 л/т, на 3 сутки роста было больше на 20 % и на 10-е сутки роста – на 53 % по сравнению с их содержанием в побегах проростков из необработанных «Бункером» семян. Увеличение содержания сахаров на 3 сутки роста в незакалённых проростках яровой пшеницы, выращенных из обработанных «Бункером» семян, может объясняться меньшим расходом сахаров на дыхание, о чём свидетельствует сниженная на 12 % скорость поглощения кислорода клетками coleoptилей проростков из обработанных «Бункером» семян. После холодового закаливания содержание сахаров было также больше (на 19 %) в побегах проростков яровой пшеницы, выращенных из обработанных «Бункером» семян, хотя при этом наблюдалось увеличение общей скорости поглощения кислорода (на 14 %) клетками coleoptилей. Содержание сахаров в холодозакалённых проростках, выращенных из обработанных «Бункером» семян, оставалось повышенным (на 6 %), по сравнению с проростками из необработанных «Бункером» семян, и после промораживания растений. Обработка семян «Бункером» в

концентрации 1,5 л/т, которая сопровождалась увеличением содержания сахаров в тканях побегов проростков, приводила к повышению выживаемости холодозакалённых проростков яровой пшеницы после промораживания (-7°C , 24 часа). Так, выживаемость проростков из семян обработанных «Бункером», составляла 84,5 %, тогда как из необработанных семян – 30 %.

Таким образом, в ходе проведённых исследований установлено, что обработка семян яровой пшеницы протравителем семян «Бункер», содержащим в качестве действующего вещества тебуконазол, не приводит к гибели клеток растений, оказывает ростингибирующее действие на побеги, сопровождается накоплением сахаров в тканях побегов и снижением их расходования после промораживания и повышает устойчивость проростков к низкой температуре. При этом тебуконазол, добавленный в суспензию изолированных митохондрий, концентрационно-зависимым образом снижает скорость окисления малата при фосфорилировании АДФ и не влияет на скорость дыхания в отсутствии АДФ. Можно заключить, что тебуконазол влияет на дыхательный метаболизм растений, а обработка семян тебуконазол-содержащим препаратом эффективно повышает устойчивость этиолированных проростков яровой пшеницы к низкой температуре. Требуется выяснение механизма действия тебуконазола на клеточном уровне, а также проведение исследований на озимых зерновых.

ЛИТЕРАТУРА

- Попов С.Я., Дорожкина Л.А., Калинин В.А. Основы химической защиты растений: учебники и учебные пособия для высших учебных заведений / под ред. проф. С.Я. Попова. – М.: Арт-Лион, 2003. – 208 с.
- Прусакова Л.Д., Чижова С.И. Применение производных триазола в растениеводстве // Агрохимия. – 1998. – № 10. – С. 37–44.
- Туманов И.И. Физиология закаливания и морозостойкости растений / отв. ред. академик М.Х. Чайлахян. – М.: Наука, 1979. – 352 с.

**ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ,
ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ РНК-ПОЛИМЕРАЗУ RPO1MP
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ И ХЛОРОПЛАСТНОЙ АДРЕСАЦИИ**

В.И. Тарасенко, А.И. Катышев, В.В. Черникова, М.В. Кулинченко, Ю.М. Константинов

ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
e-mail: mk100171@yahoo.com

У ряда двудольных растений транскрипцию генов органелл осуществляют три РНК полимеразы, RpoTm, RpoTmr и RpoTr. Одна из полимераз, RpoTmr, участвует в контроле экспрессии как митохондриальных, так и хлоропластных генов. В работах ряда авторов показано, что инсерционный мутант арабидопсиса по гену *rpoTmr*, кодирующему РНК полимеразу двойной направленности RpoTmr, характеризуется рядом отличных от растений дикого типа фенотипических и молекулярно-биологических признаков [Baba et al., 2004; Kuhn et al., 2009]. При этом остаются неизвестными индивидуальные различия в функционировании РНК полимеразы RpoTmr в митохондриях и хлоропластах. Изучение особенностей функционирования РНК полимеразы RpoTmr представляется интересным не только для фундаментальных, но и прикладных исследований, например при разработке подходов для трансформации растительных митохондрий *in vivo*. Целью работы было проведение исследования, направленного на выяснение того, может ли потенциальная коррекция дефекта отсутствия полимеразы именно в митохондриях обусловить преимущество для отбора потенциальных митохондриальных трансформантов при использовании мутантной линии RpoTmr в качестве реципиента генетических конструкций, содержащих селективный ген *rpoTmr* дикого типа. Нашими задачами в этом направлении являлось: (i) получение трансгенных растений на основе мутантной линии арабидопсиса RpoTmr и дикого типа с использованием генетических конструкций, имеющих в своем составе последовательности, кодирующие полимеразу RpoTmr с различной цитоплазматической адресацией, митохондриальной или хлоропластной; (ii) фенотипическая и моле-

кулярно-биологическая характеристика трансформантов.

В ходе выполнения поставленных задач получены следующие результаты.

I. Созданы генетические конструкции, содержащие фрагменты кДНК, кодирующие участки генов арабидопсиса, а именно, транзитные пептиды митохондриальной RpoTm или хлоропластной RpoTr и каталитическую часть RpoTmr, не содержащую последовательности транзитного пептида. Данные генетические конструкции, клонированные последовательно в клетках *E. coli* и *A. tumefaciens*, были использованы для проведения агробактериальной трансформации соцветий арабидопсиса [Clough et al., 1998] двух линий, дикого типа и мутанта по гену *rpoTmr*. Для каждого из перечисленных вариантов путем отбора на канамицине с последующей пересадкой на почву получено несколько независимых трансформантов, давших начало отдельным линиям тестируемых растений. Были получены следующие варианты трансгенных растений: (1) растения дикого типа, экспрессирующие рекомбинантный белок RpoTmr, направляемый в митохондрии (Col-M); (2) растения дикого типа с хлоропластной адресацией рекомбинантного RpoTmr (Col-P); (3) растения мутантной линии RpoTmr с инактивированным геном собственной РНК-полимеразы RpoTmr, экспрессирующие рекомбинантный белок, направляемый в митохондрии (Tmr-M); (4) растения мутантной линии RpoTmr с хлоропластной адресацией рекомбинантного белка (Tmr-P).

II. Изучение фенотипа мутантных растений, экспрессирующих RpoTmr хлоропластной локализации, не выявило различий между ними и исходными мутантами с полной инактивацией RpoTmr. Все фенотипические особенности, характерные

для мутантов RpoTmr – замедленный рост, позднее цветение, темно-зеленая окраска и «волнистость» листьев – проявлялись также и в мутантах, экспрессирующих белок, направляемый в хлоропласты. Таким образом, восстановление активности РНК-полимеразы RpoTmr в хлоропластах, по-видимому, не приводит к компенсации дефекта. Растения RpoTmr, экспрессирующие RpoTmr митохондриальной адресации, напротив, проявляли фенотип, в большей степени напоминающий растения дикого

типа (рис. 1А). Листья этих растений имели гладкую поверхность, а скорость роста и время начала цветения были сопоставимы с таковыми у растений дикого типа. С помощью обратнo-транскриптазной ПЦР в реальном времени с праймерами, распознающими 3'-область последовательности гена, кодирующей белок RpoTmr, был определен уровень транскриптов этого гена в нескольких линиях вариантов Col-M, Col-P, Tmr-M и Tmr-P. Качественный анализ экспрессии трансгенов с помощью ОТ-ПЦР показал, что

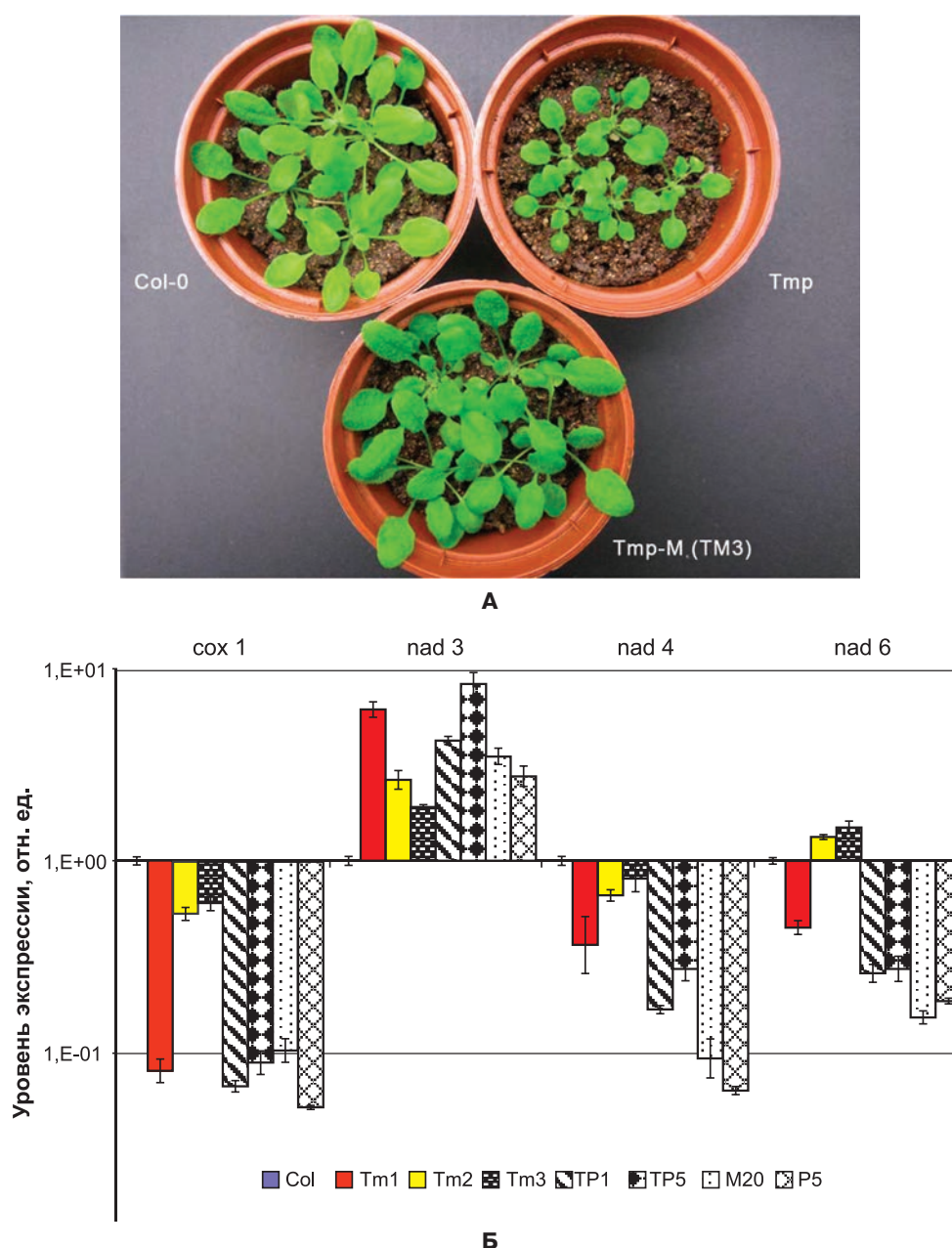


Рис. 1. **А** – фенотипический облик трансформантов Tmr-M (линия TM3) в сравнении с мутантными растениями RpoTmr (Tmr) и растениями дикого типа (Col-0). **Б** – содержание транскриптов нескольких митохондриальных генов в растениях дикого типа (Col-0), мутантах RpoTmr (Tmr) и полученных трансгенных растениях вариантов Tmr-M (линии TM2 и TM3) и Tmr-P (линии TP1 и TP5).

во всех растениях, для которых показано наличие встройки Т-ДНК, наблюдается транскрипция целевого гена. Хотя уровень экспрессии транскрипта RpoTmr различался между растениями индивидуальных линий, однако во всех тестируемых трансгенных растениях он был существенно выше, чем в растениях дикого типа. Несмотря на предварительность данных, можно сделать вывод о том, что конструкции экспрессируют на достаточно высоком уровне полноразмерный транскрипт гена RpoTmr. Нами было проведено изучение экспрессии нескольких митохондриальных генов в растениях Tmr-M и Tmr-P. Ранее было показано, что в мутантах RpoTmr происходит значительное снижение содержания транскриптов одних, и напротив, возрастание содержания транскриптов других митохондриальных генов [Kuhn et al., 2009]. Уровень экспрессии этих генов может служить своего рода маркером компенсации на молекулярном уровне последствий отсутствия РНК-полимеразы RpoTmr. Проведенное нами исследование уровня транскриптов нескольких митохондриальных генов (*cox1*, *nad3*, *nad4*, *nad6*) в растениях дикого типа, мутантах RpoTmr и полученных трансгенных линиях показало, что экспрессия в мутантных растениях рекомбинантного белка RpoTmr митохондриальной (но не хлоропластной) адресации приводит к частичному восстановлению

уровня митохондриальных транскриптов, содержание которых было снижено в мутантах RpoTmr (рис. 1Б).

Полученные экспериментальные данные говорят в пользу того, что, несмотря на локализацию в двух клеточных компартментах, белок RpoTmr играет основную роль в митохондриях, а не в хлоропластах. Данный факт свидетельствуют о возможности использования растений RpoTmr и генетической конструкции, несущей ген RpoTmr, в качестве потенциальной системы для трансформации митохондриального генома.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 12-04-01027 и 12-04-01400, а также междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 59.

ЛИТЕРАТУРА

Bava K., Schmidt J., Espinosa-Ruiz A., Villarejo A., Shiina T., Gardeström P., Sane A.P., Bhalerao R.P. Organelle gene transcription and early seedling development are affected in the *rpo2* mutant of *Arabidopsis* // *The Plant Journal*. – 2004. – Vol. 38. – P. 38–48.

Clough S.J., Bent A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* // *The Plant Journal*. – 1998. – Vol. 16, No 6. – P. 735–743.

Kuhn K., Richter U., Meyer E., Delannoy E., de Longevialle A.F., O'Toole N., Börner T., Millar H., Small I., Whelan J. Phage-type RNA polymerase RPO2mr performs gene-specific transcription in mitochondria of *Arabidopsis thaliana* // *The Plant Cell*. – 2009. – Vol. 21. – P. 2762–2779.

ИНВЕРТИРОВАННЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ В МИТОХОНДРИАЛЬНОМ ГЕНОМЕ БАЙКАЛЬСКИХ ГУБОК СЕМЕЙСТВА *LUBOMIRSKIIDAE*

О.О. Майкова¹, С.И. Беликов¹, Д.Ю. Щербаков^{1,2}

¹ ФГБУН Лимнологический институт СО РАН, Иркутск
e-mail: maikova@lin.irk.ru

² ФГБОУ ВПО Иркутский государственный университет, Иркутск
e-mail: dysh007@gmail.com

Сравнительный анализ последовательностей полных митохондриальных геномов 4 видов байкальских эндемичных губок семейства *Lubomirskiidae* и космополитного вида *E. muelleri* позволил выявить интересную особенность в структуре мтДНК

байкальских губок [Lavrov, 2010; Lavrov et al., 2012]. Среди имеющихся в базе данных митохондриальных геномов губок представители семейства *Lubomirskiidae* обладают самым протяженным геномом. Связано это с появлением в межгенных областях

множества инвертированных повторов, способных формировать вторичные структуры (шпильки). Копийность отдельных шпилек достигает 40-50 раз. Обнаружены интересные особенности в появлении ряда таких структур. Например, H3 и H4 структуры всегда встречаются вместе и напоминают двойные шпилечные элементы (рис. 1), обнаруженные Пакуином и соавторами [Paquin et. al., 2000] в мтДНК грибов *Allomyces macrogynus*, которые описаны как мобильные элементы.

Показано, что некоторые двойные вторичные элементы представляют собой псевдоузлы. Потенциальные вторичные структуры псевдоузлов, расположенных между генами тРНК-Туг и тРНК-Цепоказаны на рисунке 2.

Известно, что устойчивые двойные шпилечные структуры могут играть важную роль в рекомбинации ДНК. Показано, что инвертированные последовательности в мтДНК динофлагеллят способствуют внутримолекулярной рекомбинации, в результате чего происходят перестановки фрагментов последовательностей белок-кодирующих генов [Nash et. al., 2007; Nash et. al., 2008]. Схожая ситуация наблюдается в мтДНК растений, у которых изменения в

организации митохондриального генома происходит в результате внутримолекулярной и межмолекулярной рекомбинации с помощью инвертированных повторов [Alverson et. al., 2010].

Наличие псевдоузлов в мтДНК байкальских губок свидетельствует о высокой вероятности внутримолекулярной рекомбинации, как возможного механизма распространения инвертированных последовательностей в межгенных областях.

Все эти наблюдения позволяют сделать предположение, что в появлении и распространении отдельных шпилек и их кластеров могут быть вовлечены различные механизмы. По результатам анализа распределения шпилечных структур, можно сказать, что эти элементы являются динамичными, быстро эволюционирующими. Показано, что эти последовательности могут представлять собой мобильные элементы. Возможным механизмом распространения инвертированных последовательностей может являться внутримолекулярная рекомбинация с помощью псевдоузлов.

В результате статистического анализа нуклеотидных последовательностей мтДНК четырех видов байкальских губок показана

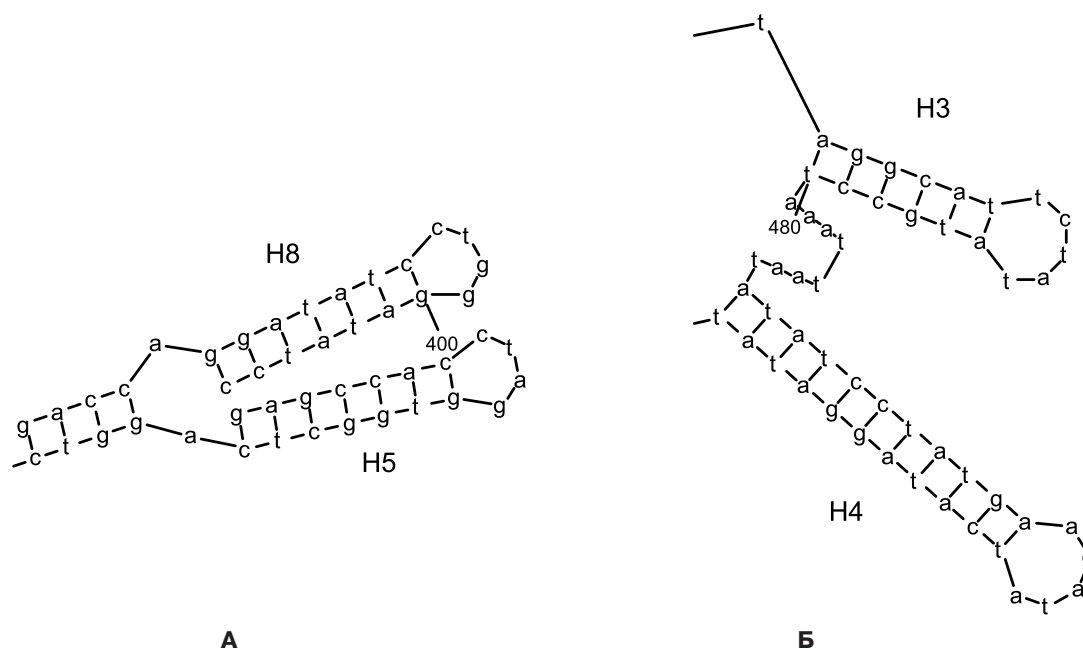


Рис. 1. Фрагмент вторичной структуры некодирующей мтДНК *L. baicalensis*: **А** – возможная, но не консервативная среди мтДНК байкальских губок комбинация шпилек H8 и H5, **Б** – консервативная среди мтДНК байкальских губок вторичная структура, состоящая из шпилек H3 и H4.

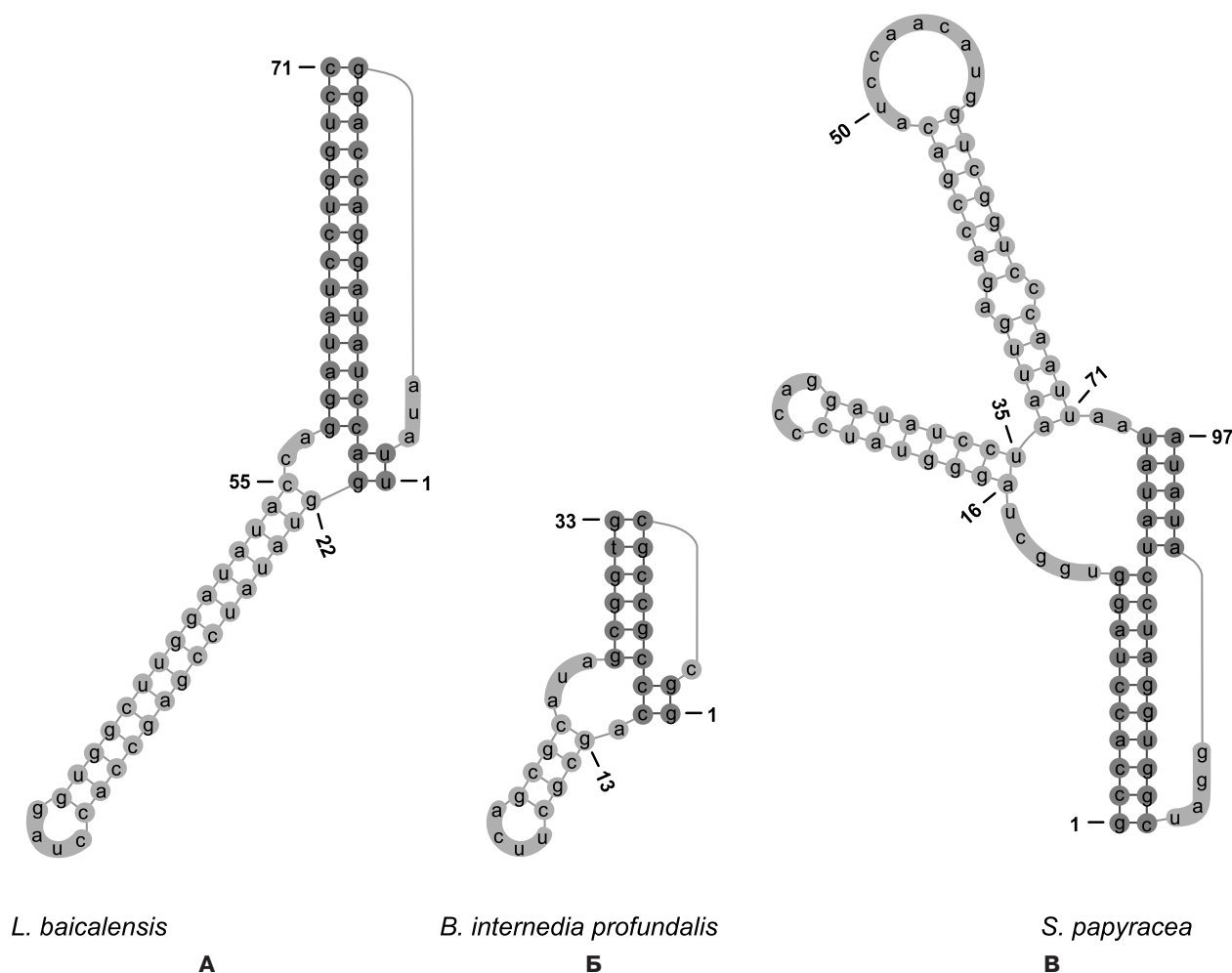


Рис. 2. Конформации потенциальных псевдоузлов: **A** – у *L. baicalensis*, **Б** – у *B. internedia profundalis*, **В** – у *S. papyracea*.

высокая вероятность возможного рекомбинационного процесса. Коэффициент Phi равен 0,0693 или 6,9 %, то есть вероятность того, что рекомбинации между исследуемыми последовательностями не существует, составляет 6,9 %. На основе нуклеотидных последовательностей полных митохондриальных геномов байкальских губок и *E. muelleri* был проведен статистический анализ вероятности рекомбинации с помощью программы TOPALi кватерным методом (без аутгруппы).

С большой долей вероятности показано, что между четырьмя исследуемыми байкальскими видами губок происходил ассиметричный горизонтальный перенос фрагментов мтДНК.

В результате анализа вероятности обмена генетическим материалом между видами байкальских губок показано, что из мтДНК

вида *B. internedia profundalis* с большой долей вероятности был возможен горизонтальный перенос фрагментов некодирующей ДНК в митохондриальные геномы видов *S. papyracea* и *R. echinata*.

ЛИТЕРАТУРА

- Alverson A.J., Wei X.X., Rice D.W., Stern D.B., Barry K., Palmer J.D. Insights into the evolution of mitochondrial genome size from complete sequences of *Citrullus lanatus* and *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) // Mol. Biol. Evol. – 2010. – Vol. 2, N 6. – P. 1436–1448.
- Lavrov D.V. Rapid proliferation of repetitive palindromic elements in mtDNA of the endemic Baikalian sponge *Lubomirskia baicalensis* // Mol. Biol. Evol. – 2010. – Vol. 27, № 4. – P. 757–760.
- Lavrov D.V., Maikova O.O., Pett W., Belikov S.I. Small inverted repeats drive mitochondrial genome evolution in Lake Baikal sponges // GENE. – 2012. – Vol. 505. – P. 91–99.
- Nash E.A., Barbrook A.C., Edwards-Stuart R.K., Bernhardt K., Howe C.J., Nisbet R.E.R. Organization

of the mitochondrial genome in the Dinoflagellate *Amphidinium carterae* // Mol. Biol. Evol. – 2007. – Vol. 24. – P. 1528–1536.

Nash E.A., Nisbet R.E.R., Barbrook A.C., Howe C.J. Dinoflagellates: a mitochondrial genome all at

sea // Trends in genetics. – 2008. – Vol. 24, N 7. – P. 328–335.

Paquin B., Laforest M.-J., Lang B.F. Double-hairpin elements in the mitochondrial DNA of *Allomyces*: evidence for mobility // Mol. Biol. Evol. – 2000. – Vol. 17, N 11. – P. 1760–1768.

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА И АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ВЫСВОБОЖДАЕМЫХ ПОСЛЕ КИСЛОТНОГО ГИДРОЛИЗА ИЗ ВАКУОЛЯРНОГО СОКА СТОЛОВОЙ СВЕКЛЫ (*BETA VULGARIS* L.)

Л.Е. Макарова, Н.В. Озолина, Е.В. Колесникова, Л.В. Дударева

ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

Вакуолярный сок может содержать значительное количество связанных фенольных соединений (ФС), в том числе и обладающих высокой антиоксидантной активностью. Эти соединения могут представлять существенный интерес с точки зрения стабилизации окислительных процессов. Для выяснения всего потенциала антиоксидантной активности фенольных соединений вакуолярного сока необходимо перед фракционированием вакуолярного сока провести гидролиз. В связи с этим целью нашей работы была сравнительная оценка антиоксидантных свойств трёх фенолсодержащих экстрактов из вакуолярного сока корнеплодов столовой свёклы, подвергнутого кислотному гидролизу, и получение данных, указывающих на роль в свободно-радикальных реакциях присутствующих в экстрактах ароматических соединений.

Вакуолярный сок получали из фракции изолированных вакуолей, выделенных по методу [Салаяев и др., 1981]. Фракцию изолированных вакуолей выделяли из корнеплодов столовой свёклы (*Beta vulgaris* L.) сорта Бордо, находящихся на стадии покоя.

Фенольные соединения, извлекаемые этилацетатом, вошли в два разных экстракта, обозначенных нами как «экстракт I» и «экстракт II». В экстракте I оказались ФС, которые извлекли из этилацетата в 5% водный раствор NaHCO_3 , затем из содового раствора, подкисленного при помощи 4н HCl до pH 3,0–4,0, еще раз экстрагировали эти-

лацетатом. Неперешедшая из этилацетата в раствор NaHCO_3 группа ФС оказалась в экстракте II. Из полученных выше описанным образом этилацетатных экстрактов удалили этилацетат путем упаривания его в токе холодного воздуха и остатки перерастворили в небольших объемах 96% этанола. Экстракт III, полученный при использовании н-бутанола в качестве экстрагента, также упаривали в токе холодного воздуха, удалив из него н-бутанол, и остаток перерастворили в 96% этаноле. Радикалскавенгирующую активность фенолсодержащих экстрактов определяли с использованием 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила (ДФПГ) по прописи из работы [Georgiev et al., 2010]. Выявления фенольных анти- и прооксидантов хроматографическим методом. [Максимов и др., 1985].

Общее количество ФС, извлеченных из вакуолярного сока после гидролиза кислотой, составляло немного более 1,2 % от массы сухих веществ, присутствующих в соке. В полученных экстрактах процентное содержание ФС от массы сухих веществ выше: в экстракте I ФС составляли $7,2 \pm 0,09$ %, в экстракте II – $6,7 \pm 0,34$ % и в экстракте III – $3,78 \pm 0,04$ %. ВЭЖХ-анализ показал различия в составе фенольных компонентов изучаемых экстрактов.

