

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ СИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ
И БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

На правах рукописи



Бельков Вадим Игоревич

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

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Константинов Юрий Михайлович

Иркутск-2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОСНОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Суточные колебания экспрессии генов глутаматдегидрогеназы и их возможные причины	13
1.1.1. Место глутаматдегидрогеназы в системе клеточного метаболизма.....	13
1.1.2. Регуляция экспрессии генов глутаматдегидрогеназы у растений	15
1.1.2.1. Гены, кодирующие глутаматдегидрогеназу арабидопсиса	15
1.1.2.2. Регуляция экспрессии генов глутаматдегидрогеназы.....	16
1.1.2.3. Митохондриально-ядерная регуляция экспрессии гена <i>GDH2</i>	18
1.2. Светозависимая регуляция ядерных генов растений	19
1.2.1. Сигнальная функция фитохромов и криптохромов	19
1.2.2. Хлоропластно-ядерные сигналы в регуляции экспрессии ядерных генов	25
1.2.2.1. Сигналы, опосредуемые промежуточными продуктами биосинтеза тетрапирролов	26
1.2.2.2. Сигналы, связанные с изменением редокс-состояния пула пластохинона	27
1.2.2.3. Тиоредоксины как возможные посредники в передаче хлоропластно-ядерных сигналов.....	30
1.2.2.4. Активные формы кислорода как компонент цепи передачи пластидно-ядерных сигналов.....	32
1.2.2.5. Регуляторный путь β -циклоцитрала как частный случай АФК- зависимой пластидно-ядерной регуляции	33
1.2.2.6. Участие фосфонуклеотидов в передаче пластидно-ядерных сигналов (путь SAL 1-PAР).....	34
1.2.2.7. Путь передачи сигнала, опосредуемый метилэритритол циклодифосфатом (MEсPP)	35
1.3. Изменения углеводного статуса как фактор, регулирующий экспрессию ядерных генов растений	35
1.3.1. Глюкозозависимая регуляция экспрессии генов, опосредуемая гексокиназой 1	37
1.3.2. Трегалоза как фактор регуляции ядерных генов	41
1.3.3. Сахароза как фактор регуляции ядерных генов.....	42

1.3.4. Взаимодействие сигнальных путей, опосредуемых изменениями метаболизма углеводов, азота и неорганического фосфата	43
1.3.5. Взаимодействие сахарозависимых и гормонзависимых путей регуляции экспрессии генов растений.....	45
1.3.5.1. Роль абсцизовой кислоты и транскрипционного фактора ABI4	45
1.3.5.2. Взаимодействие сахаропосредованных сигналов и АБК-опосредованных сигналов с этиленом.....	50
1.4. Выводы из обзора литературы.....	50
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	53
2.1. Объект исследования и условия экспериментов	53
2.2. Методы исследования.....	55
2.2.1. Экстракция РНК	55
2.2.2. Электрофоретическое разделение РНК в агарозном геле в нативных условиях	55
2.2.3. Синтез первой цепи кДНК	55
2.2.4. Подбор праймеров.....	56
2.2.5. Обратнo-транскриптазная ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ)	57
2.2.6. Определение содержания супероксидного радикала	57
2.2.7. Определение уровня глюкозы в листьях	58
2.2.8. Экстракция ферментов	59
2.2.9. Электрофорез белков в полиакриламидном геле в нативных условиях (native PAGE).....	59
2.2.10. Определение активности глутаматдегидрогеназы	60
2.2.11. Количественное определение белка по Бредфорд.....	60
2.2.12. Статистическая обработка результатов	61
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	62
3.1. Определение изоферментного спектра глутаматдегидрогеназы в различных органах и типах клеток арабидопсиса	62
3.2. Характер изменений экспрессии генов <i>GDH1</i> и <i>GDH2</i> при изменении освещенности.....	63
3.2.1. Динамика изменения уровня транскриптов генов <i>GDH1</i> и <i>GDH2</i> на свету и в темноте	63
3.2.2. Зависимость уровня транскриптов генов <i>GDH1</i> и <i>GDH2</i> от уровня освещенности.....	67
3.3. Изучение механизмов регуляции экспрессии генов <i>GDH1</i> и <i>GDH2</i>	68

3.3.1. Сахарозависимая регуляция экспрессии генов <i>GDH1</i> и <i>GDH2</i>	68
3.3.1.1. Влияние экзогенной сахарозы на экспрессию генов <i>GDH1</i> и <i>GDH2</i>	68
3.3.1.2. Роль транскрипционного фактора ABI4 в сахарозависимой регуляции экспрессии генов <i>GDH1</i> и <i>GDH2</i>	76
3.3.2. Хлоропластно-ядерная регуляция экспрессии генов <i>GDH1</i> и <i>GDH2</i>	79
3.3.2.1. Изучение участия сигналов, возникающих при синтезе тетрапирролов, в регуляции экспрессии генов <i>GDH1</i> и <i>GDH2</i>	79
3.3.2.2. Роль редокс-сигналов пула пластохинона в регуляции экспрессии генов <i>GDH1</i> и <i>GDH2</i>	86
3.3.2.3. Уровень АФК в условиях экспериментов с ингибиторами фотосинтеза	91
3.3.2.4. Роль активных форм кислорода в регуляции экспрессии генов <i>GDH1</i> и <i>GDH2</i>	93
3.3.2.5. Особенности регуляции экспрессии генов <i>GDH1</i> и <i>GDH2</i> у мутанта <i>chl1-1</i>	97
3.3.2.6. Светозависимая регуляция генов <i>GDH1</i> и <i>GDH2</i> и ее возможное физиологическое значение.....	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	104
ВЫВОДЫ	108
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	109

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОСНОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АА – антимисин А

АБК – абсцизовая кислота

АФК – активные формы кислорода

К – криптохром

МЕсРР - метилэритритол циклодифосфат

мтхЭТЦ – электрон-транспортная цепь митохондрий

НАДФ – никотинамид адениннуклеотид фосфат, окисленная форма

НАДФН – никотинамид адениннуклеотид фосфат, восстановленная форма

НСТ – нитросиний тетразолий

НФ – норфлюразон

НХК1 – гексокиназа 1

ТФ – транскрипционный фактор

Фкр, Фдк – фоторецептор фитохром, поглощающий свет в красной (660 нм) и дальней красной области спектра (более 700 нм)

ФС I – фотосистема 1

ФС II – фотосистема 2

хлЭТЦ – электрон-транспортная цепь хлоропластов

АВІ4 – *abscisic insensitive 4* – транскрипционный фактор, чувствительный к абсцизовой кислоте

CRY1, CRY2 – криптохром-белковые комплексы

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

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

GDH – глутаматдегидрогеназа

H₂O₂ – пероксид водорода

HO₂[•] – гидропероксил-радикал

МЕсРР – метилэритритритол циклодифосфат

Mg-ProtoIX – магний протопорфирин 9

MS – минеральные соли по Мурасиге и Скуга

$^1\text{O}_2$ – синглетный кислород

$\text{O}_2^{\bullet-}$ – супероксид-радикал

OH^\bullet – гидроксил-радикал

PAP – 3'-фосфоаденозин 5'-фосфат

PhANGs – *photosynthesis associated nuclear genes* – ядерные гены, связанные с фотосинтезом

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

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

XRNs – ядерные экзорибонуклеазы

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследований

Растения имеют ядерный, митохондриальный и хлоропластный геномы, которые нуждаются в тесной координации экспрессии, что осуществляется благодаря сложной сети сигналов (Kleine, Leister, 2013). Сигналы, которые поступают от ядра к органеллам, контролируют экспрессию генов органелл, их развитие и функционирование (антероградная регуляция). В свою очередь от органелл в ядро поступают сигналы, воздействующие на экспрессию ядерных генов (ретроградная регуляция) (Nott et al., 2006).

В литературе описано множество генов ядерного кодирования, экспрессия которых изменяется при смене условий темнота/свет. Наиболее вероятными причинами таких изменений могут служить хлоропластно-ядерные сигналы либо сигналы, связанные с изменением уровня сахаров в клетке (Blasing et al., 2005; Li et al., 2006; Chi et al., 2013).

К числу генов, экспрессия которых зависит от условий освещенности, относятся гены глутаматдегидрогеназы (GDH) – фермента, который участвует в метаболизме углерода и азота, а также в регуляции скорости процессов дыхания, особенно в условиях углеводного голодания (Robinson et al., 1992; Miyashita, Good, 2008). Фермент состоит из 6 субъединиц одного или двух видов. Считается, что преобладающее значение имеют субъединицы α и β , которые кодируются у арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) ядерными генами *GDH1* и *GDH2* соответственно. Исследуемая в настоящей работе НАД-зависимая форма фермента локализована в митохондриях и наиболее активна в клетках-спутницах флоэмы.

Известно, что экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* максимальна в темное время суток и минимальна в светлое. В 2008 году Miyashita и Good показали, что двойные мутанты по генам глутаматдегидрогеназы переносят длительное (несколько суток) углеродное голодание хуже, чем растения дикого типа, и высказали гипотезу, согласно которой такое изменение экспрессии генов

GDH1 и *GDH2* зависит от доступности углерода в виде углеводов, уровень которых выше на свету, чем в темноте (Miyashita, Good, 2008).

При этом в литературе отсутствуют работы, посвященные изучению действия конкретных светозависимых регуляторных сигналов на экспрессию генов глутаматдегидрогеназы.

Некоторые сахара выполняют функцию сигнальных молекул и принимают участие в регуляции экспрессии ядерных генов, особенно генов, продукты которых необходимы для фотосинтеза (Hausler et al., 2014). Установлено, что у арабидопсиса около 40 % генов, экспрессия которых подвержена суточным изменениям, контролируются сахарозависимыми сигналами (Blasing et al., 2005). Наиболее изученными посредниками сахарозависимой регуляции у растений являются гексокиназа 1 и транскрипционный фактор ABI4. Хотя для генов *GDH1* и *GDH2* ранее высказывалась гипотеза о зависимости их экспрессии от метаболизма углерода (Miyashita, Good, 2008), роль перечисленных регуляторных факторов в регуляции экспрессии этих генов до сих пор не исследовалась.

Хлоропластно-ядерные сигналы возникают при разнообразных биохимических реакциях, происходящих в самих хлоропластах: биосинтезе тетрапирролов (предшественников гема, хлорофиллов а и b), изменении редокс-состояния пула пластохинона (участка фотосинтетической электрон-транспортной цепи), образовании активных форм кислорода в фотосинтетической электрон-транспортной цепи (Barajas-Lopez et al., 2013; Chi et al., 2013). Возможное участие данных сигналов в регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* ранее также не исследовалось.

Исходя из вышесказанного, **цель** настоящей работы – изучить механизмы ретроградной регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* арабидопсиса.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

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

Научная новизна

В представленной работе впервые исследована почасовая динамика изменений уровня транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* при переносе модельных растений (*A. thaliana*) из темноты на свет и из освещенных условий в темноту. Показано, что снижение уровней транскриптов исследуемых генов на свете происходит значительно быстрее, чем их повышение в темноте.

Впервые исследована роль известных компонентов сахарозависимых регуляторных путей (гексокиназы 1, транскрипционный фактор ABI4) в светозависимой регуляции исследуемых генов. Установлено, что сахарозависимое снижение уровня транскриптов гена *GDH2* не зависит от регуляторной функции гексокиназы 1, но опосредуется транскрипционным фактором ABI4.

Впервые показано, что сахарозависимая регуляция является не единственной причиной снижения уровня транскриптов исследуемых генов на свете.

Установлено, что уровень транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* зависит от редокс-состояния пула пластохинона тилакоидных мембран.

Теоретическая и практическая значимость работы

Получены приоритетные данные об участии конкретных регуляторных факторов (гексокиназа 1, транскрипционный фактор ABI4, редокс-состояние

пула пластохинона тилакоидных мембран) в светозависимой регуляции генов *GDH1* и *GDH2*, кодирующих альфа- и бета-субъединицы белка глутаматдегидрогеназы. Эти сведения расширяют представления о механизмах регуляции метаболических процессов в растительной клетке и важны для понимания хлоропластно-ядерных взаимодействий на уровне экспрессии генов. Выяснение механизмов регуляции экспрессии генов глутаматдегидрогеназы способствует пониманию путей использования растениями молекул L-глутамата и дополняет данные о приспособлении растений к изменению условий окружающей среды.

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

Основные положения, выносимые на защиту

1. Экспрессия гена *GDH2* подвержена сахарозависимой репрессии, которая не опосредуется гексокиназой 1, но передается через транскрипционный фактор ABI4. Сахарозависимые сигналы не являются единственным механизмом регуляции экспрессии гена *GDH2*.

2. Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* подчиняется хлоропластно-ядерным светозависимым сигналам, связанным с редокс-состоянием пула пластохинона. Окисленное состояние пула пластохинона приводит к повышению экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*.

Апробация работы

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

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, из них 4 статьи в рецензируемых журналах из Перечня ВАК РФ.

Личное участие автора

Автор лично принимал участие в планировании и проведении экспериментов, статистической обработке, обобщении и интерпретации полученных данных, а также в написании статей, опубликованных по результатам работы. В диссертационной работе использованы экспериментальные материалы, полученные лично автором, а также совместно с сотрудниками лаборатории генетической инженерии растений СИФИБР СО РАН.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения и трех глав, включающих обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 147 библиографических источников, 144 из которых на иностранном языке.

Материалы диссертации изложены на 125 страницах машинописного текста, иллюстрированы 31 рисунком и 2 таблицами.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность и благодарность научному руководителю диссертационной работы – доктору биологических наук, профессору Юрию Михайловичу Константинову за идейное руководство и всестороннюю помощь, а также за предоставленную возможность работать над интересной темой, сердечную благодарность – кандидату биологических наук Елене Юрьевне Гарник за помощь в проведении исследований и содержательные консультации, искреннюю благодарность – кандидату биологических наук Владиславу Игоревичу Тарасенко за ценные консультации по теме исследования, признательность доктору биологических наук, ведущему научному сотруднику лаборатории физиологической генетики растений Евгению Геннадьевичу Рихванову и доктору биологических наук, профессору,

ведущему научному сотруднику лаборатории физиолого-биологической адаптации растений Светлане Владимировне Осиповой за внимательное ознакомление с работой и сделанные замечания.

Автор искренне благодарен коллективу лаборатории генетической инженерии растений СИФИБР СО РАН за создание творческой научной атмосферы и плодотворное обсуждение настоящей работы, а также своей семье за моральную поддержку и проявленное терпение.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Суточные колебания экспрессии генов глутаматдегидрогеназы и их возможные причины

Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* может служить примером светозависимой регуляции. В темноте уровень транскриптов этих генов максимален, в то время как на свету – минимален. Разница в уровне экспрессии на свету и в темноте может достигать десятки раз (Turano et al., 1997). Причины и молекулярные механизмы этой регуляции на сегодняшний день неизвестны.

1.1.1. Место глутаматдегидрогеназы в системе клеточного метаболизма

Одним из источников органического азота в клетке растений является нитрат (NO_3^-), поглощаемый корнями из почвы. В корнях NO_3^- восстанавливается до аммония NH_4^+ , который может транспортироваться по ксилеме в листья растения. Также аммоний может образовываться при фотодыхании. Азот в аммонийной форме принимает участие в синтезе глутамина и глутамата (Ford, Lea, 2007; Schwarzlander, Finkemeier, 2013).

Глутамин синтезируется из глутамата и аммония, при участии глутаминсинтетазы (GS). Активность GS отмечена в цитоплазме и хлоропластах клеток большинства высших растений (Ford, Lea, 2007). Под действием фермента глутаматсинтазы (глутамин:2-оксоглутарат аминотрансфераза, GOGAT) происходит перенос аминогруппы с глутамина на 2-оксоглутарат, при этом образуется 2 молекулы L-глутамата (глутамата). GOGAT представлена в клетках растений в двух формах: ферредоксин-зависимая (функционирует преимущественно в фотосинтезирующих клетках) и НАД(Н)-зависимая (присутствует в клетках, не осуществляющих фотосинтез) (Ford, Lea, 2007).

Глутамат является центральной молекулой в метаболизме аминокислот высших растений: α -аминогруппа глутамата переносится на аминокислоты, принимает участие в ассимиляции и диссимиляции аммония; глутамат является основой для синтеза γ -аминобутирициновой кислоты (GABA), аргинина, пролина и хлорофиллов (Ford, Lea, 2007).

Помимо вышеупомянутых ферментов, в метаболизме глутамата принимает участие фермент митохондриальной локализации глутаматдегидрогеназа (GDH; EC 1.4.1.2.) (Ford, Lea, 2007). Наиболее изученной формой GDH является НАД(Н)-зависимая глутаматдегидрогеназа (НАД(Н)-GDH), обнаруживаемая в клетках-спутницах флоры, а также в меристемах (Terese-Laforgue et al., 2004; Fontaine et al., 2012).

НАД(Н)-GDH катализирует реакцию восстановительного аминирования 2-оксоглутарата до L-глутамата или обратную реакцию окислительного дезаминирования глутамата до 2-оксоглутаровой кислоты. В 2006 году Masclaux-Daubresse с коллегами установили, что в листьях табака синтез глутамата осуществляется через совместное действие GS и GOGAT, при этом GDH участвует в дезаминировании этой молекулы. Таким образом, исследователи установили роль фермента GDH, которая служила предметом спора в течение некоторого времени (Ford, Lea, 2007; Fontaine et al., 2013).

Ферментативно активный белок GDH представлен в виде гексамера, состоящего из 6 субъединиц трех видов (α , β , γ), которые кодируются генами *GDH1*, *GDH2* и *GDH3* соответственно. Сборка фермента происходит случайным образом, в результате спектр изоформ зависит от соотношения различных субъединиц в данной ткани. Таким образом, фермент GDH может содержать только 6α (*GDH1*), 6β (*GDH2*) или 6γ субъединиц (*GDH3*), образуя гомогексамер, либо существовать в виде гетерогексамера, состоящего из разных видов субъединиц (Skopelitis et al., 2007; Fontaine et al., 2013). Продукт гена *GDH3* редко визуализируется с помощью разделения в полиакриламидном геле и, по-видимому, кодируемая им γ -субъединица имеет минорное значение в обеспечении активности фермента GDH (Marchi et al., 2013). Относительная пропорция α - и β -субъединиц в белке может варьировать в зависимости от органа растения и уровня доступного азота (Ford, Lea, 2007; Miyashita, Good, 2008).

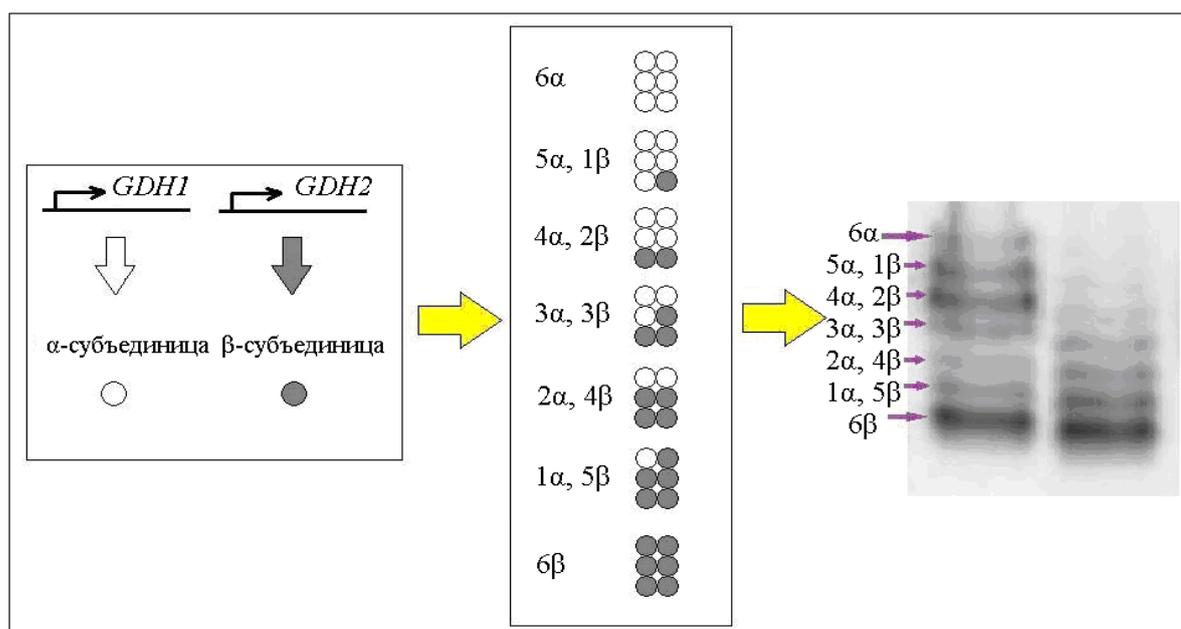


Рис. 1. Схематичное изображение сборки НАД(Н)-GDH, состоящей из α - и β -субъединиц (Restivo et al., 2004).

Обозначения: Слева показаны гены, кодирующие субъединицы α и β . По центру показана возможная комбинация α - и β - субъединиц в гексамере GDH. Справа показан снимок гель-электрофореза в полиакриламидном геле, на котором видна «лестница» из возможных изоформ фермента GDH.

GDH является связующим звеном между метаболизмом азота и углерода. Исследования, проведенные на мутантах по генам *GDH* (*gdh1-1 gdh1-2*, *gdh1-3*, *gdh2-1*, и двойной мутант *gdh1-2/gdh2-1*) указывают, что глутаматдегидрогеназа играет роль одного из главных ферментов в метаболизме аминокислот и углеводов. При выдерживании *gdh*-мутантов в темноте отмечается повышенный уровень некоторых аминокислот в сравнении с растениями линии дикого типа (Miyashita, Good, 2008).

1.1.2. Регуляция экспрессии генов глутаматдегидрогеназы у растений

1.1.2.1. Гены, кодирующие глутаматдегидрогеназу арабидопсиса

Субъединицы глутаматдегидрогеназы арабидопсиса α , β и γ кодируются ядерными генами *GDH1* (*At5G18170*), *GDH2* (*At5G07440*) и *GDH3* (*At3G03910*) соответственно. Есть сообщения о существовании хлоропластной формы НАДФ(Н)-зависимой GDH у арабидопсиса, которая предположи-

тельно кодируется ядерным геном *GDH4* (Igarashi et al., 2009). Некоторые исследователи отрицают физиологическое значение НАДФ(Н)-зависимой GDH (Fontaine et al., 2012).

1.1.2.2. Регуляция экспрессии генов глутаматдегидрогеназы

Согласно литературным данным, экспрессия ядерных генов *GDH1* и *GDH2* арабидопсиса максимальна в темноте и минимальна на свету (Turano et al., 1997; Miyashita, Good, 2008). Экспрессия генов семейства *GDH* имеет органоспецифичный характер: ген *GDH1* более активно экспрессируется в листьях, а ген *GDH2* – в корнях. Соответствующая закономерность характерна и для содержания субъединиц GDH. Miyashita и Good в 2008 году исследовали мутанты арабидопсиса, имеющие нарушения по генам глутаматдегидрогеназы. Исследования, проведенные на двойном мутанте *gdh1-2/gdh2-1*, показали, что GDH участвует в поддержании жизнедеятельности растений арабидопсиса при углеводном голодании, вызванном продолжительным пребыванием образцов в темноте. Авторы установили, что мутанты *gdh1-2/gdh2-1* имели меньшую продолжительность жизни в этих условиях, чем растения дикого типа. При этом у двойного мутанта происходило накопление аминокислот, что было нехарактерно для растений дикого типа. Авторы предположили, что GDH принимает участие в поддержании цикла трикарбоновых кислот в условиях углеродного голодания, вызванного продолжительным пребыванием растений арабидопсиса в темноте (Miyashita, Good, 2008). Еще в 1992 году было доказано, что продукт реакции, катализируемой ферментом GDH – 2-оксоглутарат – может быть введен в цикл Кребса и использован для получения энергии (Robinson et al., 1992). Поэтому в настоящее время принята гипотеза, согласно которой наличие доступных форм углерода является ключевым фактором в регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* (Melo-Oliveira et al., 1996; Miyashita, Good, 2008).

