


На правах рукописи



Андреева Александра Александровна

**Регуляция экспрессии генов белков, ассоциированных с
пластидной РНК-полимеразой бактериального типа, 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

Кузнецов Владимир Васильевич

кандидат биологических наук

Кудрякова Наталия Васильевна

Официальные оппоненты:

Шакирова Фарид Миннихановна

доктор биологических наук, профессор, руководитель 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

Захарова Екатерина Владимировна

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории маркерной и геномной селекции растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии"

Ведущая организация: Институт биологии - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра "Карельский научный центр Российской академии наук"

Защита диссертации состоится «23» июня 2022 года в 11 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 темы исследования. Ведущую роль в реализации механизмов биогенеза хлоропластов играет аппарат пластидной транскрипции. Согласно современным представлениям, транскрипция пластома осуществляется РНК-полимеразами двух типов: ядерного и пластидного кодирования, а также транскрипционными факторами семейства сигма. В минимальный РНК-полимеразный комплекс входят также 12 белков, ассоциированных с пластидной мультисубъединичной РНК-полимеразой бактериального типа (PEP), названных PEP-ассоциированными белками (Plastid RNA-associated proteins, PAP). Хотя белки PAP различаются по своей структуре и функциям, кодирующие их гены проявляют большую степень корреляции в накоплении транскриптов и, по мнению Pfannschmidt и коллег, образуют регулон (Pfannschmidt et al., 2015). Инактивация любого из этих белков приводит к бесхлорофильному или бледно-зеленому фенотипу с подавлением развития хлоропластов, отсутствием или минимальной активностью PEP и увеличенной активностью хлоропластных РНК-полимераз ядерного кодирования (NEP). Несмотря на то, что белки PAP являются предметом интенсивных исследований, в настоящее время практически отсутствуют данные об их регуляции факторами эндогенной или экзогенной природы, определяющими специфичность действия белков PAP. Поэтому изучение регуляции экспрессии генов *PAP* имеет приоритетный характер и может представлять интерес для расшифровки деталей функционирования транскрипционного аппарата пластид и понимания механизмов биогенеза пластид.

Целью представленной работы является анализ особенностей гормон-зависимой и стресс-индуцибельной регуляции экспрессии генов, кодирующих белки, ассоциированные с пластидной РНК-полимеразой бактериального типа у растений *Arabidopsis thaliana*. Для реализации указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать влияние экзогенных фитогормонов на уровень транскриптов генов *PAP* у растений дикого типа на разных стадиях онтогенеза.
2. При выявлении гормон-зависимых реакций изучить экспрессию генов *PAP* у мутантов по синтезу и трансдукции гормональных сигналов.

3. Провести анализ особенностей гормон-зависимой регуляции генов синтеза и трансдукции гормональных сигналов и хлоропластных генов у мутантов с инактивированными генами *PAP*.

4. Используя коммерческие антитела на хлоропластные белки, оценить влияние фитогормонов на содержание хлоропластных белков у растений дикого типа и мутантов *rap*.

5. Проанализировать экспрессию генов белков *Arabidopsis thaliana*, ассоциированных с пластидной РНК-полимеразой, в условиях абиотического стресса различной природы у растений дикого типа и мутантов *rap*.

Научная новизна. Впервые показано, что для генов, кодирующих белки, ассоциированные с пластидной РНК-полимеразой бактериального типа, характерна высокая степень ко-регуляции экспрессии при обработке экзогенными гормонами, сочетающая ингибиторное влияние одних и активирующее – других. Ответная реакция на воздействие фитогормонов зависит от генетического фона растения: в отличие от образцов дикого типа у инсерционного мутанта с нокаутированным геном *PAP1* транс-зеатин не оказывал активирующего влияния на экспрессию генов аппарата транскрипции и пластидных генов или даже подавлял ее. Этот эффект не был связан с нарушениями в цепи трансдукции сигнала ЦК, но определялся увеличенным уровнем базовой экспрессии генов синтеза и катаболизма гормона. Предполагаемое изменение гормонального статуса мутанта могло быть результатом компенсаторного механизма, позволяющего растению стимулировать морфогенез в отсутствие нормального фотосинтеза. Различные виды абиотического стресса дифференциально регулировали накопление транскриптов генов *PAP*. При этом изменение характера экспрессии различных генов *PAP* в ответ на действие стрессоров определялось их физиологической функцией. У мутантов *rap4* и *rap9* инактивация генов, кодирующих железосодержащую супероксиддисмутазу, индуцировала специфичные и общие реакции и вызывала помимо ингибирования фотозависимого ответа пониженную устойчивость к тепловому стрессу. Полученные данные представляют интерес для понимания механизмов взаимодействия компонентов транскрипционного аппарата пластид и сигнальных путей растений в регуляции биогенеза хлоропластов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Данные об участии фитогормонов и стресс-факторов в регуляции экспрессии генов, кодирующих белки РАР, являются важным источником информации о функционировании и биогенезе хлоропластов и могут найти применение в генно-инженерных работах для создания экологически чистых транспластомных растений с улучшенными характеристиками продуктивности и стресс-толерантности. Полученные результаты открывают новые возможности для дальнейших фундаментальных исследований фотосинтетической функции растений и могут быть использованы в учебном процессе в высших учебных заведениях страны.

Методы и методология исследования. В качестве методологической основы данной работы выступали общепринятые протоколы и методики. В работе применялись молекулярно-генетические и биохимические методы анализа. Для обработки полученных результатов использовали различные компьютерные программы.

Степень достоверности и апробация результатов. Эксперименты, представленные в данной работе, были проведены в достаточных биологических и аналитических повторностях, исходя из которых можно было построить достоверную статистику. Выводы обоснованы экспериментально и отражены в печатных работах. Результаты работы были представлены на 5 конференциях. По материалам диссертации опубликовано 12 работ, 7 из которых – статьи в рецензируемых изданиях.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследований, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Материалы диссертации изложены на 136 страницах машинописного текста и содержат 23 таблицы и 41 рисунок. Список цитируемой литературы включает 115 наименований, в том числе 108 иностранных.

Положения, выносимые на защиту:

1. Гены, кодирующие белки, ассоциированные с пластидной РНК-полимеразой бактериального типа (белки РАР), показали высокую степень ко-регуляции в содержании транскриптов на разных этапах онтогенеза, которая контролировалась световыми, онтогенетическими и циркадными сигналами.