В наших экспериментах максимальное содержание ФС и антиоксидантная активность оказались у экстракта, полученного по схеме экстракции: этилацетат→5%

NaHCO₃ → этилацетат. Присутствие ФС в зонах анти- и прооксидантной активности, установленных после разделения компонентов экстракта на ТСХ, позволяет предположить участие этих веществ в ингибировании и стимулировании окисления β-каротина. Методами ВЭЖХ-анализа, хроматографии на бумаге с проведением качественных реакций с реагентами на ФС было установлено присутствие соединений фенольной природы в зонах, проявивших активность в свободнорадикальных реакциях. Следовательно, показано, что роль ФС в полученных нами экстрактах может быть двойной, но их активность в свободнорадикальных процессах несомненна. В числе активных веществ могут быть не только ФС, но и присутствующие в экстрактах аминокислоты, которые также являются эффективными природными антиоксидантами [Штаркман, 2008].

Результаты проведенных исследований позволили подтвердить участие присутствующих в экстрактах фенольных соединений в свободнорадикальных реакциях и

отработать способ получения экстрактов вакуолярного сока, обладающих наибольшей антиоксидантной активностью с целью их использования в качестве биологически активных добавок.

ЛИТЕРАТУРА

Максимов О.Б., Ребачук Н.М., Богуславская Л.Б. Скрининг для обнаружения антиоксидантной активности в экстрактах из растений // Раст. ресурсы. – 1985. – Т. 21. – С. 216–220.

Салеев Р.К., Кузеванов В.Я., Хантагаев С.Б., Копытчук В.Н. Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток растений // Физиология растений. – 1981. – Т. 28. – С. 1295–1305.

Штаркман И.Н., Гудков С.В., Черников А.В., Брусков В.И. Влияние аминокислот на образование перекиси водорода и гидроксильных радикалов в воде и 8-оксогуанина в ДНК при воздействии рентгеновского излучения // Биохимия. – 2008. – Т. 73. – С. 576–586.

Georgiev V.G., Weber J., Kneschke E.-M., Denev P.N., Bley T., Pavlov A.I. Antioxidant Activity and Phenolic Content of Betalain Extracts from Intact Plants and Hairy Root Cultures of Red Beetroot *Beta vulgaris* cv. Detroit Dark Red // Plant Foods Hum Nutr. – 2010. – Vol. 65. – P. 105–111.

РОЛЬ ЛИПИДОВ ТОНОПЛАСТА В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ ВАКУОЛИ

И.С. Нестеркина, Н.В. Озолина

ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
e-mail: nirinka24@mail.ru

Известно, что биологическая мембрана может содержать более ста разных типов липидных молекул. Очевидно, что липидный состав различных мембран не является случайным, однако удовлетворительного объяснения этому феномену не найдено. В настоящее время, становится все более понятным, что липиды активно участвуют в процессах, протекающих в мембранах. Так, липиды регулируют проницаемость мембран, их текучесть, обеспечивают функционирование мембраносвязанных ферментов [Ивков, Берестовский, 1982].

Как уже упоминалось выше, липидный состав мембран разнообразен его высокая вариабельность зависит от вида растения, органа и ткани, а также от типа мембран и функций выполняемых ими. Например, у

ячменя (*Hordeum vulgare* L.) в плазмалемме клеток корня количество свободных стерин-ов превышает количество фосфолипидов более чем в два раза, тогда как в листьях фосфолипидов больше, чем стерин-ов почти в 1,5 раза. В листьях шпината (*Spinacia oleracea* L.) соотношение фосфолипиды: свободные стерин-ы почти на порядок выше — 9:1. Это объясняется тем, что фосфолипиды входят в фотосинтетический аппарат растений. В основном — это фосфатидилглицерин [Полевой, 1989].

Что касается вакуолярной мембраны, то она отличается от всех других клеточных мембран большим содержанием липидов, составляющих 80 % от общего веса. Высокое содержание липидов и низкое содержание периферических белков в тонопласте объяс-

Липидный состав вакуолярных мембран (%) некоторых видов растений.

Липиды	1. Рис посевной (<i>Oryza sativa</i> L.)	2. Клен псевдоплатановый (<i>Acer pseudoplatanus</i> L.)	3. Фасоль золотистая (<i>Vigna radiata</i> L.)
Фосфолипиды	38,0	44,5	51,0
Гликолипиды	56,0	39,1	21,0
Стерины	6,0	16,4	27,9

Примечание. Цитировано по: 1 – Yamaguchi, Kasamo, 2001; 2 – Tavernier et al., 1993; 3 – Yoshida, Uemura, 1986.

няет эластичные свойства мембраны [Салеев и др., 1982]. Липидный состав тонопласта представлен в основном фосфолипидами, гликолипидами и стеринами [Yoshida, Uemura, 1986]. Их количественное содержание меняется в зависимости от вида растения (табл. 1).

В составе нейтральных липидов вакуолярной мембраны обнаружены моно-, ди- и триглицериды, стерины, эфиры стеринов и свободные углеводороды. Также присутствует небольшое количество жирных кислот и α -токоферола. В составе полярных липидов вакуолярной мембраны преобладают фосфолипиды, содержание которых видоспецифично (табл. 1). Из фосфолипидов преобладают фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин. Также обнаружены другие группы фосфолипидов: фосфатидилглицерин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, фосфатидная кислота. Количество гликолипидов и сфинголипидов в вакуолярных мембранах у многих растений меньше чем фосфолипидов. Их состав представлен в основном моногалактозилдиглицеридами, дигалактозилдиглицеридами, стерилгликозидами и гликоцерамидами [Yoshida, Uemura, 1986; Макаренко и др., 1992; Tavernier et al., 1993; Yamaguchi, Kasamo, 2001].

Известно, что липиды точнее липидный бислой необходим для поддержания оптимальной активности ряда ферментов. Важным параметром, определяющим активность большинства мембранных ферментов, безусловно, является физическое состояние бислоя. В другом случае липидный бислой играет пассивную роль в функционировании мембраносвязанных ферментов, являясь лишь средой, в которой происходит взаимодействие фермента

с субстратом. Однако оптимальное функционирование мембранных ферментов оказывается возможным только в присутствии определенных липидов. Это было доказано на примере протонной помпы тонопласта культуры клеток рис (*Oryza sativa* L.). При экзогенном добавлении фосфолипидов тонопласта активность очищенной вакуолярной H^+ -АТФазы увеличивалась, но при добавлении гликолипидов тонопласта ситуация менялась и активность H^+ -АТФазы снижалась [Yamaguchi, Kasamo, 2001].

Некоторые липиды являются биорегуляторами, наиболее изучена в этом отношении регуляторная роль фосфатидилинозитола, который в вакуолярной мембране содержится в небольшом количестве [Yoshida, Uemura, 1986; Макаренко и др., 1992; Tavernier et al., 1993; Yamaguchi, Kasamo, 2001]. Фосфатидилинозитол является субстратом для множества разнообразных сигнальных молекул – киназ, которые могут присоединить к инозитолу фосфатную группу. Кроме того, фосфатидилинозитол выполняет «якорную» функцию, например к нему через олигосахарид могут присоединяться специфические белки наружной поверхности. Так же к биоактивным липидам относятся глико-сфинголипиды. Например, гликоцерамид обеспечивает большинство реакций организма на клеточные стрессы [Hannun, Obeid, 2008; Wang, Chapman, 2013]. Как и фосфатидилинозитол гликоцерамиды содержатся в тонопласте в небольшом количестве [Yamaguchi, Kasamo, 2001].

В последние десятилетия в мембранологии и липидологии появилось новое направление – «Липидные рафты». Концепция состоит в том, что определенные

участки мембраны самоорганизованы в обогащенные холестерином «рафты», в которых липиды находятся в новом фазовом состоянии, жидкоупорядоченном, т.е. они более плотные, чем остальные области мембраны, и потому свободно дрейфуют в окружающем пространстве [Simons, Ikonen, 1997]. В настоящее время, изучение рафтов позволило по – новому взглянуть на зависимость функционирования мембранных белков от липидного состава мембран. В связи с этим, главная причина, по которой липидные рафты привлекают к себе повышенное внимание, состоит в том, что они имеют высокоспецифичный белковый состав, отвечающий за восприятие и проведение сигналов, за процесс эндоцитоза и организацию цитоскелета и т.д. [Morel et al., 2006; Lingwood, Simons, 2010]. Липидный состав рафтов представлен фитостеролами (стигмастирол, ситостерол), сфинголипидами (церамиды) и фосфолипидами (фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин) [Mongrand S et al., 2010; Плескова, 2013].

Впервые рафты на вакуолярной мембране были обнаружены нами в корнеплодах столовой свёклы (*Beta vulgaris* L.) [Ozolina et al., 2013]. Немного позже коллеги из Японии выявили рафты на тонопласте культуры клеток арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L.) [Yoshida et al., 2013]. Ими было доказано, что в рафтах содержатся белки, выполняющие основные функции тонопласта. Такие белки как V-АТФаза, транспортеры типа ABCG, ионные транспортеры, транспортеры сахара, Ca^{2+} -АТФаза. Следовательно, авторы предполагают, что рафты могут быть вовлечены в регулирование процессов мембранного транспорта или передачи сигнала через вакуолярную мембрану. Интересно, что аквапорины не обнаружены в рафтах тонопласта выделенных из клеток культуры арабидопсиса [Yoshida et al., 2013].

Таким образом, становится ясно, что липиды вакуолярной мембраны принимают активное участие в функциях выполняемых вакуолью.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 14-04-31103.

ЛИТЕРАТУРА

- Ивков В.Г., Берестовский Т.Н. Липидный бислой биологических мембран. – М.: Наука, 1982. – 224 с.
- Макаренко С.П., Коненкина Т.А., Салеев Р.К. Химический состав и структура липидов вакуолярных мембран // Биологические мембраны. – 1992. – Т. 9, № 3. – С. 290–300.
- Плескова С.Н., Пудовкина Е.Е. Морфологическая и структурная характеристика рафтов // Цитология. – 2013. – Т. 55, № 8. – С. 586–592.
- Полевой В.В. Физиология растений. – М.: Высшая школа, 1989. – 464 с.
- Yusuf A. Hannun, Lina M. Obeid. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids // Molecular Cell Biology. – 2008. – Vol. 9. – P. 139–150. doi:10.1038/nrm 2329
- Lingwood D., Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle // Science. – 2010. – Vol. 327. – P. 46–50.
- Morel J., Claverol S., Mongrand S., Furt F., Fromentin J., Bessoule J., Blein J., Simon-Plast F. Proteomics of plant detergent-resistant membranes // Mol. Cell Proteomics. – 2006. – Vol. 5, No 8. – P. 1396–1411.
- Mongrand S., Stanislas T., Bayer E.M.F., Lherminier J., Simon-Plas F. Membrane rafts in plant cells // Trends in Plant Science. – 2010. – Vol. 15, No 12. – P. 656–663.
- Ozolina N.V., Nesterkina I.S., Kolesnikova E.V., Salyaev R.K., Nurminsky V.N., Rakevich A.L., Martynovich E.F., Chernyshov M.Y. Tonoplast of *Beta vulgaris* L. contains detergent-resistant membrane microdomains // Planta. – 2013. – Vol. 237. – P. 859–871.
- Simons K., Ikonen E. Functional rafts in cell membranes // Nature. – 1997. – Vol. 387. – P. 569–571.
- Tavernier E., Lê Quốc D., Lê Quốc K. Lipid composition of the vacuolar membrane of *Acer pseudoplatanus* cultured cells // Biochim Biophys Acta. – 1993. – Vol. 1167, No 3. – P. 242–247.
- Xuemin Wang, Kent D. Chapman. Lipid signaling in plants // Front. Plant Sci. – 2013. – Vol. 4. – article 216. doi: 10.3389/fpls.2013.00216
- Yamaguchi M., Kasamo K. Modulation in the activity of purified tonoplast H⁺-ATP-ase by tonoplast glycolipids prepared from cultured rice (*Oryza sativa* L. var. Boro) cells // Plant Cell Physiol. – 2001. – Vol. 42. – P. 516–523.
- Yoshida S., Uemura M. Lipid composition of plasma membranes and tonoplast isolated from etiolated seedlings of Mung Bean // Plant Physiol. – 1986. – Vol. 82, No 3. – P. 807–812.
- Yoshida K., Ohnishi M., Fukao Y., Okazaki Y., Fujiwara M., Song C., Nakanishi Y., Saito K., Shimmen T., Suzaki T., Hayashi F., Fukaki H., Maeshima M., Mimura T. Studies on vacuolar membrane microdomains isolated from Arabidopsis suspension-cultured cells: local distribution of vacuolar membrane proteins // Plant Cell Physiol. – 2013. – Vol. 54, No 10. – P. 1571–1584.

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ БИОФИЗИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ
ТОНОПЛАСТА МЕТОДОМ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИВ.Н. Нурминский¹, Н.В. Озолина¹, И.С. Нестеркина¹, А.Л. Ракевич², А.А. Пилипченко³¹ ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
e-mail: cell@sifibr.irk.ru² Иркутский филиал ФГБУН Института лазерной физики СО РАН, Иркутск³ ФГБОУ ВПО Иркутский государственный университет, Иркутск

Режим функционирования мембраны сильно зависит от микровязкости липидного бислоя и подвижности фосфолипидных молекул в мембране [Антонов и др., 2013]. Динамическая подвижность мембранных компонентов связана с их биологическими функциями и является залогом их нормального функционирования [Болдырев и др., 2006].

Одним из способов оценки микровязкости биологических мембран является использование флуоресцентных зондов в спектроскопии или микроскопии. При этом об изменении микровязкости липидов в мембранах судят по параметрам флуоресценции липофильных зондов (например, ДФГ, ТМА-ДФГ, лаурдан и др.), включенных в липидный бислой изолированных мембран.

Липидный бислой не является просто вязкой трехмерной жидкокристаллической структурой, а представляет собой жидкую среду с низкой вязкостью, у которой состав и динамические свойства в центральной области сильно отличаются от состава и свойств периферических полярных участков [Геннис, 1997]. Часто зонды внутри мембраны имеют предпочтительную ориентацию и их движения ограничены определенными рамками. Локализация разных зондов в мембране зависит от их природы, так что, подбирая зонды различной структуры, можно получать информацию от различных участков мембран. Микровязкость мембраны можно оценить по изменениям спектров флуоресценции (в случае применения зонда лаурдан), а также по степени поляризации (Р) или анизотропии (г) флуоресцентного излучения при освещении мембраны поляризованным светом (при использовании зондов АНС, бис-АНС, ДФГ и ТМА-ДФГ и др.).

В первом случае определяют величину генерализованной поляризации (GP) флу-

оресценции зонда лаурдан. Лаурдан реагирует характерным сдвигом флуоресценции с 440 нм до 490 нм, если молекула зонда окружена молекулами воды, что имеет место в жидко-кристаллической фазе липидов, в отличие от более плотноупакованной гелевой фазы [Gaus et al., 2006]. Таким образом, по значениям GP лаурдана можно составить представление о микровязкости мембраны в гидрофильно-гидрофобной области липидного бислоя. В случае использования зондов АНС, ДФГ, ТМА-ДФГ измеряют их вращательную подвижность внутри липидной фазы мембран по поляризации флуоресценции. Для этого измеряют величину анизотропии флуоресценции зонда.

В исследовании микровязкости мембран с использованием конфокальной микроскопии возникают сложности, связанные с обработкой большого массива данных, получаемых от конфокального микроскопа. Данные представляют собой изображения, отражающие информацию об интенсивности флуоресценции или файл данных с информацией о количестве испускаемых в результате флуоресценции фотонов в каждом пикселе изображения. Для автоматизации расчетов биофизических параметров при исследовании микровязкости биологических мембран с помощью флуоресцентной микроскопии разработан программный продукт [Баранов и др., 2014].

Целью исследования явилось изучение структурных особенностей и изменений, которые происходят в липидной составляющей вакуолярной мембраны при окислительном стрессе методом конфокальной микроскопии и флуоресцентных зондов. Объектом исследования были изолированные вакуоли столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). Окислительный стресс для мембран создавали добавлением в суспензию изолирован-

ных вакуолей пероксида водорода и FeSO_4 . Фазовое состояние мембранного бислоя тонопласта было исследовано на лазерном сканирующем конфокальных микроскопах MicroTime 200 (PicoQuant GmbH) и LSM 710 (Carl Zeiss, Germany) с использованием различных липофильных зондов (лаурдан, 1-анилинонафталин-8-сульфонат (АНС), ДФГ). Кроме того, была проведена оценка влияния окислительного стресса на стабильность и барьерные свойства изолированных вакуолей методом цейтраферной компьютерной видеосъемки.

Выявлено, что вакуоли, изолированные в изотоническом растворе выделения (по отношению к клеточному соку корнеплодов), окрашиваются гетерогенно (интенсивность окрашивания варьирует в широких пределах). Кроме самой мембраны на препаратах изолированных вакуолей отчетливо видны везикулы и внутривакуолярные нити (рис. 1). Везикулярные структуры, отпочковывающиеся от вакуолярной мембраны, и нитеобразные структуры внутри вакуолей уже были обнаружены и

на других объектах [Oda et al., 2009]. Образование везикул происходит, по видимому, по типу как эндоцитоза, так и экзоцитоза (наблюдаются как внутри, так и снаружи вакуолей). Гипер- или гипоосмотические условия вызывают увеличение количества везикул, при этом часто происходит распад вакуолей на большое количество мелких везикул. Нарушения целостности мембраны не всегда приводят к распаду вакуоли. При возникновении локального дефекта мембраны вакуоль теряет внутреннее содержимое, часть внутривакуолярных нитей может выходить наружу (рис. 1), а затем место дефекта «залечивается» и вакуоль не разрушается.

В наших исследованиях было обнаружено, что длина мембранных нитей вакуолей варьирует в широких пределах и может достигать более трехсот мкм, что в несколько раз превышает средний диаметр вакуоли. На детальном изображении отчетливо видно двуслойную (трубчатую) структуру мембранных нитей. При цейтраферном сканировании было зафиксировано, что

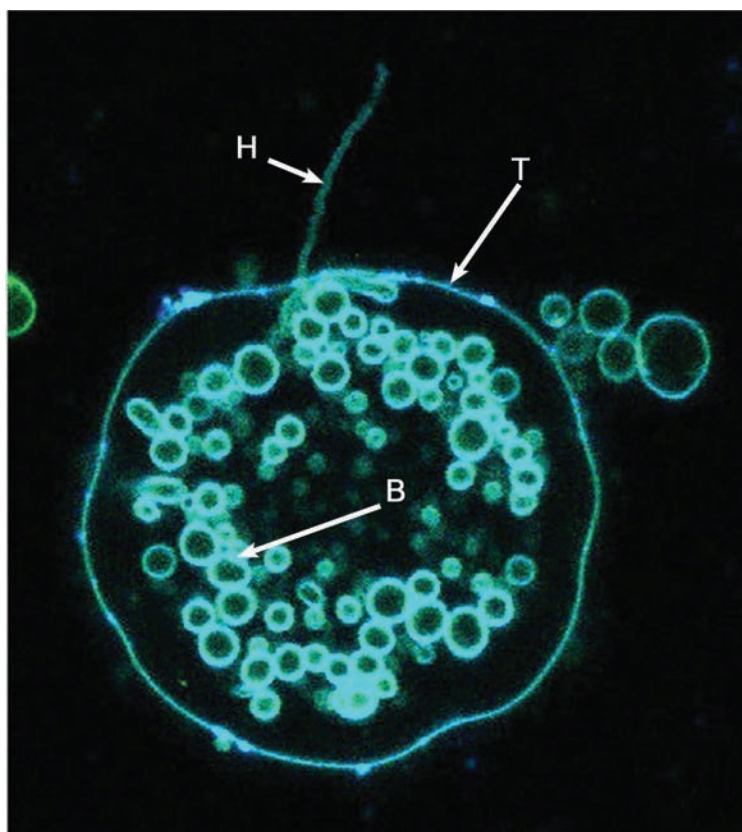


Рис. 1. Изолированные вакуоли столовой свеклы, окрашенные АНС. Т – тонопласт, В – везикулы, Н – внутривакуолярные нити.

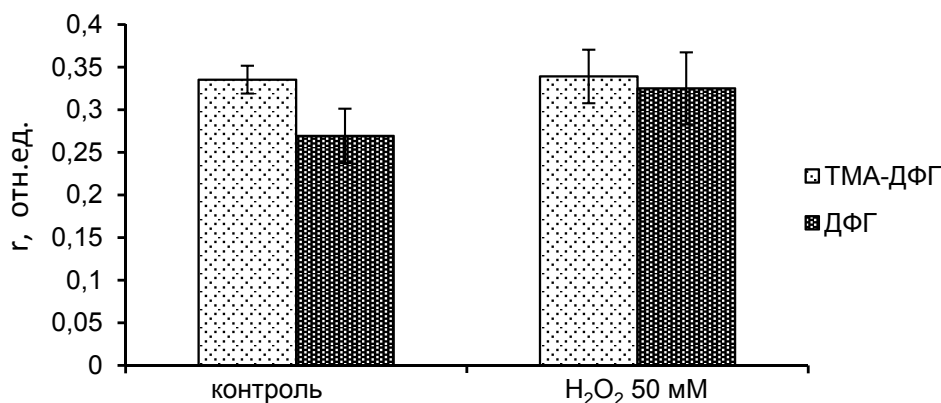


Рис. 2. Влияние окислительного стресса на микровязкость вакуолярной мембраны, оцениваемую по анизотропии флуоресценции зондов ДФГ и ТМА-ДФГ.

вакуолярные везикулы могут перемещаться по мембранным нитям. Вполне возможно, что обнаруженные вакуолярные структуры (везикулы и нити) играют важную транспортную роль в растительной клетке.

Измерение микровязкости тонопласта проводили по параметрам генерализованной поляризации (GP) флуоресцентного зонда лаурдана и по анизотропии флуоресценции зондов ДФГ и ТМА-ДФГ. Как известно зонд ДФГ обычно используют, чтобы определить микровязкость гидрофобной области мембраны. Зонд ТМА-ДФГ также равномерно распределяется в мембране, обладает интенсивной флуоресценцией, не связывается с белками и чувствителен к физическому состоянию мембран, но при этом встраивается в гидрофильной области полярных головок фосфолипидов [Kantar et al., 1999]. ТМА-ДФГ имеет амфифильный характер благодаря наличию катионного остатка.

Обнаружено, что при окислительном стрессе величина генерализованной поляризации (GP) лаурдана в тонопласте увеличивается. Также при окислительном стрессе увеличивается анизотропия флуоресценции ДФГ, однако анизотропия флуоресценции зонда ТМА-ДФГ не изменяется (рис. 2). Таким образом, при сильном окислительном воздействии (H₂O₂ 50 мМ) происходит более плотная упаковка гидрофобной области липидов тонопласта и не изменяется микровязкость гидрофильной области липидного бислоя мембраны.

Известно, что в ацильных (алифатических) остатках ненасыщенных жирных

кислот липидных молекул может быть до четырех сопряженных двойных связей. Эти жирные кислоты имеют так называемые «изломы», которые препятствуют слишком плотной упаковке молекул в мембране и делают её более рыхлой, а, следовательно, и более «текучей». При окислительном стрессе, а именно при перекисном окислении липидов (ПОЛ), наиболее уязвимы ненасыщенные жирнокислотные цепи мембранных фосфолипидов. Их атака кислородными радикалами приводит к образованию гидрофобных радикалов, взаимодействующих друг с другом. ПОЛ вызывает нарушения нормальной упаковки мембранного бислоя и грозит нарушением целостности клеточной мембраны. Возможно, что при действии перекиси водорода как сильного окислителя на вакуолярную мембрану в липидах уменьшается количество ненасыщенных связей, что способствует увеличению микровязкости тонопласта. Таким образом, окислительный стресс, как показали наши исследования, влияет на биофизические параметры вакуолярной мембраны, вызывая увеличение микровязкости липидов мембраны, что может привести к нарушению транспортных процессов на тонопласте.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 14-04-31103.

ЛИТЕРАТУРА

Антонов В.Ф., Козлова Е.К., Черныш А.М. Физика и биофизика: учебник. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 472 с.

Болдырев А.А., Кяйвяряйнен Е.И., Илюха В.А. Биомембранология: Учебное пособие. – Петрозаводск: Изд-во Кар НЦ РАН, 2006. – 226 с.

Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции: Пер. с англ. – М.: Мир, 1997. – 624 с.

Gaus K., Zech T., Harder T. Visualizing membrane microdomains by Laurdan 2-photon microscopy // Mol. Membr. Biol. – 2006. – Vol. 23, No 1. – P. 41–48.

Oda Y., Higaki T., Hasezawa S., Kutsuna N. Chapter 3. New insights into plant vacuolar structure and dynamics // Int. Rev. Cell Mol. Biol. – 2009. – Vol. 277. – P. 103–135.

Баранов С.И., Нурминский Г.Н., Нурминский В.Н. Программа для расчета анизотропии флуоресценции и визуализации микровязкости биологических мембран по данным флуоресцентной микроскопии // Биология – наука XXI века: сборник тезисов 18-й межд. Пущинской школы-конф. молод. ученых: 21–25 апреля 2014 г. – Пущино, 2014. – С. 370–371.

Kantar A., Littarru G.P., Falcioni G., Cherubini V., Coppa G.V., Fiorini R. Plasma membrane fluidity and polarity of polymorphonuclear leukocytes from children with type I diabetes mellitus // J. Diabetes Complications. – 1999. – Vol. 13. – P. 243–250.

ВАКУОЛИ В ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ: СОХРАННОСТЬ, БИОГЕНЕЗ, ВОДНЫЙ ТРАНСПОРТ

Н.В. Обручева, С.В. Литягина, И.А. Синькевич

Институт физиологии растений РАН, Москва
e-mail: obroucheva@ippras.ru

Семена растений разделяются на две группы – рекальцитрантные и ортодоксальные – по способности переносить потерю воды при созревании. Рекальцитрантные семена (в переводе «непослушные») растений тропических и субтропических регионов погибают, если их влажность снижается ниже 50 %, тогда как ортодоксальные (обычные) семена переносят высушивание до 8–10 % влажности без потери жизнеспособности. В осевых органах семян обоих типов было изучено состояние вакуолей при прорастании. В рекальцитрантных семенах конского каштана *Aesculus hippocastanum* осевые органы в период покоя сохраняют влажность 62–64 %, а при прорастании она возрастает во время набухания до 73–74 %. В осевых органах кормовых бобов *Vicia faba minor* (ортодоксальный тип семян) влажность при набухании возрастает от 8 % до 72–73 %. Выбранные семена отличались по водному статусу, но имели одинаковую характерную черту – их прорастание происходило в результате только растяжения клеток в осевых органах зародыша, тогда как деления клеток в меристеме корня начинались гораздо позже. Поскольку собственно прорастание (прорастание) происходит только путем растяжения клеток, выбор семян с различным водным статусом позволил изучить в них судьбу вакуолей, а также особенности

и общие закономерности вакуолизации клеток при инициации прорастания у контрастных типов семян.

В отличие от ортодоксальных семян, в осевых органах конского каштана вакуоли сохраняются как при подсыхании созревающих семян, так и в течение периода покоя, о чем говорит их прижизненное окрашивание нейтральным красным. При этом они остаются физиологически активными, что подтверждается не только иммунохимически выявленным присутствием в тонопласте аквапоринов TIP2 и TIP3;1, а также Е-субъединицы вакуолярной АТФазы, но и сохранением ферментативной активности вакуолярной инвертазы. Так было показано, что вакуолярная инвертаза сохраняет молекулярный вес и субъединичную структуру, а также оптимум pH и субстратную специфичность. Ее активность, так же как активность апопластной инвертазы, возрастает при набухании семян ко времени наклеивания, что связано с начавшимся еще до проклеивания притоком сахарозы из семядолей. Таким образом, для рекальцитрантных семян характерна сохранность физиологически активных вакуолей в достаточно оводненных осевых органах зрелых семян, что способствует быстрому растяжению клеток в них и прорастанию при опадении во влажном климате тропических лесов.

В гипокотиле набухающих кормовых бобов вакуолизация клеток происходит в результате реставрации вакуолей из белковых тел (белок-запасующих вакуолей) путем протеолиза запасных белков и последующего слияния вакуолей. Образование вакуолей в гипокотиле предшествует инициации растяжения клеток, что в свою очередь приводит к проклевыванию семян. Но в клетках корней, начавших делиться и растягивающихся после проклевывания, практически нет белковых тел, и вакуоли образуются в лагунах эндоплазматического ретикула как провакуоли, после чего их биогенез протекает так же, как и биогенез вакуолей из белковых тел – они сливаются и уже в растягивающейся клетке формируют большую центральную вакуоль.

В осевых органах набухающих семян кормовых бобов динамика вакуолизации была сопоставлена с данными по экспрессии генов аквапоринов тонопласта TIP1;1, TIP2;1, TIP2;2, TIP3;1 и TIP3;2. Гены аквапоринов TIP3;1 и TIP3;2, рассматриваемых как маркеры тонопласта белковых тел, при набухании перестают считываться и сами эти тонопластные белки не образуются и исчезают после проклевывания, что связано с превращением белковых тел в вакуоли и заменой данных аквапоринов в тонопластах самих вакуолей другими аквапоринами. Действительно, после проклевывания многократно возрастает экспрессия генов TIP1.1, TIP2;1 и TIP2;2; характерных для вакуолей растущих клеток.