Turano с коллегами в 1997 году установили, что в листьях арабидопсиса при обработке аммонийным азотом или выдерживании растений в темноте происходит повышение уровня транскриптов гена *GDH2* в 20 раз по сравне-

нию с контролем. При этом экспрессия гена *GDH1* индуцировалась не более чем в 3 раза. Полученные данные подтверждают, что гены *GDH1* и *GDH2* не всегда экспрессируются на одном уровне, хотя и имеют схожий профиль экспрессии (Turano et al., 1997).

В 2004 году Restivo с коллегами проводили исследования регуляции генов *GDH* на каллусной культуре табака (*Nicotiana plumbaginifolia*). Табак имеет гены *GDHA* и *GDHB*, гомологичные генам *GDH1* и *GDH2* арабидопсиса. Авторы установили, что при добавлении в среду аммонийной формы азота вместе с сахарозой не происходит снижения экспрессии генов *GDHA* и *GDHB*. Эти данные служат в поддержку теории о том, что GDH функционально связана с ассимиляцией аммония (Restivo, 2004).

Существует большой массив данных, свидетельствующих об индукции экспрессии генов глутаматдегидрогеназы при абиотических стрессах. Установлено снижение уровня транскриптов исследуемых генов у образцов каллусной культуры табака (*N. plumbaginifolia*) в условиях теплового стресса (60 мин при +40 °С) или холодового стресса (120 мин при +4 °С). Однако укороченное время инкубации (+40 °С, 30 мин или +4 °С, 60 мин) не приводило к изменениям уровня транскриптов генов *GDHA* и *GDHB* (Restivo, 2004). При солевом стрессе (обработка NaCl) отмечены разнонаправленные изменения экспрессии исследуемых генов: уровень транскриптов гена *GDHA* повышался, а гена *GDHB* – снижался. Следует отметить, что изменения в экспрессии генов *GDH* не всегда приводили к схожим изменениям активности фермента GDH (Restivo, 2004). Уровень транскриптов гена глутаматдегидрогеназы у табака, кодирующего α -субъединицу в стебле, побегах и листьях, а также общий уровень фермента GDH в листьях значительно повышался при солевом стрессе, вызванном обработкой раствором NaCl (250 мМ) (Skopelitis et al., 2006).

При ранении листьев рапса (*Brassica napus*) отмечается индукция экспрессии гена *GDH2* (кодирует α -субъединицу глутаматдегидрогеназы у *B.*

napus) в 5 раз, при этом не наблюдалось изменений в концентрации продуктов этого гена (Watanabe et al., 2007).

Помимо генов *GDH1* и *GDH2*, в геноме арабидопсиса обнаружен ген *GDH3*. Исследования мутантов *gdh1*, *gdh2*, *gdh1-2* и *gdh1-2-3* арабидопсиса показали присутствие продуктов гена *GDH3* в клетках-спутницах флоэмы корней (Fontaine et al., 2012).

Позже было установлено, что ген *GDH3* экспрессируется во всех органах растения на всех стадиях роста и развития. Исследования, проведенные Marchi с коллегами в 2013 на мутантах арабидопсиса, показывают, что ген *GDH3* не имеет выраженной органоспецифичности. Авторы предположили, что продукт гена *GDH3* может выполнять тонкую регуляцию ферментативной активности фермента GDH в организме растения (Marchi et al., 2013).

1.1.2.3. Митохондриально-ядерная регуляция экспрессии гена *GDH2*

При анализе данных ДНК-микрочипирования обнаруживается, что экспрессия генов глутаматдегидрогеназы в листьях арабидопсиса индуцируется после обработки антимицином А (АА), ингибитором III комплекса митохондриальной электрон-транспортной цепи (мтхЭТЦ) (Yu et al., 2001). В 2009 году Тарасенко с коллегами исследовали участие компонентов мтхЭТЦ в регуляции экспрессии гена *GDH2*. Клетки суспензионной культуры обрабатывали АА и цианидом калия (KCN) (ингибитором комплекса IV), что приводило к индукции экспрессии гена *GDH2*, при этом обработка ингибитором комплекса I (ротеноном) не влияла на уровень транскриптов гена *GDH2*. Авторы предположили, что индукция экспрессии *GDH2* при ингибировании III или IV дыхательного комплекса опосредуется редокс-сигналом, берущим начало от участка мтхЭТЦ, содержащего убихинон. Это предположение подтверждают данные, в которых установлено, что ни АФК (генерация которых была спровоцирована добавлением АА или KCN), ни изменение электрохимического митохондриального мембранного потенциала (один из источников митохондриально-ядерных сигналов) не служат сигналами для данной индукции. Установлено, что серин-треониновые протеинкиназы принимают

участие в передаче сигналов, регулирующих экспрессию гена *GDH2* (Tarasenko et al., 2009). Позже этой же группой показано, что обработка АА приводила к повышению экспрессии гена *GDH2* в клетках суспензионных культур, полученных из растений арабидопсиса дикого типа, а также трансформанта AS-12 с пониженной активностью альтернативной оксидазы, но не трансформанта ХХ-2 с повышенной активностью альтернативной оксидазы. Поскольку активная работа альтернативной оксидазы вызывает снижение степени восстановленности убихинонового пула мтЭТЦ, то эти данные, по видимому, свидетельствуют в пользу участия митохондриальных редокс-сигналов в регуляции экспрессии гена *GDH2* (Тарасенко и др., 2013).

1.2. Светозависимая регуляция ядерных генов растений

Свет является наиболее важным фактором, влияющим на рост и развитие растений. На свету в хлоропластах растений возникает поток возбужденных электронов, который передается по цепи переносчиков на мембране тилакоидов. Это приводит к синтезу АТФ и восстановительных эквивалентов (НАДФН), которые используются для фиксации углерода в цикле Кальвина-Бенсона (Waters, Langdale, 2009). Изменения условий окружающей среды (интенсивность света, температура, уровень доступной воды, уровень доступного азота) оказывают прямое влияние на эффективность процессов фотосинтеза и рост всего растения (Lepisto et al., 2012). Фотосинтезирующие организмы, включая цианобактерии, водоросли и высшие растения, способны регулировать скорость реакций фотосинтеза в ответ на соответствующие условия среды (Pfannschmidt et al, 2012). На сегодняшний день известно о существовании множества светозависимых сигнальных механизмов, обзоры которых представлены ниже.

1.2.1. Сигнальная функция фитохромов и криптохромов

Фотоморфогенезом (деэтиоляцией) называют характерные изменения этиолированных растений при выносе их надземной части на свет: прекращение удлинения гипокотыля, дифференциация пропластид в

хлоропласты, синтез пигментов фотосинтеза, переход к автотрофному метаболизму (Gururani et al., 2014).

Фотоморфогенез растений опосредуется восприятием интенсивности и длины волны светового потока пигмент-белковыми комплексами (фоторецепторами). Поглощение кванта света приводит к изменению конформации белка фоторецептора с его последующим фосфорилированием (рецептор красного света) или используется в реакциях восстановления мессенджеров (рецептор синего света). При фоторецепции происходит преобразование энергии квантов света в энергию химических связей (Waters, Langdale, 2009; Chen, Chory, 2011).

Для проведения световых реакций фотосинтеза растению необходим свет определенной длины волны. Фотосистема I (ФС I) поглощает и преобразует кванты с длиной волны около 700 нм, а фотосистема II (ФС II) – около 680 нм. Энергии от длинноволновых квантов (более 700 нм) недостаточно для осуществления световых реакций. Принято делить красные лучи на красную область, К (до 700 нм) и дальнюю красную, ДК (более 700 нм) (Chen, Chory, 2011). Оценить качество и количество квантов света в красной области растениям позволяют фоторецепторы из группы фитохромов. Фитохром состоит из пигмента фитохромобилина, образующего комплекс с белком. Различают две основные формы фитохрома: красную – Фкр (660 нм) и дальнекрасную – Фдк (730 нм) (Martinez-Garcia et al., 2014).

Фитохром существует в виде димера белка с ковалентно связанной хромофорной группировкой из четырех пиррольных колец (А, В, С и D). Хромофор синтезируется в виде замкнутой молекулы тетрапиррола, после чего встраивается в белок в незамкнутом состоянии. Именно хромофор фитохрома (фитохромобилин) может воспринимать красную часть спектра и изменять свою конформацию за счет поворота одного из своих колец (Salewski et al. 2013).

На свету Фкр улавливает кванты света и переходит в форму Фдк, что запускает каскад сигналов, индуцирующих фотоморфогенез. Фдк переходит в

форму Фкр в темноте. Накопление Фкр служит сигналом об отсутствии света для фотосинтеза и начале этиоляции (Gururani et al., 2014).

Арабидопсис имеет 5 генов, кодирующих фитохромы (*phyA*, *phyB*, *phyC*, *phyD* и *phyE*). Наиболее активное участие в регуляции принимают фитохром А (Φ_A) и фитохром В (Φ_B). Фитохромы С, D и Е, в основном, являются минорными формами (Wang, Wang, 2014).

Фитохромы участвуют в контроле прорастания семян, удлинения стебля и цветения. Φ_A способен воспринимать кванты света не только в К части спектра, но и улавливает ДК-свет, не имеет К-ДК обратимости. Спектр поглощения Φ_B составляет область только К-света (свет с интенсивностью не более 700 нм), имеет К-ДК обратимость. С помощью этих механизмов происходит различие полной темноты и света, а также света, обогащенного ДК-квантами, что характерно в условиях затенения. Фитохромы D и E участвуют в регуляции удлинения черешка листа и цветения, а фитохром E регулирует удлинение междоузлий между розетками листьев (Martinez-Garcia et al., 2014).

В неактивном состоянии фитохромы локализованы в цитозоле, при освещении они обнаруживаются в ядре. В ядре фитохромы запускают изменения экспрессии около 10 % генов арабидопсиса (Ni et al., 2013). На С-концевом участке фитохромов расположены два PAS-домена (участвуют в ДНК-белковых и белок-белковых взаимодействиях), характерные для транскрипционных факторов (ТФ) (Christie et al., 2015).

Арабидопсис имеет несколько ТФ (HY5, HYH, HFR1 и LAF1), которые активируют гены, участвующие в фотоморфогенезе. Гены этих ТФ в темноте ингибируются белками семейства COP (constitutive photomorphogenesis) и DET (de-etiolated) (Waters, Langdale, 2009). Установлено, что активация фитохромов на свету приводит к деградации белков COP1, COP9 и DET1, что индуцирует фотоморфогенез (Wang, Wang, 2014).

На свету фитохромы вызывают деградацию транскрипционных факторов PIFs (*phytochrome interacting factors*) (Martinez-Garcia et al., 2014).

Исследования, проведенные на мутантах арабидопсиса по генам *pif1*, *pif3*, *pif4* и *pif5*, показывают, что гены семейства *PIF* участвуют в подавлении фотоморфогенеза в темноте (Ni et al., 2013). Белки PIF3, PIF4, PIF5 и PIF7 индуцируют удлинение гипокотыля, синдром избегания темноты и развитие листьев (Jeong, Choi, 2013).

Установлено, что белки COP1, DET1 и PIFs подавляют экспрессию генов *LHCB* (*CAP*), малой субъединицы *Rubisco* (*RBCS*), пластоцианина (*PETE*) и гена *GUN5* (Wang, Wang, 2014).

Помимо красной части спектра, растения способны улавливать синий свет (400-500 нм) с помощью трех групп фоторецепторов: криптохромов, фототропинов и белков, содержащих LOV-домены (ZTL, FKF1 и LKP2) (Solomon et al., 2003; Christie et al., 2015).

Арабидопсис имеет два криптохром-белковых комплекса: CRY1 и CRY2 (Lin et al., 2002). Криптохромы содержат консервативный участок для связывания хромофорных группировок, которыми являются птерин (метенилтетрагидрофолат) и ФАД. Функцию светособирающего хромофора выполняет птерин. При улавливании квантов синего света молекулой птерина, фитохром связывает окисленную молекулу ФАД, которой передается возбужденный электрон. При этом ФАД переходит в форму восстановленного семихинона (ФАД•), который становится сильным восстановителем. Если образованная энергия не передается, то возбужденный ФАД флуоресцирует (Herbel et al., 2013).

От синей части спектра, улавливаемой криптохромами (400-500 нм) поступают сигналы, которые участвуют в регуляции физиологических процессов: синтез каротиноидов, антоцианов, движение замыкающих клеток устьиц (Christie et al., 2015).

По структуре криптохромы имеют высокое сходство с ДНК-фотолиазами, ферментами, которые участвуют в репарации участков ДНК, поврежденных вследствие действия ультрафиолетовых лучей, используя полностью восстановленную форму ФАД (ФАДН⁺). Фермент содержит

участки связывания с птерином и флавином, которые приводят к образованию ФАДН на свету. Однако криптохромы содержат нейтральный семихинон ФАД; поэтому, как правило, не имеют фотолиазной активности (Herbel et al., 2013).

На свету происходит фосфорилирование криптохромов (Muller et al., 2014). Только фосфорилированная форма фитохрома является его биологически активной формой, приводящей к возникновению сигналов, которые вызывают биохимические и структурные изменения (Herbel et al., 2013).

Мутант по гену *CRY1*, выращенный под синим светом, образует удлинённый гипокотиль, имеет низкий уровень антоцианов вследствие потери индукции гена хальконсинтазы (*CHS*), продукт которого участвует в синтезе антоцианов. Мутант по гену *CRY2* арабидопсиса имеет нарушения в индукции генов цветения (Gould et al., 2013; Christie et al., 2015).

Арабидопсис имеет криптохром-подобный ген *CRY3*, продукт которого участвует в репарации одноцепочечных участков ДНК и исправлении лишних шпилек в двухцепочечной ДНК хлоропластов и митохондрий (Herbel et al., 2013).

Локализованные в ядре *CRY1* и *CRY2* влияют на развитие растений через изменение экспрессии ядерных генов. Для криптохромов известны, по крайней мере, два механизма регуляции транскрипции генов. Первый механизм – активированные светом криптохромы вызывают деградацию белков, которые репрессируют ТФ. У этиолированных растений транскрипционный фактор HY5 подвергается протеолизу комплексом белков SPA1 (*supressor of phyA*). При действии синего света криптохромы связываются с COP1-SPA1 комплексом, что приводит к накоплению транскрипционных факторов HY5, запускающих экспрессию генов, продукты которых участвуют в фотоморфогенезе. Установлено, что связывание *CRY2* с комплексом COP1-SPA1 вызывает индукцию гена цветения *CO* (*constans*). Вторым механизмом – это непосредственное связывание *CRY2* с ТФ, в результате чего *CRY2* активно участ-

вует в работе последнего. Например, фотоактивированный CRY2 связывается с транскрипционным фактором CIB1 (*Cry-interacting bHLH1*), что вызывает индукцию экспрессии гена *FT* (*flowering locus T*), продукт которого является регулятором цветения. Экспрессия *FT* в замыкающих клетках устьиц усиливает их открывание (Ando et al., 2013; Christie et al., 2015).

Еще один рецептор синего света – фототропин. Свое название он получил за счет своей способности опосредовать фототропизм у высших растений, процесс, при котором происходит изменение направления роста растения в сторону падающего света. Арабидопсис содержит 2 гена фототропина (*PHOT1* и *PHOT2*), продукты которых участвуют в регуляции фотосинтеза и ростовых процессов соответственно условиям освещения (Labuz et al., 2012).

Фототропин является ассоциированной с мембраной серинтреониновой протеинкиназой, которая активируется при действии синего света в результате автофосфорилирования. Фототропины *PHOT1* и *PHOT2* локализованы в цитозоле (на плазматической мембране), но не являются интегральными мембранными белками (Christie et al., 2015).

Воздействие синего света вызывает различные изменения в локализации белков фототропинов. *PHOT1* отсоединяется от мембраны при действии синего света и остается в цитозоле, а *PHOT2* направляется в аппарат Гольджи. Биологическая важность этого процесса диссоциации пока не до конца изучена, но известно, что диссоциация необходима для участия белка *PHOT1* в фототропизме (Wan et al., 2008; Christie et al., 2015).

Наиболее изученный механизм передачи сигналов от фототропина можно проиллюстрировать на примере открывания устьиц при действии синего света. H^+ -АТФаза на плазматической мембране вместе с K^+ каналами являются главными компонентами этого процесса. Фототропин активирует H^+ -АТФазу, вызывая гиперполяризацию плазматической мембраны, что позволяет K^+ проникать внутрь клетки через специальные каналы. Накопление K^+ вызывает набухание клетки, что индуцирует открывание устьиц (Christie et al., 2015).

Кроме фототропинов, существует еще несколько фоторецепторов, содержащих LOV-домен у арабидопсиса. К ним относятся белок ZTL (*zeitlupe*), белок с флавинсвязывающим участком (FKF1) и LOV-содержащий белок 2 (LKP2) (Ito et al., 2012). Белки ZTL/FKF1/LKP2 участвуют в регуляции суточных ритмов, фотопериодизма и цветения. Они локализованы в цитозоле или ядре. Мутанты арабидопсиса по гену *ZTL* имеют нарушение в регуляции суточных ритмов, а мутанты по гену *FKF1* имеют изменения во времени цветения (Imaizumi et al., 2003). Мутация по гену *LKP2* вызывает минимальные изменения в регуляции суточных ритмов и цветения, в то время как мутанты со сверхэкспрессией этого гена не имеют вышеуказанных отклонений (Schultz et al., 2001; Baudry et al. 2010).

Белок ZTL вызывает деградацию белка-репрессора TOC1 (*timing of CAB expression 1*), который участвует в регуляции суточных ритмов. FKF1 вызывает деградацию транскрипционных факторов семейства CDF (*Cy*cling *DOF* *factors*), что приводит к индукции генов *FT* и *CO*, ответственных за цветение (Thomas, 2006; Christie et al., 2015).

1.2.2. Хлоропластно-ядерные сигналы в регуляции экспрессии ядерных генов

Ретроградный хлоропластно-ядерный контроль представляет собой тонкий механизм регуляции экспрессии ядерных генов в ответ на изменения биосинтеза пигментов, скорости потока электронов по электрон-транспортной цепи хлоропластов (хлЭТЦ), а также при повреждении хлоропластов из-за повышения уровня освещения или в результате действия патогенов (Chi et al., 2013). Таким образом, внутриклеточная координация между ядерным и пластидным геномом приводит к своевременному регулированию экспрессии генов в ответ на изменения в окружающей среде. Эта координация возможна благодаря многочисленным хлоропластно-ядерным сигналам.

1.2.2.1. Сигналы, опосредуемые промежуточными продуктами биосинтеза тетрапирролов

Классическим примером ретроградной хлоропластно-ядерной регуляции считаются сигналы, изученные на *gun*-мутантах (*genome uncoupled*) арабидопсиса, которые были получены методом химического мутагенеза и впервые описаны группой исследователей под руководством Susek в 1993 году. Мутанты молекулярного *gun*-фенотипа характеризуются высоким уровнем экспрессии ядерных генов, связанных с фотосинтезом (*LHCB*, *PETE*, *RBCS*), выявляются при выращивании растений арабидопсиса в присутствии веществ, приводящих к разрушению хлоропластов (норфлурозон, линкомицин, гигромицин).

Растения арабидопсиса дикого типа, выращенные в присутствии норфлурозона на свету, лишены хлоропластов и имеют сильно сниженную экспрессию ядерного гена *CAB3/LHCB1.2* (кодирует хлоропластный белок светособирающего комплекса II), относящегося к генам группы *PhANGs* (*photosynthesis-associated nuclear genes*). Показано, что *gun*-мутанты продолжают экспрессировать ген *CAB3/LHCB1.2*, несмотря на отсутствие функционально активных хлоропластов (Susek et al., 1993; Kleine et al., 2009; Barajas-Lopez et al., 2013). Таким образом, *gun*-мутанты лишены координации экспрессии между хлоропластным и ядерным геномами.

Установлены гены, мутации по которым приводят к возникновению *gun*-фенотипа. Продукты этих генов участвуют в пути синтеза тетрапирролов (предшественников хлорофиллов а и b) и гемовых групп цитохромов: ген *GUN2* кодирует гемоксигеназу, *GUN3* – фитохромобиллинсинтазу, *GUN4* кодирует белок, который принимает участие в активации Mg-хелатазы, *GUN5* кодирует N-субъединицу самой Mg-хелатазы, *GUN6* – феррохелатазу (Nott et al., 2006; Woodson et al., 2011). Исключение составляет ген *GUN1*, кодирующий пластидный PPR-белок GUN1.

Механизм передачи пластидно-ядерного сигнала через белок GUN1 до конца не ясен (Chi et al., 2013). Было предположено, что посредником этого

сигнального пути является Mg-протопорфирин IX (Mg-Proto IX) (промежуточное соединение в синтезе хлорофиллов), который совместно с белком GUN1 передает информацию о состоянии хлоропластов в ядро, что приводит к репрессии генов, связанных с фотосинтезом (*PhANGs*) (Strand et al., 2003; Nott et al., 2006). Накопление Mg-ProtoIX, по-видимому, происходит и под действием норфлуразона, чем и объясняется репрессия генов *PhANG* у дикого типа и отсутствие такой репрессии у *gun*-мутантов (Barajas-Lopez et al., 2013).

В 2008 году ряд исследователей не подтвердили накопление Mg-ProtoIX в условиях, приводящих к репрессии генов *PhANGs* (Moulin et al., 2008; Mochizuki et al., 2008). Возможно, высокая фотореактивность Mg-ProtoIX позволяет ему участвовать в передаче светозависимых сигналов при очень низких концентрациях, либо происходило тканеспецифичное накопление этого вещества. Большинство исследователей по-прежнему придерживаются вышеописанной гипотезы о передаче сигналов, связанных с синтезом тетрапирролов (Chi et al., 2013).

1.2.2.2. Сигналы, связанные с изменением редокс-состояния пула пластохинона

Большое количество светозависимых регуляторных механизмов активируются сигналами, поступающими при изменении редокс-состояния компонентов, участвующих в фотосинтезе. Редокс-сигналы оказывают влияние на экспрессию ядерных генов, продукты которых участвуют в фотосинтезе. В литературе описано множество примеров подобной регуляции (Pogson et al., 2008; Pfannschmidt et al., 2009).

При активной работе ФС II идет поток электронов по направлению к фотосистеме I (ФС I) через пул пластохинона (PQ-пул), участок электрон-транспортной цепи хлоропластов (хлЭТЦ), расположенный между фотосистемой II (ФС II) и комплексом цитохромов b_6/f , который становится восстановленным. Если же активность ФС I выше, чем активность ФС II, PQ-пул

становится окисленным. Таким образом, PQ-пул чувствителен к любым изменениям активности обеих фотосистем (рис. 2).