2. Салициловая кислота, АБК, метилжасмонат и brassinosteroids подавляли активность генов *PAP*, а цитокинин индуцировал их экспрессию.
3. Ответная реакция генов *PAP* на воздействие цитокинина зависела от генетического фона растения. У мутанта с нокаутированным геном *PAP1* цитокинин не оказывал активирующего влияния на экспрессию пластидных генов и ядерных генов аппарата транскрипции в отличие от растений дикого типа. Этот эффект не был связан с нарушениями в цепи трансдукции сигнала ЦК, а объяснялся изменением экспрессии генов синтеза и катаболизма гормона и изменением уровня эндогенных ЦК.
4. Дифференциальная экспрессия различных генов *PAP* на действие абиотических стрессоров определялась физиологической функцией кодируемых ими белков. Гены железосодержащей супероксиддисмутазы *PAP9/FSD2* и *PAP4/FSD3*, наряду с их специализированными функциями в формировании и поддержании комплекса PEP, участвовали в защите хлоропластного генома и генов аппарата транскрипции пластид от негативного воздействия различных стрессоров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования и условия выращивания. В исследовании были использованы растения вида *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., экотип Columbia-0 (Col-0) и созданные на его основе инсерционные нокаут-мутанты, полученные из коллекций ABRC и NASC. Растения выращивали на агаризованной питательной половинной среде MC с добавлением 1% сахарозы в чашках Петри, которые после стратификации в течение 3 суток переносили в климатическую камеру MLR-352H-PE (Sanyo, Япония) и культивировали при температуре 23°C, продолжительности светового/темнового периодов 16/8 часов и интенсивности освещения 120 мкЕ·м⁻²·с⁻¹. Мутантные линии *rar* выращивали на агаризованной полной питательной среде MC с добавлением 2% сахарозы.

Электронные базы данных. Последовательности ДНК целевых генов были получены из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Праймеры подбирали в программе Vector NTI Advance 11 (Invitrogen). Подобранные последовательности дополнительно были проверены онлайн-инструментом Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Обработка фитогормонами. Для обработки растений фитогормонами использовали концентрации, указанные в базе данных <https://bar.utoronto.ca/>. Обработку производили 2 способами: опрыскиванием и перенесением фильтровальной бумаги с растительным материалом в чашки Петри с раствором гормона.

Методы молекулярного анализа.

Выделение тотальной ДНК. Выделения ДНК из растительных тканей проводили в соответствии с Маниатис и др. (1984).

Выделение РНК и ПЦР в режиме реального времени. РНК выделяли при помощи TRIzol-реагента по стандартному протоколу. Для выделения РНК из семян применяли методику Meng и Feldman (2010). Концентрацию и чистоту полученных препаратов нуклеиновых кислот определяли с использованием прибора NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, США). Очистку РНК от примеси ДНК производили с применением ДНКазы I (ThermoFisher Scientific, США). После проверки качества выделенной РНК проводили обратную транскрипцию с использованием праймеров и обратной транскриптазы RevertAid Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific, США). Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) в присутствии ген-специфичных праймеров. Реакции проводили на амплификаторе Light Cycler 96 («Roche», Швейцария). Референсными генами служили *UBC10 (At4g05320)* и *PP2A (At3g25800)*. Все образцы были проанализированы в трех биологических и аналитических повторах.

Методы биохимического и биофизического анализов.

Выделение белка и вестерн-блот анализ. Растительные ткани, замороженные в жидком азоте, гомогенизировали в экстракционном буфере (330 мМ Сорбит(D), 50 мМ HEPES pH 8.0, 1 мМ MgCl₂, 2 мМ EDTA-Na₂ pH 8.0). Содержание белка в экстракте определяли при помощи кита BCA Assay and Lowry Assays (Thermo Fisher Scientific, США).

Электрофорез проводили в 10% SDS-PAGE с использованием камеры для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, США). Для полусухого переноса белков из геля на мембрану использовали прибор Trans-Blot SD Semy-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, США). Вестерн-блот гибридизацию проводили

в соответствии с рекомендацией фирмы Agrisera (Швеция). Для детекции сигнала, использовали растворы для реакции хемилюминесценции (ECL western blotting detection Kit, Bio-Rad, США). Сигнал регистрировали в темной комнате на рентгеновской пленке, а также на приборе Licor (США) и iBright 1500 (Thermo Fisher Scientific, США).

Определение пигментов проводили стандартным методом, предложенным Lichtenthaler (Lichtenthaler, 1987) с помощью спектрофотометра Pharmacia Biotech ultrospec 2000 (UK). Параметры фотосинтетической активности ФС II оценивали, измеряя флюоресценцию хлорофилла а и редокс-превращения первичного донора электронов (P700) с помощью флуориметра DUAL-PAM-100 (Walz, Германия) согласно протоколу Козулёвой и др. (2017). Вторичные продукты перекисного окисления липидов мембран (МДА) определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой в соответствии с протоколом Heath L.R., Packer L. (1968). Содержание перекиси водорода в растительных тканях измеряли по методу Kumar S. N., Knowles N. R. (1993). Содержание свободного пролина определяли по методу Bates et al. (1973).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессии генов *PAP* в процессе онтогенеза. На первом этапе работы исследовали экспрессию генов *PAP* на разных стадиях онтогенеза растения. При прорастании активация экспрессии генов *PAP* происходит уже к окончанию стратификации и нарастает в процессе становления транскрипционной системы пластид как на свету, так и в темноте. Это говорит о том, что, по крайней мере, на уровне мРНК, *PAP* необходимы для нормального биогенеза пластид с самых ранних этапов прорастания. Максимальное накопление транскриптов генов *PAP* наблюдали в семядолях 7-дневных проростков, которое по мере роста растений снижалось (рис. 1).

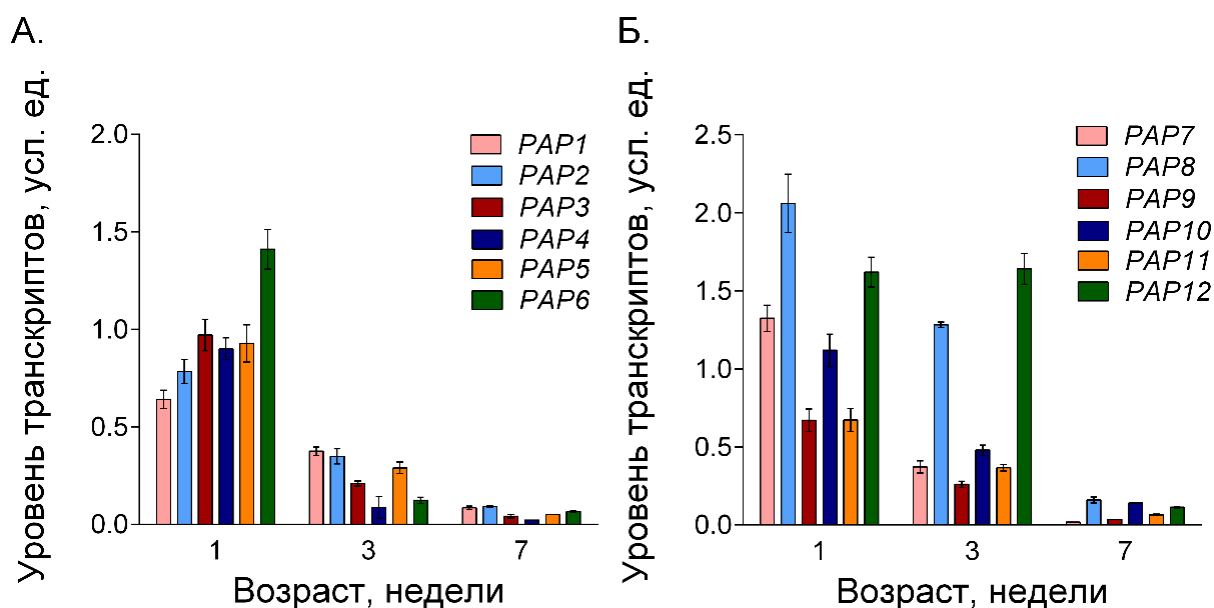


Рисунок 1. Экспрессия генов *PAP1-6* (А) и *PAP7-12* (Б) на разных этапах онтогенеза *A. thaliana* (Col-0).

