

На правах рукописи

Бычков

Бычков Иван Александрович

**Мелатонин как элемент защитной и регуляторной систем
хлоропластов и митохондрий при фотоокислительном стрессе
у *Arabidopsis thaliana***

1.5.21. – Физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Лаборатории экспрессии генома растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук.

Научные руководители:

доктор биологических наук
кандидат биологических наук

Кузнецов Виктор Васильевич
Кудрякова Наталия Васильевна

Официальные оппоненты:

Соловченко Алексей Евгеньевич

доктор биологических наук, профессор Кафедры биоинженерии Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова"

Авальбаев Азамат Мэлсович

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Лаборатории молекулярных механизмов устойчивости растений к стрессам Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук "

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет».

Защита диссертации состоится «18» октября 2022 года в 13 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций 24.1.138.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, Ботаническая ул., 35. Телефон/факс: (499) 678-54-20; e-mail: ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук и на сайте www.ippras.ru

Автореферат разослан « » _____ 2022 года.

Ученый секретарь диссертационного совета:

кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Одним из активно изучаемых регуляторных соединений растений является мелатонин. В большом количестве работ показана защитная роль мелатонина, как антиоксиданта и регулятора внутриклеточных процессов, который действует преимущественно в условиях стресса. Однако конкретные механизмы его действия до сих пор практически не изучены. Мало известно об его роли в защите от фотоокислительного стресса. Также практически ничего не известно о его способности регулировать функциональную активность митохондрий и хлоропластов в условиях стресса. В этой связи представляется интересным изучение способности мелатонина регулировать экспрессию хлоропластных, митохондриальных и ядерных генов, вовлеченных в ответ на абиотические стрессы. Предполагается, что регуляторная роль мелатонина может быть связана с его способностью влиять на уровень эндогенных фитогормонов. Однако в настоящее время взаимодействие мелатонина и гормонов растений практически не освещено. Наибольший интерес связан с взаимовлиянием мелатонина, абсцизовой кислоты (АБК) и цитокининов на уровне генов синтеза фитогормонов и мелатонина, а также генов рецепции и трансдукции гормональных сигналов. Открытие потенциального рецептора мелатонина позволяет изучать молекулярные механизмы действия мелатонина и искать точки пересечения с фитогормонами. Изучение роли мелатонина дает возможности для расширения представлений о защитных механизмах растений.

Целью представленной работы было изучение участия мелатонина в регуляции экспрессии пластидных, митохондриальных и ядерных генов в нормальных условиях и при фотоокислительном стрессе. Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить особенности защитной роли мелатонина при умеренном и сильном фотоокислительном стрессе.
2. Проанализировать особенности мутантов по гену синтеза и потенциальным компонентам сигналинга мелатонина в условиях фотоокислительного стресса.

3. Исследовать роль мелатонина в регуляции экспрессии хлоропластных, митохондриальных и ядерных генов в нормальных условиях и при действии избыточного освещения.

4. Изучить влияние мелатонина на активность генов синтеза и сигналинга цитокининов и АБК в условиях фотоокислительного стресса. Исследовать эффект цитокининов и АБК на экспрессию генов синтеза и сигналинга мелатонина.

5. С использованием мутантов по компонентам синтеза и сигналинга фитогормонов изучить влияние дефицита гормонов и блокирования путей их сигналинга на функциональную активность мелатонина.

Научная новизна работы. На растениях *Arabidopsis thaliana* дикого типа и инсерционных мутантов по генам синтеза и сигналинга мелатонина впервые изучена роль мелатонина в регуляции экспрессии хлоропластных генов, а также в регуляции уровня кодируемых ими белков в условиях фотоокислительного стресса. Показано, что при фотострессе мелатонин поддерживает уровень дыхания и активность генов всех комплексов дыхательной цепи, а также снижает активность альтернативной оксидазы. Механизм регуляции генов пластома и хондриома мелатонином связан с регуляцией экспрессии генов РНК-полимераз и других компонентов аппарата транскрипции. Потенциальный рецептор мелатонина CAND2/PMTR1 участвует в регуляции ответов растения на стресс. Мутант по данному гену проявляет сниженную чувствительность к мелатонину на уровне экспрессии хлоропластных и митохондриальных генов. Мелатонин влияет на экспрессию генов метаболизма и сигналинга цитокининов и АБК у дикого типа и мутантов по генам синтеза и сигналинга мелатонина. *Транс*-зеатин и АБК способны регулировать активность гена синтеза мелатонина *ASMT*. Взаимодействие мелатонина и АБК, вероятно, связано с участием транскрипционного фактора ABI4. Полученные данные представляют интерес для более глубокого понимания регуляторной роли мелатонина в стрессоустойчивости растений и взаимодействии с фитогормонами.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты работы расширяют представления о роли мелатонина в жизни растений, включая его функцию в контроле ядерно-органельных взаимодействий, демонстрируют участие

мелатонина в защите растительной клетки, дополняют знания о механизмах его действия в регуляторных системах растений. Полученные данные могут быть использованы в генной инженерии, в защите растений и в фармацевтической промышленности. Экспериментальные данные могут быть полезны для подготовки курсов лекций по физиологии, биохимии и молекулярной биологии растений в высших учебных заведениях.

Степень достоверности работы. Данная работа проводилась с применением современных физиологических, молекулярно-генетических и биохимических методов анализа. Все эксперименты проводились в достаточных для построения достоверной статистики биологических и аналитических повторностях. Выводы обоснованы экспериментально и отражены в печатных работах.

Апробация результатов. Результаты данной работы были представлены на следующих научных конференциях: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2019); XXVII Всероссийская молодежная научная конференция «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Сыктывкар, 2020); VI международная научная конференция PlantGen (Новосибирск, 2021); Конференция годовичного собрания Общества физиологов растений России «Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее» (Москва, 2021).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 работ, из которых 3 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследований, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Материалы диссертации изложены на 164 страницах машинописного текста и содержат 22 таблицы и 40 рисунков. Список цитируемой литературы включает 205 наименований, в том числе 197 иностранных.

Положения, выносимые на защиту:

Мелатонин эффективно защищает растения при воздействии света высокой интенсивности, снижает окислительный стресс, поддерживает фотосинтетические

процессы и уровень дыхания. Дефицит мелатонина делает растение более уязвимым в условиях стресса.

Мелатонин при фотоокислительном стрессе влияет на экспрессию пластидных, митохондриальных и ядерных генов. Регуляция осуществляется путем влияния на гены РНК-полимераз и другие компоненты аппарата транскрипции.

Предполагаемый рецептор мелатонина CAND2/PMTR1 играет важную роль в обеспечении регуляторной функции мелатонина при фотострессе. Инактивация генов сигналинга мелатонина приводила к ингибированию способности мелатонина регулировать экспрессию ряда пластидных, митохондриальных и ядерных генов.