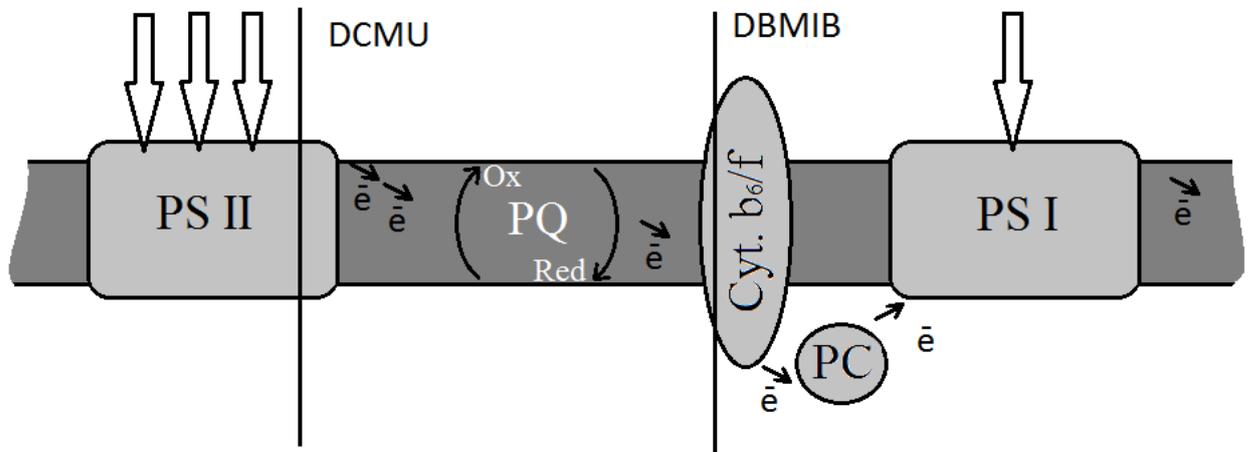


Рис. 2. Схема электрон-транспортной цепи хлоропластов.

Обозначения: Вертикальной чертой показано место блокирования переноса электронов вследствие действия конкретного ингибитора. PS II – фотосистема 2, PS I – фотосистема 1, PQ – пул пластохинона, PC – пластоцианин, DCMU – 3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметилмочевина, DBMIB – 2,5-дибромо-3-метил-6-изопропилбензохинон, PQred/ox – восстановленное или окисленное состояние пула пластохинона.

Редокс-состояние PQ-пула может изменяться под действием внешних факторов. Такие факторы условно можно подразделить на 2 группы: естественные (условия освещения) и искусственные (действие ингибиторов переноса электронов на разные участки хлЭТЦ) (Pfalz et al., 2012). К последним относятся вещества: 3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметилмочевина (DCMU) и 2,5-дибромо-3-метил-6-изопропилбензохинон (DBMIB). DCMU необратимо связывается с участком Q_B (менахиноном) в ФС II и блокирует перенос электронов от ФС II к последующим акцепторам, что вызывает окисление PQ-пула. DBMIB связывается с сайтом окисления пластохинона в комплексе b_6/f , вызывая восстановление PQ-пула (Trebst et al., 1970).

Влияние редокс-состояния пластохинона на экспрессию пластидных генов известно достаточно давно. В 1999 году Pfannschmidt с коллегами исследовали экспрессию пластидных генов горчицы (*Sinapis alba* L.) PSAAB

(кодирует одну из субъединиц ФС I) и *PSBA* (кодирует белок D1, компонент реакционного центра ФС II). В своей работе исследовательская группа применяла ингибиторы DCMU и DBMIB, а также свет, специфичный для возбуждения только ФС I или ФС II. Методом run-on транскрипции они установили изменение скорости транскрипции вышеуказанных генов, которая зависела от редокс-состояния PQ-пула (Pfannschmidt, 1999). Затем в 2001 году эта же группа впервые показала, что изменения редокс-состояния PQ-пула в растениях табака могут регулировать экспрессию не только пластидных, но и ядерных генов, функционально связанных с фотосинтезом: *PETE* (пластоцианин), *PSAD* и *PSAF* (компоненты ФС I) (Pfannschmidt et al., 2001). Обработка растений ингибитором DCMU приводила к снижению экспрессии этих генов, действие ингибитора DBMIB не вызывало изменений в их экспрессии (Pfannschmidt et al., 2001). Позже такая регуляция была показана для генов арабидопсиса, включая гены семейства *LHCB* (Fey et al., 2005).

Fey с коллегами в 2005 году исследовали регуляцию экспрессии генов в ответ на изменения длины световой волны. В экспериментах растения выращивали 4 суток при освещении около $30 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, а после – под светом с длиной волны, возбуждающей либо ФС I (около $20 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), либо ФС II (около $30 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) в течение 6 дней. Авторы наблюдали индукцию 1121 гена и репрессию 1012 генов в растениях, которые вначале выдержали под светом, возбуждающим ФС I, а затем – под светом, возбуждающим ФС II. Оказалось, что из 2133 исследуемых генов, регуляция 268 генов является редокс-чувствительной: экспрессия 86 генов индуцировалась при восстановлении компонентов фотосинтетической цепи, а в тех же условиях экспрессия 200 генов снижалась (Fey et al., 2005).

Вопрос о механизме передачи сигнала о редокс-состоянии пула пластохинона в ядро остается открытым. Одним из немногих кандидатов на роль посредника выступает протеинкиназа *STN7* (*state transition 7*), которая расположена на мембране тилакоидов (Pesaresi et al., 2009; Foyer et al., 2012). *STN7* участвует в посттрансляционном процессе, который лежит в основе

краткосрочного приспособления световых реакций фотосинтеза к изменениям условий освещения. Данный механизм зависит от сигналов, поступающих от PQ-пула (Kleine et al., 2009).

По-видимому, STN7 участвует в передаче хлоропластно-ядерных сигналов, которые образуются при изменении редокс-состояния PQ-пула и регулируют экспрессию генов *PhANGs*. Исследования, проведенные на мутантах по гену *STN7*, позволили установить, что данная протеинкиназа лишь косвенно участвует в хлоропластно-ядерной регуляции экспрессии генов (Barajas-Lopez et al., 2012). Продукты этих генов участвуют в механизмах стрессоустойчивости и регуляции процессов метаболизма (Pesaresi et al., 2009), причем выделена целая группа *ERG* генов (*early redox-regulated genes*), часть которых также подвержена регуляции через STN7 протеинкиназу (Dietzel et al., 2015).

1.2.2.3. Тиоредоксины как возможные посредники в передаче хлоропластно-ядерных сигналов

Тиоредоксины (TRXs) – повсеместно распространенные малые (около 12 кДа) тиолдисульфидные оксидоредуктазы, выполняющие функцию естественных элементов, которые участвуют в редокс-регуляции метаболизма растений (Wang et al., 2013). Все тиоредоксины имеют редокс-активный сайт, который содержит две консервативные последовательности цистеина. В восстановленном состоянии тиоредоксины способны восстанавливать дисульфидные мостики в белках-мишенях, тем самым участвуя в регуляции активности последних (Dietz, Pfannschmidt, 2011).

У арабидопсиса обнаружено, по меньшей мере, 20 изоформ тиоредоксинов, которые локализованы в разных клеточных компартментах: в хлоропластах, митохондриях и цитозоле (Meyer et al., 2005; Lemaire et al., 2007).

В зависимости от локализации, тиоредоксины способны принимать электроны от большого числа восстановителей из разных электрон-транспортных систем. Так, тиоредоксины, локализованные в митохондриях и цитозоле, восстанавливаются НАДФН-тиоредоксинредуктазой, а хлоропла-

стные тиоредоксины – ферредоксин-зависимой редуктазой, которая получает электрон от ферредоксина - компонента электрон-транспортной цепи хлоропластов (хлЭТЦ) (Schurmann, Jacquot, 2000). Тиоредоксины могут контролировать накопление АФК, поскольку конкурируют с молекулярным кислородом за принятие электрона от хлЭТЦ (Baier, Dietz, 2005).

Система тиоредоксинов хлоропластов арабидопсиса сложна и содержит 5 главных групп (2f, 4m, 1x, 2y и 1z). Такое разделение основано на сложной регуляторной роли тиоредоксинов в данной органелле (Wang et al., 2013). В темноте тиоредоксины окислены, но быстро восстанавливаются на свету. Они способствуют образованию углеводов за счет восстановления тиоловых групп ферментов цикла Кальвина-Бенсона (Chibani et al., 2011; Wang et al., 2013).

В 2010 году обнаружена новая форма тиоредоксин-подобного белка, z-формы (TRX z). TRX z участвует в регуляции экспрессии генов хлоропластов, что обуславливает взаимосвязь редокс-сигналов и транскрипции генов пластид (Arsova et al., 2010). Мутация по гену тиоредоксина z-формы (*TRXZ*) приводит к обесцвечиванию растений (Arsova et al., 2010; Schroter et al., 2010), что указывает на уникальность данной формы белка. Также *trxz*-мутанты имеют сниженную экспрессию генов хлоропластов, которые транскрибируются с помощью РНК-полимеразы пластидного кодирования. На основании этого было предположено, что TRX z регулирует активность протеинкиназ, которые в свою очередь регулируют вышеупомянутую РНК-полимеразу при переносе растений из темноты на свет (Barajas-Lopez et al., 2013).

Таким образом, тиоредоксины хлоропластов могут участвовать в передаче хлоропластно-ядерных сигналов, которые возникают при изменении редокс-состояния органеллы в целом.

1.2.2.4. Активные формы кислорода как компонент цепи передачи пластидно-ядерных сигналов

ХлЭТЦ является одним из источников возникновения активных форм кислорода (АФК) (Иванов и др., 2013). Вследствие избытка электронов в хлЭТЦ происходит усиленная генерация следующих АФК: супероксидного радикала, гидроксил-радикала (OH^\cdot), синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$) и перекиси водорода (H_2O_2) (Asada, 2006). В отличие от остальных АФК, H_2O_2 способна диффундировать из хлоропластов. Наиболее вероятно образование H_2O_2 при поглощении O_2 восстановленным пулом пластохинона на акцепторной стороне ФС II (Креславский и др., 2012).

АФК представляют опасность для всех молекул и структур в клетке, включая сам фотосинтетический аппарат, поскольку вызывают окислительные повреждения белков и липидов мембран. Поэтому растения выработали сложную антиоксидантную систему, которая состоит из низкомолекулярных компонентов-восстановителей (глутатион, аскорбат и α -токоферол), а также антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза, ферменты аскорбат-глутатионового цикла), глутаредоксинов и тиоредоксинов (ApeI, Hirt, 2004; Foyer, Noctor, 2005; Pfalz et al., 2012).

Известно, что изменения уровня АФК и редокс-состояния органелл являются источником ретроградных сигналов (Asada, 2006; Креславский и др., 2012).

Изучение АФК в качестве сигнальных молекул проводилось на генах, экспрессия которых повышается в условиях избыточной освещенности, таких как гены цитозольных форм аскорбатпероксидазы (*APX1* и *APX2*), транскрипционный фактор типа «цинкового пальца» (*ZAT10* и *ZAT12*) и белок *ELIP2* (*early light inducible protein 2*) (Davletova et al. 2005; Rossel et al., 2007).

Обработка растений арабидопсиса перекисью водорода стимулирует экспрессию генов *APX2*, *ZAT10* и *ZAT12* (Pogson et al., 2008), а также приводит к окислению молекулы хинона А (QA), первичного акцептора электронов PQ-пула (Suzuki et al., 2012).

Перекись водорода накапливается в хлоропластах на свету, принимает участие в регуляции экспрессии ядерных генов. Это было показано в экспериментах, в которых проводили инфильтрацию листьев каталазой, что приводило к отмене индукции экспрессии гена *APX2* у арабидопсиса при повышенном освещении. При обработке супероксиддесмутазой такого эффекта не происходило (Apel, Hirt, 2004; Nott et al., 2006).

Образование больших количеств синглетного кислорода $^1\text{O}_2$ приводит к обесцвечиванию растений и активации программируемой клеточной гибели. При помощи *flu*-мутанта арабидопсиса, который имеет нарушение в работе ядерного гена *FLU* (*fluorescent*), кодирующего хлоропластный белок, удалось установить путь передачи сигнала, опосредуемого синглетным кислородом (Kim et al., 2012). Белок FLU является регуляторным компонентом пути биосинтеза хлорофилла. В темноте *flu*-мутанты накапливают протохлорофиллид, что приводит к активной генерации $^1\text{O}_2$ на свету. Установлено, что $^1\text{O}_2$ взаимодействует с хлоропластными белками EX1 и EX2 (EXECUTER 1, EXECUTER 2), которые участвуют в передаче сигнала в ядро, приводя к программируемой клеточной гибели (op den Camp et al., 2003; Kim, Apel, 2013). Передача сигнала через белки EX1 и EX2 является классическим примером хлоропластно-ядерного редокс-сигнала.

На свету индуцируется экспрессия гена *ELIP2*, что указывает на возможную причастность продукта гена *ELIP2* в защите от фотоокислительного стресса. Установлено, что экспрессия гена *ELIP2* (как и гена *APX2*) регулируется сигналами от PQ-пула (Nott et al., 2006).

1.2.2.5. Регуляторный путь β -циклоцитрала как частный случай АФК-зависимой пластидно-ядерной регуляции

Каротиноиды – первые молекулы, нейтрализующие $^1\text{O}_2$, который образуется при фотоокислительном стрессе. Через некоторое время избыток $^1\text{O}_2$ приводит к образованию окисленных продуктов самих каротиноидов. Одним из таких продуктов является летучее соединение β -циклоцитрал (β -СС), количество которого возрастает более чем в 1,5 раза после 1 часа светоиндуци-

руемого стресса. В результате происходит повышение уровня транскриптов генов MAP киназ (*MKK9*, *MPK17*), биосинтеза гормонов этилена и жасмоната (*ATERF-2*, *CEJ1*, *LOX2*, *OPR1*, *AOC1*, *AOS*), цитохрома P450 (*CYP81D11*). При этом снижается экспрессия генов, участвующих в росте и развитии растения (*EXPA8*, *EXPA11* и *XTH4*) (Gonzales-Perez et al., 2011; Ramel et al., 2012).

Несмотря на то, что механизм действия β -СС еще не до конца изучен, вполне возможно, что это соединение взаимодействует с сульфгидрильными группами белков, которые могут участвовать в передаче сигнала в ядро (Estavillo et al., 2013).

1.2.2.6. Участие фосфонуклеотидов в передаче пластидно-ядерных сигналов (путь SAL 1-PAP)

В 2011 году Estavillo с коллегами, используя мутант арабидопсиса *alx8* (*altered APX2 expression 8*), установили еще один тип ретроградного сигнала (Estavillo et al., 2011). Мутант *alx8* имеет дефект гена *SAL1/ALX8/FRY1* и экспрессирует неактивную форму фермента фосфатазы SAL 1. Фосфатаза SAL 1 регулирует концентрацию 3'-фосфоаденозин 5'-фосфата (PAP) в клетке растений через дефосфорилирование PAP до аденозинмонофосфата (АМФ). Известно, что SAL 1 присутствует как в хлоропластах, так и в митохондриях. Экспрессия генов *ZAT10*, *DREB2A*, *ELIP2* и *APX2* у мутанта *alx8* в 2-20 раз выше по сравнению с линией дикого типа (Rossel et al., 2006). Эти гены регулируются в ответ на окислительный стресс и интенсивное освещение (Estavillo et al., 2011). Мутант *alx8* способен накапливать PAP в 30-кратном количестве по сравнению с линией дикого типа в условиях засухи или избыточной освещенности (Barajas-Lopez et al., 2013). PAP является сигнальной молекулой, которая приводит к изменению метаболизма РНК через ингибирование ядерных экзорибонуклеаз (XRNs) (Estavillo et al., 2013). PAP образуется из 3'-фосфоаденозин 5'-фосфосульфата (PAPS) под действием фермента сульфотрансферазы, вызывает индукцию экспрессии генов *APX2* и *ELIP2* (Estavillo et al., 2011).

1.2.2.7. Путь передачи сигнала, опосредуемый метилэритритол циклодифосфатом (MEcPP)

Известно, что гидроксипероксилиаза (*hydroperoxide lyase 1*, *HPL 1*), локализованная в хлоропластах, участвует в пути синтеза изопреноида метилэритролфосфата (MEP) (Flores-Perez et al., 2010).

Метилэритритол циклодифосфат (MEcPP), промежуточный продукт синтеза изопреноидов, определен в качестве потенциального хлоропластно-ядерного сигнала. MEcPP не участвует в регуляции экспрессии ядерных генов, связанных с фотосинтезом (Xiao et al., 2012). Накопление MEcPP происходит при поранении и светоиндуцируемом стрессе, что вызывает повышение экспрессии гена *HPL*, кодирующего гидроксипероксилиазу (Estavillo et al. 2013). В отличие от сигналов, вызванных промежуточными продуктами биосинтеза тетрапирролов (Woodson et al., 2011), индукция *HPL* запускается именно MEcPP, а не другими интермедиатами пути синтеза MEP. Ретроградный сигнал, связанный с накоплением MEcPP, установлен при исследовании мутанта *ceh1* (*constitutive expressing HPL 1*), в котором повышен уровень MEcPP, а также экспрессия генов *HPL1* и *ICS1* (ген фермента биосинтеза салициловой кислоты) в сравнении с линией дикого типа. Вследствие этого, мутант *ceh1* содержит повышенный уровень салициловой кислоты, а также более устойчив к действию патогена *Pseudomonas syringae* (Xiao et al., 2012). Механизм действия MEcPP ясен не до конца (Estavillo et al., 2013).

Таким образом, хлоропластно-ядерные сигналы – это сложная сеть, объединяющая множество регуляторных путей, к числу которых относятся как сигналы, возникающие при изменении уровня освещенности, так и те сигналы, которые образуются в ответ на нарушение целостности тканей растения (механические повреждения и действие патогенов) (Xiao et al., 2012).

1.3. Изменения углеводного статуса как фактор, регулирующий экспрессию ядерных генов растений

Растения накапливают глюкозу, фруктозу и сахарозу в качестве продуктов реакций фотосинтеза. Последующее участие этих сахаров в метабо-

лизме растений является важным условием для их дальнейшего роста и развития. При этом сахара служат источником не только углеродных скелетов для построения биологических молекул, но и энергии в автотрофных и гетеротрофных тканях (Rolland, Sheen, 2006).

Уровень сахаров в клетках растений изменяется в соответствии с суточными изменениями условий внешней среды. При дефиците сахаров происходит переключение метаболизма, направленное на поддержание основных метаболических процессов, остановка роста, замещение реакций гликолиза на катаболизм белков, аминокислот и липидов при клеточном дыхании, выключение энергозатратного синтеза некоторых белков (Rolland, Sheen, 2006; Hausler et al., 2014).

Некоторые сахара имеют функцию сигнальных молекул и принимают участие в регуляции экспрессии ядерных генов, особенно генов, продукты которых необходимы для фотосинтеза. Были открыты независимые пути передачи сахаропосредуемых сигналов для глюкозы, фруктозы, сахарозы и трегалозы (Hausler et al., 2014). Установлено, что у арабидопсиса около 40% генов с суточным ритмом экспрессии контролируются сахарозависимыми сигналами (Blasing et al., 2005).

Снижение уровня сахаров в растительной клетке является ключевым фактором в индукции экспрессии *DIN* генов (*dark induced*), экспрессия которых выше в темноте, чем на свету (Rolland et al., 2006).

Примером сахарозависимой регуляции *DIN* генов является регуляция генов *DIN6/ASN1* (кодирует глутаминзависимую аспарагинсинтазу) и *PRODH2* (кодирует пролиндегидрогеназу). Было установлено, что экспрессия обоих генов регулируется транскрипционным фактором *bZIP11/ATB2* (Hanson et al., 2007).

Известно, что сахароза подавляет экспрессию гена *bZIP11/ATB2*. Также авторы провели исследования 163 генов, подверженных регуляции через транскрипционный фактор *bZIP11*. Обработка сахарозой или глюкозой при-

вела к репрессии некоторого числа исследованных генов. Продукты этих генов участвуют в метаболизме аминокислот (Hanson et al., 2007).

Таким образом, авторы установили, что сахаропосредуемые сигналы контролируют уровень аминокислот через регуляцию транскрипционного фактора bZIP11.

Получено множество мутантов арабидопсиса с измененной чувствительностью к глюкозе, сахарозе, трегалозе. Исследования, проведенные на таких линиях мутантов, способствовали пониманию механизмов, контролирующих изменение углеводного статуса у растений (Baier et al., 2004; Ramon et al., 2008).

Например, мутант *pgm* (*phosphoglucomutase*) имеет нарушение активности АГР-азы, не накапливает крахмал, имеет повышенный уровень сахаров днем и пониженный уровень ночью по сравнению с растениями дикого типа. Обработка таких мутантов экзогенными сахарами позволила установить огромное число генов, экспрессия которых регулируется сахарозависимыми сигналами (Blasing et al., 2005).

Исследование мутантов, которые гиперчувствительны (*prl1*) и нечувствительны (*sis1*, *ctr1*) к сахаропосредуемым сигналам, позволило установить пересечение сахаропосредованных и гормонопосредуемых сигнальных путей у арабидопсиса (Gibson, 2004).

1.3.1. Глюкозозависимая регуляция экспрессии генов, опосредуемая гексокиназой 1

Сахароза является основной транспортной формой углерода у большинства растений, в то время как наибольшие регуляторные эффекты опосредует глюкоза. Глюкоза служит универсальным источником углерода и энергии в живой клетке, начиная от микроорганизмов и до клеток растений и животных (Ramon et al., 2008).

Изменение уровня глюкозы в разных компартментах клетки улавливается сенсорами, что приводит к соответствующим изменениям экспрессии ядерных генов. Главным из этих сенсоров для растений является гексокиназа

1 (HXK1) – фермент, катализирующий превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат. Исследование мутантов *gin2* (*glucose insensitive 2*), имеющих дефект по гену гексокиназы 1 (*HXK1/GIN2*), позволило совершенно четко определить HXK1 в качестве главного компонента одного из путей передачи сахарных сигналов у растений (Moore et al., 2003; Kelly et al., 2012). Использование мутантов линии *gin2* позволяет исследовать сахарозависимую регуляцию, опосредуемую HXK1, без воздействия на растения экзогенными сахарами (Rolland et al., 2006).

У мутантов *gin2*, несмотря на отсутствие сигнальной функции HXK1, сохраняется каталитическая активность гексокиназы до 50 % от уровня в растениях дикого типа и накапливается нормальный уровень глюкозо-6-фосфата. Вероятно, это объясняется наличием у арабидопсиса других каталитически активных гексокиназ (Rolland, Sheen, 2006). Семейство гексокиназ арабидопсиса представлено тремя белками, которые имеют каталитическую активность, и тремя гексокиназа-подобными белками (HKL), лишенными каталитической активности. Функции HKL белков изучены не до конца. По-видимому, сигнальной функцией обладает только HXK1 (Ramon et al., 2008).

Кроме цитозольных форм гексокиназы (HXK1 и HXK2), есть данные о существовании HXK3 (pHXK), функционирующей аналогичным образом в строме пластид, действующей в качестве сенсора гексоз. Изучение экспрессии генов пластид в качестве потенциального источника формирования ретроградных сигналов показало, что хлорамфеникол или линкомицин (ингибиторы трансляции в пластидах) совместно с обработкой 3 % глюкозой приводили к подавлению экспрессии ядерных генов *PhANGs* у растений дикого типа, но не у мутантов по pHXK (Nott et al., 2006; Zhang et al., 2010).