На разных этапах жизненного цикла гены *PAP* продемонстрировали высокую степень ко-регуляции в содержании транскриптов, которая, по-видимому, контролировалась световыми, онтогенетическими и циркадными сигналами. Тем не менее, для некоторых генов были отмечены генно-специфичные особенности в величине экспрессии, которые могли объясняться не только интенсивностью транскрипции и селективной стабильностью транскриптов, но и функциональной специфичностью белков.

Анализ гормон-зависимой экспрессии генов *PAP* у растений дикого типа
Изменение активности генов аппарата транскрипции под действием эндогенных и экзогенных факторов имеет важнейшее значение в регуляции экспрессии хлоропластных генов. Вопрос о том, подвержены ли ядерные гены, кодирующие РЕР-ассоциированные белки, гормональной регуляции, оставался открытым. В связи с этим мы исследовали влияние основных классов фитогормонов на уровень транскриптов генов *PAP* у растений *A. thaliana* дикого типа.

Для этого 7-дневные проростки, выращенные на жидкой половинной среде МС, обрабатывали на свету растворами гормонов ранее подобранных концентраций в МС среде в течение 3 ч в соответствии с протоколом (Kilian et al., 2007). Для подтверждения эффективности гормональной обработки анализировали накопление транскриптов ядерных генов (рис. 2), используемых в качестве маркёров действия

фитогормонов: *ARR5* (цитокинин, ЦК), *ERF1* (этилен, АЦК), *ERF-1* (метилжасмонат, МЖ), *RAB18* (АБК), *DWF4* (брасиностероиды, БС), и *PR1* (салициловая кислота, СК).

Согласно полученным данным, СК, АБК и МЖ негативно регулировали активность генов транскрипционного аппарата пластид (рис. 2). Обработка этими фитогормонами вызывала падение уровня транскриптов всех категорий генов *PAP*. Ингибирующий эффект АБК и МЖ мог быть связан с повышением концентрации алармона гуанозин-3'-5'-бисдифосфата (ppGpp), который, связываясь с β -субъединицей пластидной РНК-полимеразы, способен изменять её взаимодействие с промоторами транскрибируемых генов (Sato и др., 2009).

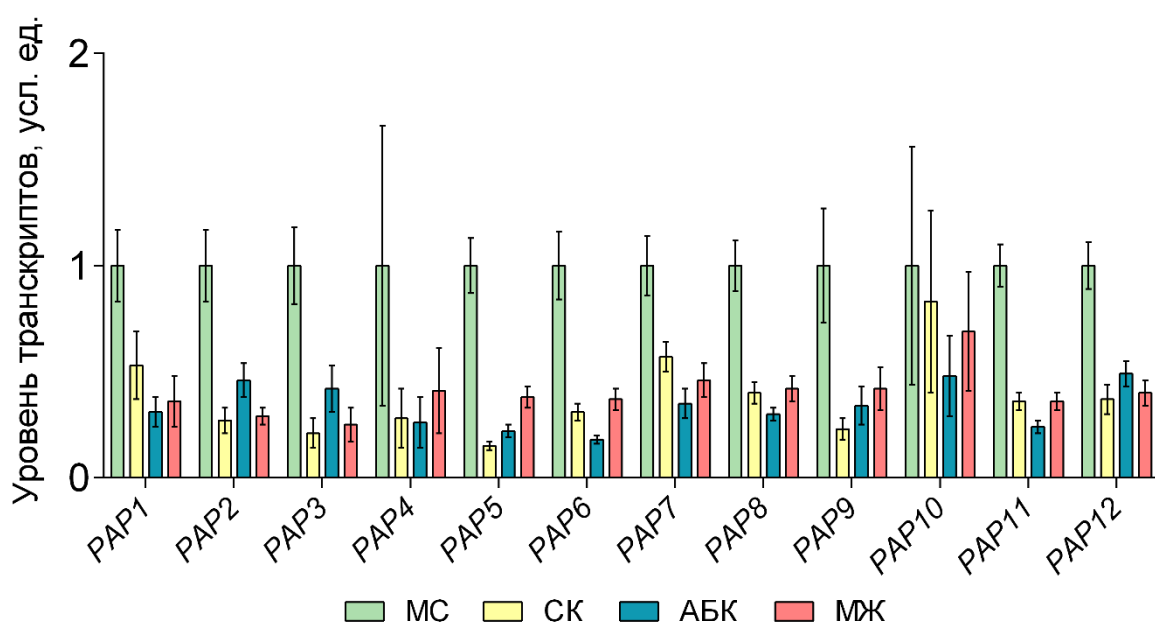


Рисунок 2. Влияние экзогенных фитогормонов на уровень транскриптов генов *PAP* в проростках *A. thaliana* Col-0. Нормализация относительно необработанного контроля. Контроль – среда MC без гормона; метилжасмонат – МЖ; абсцизовая кислота – АБК; салициловая кислота – СК.

Экзогенный *транс*-зеатин, напротив, усиливал накопление транскриптов всех генов *PAP*. Брасинолид при уровне освещения $100 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ действовал преимущественно как антагонист цитокинина. В условиях наших экспериментов предшественник этилена 1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота (АЦК; 10 мкМ) не влиял на накопление транскриптов генов *PAP* (рис. 3).