Мелатонин влияет на экспрессию генов метаболизма и сигналинга фитогормонов, а цитокинины и АБК влияют на активность генов синтеза мелатонина. *Транс*-зеатин и АБК оказывают противоположный эффект на активность гена одного из ключевых ферментов синтеза мелатонина ASMT (N-ацетилсеротонинметилтрансфераза). *Транс*-фактор ABI4 может быть вовлечен в процесс взаимодействия мелатонина и АБК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования и условия выращивания. Были использованы растения *Arabidopsis thaliana* экотипа Columbia 0 (Col-0) и созданные на его основе инсерционные мутанты по гену синтеза мелатонина (*asmt*), предполагаемым генам рецепции и сигналинга мелатонина (*cand2* и *gpa1*), генам синтеза, рецепции и сигналинга цитокининов (*ahk2,3*, *ipt3,5,7*, *arr1,10,12*) и АБК (*aba3*, *abi4*, *abi5*), из коллекции NASC. Выращивание проростков производилось в чашках Петри на агаризованной (0.5%) среде Мурасиге-Скуга с половинным содержанием солей (рН 5.6). После стратификации при +4°C чашки переносили в камеру фитотрона и выращивали при световом режиме 16 ч свет / 8 ч темнота, постоянной температуре 22°C и интенсивности светового потока 60 мкмоль·м⁻²·с⁻¹. Для получения отделенных листьев использовали растения *A. thaliana*, выращенные в смеси почвы и вермикулита при тех же показателях светового режима и температуры и интенсивности светового потока 75 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ до достижения четырехнедельного возраста.

Условия постановки экспериментов. В экспериментах с сильным фотострессом использовали двухнедельные проростки, которые предварительно обрабатывали 50 мкМ мелатонина, 5 мкМ *транс*-зеатина или 50 мкМ АБК. Опытные растения переносили на 24 ч под лампу НР1-Т2 2000W/646 (Philips, Нидерланды) с потоком световой энергии 600 мкмоль м⁻² с⁻¹. Контрольные растения оставляли при обычных условиях выращивания. В экспериментах с умеренным светом использовали 5 и 6 листья розетки, которые инкубировали в чашках Петри на фильтровальной бумаге с водой (контроль) или растворами мелатонина (10 мкМ, 100 мкМ или 1 мМ). Опыт продолжался 72 ч при постоянном освещении, создаваемым люминесцентными лампами (OSRAM L58W / 640, Россия) с потоком световой энергии 250 мкмоль м⁻² с⁻¹. Контрольные листовые пластинки оставляли при интенсивности 75 мкмоль м⁻² с⁻¹.

Методы биохимического анализа. Определение содержания фотосинтетических пигментов проводили по методу, описанному Lichtenthaler (1987). Содержание свободного пролина определяли по методу Bates (1973). Уровень антоцианов оценивали по методу Giraud (2009). Содержание перекиси водорода в растительных тканях оценивали по реакции с хлоридом титана по методу Kumar и Knowles (1993). Интенсивность дыхания и активность альтернативной оксидазы измеряли по Moller et al. (1988). Активность СОД оценивали по реакции с нитросиним тетразолием (NBT) согласно Giannopolitis и Ries (1977).

Методы биофизического анализа. Изменение целостности мембран оценивали по выходу электролитов из растительных тканей по методу Herburn (1986). Параметры фотосинтетической активности оценивали, измеряя флуоресценцию хлорофилла *a* и редокс-превращения первичного донора электронов (P700) с помощью флуориметра DUAL-PAM-100 (Walz, Германия). Подбор параметров измерения осуществлялся экспериментальным путем, основываясь на статье Козулевой с соавторами (2017).

Методы молекулярного анализа. Выделение ДНК из растительных тканей проводили в соответствии с Маниатис и др. (1984). РНК выделяли с помощью TRIzol-реагента по стандартному протоколу. Содержание РНК определяли на спектрофотометре Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, США). РНК очищали

обработкой ДНКазой I, свободной от РНКаз (Thermo Scientific, США). Обратную транскрипцию проводили с использованием олиго(dT)18-праймера и обратной транскриптазы RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific). Для ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) использовали реакционную смесь qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) и амплификатор Light Cycler 96 (Roche, Швейцария). В качестве референсного гена использовали *UBQ10* (At4g05320).

Для проведения вестерн-анализа белок экстрагировали буфером (330 мМ Сорбит(D), 50 мМ HEPES pH 8.0, 1 мМ MgCl₂, 2 мМ EDTA-Na₂ pH 8.0). Содержание белка определяли при помощи наборов BCA Assay and Lowry Assays (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы разделяли в 10% и 12.5% SDS-PAGE в камере для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra, (BioRad, США) по протоколу Laemmly (1970). Для полусухого переноса белков из геля на мембрану использовали прибор Trans-Blot SD Semy-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, США). Для вестерн-блот гибридизации использовали антитела, произведенные фирмой Agrisera (Швеция). Для детекции сигнала использовали реактивы для реакции хемилюминесценции (ECL western-blotting detection Kit, Bio-Rad, США). Сигнал регистрировали на приборе iBright 1500 (Thermo Fisher Scientific, США).

Выделение мелатонина производили по методике Lee, Back (2018), для определения количества мелатонина иммуно-ферментным методом использовали ELISA Kit CEA908GE (Cloud-Clone Corp., USA) согласно инструкции производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Роль мелатонина в защите растений при фотострессе. Мелатонин эффективно снижал окислительный стресс и поддерживал фотосинтез в условиях повышенного освещения. Обработка мелатонином проростков дикого типа и мутантов по генам синтеза и сигналинга мелатонина показала, что экзогенный мелатонин уменьшает накопление продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой, поддерживает содержание хлорофилла и функциональную активность фотосистемы II, уменьшает содержание низкомолекулярного антиоксиданта пролина, поддерживает уровень каротиноидов, снижает утечку электролитов, образование

пероксида водорода, активность СОД, а также уменьшает накопление транскриптов генов-маркеров стресса, в том числе гена *ELIP1*, индуцируемого стрессом (рис. 1). При этом мутант *asmt* проявлял большую восприимчивость к стрессу, а мутанты по генам сигналинга слабее отвечали на обработку. Сходные данные получены для растений дикого типа при длительном умеренном стрессе в системе отделенных листьев, где мелатонин также изменял показатели стресса и фотосинтеза, в том числе регулировал активность фотосистемы I.