У растений определены различные пути передачи глюкозозависимого сигнала:

1. HXK1-зависимый путь, главный эффект которого – подавление экспрессии генов *PhANGs*. Целевые гены этого пути могут быть определены с

использованием мутанта *gin2*, либо других мутантов с инактивированными аллелями гена *HXK1*. Установлено, что НХК1 входит в состав ядерного высокомолекулярного комплекса, регулирующего транскрипцию ядерных генов – рис. 3 (Cho et al., 2006; Cho et al., 2007).

2. НХК1-независимые пути. Известны гены, экспрессия которых регулируется в ответ на изменения уровня глюкозы, несмотря на сниженную или повышенную экспрессию гена *hvk1* у трансгенных линий.

Передача данного сахарозависимого сигнала также может осуществляться через G-белок RGS1, который имеет 7 трансмембранных доменов и действует как высокочувствительный сенсор глюкозы. Такая регуляция приводит к остановке деления клетки (Ramon et al., 2008).

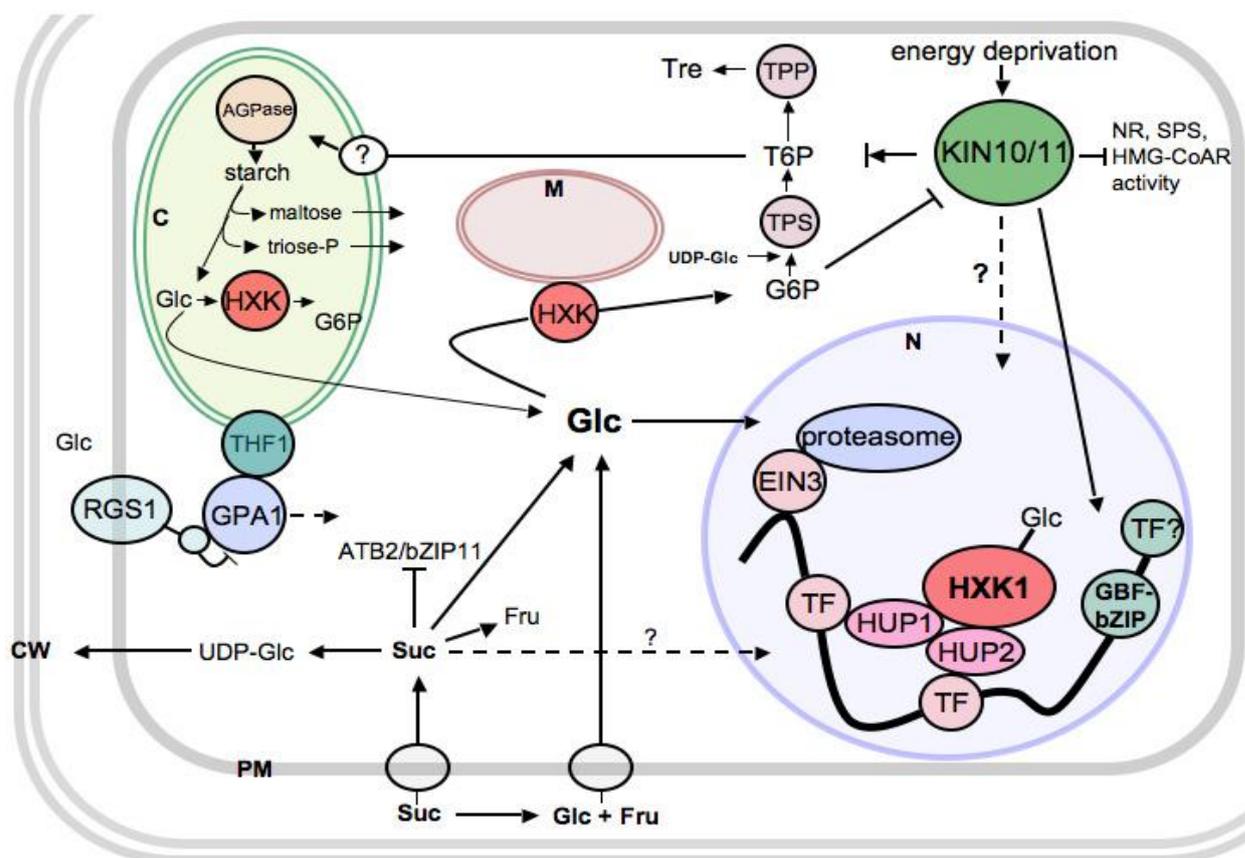


Рис. 3. Гексокиназа 1 как регуляторная молекула (Ramon et al., 2008).

Обозначения: Глюкоза (Glc) и фруктоза (Fru) могут попадать в клетку растений через транспортеры гексоз или в результате разложения крахмала и/или сахарозы (Suc), которая локализована в цитозоле или в вакуоли. После фосфорилирования гексокиназой (HXK1), глюкоза включается в метаболизм. НХК1 присутствует в высокомолекулярном

ядерном комплексе вместе с ядерными компонентами HUP1 и HUP2, а также факторами регуляции транскрипции (TFs), где участвует в регуляции транскрипции генов и вызывает протеасома-опосредованную деградацию транскрипционного фактора EIN3. KIN10/11 участвуют преимущественно в регуляции транскрипции ядерных генов типа «цинковый палец», в пост-трансляционной регуляции некоторых белков. Также показан сигнальный путь, связанный с G-белком RGS1, в котором принимает участие α -субъединица этого белка (GPA1) и белок, локализованный на внешней мембране тилакоидов (THF1). ATB2/bZIP11 – факторы регуляции транскрипции, активируемые сахарозой, репрессоры; С – хлоропласт; М - митохондрия; CW – клеточная стенка; N - ядро; PM - плазмалемма; NR - нитратредуктаза; SPS - сахарозофосфатсинтаза; HMG-CoAR – 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А-редуктаза; Tre - трегалоза; Т6Р – трегалоза-6-фосфат; TPS – трегалоза-6-фосфатсинтаза; TPP – трегалоза-6-фосфатаза.

Первые данные о двойственной функции HXK1 получены в экспериментах, в которых использовали различные сахара, их аналоги и интермедиа-ты (Villadsen, Smith, 2004). Позже использовали трансгенные линии арабидопсиса со вставками гена гексокиназы 1 в смысловой и антисмысловой ориентации. При этом растения дикого типа, выращенные на среде, содержащей 6 % глюкозы, демонстрировали задержку в росте и развитии листьев, укороченные корни. Линии со сниженной экспрессией гена *HXK1* имели сниженную сигнальную активность гексокиназы 1 при обработке растений экзогенным сахаром. В тех же условиях растения, сверхэкспрессирующие гексокиназу 1, были сверхчувствительны даже к небольшим концентрациям глюкозы (2 %, 3 % глюкозы в среде). При этом часть образцов обрабатывали иными сахарами, которые служили в качестве контроля осмотических условий (маннитолом или 3-О-метилглюкозой). Такая обработка не вызывала никаких видимых отличий от образцов, обработанных глюкозой (Jang et al., 1997).

HXK1 играет значительную роль в регуляции цветения, роста корней и листьев, что было установлено в результате проведенных исследований мутанта *gin2* в условиях повышенной освещенности (200-300 мкмоль*м⁻²*с⁻¹ для арабидопсиса).

Таким образом, НХК1-опосредованные сигналы могут усиливать или подавлять рост растений в зависимости от уровня глюкозы в клетке и чувствительности к ней растений (Rolland, Sheen, 2008).

Добавление сахаров, которые не могут транспортироваться в клетку или служить субстратом для фосфорилирования НХК1, не вызывает репрессию генов фотосинтеза. Установлено, что эта репрессия не вызвана понижением уровня АТФ или неорганического фосфата (Rolland, Sheen, 2008). Отмечено, что обработка сахарозой или увеличение синтеза глюкозы приводят к повышению числа митохондрий, скорости дыхания и накопления АТФ, это связано с действием цитозольной НХК, заякоренной на внешней митохондриальной мембране. Таким образом, действие данной НХК обеспечивает субстрат для синтеза АТФ в митохондриях и поддержание активности митохондрии на определенном уровне, предотвращая накопление АФК (Rolland et al., 2006).

1.3.2. Трегалоза как фактор регуляции ядерных генов

Трегалоза (α -D-гликопиранозил-(1-1)- α -D-гликопиранозид) и трегалоза-6-фосфат (Т6Ф) выделены как отдельные регуляторы метаболизма углеводов и развития растений (Ramon et al., 2008).

У растений выявлено мультигенное семейство, кодирующее белки, подобные трегалозафосфатсинтазе (TPS) и трегалоза-6-фосфат-фосфатазе (Т6Р), ферментам синтеза трегалозы. Белок арабидопсиса TPS1 принимает участие в регулировании клеточного цикла через взаимодействие с одной из протеинкиназ. Мутация по гену *AtTPS1* является летальной для эмбрионов. Растения арабидопсиса, сверхэкспрессирующие ген *AtTPS1*, нечувствительны к глюкозе на стадии прорастания. TPS5 взаимодействует с коактиватором транскрипции MBF1, главным регулятором термотолерантности у арабидопсиса (Smeekens et al., 2010).

Установлено, что в геноме арабидопсиса существует не менее, чем 21 ген, продукты которых причастны к метаболизму трегалозы и Т6Ф (Ramon et

al., 2008). У дрожжей уровень Т6Р регулируется через комплекс белков TPS (Tps1) и TPP (Tps2).

Трегалоза участвует в регуляции длины корней у растений арабидопсиса. Остановка роста в ответ на добавление трегалозы во внешнюю среду сопровождается индукцией гена *APL3*, что вызывает активное образование крахмала в семядолях (Rolland, 2007).

Установлено, что при передаче сигналов через трегалозу задействованы хлоропласты. При функционально неактивных хлоропластах не происходит образования трегалозы (Ramon et al., 2008).

Применение трансгенных линий арабидопсиса, которые сверхэкспрессировали гены *TPS* и *TPP*, позволило установить значение трегалозы в перераспределении сахаров. Сверхэкспрессия гена *TPS1* арабидопсиса вызывает нечувствительность растений к повышению уровня глюкозы и абсцизовой кислоты (АБК), что подтверждает взаимодействие сигнальных путей, опосредуемых Т6Р с иными сахарными сигналами, а также сигналами, опосредуемыми АБК (Ramon et al., 2008).

1.3.3. Сахароза как фактор регуляции ядерных генов

Сахароза является главной транспортной формой сахаров в организме растений. Проведены исследования, подтверждающие существование сахарозо-специфичной регуляции экспрессии генов и роста растений, несмотря на то, что сахароза может образовываться из триозофосфатов цикла Кальвина (Wind et al., 2010).

Установлено, что аналоги сахарозы (платиноза и тураноза), которые не могут принимать участия в метаболизме растений, вызывают сахарозоопосредованные сигналы, что подтверждает сигнальную функцию данного дисахарида. Эти аналоги действуют на экспрессию α -амилазы у эмбрионов ячменя (Loreti et al., 2000) и АГРазы у картофеля (Tiessen et al., 2003), и индуцируют деградацию и синтез крахмала, соответственно, в клубнях картофеля. Однако платиноза и тураноза могут активировать новые сигнальные пути,

отличающиеся от сигналов сахарозы, поскольку воспринимаются растением как общие стрессовые сигналы (Sinha et al., 2002; Rottsch et al., 2003).

Примером сахарозо-зависимой передачи сигнала является регуляция сахарозой трансляции белка *ATB2*. Ген *ATB2* кодирует транскрипционный фактор «лейциновой застёжки» (*bZIP11*). При увеличении концентрации сахарозы в среде экспрессия гена *ATB2* снижается (Hanson et al., 2008). Для определения специфичности действия сахарозы на экспрессию этого гена было исследовано действие других сахаров, но ни один из них не вызвал такого же репрессирующего эффекта.

Также сахароза может участвовать в регуляции процессов развития отдельно от сигналов, вызванных гексозами. У эмбрионов *Vicia faba* высокий уровень гексоз приводит к делению клеток на ранней стадии развития эмбриона, в то время как накопление сахарозы вызывает переключение от активного деления к росту клеток, их дифференциации и накоплению крахмала (Ramon et al., 2008).

1.3.4. Взаимодействие сигнальных путей, опосредуемых изменениями метаболизма углеводов, азота и неорганического фосфата

С применением ДНК-микрочипирования установлено, что экспрессия множества генов, продукты которых участвуют в распаде углеводов, аминокислот и белков, проявляет чувствительность к изменению углеводного статуса (Lee et al., 2004).

Углеводы являются основой для синтеза нитратов и участвуют в ассимиляции аммония при биосинтезе аминокислот. Азот является обязательным компонентом в структуре нуклеиновых кислот, аминокислот и хлорофиллов. Колебания уровня доступных форм азота или сахаров в клетке растений приводят к изменению скорости роста, эффективности фотосинтеза, что осуществляется через регуляцию экспрессии соответствующих генов (Rolland et al., 2006).

Установлено, что обработка арабидопсиса сахарозой приводило к изменению экспрессии 1310 генов, а обработка аммонием и нитратом влияла на

экспрессию лишь 4 генов. При этом одновременное добавление экзогенного азота и сахарозы приводило к изменению экспрессии 208 исследованных ядерных генов. Авторы пришли к выводу о том, что азотопосредуемые сигналы являются сахарозависимыми (Palenchar et al., 2004).

Malamy и Ryan установили, что при избытке сахаров в среде происходит ингибирование образования боковых корешков у растений арабидопсиса дикого типа (Malamy, Ryan, 2001). Однако мутант *lin1* (*lateral root initiation 1*), имеющий нарушения по гену *NTR2*, кодирующему транспортер нитрата, способен к инициации роста боковых корешков даже при высоком содержании сахаров во внешней среде и низком уровне азота. Следовательно, *NTR2* является сигналом-репрессором развития боковых корней (Malamy, Ryan, 2001; Litte et al., 2005; Ramon et al., 2008).

Компонентом многих ферментативных реакций является неорганический фосфат. В этих реакциях он либо расщепляется, либо переносится на субстрат. Поскольку концентрация этого соединения в почве невелика, растения выработали соответствующие механизмы адаптации. Так, изменения концентрации неорганического фосфата во внешней среде вызывают перераспределение углеводов в клетках. При повышении концентрации неорганического фосфата в цитоплазме происходит обмен этого соединения на триозофосфаты из хлоропластов за счет активной работы фосфат/триозофосфат транслокатора, что вызывает синтез сахарозы в цитоплазме. Если уровень неорганического фосфата в цитоплазме снижается, то триозофосфаты не проникают за пределы хлоропласта и используются для синтеза крахмала. В результате применения ДНК-микрочипирования выявлено около 150 генов, экспрессия которых регулируется при обработке листьев сахарозой или неорганическим фосфатом по принципу либо синергизма, либо антагонизма (Ramon et al., 2010).

1.3.5. Взаимодействие сахарозависимых и гормонзависимых путей регуляции экспрессии генов растений

1.3.5.1. Роль абсцизовой кислоты и транскрипционного фактора ABI4

Передача глюкозозависимого сигнала у растений взаимодействует с сигналами, опосредованными этиленом и АБК. Например, для передачи сигналов, связанных с изменением уровня глюкозы на самых ранних стадиях развития растений арабидопсиса, необходимым условием является наличие продуктов некоторых АБК-зависимых генов (Li et al., 2006; Rolland et al., 2010).

Действие абсцизовой кислоты при засухе вызывает сигнал, который передается от корней в надземные органы, что вызывает замыкание устьичных клеток и замедляет рост листьев. АБК участвует в закрывании устьиц через активацию НАДФН-оксидаз и регуляцию экспрессии генов транскрипционных факторов группы ABF/AREB (Foyer et al., 2012). Также АБК участвует в ответе растения на абиотический стресс, взаимодействуя с жасмоновой или салициловой кислотой (Grant, Jones, 2009).

На основании работ, проведенных на *gip*-мутантах, в которых не снижается экспрессия генов светособирающего комплекса II при действии норфлюразона, было выдвинуто предположение о том, что существует некий переключатель экспрессии большого количества ядерных генов, продукты которых локализованы в хлоропластах (Susek et al., 1993; Richly et al., 2003). В результате удалось определить *cis*-регуляторные области в промоторах генов семейства *LHCB*, которые регулируются АБК, а также были определены некоторые транскрипционные факторы, взаимодействующие с этой областью. Одним из таких транскрипционных факторов является ABA-INSENSITIVE 4 (ABI4) (Koussevitzky et al., 2007).

Исследования, проведенные на мутантах по генам *ABI1-ABI5*, указывают на то, что продукт гена *ABI4* является тем связующим звеном (транскрипционным фактором), которое объединяет многие сигнальные пути (Arroyo et al., 2003; Shkolnik-Inbar, Bar-Zvi, 2010; Cui et al., 2012).

ABI4 относят к белковому подсемейству DREB A3, которое входит в состав большого семейства транскрипционных факторов, известных как AP2/EREBP (Sakumura et al., 2002). В геноме арабидопсиса содержится 147 компонентов AP2/EREBP, многие из которых участвуют в таких сигнальных процессах, как ответы на биотический и абиотический стресс, что вызывает практический интерес многих исследователей (Leon et al., 2013). ABI4 связывается с CE1-подобным элементом CACCG (*cis*-регуляторным участком), который входит в состав промоторов генов арабидопсиса и кукурузы (Koussevitzky et al., 2007). Взаимодействие ABI4 с этой *cis*-областью приводит к активации или репрессии генов, среди которых и сам ген *ABI4*. Двойная функция данного транскрипционного фактора в качестве репрессора и активатора основана на расположении его сайта связывания в конкретном гене. Например, гены семейства *LHCB* и *RBCS* (РУБИСКО) репрессируются транскрипционным фактором ABI4, сайт связывания которого перекрывается с G-боксом (CACGTG) вышеупомянутых генов (Acevedo-Hernandez et al., 2005). Установлено, что CE1-подобные элементы представлены в двух видах в зависимости от расположения: либо до ТАТА-бокса (связывание с ABI4 приводит к активации гена), либо после ТАТА-бокса (связывание с ABI4 приводит к репрессии гена). Кроме того, ABI4 имеет и другие сайты связывания, в состав которых входит небольшая последовательность CCAC (Reeves et al., 2011). Для этого необходимо участие других транскрипционных факторов, которые пока достоверно не установлены.

Изучение трансгенных растений арабидопсиса, которые имеют гиперэкспрессию гена *ABI4*, и нокаут-мутантов по этому гену, позволило выявить большое число ядерных генов, экспрессия которых регулируется через транскрипционный фактор ABI4. В основном это гены, участвующие в метаболизме, развитии семян, защите от стрессов, мобилизации липидов на стадии эмбриогенеза, устойчивости к действию патогенов, росте корней и ингибировании роста боковых корешков (Leon et al., 2013).

Подтверждена консервативность гена *ABI4*, гомологи которого были найдены у риса и кукурузы (Niu et al., 2002), а также у большинства видов растений (Leon et al., 2013).

Получение мутантов, которые нечувствительны к действию АБК (*abi*-мутанты), послужило первым шагом, связавшим данный транскрипционный фактор с действием абсцизовой кислоты (Finkelstein et al., 1998). Центральная роль АБК в передаче сахарозависимых сигналов была установлена через исследование генов *GIN5* (*glucose insensitive5*) и *SIS5* (*GIN6/sucrose uncoupling6* (*SUN6*)/*sugar insensitive5*), в качестве мутантных аллелей гена *ABI3* и гена *ABI4*. Также установлено, что мутанты *sis4/gin1*, нечувствительные к сигналам, вызванным высоким уровнем глюкозы, являются аллельными по отношению к мутанту *aba2*, который лишен короткой цепи дегидрогеназы/редуктазы (SDR1), участвующей в синтезе АБК (Rolland et al., 2006).

Экспрессия гена *ABI4* повышается при увеличении содержания АБК и глюкозы, а также при стрессовом воздействии. Транскрипционный фактор *ABI4* участвует в регуляции таких генов, как *ABI5*, *ABI4*, *SBE2.2* (*starch branching enzyme 2.2*), *AOX1A*, *RBCS*, а также генов группы *LHCB* (Gregorio et al., 2014).

Обработка растений арабидопсиса линии дикого типа глюкозой индуцирует экспрессию генов, участвующих в синтезе АБК. Это указывает на взаимодействие сахаропосредованных сигналов с сигналами от АБК (Rolland et al., 2006). Однако не все *abi*-мутанты чувствительны к изменению уровня глюкозы на стадии раннего развития растений, поскольку существует множество путей передачи сигналов, как от глюкозы, так и от АБК (Arenas-Huertero et al., 2000).

При высоком уровне сахаров происходит остановка роста растений линии дикого типа после стадии прорастания, но не у мутантов по гену *ABI4*. Задержка развития растений в ответ на обработку сахарами происходит только на ранних стадиях развития растений, по аналогии с некоторыми хлоропластно-ядерными сигналами (Dekkers et al., 2008). Сахара и АБК действуют

в качестве важных сигналов на стадиях раннего развития через прямой контроль работы генов, ответственных за фотоавтотрофное развитие, прорастание, фотосинтез, и даже инициацию передачи ретроградных сигналов (Koussevitzky et al., 2007).

Связь хлоропластно-ядерных сигналов с транскрипционным фактором *ABI4* установлена после изучения регулятора транскрипции *PTM*, который непосредственно активирует экспрессию гена *ABI4*. *PTM* – транскрипционный фактор, консервативный для большинства видов растений, содержит го-меодомен, локализован в мембране пластид (Leon et al., 2013). При обработке норфлюразоном, линкомицином или в условиях высокой интенсивности освещения *PTM* подвергается действию одной из мембранных пептидаз (конкретная пептидаза еще достоверно не установлена), в результате чего *PTM* отсоединяется от мембраны и попадает в цитоплазму, а затем накапливается в ядре, где непосредственно активирует экспрессию гена *ABI4*. Мутанты по гену *PTM* имеют сниженную экспрессию гена *abi4* (Leon et al., 2013). Установлено, что *PTM* участвует в передаче хлоропластно-ядерных сигналов. Так, обработка норфлюразоном или линкомицином мутантов по гену *PTM* не вызывает репрессию генов семейства *LHCB* (*gun*-фенотип).

Обработка растений арабидопсиса контрольной линии или мутантов *gun1* только АБК или АБК совместно с норфлюразоном, вызывает репрессию генов семейства *LHCB*, но не оказывает никакого эффекта у мутантов по гену *ABI4* (Koussevitzky et al., 2007). Хотя *ABI4* участвует в передаче сигналов, связанных с синтезом тетрапирролов, это не является следствием его участия в АБК-опосредованной регуляции, поскольку в отличие от *abi4* мутантов, другие *abi*-мутанты не имеют *gun*-фенотипа (Koussevitzky et al., 2007).

Тем не менее, участие *ABI4* в передаче хлоропластно-ядерных сигналов может быть связано с его взаимодействием с сахаропосредованной регуляцией. Установлено, что при нормальных условиях развития растений, ген *ABI4* экспрессируется на ранних стадиях развития (Leon et al., 2013). Транскрипция *ABI4* обнаруживается в эмбриогенезе на большинстве стадий разви-

тия семени, но не обнаруживается в сухих семенах. Имеются данные, которые указывают на то, что ген *ABI4* экспрессируется и на более поздних стадиях роста растений, для чего необходимы специальные сигналы, или действие специфичных регуляторов. Так, регулятор роста и развития корней, *SCR* (*scarecrow*), снижает экспрессию гена *ABI4* в апикальной меристеме корня, что было установлено с использованием мутанта по гену *SCR* (Cui et al., 2012).