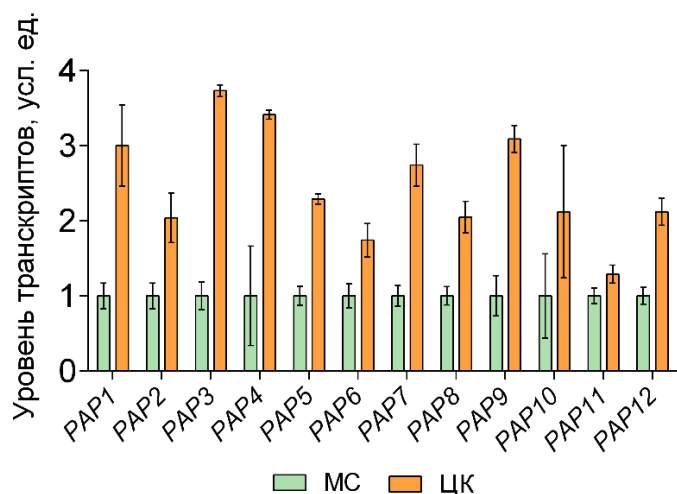


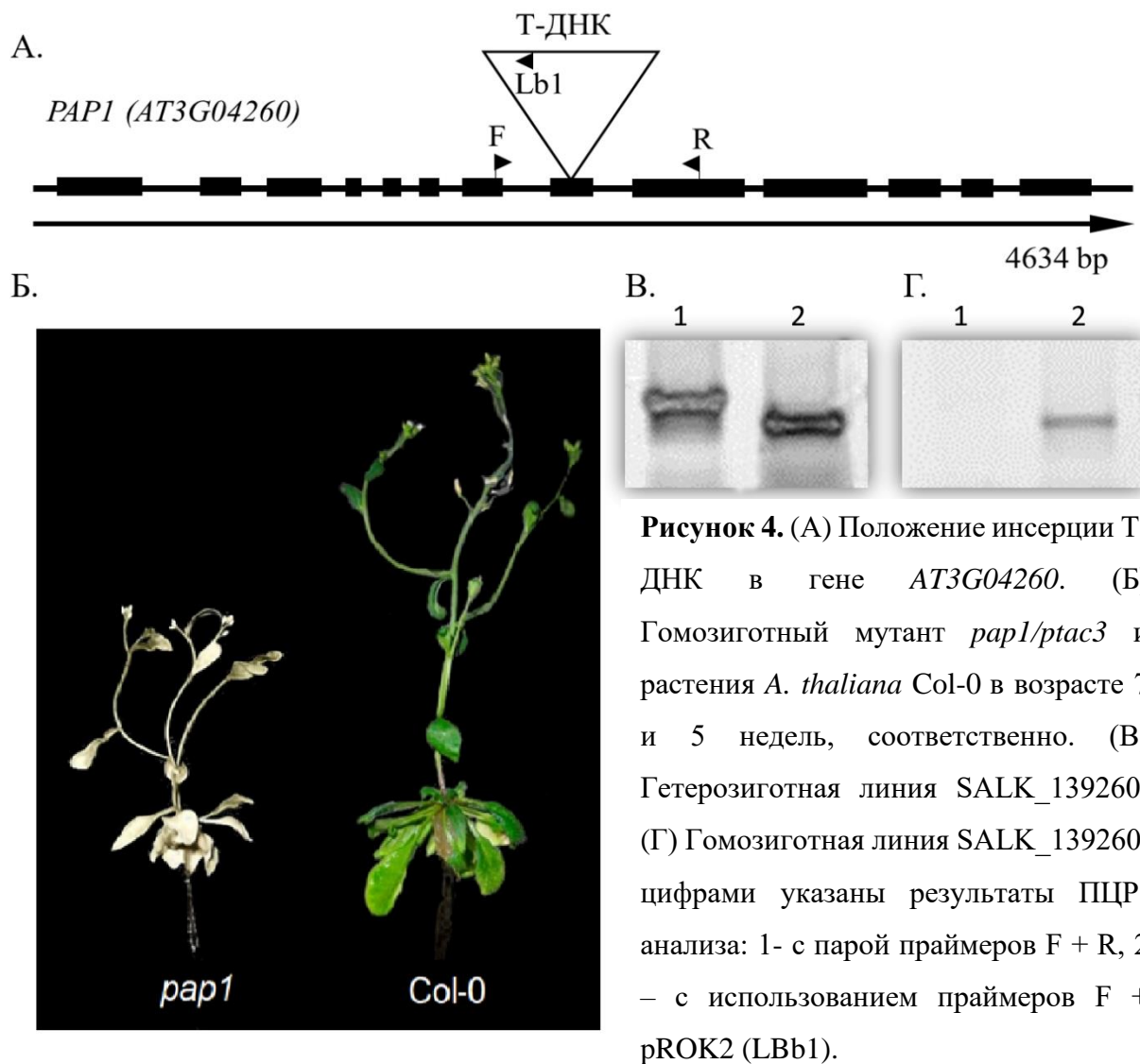
Рисунок 3. Влияние экзогенных фитогормонов на уровень транскриптов генов *PAP* в проростках *A. thaliana* Col-0. Нормализация относительно необработанного контроля. Контроль – среда МС без гормона; цитокинин – ЦК.

Результаты исследований позволяют заключить, что гены PER-ассоциированных белков дифференцированно отвечают на воздействие экзогенных гормонов. Активация экспрессии или ее ингибирование определяются специфичностью действия конкретного гормона, а также физиологическим статусом растений, определяющим «окна возможностей» реализации гормональных сигналов. Однако в целом ответная реакция генов *PAP* на действие экзогенных гормонов соответствует представлению об их ко-регуляции и, несмотря на различие функций кодируемых ими белков, позволяет предполагать наличие общих регуляторных элементов.

Роль цитокинина в регуляции экспрессии генов *PAP*. Белки *PAP* и кодирующие их гены вызывают большой интерес как возможные мишени действия ЦК. Экзогенный *транс*-зеатин усиливал накопление транскриптов всех генов *PAP* независимо от их функций. ЦК-регулируемая экспрессия генов *PAP* могла осуществляться при непосредственном участии генов канонического пути передачи сигнала этого гормона: инактивация генов рецепторов ЦК *АНК 2* и *3*, фосфотрансммиттеров *АНР2,3* и *5* и генов регуляторов ответа на ЦК типа В *ARR 1,10* и *12* резко снижала реакцию генов *PAP* на действие *транс*-зеатина.

Далее мы решили выяснить, как инактивация генов белков *PAP* могла бы повлиять на экспрессию генов ответа на действие *транс*-зеатина и ЦК-зависимую экспрессию генов аппарата транскрипции пластид и некоторых пластидных генов. Для анализа был выбран мутант по гену *PAP1* (рис. 4). *PAP1* – белок размером около 110 kDa, ассоциированным с комплексом PER на всех трех стадиях транскрипционного цикла (Yagi et al., 2012). *PAP1* является транскрипционным

фактором общей направленности и содержит ДНК-связывающий домен SAP и домен PPR, участвующий в метаболизме РНК, а также домен, связанный со стабилизацией транскриптов гена *rbcL*, кодирующего большую субъединицу РБФК (Pfannschmidt et al., 2015) и.



С помощью сайта AthaMap (<http://www.athamar.de/>) был проведен анализ *in silico* промоторной области гена *PAP1*. В пределах последовательности в 500 п.н. выше и 50 п.н. ниже сайта старта транскрипции, составляющей эффективную длину промотора для большинства генов *A. thaliana*, обнаружен мотив (A/G)GAT), который является сайтом связывания для регуляторов ответа типа В на действие ЦК и *цис*-элементы для ЦК-регулируемых *транс*-факторов GLK2-1 и NY5. Это позволяет предполагать, что *PAP1* может быть их целевым геном.