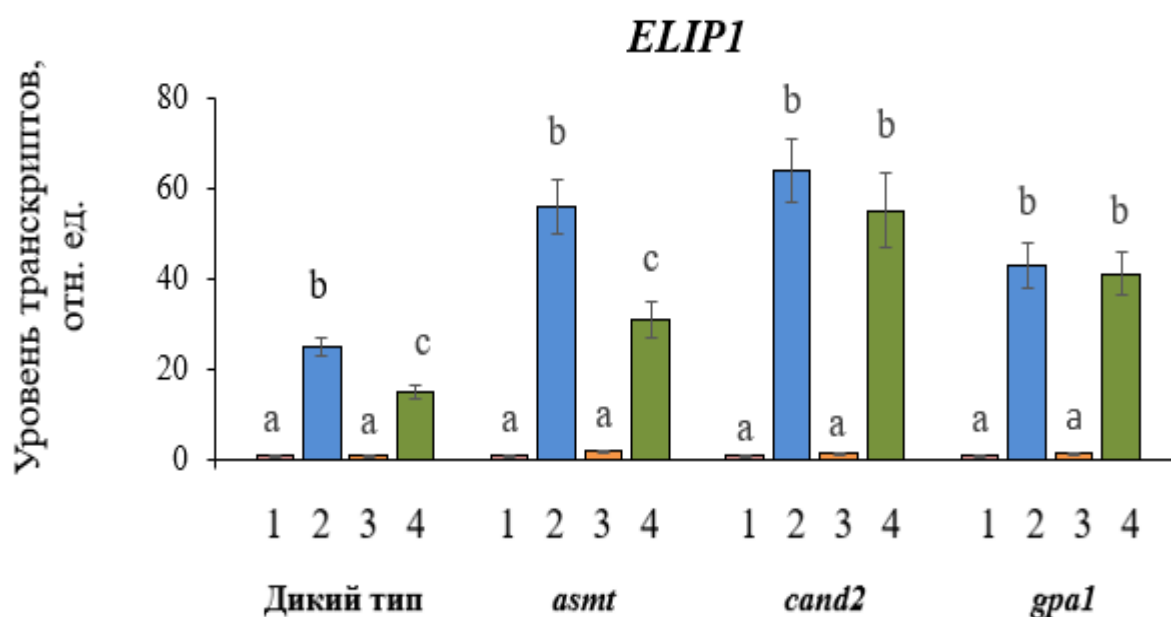


Рисунок 1. Влияние сильного фотоокислительного стресса и мелатонина на экспрессию гена *ELIP1* у дикого типа и мутантов по генам синтеза и сигналинга мелатонина. 1 – нормальные условия MS; 2 – фотостресс MS; 3 – нормальные условия MS + мелатонин; 4 – фотостресс MS + мелатонин. Уровень достоверности при $p < 0,05$.

Фотостресс вызывал падение уровня эндогенного мелатонина, при этом обработка экзогенным мелатонином позволяла вернуть содержание к исходным значениям. Это также сопровождалось падением накопления транскриптов для генов синтеза мелатонина *SNAT*, *ASMT* и *COMT*. Мутант *asmt* характеризовался меньшим базовым уровнем мелатонина и большим ответом на обработку (рис 2).

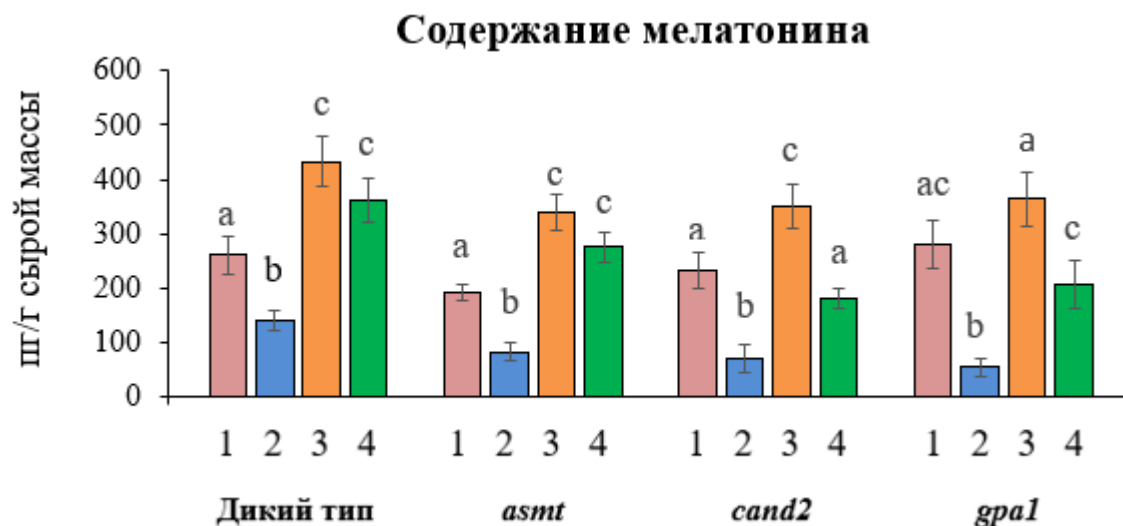


Рисунок 2. Влияние фотоокислительного стресса и экзогенного мелатонина на эндогенное содержание мелатонина. 1 – нормальные условия МС; 2 – фотостресс МС; 3 – нормальные условия МС + мелатонин; 4 – фотостресс МС + мелатонин. Уровень достоверности при $p < 0,05$.

Полученные данные подтверждают двойную роль мелатонина как антиоксиданта и регулятора. Так как ряд процессов слабо регулировался у мутантов по генам сигналинга, можно предположить участие потенциального рецептора мелатонина в регуляцию фотосинтеза при фотострессе.

Регуляция мелатонином экспрессии пластидных генов. Сильный окислительный стресс вызывал резкое падение активности хлоропластных генов в системе интактных двухнедельных проростков. Обработка мелатонином поддерживала активность экспрессии генов в условия фотостресса и не влияла в контрольных условиях. Влияние мелатонина было наиболее ярко показано для фотосинтетических пластидных генов, транскрибируемых РНК-полимеразой бактериального типа PEP: *rbcL*, *psbA*, *psbD*, *psaA* (рис. 3), полимеразой фагового типа NEP: *accD*, или обеими полимеразами: *atpB*, а также для гена *LHCb2*, кодируемого ядром. Исключением являлся ген *trnE*, возможно, из-за способности его продукта подавлять активность полимеразы PEP (Kanamaru, Sugita, 2013). У мутантов по генам сигналинга мелатонина регуляция этих генов практически отсутствовала.