Действие линкомицина и норфлурозона вызывает генерацию $^1\text{O}_2$ у *gun*-мутантов и мутантов по гену *ABI4*, что подтверждает взаимосвязь некоторых сигнальных путей, опосредованных АФК, с транскрипционным фактором *ABI4* (Moulin et al., 2008). Известно, что *ABI4* участвует в регуляции экспрессии генов *ZAT10* и *ZAT12*, кодирующих транскрипционные факторы, которые активно синтезируются в ответ на повышение уровня внутриклеточной перекиси водорода (Rossel et al., 2007; Suzuki et al., 2012). Это служит доказательством участия белков *GUN1* и *ABI4* в передаче сигналов, опосредуемых образованием АФК (Koussevitzky et al., 2007).

Известно, что *ABI4* участвует в передаче некоторых хлоропластно-ядерных сигналов: индукция экспрессии ядерных генов (*CAB2/LHCB2*, *RBCS* (РУБИСКО), *CHS* (хальконсинтаза)) в ответ на изменения редокс-состояния хлЭТЦ отменяется при повышении уровня сахаров в клетке растений. Для передачи такого сахарозависимого сигнала необходим *ABI4*, поскольку обработка мутанта *sunb/abi4* раствором сахарозы не вызывает ингибирование экспрессии ядерных генов, продукты которых локализованы в хлоропластах (Oswald et al., 2001).

Имеются данные об участии *ABI4* в передаче митохондриально-ядерных сигналов у растений. Установлено, что при действии ротенона, ингибитора митохондриального дыхательного комплекса I, у растений линии дикого типа арабидопсиса происходит индукция ядерного гена *AOX1A*, продукт которого локализован в митохондриях. У мутанта *abi4* такой индукции не происходит (Giraud et al., 2009). Показано, что *ABI4* связывается с регуля-

торными элементами, расположенными перед геном *AOX1A*. Эти данные указывают на непосредственное участие ABI4 в передаче митохондриально-ядерных сигналов при нарушении работы митохондриальной электрон-транспортной цепи (Leon et al., 2013).

1.3.5.2. Взаимодействие сахаропосредованных сигналов и АБК-опосредованных сигналов с этиленом

Получено большое число мутантов, которые имеют дефекты в синтезе этилена или в восприятии этиленопосредуемых сигналов (Matsoukas, 2014).

Этилен вызывает сигналы, противоположные действию глюкозы и АБК. Линии арабидопсиса, нечувствительные к этилену (*etr1*, *ein2* и *ein3*) являются гиперчувствительными к действию эндогенной глюкозы, а обработка таких линий предшественником этилена снижает их чувствительность к глюкозе (Matsoukas, 2014). Мутант, образующий большее количество этилена относительно растений линии дикого типа (*eto1*) не проявляет чувствительность к сахаропосредованным сигналам (Ramon et al., 2008).

Мутант *ein2* (*ethylene insensitive*) с нарушением в передаче этиленопосредуемых сигналов имеет гиперчувствительность к глюкозе, в то время как мутанты *gin4* (*glucose insensitive 4*) и *sis1* (*sucrose insensitive 1*), нечувствительные к сахарозависимой регуляции, несут мутацию по гену *CTR1* (*constitutive triple response 1*), продукт которого блокирует передачу сигналов, опосредуемую этиленом. Обработка растений линии арабидопсиса дикого типа предшественником этилена, 1-аминоциклопропан-1-карбоксилевой кислотой (АСС), вызывает нечувствительность растений к глюкозе (*gin*-фенотип) (Ramon et al., 2008).

1.4. Выводы из обзора литературы

Глутаматдегидрогеназа является одним из ключевых ферментов в метаболизме L-глутамата, молекулы, которая играет важную роль в регуляции уровня доступных форм азота и углерода в клетке растения (т.н. C/N метаболизм). Экспрессия генов глутаматдегидрогеназы максимальна ночью (в темноте) и минимальна днем (на свету). Причина таких суточных изменений

экспрессии не изучена. Гипотеза о сахарозависимой регуляции суточных изменений экспрессии генов глутаматдегидрогеназы высказывалась, но не проверялась. При этом действие хлоропластно-ядерных сигналов на регуляцию экспрессии генов глутаматдегидрогеназы не изучалось.

Свет является одним из главных внешних факторов, необходимых для развития растений. На ранних этапах развития семени, а в последующем и молодые растения, воспринимают данный фактор в основном при помощи специализированных фоторецепторов, которые активируются светом определенной длины волны и запускают регуляторные каскады.

При изменении условий от полной темноты до уровня естественного освещения изменяется экспрессия огромного числа растительных генов (по некоторым оценкам до 30 % транскриптома) (Rasmusson et al., 2007). Эта светоиндуцибельность порождается разнообразными причинами, среди которых могут быть изменения уровня метаболитов (сахаров, интермедиатов биосинтеза пигментов и нуклеотидов), изменения редокс-статуса хлоропластов в целом и отдельных компонентов хлЭТЦ, митохондрий и клетки в целом, а также ряд других пластидно-ядерных сигналов. Так, при синтезе тетрапиролов в хлоропластах формируются сигналы, поступающие в ядро, способные активировать экспрессию ядерных генов, продукты которых участвуют в фотосинтезе (преимущественно гены группы *LHCB*); возбуждение светом фоторецепторов приводит к возникновению потока электронов по хлЭТЦ, в результате чего происходит последовательное изменение редокс-состояния ее участков (пул пластохинона), а также некоторых других компонентов пластид (тиоредоксины) и повышению генерации АФК, что также приводит к появлению сигналов, принимающих участие в регуляции экспрессии ядерных генов. Относительно недавно обнаружен ряд новых сигнальных молекул, участвующих в хлоропластно-ядерной регуляции экспрессии генов растений: к ним относятся фосфоаденозинфосфат, действующий через посредство ядерных экзорибонуклеаз, продукт окисления каротиноидов β -

циклоцитрал, и предшественник изопреноидов МЕСРР (Estavillo et al., 2011; Ramel et al., 2012; Xiao et al., 2012).

К сахарозависимым сигналам относят сигналы, возникающие при изменении уровня сахарозы, глюкозы и трегалозы в клетках растений, которые передаются через специальные транскрипционные факторы. Отдельное место в литературе занимает вопрос о сигнальной роли абсцизовой кислоты, которая оказывает воздействие на целые группы ядерных генов: доказано тесное взаимодействие сигналов, поступающих от абсцизовой кислоты, с сахарозависимой регуляцией.

Таким образом, при изменениях освещенности в растениях активизируется большое число сигнальных путей, в которых принимают участие множество сигнальных молекул, некоторые из которых еще не до конца понятны и изучены, способных оказывать действие на экспрессию ядерных генов. Причиной суточных изменений экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* при переходе «свет-темнота» может служить действие нескольких сигналов, имеющих как светозависимое, так и сахарозависимое происхождение.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объект исследования и условия экспериментов

Семена *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотип *Columbia* (далее *Col-0*) были получены из Arabidopsis Biological Resource Center (The Ohio State University, USA). Семена линий *gun1* и *gun1gun5* были любезно предоставлены нам Nobuyoshi Mochizuki. Особенности линий арабидопсиса представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Используемые в работе линии арабидопсиса

Линия	Локус	Дефект	Фенотип
Columbia-0 (<i>Col-0</i>)	-	-	Дикий тип
Landsberg erecta (<i>Ler</i>)	-	-	Дикий тип
Glucose insensitive 2 (<i>gin2</i>)	At4G29130	Отсутствие регуляторной функции гексокиназы 1 (HXK1)	Замедленный рост, нечувствительность к глюкозе при прорастании
Abscisic acid insensitive 4 (<i>abi4</i>)	At2G40220	Отсутствие транскрипционного фактора ABI4	Нечувствительность к АБК при прорастании
Genome uncoupled 1 (<i>gun1</i>)	At2G31400	Отсутствие PPR-белка GUN1	<i>gun</i> -фенотип
Двойной мутант Genome uncoupled 1 и Genome uncoupled 5 (<i>gun1gun5</i>)	At2G31400, At5G13630	Отсутствие белка GUN1, отсутствие Н-субъединицы Mg-хелатазы	<i>gun</i> -фенотип, более светлая окраска листьев, чем у дикого типа
Chlorina 1-1 (<i>chl1-1</i>)	At1G44446	Отсутствие функции хлорофилла a оксигеназы, отсутствие хлорофилла b	Желто-зеленая окраска листьев, замедленное развитие, потребность в более высокой освещенности

Семена стерилизовали в растворе, содержащем 70 % этанола и 0,05 % Triton X-100, в течение 8 минут, трижды промывали стерильной водой и раскладывали на плотной среде в чашках Петри вдоль диаметра чашки.

Питательная среда содержала: минеральные соли MS (Murashige, Skoog, 1962) – половинный состав, фитогель («Sigma-Aldrich», США) – 0,8 %, а также сахарозу («Helicon», Россия) – 2 % и/или норфлюразон («Sigma-Aldrich») – 50 нМ или 5 мкМ. После стратификации при +4 °С в течение трех суток чашки устанавливали в вертикальном положении и выращивали растения при температуре 23 °С, освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ или $10 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и длине светового дня 16 час.

В экспериментах с обработкой растений ингибиторами фотосинтеза, сахарозой, маннитолом, перекисью водорода 14-суточные растения арабидопсиса выдерживали в темноте в течение 18 часов до начала эксперимента. Обработку ингибиторами фотосинтеза и перекисью водорода проводили путем опрыскивания листьев интактных растений растворами, содержащими: 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевину (DCMU) («Sigma-Aldrich») – 20 мкМ, 2,5-дибromo-3-метил-6-изопропил бензохинон (DBMIB) («Sigma-Aldrich») – 20 мкМ, H_2O_2 – 10 мМ. Обработку сахарозой и маннитолом проводили путем опрыскивания корней интактных растений растворами, содержащими 3 % сахарозы («Helicon») или 3 % маннитола («Helicon»). В качестве контроля использовали растения, обработанные деионизированной водой с соответствующими концентрациями растворителей; все растворы содержали 0,05 % Triton X-100. Время обработки растений ингибиторами фотосинтеза, сахарозой, маннитолом составляло 4 часа, перекисью водорода – 2 и 4 часа, вслед за чем немедленно выделяли РНК.

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

(The Ohio State University, USA), за исключением семян линий *gun1* и *gun1gun5*, любезно предоставленных нам Nobuyoshi Mochizuki.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Экстракция РНК

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

2.2.2. Электрофоретическое разделение РНК в агарозном геле в нативных условиях

Образцы выделенной РНК разделяли в 1 % агарозном геле в буфере Tris-ацетат-EDTA (ТАЕ, состав: 40 mM Tris-ацетат, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 8,0) с окрашиванием бромистым этидием для предварительной визуальной оценки количества и качества выделенной РНК. Каждый образец для нанесения на гель содержал 2 мкл раствора РНК в буфере Tris-EDTA (ТЕ, состав: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), 5 мкл стерильной деионизированной воды и 1,5 мкл раствора бромфенолового синего в буфере ТАЕ. Электрофорез вели при напряжении 80-100 V, силе тока до 50 mA. Бромистый этидий добавляли при приготовлении геля до чуть розоватой окраски. Визуализацию нуклеиновых кислот и фотографирование геля производили с помощью оборудования GelDoc («Bio-Rad», США).

2.2.3. Синтез первой цепи кДНК

Для удаления возможных примесей ДНК к 8 мкл образца РНК добавляли 1 мкл 10-ти кратного буфера ДНКазы («Fermentas», Литва), 0,5 мкл ДНКазы

зы («Fermentas»). Инкубировали 30 минут при 37 °С. Для инактивации ДНКазы добавляли 1 мкл EDTA (25 мкМ) и прогревали 10 минут при 65 °С. Добавили 1 мкл праймеров oligo-dT (80 pM) («Fermentas») и прогревали 5 минут при 70 °С. Инкубировали 5 минут на льду. К смеси добавляли 4 мкл 5x буфера обратной транскриптазы («Fermentas»), 0,5 мкл (20 единиц) ингибитора РНКаз («Fermentas»), 2 мкл 10 мМ смеси dNTP («Fermentas»). Инкубировали 5 минут при 37 °С. К смеси добавили 0,7 мкл (140 единиц) обратной транскриптазы ReverAidH MinusM-MuIV («Fermentas»). Инкубировали 60 минут при 42 °С. Инактивировали фермент инкубацией 10 мин при 70 °С.

2.2.4. Подбор праймеров

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

Список всех использованных праймеров приведен в таблице 2 (табл. 2). Все праймеры были предварительно проверены путем анализа продуктов ПЦР-реакции в агарозном геле, каждая пара давала единственный продукт требуемого размера.

Таблица 2 - Праймеры, использованные для ПЦР в режиме реального времени

Локус	Ген	Праймеры, используемые для ОТ-ПЦР-РВ
At5G08290	<i>YLS8</i>	Л: AGGTGCTTGCGTCTGTTGCT П: TGTCCCTTGAGAGCCCAGTTGAT
At5G18170	<i>GDH1</i>	Л: CAGGGCAGCGTTTTGTCATCCA П: CGATACCATCCTTGTTCTTGATTGCT
At5G07440	<i>GDH2</i>	Л: CGCTCTTGGTGGTGTCCCTGAA П: CTCCTCCTGCGTTTGCGTAGA

At5G64870	<i>NOD1</i>	Л: ACGAGAAGCAGAAGCAAGCG П: GGTAAGTCCCCTGAGCATCGG
At3G14200	<i>DNAJ</i>	Л: AGGGAAAAACAATGGCGGAAGA П: TGGTGTGAAGTGGCTATGAGGTG
At5G59820	<i>FER1</i>	Л: ACTCCCTCACGGCTCTGCTT П: CGAAAGGCTGGAACACGACTC
At1G29910	<i>LHCB1.2</i>	Л: CGGAAAGTGAGCCAAGTTCT П: TGAAAGTCTCTACCATCCACCA
At4G29130	<i>HXK1</i>	Л: ATGGATGGTGGATTGTTTGAGCAT П: AAGGTAGAGAGAGTGAGAAGCAGCA
At4G39210	<i>APL3</i>	Л: CGTGCGTCGGAGTATGGACTG П: AGATTTTGCTGCTTCTTGATGAGAC

2.2.5. Обратнo-транскриптазная ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ)

ОТ-ПЦР-РВ проводили с использованием готовой смеси реагентов SYBR Select Master Mix («Applied Biosystems», США) и оборудования C1000 Thermal Cycler CFX96 Real-Time System («Bio-Rad», США). Объем реакционной смеси составлял 10 мкл. ПЦР проводили по следующему протоколу: прогревание до 50 °С, 2 минуты (согласно рекомендации производителя), один цикл денатурации (95 °С, 3 минуты), 36 циклов амплификации (95 °С, 20 с – 60 °С, 30 с – 72 °С, 30 с), после чего образцы подвергались нагреванию до 95 °С для последующего анализа кривых плавления. В качестве референсного гена использовали *YLS8* (*At5G08290*) (Hong et al., 2010). Для подтверждения отсутствия примесей проводили реакции «негативного контроля» без добавления кДНК со всеми используемыми праймерами. Анализ результатов и построение графиков проводили при помощи программного обеспечения CFX Manager™ Software Version 1,6 («Bio-Rad»).

2.2.6. Определение содержания супероксидного радикала

Определение содержания супероксидного радикала проводили методом инфльтрации 14-суточных листьев арабидопсиса раствором нитросинего

тетразолия (НСТ) согласно Meyer et al. (2009). При взаимодействии НСТ с супероксидным радикалом выпадает формазан в виде осадка темно-синего цвета. К раствору НСТ (1 мг/мл) в 10 мМ KH_2PO_4 (рН 7,8) добавляли DCMU (конечная концентрация – 20 мкМ) или DBMIB (конечная концентрация – 20 мкМ), после чего проводили инфильтрацию листьев под низким давлением. Контрольные образцы инфильтровали раствором НСТ без добавок. Часть контрольных образцов экспонировали на свету ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), часть в темноте. Время экспозиции составляло 40 минут. Затем все образцы перенесли в 70 % этанол, инкубировали при 80 °С до полной экстракции хлорофилла и фотографировали.

2.2.7. Определение уровня глюкозы в листьях

Для получения экстракта глюкозы навеску листьев около 300 мг гомогенизировали в жидком азоте до порошкообразного состояния, добавляли двукратное количество деионизированной воды относительно веса листьев. Инкубировали на водяной бане в течение 30 минут при 80 °С. Центрифугировали 10 минут при 15000 g. Отбирали супернатант, производили измерение уровня глюкозы коммерческим набором Glucose (HK) Assay Kit («Sigma-Aldrich»), согласно протоколу производителя.

Энзиматический метод определения глюкозы основан на спектрофотометрическом измерении оптической плотности НАДН, образующегося в результате двух ферментативных реакций:



где НХК1 – гексокиназа 1, G6PDH – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа.

К 50 мкл экстракта глюкозы добавляли 250 мкл реагента (содержит гексокиназу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу). Через 15 минут измеряли

оптическую плотность при длине волны 340 нм. Концентрацию глюкозы в экстракте рассчитывали по формуле:

$$\text{глюкоза, мг / мл} = \frac{\Delta A * TV * F * 180,2}{6,22 * d * SV * 1000}$$

где ΔA – разница в оптической плотности образца и раствора сравнения; TV – общий объем образца, мл; F – фактор разбавления; 180,2 – молярная масса глюкозы, г/моль; SV – объем супернатанта в образце, мл; 6,22 – молярный коэффициент поглощения для НАДН при 340 нм; d – длина оптического пути (= 1 см); 1000 – коэффициент перевода мкг в мг. Конечный результат выражали в мг глюкозы на грамм сырого веса тканей арабидопсиса.

2.2.8. Экстракция ферментов

Для экстракции ферментов брали навеску (300-400 мг) зеленых тканей арабидопсиса, растирали на льду до образования гомогенной массы в 400 мкл буфера (KH_2PO_4 – 50 мМ, поливинилпирролидон (PVP) – 4%, Triton X-100 – 0,3 %, β -меркаптоэтанол – 14 мМ, PMSF – 1 мМ, ЭДТА – 1 мМ, аскорбиновая кислота – 2 мМ, pH 7,4). β -меркаптоэтанол, PMSF и аскорбиновую кислоту добавляли в буфер непосредственно перед началом экстракции. Гомогенат центрифугировали при +4 °C при ускорении 16000 g в течение восьми минут. Получившийся супернатант переносили в пластиковые пробирки и использовали для определения активности GDH в полиакриламидном геле.

2.2.9. Электрофорез белков в полиакриламидном геле в нативных условиях (native PAGE)

Электрофорез в полиакриламидном геле в нативных условиях проводили согласно Davis (Davis, 1964). Стеклянные пластины отделяли друг от друга с помощью прокладок толщиной 1 мм. В просвет между пластинками заливали раствор мелкопористого полиакриламидного геля (7,5 %). Для создания ровной верхней границы разделяющего геля на него наслаивали бидистиллированную воду до застывания геля. После полимеризации заливали

крупнопористый гель (5%). В последний погружали пластиковый шаблон для формирования «карманов» в верхней границе геля.

Верхним и нижним электродным буфером служил 3-х кратный трис-глицин (глицин – 9 г/л, Tris-HCl – 1,8 г/л, pH 8,3). К 15 мкл анализируемого образца добавляли 2 мкл раствора бромфенолового синего, после чего смесь помещали в карманы геля. Электрофорез проводили при 4 °С. Первые полчаса электрофореза проводили при напряжении 120 V при силе тока в 20 мА. Затем мощность доводили до 220-240 V/30 мА. Продолжительность электрофореза составляла около 3 часов. Сигналом к окончанию процесса служило полное прохождение бромфеноловым синим блока разделяющего геля.

Для контроля количества исследуемого белка после окончания электрофореза гель окрашивали в водном растворе, содержащем 0,2 % Coomassie G-250, 25 % изопропанола, 10 % уксусной кислоты в течение 60 минут. Для обесцвечивания фона гель переносили в раствор, содержащий 10 % уксусной кислоты и 12 % изопропанола.

2.2.10. Определение активности глутаматдегидрогеназы

После проведения электрофореза гель заливали 10 мл раствора, содержащего НАД (1,2 мМ), глутаминовую кислоту (10 мМ), НСТ (1,8 мМ) в 0,1 М буфере Tris-HCl (pH 7,8). Гель инкубировали в красящем растворе при покачивании в течение 10-15 минут до появления окрашивания. Зоны активности глутаматдегидрогеназы выявлялись как бурые полосы на бесцветном фоне. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл ледяной уксусной кислоты. Затем буфер сливали, окрашенный гель фотографировали.

2.2.11. Количественное определение белка по Бредфорд

Количественное определение уровня белка проводили методом Бредфорд (Bradford, 1976). В лунки 96-луночного иммунологического планшета вносили по 200 мкл реактива Бредфорд («Sigma-Aldrich») и 4 мкл экстракта белка. Через 5 мин измеряли оптическую плотность при 595 нм на планшетном спектрофотометре BioRad-680 (США). Концентрацию белка вычисляли

по калибровочному графику, построенному с использованием бычьего сывороточного альбумина.

2.2.12. Статистическая обработка результатов

Все эксперименты были проведены не менее, чем в трех биологических повторностях. Построение диаграмм при количественном определении глюкозы осуществляли с помощью пакета программ Microsoft Excel. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента при уровне вероятности $p < 0,05$. Для обратнo-транскриптазной ПЦР в реальном времени статистическая обработка данных и построение диаграмм производились программой CFX ManagerTM Software Version 1,6 («Bio-Rad»).

Бары на всех диаграммах означают стандартные отклонения.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Определение изоферментного спектра глутаматдегидрогеназы в различных органах и типах клеток арабидопсиса

Определение специфической активности фермента НАД(Н)-GDH проведено на гетеротрофной культуре клеток и в надземных органах арабидопсиса.