Анализ экспрессии генов восприятия и передачи сигнала ЦК позволил заключить, что инактивация гена *PAP1* может модулировать накопление транскриптов этих генов, хотя цепь трансдукции сигнала ЦК у мутанта *rap1* остается функциональной. Однако повышенные базовые уровни транскрипта *ARR5*, индикатора уровня эндогенных ЦК (Aloni et al., 2005), свидетельствовали о возможном изменении гормонального статуса мутанта. Действительно, у *rap1* оказались увеличены уровни экспрессии генов *IPT3* и *IPT5*, кодирующих локализованные в пластидах гены синтеза биоактивных форм ЦК *транс*-зеатина и изопентениладенина и повышены базовые уровни накопления матриц одного из основных генов деградации ЦК *СКХ3* (рис. 5). Количественное определение уровня ЦК в побегах 5-недельных растений с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), проведенное коллегами в Институте экспериментальной ботаники Чешской академии наук (Czech Academy of Sciences, Чехия, Прага), показало увеличение общего содержания метаболитов ЦК у мутанта с явным преобладанием предшественников цитокининов.

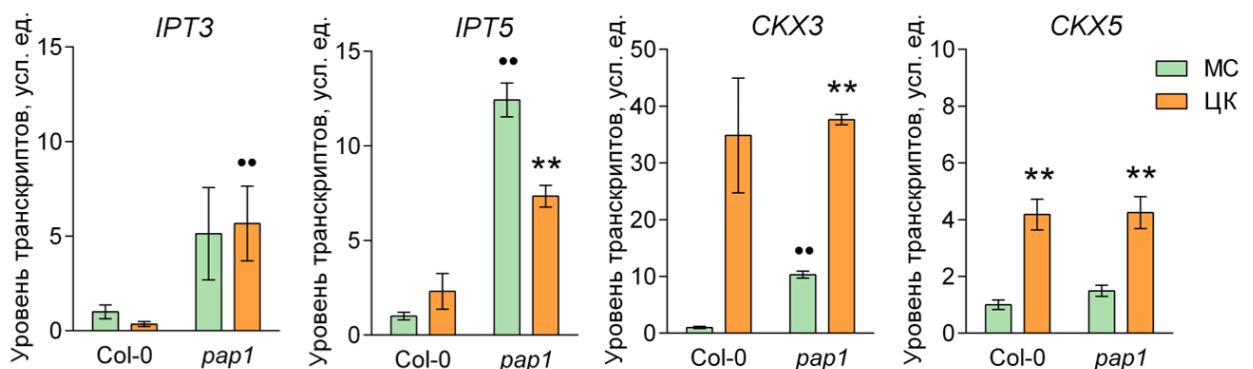


Рисунок 5. Экспрессия генов синтеза и деградации ЦК при обработке ЦК (5мкМ *транс*-зеатин, 3 ч) у растений *A. thaliana* Col-0 и мутанта *rap1*. Нормализация относительно необработанного контроля. Звездочки и точки указывают на достоверные отличия от Col-0 и соответствующих необработанных контролей (* и • - $P < 0,05$; ** и •• - $P < 0,01$).

С целью дальнейшего анализа влияния мутаций *rap* на регуляцию генов аппарата транскрипции пластома были исследованы уровни транскриптов его компонентов. *Транс*-зеатин не оказывал достоверного влияния на экспрессию у

мутанта функционирующих генов *PAP*, а также генов *RPOTr*, *RPOTrp*, *RPOTrm*. *SIG 2*, *6* и *СКА4*, активируемых у Col-0, или даже подавлял ее. Уровни экспрессии генов пластоста (*psbA*, *psbD* и *rbcL*), активируемых ЦК у растений дикого типа, практически не регулировались у мутантов или даже подавлялись (*rpoA* и *rpoB*) (рис. 6). Согласно результатам вестерн-блот анализа, изменения экспрессии пластидных генов на уровне белка при гормональной обработке мутанта *rap1* в целом соответствовали профилям накопления транскриптов кодирующих их генов (рис. 7).

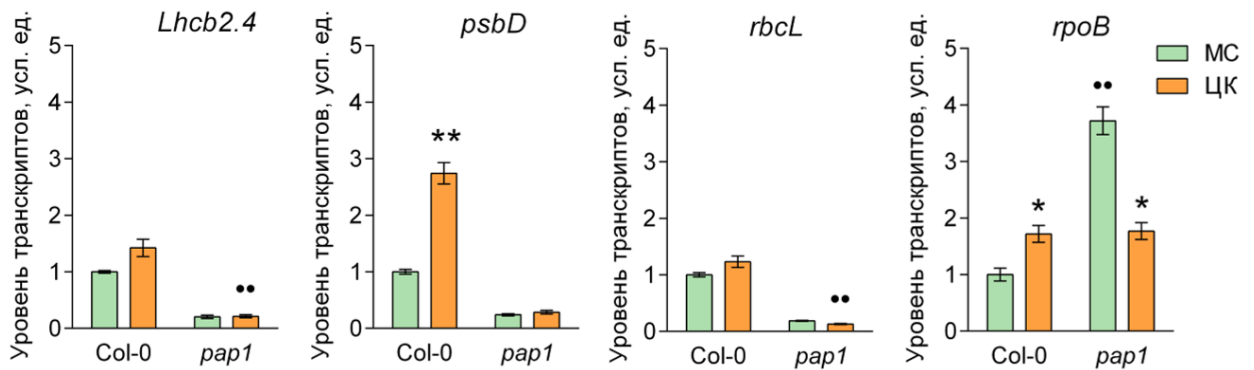


Рисунок 6. Влияние ЦК (*транс*-зеатин 5 мкМ, 24 ч) на экспрессию хлоропластных генов у растений *A. thaliana* Col-0 и мутанта *rap1*. Нормализация относительно необработанного контроля. Звездочки и точки указывают на достоверные отличия от Col-0 и соответствующих необработанных контролей (* и • - $P < 0,05$; ** и •• - $P < 0,01$).

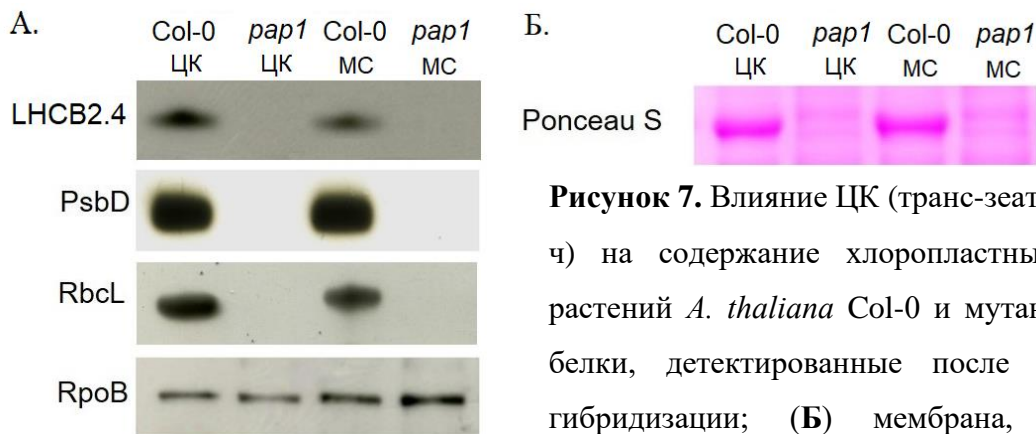


Рисунок 7. Влияние ЦК (*транс*-зеатин 5 мкМ, 24 ч) на содержание хлоропластных белков у растений *A. thaliana* Col-0 и мутанта *rap1*. (А) белки, детектированные после вестерн-блот гибридизации; (Б) мембрана, окрашенная Ponceau S.