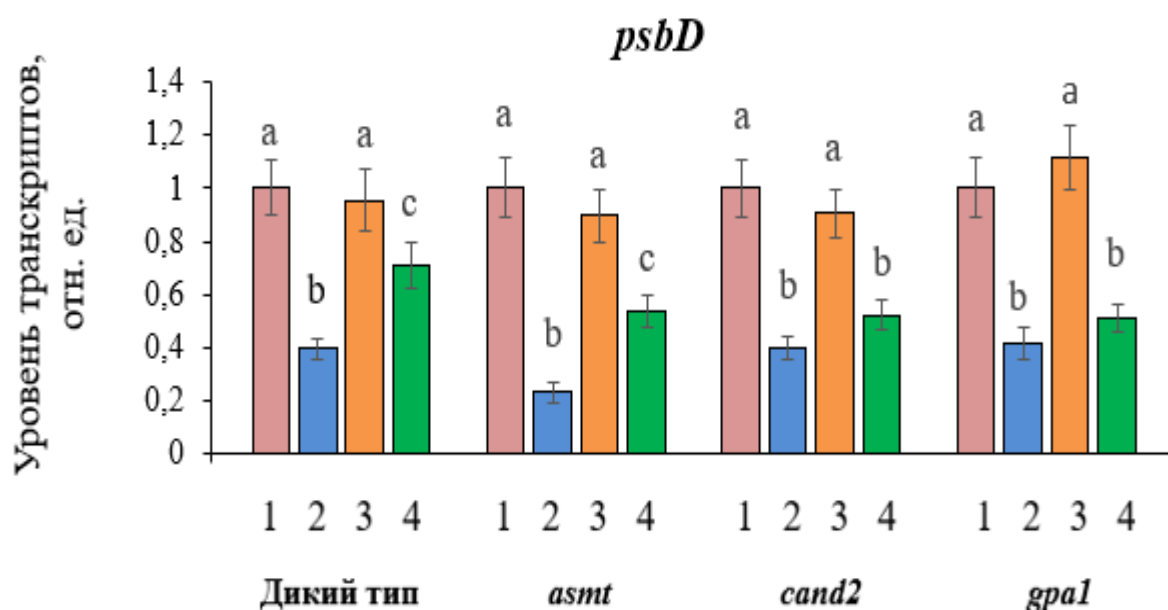


Рисунок 3. Влияние фотоокислительного стресса и мелатонина на экспрессию гена *psbD* у дикого типа и мутантов по генам синтеза и сигналинга мелатонина. 1 – нормальные условия МС; 2 – фотостресс МС; 3 – нормальные условия МС + мелатонин; 4 – фотостресс МС + мелатонин. Уровень достоверности при $p < 0,05$.

Положительное влияние мелатонина также прослеживалось на уровне белков. Как и уровень транскриптов, уровень белка ELIP1 резко увеличивался при сильном фотострессе. Однако у дикого типа и мутанта *asmt* его уровень снижался при обработке мелатонином (рис 4). При этом у мутантов *cand2* и *gpa1* с нарушенным восприятием мелатонина повышенные уровни ELIP1 сохранялись после инкубации с мелатонином. Белок реакционного центра D2, продукт гена *psbD*, регулировался сходным образом. Уровни белков RbcL, *atpB* и *psaB* были приблизительно одинаковы у дикого типа и мутантов при всех условиях, несмотря на то, что соответствующие уровни транскриптов сильно регулировались светом и мелатонином. Несоответствие уровня этих белков содержанию их мРНК позволяет предполагать, что регуляция экспрессии генов в значительной степени происходит на посттранскрипционном уровне.

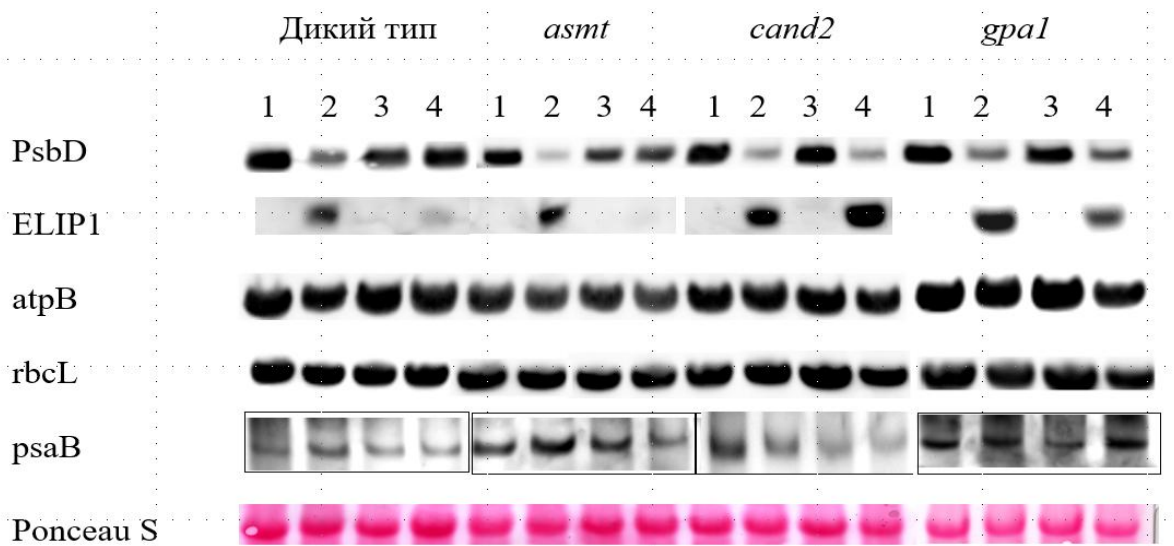


Рисунок 4. Иммуно-блот анализ белков, кодируемых пластидным геномом, и ELIP1 (ядерного кодирования) при сильном фотострессе и обработке мелатонином. Ponceau S использовали в качестве контроля нанесения белка. 1 – нормальные условия МС; 2 – фотостресс МС; 3 – нормальные условия МС + мелатонин; 4 – фотостресс МС + мелатонин.

Поддержание активности экспрессии пластидных генов может быть связано с регуляцией генов РНК-полимераз. Было показано, что мелатонин способен в условиях фотостресса регулировать экспрессию генов как PEP, так и NEP, поддерживая их активность практически на уровне контрольных значений у дикого типа. Данная регуляция была еще сильнее выражена у мутанта *asmt* (рис. 5) и отсутствовала у мутантов *cand2* и *gpa1*.

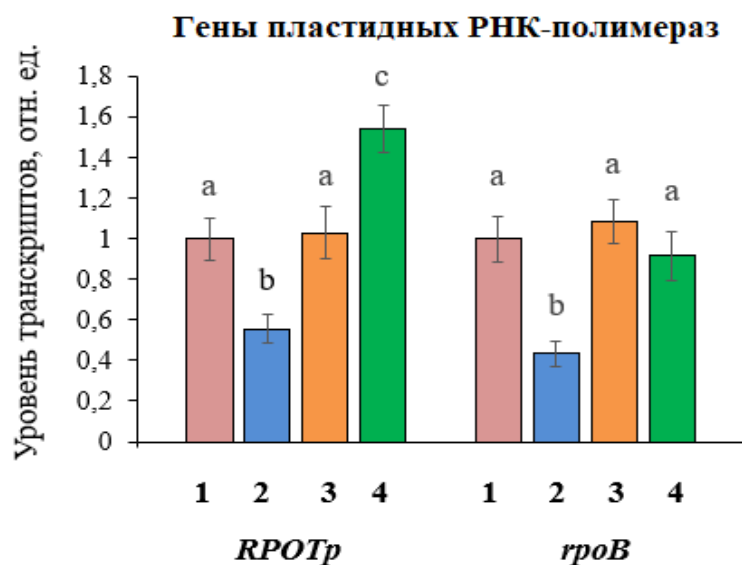


Рисунок 5. Влияние фотостресса и мелатонина на экспрессию генов PEP (*rpoB*) и NEP (*RPOTr*) у мутанта *asmt*. 1 – нормальные условия МС; 2 – фотостресс МС; 3 – нормальные условия МС + мелатонин; 4 – фотостресс МС + мелатонин. Уровень достоверности при $p < 0,05$.