В тонопластах вакуолей в проклевывающихся осевых органах обоих типов семян

имеются аквапорины, что указывает на возможность участия образуемых ими водных каналов в мембранах в транспорте воды, при условии открытости водных каналов.

Опыты с ингибированием поглощения воды сулемой и снятия этого эффекта восстановителем показали, что в проклевывающихся осевых органах обоих видов семян водные каналы закрыты и вода поступает через мембраны путем диффузии, тогда как в поступлении воды в интенсивно растягивающиеся клетки активную роль играют открытые водные каналы.

Таким образом, независимо от типа семян и способа образования или поддержания вакуолей, вакуоль как осмотический компартмент необходима для начала растяжения клеток и ее формирование предшествует инициации растяжения; вода поступает путем диффузии. После инициации растяжения, то есть после начала прорастания, усиленный транспорт воды в вакуоль растущей клетки осуществляется через открытые водные каналы.

ЛИТЕРАТУРА

Novikova G., Tounaire-Roux C., Sinkevich I., Lityagina S., Maurel C., Obroucheva N. Vacuolar biogenesis and aquaporin expression at early germination of broad bean seeds // Plant Physiology and Biochemistry. – 2014. – (представлена).

Obroucheva N.V., Lityagina S.V., Novikova G.V., Sinkevich I.A. Vacuolar status and water relations in embryonic axes of recalcitrant *Aesculus hippocastanum* seeds during stratification and early germination // AoB Plants. – 2012. – pls008; doi:0.1093/aobpla/pls008. – P. 1–14.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ ВАКУОЛИ В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ

Н.В. Озолина

ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
e-mail: ozol@sifibr.irk.ru

Уникальной и отличительной особенностью растительных клеток, а также клеток водорослей и дрожжей является присутствие в них вакуоли – полифункционального компартмента, участвующего в интеграции и регуляции метаболизма

клетки. Морфология вакуолей в растительной клетке очень разнообразна – от мелких пузырьков в меристематических клетках до крупной центральной вакуоли, занимающей до 90 % объема в зрелых клетках. Эти нехарактерные для других органелл размеры

позволили Антонио Левенгуку уже в 1670 обнаружить этот компартмент под микроскопом. Название «вакуоль» было дано от слова «вакуум» в 1872 году, поскольку органелла выглядела абсолютно однородной. Современные методы визуализации с использованием, электронной, флуоресцентной, конфокальной микроскопии показали, что вакуоль совсем не однородна. Была показана высокоорганизованная комплексная морфология и динамика содержимого вакуолей. В наших экспериментах с использованием светового и конфокального микроскопа хорошо видна гетерогенность фракции вакуолей, выделенных из корнеплодов столовой свёклы и по окраске, которая связана с биохимическим составом содержимого вакуоли, и по структуре содержимого, которая показывает аутофагическую роль этого компартмента, а также его связь с цитоскелетом клетки. Растительная клетка не может существовать без вакуолярного компартмента. По современным представлениям [Muntz, 2007] растения могут содержать большое разнообразие дифференцированных и специализированных вакуолей и даже одна клетка может содержать два и более типов вакуолей.

В последние десятилетия подъём интереса к выяснению разнообразия функций вакуолей стимулировался появлением методов, позволяющих выделять большие количества интактных вакуолей из тканей высших растений. Первые успешные опыты выделения интактных вакуолей были проведены Кукингом [Cocking, 1960]. Он выделял вакуоли из протопластов методом осмотического лизиса. В 1975 году этот метод усовершенствовали Вагнер и Сигельман [Wagner, Sigelman, 1975]. Ими были выделены вакуоли из мягких растительных тканей: из листьев, молодых фруктов, лепестков цветов. В 1976 году Лэй и Брэнтон [Leigh, Branton, 1976] продемонстрировали новый подход, который позволил получить чистую фракцию изолированных вакуолей из грубых растительных тканей, в частности, из корнеплодов столовой свёклы методом механического нарезания на тонкие пластики. Все эти методы были успешно применены другими исследователями и вызвали не-

бывалый подъём в изучении огромного разнообразия метаболитов и ферментов, присутствующих в вакуолях. В вакуолях была идентифицирована активность целого ряда ферментов, главным образом гидролитических, и большого количества метаболитов (сахара, органические кислоты, аминокислоты, нитраты, ионы, фенолы, антоцианы и т.д.) [Matile, 1978; Boller, Wiemken, 1986].

В нашем институте в 1978–1981 годах В.Я. Кузевановым [Салаяев и др., 1981] был отработан на основе метода Лэй и Брэнтона модифицированный способ выделения фракции изолированных вакуолей и вакуолярных мембран. Это позволило провести целую серию очень интересных исследований, которые были опубликованы в центральных и зарубежных изданиях и внесли заметный вклад в изучение роли вакуоли в метаболизме растительной клетки. Все эти исследования проводились под руководством Р.К. Салаяева.

На сегодня благодаря обзорам И.М. Андреева [2001, 2012], Оливера Трентмана, Ика Хаферкампа [Trentmann, Haferkamp, 2013], Фрэнсиса Марти [Marty, 1999], Корадо Виотти [Viotti, 2014] и многих других исследователей современные представления о роли вакуоли в растительной клетке значительно расширились.

В настоящее время известно, что вакуоль играет основную роль во многих важных для растительной клетки и для всего растения процессах. К ним относятся: запасание первичных и вторичных метаболитов, регуляция клеточного объёма, тургора, а также рН и ионного гомеостаза цитозоля, трансдукция сигналов различной природы, детоксикация и катаболическая деградация целого ряда соединений эндогенного и экзогенного происхождения. Кроме того, она активно включается в ответные защитные реакции в стрессовых условиях окружающей среды. Осуществление всех этих функций невозможно без активного содействия вакуолярной мембраны, которая была названа в 1885 году Г. Де Фризом тонопластом. Электронные микрофотографии выявляют у тонопласта структуру элементарной липопротеидной мембраны и асимметричность поверхности. Толщина

тонопласта на поперечных срезах составляла 9,5–10,5 нм. На репликах, полученных методом замораживания-скалывания, на поверхности тонопласта наблюдаются многочисленные глобулярные образования. В настоящее время хорошо изучен химический состав тонопласта. В этих исследованиях принимали активное участие и сотрудники нашего института [Салеев и др., 1982, 1983].

Разнообразие выполняемых вакуолюй функций находится в соответствии с морфологией, биохимией и биогенезом этих органелл и зависит от органа или ткани, в котором она расположена. Вакуоль в запасющих органах растений является конечным пунктом направленного транспорта метаболитов и поэтому обладает особенностями, позволяющими накапливать большие количества первичных и вторичных метаболитов (сахаров, аминокислот и т. д.). Транспортные системы тонопласта этих вакуолей характеризуются свойствами, которые в настоящее время вызывают повышенный интерес и интенсивно изучаются. Регуляции механизмов этих транспортных систем посвящено большое количество исследований, в том числе проводимых сотрудниками нашей лаборатории.

Несмотря на то, что существуют разные виды вакуолей, одна функция является для всех общей – все они принимают участие в защите клетки от абиотического стресса [Reisen et al., 2005], реализуя для этого определённые стратегии. Одна из них состоит в накоплении при стрессе метаболитов, относящихся к осмопротекторам, антиоксидантам. Так, в вакуоли в 4 раза увеличивается содержание аскорбата при световом стрессе [Zechmann, 2011]. Вакуоль может накапливать большие количества сахаров, пролина при гиперосмотическом стрессе, чтобы предотвратить обезвоживание клетки, ионов натрия и хлора при солевом стрессе и т. д. Другая стратегия связана со структурными изменениями, происходящими в вакуоли при стрессе, которые были обнаружены при использовании конфокальной микроскопии. Была показана тесная связь вакуоли с цитоскелетом растительной клетки. Доказано, что центральная вакуоль

через трансвакуолярные нити управляет распределением органелл в цитоплазме и движением самой цитоплазмы [Sheahan et al., 2007].

В настоящее время в изучении функционирования вакуолей и вакуолярных мембран используют много новых оригинальных методов микроскопии, биохимии, генетики и молекулярной биологии, что, несомненно, позволит найти ответы на постоянно возникающие вопросы и сделает наши знания более полными.

ЛИТЕРАТУРА

- Андреев И.М. Функции вакуоли в клетках высших растений // Физиология растений. – 2001. – Т. 48. – С. 777–787.
- Андреев И.М. Роль вакуоли в редокс-гомеостазе растительных клеток // Физиология растений. – 2012. – Т. 59. – С. 660–667.
- Салеев Р.К., Кузеванов В.Я., Хантагаев В.Я., Копытчук В.Н. Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток растений // Физиология растений. – 1981. – Т. 28. – С. 1295–1305.
- Салеев Р.К., Кузеванов В.Я., Озолина Н.В., Каменкова Л.Д., Пузанова Н.А. Содержание липидов, белков и углеводов в мембране изолированных вакуолей красной свёклы // Физиология растений. – 1982. – Т. 29. – С. 933–940.
- Салеев Р.К., Хантагаев С.Б., Кузеванов В.Я., Копытчук В.Н. Об ультраструктуре изолированных вакуолярных мембран // Цитология. – 1983. – Т. XXV. – С. 643–648.
- Boller T., Wiemken A. Dynamics of vacuolar compartmentation // Ann. Rev. Plant Physiol. – 1986. – Vol. 37. – P. 137–164.
- Cocking E.S. A method for the isolation of plant protoplast and vacuoles // Nature. – 1960. – Vol. 187. – P. 962–963.
- Leigh R.A., Branton D. Isolation of vacuoles from root storage tissue of *Beta vulgaris* L. // Plant Physiol. – 1976. – Vol. 58. – P. 656–662.
- Marty F. Plant vacuoles // The plant cell. – V.11. – P. 587–599.
- Matile P. Biochemistry and function of vacuoles // Ann. Rev. Plant Physiol. – 1978. – Vol. 29. – P. 193–213.
- Muntz K. Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles // J. of Experimental Botany. – 2007. – Vol. 58. – P. 2391–2407.
- Raisen D., Marty F., Leborgne-Castel N. New insights into the tonoplast architecture of plant vacuoles and vacuolar dynamics during osmotic stress // BMC Plant Biol. – 2005. – Vol. 5. – P. 1–13.
- Sheahan M.B., Rose R.J., McCurdy D.W. Actin-filament-dependent remodeling of the vacuole in cultured mesophyll protoplasts // Protoplasma. – 2007. – Vol. 230. – P. 141–152.

Trentmann O., Haferkamp I. Current progress in tonoplast proteomics reveals insights into the function of the large central vacuole // *Frontiers in Plant Science*. – 2013. – Vol. 4. – P. 1–10.

Viotti C. ER and vacuoles: never been closer // *Frontiers in Plant Science*. – 2014. – Vol. 5. – P. 1–7.

Zechmann B. Subcellular distribution of ascorbate in plants // *Plant Signaling & behavior*. – 2011. – Vol. 6. – P. 360–363.

Wagner G.J., Siegelman H.W. Large-scale isolation of intact vacuoles and isolation of chloroplasts from protoplasts of mature plant tissues // *Science*. – 1975. – Vol. 190. – P. 1298–1299.

СПОСОБЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ХЛОРОПЛАСТАМИ И МИТОХОНДРИЯМИ В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ

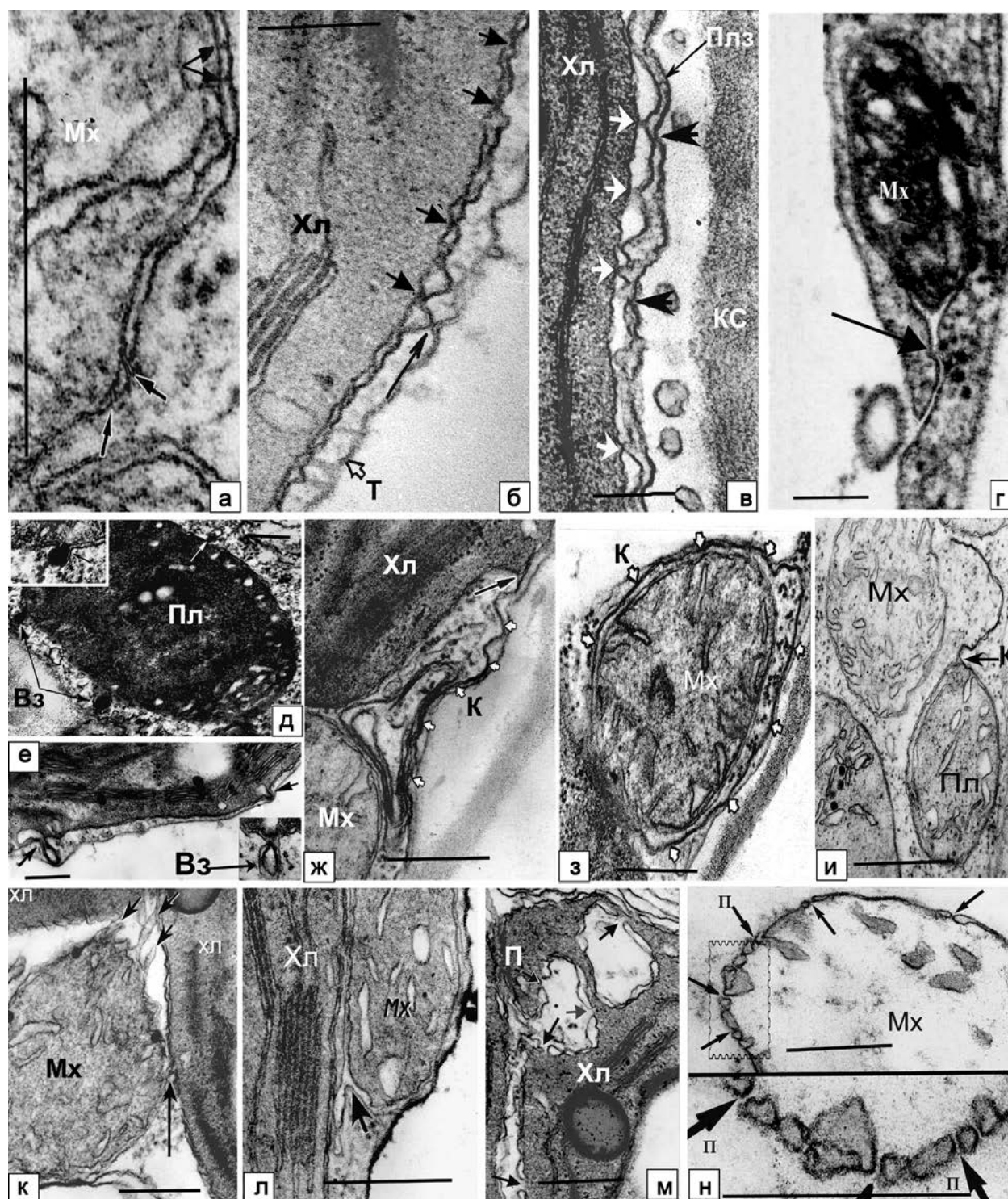
Н.В. Парамонова

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва
e-mail: paranva@mail.ru

Биохимические исследования изолированных органелл в сочетании с электронной микроскопией дали первые ценные об их строении и функции. Между тем, чтобы понять жизнедеятельность клетки в целом, строение и функции органелл необходимо изучать во взаимодействии с другими органеллами, т.е. в самой клетке. Электронно-микроскопическое изучение пространственного расположения органелл по отношению друг к другу, способов их структурной взаимосвязи между собой, особенностей поведения мембран (МБ) оболочки органелл, отчасти может способствовать решению этих вопросов. В данной работе рассматриваются способы взаимодействия между митохондриями (Мх) и хлоропластами (Хл), а также особенности взаимодействия их с цитоплазмой.

Анализ большого количества снимков показал, что в Мх (рис. 1а) и Хл (рис. 1б, в) часто отмечались контакты между наружной и внутренней МБ оболочки. Через участки контакта МБ оболочки в Мх и Хл может происходить обмен веществами между матриксом этих органелл и цитоплазмой, а при одновременном контакте еще и с плазмалеммой (рис. 1в) или тонопластом (рис. 1б) обмен между матриксом этих органелл с вакуолью или с периплазматической зоной. По литературным данным контакты, наблюдаемые между МБ в оболочке ядра, Мх, Хл служат для обмена белками и другими веществами между цитоплазмой и матриксом этих органелл. Предполагается,

что образующиеся в ЭР фосфолипиды, либо, синтезированные на рибосомах белки, перемещаются внутрь органеллы именно через участки контакта двух МБ оболочки, минуя тем самым пространство между МБ [Льюин и др., 2011]. Контакты между наружными МБ Хл и Мх (рис. 1к – длинная стрелка, рис. 1л), вероятно, обеспечивают обмен веществами между их наружными камерами, т.е. перихлоропластным и перимитохондриальными пространствами. В листьях сахарной свеклы между Хл и Мх, по видимому, возможно и прямое сообщение друг с другом посредством канальцев неизвестной природы (рис. 1к, л). Хл и другие Пл могут вступать также в прямую связь не только с шероховатым ЭР, но и с длинными тонкими, канальцами, которые по диаметру сходны с перихлоропластным пространством (рис. 1ж, и) и, возможно, представляют собой разрастания наружной МБ оболочки Пл. В клетках паренхимы этиолированного стебля гороха с помощью тонких канальцев отмечались случаи соединения Пл. В клетках мезофилла зеленого листа гороха канальцы, отходящие от наружной МБ Хл, были довольно длинные и окружали не только Хл, но и Мх (рис. 1з). Можно предположить, что интенсивное разрастание наружной МБ оболочки Хл происходит для увеличения площади обмена веществами с цитоплазмой, а также и между Хл и Мх в местах плотного прилегания канальцев к Мх (рис. 1ж). В клетках семядолей гороха на 21 день от начала прорастания посред-



Обозначения: Мх – митохондрия, Хл – хлоропласт, Т – тонопласт, Плз – плазмалемма, КС – клеточная стенка, Пл – пластида, Вз – везикула, К – каналцы, П – поры. Масштаб – 0,25 мкм.

Рис. 1. а – каналцы в оболочке Мх (стрелки); б – в Хл показаны контакты наружной и внутренней мембраны оболочки, и контакт Мб оболочки Хл с тонопластом; в – контакты наружной и внутренней мембраны оболочки в Хл (светлые стрелки), и контакт оболочки с плазмалеммой (темные стрелки); г – стрелкой показан участок соединения каналца, отходящего от Мх, с вакуолью; д, е – везикулы, отделяющиеся от Пл (д) и от Хл (е) – стрелки; ж – стрелкой показано место соединения длинного каналца с Хл; з – каналец (стрелки), окружающий Мх; и – Пл, соединенная с каналцем, к, л – каналцы, связывающие Мх и Хл; м, н – стрелками показаны поры в оболочке Хл (м), в Мх (н).

ством каналца (рис. 1г) отмечалось прямое сообщение между перимитохондриальным

пространством Мх и центральной вакуолю. Так как в этот период большая часть

клеток в семядолях разрушается, открытие канальца, отходящего от наружной мембраны Мх в вакуоль, указывает на последующий лизис Мх в вакуоле.

Взаимосвязь между органеллами может происходить, и опосредовано, с помощью отделяющихся от них пузырьков. От ядра, Хл и других Пл пузырьки могут отпочковываться от наружной Мб оболочки, либо эвагинируют наружу одновременно обе Мб оболочки. В Хл мезофилла листьев гороха и кукурузы нами наблюдались эвагинации, в которые одновременно вовлечены три Мб – две оболочки и Мб периферического ретикулума Хл. Это происходит в тех участках, где внутренняя Мб оболочки граничит не со стромой, а контактирует, и впоследствии сплавляется с Мб периферического ретикулума Хл. После эвагинации этого утолщенного участка Мб одновременно с наружной Мб оболочки от Хл будет отделяться пузырек (рис. 1е) с содержимым периферического ретикулума, и перихлоропластного пространства. В запасящей паренхиме семядолей 10-дневных проростков гороха от Пл отпочковывались везикулы с темным содержимым. Электронноплотный материал проникал в периферический ретикулум, а затем и в эвагинируемые пузырьки из канальцев проламеллярного тела, связанного с ретикулулом напрямую. Когда Пл находились около вакуоли, отделяющиеся от них везикулы, вследствие инвагинации тонопласта отпочковывались внутрь вакуоли. Таким образом, продукты жизнедеятельности Хл и других Пл попадают в вакуоль. Обмен между органеллами, и цитоплазмой, по всей вероятности, происходит и посредством пор в органеллах. Хорошо известно, что поры обнаружены в ядрах животных и растительных клеток. В оболочке других органелл – Пл, Мх, имеющих оболочку из 2-х Мб, поры отмечались довольно редко. Возможно, это объясняется их малыми размерами. Чаше в оболочке этих органелл приходилось наблюдать мостики между Мб оболочки, либо структуры больше похожие

на микроканальцы, тянущиеся от одной Мб к другой (рис. 1а). Наличие таких структур в оболочке Мх, может быть связано с присутствием микроканальцев (пор) в оболочке Мх. Это предположение подтверждается исследованиями Мх после выдерживания отрезков стеблей гороха в воде. В этих условиях Мх значительно увеличиваются в объеме, и просвет пор сильно расширяется (рис. 1н). В Хл, листа сахарной свеклы при нарушении оттока ассимилятов в оболочке были обнаружены участки, где наружная и внутренняя Мб оболочки сливаются (рис. 1м). Пory в оболочке Хл были описаны также в Хл фунии влагомерной [Недуга 1976], в Хл листьев табака [Mohapatra, Johnson, 1976]. Тот факт, что присутствие пор в Хл, Мх показано лишь в некоторых работах, возможно, говорит о том, что их нельзя считать постоянными структурами в этих органеллах.

Межорганойдный обмен в растительной клетке обусловлен функциональной зависимостью клеточных структур друг от друга. Многообразие путей взаимодействия органелл друг с другом и с окружающей их цитоплазмой, по-видимому, может объясняться расстоянием между органеллами, размерами и свойствами транспортируемых молекул, различными свойствами самих Мб, а также тем, что функциональная зависимость органелл друг от друга неодинакова в онтогенезе одной клетки, в различных тканях, и при разных условиях выращивания.

ЛИТЕРАТУРА

- Льюин Б., Кассимерис Л., Линганна В.П., Плонпер Д. Клетки / Пер. с английского. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 951 с.
- Недуга Е.М. Пory хлоропластов фунии влагомерной // Цитология и генетика. – 1976. – № 10. – С. 43–44.
- Mohapatra S.C., Johnson W.H. Microscopic studies on bright leaf tobacco. V. Scanning electron microscopic observation on chloroplast structure and distribution // Trans. Amer. Micros. Soc. – 1976. – Vol. 3, № 2. – P. 228–232.

УЛЬТРАСТРУКТУРА СЕМЯДОЛЕЙ ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЯН ГОРОХА В СВЯЗИ С МОБИЛИЗАЦИЕЙ ЗАПАСНЫХ ВЕЩЕСТВ**Н.В. Парамонова**ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва
e-mail: paranva@mail.ru

Клетки в растении взаимодействуют друг с другом не только через плазмодесмы, но и межклеточную зону – апопласт. Это было подтверждено экспериментами по введению в растение красителей, меченых соединений, коллоидных растворов благородных металлов, а также благодаря обнаружению в оболочке, через которые идет интенсивная переброска метаболитов, специфических выростов – протуберанцев. Как было показано нами ранее, в развивающиеся семядоли гороха, питательные вещества к клеткам поступают через лабиринт оболочек [Парамонова, 1981], образующийся в клетках эпидермиса семядолей, т.е. на границе эндосперма и развивающимся семенем. В данной работе предстояло выяснить, с какими структурными изменениями в запасающей паренхиме сопряжены периоды повышенной мобилизации запасных веществ из семени. С этой целью исследовалась ультраструктура клеток запасающей паренхимы семядолей гороха на 2–4 и 14 день от намачивания.

На 2–4 сутки после намачивания клетки эпидермиса (КЭ) и запасающей паренхимы (ЗП) утрачивали черты характерные для клеток в состоянии покоя. Цитоплазма в них становилась менее плотной, органеллы набухали и увеличивались в размерах. Наружная стенка клеток эпидермиса (НСКЭ) имела строение, сходное с тем, которое наблюдалось на последних этапах развития семени. В ней наблюдались цитоплазматические включения, замуровываемые при утолщении стенки на последних этапах развития (рис. 1а) [Парамонова, 1981]. Остатки эндосперма, сохранившиеся между семенной кожурой и семядолями, становились менее плотными, в них хорошо распознавались различные структуры: белковые тела, митохондрии, везикулы (рис. 1а). Темные участки в (НСКЭ), напротив межклеточников, на 3–4 сутки после намачивания становились электронно-прозрачными и сильно пористыми (рис. 1б). В КЭ и ЗП плазмалемма часто была извилистой

и образовывала инвагинации содержащие везикулы (рис. 1в, г, е). На 4 день от замачивания часть КЭ была сильно вакуолизирована (рис. 1ж), другая – имела плотную цитоплазму (рис. 1з). Во всех типах КЭ исчезал слой липидов (рис. 1ж, з), прилегающий к плазмалемме в сухих семенах. В клетках отмечались вакуоли, в которых отмечались разрушающиеся органеллы, а около плазмалеммы – двойные пузырьки, благодаря которым происходит экскреция веществ из клетки (рис. 1в, г). В периплазматической зоне и около плазмалеммы многих КЭ наблюдался электронно-плотный материал, гранулы фитина (рис. 1ж). В оболочках эпидермиса и ЗП приходилось наблюдать различного рода внутрисстеночные включения – везикулы, липидные капли, темные включения и фрагменты мембран (рис. 1з). В клетках ЗП плотная цитоплазма, заполнена органеллами и запасными веществами – белковыми телами, крахмальными зернами, свободно лежащими в цитоплазме, и в амилопластах, около плазмалеммы отмечался слой липидов. В КС ЗП плазмодесмы чаще всего тянулись не от клетки к клетке, а оканчивались в области срединной пластинки (рис. 1д, е, н). Кроме того, плазмодесмы со стороны клетки были либо оторваны от плазмалеммы, (рис. 1н), либо закрыты дополнительным слоем оболочки, образующимся на КС (рис. 1д). На 14 день от начала прорастания содержимое в одной трети клеток эпидермиса отмирает. В сохранившихся клетках чаще всего встречались митохондрии, эндоплазматический ретикулум. Вследствие сильного истончения цитоплазматического слоя плазмалемма и тонопласт сплавляются друг с другом, с образованием одной пятислойной мембраны (рис. 1и). Семядоли к этому времени эвакуируют большую часть ассимилятов, их объем значительно уменьшается, а поверхность семядолей сильно сморщивается. В ЗП большая часть клеток имела признаки дегенерации. Фрагменты цитоплазмы вместе с органеллами эвагинировали (рис. 1к), а затем

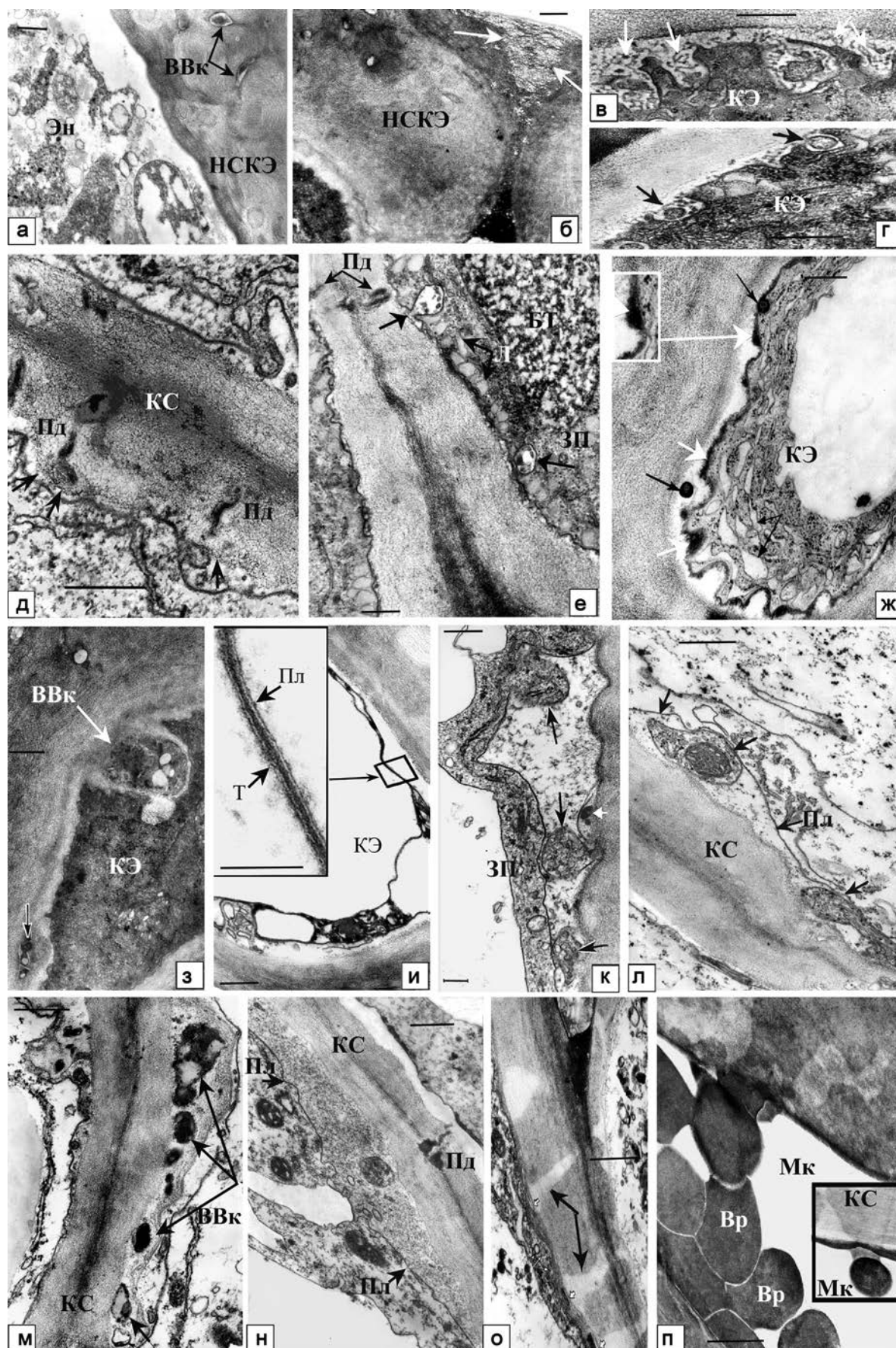


Рис. 1. Обозначения на рисунках в таблице: БТ – белковые тела, ВВк – внутристеночные включения, Вр – выросты на клеточной стенке, ЗП – запасаящая паренхима, КЭ – клетки эпидермиса, Л – липиды, Мк – межклетник, НСКЭ – наружная стенка клеток эпидермиса, Пд – плазмодесмы, Пл – плазмалемма, Т – тонопласт, Ф – фитин, Эн – эндосперм. Масштаб – 0,25 мкм.