Таким образом, инактивация гена *PAP1* способствовала трансформации гормонального статуса мутантных растений, что, в свою очередь, приводило к изменениям в экспрессии генов аппарата транскрипции и пластоста и уровней пластидных белков в ответ на воздействие экзогенного ЦК.

Регуляция экспрессии генов *PAP* при действии стрессоров различной природы. Анализ *in silico* потенциальных функций белков PAP, предсказанных на основе имеющихся в их последовательностях функциональных доменов, свидетельствует об их участии, по крайней мере, в двух процессах: метаболизме ДНК/РНК и окислительно-восстановительных процессах, включая защиту комплекса PER от активных форм кислорода. Поэтому исследование экспрессии генов *PAP* в условиях абиотического стресса представляет особый интерес для расшифровки механизмов функционирования транскрипционного комплекса хлоропластов. С этой целью двухнедельные растения *A. thaliana* Col-0 подвергали действию стрессоров различной природы: температурному, солевому, осмотическому, окислительному, световому и темновому.

Известно, что реализация ответов на действие стрессоров различной природы может вызывать избирательную инициацию элементов регуляторных сетей и определять специфичный характер экспрессии конкретных генов (Killian et al., 2007). Действительно, при гипертермии (37°C) накопление транскриптов большинства генов *PAP* в течение 3-6 часов поддерживалось на уровне, близком к контрольным значениям, после чего снижалось. Однако экспрессии двух генов, *PAP6/FLN1* и *PAP8*, существенно превышала значения, полученные для контрольных образцов в те же временные периоды.

При гипотермии (4°C) экспрессия всех генов *PAP* возрастала и через 24 часа действия холодового стресса превышала контрольные значения как минимум в 2 раза (рис.8 А). Высокая степень ко-экспрессии всех генов *PAP* при низких температурах могла быть обусловлена их ко-регуляцией циркадными ритмами, в частности геном *CCA1*, который, в свою очередь, регулирует на уровне транскрипции ключевую цепь ответа на холодовой стресс, включающую транс-факторы CBF/DREB и их целевые гены *COR*.

Длительное избыточное освещение и обработка метилвиологеном – гербицидом, генерирующим образование супероксидного радикала – способствовала достоверному снижению экспрессии всех генов *PAP* (рис.8 В) независимо от их функциональной принадлежности. Осмотический и солевой стрессы также ингибировали накопление матриц всех генов *PAP* после 24 часов стресса (рис. 8 Б, Г), однако механизмы воздействия этих стрессоров, могли быть

иными, и, возможно, определялись ингибирующим действием АБК, индуцируемой в ответ на засоление и осмотический стресс.

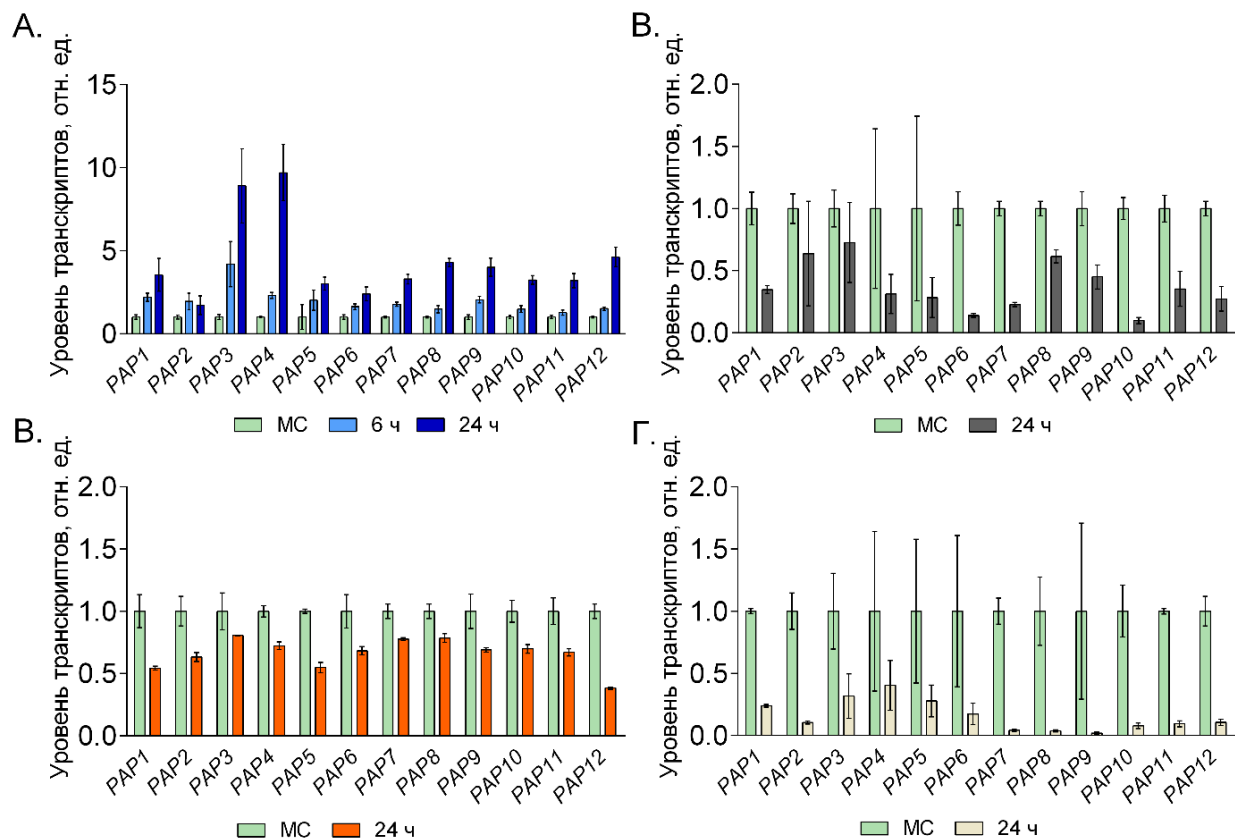


Рисунок 8. Влияние (А) холодового (4°C), (Б) осмотического (300 мМ маннитол), (В) окислительного (10 мМ метилвиологен, 24 часа), (Г) солевого (150 мМ NaCl) стрессов на уровень транскриптов генов *PAP* у растений *A. thaliana* Col-0. Нормализация относительно необработанного контроля.