В условиях умеренного стресса в системе срезанных листьев, мелатонин большей степени поддерживал активность пластидных генов «домашнего хозяйства» таких, как *accD*, *rps14*, *rpl16* и *clpP*. Кроме того, мелатонин значительно активировал гены аппарата транскрипции, включая гены обеих типов РНК-полимераз, а также сигма-факторов и РАР-белков, ассоциированные с РЕР. При этом степень активации зависела от концентрации мелатонина, высокая концентрация мелатонина (1 мМ) вызывала ингибирующий эффект.

Таким образом, как при умеренном, так и при сильном стрессе мелатонин способен оказывать влияние на экспрессию генов хлоропластных белков пластидного и ядерного кодирования, однако ответ растений на стресс и мелатонин различается. Экспрессия исследуемых генов была схожа при обработке мелатонином у дикого типа и мутанта по гену синтеза *asmt*, однако мутанты *cand2* и *gpa1* оказались нечувствительны к мелатонину, что говорит о рецептор-зависимой регуляции экспрессии хлоропластных генов.

Влияние мелатонина на процессы дыхания и активность митохондриальных генов. Мелатонин в условиях стресса поддерживал уровень дыхания и уменьшал активность альтернативной оксидазы, в том числе путем регуляции экспрессии гена *Aox1a* у дикого типа и у мутанта по гену синтеза мелатонина N-ацетилсеротонинметилтрансферазы (*ASMT*) (рис. 6).

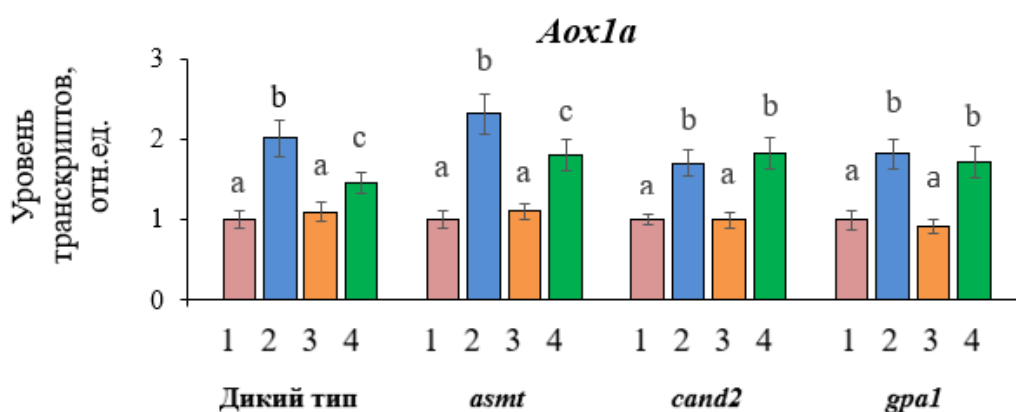


Рисунок 6. Влияние сильного света и мелатонина на накопление транскриптов гена альтернативной оксидазы. 1 – нормальные условия МС; 2 – фотостресс МС; 3 – нормальные условия МС + мелатонин; 4 – фотостресс МС + мелатонин. Уровень достоверности при $p < 0,05$.

Мелатонин поддерживал также на более высоком уровне у дикого типа и *asmt* экспрессию большинства генов хондриома, в том числе субъединицы комплексов I (*nad3* и *nad6*), III (*cob*), IV (*cox1*), и V (*atp6-1*) дыхательной цепи, цитохрома C (*ccmC*, *ccmFc*), рибосомных белков и рРНК (*rps4*, и *rrn26*), транспорта белков (*mttB*) и матуразы (*matR*). Регуляция на уровне генов могла осуществляться за счет дополнительной активации митохондриальных РНК-полимераз, что проявлялось у всех генотипов.

Таким образом, доказано участие мелатонина в регуляции не только пластидных, но и митохондриальных генов. Это важно, так как митохондрии являются одним из мест синтеза мелатонина. Поддержание экспрессии митохондриального генома может осуществляться через механизм регуляции РНК-полимераз *RPOTm* и *RPOTmp*. Экзогенный мелатонин способен прямо снижать фотоокислительный стресс и оказывать влияние на процессы дыхания.

Взаимовлияние мелатонина и фитогормонов (цитокининов и АБК) на гены метаболизма и сигналинга.

Исследование молекулярных механизмов, связывающих мелатонин с гормонами растений, представляет особый интерес, учитывая гормоноподобные функции мелатонина, и его прямое участие в модуляции экспрессии генов (Hardeland, 2016). Цитокинины и АБК считаются гормонами-антагонистами в регуляции многих процессов, включая фотосинтез и ответ на стрессы, что позволяет предположить их возможную регуляторную функцию в поддержании сигнальных и/или метаболических путей мелатонина.

В нормальных условиях уровень транскриптов генов метаболизма и сигналинга цитокининов не изменялся при добавлении мелатонина. В условиях фотостресса происходило падение экспрессии генов синтеза ЦК *IPT3*, *IPT5* и *LOG7*, генов рецепторов *АНК2* и *АНК3*, регуляторов цитокининового ответа типа А *ARR4* и *ARR5* и регуляторов ответа типа В *ARR1* и *ARR12*. Кроме того, фотостресс в два раза повышал активность гена *CRF6*. Мелатонин в условиях стресса способствовал восстановлению нормальной активности генов, а также воздействовал на гены метаболизма, повышая активность гена синтеза цитокинина *IPT3* и снижая активность гена его катаболизма

CKX5 (рис. 7), однако такая регуляция была нарушена у мутантов по генам сигналинга мелатонина. Известно, что при воздействии стресса, содержание цитокининов часто уменьшается, что является отражением изменения активности генов метаболизма цитокининов и несет адаптивный эффект, снижая интенсивность процессов жизнедеятельности (Веселов и др., 2017). В этом случае воздействие мелатонина может рассматриваться как снижение эффекта стресса – мелатонин повышает жизнеспособность растений в данных условиях, что ведет к меньшему падению содержания эндогенного цитокинина.