отделялись в периплазменную зону (рис. 1к, л). В этой зоне наблюдались также темные частицы, сходные с рибосомами, митохондриями, везикулы, и тонкозернистый материал (рис. 1к, л, н). Очевидно после лизиса структур в периплазменной зоне (рис. 1н) продукты распада присоединялись к КС. Внутри КС такие включения оказываются благодаря присоединению снаружи к ним, дополнительного слоя оболочки (рис. 1м). На этой стадии, для оболочек эпидермиса и ЗП характерно появление светлых полос, расположенных поперек КС, что, по-видимому, связано с частичным лизисом элементов, образующих оболочку (рис. 1н, р). Вместе с тем, несмотря на частичную деградацию оболочек, при «замуровывании» продуктов распада в КС (рис. 1м), отмечался и ее прирост, а также благодаря образованию крупных выростов на КС, со стороны межклетников (рис. 1п).

Изменения, происходящие с КС, плазмалеммой, периплазменной зоной, в клетках эпидермиса и ЗП на различных этапах прорастания свидетельствуют об активных процессах обмена клеток с апопластом. Судя по изменениям, наблюдаемым в НСКЭ семядолей в период прорастания, эта КС не утрачивает свойств, наблюдаемых в период развития семени, связанных с ее участием в поглощении воды и питательных веществ из эндосперма. Изменения, наблюдаемые в НСКЭ при прорастании, очевидно, связаны с тем, что эпидермис семядолей участвует в абсорбции воды и питательных веществ из набухших остатков эндосперма и семенной

кожуры. Ослизнение и разрыхление поверхностных слоев НСКЭ можно рассматривать как способ увеличения её абсорбционных и аккумулятивных свойств. После поглощения этих структур запускается запрограммированная гибель клеток в самих семядолях. Этот процесс происходит после освобождения клеток от запасных веществ, и оттока продуктов лизиса самих клеточных структур.

Полученные данные указывают на то, что апопластный транспорт в запасующей паренхиме семядолей гороха предопределен быстрой гибелью структур клетки, участвующих с симпластным транспорте. На это указывает тот факт, что плазмодесмы, в запасующей паренхиме, как правило, не проходят через всю толщу оболочки между клетками, а пересекают КС только одной клетки и оканчиваются в области середины пластинки. Кроме того, в процессе замуровывания продуктов распада в КС, плазмодесмы также оказываются изолированными от содержимого клеток вновь образовавшимися слоями КС. Апопластному пути передвижения, способствует также образование выростов на наружной поверхности оболочек, которые увеличивают емкость свободного пространства, имеющего отношение к транспорту веществ в сосуды и далее в развивающийся проросток.

ЛИТЕРАТУРА

Парамонова Н.В. О развитии наружной стенки клеток эпидермиса семядолей гороха и происхождении внутрискелетных цитоплазматических включений // Физиология растений. – 1981. – Т. 28, № 4. – С. 701–710.

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

Я.О. Зубо ^{1*}, Т.В. Потапова ^{2,3}, В.И. Тарасенко ², Ю.М. Константинов ², Т. Бернер ¹

¹ *Institute für Biologie/Genetik, Humboldt-Universität zu Berlin, Germany*

² *ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия*

³ *ФГБОУ ВПО Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия*

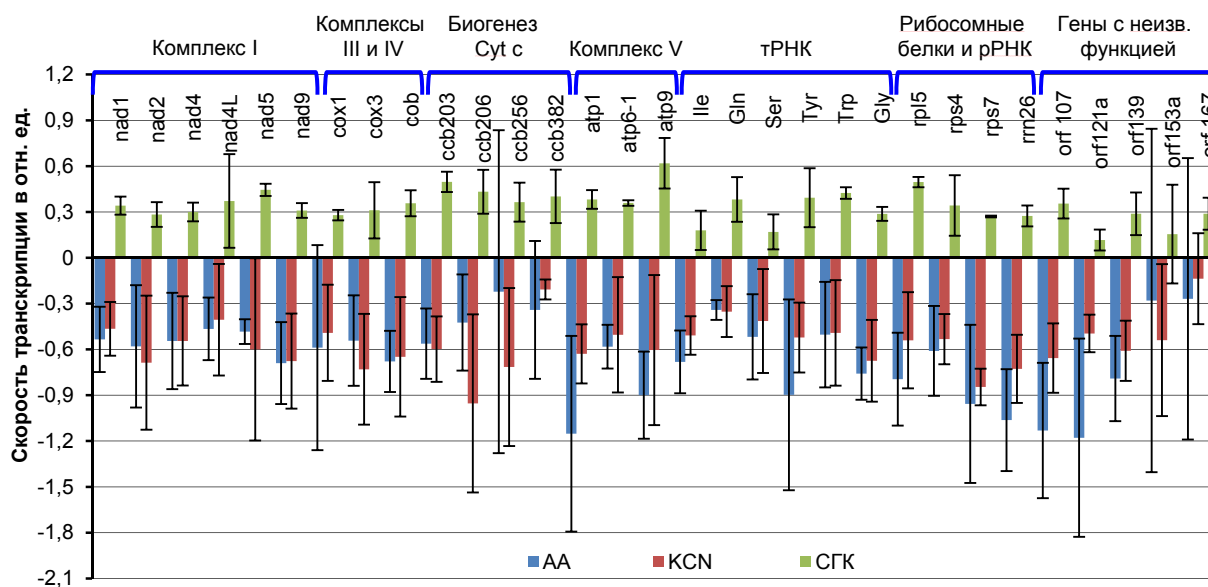
* *Current address – Dartmouth College, Hanover, NH, USA
e-mail: tatyapotapova@gmail.com*

Экспрессия хлоропластного и митохондриального геномов регулируется редокс-сигналами, возникающими при

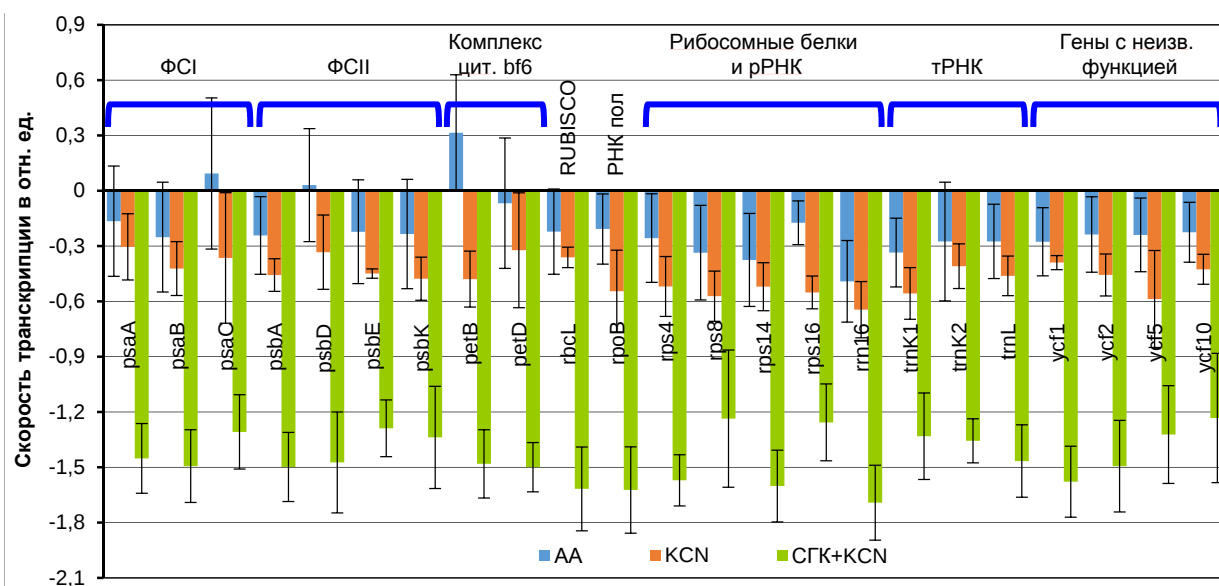
функционировании электрон-транспортных цепей внутри самих органелл. Ряд аспектов митохондриально-хлоропластных взаимо-

действий был изучен при исследовании митохондриальных мутантов с нарушениями функционирования хлоропластов [Leister, 2005]. Регуляция экспрессии митохондриальных генов изучена значительно слабее в отличие от регуляции экспрессии хлоропластных генов [Pfannschmidt et al., 2009; Dietz, Pfannschmidt, 2011]. До сих пор ответ митохондриального генома на изменение редокс-условий изучался только на уровне изменений общей транскрипции [Konstantinov et al., 1995; Wilson et al., 1996], но не на уровне

изменений экспрессии индивидуальных генов. В настоящей работе сделана попытка выяснить влияние редокс-состояния двух электрон-транспортных цепей митохондрий (цитохромного пути и альтернативной оксидазы) на транскрипцию митохондриальных и хлоропластных генов растений арабидопсиса. Исследования проводили с применением ингибиторов цитохромного пути митохондрий (антимицина А, цианида калия) и ингибитора альтернативной оксидазы салицилгидроксамовой кислоты с



А



Б

Рис. 1. **А** – разнонаправленный эффект ингибиторов цитохромного пути и альтернативной оксидазы на скорость транскрипции митохондриальных генов *Arabidopsis thaliana*. **Б** – ингибирование переноса электронов по цитохромному и альтернативному пути в митохондриях вызывает репрессию хлоропластной транскрипции в растениях *Arabidopsis thaliana*. CGK – салицилгидроксамовая кислота. Данные представлены в виде десятичного логарифма отношения скорости транскрипции в опыте к скорости транскрипции в контроле. Бары обозначают стандартное отклонение.

последующим анализом транскрипционной активности митохондриальных и хлоропластных генов с помощью системы run-on транскрипции в изолированных органеллах.

Изменение редокс-состояния основного пути транспорта электронов, вызванное обработкой проростков арабидопсиса ингибиторами дыхания, влияет на экспрессию митохондриальных генов. Это влияние зависит от точки приложения ингибитора (комплекс III или IV) и отражается принципиально разным образом на скорости транскрипции и на содержании транскриптов тех же генов.

Интенсивность транскрипции большинства митохондриальных генов зависит от активности альтернативной оксидазы. В то время как ингибирование основного пути переноса электронов в митохондриях приводит к снижению скорости транскрипции, ингибирование альтернативной оксидазы митохондрий ведет к увеличению скорости транскрипции митохондриальных генов. Предполагается, что ингибирование потока электронов по цитохромному пути служит сигналом для подавления транскрипции генов, в то время как усиление этого потока, происходящее при ингибировании альтернативного пути, вызывает активацию транскрипции.

Изменение редокс-состояния основного пути транспорта электронов в митохондриях при обработке проростков ингибиторами дыхания приводит к снижению скорости транскрипции хлоропластных генов. Данный эффект наблюдается только в условиях освещения и полностью отсутствует

в темноте, что свидетельствует в пользу роли этого регуляторного механизма в предотвращении сверхвосстановленного состояния хлоропластов на свету.

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

ЛИТЕРАТУРА

- Dietz K.J., Pfannschmidt T. Novel regulators in photosynthetic redox control of plant metabolism and gene expression // Plant Physiology. – 2011. – Vol. 155. – P. 1477–1485.
- Konstantinov Y.M., Lutsenko G.N., Podsonny V.A. Genetic functions of isolated maize mitochondria under model changes of redox conditions // Biochem Mol Biol Internat. – 1995. – Vol.36, No 2. – P. 319–326.
- Leister D. Genomics-based dissection of the cross-talk of chloroplasts with the nucleus and mitochondria in Arabidopsis // Review. Gene. – 2005. – Vol. 18, No 354. – P. 110–116.
- Pfannschmidt T., Bräutigam K., Wagner R., Dietzel L., Schröter Y., Steiner S., Nykytenko A. Potential regulation of gene expression in photosynthetic cells by redox and energy state: approaches towards better understanding // Annals of Botany. – 2009. – Vol. 103. – P. 599–607.
- Wilson S.B., Davidson G.S., Thomson L.M., Pearson C.K. Redox control of RNA synthesis in potato mitochondria // Eur J Biochem. – 1996. – Vol. 242, No 1. – P. 81–85.

РЕДОКС-ФЕРМЕНТЫ ВАКУОЛЕЙ КЛЕТОК КОРНЕПЛОДОВ СТОЛОВОЙ СВЕКЛЫ (*BETA VULGARIS* L.)

Е.В. Прадедова, О.Д. Нимаева, Р.К. Салаяев

ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
e-mail: praded@sifibr.irk.ru

Редокс-процессы протекают во всех субклеточных структурах. Они объединяют элементарные окислительно-восстановительные реакции, в которых происходит обмен восстановительными эквивалентами. Редокс-реакции являются одним из наиболее

распространенных видов биохимических реакций в растительных организмах. Они лежат в основе биологического окисления, биоэнергетических процессов, трансдукции сигнала, апоптоза и др. Редокс-ферменты, катализирующие реакции окисления-вос-

становления, объединены в разные группы в зависимости от природы их кофермента: 1) металлопротеины (связанные с металл-содержащими редокс-коферментами и ко-факторами); 2) флавин-содержащие белки; 3) пиридиннуклеотид-зависимые белки; 4) хинон-зависимые белки и др. [Saab-Rincon, Valderrama, 2009].

При изучении каталитической эффективности центральной вакуоли клеток растений мы в первую очередь обратили внимание на вакуолярные редокс-ферменты. Это явилось основной задачей настоящего исследования. Другая задача заключалась в сравнении выявленных в вакуолях редокс-ферментов с таковыми пластид. Объектом исследования служили органеллы, изолированные из клеток корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.).

(I) Большой интерес у исследователей вызывают пероксидазы III класса – разнообразные и многочисленные редокс-ферменты [Andrews et al., 2002]. В вакуолях многих растений была обнаружена фенольная пероксидаза (ПО), относящаяся к этому классу. ПО является металлопротеином, гемсодержащим белком, в состав которого входит ион железа. Редокс-статус железа (Fe^{2+} или Fe^{3+}) в белковопорфириновом комплексе ПО изменяется в зависимости от каталитического цикла ферментативной реакции [Ferreres et al., 2011]. Для ПО характерен переход с пероксидазного каталитического цикла (окисление субстрата при восстановлении H_2O_2),

на оксидазный каталитический цикл (окисление субстрата O_2). Окислительные циклы ПО, согласно современным представлениям, могут регулироваться $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 , генерируемыми самим ферментом [Chen, Schopfer, 1999]. Способность окислять соединения за счет O_2 давно обнаружена у ПО корней хрена и клеточных стенок. Особенность механизма действия ПО в оксидазных реакциях заключается в генерации свободных радикалов ($O_2^{\cdot-}$, $HO_2^{\cdot}$, радикал органического субстрата) и H_2O_2 [Рогожин и др., 2004].

ПО вакуолей корнеплодов столовой свеклы, как показали результаты, также катализировала реакции оксидазного типа, которые были похожи на реакции фенолоксидазы (тирозиныазы). При спектрофотометрическом исследовании установили, что для реакций оксидазного окисления пирокатехина (ПК) пероксидазами вакуолей была характерна выраженная pH-зависимость (рис. 1Б). Оптимумы pH для реакций вакуолярного фермента приходились на 8,0–9,0, тогда как для пластидного – на 5,0–6,0 (рис. 1Б). Согласно имеющимся на сегодня данным для тирозиназ из других растительных объектов оптимальными были низкие pH [Li et al., 2010].

Пероксидазные реакции в наших исследованиях протекали в кислых условиях независимо от локализации фермента (рис. 1А).

Электрофоретическое исследование оксидазной активности показало, что все изоформы ПО в отсутствие H_2O_2 могли окислять ПК, подобно тирозиназам (рис. 2а, г).

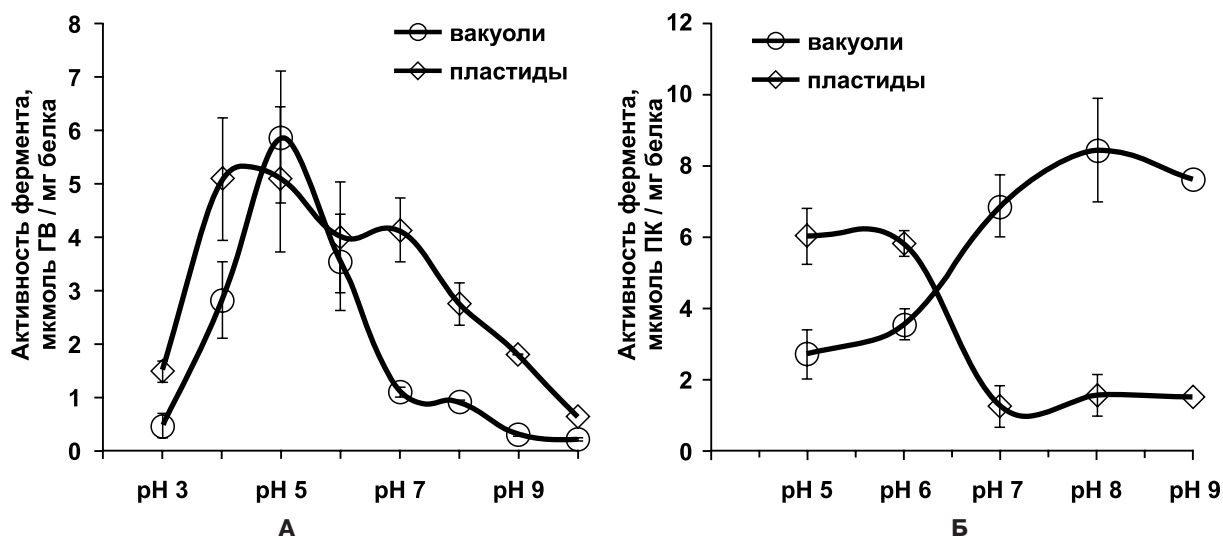


Рис. 1. Зависимость пероксидазной (А) и тирозиназной (Б) активности вакуолей и пластид от pH-условий: ГВ – гваякол; ПК – пирокатехин.

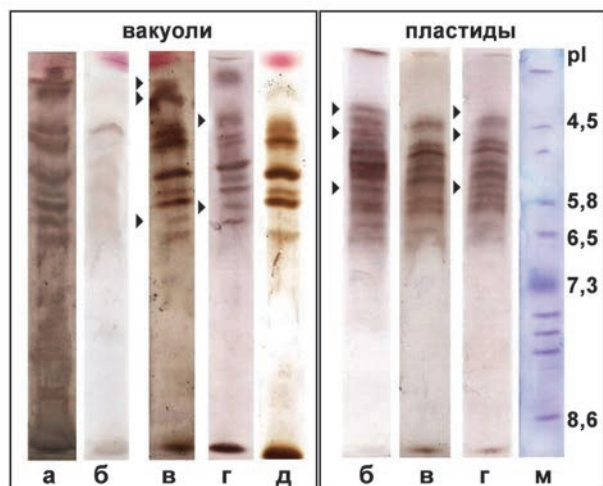


Рис. 2. Изоферментный состав пероксидазы и тирозиназы после изоэлектрофокусирования (ИЭФ): **а** – тирозиназная активность с ПК и ФДА, pH 8,0; **б** – тирозиназная активность с ПК и ФДА, pH 5,0; **в** – пероксидазная активность с ПК и ФДА, pH 5,0; **г** – тирозиназная активность с ПК и пФДА (для пластид pH 5,0; для вакуолей pH 8,0) в присутствии 1,3-диэтил-2-тиомочевин, акцептора H_2O_2 ; **д** – пероксидазная активность с ДАБ при pH 5,0; **м** – белковые маркеры для ИЭФ (Pharmacia).

Скорость пероксидазного и оксидазного окисления в ПААГ также зависела от pH среды. Оксидазные реакции у вакуолярных изоформ быстро развивались при pH 8,0 и практически отсутствовали при pH 5,0 (рис. 2а, б). Если в реакционные среды, содержавшие ПК и п-фенилендиамин (ФДА), вносили H_2O_2 , то результат был прямо противоположным, пероксидазные реакции быстро протекали при pH 5,0 и довольно медленно – при pH 8,0 (рис. 2в). Для пероксидазных реакций ПО вакуолей с 3,3'-диаминобензидином (ДАБ) и ФДА оптимальными также были pH 5,0–6,0 (рис. 2д). Следует отметить, что с ДАБ и ФДА оксидазные реакции не развивались, независимо от условий pH. В то же время оптимумы pH, спектр изоформ и субстратная специфичность локализованных в пластидах ферментов, катализирующих тирозиназные (оксидазные) и пероксидазные реакции, имели свои отличительные особенности. Во-первых, тирозиназные реакции быстро протекали при pH 5,0, и очень медленно – при pH 8,0 (рис. 2б). Во-вторых, зоны локализации изоформ предполагаемой тирозиназы (на рисунке обозначены стрелками) не совпадали с изоформами ПО пластид и вакуолей (рис. 2а, б). В-третьих, ПО пластид не обладала сродством к ДАБ и ФДА, при наличии которых пероксидазная активность в ПААГ

не проявлялась. Пероксидазная активность развивалась с ПК, а также с гваяколом (ГВ) (рис. 2в). Что касается pH-оптимумов для пероксидазных реакций пластид с ПК и ГВ, то они также варьировали в пределах 5,0–7,0 (рис. 1А). Общим свойством для ПО пластид и вакуолей была их тирозиназная активность (рис. 2а, б), хотя для нее требовались разные условия pH.

Вероятный механизм, регулирующий переход ПО вакуолей из пероксидазного цикла в оксидазный, связан с протонированием/депротонированием функциональных групп в ее активном центре.

(II) Флавопротеины – эта группа редокс-ферментов отличается многообразием и широким распространением в биологических системах. Коферменты, флавиномононуклеотид (ФМН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД), подвергаются восстановлению в ходе окислительных реакций. Восстанавливающими агентами могут служить динуклеотиды (НАДФН и НАДН) [Saab-Rincon, Valderrama, 2009]. Характерным для многих организмов является наличие высоко гомологичного флавопротеина глутатионредуктазы (GR). Этот фермент восстанавливает глутатион (GSH), который у растений обнаружен во всех клетках и практически во всех клеточных компартментах (цитозоле, хлоропластах, вакуолях, митохондриях и т.д.) [Shao et al., 2008]. GSH является главным небелковым тиолом, высокая химическая активность тиольной группы делает его незаменимым во многих биохимических процессах.

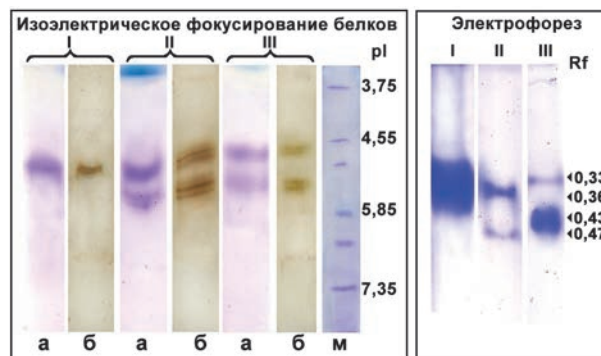


Рис. 3. Изоферментный состав глутатионредуктазы (GR) в ПААГ: **I** – контроль GR дрожжей (Sigma); **II** – GR вакуолей; **III** – GR пластид; **а** – зимография с дитионитробензойной кислотой и GSSG; **б** – иммуноферментный анализ с антителами мыши против GR дрожжей; **м** – белковые маркеры для ИЭФ (Pharmacia).

Мы выявили GR в вакуолях и сравнили биохимические характеристики GR вакуолей и пластид. Установили, что активность вакуолярного фермента ниже активности GR пластид, а электрофоретическое исследование показало для клеток корнеплодов по крайней мере две изоформы GR. Электроподвижность изоформ вакуолей несколько отличалась от таковой изоформ пластид (рис. 3, II и III).

Глутатион транспортируется в вакуоль главным образом в окисленной форме (GSSG) и согласно сложившимся на сегодня представлениям внутри вакуоли подвергается деградации посредством γ -глутамилтранспептидаз и дипептидаз [Noctor et al., 2011]. Результаты нашего исследования предполагают иной путь метаболизма GSSG в вакуолях клеток корнеплодов, а именно его восстановление до GSH вакуолярными GR.

ЛИТЕРАТУРА

- Рогожин В.В., Верхотуров В.В., Рогожина Т.В. Пероксидаза: строение и механизм действия. – Иркутск: Изд-во ИрГТУ, 2004. – 200 с.
- Andrews J., Adams S.R., Burton K.S. Subcellular localization of peroxidase in tomato fruit skin and the possible implications for the regulation of fruit growth // J. Exp. Botany. – 2002. – Vol. 53. – P. 2185–2191.
- Chen S., Schopfer P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions a novel function of peroxidase // Eur. J. Biochem. – 1999. – Vol. 260. – P. 726–735.
- Ferreeres F., Figueiredo R., Bettencourt S., Carqueijeiro I., Oliveira J., Gil-Izquierdo A. et al. Identification of phenolic compounds in isolated vacuoles of the medicinal plant *Catharanthus roseus* and their interaction with vacuolar class III peroxidase: an H_2O_2 affair? // J. Exp. Botany. – 2011. – Vol. 62. – P. 2841–2854.
- Li J.L.Y., Sulaiman M., Beckett R.P., Minibayeva F.V. Cell wall peroxidases in the liverwort *Dumortiera hirsuta* are responsible for extracellular superoxide production, and can display tyrosinase activity // Physiol. Plantarum. – 2010. – Vol. 138. – P. 474–484.
- Noctor G., Queval G., Mhamdi A., Chaouch S., Foyer C.H. Glutathione // The Arabidopsis Book. Published By: The American Society of Plant Biologists URL: <http://www.bioone.org/doi/full/10.1199/tab.0142>. – 2011. – Vol. 9. – P. 1–32.
- Saab-Rincon G., Valderrama B. Protein Engineering of Redox-Active Enzymes // Antioxidants & redox signaling. – 2009. – Vol. 11, № 2. – P. 167–189.
- Shao H.B., Chu L.Y., Lu Z.H., Kang C.M. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells // Int. J. Biol. Sci. – 2008. – Vol. 4. – P. 8–14.

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ РЕТРОГРАДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ HSP101 ARABIDOPSIS THALIANA

Д.В. Пятрикас, И.В. Федосеева, Е.Л. Таусон, Н.Н. Варакина, А.В. Степанов, Т.М. Русалева,
Е.Г. Рихванов, Г.Б. Боровский, В.К. Войников

ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
e-mail: galdasova@sifibr.irk.ru

Митохондрии в ходе ретроградной регуляции могут активно влиять на экспрессию ядерных генов [Millar et al., 2011]. Однако природа сигнала, с помощью которого митохондрии участвуют в этом процессе, остается неизвестной. Предполагается, что митохондрии, модулируя продукцию активных форм кислорода (АФК) и концентрацию ионов Ca^{2+} в цитозоле, регулируют экспрессию ядерных генов [Millar et al., 2011]. Тепловой стресс вызывает у растений повышение потенциала на внутренней митохондриальной мембране (мтДψ), что сопровождается активацией экспрессии белков теплового шока (БТШ) [Rikhvanov et al., 2007]. Было

предположено, что причиной гиперполяризации является повышение уровня $[Ca^{2+}]_{цит}$. В то же время показано, что деполяризация внутренней митохондриальной мембраны может сопровождаться активацией экспрессии БТШ [Krause, Durner, 2004; Федосеева и др., 2012] и повышением $[Ca^{2+}]_{цит}$ [Subbaiah et al., 1998]. Хотя митохондрии растительной клетки активно участвуют в гомеостазе внутриклеточного кальция [Subbaiah et al., 1998; Logan, Knight, 2004], остается неизвестным как повышение $[Ca^{2+}]_{цит}$ влияет на изменение мтДψ у растений. Поэтому целью настоящей работы являлось изучение зависимости между уровнем $[Ca^{2+}]_{цит}$, мтДψ

и активацией экспрессии генов БТШ при обработке АМД и СССР в культуре клеток *A. thaliana*.