Таким образом, реакция генов *PAP* на различные виды абиотического стресса варьировала, сочетая ко-регуляцию экспрессии и специфичность ответов.

Мутации *pap/fsd* изменяют чувствительность растений к повышенной температуре. Сигналы АФК обладают определенной степенью специфичности и селективности в зависимости от их химической природы и субклеточной локализации. Тем не менее, при всех типах окислительного стресса наблюдается комплексное воздействие различных форм активного кислорода: H_2O_2 , O_2^- , или $^1O_2^-$ (Gadjiev, 2006), что позволяет предполагать участие генов *PAP*, связанных с окислительно-восстановительными функциями, в защите растений от различных типов стресса.

Супероксиддисмутаза играет важную роль в ослаблении окислительного стресса растений, вызванного избытком супероксида в условиях фотоингибирующего действия света. Действительно, у мутантов *pap9/fsd2* и *pap4/fsd3*, выращенных при ярком освещении, наблюдалась существенная задержка в росте и фенотип *ivory* (Myouga et al., 2008). При этом, согласно полученным нами данным, инактивация генов *PAP4/FSD3*, и *PAP9/FSD2*, обеспечивающих защиту вновь синтезированных транскриптов от радикалов O_2^- в составе ДНК-РНК-полимеразного комплекса хлоропластов, способствовала снижению устойчивости к пролонгированному действию повышенных температур (5 суток, 30°C). В условиях теплового шока (ТШ) у мутантов *pap9/fsd2* и *pap4/fsd3* наблюдалось падение уровня мРНК хлоропластных генов класса I (*rbcL*, *psbA* и *psbD*), класса III (*rpoB*, *rpoA* и *accD*) и класса II (*atpB* и *clpP*), транскрибируемых соответственно РНК полимеразой пластидного кодирования (PEP), хлоропластными РНК полимеразми ядерного кодирования (NEP) и обоими типами полимераз. При этом изменения в содержании белков хлоропластов существенно не отличались от изменений уровней соответствующих транскриптов. Одновременно уменьшалась экспрессия генов NEP (*RPOTr* и *RPOTmp*), индуцируемых ТШ у растений дикого типа. Кроме того, у мутанта *pap9/fsd2*, в отличие от дикого типа, отмечено снижение уровня хлорофилла, достоверное падение максимального квантового выхода (Fv/Fm) и фотохимического тушения (YII), что могло быть интерпретировано как фотоингибирование ФСII в условиях ТШ. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об участии PAP4 и PAP9 в защите аппарата транскрипции пластома от ТШ. При этом роль PAP9/FSD2 и PAP4/FSD3 в стрессустойчивости хлоропластов, по-видимому, определяется не только ферментативной активностью, но и связана с их специализированными функциями в формировании и поддержании комплекса PEP.

ЦК и АБК в регуляции экспрессии генов PAP при тепловом шоке. Фитогормоны способны модулировать транскриптомный и протеомный ответы на температурный шок, способствуя выживанию растений в условиях неблагоприятных температур. Особая роль в этих реакциях принадлежит хлоропластам, в которых локализованы ферменты, отвечающие за метаболизм ЦК и АБК. Изменяя в условиях гипертермии содержание матриц транскрипционного

аппарата пластид, эти гормоны могут тонко воздействовать на экспрессию генов пластома.

В связи с этим мы проанализировали особенности экспрессии генов PER ассоциированных белков при гипертермии на фоне действия экзогенных АБК и цитокининов. Предобработка растений *A. thaliana* ЦК и последующий тепловой шок (37°C 3 часа) активировали экспрессию генов аппарата транскрипции пластид, но отрицательно влияли на жизнеспособность растений. АБК, напротив, способствовала поддержанию устойчивости к ТШ и дифференциально изменяла экспрессию различных компонентов транскрипционного комплекса пластид. Этот гормон подавлял накопление транскриптов генов PER и генов *PAP*, кодирующих белки, которые участвуют в метаболизме ДНК/РНК, но не оказывал воздействия на экспрессию генов NEP и генов *PAP*, ответственных за редокс-реакции. Все это позволяет существенно модулировать накопление транскриптов как самих генов аппарата транскрипции, так и транскрибируемых ими пластидных генов, обеспечивая поддержание гомеостаза в условиях повышенной температуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Особенности накопления транскриптов генов PER-ассоциированных белков при действии экзогенных фитогормонов и абиотических стрессов свидетельствуют о существовании механизмов тонкой регуляции их экспрессии, которые могут играть важную роль в биогенезе хлоропластов и жизни растений. Гены *PAP* продемонстрировали высокую степень ко-регуляции на разных этапах жизненного цикла, которая, по-видимому, контролировалась световыми, онтогенетическими и циркадными сигналами. Тем не менее, для некоторых генов были отмечены генно-специфичные особенности в динамике экспрессии на разных стадиях онтогенеза.

Реакция генов *PAP* на различные виды абиотического стресса также варьировала, сочетая ко-регуляцию экспрессии и специфичность ответов. В первый час воздействия стресс-факторов, как правило, наблюдалось падение экспрессии всех исследованных генов, что необходимо для поддержания энергетического гомеостаза и успешной адаптации к стрессовым условиям. Дальнейшее изменение характера экспрессии различных генов *PAP* определялись конкретной

физиологической ролью белков P_{AP}, связанной с их специализированными функциями в формировании и поддержании комплекса PEP.

Ответная реакция генов P_{AP} на действие экзогенных гормонов в целом соответствовала представлению об их ко-регуляции: в условиях использованной экспериментальной схемы салициловая кислота, АБК, метилжасмонат и брассиностероиды подавляли активность генов P_{AP}, а цитокинин индуцировал их экспрессию. Предшественник этилена 1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота не влиял на накопление транскриптов генов P_{AP}. Такой ответ, возможно, объясняется тем, что реакция на концентрацию эндогенных гормонов у растений дикого типа может быть близка к насыщению (Nemhauser et al., 2006), а дополнительная обработка экзогенными гормонами уже не способна усилить их воздействие.

Существенную роль в определении характера действия фитогормонов на экспрессию генов P_{AP} мог оказывать генетический фон. У инсерционного мутанта с нокаутированным геном P_{AP1} обработка экзогенным ЦК не изменяла уровень экспрессии функционирующих генов P_{AP} по сравнению с базовыми значениями или даже снижала их. Более того, *транс*-зеатин не оказывал позитивного влияния на экспрессию у мутанта генов аппарата транскрипции пластид, активируемых у Col-0, а также ряда генов пластома и кодируемых ими белков, хотя цепь трансдукции сигнала ЦК у мутанта оставалась функциональной. Изменение вектора регуляции ЦК с положительного на отрицательный могло быть следствием повышенного содержания эндогенных ЦК в результате изменения экспрессии генов синтеза и катаболизма гормона. Подобная реакция, по-видимому, определялась не специфичным повреждением генов P_{AP}, а была следствием общего нарушения биогенеза хлоропластов. При этом изменение гормонального статуса растений могло быть результатом компенсаторного механизма, позволяющего растению стимулировать морфогенез в отсутствии нормального фотосинтеза.