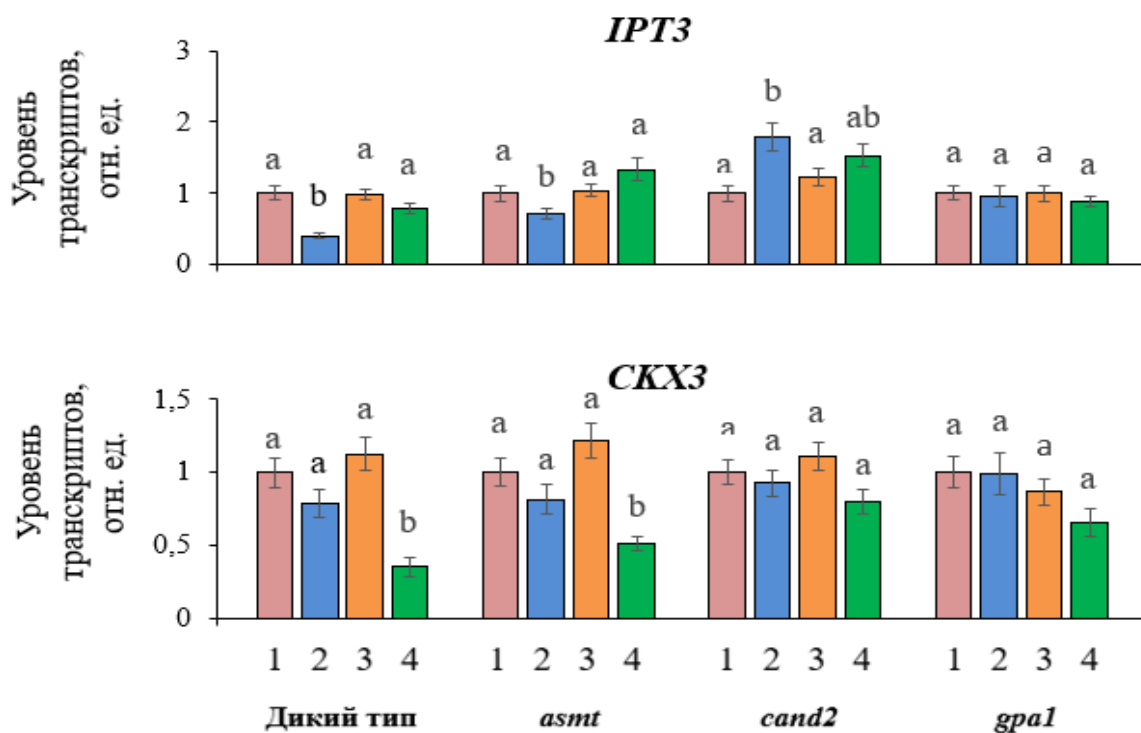


Рисунок 7. Влияние сильного света и мелатонина на экспрессию генов синтеза и катаболизма цитокининов. 1 – нормальные условия МС; 2 – фотостресс МС; 3 – нормальные условия МС + мелатонин; 4 – фотостресс МС + мелатонин. Уровень достоверности при $p < 0,05$.

У дикого типа и мутантов по генам синтеза и сигналинга мелатонина было изучено влияние мелатонина на активность одного из генов фермента синтеза АБК *ABA3*, гена фермента-участника катаболизма АБК *CYP707A1*, генов цепи передачи сигнала АБК *ABI1*, *ABI2* и генов транскрипционных факторов *ABI4* и *ABI5*. Все эти гены у дикого типа значительно активировались фотострессом. При обработке

мелатонином при фотострессе увеличение экспрессии генов было выражено в гораздо меньшей степени, исключением являлся ген катаболизма *CYP707A1*, накопление транскриптов которого оставалось высоким при действии регулятора. У мутанта *asmt*, в отличие от дикого типа, ответ на воздействие избыточного света был выражен слабее для части исследованных генов, возможно, недостаток мелатонина способен влиять на метаболизм и/или сигналинг АБК, хотя регуляция генов мелатонином была схожа с регуляцией у дикого типа. У мутантов по сигналингу мелатонина реакция генов, связанных с АБК, на световой стресс была аналогична реакции дикого типа, однако экзогенный мелатонин не влиял на их экспрессию. Исключением являлся ген *ABI4*, который у мутантов по трансдукции сигнала мелатонина не регулировался ни стрессом, ни мелатонином (рис. 8). Возможно, кодируемый им *транс*-фактор является ключевым звеном во взаимодействиях АБК и мелатонина, так же как является важным звеном во взаимодействии АБК и гиббереллинов (Shu et al., 2016).

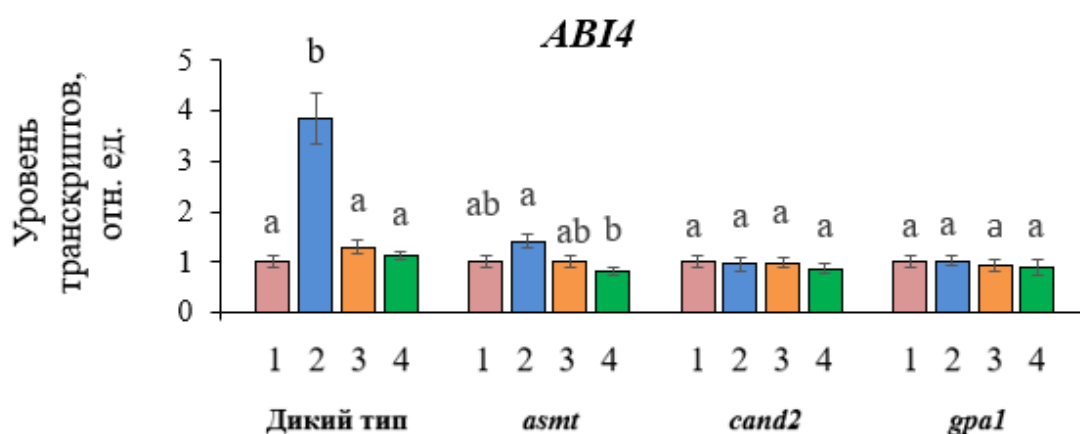


Рисунок 8. Влияние сильного света и мелатонина на экспрессию гена *ABI4*. 1 – нормальные условия МС; 2 – фотостресс МС; 3 – нормальные условия МС + мелатонин; 4 – фотостресс МС + мелатонин. Уровень достоверности при $p < 0,05$.

Цитокинин и АБК регулировали гены метаболизма и сигналинга мелатонина у дикого типа и МТ-мутантов. В нормальных условиях добавление цитокинина не влияло на экспрессию генов *SNAT* и *COMT*, но резко активировало ген *ASMT* во всех вариантах (рис. 9). В условиях стресса цитокинин немного замедлял падение экспрессии генов *SNAT* и *COMT* у дикого типа, и не влиял на эти гены у мутантов. В нормальных условиях гены потенциального рецептора мелатонина *CAND2* и элемента

сигналинга *GPA1* не регулировались цитокинином ни у дикого типа, ни у мутантов. *Транс*-зеатин в условиях стресса немного уменьшал негативное влияние избыточного света на экспрессию гена *CAND2* (кроме мутанта *gpa1*), и поддерживал на уровне контроля или даже выше активность гена *GPA1* (кроме мутанта *cand2*).