Обработка культуры клеток *A. thaliana* мягким тепловым воздействием (37 °C) сопровождалась активацией экспрессии гена *HSP101* (рис. 1) и развитием термотолерантности к последующему жесткому тепловому шоку [Пятрикас и др., 2014]. Однако несмотря на то, что АМД и СССР при 26 °C активировали экспрессию *HSP101* в клетках *A. thaliana*, эффект этих агентов на развитие индуцированной термотолерантности различался.

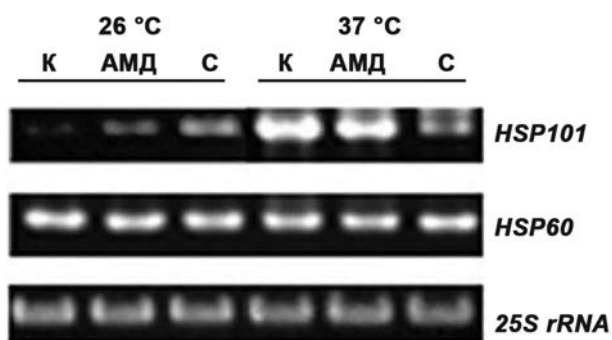


Рис. 1. Влияние АМД и СССР на экспрессию гена *HSP101* клеток *A. thaliana*. Культуру клеток *A. thaliana* инкубировали в течение 120 мин при 26 или 37 °C в присутствии 50 мкМ АМД (АМД), 4 мкМ СССР (СССР) или в отсутствии этих агентов (К). Приведены данные характерного эксперимента ($n = 3$).

Обработка СССР сопровождалась развитием устойчивости к последующему действию теплового шока, но в случае с АМД такого эффекта не наблюдалось. В то же время если добавление АМД при 37 °C не влияло ни на экспрессию *HSP101* (рис. 1), ни на развитие термотолерантности [Пятрикас и др., 2014], то присутствие СССР при 37 °C оказывало ингибирующий эффект на эти события. Таким образом, несмотря на то, что АМД активирует экспрессию *HSP101* в культуре клеток *A. thaliana*, обработка АМД не вызывает повышения термотолерантности [Пятрикас и др., 2014].

Для изучения влияния АМД и СССР на уровень $[Ca^{2+}]_{цит}$ в культуре клеток *A. thaliana* был использован флуоресцентный краситель Fluo-4AM [Пятрикас и др., 2014]. АМД и СССР при обычной температуре инкубации (26 °C), а также тепловой стресс (37 °C), вызывали повышение $[Ca^{2+}]_{цит}$. Добавление СССР во время действия тепло-

го стресса значительно повышало уровень $[Ca^{2+}]_{цит}$ по сравнению с эффектом каждого из этих факторов в отдельности (рис. 2).

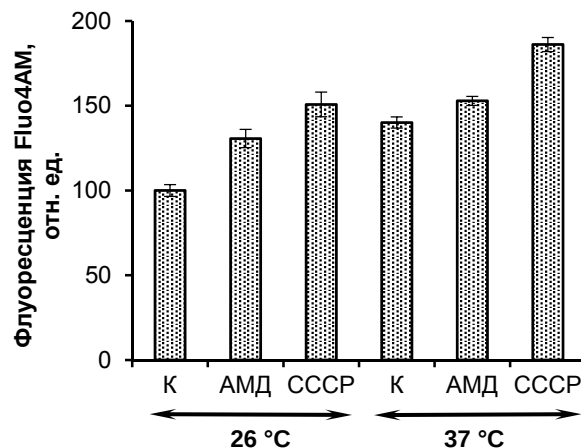


Рис. 2. Влияние АМД и СССР на уровень $[Ca^{2+}]_{цит}$ в культуре клеток *A. thaliana*. Культуру клеток *A. thaliana* инкубировали 10 мин при 26 или 37 °C в присутствии 50 мкМ АМД (АМД) или 4 мкМ СССР (СССР) или в отсутствии этих агентов (К). Перед обработкой реагентами культуру клеток инкубировали с Fluo-4 AM (4 мкМ, 120 мин) ($n = 3$, $M \pm SE$).

При изучении влияния АМД на потенциал внутренней мембраны митохондрий в клетках *A. thaliana* было показано, что обработка АМД при 26 °C и действие теплового стресса 37 °C сопровождалось повышением потенциала на внутренней митохондриальной мембране (рис. 3), определяемое по изменению флуоресценции потенциал-зависимого катионного красителя JC-1 [Пятрикас и др., 2014].

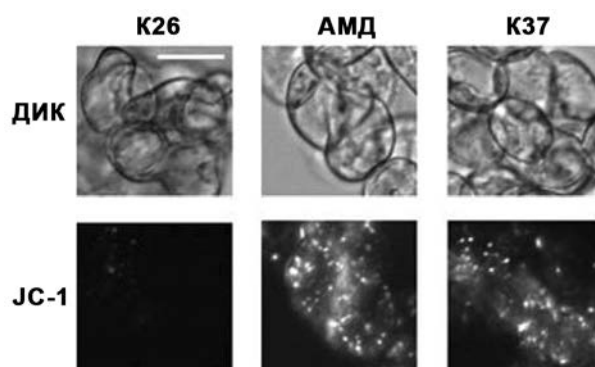


Рис. 3. Влияние АМД на потенциал внутренней мембраны митохондрий в культуре клеток *A. thaliana*. Культуру клеток *A. thaliana* инкубировали 120 мин при 26 (K26) или 37 °C (K37) в отсутствие или в присутствии 50 мкМ АМД (АМД); JC-1 (10 мкМ) добавляли за 10 мин до окончания эксперимента. Представлены микрофотографии клеток интенсивности флуоресценции митохондрий в красном канале. ДИК – дифференцированно-интерференционный контраст. Масштабная линейка равна 20 мкм. Приведены данные характерного эксперимента ($n = 3$).

В данной работе показана зависимость между изменением уровня $[Ca^{2+}]_{цит}$ и экспрессией БТШ при обработке АД и СССР. Если при обычной температуре АД и СССР вызывали повышение $[Ca^{2+}]_{цит}$ (рис. 2), что сопровождалось активацией экспрессии *HSP101* (рис. 1), то при повышенной температуре наблюдалась несколько иная картина. Добавление СССР во время теплового стресса не приводило к активации экспрессии *HSP101*, однако АД в этих условиях никакого влияния не оказывал (рис. 1). Вероятно, это связано с тем, что во время действия теплового стресса СССР повышал уровень цитозольного кальция до критического значения, при котором происходит ингибирование экспрессии *HSP101*. В то же время обработка АД при тепловом стрессе не оказывала такого повышения $[Ca^{2+}]_{цит}$ (рис. 2) и значительно не сказывалась на экспрессии *HSP101*, индуцируемой тепловым стрессом (рис. 1).

Нами было показано, что гиперполяризация внутренней мембраны митохондрий происходит при повышении уровня цитоплазматического кальция. Однако если в клетках млекопитающих ионы Ca^{2+} могут проникать в митохондрии и влиять на ферменты цикла Кребса, тем самым проводя к повышению мтДψ [Robb-Gaspers et al., 2008], то ферменты цикла Кребса растений не активируются кальцием. Вероятно, существуют другие, неизвестные на настоящий момент механизмы, участвующие в этих процессах.

Обработка клеток *A. thaliana* АД или тепловым стрессом сопровождается гиперполяризацией внутренней мембраны митохондрий и активацией экспрессии *HSP101*. Эти данные подтверждают зависимость между повышением мтДψ и активацией экспрессии БТШ [Rikhvanov et al., 2007; Федосеева и др., 2012].

Таким образом, АД и тепловой стресс вызывают в культуре клеток *A. thaliana*

параллельное повышение $[Ca^{2+}]_{цит}$, мтДψ и активацию экспрессии *HSP101*. Это указывает на то, что повышение уровня $[Ca^{2+}]_{цит}$ сопровождается повышением мтДψ, что в итоге приводит к активации экспрессии *HSP101 A. thaliana*. В то же время, деполяризация внутренней мембраны митохондрий также может сопровождаться активацией экспрессии *HSP101*, но при условии, что деполяризация будет приводить к выходу Ca^{2+} , депонированного в митохондриях, в цитозоль [Subbaiah et al., 1998].

ЛИТЕРАТУРА

Krause M., Durner J. Harpin inactivates mitochondria in arabidopsis suspension cells // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2004. – Vol. 17. – P. 131–139.

Logan D.C. Knight M.R. Mitochondrial and cytosolic calcium dynamics are differentially regulated in plants // Plant Physiol. – 2003. – Vol. 133, № 1. – P. 21–24.

Millar A.H., Whelan J., Soole K.L., Day D.A. Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants // Annu. Rev. Plant Biol. – 2011. – Vol. 62. – P. 79–104.

Rikhvanov E.G., Gamburg K.Z., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Fedoseeva I.V., Tauson E.L., Stupnikova I.V., Stepanov A.V., Borovskii G.B., Voinikov V.K. Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in Arabidopsis cell culture // Plant J. – 2007. – Vol. 52, № 4. – P. 763–778.

Robb-Gaspers L.D., Burnett P., Rutter G.A., Denton R.M., Rizzuto R., Thomas A.P. Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses // EMBO J. – 1998. – Vol. 17. – P. 4987–5000.

Subbaiah C.C., Bush D.S., Sachs M.M. Mitochondrial contribution to the anoxic Ca^{2+} signal in maize suspension-cultured cells // Plant Physiol. – 1998. – Vol. 118, № 3. – P. 759–771.

Федосеева И.В., Пятрикас Д.В., Варакина Н.Н., Русалева Т.М., Степанов А.В., Рихванов Е.Г., Боровский Г.Б., Войников В.К. Эффект амиодарона на термотолерантность и синтез Hsp104p у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Биохимия. – 2012. – Т. 77. – С. 99–109.

Пятрикас Д.В., Рихванов Е.Г., Федосеева И.В., Варакина Н.Н., Русалева Т.М., Тauson E.L., Степанов А.В., Боровский Г.Б., Войников В.К. // Физиология растений. – 2014. – Т. 61. – С. 88–98.

СВЯЗЬ ИНДОЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА И РОСТА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ АНТИГЕННЫЕ ВИРУСНЫЕ БЕЛКИ ПРИ ЯДЕРНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Н.И. Рекославская, Р.К. Салаяев

ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
e-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru
salyaev@sifibr.irk.ru

Растительные экспрессивные системы обладают рядом преимуществ перед другими системами, продуцирующими антигенные белки опасных вирусных патогенов. К достоинствам растений относят ряд посттрансляционных модификаций получаемых антигенных белков, например, гликолизирование и фолдинг, происходящие по эукариотическому типу, что позволяет им индуцировать синтез нейтрализующих антител при вакцинации теплокровных, распознающих эпитопы вирусных белков при инфекции в более широком диапазоне.

Но, к сожалению, синтезируемые вирусные антигенные белки в трансгенных растениях нередко подавляют важные метаболические звенья и по существу являются ингибиторами роста растений, причем это ингибирование роста достаточно трудно устранить, так как не известны биохимические причины, препятствующие росту трансгенных растений – продуцентов вирусных белков.

Для улучшения гормонального (или ауксинового) статуса растений, продуцирующих химерный антигенный белок TBI-HBS (HIV-1), было решено ввести в трансгенные растения дополнительно ген *ugt/iaglu*, кодирующий синтез ИУК-глюкоза синтазы (УДФГ-трансферазы), выделенный ранее нами из кДНК проростков кукурузы, клонируемой в библиотеке генов фага Лямбда и помещенный в экспрессивный вектор pBluescript.

В настоящее время в биологических и медицинских исследованиях широко изучается роль генов семейства *ugt*, которые присутствуют у всех живых организмов. Например, УДФГ-трансферазы используют в качестве биомаркеров при трансплантологии для оценки эффективности иммуносупрессии и толерантности пациента.

При химиотерапии рака изучение спектра полиморфизма генов *ugt* используется для прогноза выживаемости пациентов в ходе лечения.

У растений известно около 200 семейств генов *ugt*, которые выполняют важные функции связывания ксенобиотиков широкого плана, а также и другие функции.

Для изучения роли гена *ugt/iaglu* было решено оценить индольный метаболизм в клетках растений кукурузы, учитывая разнообразие индольного метаболизма у этого вида. Данные, полученные на модельном растении кукурузы, очевидно, могли бы быть приложимы к другим трансгенным растительным объектам, в которые этот ген вводится.

Результаты

1. Характеристика индольного метаболизма в растениях кукурузы и роль гена *ugt/iaglu*, кодирующего ИУК-глюкоза синтазу (УДФГ-трансферазу)

Наиболее богатым объектом по метаболизму и содержанию индольных веществ у кукурузы является созревающий эндосперм. Поэтому анализ индольного метаболизма проводили на этом объекте, используя радиоактивные предшественники биосинтеза ИУК: ^3H -индол и ^{14}C -триптофан. Созревающий эндосперм гомогенизировали и центрифугировали, при этом получали 3 фракции: супернатант, представляющий собой цитозоль, фракцию этиопластов и слой амилопластов. Амилопласты, которые являются по сути кукурузным крахмалом, не выявили способности к биосинтезу ИУК из предшественников, поэтому фракцию амилопластов отбрасывали. Слой этиопластов, хорошо различаемый по цвету и по способности к ресуспендированию в буфере, от амилопластов отделялся в достаточно чистом виде. Поэтому сравнение биосинтеза

ИУК из предшественников проводили в двух фракциях: в цитозоле и в этиопластах.

Оказалось, что в этиопластах синтез ИУК осуществляется из триптофана, а в цитозоле большей частью из индола. При этом второй путь, по всей вероятности, может осуществляться путем прямого превращения ^3H -индола в ^3H -индолилуксусную кислоту. По данным ГЖХ-ХРОМАСС были обнаружены пики индола и ИУК после введения индола во фракцию цитозоля. С другой стороны, триптофан в цитозоле слабо превращался в ИУК, но очень интенсивно использовался для синтеза ИУК во фракции этиопластов, что было подтверждено анализом радиоактивности во фракциях ВЭЖХ при анализе реакционной смеси биосинтеза ИУК из триптофана.

Таким образом, было установлено присутствие двух путей биосинтеза ИУК: из индола в цитозоле и в этиопластах из триптофана. Эти данные находятся в соответствии с результатами, полученными группой Wright et al. [1982], которые показали, что в ауксотрофных по триптофану мутантах кукурузы, называемых «оранжевый перикарп», отсутствует функциональная β -субъединица триптофансинтазы. Биосинтез ИУК у этих мутантов осуществляется напрямую из индола, а оранжевый цвет семян кукурузы обеспечивают продукты индольного метаболизма.

В развивающихся зерновках кукурузы происходят интенсивный биосинтез и связывание ИУК, которая, очевидно, необходима в запасенном виде для прорастания и первоначального роста проростков из семян. По сути говоря, початок кукурузы представляет собой многозародышевую структуру, а при нарушении биосинтеза и

накопления ИУК наблюдается недоразвитие семян кукурузы и происходит редуцированный рост початка, явление, которое приводит к формированию так называемых структур «baby-corn».

Система связывания ИУК в конъюгаты с различными соединениями достаточно известна у растений и хорошо изучена у кукурузы. В созревающем эндосперме кукурузы с помощью ИУК-глюкоза синтазы связывается с глюкозой до 98 % новосинтезированной ИУК, а в целом содержание свободной и связанной ИУК может достигать 0,5–1 мкмоль/мл суспензии жидкого эндосперма кукурузы.

Учитывая важную роль ИУК-глюкоза синтазы в метаболизме эндогенной ИУК у растений, было решено ввести ген *ugt/iaglu* в растения томата одновременно с геном TBI-HBS, для оптимизации ауксинового статуса у трансгенных растений с целью повышения продуктивности и образования большего количества плодов, синтезирующих химерный антигенный белок TBI-HBS.

2. Свободная и связанная ИУК и активность ИУК-глюкоза-синтазы (УДФГ-трансферазы) в трансгенных по гену *ugt/iaglu* растениях томата

Показано, что УДФГ-трансферазы осуществляют связывание различных лекарственных веществ в микросомах почек, печени, тонкого кишечника, а не в клетках всех тканей (Gill et al. 2012). Поэтому было интересно узнать, есть ли разница между цитозолем и пластидами (хлоропластами) в эффективности связывания ИУК у трансгенного по гену *ugt/iaglu* растений томата.

После трансформации возрасало содержание свободной и общей ИУК (свободная и связанная ИУК) в растениях томата в 1,5–2

Таблица 1
Изучение содержания свободной и общей ИУК и активности УДФГ-трансферазы в трансгенных растениях томата с геном *ugt/iaglu*

Вариант	Свободная ИУК, нг/г сырого веса	Общая ИУК, нг/г сырого веса	Удельная активность УДФГ-трансферазы, нмоль ИУК/мг белка в час в цитозоле	Удельная активность УДФГ-трансферазы, нмоль ИУК/мг белка в час в пластидах
Нетрансгенные томаты	15,7 ± 1,9	168,9 ± 4,5	78,7 ± 1,2	82,9 ± 1,4
Трансгенные томаты	31,4 ± 7,1	243,5 ± 10,3	538,5 ± 19,2	810,7 ± 28,4

раза. Это повышение содержания коррелировало с более высокой активностью УДФГ-трансферазы (ИУК-глюкоза синтазы) в трансгенных растениях томата (табл. 1).

Таким образом, в трансгенных растениях томата с геном *ugt/iaglu* было обнаружено более высокое содержание ИУК и усиление активности ИУК-глюкоза синтазы как в цитозоле, так и в пластидах.

3. Трансформация растений томата генами TBI-HBS и *ugt/iaglu*, молекулярно-биологические характеристики трансгенных растений

Трансгенные растения получали методом *in planta*. Для трансформации использовали *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 с рBINPLUS/ARS TBI-HBS Укоренившиеся на среде Мурасиге и Скуга, содержащей 50 мг/л канамицина, экспланты проверяли на содержание целевых генов TBI и HBS, используя для этого ПЦР, RT-ПЦР, саузерн и норзерн блот гибридизации, норзерн дот блот гибридизацию с включением ^{32}P -АТФ, а также мультиплексную ПЦР. Уровень экспрессии целевого химерного белка составлял примерно 20 нг/мг общего растворимого белка (ОРБ), определяемого с помощью иммуноферментного анализа.

4. Характеристика трансгенных растений томата с генами TBI-HBs и *ugt/iaglu*

При выращивании трансгенных растений, синтезирующих химерный антигенный белок TBI-HBs, составленный из последовательностей эпителий, индуцирующих образование Т- и В-лимфоцитов, мы наблюдали значительное торможение роста и плодоношения этих трансгенных растений, причем оно сохранялось до 7 поколения при тщательной селекции проростков. Особенно подавленным было плодоношение, которое выражалось в резком уменьшении количества завязей и развитием малосемянных или бессемянных плодов небольшого размера. С таких трансгенных растений было 3–7 плодов с куста, при этом было довольно много растений, не способных давать плоды. Улучшить всхожесть семян, их прохождение селекции и рост с дальнейшим плодоношением удавалось путем выдерживания

развитых зеленых или бланжевой спелости плодов в бытовом холодильнике при 8 °С в течение 1,5–2 месяцев. Эта обработка плодов сходна с яровизацией, приводящей к активации индольного статуса. Трансгенные растения, прошедшие холодовую обработку, выявили улучшение плодоношения и каждое растение давало плоды.

Эти нарушения роста и метаболизма трансгенных растений удавалось преодолеть, если одновременно с геном TBI-HBs в экспланты томата вводили ген *ugt/iaglu*. У этих растений не происходило торможение роста, количество плодов на растение было в 5–10 раз больше. В плодах присутствовал антигенный белок TBI-HBs.

Морфологически у трансгенных по гену *ugt/iaglu* растений были более развиты листья, у которых масса 1 листа достигала $29,27 \pm 7,80$ г по сравнению с листьями контрольных растений с массой в $8,71 \pm 3,69$ г. Площадь листа трансгенного томата также была в 3 раза больше по сравнению с контрольными листьями. Увеличение размера листьев свидетельствует об усилении в них ауксинового статуса.

Исходя из этого, можно предположить, что синтез ИУК в цитозоле значительно редуцирован у трансгенных по гену TBI-HBs растений, что приводит и к снижению роста и плодоношения. Введение гена *ugt/iaglu* увеличивает уровень ИУК как свободной, так и связанной не только в цитозоле, но и в пластидах. Учитывая высокую способность к синтезу ИУК в пластидах из триптофана, можно предположить, что именно ИУК, синтезируемая в пластидах, большей частью обеспечивает рост трансгенных по гену TBI-HBs растений томата при дополнительном введении гена *ugt/iaglu* в эти растения.

Таким образом, множественность путей биосинтеза ИУК в растениях, кодируемых в разных геномах, можно использовать как дополнительный фактор поддержания их роста при нарушениях, вызываемых прокаротиотическими генами, если обеспечить связывание и сохранность ИУК с помощью УДФГ-трансферазы (ИУК-глюкоза синтазы), стабилизируя гормональный статус.

МЕХАНИЗМ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ РЕТРОГРАДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ И РАСТЕНИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ТЕПЛОВОГО СТРЕССА

Е.Г. Рихванов, И.В. Федосеева

ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
e-mail: eugene@sifibr.irk.ru

В ответ на мягкое повышение температуры в клетках эукариот индуцируется синтез белков теплового шока (БТШ), которые защищают клетку от гибели при действии жесткого теплового шока. В клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* основную роль в развитии термотолерантности играет белок Hsp104, а в клетках растений Hsp101. Однако до сих пор нет четкого ответа, как активируется экспрессия БТШ? Гипотеза об участии митохондрий в активации экспрессии БТШ появилась более 50 лет назад. В 1962 г. было показано, что тепловой стресс вызывает изменение пучков в полигенных хромосомах слюнных желез *Drosophila melanogaster*. Одновременно было продемонстрировано, что не только повышение температуры, но и обработка митохондриальными ингибиторами вызывает образование точно таких же пучков, что и тепловой стресс. Соответственно, было предположено, что митохондрии являются источником сигнала, который активирует экспрессию БТШ [Ashburner, Bonner, 1979]. Однако вскоре было показано, что мутанты дрожжей, которые не могут осуществлять окислительное фосфорилирование, не теряют способность синтезировать БТШ. На этом основании был сделан вывод, что наличие окислительного фосфорилирования не является обязательным условием для индукции синтеза БТШ [Mitchel, Morrison, 1983]. Согласно представлениям тех лет, синтез АТФ в процессе окислительного фосфорилирования являлся единственной функцией митохондрий. Однако, окислительное фосфорилирование не единственная функция митохондрий. Помимо производства энергии, эти органеллы участвуют в развитии программированной клеточной гибели и ретроградной регуляции экспрессии ядерных генов. Эти обстоятельства позволили рассмотреть роль

митохондрий в регуляции экспрессии генов БТШ под другим углом.

На первом этапе для изучения митохондриальной ретроградной регуляции экспрессии БТШ использовали дрожжи *S. cerevisiae*. Клетки *S. cerevisiae* представляют собой уникальную модель, которая, в отличие от растений, позволяет отделить процесс окислительного фосфорилирования от других функций митохондрий. Энергетический метаболизм дрожжей можно легко регулировать, используя питательные среды с различными источниками углерода. В клетках дрожжей можно получить *petite* мутанты, у которых отсутствует митохондриальная ДНК, а, следовательно, и компоненты дыхательной цепи. Но даже у таких мутантов функционируют митохондрии, что является необходимым условием для поддержания жизнеспособности. Оказалось, что нарушение функций митохондрий в результате мутации *petite* или обработки митохондриальными ингибиторами и разобщителями подавляет индукцию синтеза Hsp104 при мягком тепловом стрессе [Rikhvanov et al., 2005]. Таким образом, было доказано, что митохондрии играют активную роль в активации защитного ответа клетки в ответ на повышение температуры.

Сравнение дрожжей, использующих окислительный и ферментативный энергетический метаболизм, а также мутантов *petite*, продемонстрировало, что разобщители подавляли индукцию синтеза Hsp104 независимо от типа энергетического метаболизма. В то же время, ингибитор комплекса III антимицин А подавлял синтез Hsp104 только в клетках дрожжей, использующих окислительный энергетический метаболизм [Rikhvanov et al., 2005]. Даже в митохондриях дрожжей, у которых отсутствует функциональная дыхательная

цепь, митохондриальный мембранный потенциал (МП) поддерживается в результате электрогенного обмена АТФ⁴⁻ на АДФ³⁻. В таких клетках МП снижается при обработке разобщителями, но остается неизменным при действии ингибиторов дыхательной цепи. Следовательно, подавление синтеза Hsp104 при тепловом стрессе при нарушении митохондриальных функций не является следствием истощения АТФ, поскольку тот же самый эффект наблюдался в клетках, которые не могут дышать. Поскольку наблюдалась связь между способностью используемых агентов деполяризовать митохондриальную мембрану и ингибировать синтез Hsp104 при тепловом стрессе, то было предположено, что синтез Hsp104 подавляется в результате снижения МП.

Выводы, полученные с помощью дрожжевых клеток, оказались справедливы для клеток растений. Нарушение митохондриальных функций подавляло активацию экспрессии гена *HSP101* в культуре клеток *Arabidopsis thaliana* при действии теплового стресса [Rikhvanov et al., 2007]. Следовательно, агенты, способные при данных экспериментальных условиях снижать МП, подавляют экспрессию *HSP104/HSP101* при действии теплового стресса. Полученные результаты ясно указывали, что митохондриальная ретроградная регуляция определяет активацию экспрессии генов при повышении температуры. Этот процесс не зависит от окислительного фосфорилирования, но в то же время, зависит от поддержания МП.

Что же происходит с МП при действии теплового стресса? Было показано, что тепловой стресс приводит к повышению МП в культуре клеток млекопитающих и это событие сопровождается активацией экспрессии БТШ [Balogh et al., 2005]. Оказалось, что аналогичное событие происходит у дрожжей и растений. Тепловой стресс вызывал повышение МП в клетках *S. cerevisiae* [Федосеева и др., 2012] и клетках *A. thaliana* [Пятрикас и др., 2014]. Зависимость между повышением МП и активацией экспрессии *HSP104/HSP101* была подтверждена при использовании амиодарона. Обработка амиодароном при обычной температуре инкубации приводила к повышению МП

и активации экспрессии *HSP104/HSP101* в клетках дрожжей [Федосеева и др., 2012] и клетках *A. thaliana* [Пятрикас и др., 2014]. Полученные результаты ясно указывали, что повышение МП является необходимым условием для активации экспрессии *HSP104/HSP101* в клетках дрожжей и растений. Тем не менее, положительная корреляция между МП и экспрессией *HSP104/HSP101* не является строгой и выполняется только в условиях теплового стресса. При обычных условиях инкубации протонофор CCCP снижал МП и активировал экспрессию *HSP104/HSP101* [Федосеева и др., 2012; Пятрикас и др., 2014].

Что является причиной повышения МП? Гиперполяризация внутренней мембраны наблюдается в самых различных типах клеток и при самых разных стрессовых воздействиях. Показана связь между повышением уровня кальция в цитозоле [Ca²⁺]_{цит} и повышением МП [Balogh et al., 2005]. Поскольку в клетках растений при тепловом стрессе происходит повышение [Ca²⁺]_{цит} [Saidi et al., 2011], было изучено изменение уровня [Ca²⁺]_{цит} в клетках *A. thaliana*. Оказалось, что повышение МП при обработке амиодароном и тепловом стрессе сопровождалось повышением [Ca²⁺]_{цит} [Пятрикас и др., 2014]. Следовательно, наблюдается зависимость между повышением [Ca²⁺]_{цит} и МП. Тем не менее, при обычной температуре инкубации протонофор CCCP снижал МП и, в то же время, повышал [Ca²⁺]_{цит}. Поскольку снижение МП в клетках млекопитающих приводит к выходу Ca²⁺ из митохондрий в цитозоль, было предположено, что аналогичное событие происходит в клетках растений. Действительно, комбинированное действие CCCP и теплового стресса приводило к синергическому повышению [Ca²⁺]_{цит}. Это могло быть следствием суммирования двух одновременных процессов: поступления Ca²⁺ в цитозоль через плазматическую мембрану и выхода Ca²⁺ из митохондрий в цитозоль. На этом основании было предположено, что CCCP ингибирует экспрессию *HSP104/HSP101* при действии теплового стресса в клетках дрожжей [Федосеева и др., 2012] и растений [Пятрикас и др., 2014] в результате нарушения сигнатуры Ca²⁺, необходимой для эффективной активации

экспрессии изучаемых нами генов. На основании полученных результатов и литературных данных нами была сформулирована гипотетическая модель митохондриальной ретроградной регуляции экспрессии генов БТШ при повышении температуры [Рихванов и др., 2014].