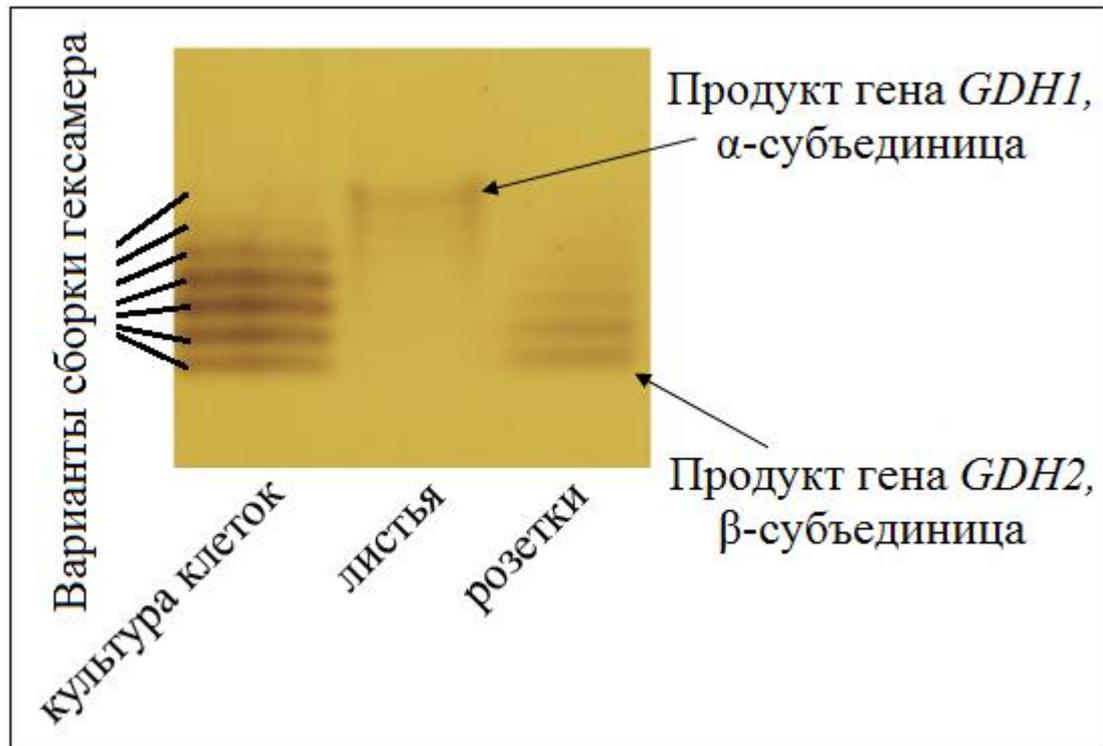


Рис. 4. Изоферментный спектр глутаматдегидрогеназы в суспензионной культуре клеток и различных органах арабидопсиса на свету ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$).

Использовали 7-суточную гетеротрофную суспензионную культуру клеток, а также 14-суточные растения арабидопсиса, выращенные горизонтально на чашках Петри. После электрофореза в неденатурирующих условиях, проведенном в 7,5 % полиакриламидном геле, наблюдали все семь изоформ, соответствующих семи вариантам сборки фермента GDH (рис. 4). Данная методика не предусматривает использование белков-маркеров, однако из литературных данных известно, что в неденатурирующих условиях β-субъединицы глутаматдегидрогеназы в геле продвигаются быстрее, чем α-

субъединицы (Turano et al., 1997; Miyashita, Good, 2008). Спектр изоформ GDH различался в зависимости от используемого материала. В клетках суспензионной культуры наблюдали высокую активность вариантов сборки от $4\alpha 2\beta$ до 6β , варианты 6α и $5\alpha 1\beta$ визуализировались слабо. В листьях арабидопсиса, которые находились на свету, преобладали изоформы 6α и $5\alpha 1\beta$, т.е. при сборке холофермента преобладали продукты гена *GDH1*. В целых розетках (каждый образец содержал листья, стебли и листовые черешки 3-5 растений) преобладали изоформы 6β , $1\alpha 5\beta$ и $2\alpha 4\beta$, т.е. при сборке холофермента преобладали продукты гена *GDH2*. Таким образом, различные типы клеток содержали различные изоферментные спектры GDH. Известно, что в корнях арабидопсиса наиболее активны формы GDH, богатые β -субъединицами, в мезофиле листьев – α -субъединицами (Turano et al., 1997; Miyashita, Good, 2008). Что касается спектров GDH в целых розетках, то он образуется в результате смешения спектров, характерных для листовых пластинок, стеблей и листовых жилок и, по-видимому, может зависеть от условий выращивания, возраста растений. В нашей работе, как и в работе Miyashita и Good (Miyashita, Good, 2008), спектр изоформ GDH в целых розетках характеризовался преобладанием форм, богатых β -субъединицами.

В дедифференцированных клетках суспензионной культуры тканеспецифичный характер экспрессии генов, как правило, утрачивается, что в данном случае позволило наблюдать практически полный изоферментный спектр GDH.

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

3.2.1. Динамика изменения уровня транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* на свету и в темноте

В последующих разделах данной работы использовали зеленые ткани растений (розетки) растений линии *Arabidosisis thaliana* дикого типа, экотип *Columbia-0* (*Col-0*). Для изучения экспрессии исследуемых генов использовали данные обратной-транскриптазной полимеразной цепной реакции в режиме

реального времени (ОТ-ПЦР-РВ). В качестве референсного гена использовали *YLS8* (*At5G08290*), который кодирует белок, участвующий в митотическом цикле. Экспрессия гена *YLS8* стабильна при смене температуры окружающей среды и не подвержена суточным изменениям, в отличие, например, от широко применяемого в качестве референсного гена актина (*ACT*) (Hong et al., 2010).

Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* максимальна в темноте и минимальна на свету. Данные, представленные на рисунке 5, показывают изменение уровня транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* в 14-суточных розетках арабидопсиса, выращенных на чашках Петри. Растения выдерживали 18 часов в темноте, после чего часть выставляли на 4 часа на свет ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), а часть оставалась 4 часа в темноте. Уровень транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* был значительно выше в темноте, чем на свету (рис. 5).

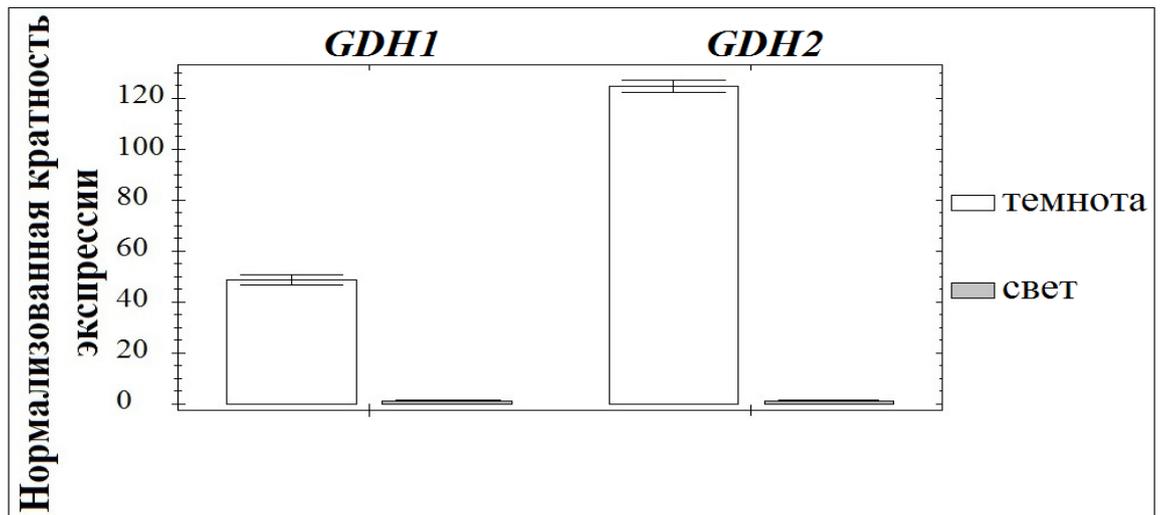


Рис. 5. Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* при экспонировании растений линии *Col-0* в темноте и на свету.

Обозначения: Темнота – экспозиция растений в темноте 22 (18+4) часа; свет – экспозиция растений 4 часа при освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

В зависимости от условий эксперимента (уровень освещенности, продолжительность экспонирования на свету и в темноте) разница могла составлять от 10 до 120 раз (данные не приведены), причем для гена *GDH2* эта раз-

ница была, как правило, больше. Полученные данные согласуются с данными литературы. Так, по данным Turano, экспрессия гена *GDH1* повышалась в темноте в 3 раза, а *GDH2* – в 18 раз (использовались листья 24-дневных растений арабидопсиса линии дикого типа *Col-0*, освещенность составляла 120-140 мкмоль*м⁻²с⁻¹, время экспозиции в темноте – 4 суток) (Turano et al., 1997).

Таким образом, масштаб изменения экспрессии гена *GDH2* больше, чем гена *GDH1*. Поскольку этот масштаб изменений варьирует в зависимости от условий эксперимента, с целью более детального изучения характера изменения экспрессии исследуемых генов, мы изучили динамику изменения уровня транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* при изменении условий освещенности (темнота-свет и свет-темнота). Динамику изменения уровня транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* исследовали в розетках 14-суточных растений линии *Col-0* в течение 8 часов после переноса из темноты на свет и из света в темноту. В эксперименте использовали 14-суточные растения арабидопсиса, выращенные при освещении 120 мкмоль*м⁻²с⁻¹. После непрерывного пребывания на свету в течение 18 часов растения убрали в темноту, после чего отбирали образцы каждые 2 часа (рис. 6).

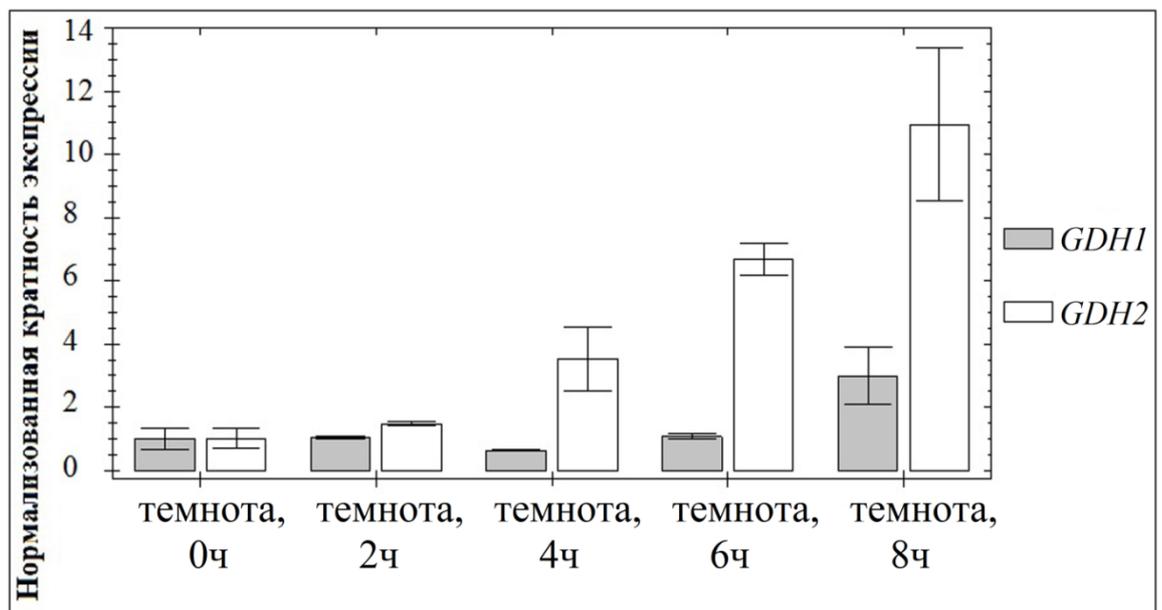


Рис. 6. Динамика изменения экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* после 18 ч непрерывного освещения (120 мкмоль*м⁻²с⁻¹) 14-суточных растений дикого типа *Col-0* и переноса их в темноту.

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

Для исследования динамики снижения уровня транскриптов исследуемых генов на свету использовали 14-суточные растения арабидопсиса, которые выдерживали 18 ч в темноте, затем – перенесли на свет ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). При экспонировании растений на свету, экспрессия обоих исследуемых генов оказывалась значительно снижена уже через 30 минут после начала эксперимента, а через 2-4 часа на свету достигала значений, близких к минимальным (рис. 7).

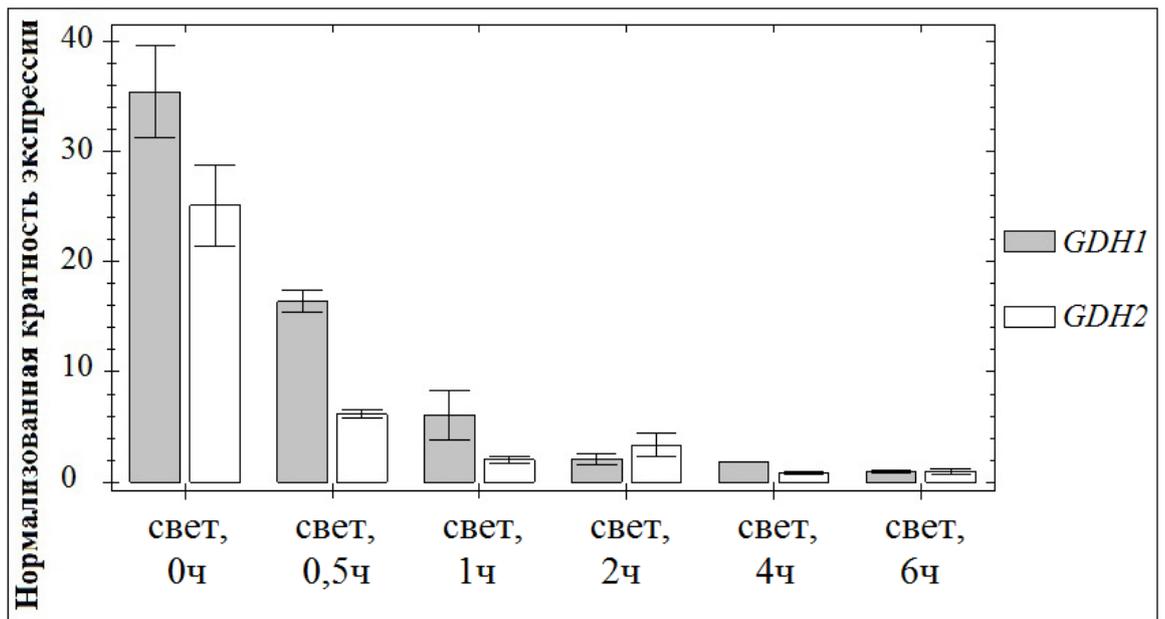


Рис. 7. Динамика изменения экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* после переноса 14-суточных растений линии *Col-0* из темноты (18 часов в темноте) на свет ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$).

Таким образом, повышение уровня транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* в темноте идет медленнее, чем снижение на свету. Достаточно 30 минут экспонирования образцов на свету, чтобы увидеть значительную разницу в экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* с образцами, выдержанными в темноте. В

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

3.2.2. Зависимость уровня транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* от уровня освещенности

С целью изучения характера экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* при разной освещенности 14-суточные растения арабидопсиса, выращенные горизонтально на чашках Петри при освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, адаптировали к условиям пониженной освещенности ($2,5$, 25 , 40 и $95 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) в течение двух суток. Затем после 4 часов непрерывного освещения из розеток выделяли РНК и оценивали уровень экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*. Чем выше была освещенность в эксперименте, тем ниже была экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* (рис. 8). Наблюдали быстрое снижение уровня транскриптов исследуемых генов при переходе освещенности от 0 к $2,5$ и от $2,5$ к $25 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

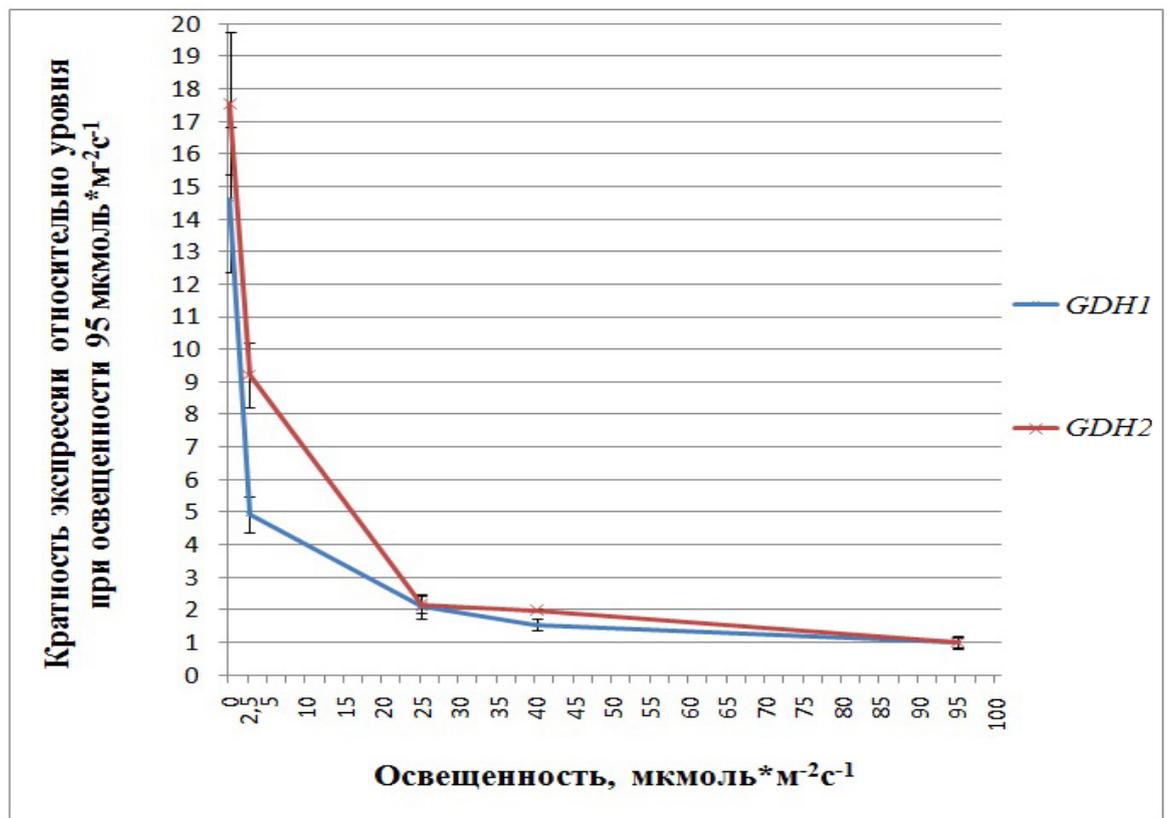


Рис. 8. Уровень экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* в листьях 14-суточных растений линии *Col-0* при разной освещенности.

При дальнейшем повышении освещенности продолжалось понижение экспрессии, но менее интенсивно.

Таким образом, зависимость уровня транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* от освещенности сохраняется и при очень низких значениях освещенности (2,5 и 25 мкмоль*м⁻²с⁻¹). По-видимому, при низких значениях освещенности экспрессия исследуемых генов более чувствительна к ее изменениям, чем при умеренных значениях.

Принято считать, что изменения уровня транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* происходят вследствие возникновения сигналов, которые вызваны ростом уровня сахаров у растений в дневное время на свету и снижением в темноте (Turano et al., 1997; Miyashita, Good, 2008). Ряд исследователей связывают роль глутаматдегидрогеназы именно с поддержанием углеродного статуса клетки за счет участия в процессе диссимиляции пептидов и повышением уровня углеводов, которые включаются в цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса) при «углеводном голодании» (Miyashita, Good, 2008; Fontaine et al., 2013). Поэтому следующая часть исследований посвящена изучению сахарозависимых механизмов регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*.

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

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

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

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

Несмотря на заинтересованность различных исследовательских групп в изучении физиологической роли глутаматдегидрогеназы и генов, кодирующих субъединицы данного фермента, конкретный механизм регуляции генов *GDH1* и *GDH2* до настоящего времени не изучен. Согласно единственной на

сегодняшний день гипотезе, повышение экспрессии ядерных генов *GDH1* и *GDH2* происходит за счет отмены сигнала-репрессора, который возникает вследствие повышения уровня сахаров на свету (Miyashita, Good, 2008).

Для исследования роли сахарозависимых сигналов в светозависимых изменениях экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*, использовали растения дикого типа экотипа *Landsberg erecta (Ler)*. Использование линии *Ler* было необходимо для последующего сравнения полученных результатов с данными, полученными на растениях мутантной линии *gin2*, полученной на основе линии *Ler*.

14-суточные растения выдерживали 18 часов в темноте до начала эксперимента. Затем корни растений обрабатывали 3 % сахарозой, а корни контрольных образцов – 3 % маннитолом (маннитол использовали для контроля осмотического стресса, который могут испытывать растения при действии сахарозы). После этого половину тех и других образцов экспонировали на свету в течение 3 часов при освещенности в $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, другую часть образцов убрали на 3 часа в темноту (рис. 9).

В качестве гена-маркера уровня эндогенных сахаров использовали ген *APL3*, который кодирует большую субъединицу АДФ-глюкозопирифосфорилазы (ADP-Glucose pyrophosphorylase), первого фермента в пути биосинтеза крахмала. Экспрессия гена *APL3* индуцируется при повышении уровня сахаров в клетке растений, и репрессируется при их снижении (Ramon et al., 2008).

В растениях, обработанных 3 % маннитолом и экспонированных на свету, уровень транскриптов гена *APL3* был значительно выше, чем в растениях, обработанных 3 % маннитолом и выдержанных в темноте (контроль) (рис. 9, А). Обработка 3 % сахарозой вызывала повышение экспрессии гена *APL3* как в темноте, так и на свету. Таким образом, обработка корней растений сахарозой, по-видимому, приводит к повышению уровня сахаров в клетке, что и вызывает повышение экспрессии гена *APL3*.

после обработки растений сахарозой в темноте, и в меньшей степени, но достоверно снижался на свету.

Таким образом, мы наблюдали сахарозависимую репрессию для гена *GDH2*, но не гена *GDH1*. При переносе растений с темноты на свет или из света – в темноту уровень транскриптов гена *GDH2*, как правило, изменяется быстрее (рис. 7), а разница между уровнем в темноте и на свету оказывается больше, чем для гена *GDH1* (рис. 5 и 6). По-видимому, ген *GDH1* вообще в меньшей степени отвечает на регуляторные сигналы, чем ген *GDH2*.

Наиболее изученным посредником при передаче сахарозависимого сигнала у растений является гексокиназа 1 (НХК1). Помимо своей ферментативной функции, гексокиназа 1 выполняет сигнальную функцию: повышение уровня глюкозы вызывает фосфорилирование НХК1, которая становится компонентом ядерного высокомолекулярного комплекса, способного связываться с промоторами ядерных генов (Ramon et al., 2008).

Мы исследовали роль гексокиназы 1 в регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*. Исследования проводили на двух линиях арабидопсиса: линия дикого типа *Ler* и мутантная линия *glucose insensitive 2 (gin2)*, полученная на основе линии *Ler*. Растения линии *gin2* имеют дефект сигнальной функции гексокиназы 1.

Использовали 14-суточные растения линий *Ler* и *gin2*, выращенные горизонтально в чашках Петри на среде, содержащей 2 % сахарозу и без сахарозы. Растения предварительно выдерживали 18 часов в темноте, затем экспонировали на свету в течение 4 часов (рис. 10). Оценивали уровень транскриптов гена гексокиназы 1 (*HXK1*). Согласно литературным данным, гексокиназа 1 опосредует повышение экспрессии собственного гена (*HXK1*) при повышении уровня глюкозы в клетке. Уровень транскриптов гена *HXK1* выше на свету и при обработке сахарозой, и ниже в темноте (Granot et al., 2013).

Наблюдали остаточную экспрессию (около 30 % от уровня экспрессии у дикого типа) гена *HXK1* у линии *gin2*, что согласуется с литературными данными, согласно которым мутант *gin2* может сохранять до 50% экспрессии

гена *hvk1* (Rolland et al., 2006). Экспрессия гена *HVK1* у линии *Ler* повышается в присутствии сахарозы. Выращивание растений линии *gin2* на среде, содержащей сахарозу, не вызывает больших изменений по сравнению с контрольным образцом этой линии (рис. 10).