Конкретные регуляторные сети, связывающие воедино биогенные сигналы и аппарат транскрипции пластома при реализации морфогенетических программ еще очень далеки от полной расшифровки. Однако их понимание – залог контроля над процессом фотосинтеза и создания высокопродуктивных сортов сельскохозяйственных растений.

ВЫВОДЫ

1. Уровень экспрессии генов *PAP* у *Arabidopsis thaliana* определялся возрастом растений. Переход семян от состояния покоя к активному росту сопровождался резким повышением накопления транскриптов всех исследованных генов уже в первые сутки. Максимальное содержание мРНК, выявленное в семядолях 7-дневных проростков, снижалось по мере роста и старения растений.

2. Экзогенные фитогормоны оказывали дифференцированное регуляторное действие на экспрессию генов *PAP*. Салициловая кислота, АБК, метилжасмонат и брассиностероиды подавляли активность генов *PAP*, а цитокинин индуцировал их экспрессию

3. Анализ мутантов по генам трансдукции сигнала цитокинина показал, что ЦК-зависимая экспрессия *PAP* генов происходит при непосредственном участии компонентов канонического пути передачи сигнала ЦК.

4. У инсерционного мутанта с нокаутированным геном *PAP1* транс-зеатин не оказывал достоверного влияния на экспрессию генов аппарата транскрипции пластид, а также ряда генов пластома и кодируемых ими белков, активируемых у Col-0. При этом цепь трансдукции сигнала ЦК у мутанта оставалась функционально активной. Кроме того, у мутанта обнаружен увеличенный уровень базовой экспрессии генов синтеза и катаболизма гормона и повышенное содержание эндогенных ЦК.

5. Различные виды абиотического стресса дифференциально регулировали накопление транскриптов генов *PAP*, активируя или подавляя их экспрессию. Специфичность реакций различных *PAP* на действие некоторых стрессоров (гипертермия) сочеталась с ко-регуляцией экспрессии в ответ на другие виды стрессов.

6. Гены *PAP4* и *PAP9*, кодирующие изоферменты железосодержащей супероксиддисмутазы, принимают участие в защите хлоропластного генома и генов аппарата транскрипции пластид от негативного воздействия повышенной температуры.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В журналах, рекомендованных ВАК:

- 1) **Andreeva A. A., Kudryakova N. V., Corresponding Member of the RAS Kuznetsov Vl. V., Kusnetsov V. V.** (2021) Ontogenetic, Light, and Circadian Regulation of PAP Protein Genes during Seed Germination of *Arabidopsis thaliana* // *Doklady Biochemistry and Biophysics*, **500**, 312–316.
- 2) **Andreeva A. A., Vankova R., Bychkov I. A., Kudryakova N. V., Danilova M. N., Lacek J., Pojidaeva E. S., Kusnetsov V. V.** (2020) Cytokinin-Regulated Expression of *Arabidopsis thaliana* PAP Genes and Its Implication for the Expression of Chloroplast-Encoded Genes // *Biomolecules*, **10(12)**, 1658. <https://doi.org/10.3390/biom10121658>
- 3) **Doroshenko A. S., Danilova M. N., Andreeva A. A., Kudryakova N. V., Corresponding Member of the RAS Kuznetsov Vl. V., Kusnetsova V. V.** (2020) The Transcription Factor HY5 Is Involved in the Cytokinin-Dependent Regulation of the Expression of Genes Encoding Proteins Associated with Bacterial Plastid RNA-Polymerase during De-etiolation of *Arabidopsis thaliana* // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – Pleiades Publishing, **492(1)**, 124-129.
- 4) **Андреева А. А., Бычков И. А., Данилова М. Н., Кудрякова Н. В., Кузнецов В. В.** (2019) Цитокинины и абсцизовая кислота регулируют экспрессию генов аппарата транскрипции пластид при тепловом шоке // *Доклады академии наук*, **486 (1)**, 107–111. DOI:10.1134/S1607672919030013
- 5) **Danilova M. N., Kudryakova N. V., Andreeva A. A., Doroshenko A. S., Pojidaeva E. S., Kusnetsova V. V.** (2018) Differential impact of heat stress on the expression of chloroplast-encoded genes // *Plant Physiology and Biochemistry*, **129**, 90-100.
- 6) **Данилова М. Н., Дорошенко А. С., Кудрякова Н. В., Андреева А. А., Кузнецов В. В.** (2018) Аппарат транскрипции пластома и особенности экспрессии его генов в процессе цитокинин-зависимой деэтиоляции *Arabidopsis thaliana* // *Физиология растений*, **65(6)**, 438–450. DOI: 10.1134/S0015330318060040
- 7) **Данилова М. Н., Андреева А. А., Дорошенко А. С., Кудрякова Н. В., член-корреспондент РАН Кузнецов Вл. В., Кузнецов В. В.** (2018) Фитогормоны регулируют экспрессию ядерных генов, кодирующих компоненты аппарата транскрипции пластома // *Доклады Академии наук*, **478(4)**, 478-482. DOI: 10.7868/S0869565218040229

В прочих изданиях:

1) *Андреева А. А., Кудрякова Н. В., Кузнецов В. В.* Экспрессия генов белков, ассоциированных с пластидной рнк-полимеразой бактериального типа (pap), регулируется участниками канонического пути передачи сигнала цитокинина // Всероссийская научная конференция с международным участием и школа молодых ученых «Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее». Годичное собрание ОФР России. Материалы докладов, Москва, Россия, 27 сентября- 1 октября 2021.

2) *Андреева А. А., Кудрякова Н. В.* Гормональная регуляция экспрессии генов белков, ассоциированных с пластидной РНК-полимеразой бактериального типа, в процессе онтогенеза *Arabidopsis thaliana* // IX Съезд общества физиологов растений России Всероссийская научная конференция с международным участием «Физиология растений - основа создания растений будущего», Казань, Россия, 19-24 сентября 2019.

3) *Андреева А. А., Кудрякова Н. В., Кузнецов В. В.* Гены белков *Arabidopsis thaliana*, ассоциированных с пластидной РНК-полимеразой бактериального типа: экспрессия в условиях абиотического стресса // Научная конференция «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды», проводимой в рамках Годичного собрания ОФР 2018 Иркутск, Россия, 10-15 июля 2018.

4) *Андреева А. А., Бычков И. А., Данилова М. Н., Дорошенко А. С., Кудрякова Н. В.* Гены PAP белков и их участие в регуляции тепловым шоком // Шья научно-практическая конференция «Перспективы фитобиотехнологии для улучшения качества жизни на Севере» с международным участием и научная школа по клеточной биотехнологии, г. Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия 4- 8 июня 2018.

5) *Андреева А. А., Забродин Д. А., Кудрякова Н. В., Кузнецов В. В.* Гормональная регуляция экспрессии генов PAP- белков *Arabidopsis thaliana* // Научная конференция «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты», г. Судак, Крым, Россия 18-24 сентября 2017.