ЛИТЕРАТУРА

- Пятрикас Д.В., Рихванов Е.Г., Федосеева И.В., Варакина Н.Н., Русалева Т.М., Таусон Е.Л., Степанов А.В., Боровский Г.Б., Войников В.К. Митохондриальная ретроградная регуляция экспрессии *HSP101 Arabidopsis thaliana* при тепловом стрессе и действии амиодарона // Физиология растений. – 2014. – Т. 61. – С. 88–98.
- Рихванов Е.Г., Федосеева И.В., Пятрикас Д.В., Степанов А.В., Боровский Г.Б., Войников В.К. Механизм функционирования кальциевой сигнальной системы у растений при действии теплового стресса. Роль митохондрий в этом процессе // Физиология растений. – 2014. – Т. 61. – С. 155–169.
- Федосеева И.В., Пятрикас Д.В., Варакина Н.Н., Русалёва Т.М., Степанов А.В., Рихванов Е.Г., Боровский Г.Б., Войников В.К. Эффект амиодарона на термотолерантность и синтез Hsp104p у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Биохимия. – 2012. – Т. 77. – С. 99–109.
- Ashburner M., Bonner J.J. The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock // Cell. – 1979. – Vol. 17. – P. 241–254.
- Balogh G., Horvath I., Nagy E., Hoyk Z., Benko S., Bensaude O., Vigh L. The hyperfluidization of mammalian cell membrane acts as a signal to initiate the heat shock protein response // FEBS J. – 2005. – Vol. 272. – P. 6077–6086.
- Mitchel R.E., Morrison D.P. Assessment of the role of oxygen and mitochondria in heat shock induction of radiation and thermal resistance in *Saccharomyces cerevisiae* // Radiat. Res. – 1983. – Vol. 96, No 1. – P. 113–117.
- Rikhvanov E.G., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Rachenko E.I., Knorre D.A., Voinikov V.K. Do mitochondria regulate the heat-shock response in *Saccharomyces cerevisiae*? // Curr. Genet. – 2005. – Vol. 48. – P. 44–59.
- Rikhvanov E.G., Gamburg K.Z., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Fedoseeva I.V., Tauson E.L., Stupnikova I.V., Stepanov A.V., Borovskii G.B., Voinikov V.K. Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in *Arabidopsis* cell culture // Plant J. – 2007. – Vol. 52. – P. 763–778.
- Saidi Y., Finka A., Goloubinoff P. Heat perception and signalling in plants: a tortuous path to thermotolerance // New Phytol. – 2011. – Vol. 190. – P. 556–565.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОМОВ ЭНДЕМИЧНЫХ БАЙКАЛЬСКИХ АМФИПОД

Е.В. Романова¹, В.В. Алёшин², Р.М. Камалтынов¹, Д.Ю. Щербаков¹

¹ ФГБУН Лимнологический институт СО РАН, Иркутск
e-mail: info@lin.irk.ru

² НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва
e-mail: fxb@genebee.msu.su

Митохондриальный (мт) геном – удобный инструмент для проведения исследований в самых разнообразных областях биологии. Последовательности мт генов могут служить маркерами в филогенетических, популяционных и эволюционных исследованиях. Изучение последовательностей мт генов и межгенных районов исключительно важны для понимания особенностей важнейших физиологических процессов и явлений, таких как клеточное дыхание, апоптоз, старение и пр. С другой стороны, способ наследования мт ДНК – через цитоплазму яйцеклетки – позволяет исследовать популяционную внутриорганизменную ге-

нетику митохондрий, что, правда, требует исследований на уровне полногеномных последовательностей мт ДНК, поскольку именно они в отсутствие аппарата рекомбинации в митохондриях и являются единицей сегрегации.

Беспозвоночные рачки – амфиподы, обитающие в оз. Байкал – интересный модельный объект для исследования влияния на мт ДНК активных форм кислорода. Для озера Байкал характерны низкие температуры воды, нейтральный уровень pH, а также высокое содержание кислорода на всей глубине [Галазий, 1987]. Такие экологические факторы способствуют высокой сте-

пени свободно-радикального воздействия на митохондриальный геном байкальских организмов, и, следовательно, повышению внутриорганизменной изменчивости митохондриальных геномов.

Были расшифрованы и аннотированы мт ДНК четырех видов эндемичных байкальских амфипод: *Eulimnogammarus vittatus*, *Acantogammarus victorii*, *Eulimnogammarus cyaneus* и *Crypturops tuberculatus*. Определение нуклеотидных последовательностей проводили с помощью секвенаторов нового поколения Illumina HiSeq и Illumina MiSeq.

Для видов *E. vittatus* и *A. victorii* были получены библиотеки чтений тотальной ДНК в количестве около 6,4 М и 6,3 М парных чтений соответственно (Illumina HiSeq, длина чтения – 100). Из них для дальнейшего анализа были отобраны чтения, принадлежащие мт ДНК. Для видов *E. cyaneus* и *C. tuberculatus* были получены ампликоны мт ДНК. Нами были сконструированы праймеры для амплификации двух перекрывающихся фрагментов мт генома на основании выровненных последовательностей фрагментов гена первой субъединицы цитохром оксидазы (*COI*) и гена 16S рРНК (*rrnL*) байкальских амфипод из базы данных GenBank. Также были найдены оптимальные условия амплификации. Полученные ампликоны мт ДНК были проанализированы на секвенаторе Illumina MiSeq (длина чтения 250). Для ампликонов вида *E. cyaneus* было получено 0,53 М парных чтений, а для вида *C. tuberculatus* – 0,59 М соответственно.

Для всех наборов данных провели оценку качества чтений программой FastQC и удаление адаптеров программой Trimmomatic [Lohse M. et al., 2012]. Сборку из чтений тотальной ДНК (виды *E. vittatus* и *A. victorii*) проводили программой Velvet 1.2.10 [Zerbino D.R., Birney E., 2008]. Были подобраны следующие параметры сборки: длина к-мера – 41; ожидаемое покрытие (exp_cov) – 10; порог покрытия (cov_cutoff) – 2; мин. кол-во пар чтений для создания скаффолда (min_pair_count) – 5. Далее, используя геном амфиподы *Gammarus duebeni* (NC_017760) в качестве референсной последовательности, полученные программой контиги были со-

браны в скаффолды, соответствующий мт геномам видов *E. vittatus* и *A. victorii*. Затем с помощью программы Bowtie 2 [Langmead B., Salzberg S., 2012] было проведено картирование полученных чтений на последовательности соответствующих скаффолдов. Сборку последовательностей мт геномов видов *E. cyaneus* и *C. Tuberculatus* проводили программой SPAdes ver. 2.5.1 [Bankevich A. et al., 2012]. Был задан весь спектр длин к-мера – 21, 33, 55, 77, 99, остальные параметры были заданы по умолчанию. Дальнейшая обработка данных секвенирования мт ДНК этих видов не отличалась от описанной для видов *E. vittatus* и *A. victorii*.

Длина полученных последовательностей мт геномов вида *E. vittatus* составила 15534 п.н. (среднее покрытие – 20), *A. victorii* – 17447 п.н. (среднее покрытие – 30), *C. tuberculatus* – 14376 п.н. (среднее покрытие – 90), *E. cyaneus* – 11991 п.н. (среднее покрытие – 70). Последовательности скаффолдов с картированными на них ридами мы визуализировали с помощью программы Tablet ver.1.13.07.31 [Milne I. et al., 2013]. Первоначальную (черновую) аннотацию полученных последовательностей мт ДНК проводили с помощью программы MITOS [Bernt M. et al., 2013]. С помощью программы MEME ver. 4.9.1 [Bailey T.L et al., 2009] был также проведен поиск повторов в контрольных регионах исследуемых последовательностей.

В результате проведенной работы нами были получены последовательности мт геномов четырех видов эндемичных байкальских амфипод. Проведена аннотация полученных последовательностей. Показано, что структура мт геномов (наличие и порядок тРНК, а также генов, кодирующих белки и рРНК) у исследованных видов практически не отличается. Различия в длине мт геномов обусловлены разной протяженностью контрольного региона у разных видов амфипод, для которого характерны повторенные последовательности. Показано также наличие в составе мт ДНК исследованных видов нуклеотидных полиморфизмов, большая часть которых сосредоточена в области контрольных регионов. Предположительно, данное явление – результат соматического

мутагенеза, интенсивность которого повышена вследствие обитания в насыщенной кислородом среде.

ЛИТЕРАТУРА

Галазий Г.И. Байкал в вопросах и ответах. – 4-е изд., испр. и доп. – Иркутск: Облмашинформ, 2004. – 304 с.

Bailey T., Bodén M., Buske F., Frith M., Grant C., Clementi L., Ren J., Li W., Noble W. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching // *Nucleic Acids Research*. – 2009. – Vol. 37. – P. 202–208.

Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A., Dvorkin M., Kulikov A., Lesin V., Nikolenko S., Pham S., Prjibelski A., Pyshkin A., Sirotkin A., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M., Pevzner P. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing // *Journal of Computational Biology*. – 2012. – Vol. 19, No 5. – P. 455–477.

Bernt M., Donath A., Jühling F., Externbrink F., Florentz C., Fritzsche G., Pütz J., Middendorf M., Stadler P. MITOS: Improved de novo Metazoan Mitochondrial Genome Annotation // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2013. – Vol. 69, No 2. – P. 313–319.

Langmead B., Salzberg S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // *Nature Methods*. – 2012. – Vol. 9. – P. 357–359.

Lohse M., Bolger A.M., Nagel A., Fernie A.R., Lunn J.E., Stitt M., Usadel B. RobiNA: a user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – Vol. 40. – P. 622–627.

Milne I., Bayer M., Cardle L., Shaw P., Stephen G., Wright F., Marshall D. Tablet-next generation sequence assembly visualization // *Bioinformatics*. – 2010. – Vol. 26, No 3. – P. 401–402.

Zerbino D.R., Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs // *Genome Research*. – 2008. – Vol. 18. – P. 821–829.

ОСОБЕННОСТИ ЯДЕРНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ ПРИ РАЗРАБОТКЕ МУКОЗАЛЬНЫХ ВАКЦИН

Р.К. Салаяев, Н.И. Рекославская

ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
e-mail: salyaev@sifibr.irk.ru

Включение в геном растений чужеродного генетического материала нередко вызывает ответную реакцию, выражающуюся в возникновении определенных трудностей дальнейшего их культивирования, получения плодов и т.д.

Особенно это бывает заметно при генетической трансформации растений конструкциями, содержащими гены, кодирующие синтез антигенных белков опасных вирусных заболеваний. В частности, это встречается при разработке мукозальных вакцин на основе растений.

В докладе рассмотрены варианты трудностей, с которыми встретились авторы при разработке кандидатных вакцин на основе трансгенных растений против таких опасных вирусных заболеваний как СПИД (ВИЧ-1), гепатит В и цервикальный рак.

При разработке бинарной кандидатной вакцины одновременно против ВИЧ-1 и гепатита В, которая проводилась совместно с ГНЦ ВБ «Вектор», ИХБиФМ СО РАН и лабораторией патологии растений

(штат Мериленд, США), в работе использовался химерный ген TBI-HBS, кодирующий 9 эпитопов антигенного белка ВИЧ-1 и поверхностный антигенный белок вируса гепатита В HBS.

Было получено более 2000 эксплантов растений томата, которые трансформировались классическим методом в верхушечную почку *in planta (in apex)* и методом *flamingo bill* (рис. 1).

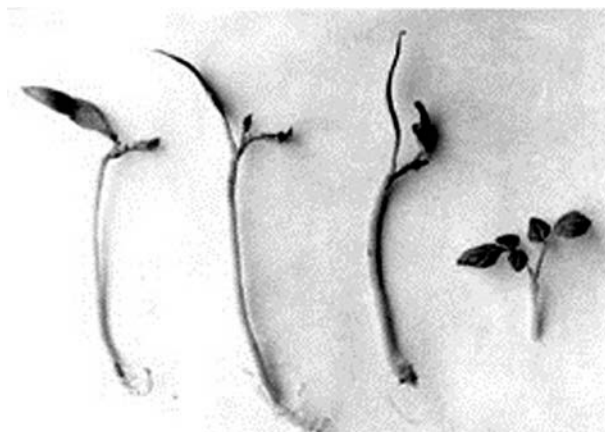


Рис. 1. Получение регенеранта томата по методу *flamingo bill*.

В результате почти все растения погибли после селекции на канамицине (50 мг/л). Сохранились считанные экземпляры, которые отличались от контроля значительно худшим ростом. Дополнительное введение в экспланты гена *ugt*, кодирующего синтез УДФГ-трансферазы (ИУК-глюкоза синтазы) привело к улучшению роста эксплантов, поскольку введенный дополнительный ген *ugt* оптимизировал гормональный статус в трансгенных растениях. Тем не менее трансформированные растения, выращиваемые *in vitro*, по непонятной причине обнаруживали массовую гибель при попытках перенесения в субстрат. Работать с таким материалом для получения полноценных плодоносящих растений было практически невозможно. Использовались разные среды и разные субстраты, но серьезных результатов не было. Наиболее удачным методом оказалась многоступенчатая адаптация эксплантов до перенесения в субстрат. Культивационные сосуды (Маженты) с трансгенными растениями *in vitro* открывали на несколько секунд (5–10 сек). На следующий день открывали на 15–20 сек, еще через день на 30–40 сек и далее на 1, 2, 3 мин, увеличивая интервал в течение месяца. Далее подбирали интервал и экспозицию, судя по состоянию растений. Через месяц открывали на 30–60 мин, а затем выдерживали с открытой крышкой. Такая адаптация позволила постепенно пе-

рестроить транспирационный и фотосинтетический аппараты эксплантов к обычным атмосферным условиям. В результате были получены растения, способные укореняться в различных субстратах (песок, почвенная смесь, торфоперегнойные горшочки). При такой адаптации гибель растений значительно сократилась и после выращивания в субстратах на их основе можно было получить рассаду трансгенных растений.

Второй метод агробактериальной ядерной трансформации – в завязь привел к деформированию значительной части плодов. Однако, несмотря на это, содержание антигенных белков при такой трансформации значительно увеличилось по сравнению с плодами, полученными от растений, трансформированных классическим методом.

В итоге, применяя различные способы трансформации, удалось получить вакцинный материал в виде свежих и высушенных тканей плодов томата, который содержал достаточное количество антигенного белка: от $4,8 \pm 1,89$ до $25,91 \pm 4,2$ нг/мг общего растворимого белка (ОРБ). Этот материал показал остаточную иммуногенность при испытании на мышах. Он давал четкий антительный иммунный ответ к TBI-HBS как в фекалиях, так и в сыворотке крови (рис. 2).

При разработке вакцины против гепатита В использовался ген *preS2-S*, который

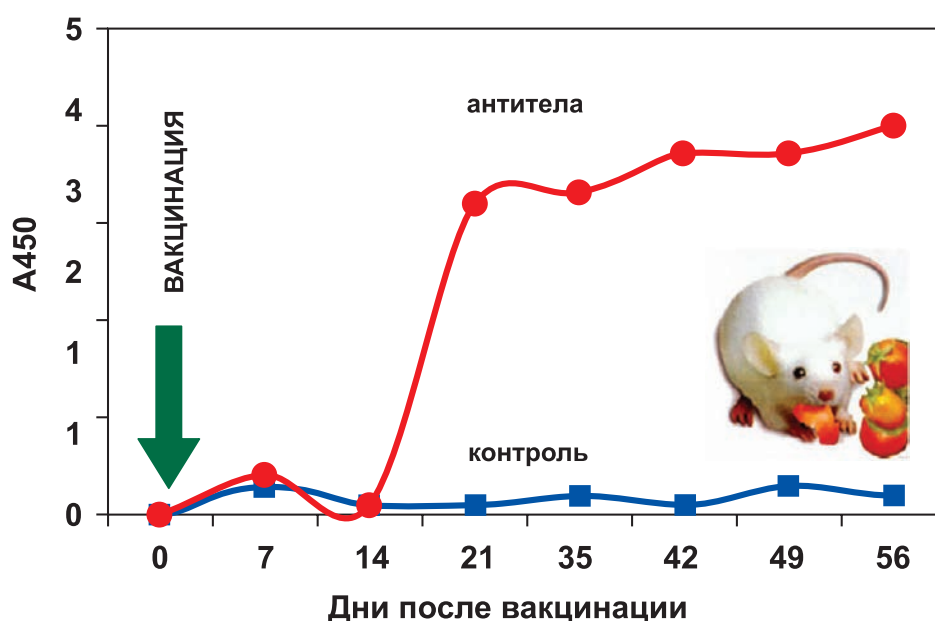


Рис. 2. Индукция синтеза антител после вакцинации плодами томата с белком TBI-HBS.

кодировал основной антигенный поверхностный белок S совместно с белком PreS2.

Используя ядерную трансформацию *in apex* с дополнительным геном *ugt* был получен вакцинный материал с геном *preS2-S*, в котором содержание антигенного белка в плодах было от 25 до 130 нг/мг ОРБ с достаточно высокой иммуногенностью.

С геном *preS2-S* был испытан также вариант с дополнительной агробактериальной трансформацией *in fruto*, который также дал неплохие результаты.

В следующей работе при разработке кандидатной вакцины против цервикального рака, вызываемого онкогенными вирусами папилломы человека, был использован способ дополнительной трансформации *in fruto*, который, как было установлено, дает достаточную эффективность трансформации и имеет ряд преимуществ, освобождая от наиболее трудоемких и капризных этапов трансформации через экспланты в вариантах *in apex* и *flamingo bill* (рис. 3).

В этой работе был использован целевой ген HPV16 L1, относящийся к наиболее онко-

генному типу вируса HPV16, вызывающего цервикальный рак, который на сегодня является вторым по встречаемости после рака грудной железы у женщин.

В генетическую конструкцию под р35S промотором была введена последовательность так называемого «омега лидера вируса табачной мозаики» и ген, кодирующий синтез антигенного белка L1 папилломавируса типа HPV16, а также селективный ген NPTII под убиквитиновым промотором. В качестве терминатора фрагмента «омега лидер» + HPV16 L1 был использован t35 S, а для фрагмента с геном NPTII – убиквитиновый.

Последовательность «омега лидер ВТМ», судя по литературным данным, выполняет роль энхансера трансляции, увеличивая в итоге синтез антигенного белка HPV16 L1. Применив разработанную генетическую конструкцию и трансформацию *in fruto*, удалось получить весьма неплохой выход антигенного белка: 140–287 нг/мг ОРБ, а в ряде случаев более 2000 нг/мг ОРБ.

Использование сухого вакцинного материала с целевым геном HPV16 L1 при

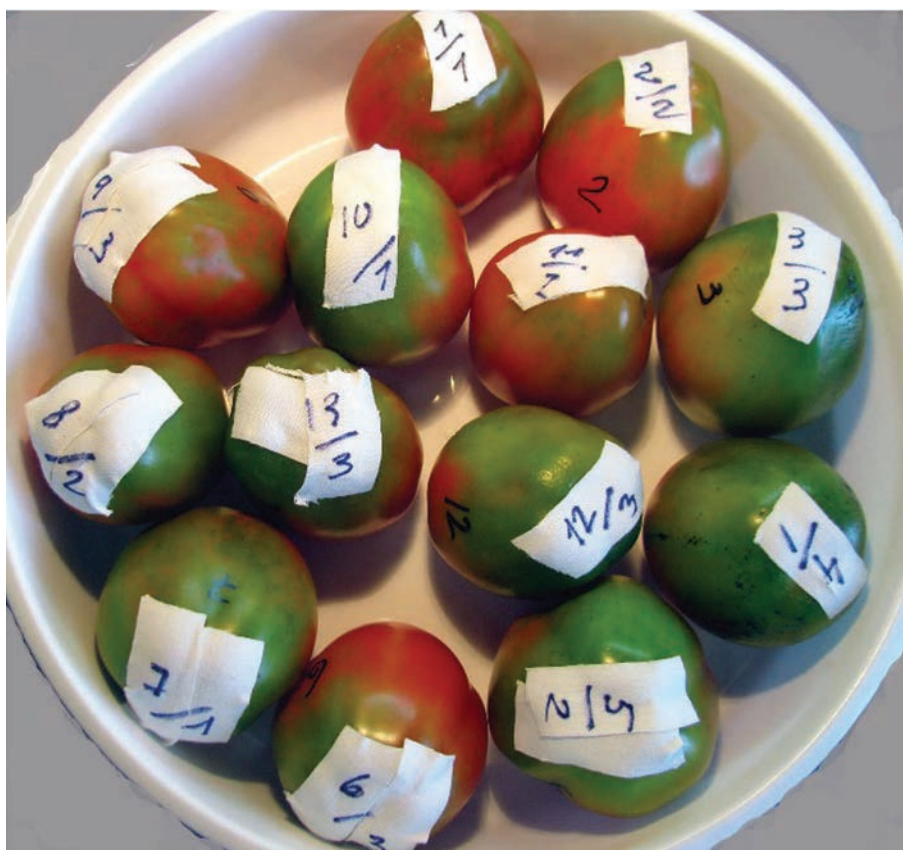


Рис. 3. Трансформация методом *in fruto*.

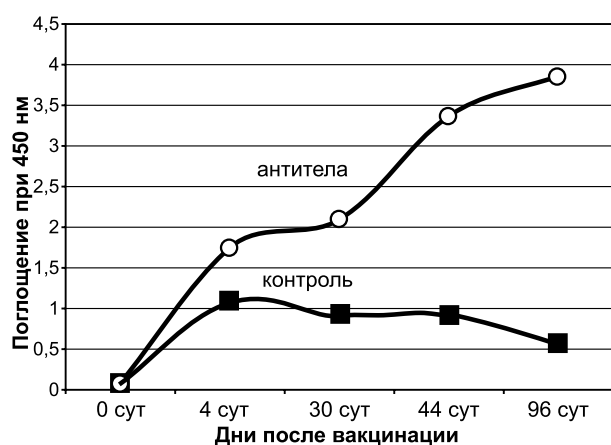


Рис. 4. Иммуноферментный анализ содержания антител в сыворотке крови мышей после вакцинирования плодами томата с геном HPV16 L1 (омега лидер BTM) и в контроле. Верхняя линия – сыворотка крови вакцинированных мышей, нижняя линия – сыворотка крови контрольных мышей.

пероральной вакцинации мышей показало, что на протяжении 96 суток и далее у подопытных животных сохраняется активный синтез антител в ответ на вакцинацию (рис. 4).

В заключение можно считать, что при ядерной генетической трансформации с применением различных методов трансформации, а также сочетанием генов и ступенчатой адаптацией эксплантов после трансформации, удастся преодолевать негативные последствия введения в геном растений чужеродных генов, принадлежащих опасным патогенным вирусам при разработке растительных мукозальных вакцин перорального применения.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОМОВ ОРГАНЕЛЛ У АЛЛОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ ЯЧМЕНЯ

М.Г. Синявская, Л.Н. Сивицкая, А.М. Шимкевич, Н.Г. Даниленко, О.Г. Давыденко

Институт генетики и цитологии НАН Б, Минск
e-mail: cytoplasmic@mail.ru

Сочетание одного и того же ядерного генома с различным цитоплазматическим окружением зачастую приводит к изменению взаимоотношений ядро-цитоплазма и отражается на особенностях кофункционирования генетических систем в растительной клетке. Ранее в лаборатории нехромосомной наследственности ИГиЦ НАНБ была создана модельная коллекция аллоплазматических линий ячменя (*Hordeum vulgare* (*Hordeum spontaneum*)) с маркированными геномами хлоропластов и митохондрий. На основании изучения данной коллекции показано, что замещение ядра на различных цитоплазматических фонах приводит к изменению ряда характеристик фотосинтетического аппарата: содержания хлорофиллов и каротиноидов, количества Q_b -невосстанавливающих центров ФСII, нефотохимического тушения хлорофиллов и др [Шимкевич и др., 2006].

Ранее нами был разработан макроэррей – система ДНК проб к геномам хлоро-

пластов и митохондрий (включающая все важнейшие гены органелл за исключением тРНК генов), нанесенная на мембрану [Синявская и др., 2012]. В вышеописанной модельной системе с помощью макроэррей гибридизации (макроэррей – из проб к геномам хлоропластов, митохондрий и отдельных генов ядра) нами были исследованы «steady-state» уровни транскриптов отдельных генов органелл, являющиеся итогом динамического баланса процессов транскрипции и деградации РНК в клетке. Данные макроэррей были верифицированы ПЦР в реальном времени.

Выделена тотальная РНК из двух контрастных по фотобиологическим показателям линий Роланд (W_8)⁸, Роланд (W_3)⁸ и родительского сорта ячменя Роланд, получена кДНК и помечена биотином. Проведены эксперименты по гибридизации макроэррей с биотинилированными пробами, проведена хромогенная детекция результатов гибридизаций и относительная количественная оценка уровня отдельных

Определение относительного уровня транскрипта в аллоплазматических линиях ячменя по сравнению с родительским сортом ячменя Роланд

Ген	Роланд (W ₈) ⁸			Роланд (W ₃) ⁸		
	ΔCt	$E_{target}^{\Delta Ct}$	Ratio (E_{target}/E_{ref})	ΔCt	$E_{target}^{\Delta Ct}$	Ratio (E_{target}/E_{ref})
<i>psbA</i>	0,06	1,04	1,35	–0,1	0,93	0,45
<i>psbD</i>	–0,35	0,78	1,01	0,33	1,26	0,62
<i>cob</i>	–0,29	0,82	1,06	0,003	1,00	0,49

транскриптов в «steady-state» пуле тотальной РНК растений.

Макроэррей гибридизация показала, что относительное накопление уровня транскриптов между сортом ячменя Роланд и его аллоплазматическими потомками по *cox1*, *cox2*, *cox3*, *Nad2*, *Nad7*, *ccmFc*, *atp6* генам отличается незначительно, тогда как для других генов – *psbA*, *psbB*, *psbD*, *psbC*, *orf359*, *ccmFn*, *Cab1*, *Nad3*, *Nad1*, *mat* – сильно варьирует.

Результаты макроэррей верифицированы ПЦР в реальном времени. В качестве референсного гена был взят RLI ген (RNase L inhibitor-like protein) [Gimernez et al., 2011]. Real-time ПЦР была выполнена для генов *psbA*, *psbD*, *cob*. Анализ результатов выполняли методом PFAFFL [Pfaffl, 2004], расчеты производили относительно результатов, полученных для референсного гена – RLI.

Показано, что уровень транскриптов генов *psbA* и *cob* у аллоплазматической линии Роланд (W₃)⁸ относительно родительского сорта Роланд (донора ядра) снижен почти в 2 раза, а гена *psbD* примерно на 30 %, что согласуется с результатами макроэррей гибридизации. По макроэррей для гена *psbA* наибольший уровень транскрипта детектируется у аллоплазматической формы ячменя с цитоплазмой W8, а наименьший у аллоплазматической формы ячменя с цитоплазмой W3. Это напоминает полученные ранее данные по фотобиологии вышеописанных форм.

Как известно, наиболее чувствительным к неблагоприятным внешним воздействиям компонентом Q_B-центров является продукт гена *psbA* белок D1 [Kettunen et al., 1997]. Возможно совмещение в одном растении ядра и цитоплазмы от разных форм ячменя действует аналогично внешнему стрессу и поэтому экспрессия отдельных генов пластид и митохондрий изменяется в ответ на такую трансформацию.

ЛИТЕРАТУРА

Синявская М.Г., Сивицкая Л.Н., Давыденко О.Г. Создание макроэррей для изучения экспрессии геномов органелл у злаков // Генетика и биотехнология XXI века: междун. научн. конфер., 8–11 октября 2012 г. – Минск, 2012. – С. 22.

Шимкевич А.М., Макаров В.Н., Голоенко И.М., Давыденко О.Г. Функциональное состояние фотосинтетического аппарата у аллоплазматических линий ячменя // Экологическая генетика. – 2006. – Т. IV, № 2. – С. 37–42.

Gimernez M.J., Pistorn F., Atienza S.G. Identification of suitable reference genes for normalization of qPCR data in comparative transcriptomics analyses in the Triticeae // Planta. – 2011. – Vol. 233, No 1. – P. 163–173.

Kettunen R., Pursiheimo S., Rintamaki E., Van Wijk K.J., Aro E.M. Transcriptional and translational adjustments of *psbA* gene expression in mature chloroplasts during photoinhibition and subsequent repair of photosystem II // Eur. J. Biochem. FEBS. – 1997. – Vol. 247. – P. 441–448.

Pfaffl M.W. Quantification strategies in real-time PCR // A-Z of quantitative PCR- (ed.) S.A. Bustin. – 2004. – Ch. 3. – P. 87–112.

**ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ/ДЕФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ
КАК ОДИН ИЗ ВЕДУЩИХ МЕХАНИЗМОВ ТОНКОЙ РЕГУЛЯЦИИ
МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ МИТОХОНДРИЙ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ**

И.Ю. Субота, А.Ш. Арзиев, М.В. Кулинченко, Ю.М. Константинов

ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
e-mail: subota@sifibr.irk.ru

Митохондрии являются динамично изменяющимися органеллами, которые выполняют ряд жизненно важных функций в эукариотической клетке. В дополнение к их роли в энергетическом метаболизме митохондрии вовлечены в ряд процессов промежуточного метаболизма, биохимического синтеза, кальциевого сигналинга, редокс-регуляцию и апоптоз [Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003; Pagliarini and Dixon, 2006]. Все это требует сложной системы внутриклеточной передачи сигнала, способной отвечать быстро на изменения в клеточном энергетическом метаболизме. Регуляция ферментов за счет обратимой ковалентной модификации играет одну из ведущих ролей в тонком метаболическом контроле и это, пожалуй, главный механизм при передаче сигнала от таких экстраклеточных стимулов как гормоны или свет [Cohen, 2002; Huber and Hardin, 2004; Plaxton, 2004; Moorhead et al., 2005].