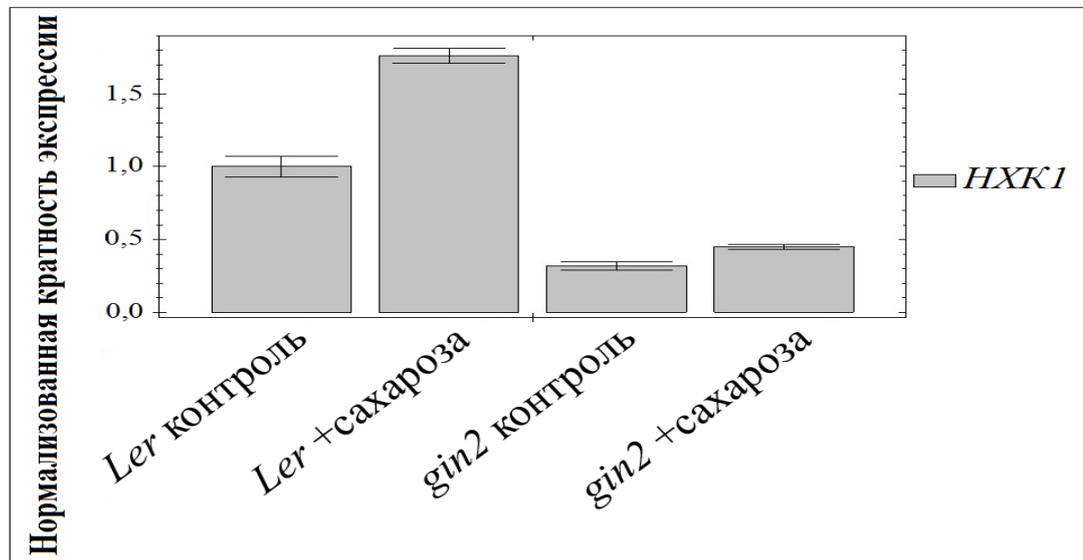


Рис. 10. Уровень экспрессии гена *HVK1* в 14-суточных розетках арабидопсиса линии дикого типа *Ler*, выращенных в присутствии 2 % сахарозы в среде.

Обозначения: Растения выдерживали 18 часов в темноте с последующей экспозицией 4 часа на свету. Контроль – растения выращены на среде без сахарозы, сахароза – растения, выращенные на среде в присутствии 2 % сахарозы.

При экспонировании 14-суточных растений *Ler* и *gin2* 4 часа на свету (после выдерживания 18 часов в темноте) наблюдали повышение экспрессии гена *HVK1* у линии *Ler* (рис. 11).

Существенных изменений экспрессии гена *hvk1* у линии *gin2* не было. Таким образом, ни обработка сахарозой, ни перенос из темноты на свет не приводили к повышению экспрессии гена *hvk1* у мутантной линии *gin2*, что подтверждает потерю регуляторной функции гексокиназы 1 у мутанта *gin2*. Это позволяет использовать мутант *gin2* для исследования сигнальной роли гексокиназы 1 в сахарозависимой регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*.

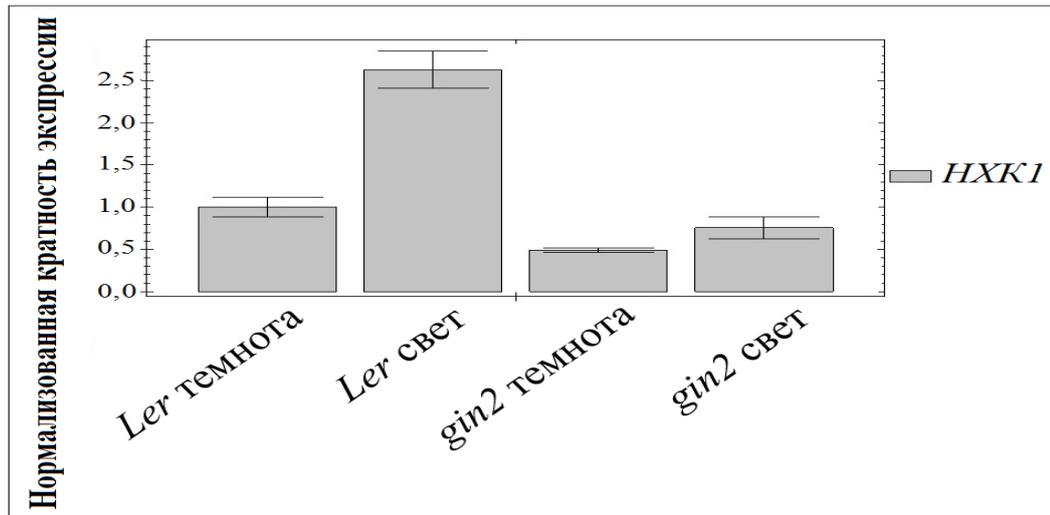


Рис. 11. Уровень транскриптов гена *HXK1* в 14-суточных розетках линии дикого типа *Ler*, предварительно выдержанных 18 часов в темноте с последующей экспозицией 4 часа на свету при освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Обозначения: Темнота – растения находились в темноте 22 (18+4) часа; свет – растения находились при освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ 4 часа.

Далее исследовали экспрессию генов *GDH1* и *GDH2* у мутанта *gin2*. Растения линий *Ler* и *gin2*, выращенные вертикально на чашках Петри, выдерживали 18 часов в темноте, после чего часть образцов экспонировали 4 часа на свету, а часть – в темноте (рис. 12).

Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* в растениях линии *Ler* была значительно выше в темноте, чем на свету. Экспрессия исследуемых генов у растений мутантной линии *gin2* существенно не отличалась от их экспрессии у линии дикого типа: экспрессия была выше в темноте и ниже на свету. Полученные данные указывают на непричастность *HXK1* к регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*.

Исходя из полученных результатов, была проведена серия экспериментов, в которой 14-суточные растения линий *Ler* и *gin2* выдерживали 18 часов в темноте, затем обрабатывали 3 % сахарозой или 3 % маннитолом. Контролем служили растения линии *Ler*, обработанные 3 % маннитолом, пребывавшие 4 часа на свету.

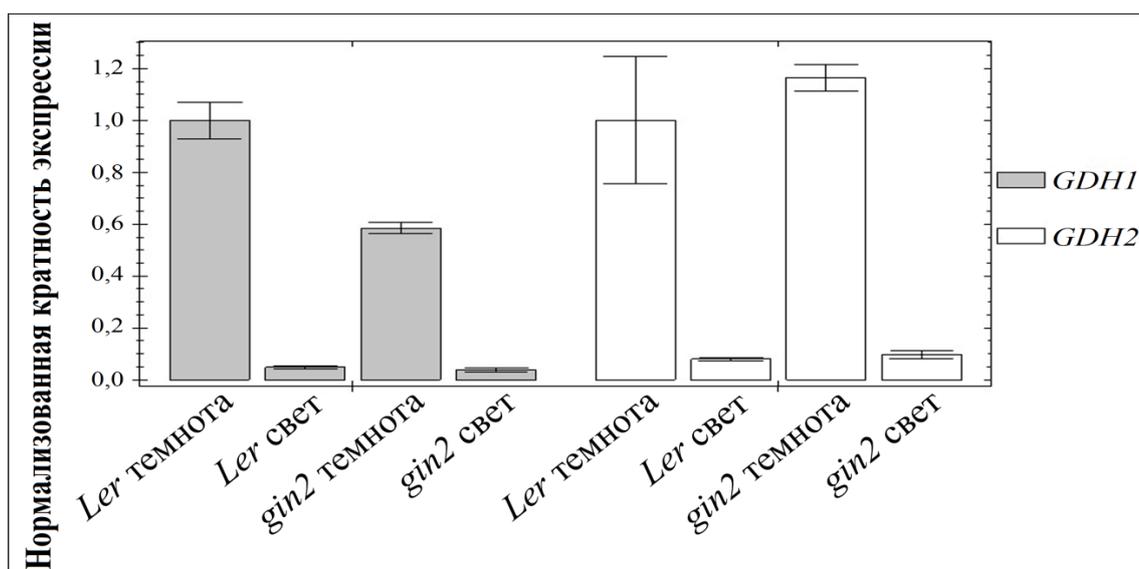


Рис. 12. Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* в розетках растений линий *Ler* и *gin2*, выращенных без сахарозы, на свету и в темноте.

Обозначения: Темнота – растения выдерживали 22 (18+4) часа в темноте; свет – растения выдерживали 4 часа при освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

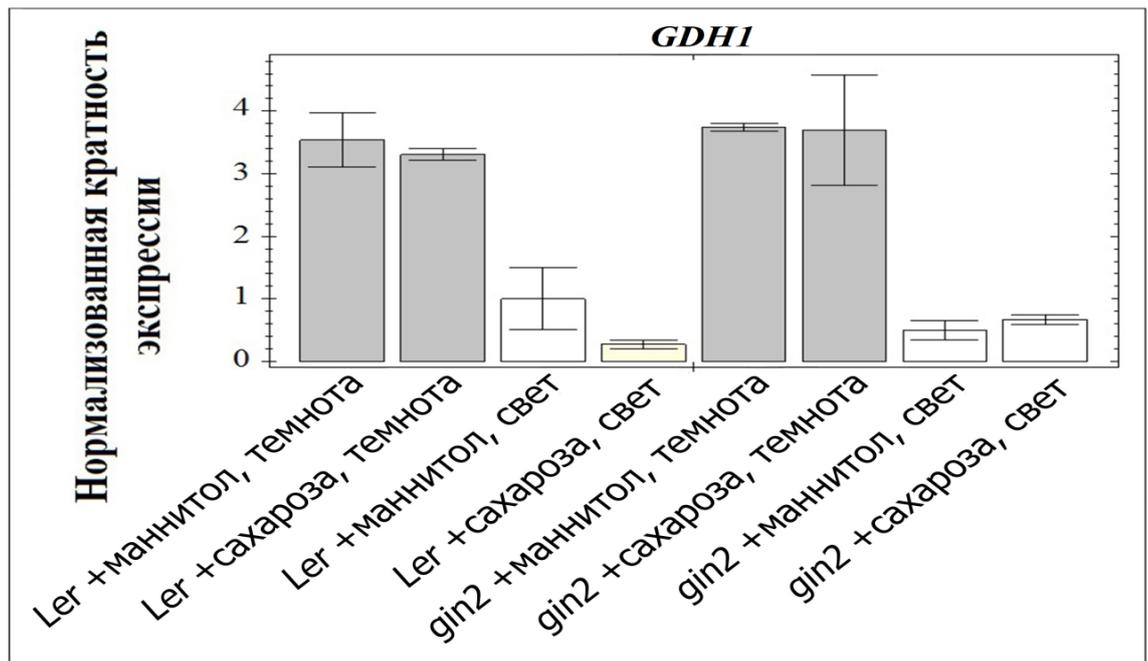
Маннитол использовали для контроля осмотического стресса, который могут испытывать растения при действии сахарозы (рис. 13).

Характер экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* у мутанта *gin2* при обработке растений сахарозой и на свету существенно не отличался от экспрессии у линии дикого типа (рис. 13). Экспрессия гена *GDH2* на свету была ниже, чем в темноте. Обработка сахарозой приводила к снижению экспрессии гена *GDH2*. Изменения уровня экспрессии в зависимости от освещенности и от присутствия сахарозы были значительно сильнее выражены для гена *GDH2*, чем для гена *GDH1*.

Таким образом, мы наблюдали снижение уровня транскриптов гена *GDH2* под действием сахарозы (рис. 9 и 13). Это согласуется с высказанной ранее гипотезой о сахарозависимом характере регуляции генов GDH (Miyashita, Good, 2008). Достоверного снижения уровня транскриптов для гена *GDH1* не наблюдали.

По нашим данным, ни сахарозависимое, ни светозависимое снижение уровня транскриптов гена *GDH2* не зависит от гексокиназы 1.

А



Б

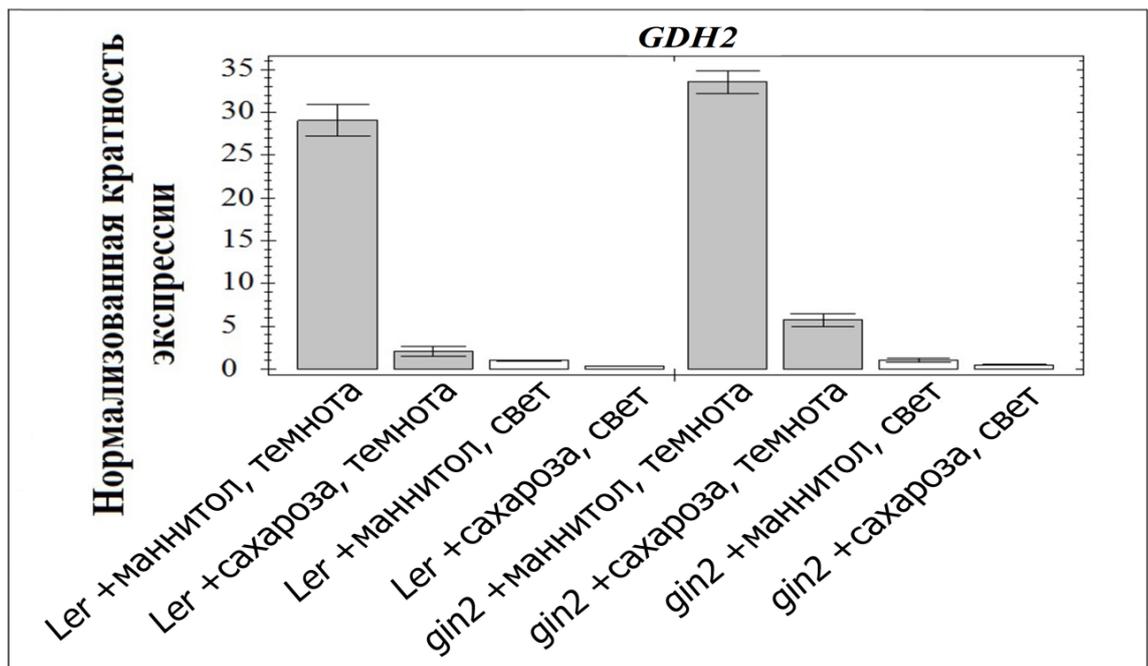


Рис. 13. Экспрессия генов *GDH1* (А) и *GDH2* (Б) в растениях линий *Ler* и *gin2* на свету и в темноте в присутствии сахарозы.

Обозначения: Маннитол – листья обработаны 3% маннитолом; сахароза – листья обработаны 3 % сахарозой; темнота – экспозиция в темноте в течение 22 (18+4) часа; свет – экспозиция при $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ в течение 4 часов.

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

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

Транскрипционный фактор abscisic acid insensitive 4 (ABI4) является связующим звеном между различными типами регуляторных сигналов, в число которых входят сахарозависимые и хлоропластно-ядерные сигналы. ABI4 взаимодействует с определенными участками в промоторах ядерных генов, оказывая активирующее или репрессирующее действие на транскрипцию последних (Leon et al., 2013).

В клетках растений существует тесное взаимодействие между сигналами, опосредуемыми АБК и сахарозависимыми сигналами. Мутанты, нечувствительные к высокому уровню глюкозы (*gin1/isi4/sis4* и *gin5/isi2/sis3*), аллельны по отношению к мутантам с нарушением синтеза АБК (*aba2* и *aba3*) (Arenas-Huertero et al., 2000; Rook et al., 2001; Ramon et al. 2008). Установлено, что обработка глюкозой проростков арабидопсиса дикого типа приводит к повышению уровня АБК (Cheng et al., 2002). Это подтверждает взаимосвязь упомянутых выше сигнальных путей. Исследования, проведенные на трансформантах, полученных на базе мутантов *gin1* и *gin5* и сверхэкспрессирующего ген *HXK1*, показали, что сигналы, опосредуемые АБК, действуют в цепи передачи после сигналов, опосредуемых *HXK1* (Ramon et al., 2008).

В следующей серии экспериментов мы исследовали роль ABI4 в светозависимой регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*. Использовали розетки линий *Col-0* и мутантов *abi4*. 14-суточные растения выдерживали 18 часов в темноте, после чего часть растений выставляли на свет ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) на 4 часа, остальные оставляли в темноте. Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2*

была выше в темноте и ниже на свету как у растений линии *Col-0*, так и у мутантной линии *abi4* (рис. 14).

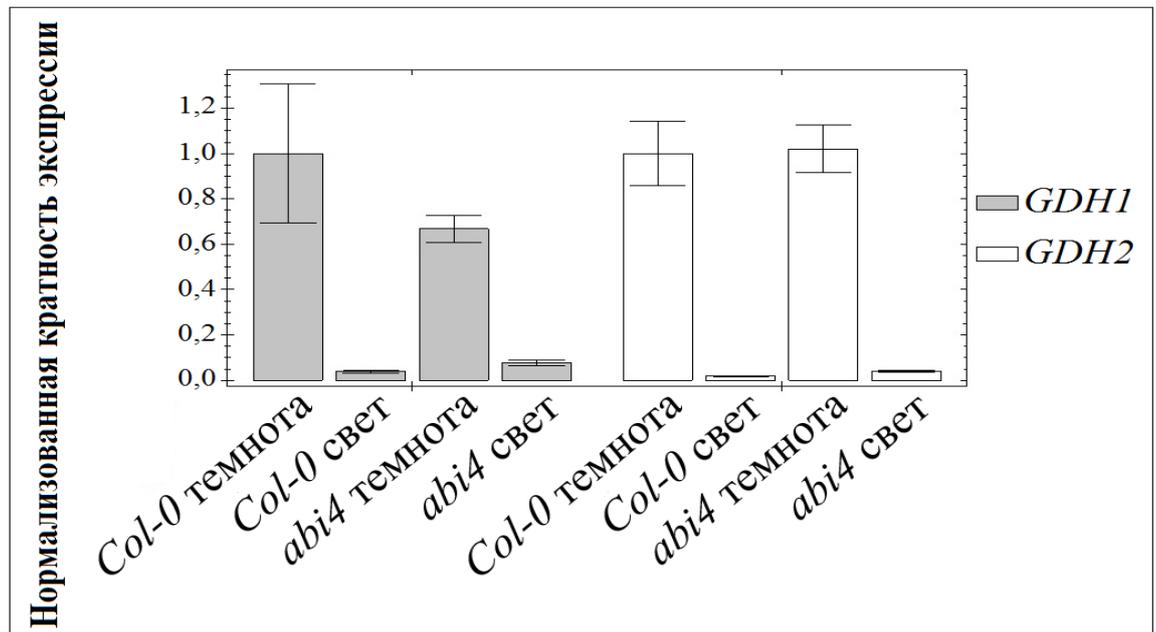


Рис. 14. Уровень транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* в 14-суточных розетках линий *Col-0* и *abi4*, выращенных на среде без сахарозы.

Обозначения: Темнота – растения экспонировали 22 (18+4) часа в темноте; свет – растения экспонировали 4 час при освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Профиль экспрессии на свету и в темноте существенно не отличался между линиями. Следовательно, отсутствие транскрипционного фактора ABI4 не отменяет светозависимой репрессии генов *GDH1* и *GDH2*. Полученные данные не исключают возможное участие ABI4 в сахарозависимой регуляции экспрессии исследуемых генов.

Снижение уровня транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* на свету может быть вызвано одновременным действием двух факторов: хлоропластно-ядерных сигналов, не связанных с изменением уровня сахаров, и изменениями уровня сахаров в клетке. Установлено, что все известные сахарозависимые регуляторные сигналы, не опосредуемые HXK1, передаются через ABI4 (Ramon et al., 2008). С целью оценки вклада сахарозависимых сигналов в регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* мы оценивали возможное участие транскрипционного фактора ABI4 в снижении уровня транскриптов ис-

следуемых генов на свету. Для этого 14-суточные растения арабидопсиса линии *Col-0* и мутанта *abi4* выдерживали сутки в темноте, затем корни растений обрабатывали 3% р-ром сахарозы и переносили на свет на 30 минут. Контрольные образцы обрабатывали водой в тех же условиях (рис. 15).

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

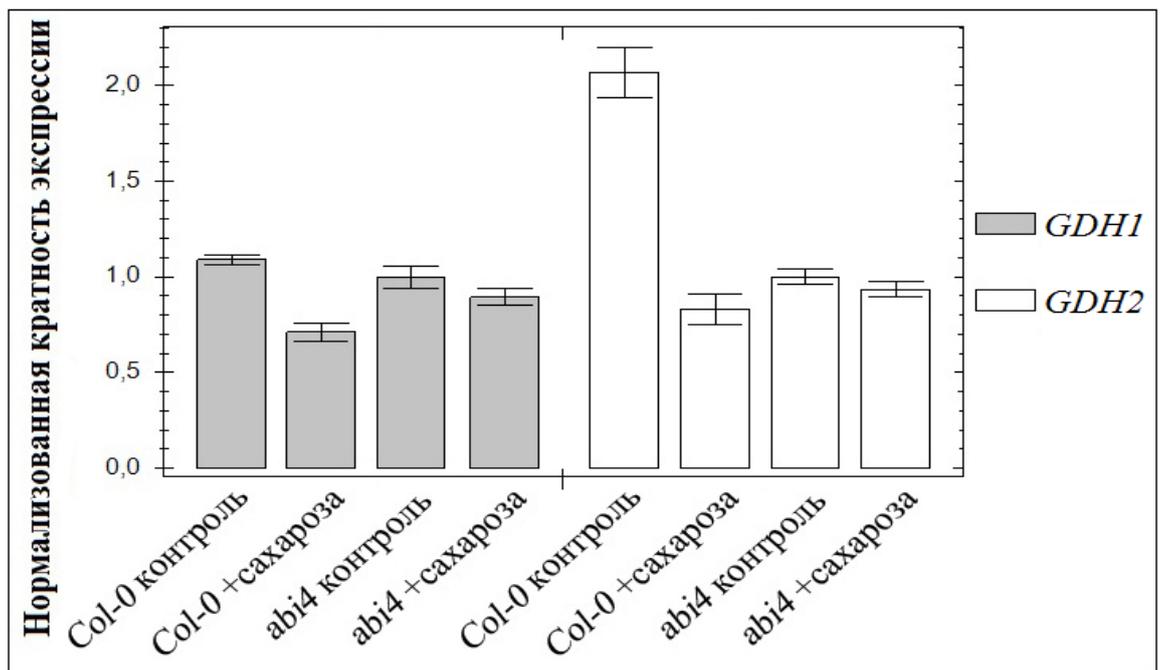


Рис. 15. Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* на свету в розетках 14-суточных растений линий *Col-0* и *abi4*, выдержанных 18 часов в темноте с последующей обработкой и экспонированием 30 минут на свету ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$).

Обозначения: Контроль – без обработки; сахароза – обработка листьев 3% раствором сахарозы.

Таким образом, у растений мутантной линии *abi4* сохранялась тенденция к многократному снижению уровня транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* при переносе растений из темноты на свет, но подобное снижение отсутствовало после обработки сахарозой. Из этого мы делаем вывод, что снижение экспрессии исследуемых генов на свету опосредуется более, чем одной причиной. Повышение уровня сахаров на свету – не единственная причина такого снижения. Сахаропосредованное снижение экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* не зависит от НХК1 и опосредуется транскрипционным фактором ABI4. При этом существует светозависимая регуляция экспрессии исследуемых генов, которая не опосредуется фактором ABI4 и не зависит от уровня сахаров в клетке.