У дикого типа АБК в нормальных условиях не влияла на экспрессию гена *COMT*, немного снижала активность гена *SNAT* и резко подавляла активность гена *ASMT*, что было противоположно эффекту цитокинина (рис. 9). Сходной реакция была и у других генотипов. В условиях стресса АБК не влияла или немного повышала экспрессию всех генов синтеза мелатонина, однако ген *ASMT* у мутантов по сигналингу мелатонина подавлялся гормоном еще сильнее по сравнению с необработанными растениями при избыточном освещении. Также у дикого типа и мутанта *asmt* АБК поддерживала на более высоком уровне, вплоть до контрольных значений, активность экспрессии генов *CAND2* и *GPA1*. Экспрессия у двух других мутантов не изменялась при действии АБК и стресса.

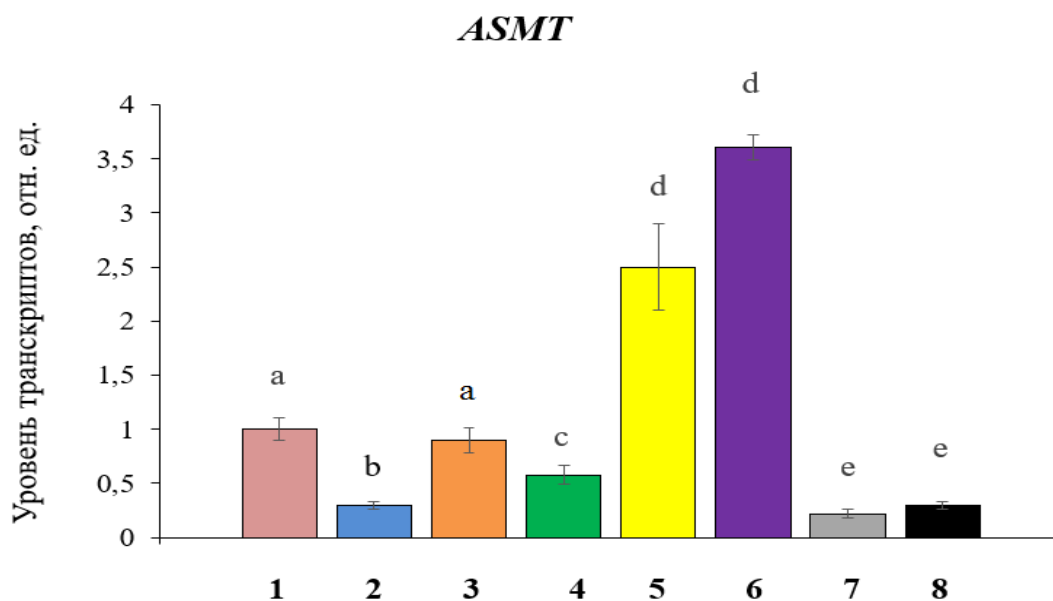


Рисунок 9. Влияние сильного света, мелатонина, *транс*-зеатина и АБК на экспрессию гена *ASMT*. 1 – нормальные условия МС; 2 – фотостресс МС; 3 – нормальные условия МС + мелатонин; 4 – фотостресс МС + мелатонин; 5 – нормальные условия МС + цитокинин; 6 – фотостресс МС + цитокинин; 7 – нормальные условия МС + АБК; 8 – фотостресс МС + АБК. Уровень достоверности при $p < 0,05$.

Использование мутантов по генам метаболизма и сигналинга цитокининов и АБК позволило установить, что у мутантов *ahk2/3* и *arr1,10,12* уровень мелатонина в нормальных условиях и при фотострессе был сопоставим с диким типом. Однако мутант *ipt3,5,7* отличался сниженным базовым уровнем мелатонина и другим характером ответа на стресс: в условиях избыточного света уровень мелатонина повышался, а не понижался, как у других мутантов. Эта реакция, вероятно, объяснялась повышенной устойчивостью к стрессам мутантов с недостаточностью синтеза ЦК (Nishiyama et al., 2011), что позволяло сохранять им в условиях жесткого светового стресса более высокий уровень синтеза, когда у растений дикого типа уже происходило его ингибирование. Также у него в отличие от других мутантов и дикого типа, стресс активировал накопление транскриптов гена *SNAT*. Добавление мелатонина уменьшало его активность при стрессе. Кроме того, его экспрессия повышалась *транс*-зеатином в нормальных условиях. Накопление транскриптов гена *ASMT* подавлялось светом, в том числе при добавлении мелатонина, хотя и в меньшей степени, чем у других ЦК-мутантов. Цитокинин, как и в других случаях, активировал данный ген, причем в большей степени в условиях стресса. Еще одним отличием было то, что у данного мутанта фотостресс, мелатонин и цитокинин активировали накопление транскриптов гена потенциального рецептора мелатонина *CAND2*.

Использование мутанта по гену синтеза АБК *aba3* и двух мутантов по генам *транс*-факторов *abi4* и *abi5* позволило выявить особую регуляцию гена *ASMT* у мутанта *abi4*. Данный ген значительно активировался стрессом, однако реакции на АБК, характерной для дикого типа и других мутантов, не наблюдалось. Это, позволяет предполагать возможность вовлечения данного *транс*-фактора в регуляцию гена *ASMT*, и говорит о возможном механизме регуляции абсцизовой кислотой метаболизма мелатонина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фотоокислительный стресс является хорошей экспериментальной моделью для изучения защитных свойств мелатонина, так как свет высокой интенсивности

непосредственно влияет на процессы фотосинтеза и дыхания – два главных процесса жизнедеятельности растений.

На двух модельных системах мы показали роль мелатонина в защите растительных клеток. При умеренном стрессе мелатонин проявлял антиоксидантные свойства, что выражалось в уменьшении накопления антоцианов, снижении степени повреждения липидов мембран, поддержании уровня фотосинтетических пигментов и функциональной активности фотосистем. То же самое наблюдалось и при сильном световом стрессе. Однако умеренный стресс слабо изменял экспрессию фотосинтетических генов. Мелатонин в основном поддерживал активность генов «домашнего хозяйства», а не собственно фотосинтетических генов, хотя на уровне содержания фотосинтетических белков эффект был обнаружен. Умеренный стресс активировал также экспрессию генов аппарата транскрипции хлоропластов, а мелатонин активировал ее еще больше. При сильном стрессе продемонстрирована роль мелатонина в поддержании экспрессии фотосинтетических генов, которые сильно подавлялись световым воздействием. Эффект наблюдался также на уровне соответствующих белков. Мелатонин поддерживал активность аппарата транскрипции хлоропластов, гены которого подавлялись при фотоокислительном стрессе. Экспрессия митохондриальных генов также значительно подавлялись сильным фотострессом, однако избыточный свет активировал гены РНК-полимераз. Продemonстрирована роль мелатонина в поддержании экспрессии генов хондриома, а также регуляции дыхания и альтернативной оксидазы.