Протеомные исследования последнего десятилетия показали широкую распространенность процесса фосфорилирования белков в митохондриях высших растений [Millar et al., 2004; Juszczuk et al., 2007; Klodmann et al., 2011]. Предполагается, что в клетках растений около 1000–2000 различных белков могут регулироваться с помощью фосфорилирования/дефосфорилирования.

Фосфорилирование/дефосфорилирование субъединиц дыхательной цепи митохондрий может рассматриваться в качестве одного из возможных механизмов, регулирующих активность синтеза АТФ. В митохондриях высших растений данной посттрансляционной модификации могут подвергаться флавопротеин сукцинатдегидрогеназы, β субъединица МРР комплекса III, а также субъединицы α и β F_0F_1 – АТФазы и др. [MacKintosh, 2004]. Как показано

для митохондрий животных, существует корреляция между соотношением процессов синтеза и гидролиза АТФ и уровнем фосфорилирования/дефосфорилирования субъединицы с F_0F_1 -АТФазы [Evtodienko et al., 2000]. Между тем вопрос о механизмах регуляции активности субъединиц F_0F_1 -АТФазы у растений остается открытым.

В наших исследованиях мы изучали действие синтетического цитокина ВАР (6-бензиламинопурин) на фосфорилирование белков изолированных митохондрий кукурузы. Как показано в литературе, ВАР в концентрации 100 мМ при использовании малата в качестве субстрата ингибирует дыхание митохондрий на 85 %. В подобных условиях действие ВАР аналогично ротенону (ингибирование на 87 %), т.е. ингибирует I комплекс. При использовании сукцината в качестве субстрата ВАР ингибирует окисление сукцината, связанное с цианид-чувствительным путем. При этом как при окислении малата, так и при окислении сукцината ВАР может ингибировать альтернативную оксидазу [Brineger et al., 1996]. Из литературы также известно, что изолированные митохондрии имеют высокую аффинность к ВАР. В митохондриях, полученных из этиолированных проростков фасоли обнаружены 2 первичные мишени для ВАР – это α или β субъединицы АТФазы, а также 32 kDa интегральный мембранный белок [Chauveau et al., 1983].

Нами показано, что ВАР снижает фосфорилирование белков, особенно в отношении α субъединицы АТФазы. Обнаружено, что в среднем ВАР снижает фосфорилирование белков на 51,4 %, а ротенон (ингибитор I комплекса электрон-транспортной цепи митохондрий) незначительно снижает активность этого процесса. Действие ВАР более сходно с совместным действием мало-

ната (ингибитор II комплекса дыхательной цепи митохондрий) и салицилгидроксамовой кислоты (ингибитор альтернативной оксидазы), чем с ротеноном. Также исследовалась активность дыхательных комплексов митохондрий кукурузы при обработке ВАР. При использовании для определения активности комплекса I и комплекса II методики BN-PAGE различий в уровне активности этих комплексов при обработке ВАР по сравнению с контролем не было обнаружено. При этом изучение изменения активности V комплекса митохондриальной дыхательной цепи под действием ВАР показало значительное снижение активности митохондриальной АТФазы под действием данного агента. Действие ВАР было сходно с действием специфического ингибитора мембрансвязанной митохондриальной АТФазы олигомицина, а также генистеина. Как известно, генистеин является изофлавоноидом растительного происхождения. Биохимическое действие в клетке генистеина достаточно сложное. Он является ингибитором некоторых тирозиновых протеинкиназ, ингибитором топоизомеразы и др. Как многие изофлавоноиды генистеин обладает мощным антиоксидантным действием. Ингибирование активности АТФазы генистеином сходно с действием такого известного антиоксиданта как ресвератрол. Как показано мощный эффект ресвератрола, как и генистеина связан, прежде всего, с ингибированием активности митохондриальной АТФазы [Zheng, Ramires, 1993]. Возможно эффект ВАР на активность АТФазы

связан также с защитными функциями. Так как при исследовании фосфорилирования митохондриальных белков под действием ВАР было показано, что активность данного процесса снижается, можно предположить, что изменение уровня фосфорилирования ряда субъединиц АТФазы под действием данного гормона приводит к изменению активности всего комплекса и это возможно один из механизмов защиты митохондрий от окислительного повреждения.

ЛИТЕРАТУРА

- Евдотиенко Ю.В., Азарашвили Т.А., Теплова В.В., Одиноква И.В., Сарис Н.-Э. Регуляция ионами кальция окислительного фосфорилирования во внутренней мембране митохондрий печени крысы // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – С. 1210–1214.
- Bykova N.V., Egsgaard H., Moller I.M. Identification of 14 New Phosphoproteins Involved in Important Plant Mitochondrial Processes // FEBS Lett. – 2003. – Vol. 540. – P. 141–146.
- Chauveau M., Dizengremel P., Roussux J. Interaction of benzylaminopurine with electron transport in plant mitochondria during malate oxidation // Physiol. Plant. – 1983. – Vol. 73. – P. 945–948.
- Juszczuk I.M., Bykova N.V., Moller I.M. Protein Phosphorylation in Plant Mitochondria // Physiol. Plant. – 2007. – Vol. 129. – P. 90–103.
- Klodmann J., Braun H.-P. Proteomic approach to characterize mitochondrial complex I from plants // Phytochemistry. – 2011. – Vol. 72. – P. 1071–1080.
- Paglierini D.J., Dixon J.E. Mitochondrial modulation: Reversible phosphorylation takes center stage? // Trends in Biochemical Sciences. – 2006. – Vol. 31. – P. 26–34.
- Zheng J., Ramires V.D. Rapid inhibition of rat brain mitochondria proton F₀F₁-ATPase by estrogens: comparison with Na⁺, K⁺-ATPase of porcine cortex // Eur. J. of Pharmacol. – 1993. – Vol. 368. – P. 92–102.

ХАРАКТЕРИСТИКА РАСТЕНИЙ АРАБИДОПСИСА, МУТАНТНЫХ ПО РАЗЛИЧНЫМ КОМПОНЕНТАМ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ

В.И. Тарасенко, Е.Ю. Гарник, М.В. Кулинченко, Т.В. Потапова, Ю.М. Константинов

ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
e-mail: vslav@inbox.ru

Проведено исследование растений арабидопсиса, мутантных по трем субъединицам дыхательного комплекса I: (а) линия, мутантная по гену *ndufs4* (Fro, at5g67590), кодирующему субъединицу размером

18 кДа, локализованную в Fe-S-субкомплексе (периферическом «плече» комплекса I); (б) мутант по гену *ndufa9* (at2g20360), кодирующему субъединицу размером 39 кДа, локализованную в β-субкомплексе мембранного

«плеча» комплекса I; (в) мутант по гену *ca2* (*at1g47260*), кодирующему одну из пяти субъединиц, составляющих карбоангидразный субкомплекс, характерный только для растительного комплекса I.

Проведенное генотипирование позволило выявить мутантные растения, гомозиготные по исследуемым вставкам тДНК. Анализ экспрессии показал отсутствие в растениях изучаемых линий функциональных транскриптов инактивируемых генов. Наиболее яркие фенотипические отличия были отмечены для растений линии *Fro*. Семена мутантных растений отличались задержкой прорастания, составлявшей 1,5–2 сут. Как количество розеточных листьев, так и диаметр розетки растений мутантной линии был снижен в течение первого месяца развития. Несмотря на существенную задержку цветения и карликовость, растения *Fro* обладали продуктивностью, сходной с таковой растений дикого типа. Интересной особенностью изучаемых растений была более темная окраска листьев. Определение содержания хлорофилла подтвердило, что листья растений линии *Fro* содержат существенно больше хлорофилла (рис. 1).

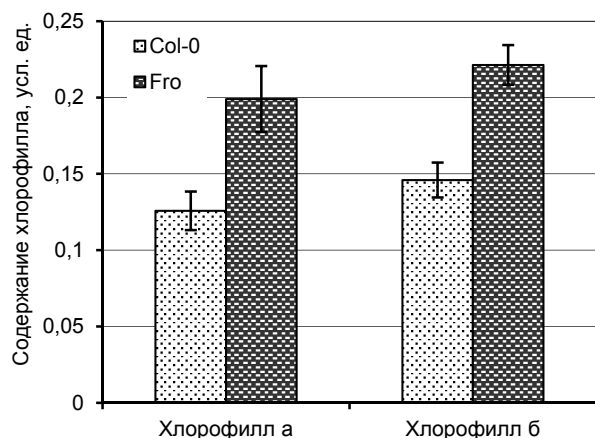


Рис. 1. Содержание хлорофилла в листьях растений дикого типа и мутантной линии *Fro*.

Семена мутантных растений линии *Ndufa9* также проявляли задержку в прорастании, однако степень этой задержки была меньше, чем у семян линии *Fro*. Рост и развитие растений *Ndufa9* были замедлены, но в меньшей степени, чем у растений *Fro*. Таким образом, по фенотипическим проявлениям линия *Ndufa9* занимает промежуточное по-

ложение между растениями дикого типа и линией *Fro*. Исследование скорости роста и развития растений линии *CA2* не выявило достоверных различий между ними и растениями дикого типа. По-видимому, отсутствие кодируемого геном *ca2* белка не оказывает выраженного влияния на жизнедеятельность растения.

С целью выявления последствий выключения генов, кодирующих три субъединицы комплекса I, на молекулярно-биохимическом уровне, были исследованы соотношение, полипептидный состав и активность комплексов дыхательной цепи, выделенных из митохондрий растений арабидопсиса дикого типа и мутантных линий *Fro*, *CA2* и *Ndufa9*. Показано, что отсутствие субъединицы *Fro* приводит к полному исчезновению комплекса I и суперкомплекса I+III (рис. 2). Как и следовало ожидать, активность комплекса I, определенная гистохимическим окрашиванием в геле, также отсутствовала. По-видимому, отсутствие субъединицы *Fro* приводит к диссоциации или невозможности сборки полноразмерного комплекса I. Анализ линии, мутантной по субъединице *Ndufa9*, показал существенное снижение содержания и активности комплекса I, но не полное исчезновение комплекса. В растениях линии *CA2*, мутантных по субъединице карбоангидразного субкомплекса, входящей в состав комплекса I, содержание и активность дыхательного комплекса оставались практически неизменными (рис. 2). Таким образом, отсутствие этой субъединицы очевидно не оказывает влияния на сборку и проявление активности комплекса I.

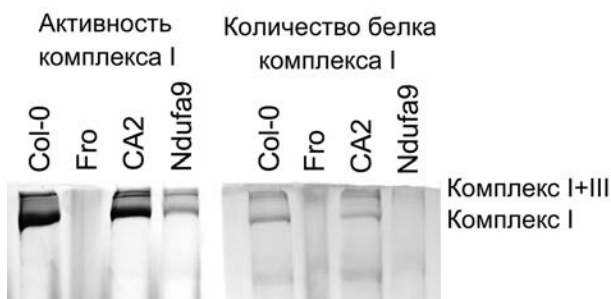


Рис. 2. Активность и количество белка комплекса I в митохондриях растений дикого типа (*Col-0*) и трех линий, мутантных по различным субъединицам комплекса I. После выделения митохондрий из листьев растений, полученные фракции белков внутренней мембраны были разделены в ПАА-геле (метод BN-PAGE).

Для того чтобы попробовать выяснить причины частичной потери активности комплекса I в мутантах *Ndufa9*, был проведен анализ полипептидного состава комплексов внутренней мембраны митохондрий, выделенных из нормальных и мутантных растений, методом двумерного электрофореза. Показано, что содержание полипептидов, составляющих комплекс I, существенно снижено. Кроме того, следует отметить исчезновение нескольких отдельных полипептидов из состава комплекса I. Таким образом, отсутствие субъединицы *Ndufa9* в мутантной линии арабидопсиса приводит к специфическим только для этой линии изменениям в полипептидном составе комплекса I.

Мы исследовали также уровень экспрессии ряда митохондриальных и ядерных генов, кодирующих митохондриальные белки, в мутантных линиях. Экспрессия изученных ядерных генов, кодирующих субъединицы дыхательных комплексов, не изменялась в мутантных растениях. В то же время, уровень транскриптов ряда митохондриальных генов был заметно выше в растениях *Fro*. Наибольшее возрастание уровня экспрессии было характерно для гена *scmF*, кодирующего белок, участвующий в биогенезе цитохрома C. Содержание транскриптов генов *nad4* и *cox3* также было выше в мутантных растениях, в то время как уровень транскриптов генов *cox1* и *cob* оставался почти неизменным. Таким образом, нами показано, что инактивация комплекса I приводит к возрастанию уровня экспрессии митохондриальных генов. Сравнение уровня транскриптов ядерных генов, кодирующих митохондриальные белки, показало возрастание уровня экспрессии гена *aox1a* – основного компонента альтернативного пути транспорта электронов – в листьях растений дикого типа, инкубированных на свету. При этом в растениях линии *Fro* данный паттерн регуляции экспрессии *aox1a* полностью отсутствовал. Более того, содержание транскрипта *aox1a* было многократно повышено в мутантах *Fro*, выдерживавшихся в темноте, сравнительно с мутантами на свету. Соответственно, уровень транскрипта *aox1a* в растениях *Fro* в темноте превышал уровень транскрипта в растениях дикого

типа, выдерживавшихся в тех же условиях, в несколько сотен раз.

Исследование внутриклеточного уровня активных форм кислорода в полученных нами суспензионных культурах клеток линии дикого типа и анализируемых мутантных линий выявило ощутимые различия. Показано, что внутриклеточный уровень активных форм кислорода значительно снижен в суспензионной культуре клеток линии *Fro* и, в меньшей степени, линии *Ndufa9*, на протяжении всего цикла субкультивирования. Обнаружены также отличия в степени возрастания уровня АФК в ответ на стрессовые воздействия. Уровень АФК в клетках, обработанных прооксидантом менадиолом и перекисью водорода, возрастал в несколько раз в клетках дикого типа, однако оставался почти неизменным в клетках линии *Fro*. Данный факт свидетельствует в пользу повышенной способности последних к детоксикации АФК, возможно связанной с постоянной мобилизацией в мутантных клетках систем антиоксидантной защиты.

На следующем этапе работы нами была изучена активность различных изоформ супероксиддисмутазы (СОД) – фермента, играющего ключевую роль в метаболизме АФК – в растениях линии *Fro* и дикого типа. В листьях растений *Fro* активность Cu/Zn-содержащей СОД (представленная преимущественно изоформой, локализованной в хлоропластах) была выше, чем в растениях дикого типа. При этом уровень активности митохондриальной Mn-содержащей СОД не отличался в исследуемых линиях. Таким образом, можно предположить, что дисфункция комплекса I в растениях не приводит к возникновению окислительного стресса в митохондриях, однако оказывает влияние на метаболизм АФК в хлоропластах.

В экспериментах, проводившихся с целыми растениями, нами показано, что в условиях недостаточного увлажнения при высоком уровне освещенности растения дикого типа накапливают в листьях в несколько раз большее количество антоцианов, чем мутантные растения линии *Fro*. Ранее, использование подобной системы – определение содержания антоцианов в листьях растений, подвергнутых комбинированному

воздействию засухи и повышенного уровня освещенности – позволило сделать вывод о сниженной стресс-устойчивости растений арабидопсиса, мутантных по альтернативной оксидазе АОХ1а [Giraud et al., 2008]. Наши данные свидетельствуют о том, что растения с дисфункцией комплекса I, напротив, оказываются более устойчивыми к данному стрессовому воздействию. Это позволяет предположить существование компенсаторного механизма, приводящего

к постоянно повышенному уровню устойчивости к стрессу у растений с нарушенным функционированием дыхательного комплекса I.

ЛИТЕРАТУРА

Giraud E., Ho L.H., Clifton R., Carroll A., Estavillo G., Tan Y.F., Howell K.A., Ivanova A., Pogson B.J., Millar A.H., Whelan J. The absence of ALTERNATIVE OXIDASE1a in Arabidopsis results in acute sensitivity to combined light and drought stress // Plant Physiol. – 2008. – Vol. 147. – P. 595–610.

ГИБЕЛЬ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ПРИ УМЕРЕННОМ ТЕПЛОВОМ ШОКЕ ЗАВИСИТ ОТ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА

И.В. Федосеева, Е.Г. Рихванов, Н.Н. Варакина, Т.М. Русалева, А.В. Федяева, Д.В. Пятрикас, А.В. Степанов, Г.Б. Боровский, В.К. Войников

ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
e-mail: fedoseeva@sifibr.irk.ru

Предполагается, что основной причиной гибели клетки после теплового шока является денатурация и агрегация клеточных белков [Kubota et al., 2009]. В то же время известно, что одной из причин гибели клеток дрожжей при различных стрессовых воздействиях является усиление продукции активных форм кислорода (АФК). Генерация АФК повышается в клетках дрожжей при действии различных про-апоптозных стимулов: в ответ на обработку NaCl, уксусной кислотой, гипохлоритом, при глюкозном голодании, что усиливает процесс гибели клетки при данных стрессовых воздействиях [Perrone et al., 2008]. Митохондрии играют важную роль в гибели клетки при стрессе [Guaragnella et al., 2012]. Тепловой шок может вызывать развитие программированной клеточной гибели (ПКГ) в клетках млекопитающих [Samali et al., 1999]. Однако остается неизвестным, может ли тепловой шок вызывать ПКГ в клетках дрожжей и какова роль митохондрий в этом процессе. Поэтому целью настоящей работы являлось изучение роли митохондрий в продукции АФК при тепловом воздействии. Для этого оценивали жизнеспособность, определяли изменение уровня генерации АФК и митохондриально-

го потенциала, используя штамм родительского типа W303-1B и изогенный ему *petite* мутант, у которого отсутствуют компоненты дыхательной цепи.

Материалы и методы

В работе использовали штамм родительского типа *Saccharomyces cerevisiae* W303-1B (Mata *ade2 his3 trp1 leu2 ura3*) и изогенный ему *petite* мутант. Выращивание дрожжей, определение термотолерантности, уровня генерации АФК по изменению флуоресценции 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) и митохондриального потенциала с помощью флуоресцентного красителя mitotracker orange (MO) проводили согласно ранее опубликованным методикам [Rikhvanov et al., 2005].

Результаты

Мутация в мтДНК, кодирующей отдельные субъединицы III и IV комплекса и F_0F_1 -компонента F_0F_1 -синтазы, у дрожжей приводит к появлению фенотипа дыхательной недостаточности, который проявляется в отсутствии дыхания и неспособности клеток *S. cerevisiae* расти на несбраживаемых источниках углерода, таких как этанол и глицерин. Несмотря на отсутствие функциональной дыхательной цепи *petite* мутанты имеют митохондрии, на внутренней мем-

бране которых поддерживается потенциал, а также функционируют F_1 -АТФ-синтаза, АДФ/АТФ-транслокатор и другие митохондриальные белки, кодируемые ядерной ДНК.

Чтобы изучить роль митохондрий в гибели клеток дрожжей, сравнили термотолерантность клеток штамма родительского типа и *petite* мутанта к действию умеренного теплового шока (45 °С). Полученные результаты показали, что устойчивость к тепловому шоку была выше у *petite* мутанта. Таким образом, нарушение митохондриальных функций в результате мутации *petite* защищало клетки от гибели при тепловом шоке (рис. 1А).

Известно, что усиление продукции АФК является главной причиной гибели при различных стрессовых воздействиях [Pergone et al., 2008]. Поэтому, чтобы изучить, почему мутация *petite* защищает клетки от гибели при тепловом шоке, сравнили продукцию АФК у родительского типа и мутанта. Оказалось, что тепловой шок 45 °С вызывал резкое усиление продукции АФК в клетках штамма родительского типа (рис. 1Б). В клетках мутанта *petite* при данных условиях теплового шока продукция АФК была гораздо ниже. Следовательно, способность мутации *petite* защищать клетки от гибели объясняется тем, что эта мутация снижает образование АФК.

Известно, что в ряде случаев увеличение продукции АФК происходит в результате повышения митохондриального потенциала

[Pozniakovsky et al., 2005]. Поэтому, в следующем эксперименте изучили изменение потенциала на внутренней митохондриальной мембране у родительского типа и *petite* мутанта. Полученные результаты показали, что тепловой шок 45 °С вызывал повышение митохондриального потенциала в клетках штамма родительского типа. У мутанта *petite* также происходило увеличение потенциала, но оно было крайне незначительно (рис. 1В).

Полученные выше результаты указывают, что повышение митохондриального потенциала сопровождается усилением генерации АФК в клетках дрожжей при тепловом шоке, что указывает на причинно-следственную связь между этими явлениями. Для доказательства этой связи изучили эффект 2,4-динитрофенола (ДНФ) на термотолерантность, митохондриальный потенциал и продукцию АФК в клетках штамма родительского типа и *petite* мутанта. ДНФ – это протонифор, который обеспечивает свободное прохождение протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану, вызывая падение протонного градиента. Изучение эффекта ДНФ на термотолерантность показало, что обработка данным агентом в момент теплового шока 45 °С значительно защищала клетки от гибели (рис. 2А). Как и ожидалось, ДНФ снижал повышение митохондриального потенциала при тепловом шоке (рис. 2Б), при этом ингибируя образование АФК (рис. 2В). Таким образом, ДНФ повышает термотолерантность

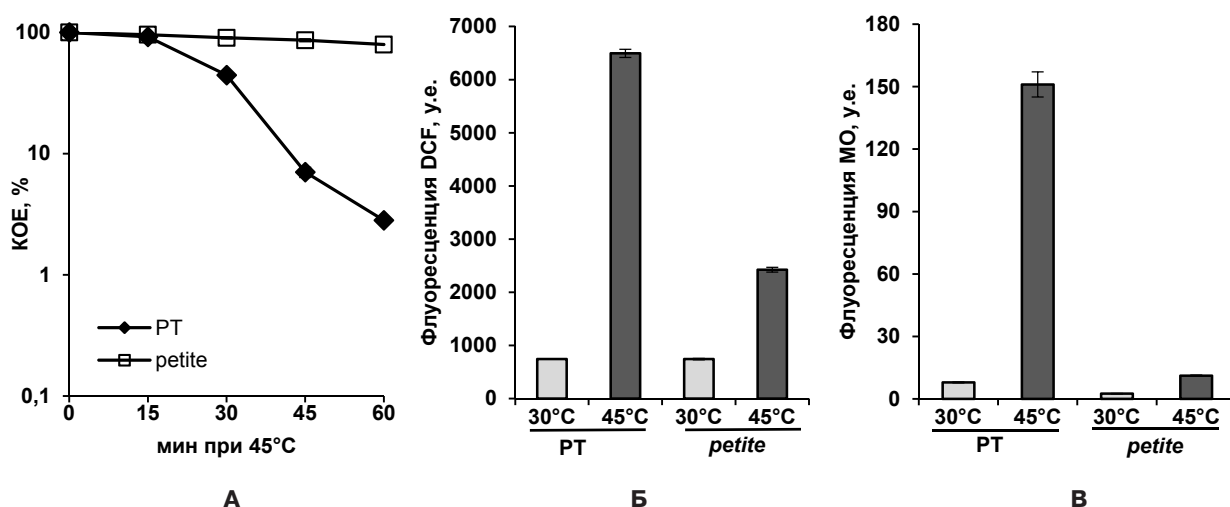


Рис. 1. Сравнение термотолерантности, уровня генерации АФК и изменения митохондриального потенциала при тепловом шоке (45 °С) в клетках штамма родительского типа (PT) и изогенного ему *petite* мутанта.

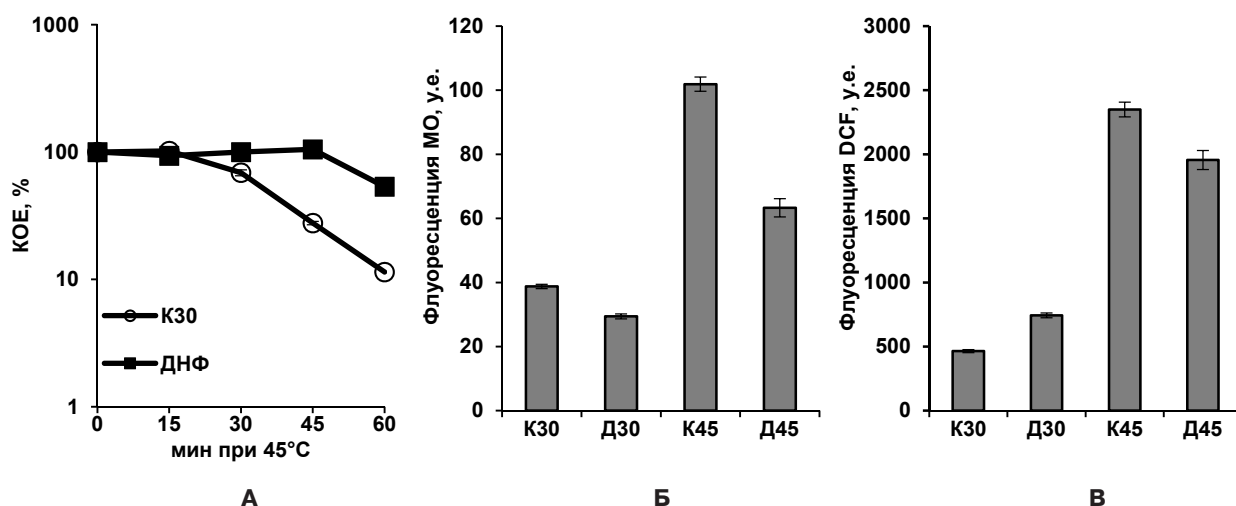


Рис. 2. Эффект 2,4-динитрофенола на термотолерантность, митохондриальный потенциал и продукцию АФК при тепловом шоке (45 °C) в клетках дрожжей штамма W303-1В.

к умеренному тепловому шоку, ингибируя продукцию АФК. При этом способность ДНФ ингибировать продукцию АФК определяется его способностью снижать потенциал на внутренней митохондриальной мембране.

Обсуждение

Митохондрии, являясь основным источником энергии, в то же время регулируют развитие ПКГ в клетках дрожжей [Guaragnella et al., 2012]. Центром образования АФК в клетках дрожжей также являются митохондрии [Longo et al., 1996]. Результаты, полученные в данной работе, указывают на то, что митохондрии играют активную роль в гибели клеток дрожжей при действии умеренного теплового шока (45 °C) (рис. 1). Нарушение функций митохондрий в результате мутации *petite* или обработки ДНФ значительно повышает устойчивость к тепловому шоку. Гибель клеток дрожжей при действии теплового шока наблюдается в результате усиления генерации АФК, поскольку мутация *petite* и ДНФ одновременно защищая клетки от гибели, подавляли продукцию АФК (рис. 2).

Механизм генерации АФК митохондриями неизвестен. Однако ранее была показана связь между митохондриальным потенциалом и продукцией АФК [Pozniakovsky et al., 2005]. Обработка амиодароном увеличивала митохондриальный потенциал и генерацию АФК, а обработка протонофором ингибировала оба этих процесса. Полученные в данной работе результаты указывают, что

аналогичные события происходят и при тепловом шоке. Тепловой шок приводит к гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны, и этот процесс является причиной генерации АФК, поскольку снижение потенциала в результате мутации *petite* и обработки ДНФ снижает продукцию АФК, генерируемые митохондриями.

ЛИТЕРАТУРА

- Guaragnella N., Zdravlević M., Antonacci L., Passarella S., Marra E., Giannattasio S. The role of mitochondria in yeast programmed cell death // *Front. Oncol.* – 2012. – Vol. 2. – P. 70.
- Kubota H. Quality control against misfolded proteins in the cytosol: a network for cell survival // *J. Biochem.* – 2009. – Vol. 146. – P. 609–616.
- Longo V.D., Gralla E.B., Valentine J.S. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271. – P. 12275–12280.
- Perrone G.G., Tan S.X., Dawes I.W. Reactive oxygen species and yeast apoptosis // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1783. – P. 1354–1368.
- Pozniakovsky A.I., Knorre D.A., Markova O.V., Hyman A.A., Skulachev V.P., Severin F.F. Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast // *J. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 168. – P. 257–269.
- Rikhvanov E.G., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Rachenko E.I., Knorre D.A., Voinikov V.K. Do mitochondria regulate the heat-shock response in *Saccharomyces cerevisiae*? // *Curr. Genet.* – 2005. – Vol. 48. – P. 44–59.
- Samali A., Holmberg C.I., Sistonen L., Orrenius S. Thermotolerance and cell death are distinct cellular responses to stress: dependence on heat shock proteins // *FEBS Lett.* – 1999. – Vol. 461. – P. 306–310.