Использование мутанта по гену синтеза мелатонина позволило показать, что растения с дефицитом мелатонина более подвержены фотоокислительному стрессу. На уровне экспрессии генов, мутантные растения в гораздо большей степени отвечали на обработку экзогенным мелатонином. Кроме того, иммуноферментное измерение показало, что экзогенный мелатонин увеличивает содержание мелатонина в клетках.

Ответ мутантов по предполагаемым генам сигналинга мелатонина на экзогенную обработку при стрессе проявлялся в основном на уровне физиологических показателей. Вероятно, такой ответ связан с прямой

антиоксидантой ролью мелатонина. При этом не наблюдалось изменения экспрессии большинства исследованных генов, а также корректировки сложных процессов, таких как активность фотосистем, что говорит о рецептор-зависимой регуляции данных процессов мелатонином.

Система межгормональных взаимодействий растений является очень сложной и до сих пор изучена лишь частично. Очевидно, немаловажным фактором в этой системе является мелатонин. Мы показали, что в условиях стресса мелатонин способен регулировать активность генов метаболизма и сигналинга цитокининов и АБК либо напрямую, либо путем создания более благоприятной физиологической ситуации в клетках. Также мы показали, что недостаток мелатонина изменяет амплитуду ответа на стресс большинства исследованных АБК-зависимых генов и генов регуляторов ответа на цитокинин типа А, а при нарушении сигналинга мелатонина изменялся ответ на стресс гена синтеза цитокининов *IPT3* и *транс*-фактора *ABI4*. Цитокинин и АБК, в свою очередь, изменяли экспрессию генов синтеза и сигналинга мелатонина. Это говорит о наличии мелатонин-гормональных взаимодействий. Одной из возможных точек взаимодействия может являться регуляция гена *ASMT*, который кодирует фермент синтеза мелатонина и разнонаправленно регулируется цитокининами и абсцизовой кислотой. Использование нокаутированного мутанта позволило доказать роль *транс*- фактора *ABI4* в регуляции этого гена.

Представленные в диссертационном исследовании материалы характеризуют мелатонин как участника сложных взаимодействий при фотоокислительном стрессе, что позволяет рассматривать мелатонин, не только как антиоксидант, но и как гормоноподобный регулятор, вовлеченный в самые различные процессы.

ВЫВОДЫ

1. Мелатонин эффективно защищает растения при фотострессе, поддерживая целостность плазматических мембран, восстанавливая фотосинтетические функции и оказывая влияние на процесс дыхания.

2. Мутанты с дефицитом мелатонина более подвержены фотоокислительному стрессу и более чувствительны к экзогенному мелатонину. Дефицит мелатонина может влиять на транскрипцию генов синтеза и сигналинга фитогормонов.
3. Мелатонин влияет на экспрессию пластидных, митохондриальных и ядерных генов. Регуляция экспрессии генов органелл мелатонином может реализоваться через его эффект на аппарат транскрипции пластид и митохондрий.
4. Получены новые подтверждения того, что CAND2/PMTR1 выполняет рецепторную функцию мелатонина. Экзогенный мелатонин не регулирует экспрессию многих исследованных пластидных, митохондриальных и ядерных генов в мутантах с инактивированной системой рецепции и сигналинга мелатонина (*cand2*, *gpa1*).
5. Мелатонин влияет на экспрессию генов синтеза, рецепции и сигналинга цитокининов и АБК. Наблюдается и обратное влияние цитокининов и АБК на гены синтеза и сигналинга мелатонина, что позволяет предполагать их взаимодействие в условиях абиотических стрессов. Важную роль в этом может играть ключевой фермент синтеза мелатонина ASMT. В регуляции гена данного фермента абсцизовой кислотой, вероятно, участвует транскрипционный фактор ABI4.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В журналах, рекомендованных ВАК:

1. **Бычков И.А., Кудрякова Н.В., Шугаев А.Г., Кузнецов Вл. В., Кузнецов В.В.** (2022) Рецептор мелатонина CAND2/PMTR1 участвует в регуляции экспрессии митохондриальных генов при фотоокислительном стрессе. Доклады российской академии наук. Науки о жизни, **502(1)**, 21-27.

2. **Bychkov I.A., Kudryakova N.V., Pojidaeva E.S., Kusnetsov V.V.** (2021) The melatonin receptor CAND2 is involved in the regulation of photosynthesis and chloroplast gene expression in *Arabidopsis thaliana* under photooxidative stress. *Photosynthetica*, **59(4)**, 683-692.

3. **Bychkov Ivan, Kudryakova Natalia, Andreeva Aleksandra, Pojidaeva Elena, Kusnetsov Victor.** (2019) Melatonin modifies the expression of the genes for nuclear- and

plastid-encoded chloroplast proteins in detached *Arabidopsis* leaves exposed to photooxidative stress. *Plant Physiol. Biochemistry*, **144**, 404-412.

В прочих изданиях:

1. **Бычков И.А., Кудрякова Н.В., Кузнецов В.В.** (2021) Роль мелатонина в изменении экспрессии генов метаболизма и сигналинга цитокининов и АБК у *Arabidopsis thaliana* при фотоокислительном стрессе. Всероссийская научная конференция с международным участием «Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее». Материалы докладов. Москва, 2021, 197.

2. **Bychkov I.A., Kudryakova N.V., Kusnetsov V.V.** (2021) Effect of melatonin deficiency and disruption of its receptor signaling pathway on photosynthetic parameters and expression of chloroplast genes in plants of *Arabidopsis thaliana* under photooxidative stress. *PLANT GENETICS, GENOMICS, BIOINFORMATICS, AND BIOTECHNOLOGY (PLANTGEN2021)*. Novosibirsk, ICG SB RAS, 46.

3. **Бычков И.А., Кудрякова Н.В., Кузнецов В.В.** (2020) Участие мелатонина в регуляции экспрессии генов аппарата транскрипции хлоропластов *Arabidopsis thaliana* при фотоокислительном стрессе. Материалы трудов XXVII Всероссийской молодежной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии» Сыктывкар. ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН. С.103-106.

4. **Бычков И.А.** (2019) Роль мелатонина в поддержании функциональной активности фотосистем I и II в листьях *Arabidopsis thaliana* при фотострессе. XXVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». Москва, 2019. ISBN 978-5-317-06100-5.

5. **Бычков И.А., Кудрякова Н.В., Кузнецов В.В.** (2018) Мелатонин и его участие в реакциях фотоокислительного стресса *Arabidopsis thaliana*. Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям окружающей среды. Сборник материалов Годичного собрания Общества физиологов растений России. Иркутск: Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН. С. 170-173.