РОЛЬ АФК В ПРОЦЕССЕ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУРАХ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM* L. И САХАРНОГО ТРОСТНИКА *SACCHARUM OFFICINARUM* L., ВЫЗВАННОЙ ДЕЙСТВИЕМ ПОВЫШЕННЫХ ТЕМПЕРАТУР

А.В. Федяева¹, И.В. Любушкина^{1,2}, А.В. Степанов¹, Т.П. Побежимова¹, Е.Г. Рихванов

¹ ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
e-mail: fedyayeva.anna@mail.ru

² ФГБОУ ВПО Иркутский государственный университет, Иркутск
e-mail: estel_86@mail.ru

В данной работе изучался процесс гибели клеток, вызванной действием повышенных температур, в суспензионных культурах озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), полученной из зрелых зародышей, и сахарного тростника (*Saccharum officinarum*, сорт РОJ2878, линия, устойчивая к анокисии). Данные культуры обладают разной скоростью роста: экспоненциальная фаза в суспензионной культуре озимой пшеницы длится до 21–24-х суток культивирования, а в культуре сахарного тростника – до 12-х суток. Растения, из которых были получены данные суспензионные культуры, также различаются по восприимчивости к действию температур: озимая пшеница обладает большей холодо- и морозостойкостью, а сахарный тростник относится к теплолюбивым растениям.

В наших предыдущих работах было показано, что действие отрицательной температуры (–8 °C) вызывает процесс гибели, обладающий рядом характеристик, позволяющих отнести его к программируемой клеточной гибели (ПКГ), как в культуре озимой пшеницы, так и в культуре сахарного тростника [Lyubushkina et al., 2013; Lyubushkina et al., 2014]. Было показано, что скорость реализации процесса гибели в данных культурах различалась: более медленно он осуществлялся в культуре озимой пшеницы (в течение 10 суток) по сравнению с культурой сахарного тростника (в течение 24 ч). Было сделано предположение, что эти различия могут быть обусловлены либо меньшей устойчивостью сахарного тростника к пониженной температуре, либо его более высокой скоростью роста. В связи с этим данная работа была направлена на изучение процесса гибели клеток озимой

пшеницы и сахарного тростника при действии ряда повышенных температур (37, 42, 45, 50, 55, 60 °C) и сравнение скорости реализации данного процесса в изучаемых культурах.

Известно, что одной из причин гибели растений при действии факторов внешней среды, в том числе, и неблагоприятных температур, является развитие в клетках окислительного стресса, вызванного неспособностью антиоксидантных систем справиться с чрезмерной генерацией активных форм кислорода (АФК) [Hong-bo et al., 2008; Potters et al., 2010; Jacoby et al., 2012]. В связи с этим мы изучили изменение содержания АФК в клетках озимой пшеницы и сахарного тростника при действии исследуемых повышенных температур в течение 10 и 30 мин. Было показано, что наиболее значимое увеличение содержания АФК в клетках озимой пшеницы происходило при обработке суспензионной культуры температурами 42, 45 и 50 °C, при этом увеличение времени экспозиции культуры при повышенной температуре до 30 мин приводило к большей генерации АФК в клетках (рис. 1А). В клетках сахарного тростника повышенный уровень АФК наблюдался при обработке суспензионной культуры всеми исследуемыми температурами, но наиболее интенсивно содержание АФК в клетках сахарного тростника увеличивалось при действии температур 37, 42, 45 и 50 °C (рис. 1Б).

Интересно отметить, что в клетках культуры, полученной из более теплолюбивого растения (сахарного тростника), значительное увеличение содержания АФК в клетках наблюдалось уже при действии температуры 37 °C (как при 10, так и при 30 мин об-

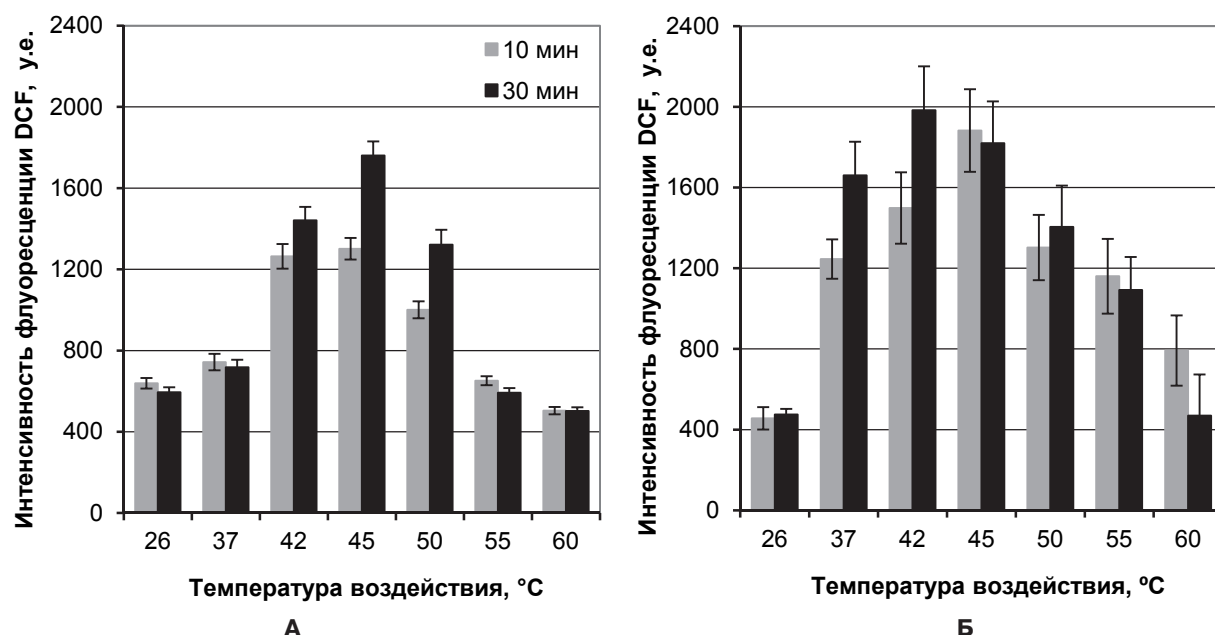


Рис. 1. Изменение содержания активных форм кислорода в клетках суспензионных культур озимой пшеницы (А) и сахарного тростника (Б) при действии повышенных температур. Обозначения: 10 мин, 30 мин – время воздействия температурой. $M \pm S.D.$

работке), в то время как в клетках культуры озимой пшеницы данная температура, хоть и вызывала повышение уровня АФК, но оно не было столь выраженным (Рис. 1А, Б). Вероятно, это могло быть связано либо с более эффективно действующими антиоксидантными системами в клетках озимой пшеницы, либо наблюдаемое увеличение содержания АФК в клетках сахарного тростника не оказывало значимого повреждающего действия на внутриклеточные компартменты и выполняло в данном случае только сигнальную функцию.

Для изучения гибели клеток исследуемых культур при действии повышенных температур было выбрано наименьшее время обработки – 10 мин. Основываясь на более ранних экспериментах, когда гибель клеток озимой пшеницы происходила в течение более длительного периода, чем у сахарного тростника, в данной работе жизнеспособность клеток озимой пшеницы определяли сразу и через 48 ч после действия температуры, а сахарного тростника – сразу и через 24 ч после обработки. Изучение жизнеспособности клеток показало, что в контрольной культуре сахарного тростника доля живых клеток была выше, чем в культуре озимой пшеницы – около

85 и 65 %, соответственно (рис. 2А, Б). Тем не менее, действие температур 37, 42, 45, 55 и 60 °C на культуры озимой пшеницы и сахарного тростника оказалось схожим: при обработке и в течение контрольного периода наблюдений не наблюдалось гибели клеток в случае температуры 37 и 42 °C, в то время как температура 45 °C вызывала гибель примерно 10 % клеток (рис. 2А, Б). После обработки исследуемых суспензионных культур температурой 55 °C оставалось живыми около 10 % клеток, которые погибали в течение последующих 48 ч (в культуре озимой пшеницы) и 24 ч (в культуре сахарного тростника), а действие температуры 60 °C вызывало гибель всех клеток в обеих культурах (рис. 2А, Б). Различным оказалось действие температуры 50 °C: если в культуре озимой пшеницы обработка данной температурой вызывала длительный процесс гибели: в течение 48 ч после действия погибало около 40 % клеток, то в культуре сахарного тростника на протяжении последующих после обработки 24 ч погибало всего лишь 10 % клеток (рис. 2А, Б).

Таким образом, в ходе работы было показано, что повышенные температуры вызывали увеличение содержания АФК в

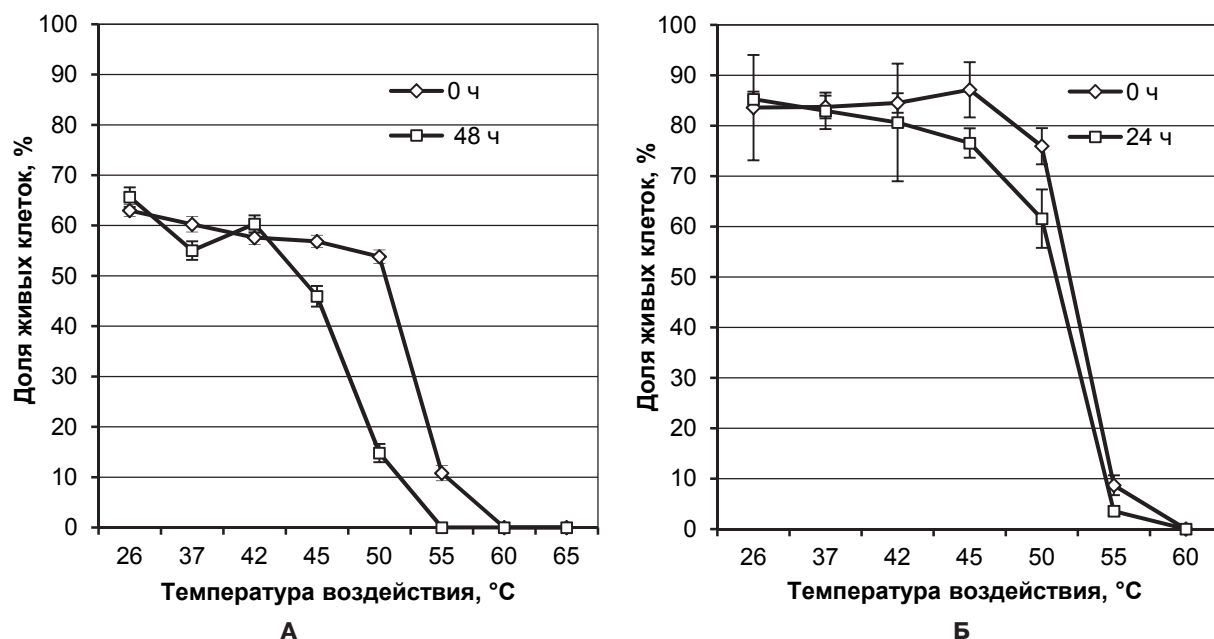


Рис. 2. Влияние повышенных температур на жизнеспособность клеток озимой пшеницы (А) и сахарного тростника (Б). Обозначения: 0 ч, 24 ч, 48 ч – время после действия повышенных температур. М ± S.D.

клетках, как озимой пшеницы, так и сахарного тростника. Однако наблюдавшееся в эксперименте повышение генерации АФК не всегда приводило к гибели клеток в культуре. Так, в суспензионной культуре сахарного тростника, где увеличение температуры даже до 37 °C способствовало значительному увеличению уровня АФК, гибели клеток не наблюдалось вплоть до обработки культуры экстремальными температурами 55 и 60 °C (рис. 1Б, 2Б). Такая реакция могла быть обусловлена большей устойчивостью клеток сахарного тростника к повышению температуры, в связи с этим особый интерес в дальнейшем представляет изучение изменений энергетического метаболизма и активности ферментов антиоксидантной системы в данных условиях. Кроме того, следует отметить, что в суспензионной культуре озимой пшеницы действие температуры 50 °C вызывало продолжительный процесс гибели клеток (рис. 2А). В ходе дальнейших экспериментов предстоит выяснить, является ли этот процесс программируемой клеточной гибелью, и какую роль в его реализации играют митохондрии – органеллы, представляющие

собой основной поставщик энергии и АФК в гетеротрофных клетках.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (№14-04-32126).

ЛИТЕРАТУРА

- Hong-bo S., Li-ye C., Ming-an S., Jaleel C.A., Hongmei M. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses // C. R. Biol. – 2008. – Vol. 331. – P. 433–441.
- Jacoby R.P., Li L., Huang S., Lee C.P., Millar A.H., Taylor N.L. Mitochondrial composition, function and stress response in plants // J. Integrative Plant Biol. – 2012. – Vol. 54. – P. 887–906.
- Lyubushkina I., Grabelnykh O., Fedyaeva A., Pobezhimova T., Stepanov A., Voinikov V. The role of mitochondria during realizing of cell death process, induced by subzero temperature, in suspension cell culture of *Saccharum officinarum* L. // FEBS J. – 2013. – Vol. 280. – P. 517.
- Lyubushkina I.V., Grabelnykh O.I., Pobezhimova T.P., Stepanov A.V., Fedyaeva A.V., Fedoseeva I.V., Voinikov V.K. Winter wheat cells subjected to freezing temperature undergo death process with features of programmed cell death // Protoplasma. – DOI 10.1007/s00709-013-0562-3.
- Potters G., Horemans N., Jansen M.A.K. The cellular redox state in plant stress biology e A charging concept // Plant Physiol. & Biochem. – 2010. – Vol. 48. – P. 292–300.

МИТОХОНДРИИ КАК ВОЗМОЖНОЕ МЕСТО СИНТЕЗА
СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ В РАСТЕНИЯХ

Е.К. Шематорова¹, И.Ю. Словохотов¹, М.Р. Халилуев², И.Н. Бердичевец^{2,3},
Е.Н. Баранова², Т.В. Манешина³, О.Г. Бабак³, В.Н. Клыков¹, Д.Г. Шпаковский¹,
С.Г. Спивак^{1,3}, Г.В. Шпаковский¹

¹ ФГБУН Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
e-mail: gvs@ibch.ru

² ФГБОУ ВПО Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва
e-mail: marat131084@rambler.ru

³ Государственное научное учреждение Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: Sve_spivak@mail.ru

В последнее десятилетие получен ряд экспериментальных данных об определённой структурной и функциональной консервативности путей биосинтеза биологически активных стероидных соединений в растениях и у животных. Установлено, что основные стадии в процессах биосинтеза и метаболизма стероидных гормонов животных и брассиностероидов растений катализируют цитохромы P450, в обеих системах функционируют такие ферменты, как стероид-5 α -редуктаза (5 α R) и 3 β -гидроксистероиддегидрогеназа/ Δ^5 - Δ^4 -изомераза (3 β -HSD). Также убедительно доказано, что в растениях наряду с брассиностероидами присутствуют стероидные гормоны животных (прогестерон, 17-гидроксипрогестерон, 16-дегидроксипрогестерон, андростендион) [Simerský et al., 2009; Pauli et al., 2010]. Пути биосинтеза этих соединений и их роль в жизнедеятельности растений пока не изучены. На сегодняшний день установленным является лишь то, что прогестерон выполняет важные функции в регуляции процессов роста и развития растений: например, экзогенный прогестерон стимулирует рост и созревание пыльцы растений табака [Ylstra et al., 1995]. Совокупность этих данных делает актуальным создание и исследование трансгенных растений, экспрессирующих гены стероидогенных белков животных. С одной стороны эти растения являются удобной моделью для изучения процессов биосинтеза и функций стероидных гормонов животных в растениях. С другой стороны подход, основанный на применении генов белков стероидогенеза животных, может привести к созданию

трансгенных растений, обладающих важными для сельского хозяйства свойствами, а в случае лекарственных растений – свойствами, важными для производства медицинских препаратов из растительного сырья. Не исключено также и то, что культура тканей этих трансгенных растений может найти биотехнологическое применение для осуществления трансформации различных стероидных соединений.

Ключевую роль в биосинтезе стероидных гормонов животных играет цитохром P450_{SCC} (side-chain-cleaving), который локализован во внутренней мембране митохондрий клеток стероидогенных тканей и, с участием двух других компонентов митохондриальной электротранспортной цепи, аденодоксина и аденодоксинредуктазы, катализирует реакцию отщепления боковой цепи холестерина с превращением его в прегненолон – общий предшественник всех стероидных гормонов животных. Несмотря на то, что похожий белок в растениях пока не найден, известно, что в растениях рода наперстянка (*Digitalis sp.*), по-видимому, также именно в митохондриях, происходит превращение холестерина в прегненолон [Lindemann & Luckner, 1997].

Ранее нами в рамках совместного проекта учёных России и Беларуси были получены и детально охарактеризованы трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* (в качестве удобного модельного объекта), экспрессирующие кДНК CYP11A1 цитохрома P450_{SCC} из коры надпочечников быка и обладающие повышенной продуктивностью и устойчивостью к грибным фитопатогенам. Изучение четырёх поколений этих трансгенных растений показало, что они по сравнению с рас-

тениями дикого типа имеют сокращенный период вегетативного развития (раннее цветение и созревание семян), увеличенную биомассу и повышенную продуктивность (количество и качество семян), а также повышенный иммунитет к неспецифическому патогену паслёновых *Botrytis cinerea*. В отличие от контрольных растений дикого типа в трансгенных растениях обнаружен прегненолон – продукт реакции, катализируемой цитохромом P450_{SCC} (CYP11A1). Установлено, что содержание прогестерона в листьях трансгенных растений существенно (в несколько раз) выше, чем в листьях растений дикого типа [Спивак и др., 2009; Спивак и др., 2010].

Очень важным было определить точное место синтеза прегненолона и прогестерона в полученных нами трансгенных растениях табака. У животных первые этапы синтеза стероидных гормонов (отщепление боковой цепи холестерина с превращением его в прегормон прегненолон, и далее – в прогестерон) происходят в митохондриях, на их внутренней мембране [Miller, 2013]. Как отмечалось выше, именно там локализован цитохром P450_{SCC} (CYP11A1) и именно туда доставляется субстрат холестерин. При этом, именно перемещение холестерина с наружной на внутреннюю мембрану митохондрий, осуществляемое с помощью особой, многокомпонентной макромолекулярной машины при активном участии белка StAR (steroidogenic acute regulatory protein), является скоростью-лимитирующей стадией в синтезе стероидных гормонов у животных.

В то же время, по всем имеющимся на сегодняшний день данным синтез брасиностероидов (стероидных гормонов растений) происходит на мембранах эндоплазматического ретикулума или, гораздо реже, на плазматической мембране растительных клеток. Несмотря на то, что цитохромы P450 представляют собой едва ли не самое обширное из всех белковых семейств в протеомах растений (например, на них приходится ~1% кодирующего потенциала арабидопсиса [Nelson et al., 2004]), существование митохондриальных цитохромов у растений до сих пор не доказано. Тем не менее, основываясь на данных

Лузиковой с соавторами [Лузиков и др., 1994] о том, что незрелый цитохром P450_{SCC} из коры надпочечников быка импортируется в митохондрии растений, где приобретает размеры зрелой формы, аналогично тому, как это происходит в митохондриях клеток животных, при конструировании экспрессионного растительного вектора мы использовали полноразмерную последовательность кДНК CYP11A1 (длиной в 1754 п.о.), кодирующую белок-предшественник P450_{SCC} из коры надпочечников быка с лидерным N-концевым экстрапептидом [Спивак и др., 2009].

Поскольку уникальный только для животных ключевой фермент стероидогенеза CYP11A1 функционирует в митохондриях вместе с FAD-содержащим флавопротеидом ADXR (адренодоксинредуктазой) и [2Fe-2S]-ферредоксином ADX (адренодоксином), мы изучили, какие белки выполняют функцию этих партнёров цитохрома P450_{SCC} в растениях. В результате, впервые охарактеризованы основные компоненты митохондриальной электротранспортной цепи растений: клонированы и установлена структура кДНК и генов адренодоксиноподобных ферредоксинов табака, томата, картофеля из семейства Solanaceae и наперстянки *Digitalis purpurea* (семейство Scrophulariaceae). Установлено, что у растений из семейства паслёновых имеются два разных гена ферредоксинов митохондриального типа (MFDX1 и MFDX2), имеющие сходную экзон-интронную структуру (содержат по 8 экзонов) и кодирующие предшественники адренодоксиноподобных белков (204-216 aa), различающиеся прежде всего по структуре N-концевого участка белка (кодируется первым и вторым экзонами), соответствующего лидерному пептиду. Определена первичная структура кДНК и генов, кодирующих белки NADPH-оксидоредуктазы (MFDXR) *Nicotiana tabacum*, *Solanum lycopersicum* и *Solanum tuberosum* (485 aa), структурно родственные ADXR животных. Полученные результаты указывают на несомненное сходство электротранспортных цепей P450-зависимых монооксигеназ в митохондриях животных и растений.

Далее, с помощью электронной микроскопии на ультратонких срезах листьев

табака мы показали, что в изучаемых нами трансгенных растениях, экспрессирующих кДНК гена *CYP11A1*, изменяется внешний вид, размер и структура (плотность) митохондрий: они уменьшаются в размерах, теряют округлость (становятся более овальными) и приобретают более плотную, гранулированную консистенцию. Это указывает на то, что перенесённый нами в растения цитохром P450_{SCC} животных, по-видимому, также функционирует именно в митохондриях (встраиваясь в митохондрии растений и даже изменяя их структуру). Эти данные – первое свидетельство того, что синтез стероидных гормонов может происходить и в растительных митохондриях. Будет интересно определить все белки-участники этого процесса, в частности истинные партнёры цитохрома P450_{SCC} в клетках растений.

Показанная нами на примере *CYP11A1* функциональная совместимость стероидогенных систем Plantae и Animalia, открыла перспективу получать трансгенные растения с комбинированными стероидогенными системами таких интересных с точки зрения сельского хозяйства, практической биотехнологии и/или фармакологии видов, как томат, картофель и наперстянка. Первые поколения трансгенных растений томата *Solanum lycopersicum* и наперстянки *Digitalis purpurea*, экспрессирующие кДНК *CYP11A1* цитохрома P450_{SCC} из коры надпочечников животных, нами уже получены.

Данная работа осуществлялась в рамках совместного российско-белорусского исследовательского проекта при финансовой поддержке Российского (РФФИ) и Белорусского республиканского (БРФФИ) фондов фундаментальных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

- Лузиков В.Н., Новикова Л.А., Спиридонова В.А., Исаева Л.В., Виллан Дж., Хьюгоссон М., Глазер Е. Конструирование гетерологичных митохондрий: импорт предшественника цитохрома P450_{SCC} крупного рогатого скота в митохондрии растений // Биохимия. – 1994. – Т. 59, № 7. – С. 1098–1101.
- Спивак С.Г., Бердичевец И.Н., Литвиновская Р.П., Драч С.В., Картель Н.А., Шпаковский Г.В. Некоторые особенности метаболизма стероидов в трансгенных растениях табака *Nicotiana tabacum*, несущих кДНК *CYP11A1* цитохрома P450_{SCC} из коры надпочечников быка // Биоорганическая химия. – 2010. – Т. 36, № 2. – С. 241–250.
- Спивак С.Г., Бердичевец И.Н., Ярмолинский Д.Г., Манешина Т.В., Шпаковский Г.В., Картель Н.А. Создание и характеристика трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L., экспрессирующих кДНК *CYP11A1* цитохрома P450_{SCC} // Генетика. – 2009. – Т. 45, № 9. – С. 1217–1224.
- Lindemann P., Luckner M. Biosynthesis of pregnane derivatives in somatic embryos of *Digitalis lanata* // Phytochemistry. – 1997. – Vol. 46, No. 3. – P. 507–513.
- Miller W.L. Steroid hormone synthesis in mitochondria // Molecular and Cellular Endocrinology. – 2013. – Vol. 379, No 1–2. – P. 62–73.
- Nelson D.R., Schuler M.A., Paquette S.M., Werck-Reichhart D., Bak S. Comparative genomics of rice and arabidopsis. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot // Plant Physiology. – 2004. – Vol. 135, No 2. – P. 756–772.
- Pauli G.F., Friesen J.B., Gödecke T., Farnsworth N.R., Glodny B. Occurrence of progesterone and related animal steroids in two higher plants // Journal of Natural Products. – 2010. – Vol. 73, No 3. – P. 338–345.
- Simerský R., Novák O., Morris D.A., Pouzar V., Strnad M. Identification and quantification of several mammalian steroid hormones in plants by UPLC-MS/MS // Journal of Plant Growth Regulation. – 2009. – Vol. 28, No 3. – P. 125–136.
- Ylstra B., Touraev A., Brinkmann A.O., Heberle-Bors E., Tunen A. Steroid hormones stimulate germination and tube growth of in vitro matured tobacco pollen // Plant Physiology. – 1995. – Vol. 107, No 2. – P. 639–643.

АЛФАВИТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

А		З	
Алёшин В.В.	80	Зубо Я.О.	67
Антипина А.И.	41	Зырина А.Н.	37
Арзиев А.Ш.	87	И	
Б		Иванов Б.Н.	27, 32
Бабак О.Г.	97	Иванова М.В.	29
Баранова Е.Н.	97	Игнатова Л.К.	32
Беликов С.И.	48	К	
Бельков В.И.	7, 15	Камалтынов Р.М.	80
Бердичевец И.Н.	97	Катышев А.И.	46
Бернер Т.	67	Клименко Е.С.	34
Бинюков В.И.	24	Клыков В.Н.	97
Борисова-Мубаракшина М.М.	27	Кнорре Д.А.	18, 37
Боровик О.А.	9, 13, 43	Коковкина Е.В.	13
Боровский Г.Б.	41, 72, 91	Колесникова Е.В.	38, 51
В		Кондакова М.А.	41
Ванюшин Б.Ф.	12	Константинов Ю.М.	7, 15, 34, 46, 67, 87, 88
Варакина Н.Н.	72, 91	Козулева М.А.	27
Велегжанинов И.О.	13	Корзун М.А.	15
Ветошкина Д.В.	27	Королева Н.А.	9
Войников В.К. 1	3, 41, 43, 72, 91	Корсукова А.В.	43
Г		Кулинченко М.В.	34, 46, 87, 88
Гармаш Е.В.	13	Л	
Гарник Е.Ю.	7, 15, 88	Литягина С.В.	58
Генерозова И.П.	24	Любушкина И.В.	94
Глаголева Е.С.	18	М	
Головко Т.К.	13	Майкова О.О.	48
Горбылева Е.Л.	20	Макарова Л.Е.	51
Грабельных О.И.	9, 13, 43	Манешина Т.В.	97
Гребнев П.А.	34	Миль Е.М.	24
Д		Н	
Давыденко О.Г.	85	Найдов И.А.	27
Далькэ И.В.	13	Нестеркина И.С.	52, 55
Даниленко Н.Г.	85	Нимаева О.Д.	69
Дитриш А.	34	Нурминский В.Н.	55
Дорофеев Н.В.	43	О	
Дударева Л.В.	51	Обручева Н.В.	58
Е		Озолина Н.В.	38, 51, 52, 55, 59
Емельянов В.В.	23	П	
Ж		Парамонова Н.В.	62, 65
Жигачева И.В.	24	Пилипченко А.А.	55
Журикова Е.М.	32		

Побежимова Т.П.	9, 43, 94		Т
Потапова Т.В.	67, 88	Тарасенко В.И.	7, 15, 46, 67, 88
Прадедова Е.В.	69	Таусон Е.Л.	72
Пятрикас Д.В.	72, 91		У
	Р	Уколова И.В.	41
Ракевич А.Л.	55		Ф
Рекославская Н.И.	75, 82	Федорчук Т.П.	32
Рихванов Е.Г.	20, 72, 78, 91, 94	Федосеева И.В.	72, 78, 91
Романова Е.В.	80	Федяева А.В.	20, 91, 94
Руденко Н.Н.	27, 32		Х
Русалева Т.М.	20, 72, 91	Халилуев М.Р.	97
	С		Ч
Саляев Р.К.	69, 75, 82	Черникова В.В.	46
Северин Ф.Ф.	37	Чиркова Т.В.	23
Сивицкая Л.Н.	85		Ш
Синькевич И.А.	58	Шематорова Е.К.	97
Синявская М.Г.	85	Шимкевич А.М.	85
Словохотов И.Ю.	97	Шпаковский Г.В.	97
Соколов С.С.	37	Шпаковский Д.Г.	97
Сорокин М.И.	37	Шугаев А.Г.	24
Спивак С.Г.	97		Щ
Степанов А.В.	20, 72, 91, 94	Щербаков Д.Ю.	48, 80
Субота И.Ю.	87		
Суворова Г.Г.	29		

Научное издание

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОРГАНЕЛЛ

**Материалы
Всероссийской научной конференции**

Издается в авторской редакции

Корректор *Черных О.Л.*
Оригинал-макет *Арсентьев Л.И.*
Логотип конференции на обложке *Нурминский В.Н., Пилипченко А.А.*
Обложка, иллюстрации *Фалеев К.А.*

Сдано в набор 19.05.14. Подписано в печать 18.06.14. Формат 60х84 ¹/₈.
Бумага офсетная. Гарнитура Cambria.
Усл. печ. 12,75 л. Уч.-изд. л. 11,85. Тираж 300 экз. Заказ № 040-14.

Отпечатано в РИО НЦРВХ СО РАМН
Иркутск, ул. Борцов Революции, 1. Тел. (395-2) 29-03-37.
E-mail: arleon58@gmail.com