Мы полагаем, что причиной светозависимой регуляции экспрессии исследуемых генов, не опосредуемой уровнем сахаров, являются хлоропластно-ядерные сигналы. В дальнейшей работе мы исследуем возможную роль наиболее известных хлоропластно-ядерных регуляторных путей: сигналов, возникающих при синтезе тетрапирролов, изменении редокс-состояния пула пластохинона тилакоидной мембраны, и активных форм кислорода, возникающих при работе фотосинтетической цепи.

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

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

Классическим примером пути передачи хлоропластно-ядерного сигнала являются сигналы, образующиеся при синтезе тетрапирролов, предшественников хлорофиллов а и b. Передача сигналов данного типа нарушена у т.н. *gun*-мутантов (*genome uncoupled*). Белок GUN1 представляет собой PPR-белок, другие гены группы *GUN* кодируют ферменты биосинтеза тетрапирролов: хлорофиллов а и b (*GUN4-5*) и гема (*GUN2-3*, *GUN6*) (Chi et al., 2013). Значение GUN-белков в передаче хлоропластно-ядерных сигналов удалось установить, выращивая растения арабидопсиса на средах, содержащих ингибитор фитоендесатуразы норфлюразон, что сопровождается фотодеструкци-

ей хлоропластов и значительным снижением экспрессии генов группы *LHCB*. *gun*-мутанты, выращенные на средах с добавлением норфлюоразона, продолжают экспрессировать гены *LHCB* на высоком уровне, что описано в литературе как *gun*-фенотип (Woodson, Chory, 2008). Данный раздел исследований посвящен изучению роли сигналов, возникающих при синтезе тетрапирролов, в регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*.

С целью подтверждения *gun*-фенотипа у двойного мутанта *gun1gun5*, любезно предоставленного нам Nobuyoshi Mochizuki, растения линий *Col-0* и *gun1gun5* выращивали в присутствии 5 мкМ норфлюоразона при освещенности 120 мкмоль*м⁻²*с⁻¹. Растения, выращенные в присутствии норфлюоразона, имели обесцвеченные семядольные листья и останавливались в развитии на 3-4 сутки после прорастания (рис. 16).

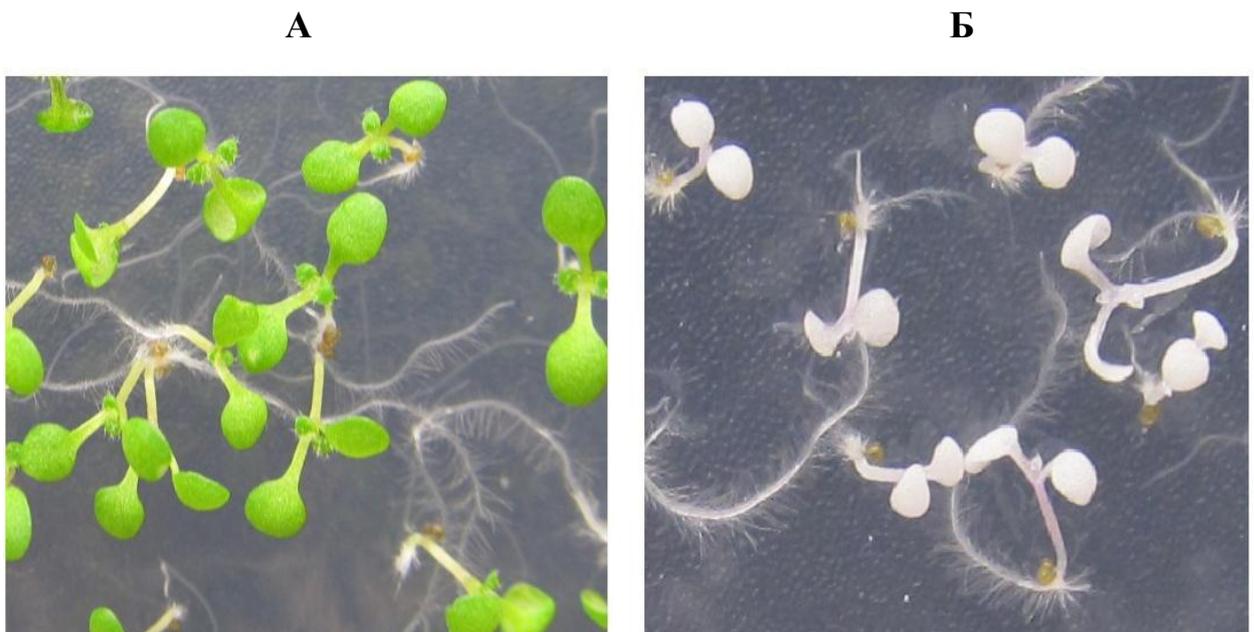


Рис. 16. Внешний вид 5-суточных проростков арабидопсиса, выращенных на среде с норфлюоразоном.

Обозначения: А – среда без добавок; Б – среда содержит 5 мкМ норфлюоразона.

На рисунке 17 отображен профиль экспрессии гена *LHCB1.2* у линии дикого типа и мутанта *gun1gun5* при выращивании растений на среде с добавлением норфлюоразона. При действии норфлюоразона экспрессия гена *LHCB1.2* у линии *Col-0* снижается относительно растений, выращенных на

среде без добавления норфлурозона, в 88 раз. Выращивание в присутствии норфлурозона растений *gun1gun5* снижает экспрессию гена *LHCB1.2* только в 5 раз (Рис. 17). Таким образом, снижение экспрессии гена *LHCB1.2* у мутанта *gun1gun5* значительно ослаблено (*gun*-фенотип).

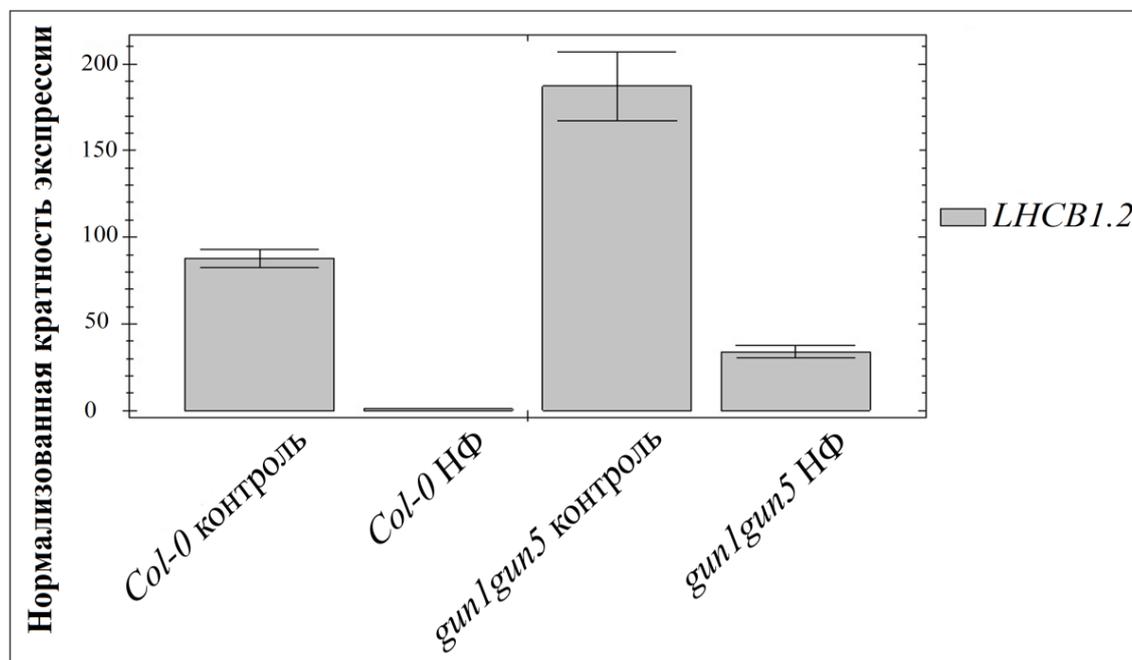


Рис. 17. Экспрессия гена *LHCB1.2* у растений линий *Col-0* и *gun1gun5* в присутствии норфлурозона.

Обозначения: Контроль – среда без добавок; НФ – среда содержала 5 мкМ норфлурозона. Освещенность в эксперименте – $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

С целью проверки гипотезы о возможном участии сигналов, возникающих при синтезе тетрапирролов, в регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*, использовали 14-суточные растения линии *gun1* и *gun1gun5*, выращенные при умеренной освещенности ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). Все растения до эксперимента выдерживали 18 часов в темноте, после чего часть растений переносили на свет ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) на 4 часа, остальные оставляли в темноте. Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* была выше в темноте и ниже на свету как у образцов линии *Col-0*, так и у мутантов *gun1* и *gun1gun5* (рис. 18). Характер изменений экспрессии исследуемых генов у растений обеих линий *gun*-мутантов на свету и в темноте не отличался от образцов линии дикого

типа. Таким образом, светозависимая регуляция экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* у растений линий *gun1* и *gun1 gun5* не изменена.

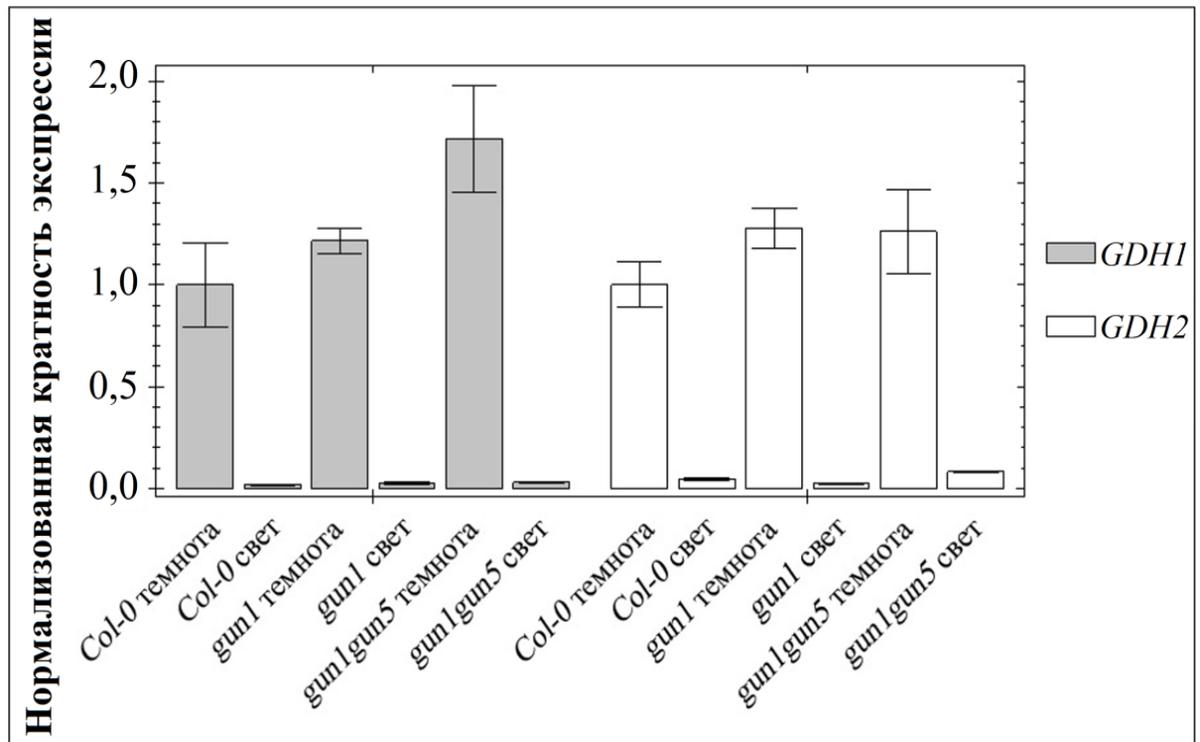


Рис. 18. Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* на свету и в темноте у растений линий *Col-0*, *gun1* и *gun1 gun5*.

Обозначения: Темнота – растения выдерживали 22 (18+4) часа в темноте; свет – растения выдерживали 4 часа при освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Физиологические последствия присутствия норфлуразона в растительной клетке зависят от сочетания его концентрации и уровня освещенности. При высокой и умеренной освещенности воздействие норфлуразона приводит к разрушению тилакоидов, что сопровождается сильным окислительным стрессом (Kim, Apel, 2013). Однако снижение освещенности до очень низкого уровня ($10 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) приводит к тому, что действие света, по-видимому, оказывает не настолько сильный повреждающий эффект (Saini et al., 2011). В следующей серии экспериментов мы применили как умеренный ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), так и очень низкий ($10 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) уровень освещенности. Это позволило оценить возможное

влияние окислительного стресса, который возникает из-за дисфункции хлоропластов, на экспрессию генов *GDH1* и *GDH2*.

На рисунке 19 показан результат экспериментов, в которых часть образцов линии *Col-0* выращивали на среде, содержащей 5 мкМ норфлюоразона при сниженной освещенности ($10 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) или 50 нМ норфлюоразона при умеренной освещенности ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) или без него при умеренной освещенности.

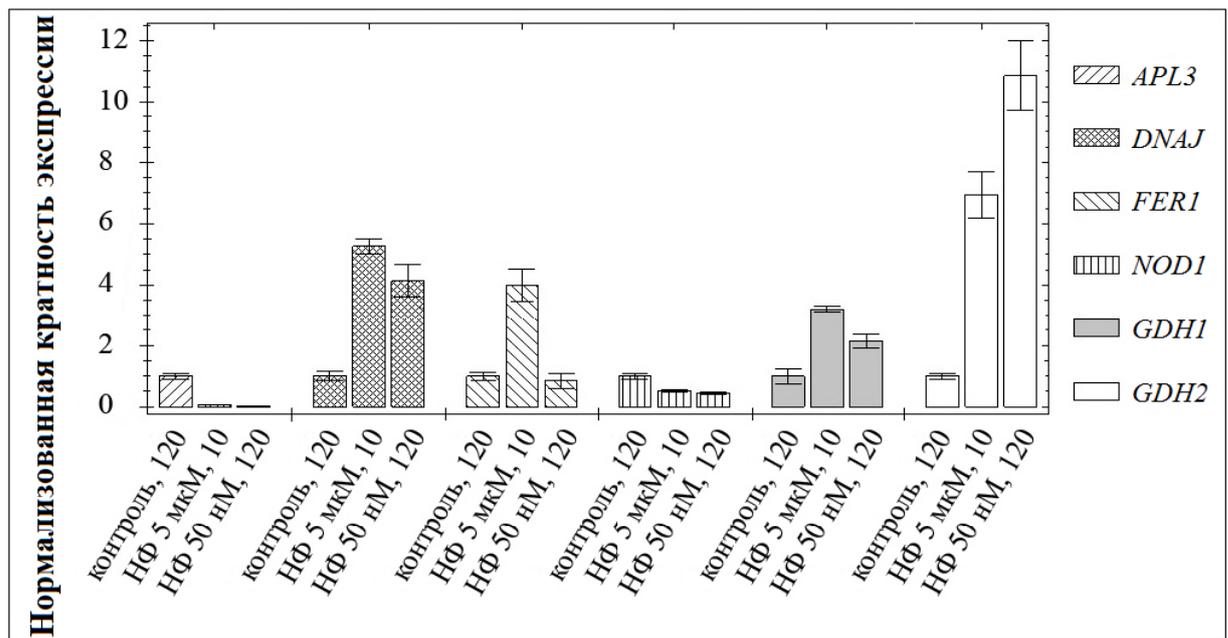


Рис. 19. Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* в семядольных листьях проростков линий *Col-0* на средах с добавлением норфлюоразона.

Обозначения: Контроль – растения выращивали на среде без добавок; НФ 5 мкМ – в среде присутствовало 5 мкМ норфлюоразона; НФ 50 нМ – в среде присутствовало 50 нМ норфлюоразона; освещенность в эксперименте: 10 – $10 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, 120 – $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. *APL3* – ген-маркер уровня сахаров, *DNAJ* – ген-маркер дисфункции хлоропластов, *FER1* – ген-маркер уровня H_2O_2 , *NOD1* – ген-маркер уровня $^1\text{O}_2$.

Уровень фотоповреждений оценивали через экспрессию генов *DNAJ* (маркер дисфункции хлоропластов), *FER1* (маркер повышения уровня перекиси водорода) и *NOD1* (маркер повышения уровня синглетного кислорода) (Van Aken, Whelan, 2012). Экспрессия гена *DNAJ* выше у образцов, выращенных в присутствии норфлюоразона, в 4-5 раз относительно контроля. Экс-

прессия гена *FER1* повышается в присутствии норфлюоразона при низкой освещенности. Экспрессия гена *NOD1* в присутствии норфлюоразона не меняется. Характер экспрессии маркеров окислительного стресса (*FER1* и *NOD1*) позволяет сделать вывод, что выращивание растений в присутствии норфлюоразона не сопровождалось повышением уровня синглетного кислорода. Уровень перекиси водорода, по-видимому, повышался только при освещенности $10 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ в присутствии норфлюоразона. Это может свидетельствовать о хлоропластном происхождении этой перекиси, поскольку при освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, когда хлоропласты повреждены в большей степени, перекись уже не продуцируется.

Уровень транскриптов гена *GDH2* в присутствии норфлюоразона возрастал в 6-8 раз при освещенности $10 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и в 9-11 раз при освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ по сравнению с контролем при $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Экспрессия гена *GDH1* была выше при выращивании растений на среде с добавлением норфлюоразона относительно контроля, выращенного на среде без добавления норфлюоразона, но разница была менее выражена по сравнению с экспрессией гена *GDH2*.

При отсутствии каротиноидов, умеренная освещенность вызывает разрушение тилакоидов хлоропластов и прекращение фотосинтеза, после чего происходит снижение уровня сахаров в клетке растения (Nott et al., 2006). Этим объясняется снижение уровня транскриптов гена *APL3* более чем в 30 раз у растений, выращенных на средах с норфлюоразоном. Кроме того, прекращается передача хлоропластно-ядерных сигналов, которые в норме обеспечивают ретроградную регуляцию экспрессии ядерных генов. Сопоставление изменений экспрессии генов *FER1* и *NOD1* с экспрессией исследуемых генов позволяет сделать вывод, что повышение уровня транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* в присутствии норфлюоразона, по-видимому, не зависит от уровня АФК (как перекиси водорода, так и синглетного кислорода).

Таким образом, при дисфункции хлоропластов происходит повышение экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*, которое может быть вызвано как сахарозависимыми, так и хлоропластно-ядерными сигналами. В данном случае к числу последних не относятся сигналы, передаваемые через АФК.

Для более тщательного изучения роли сахарозависимой регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* при функционально неактивных хлоропластах использовали 5-суточные растения линии *Col-0* и мутантной линии *gun1* (рис. 20).

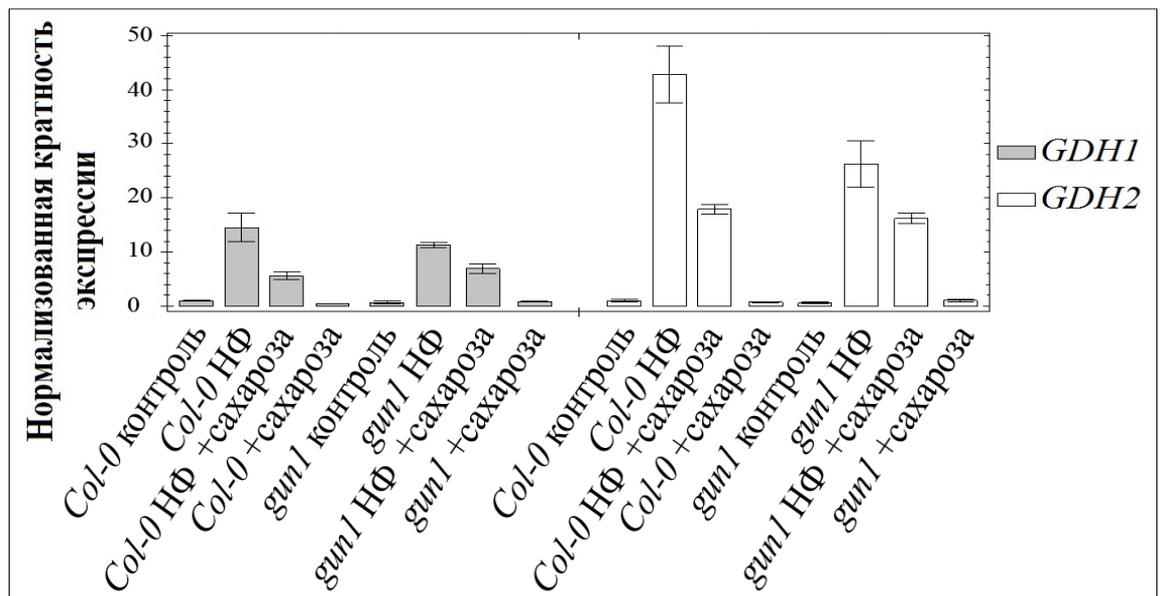


Рис. 20. Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* в листьях проростков линий *Col-0* и *gun1* в присутствии норфлюоразона и сахарозы на свету.

Обозначения: Контроль – растения, выращенные на среде без добавок; сахароза – в среде присутствует 2% сахарозы; HF – в среде присутствует 5 мкМ норфлюоразона. Освещенность в эксперименте – $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Часть образцов выращивали на средах с добавлением 5 мкМ норфлюоразона, 2 % сахарозы, 5 мкМ норфлюоразона + 2 % сахарозы, либо без добавок при освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Растения линии *Col-0*, выращенные на среде без норфлюоразона и без 2 % сахарозы при освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, служили контролем.

Выращивание в присутствии норфлуразона приводило к повышению экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* у линии *Col-0*, подобно тому, как это происходит в темноте (рис. 6 и 20). При одновременном присутствии норфлуразона и 2% сахарозы уровень экспрессии *GDH1* и *GDH2* у растений *Col-0* был несколько ниже, чем в растениях, выращенных на среде с норфлуразоном, но оставался значительно выше, чем у растений, выращенных на среде без добавок или на среде, содержащей сахарозу. Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* у растений линии *gun1* существенно не отличалась от экспрессии у линии дикого типа. Таким образом, отсутствие функционально активных хлоропластов отменяет снижение экспрессии исследуемых генов на свету. Это говорит о том, что светозависимая репрессия генов *GDH1* и *GDH2* с большой вероятностью опосредуется хлоропластно-ядерными сигналами (а не, например, фитохромами и криптохромами, сигнальная функция которых не требует наличия дифференцированных хлоропластов). Попытка компенсировать отсутствие фотосинтеза у растений, выращенных в присутствии норфлуразона, добавлением сахарозы в питательную среду не привела к репрессии исследуемых генов, сравнимой с их репрессией в контрольных условиях: если разница в уровне транскриптов в контроле и в присутствии норфлуразона составляла от 7-10 раз (рис. 19) до 40 раз (рис. 20), то добавление сахарозы в присутствии норфлуразона снижало экспрессию исследуемых генов максимум в 2 раза (рис. 20).

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

Помимо сигналов, связанных с синтезом тетрапирролов, к светозависимым хлоропластно-ядерным сигналам относят: продукты генов пластид, продукты катаболизма каротиноидов, сигналы, опосредуемые АФК и др. Особый интерес представляют редокс-сигналы, поскольку даже незначительные колебания в уровне освещенности вызывают изменения редокс-состояния компонентов хлЭТЦ.

Пул пластохинона – участок хлЭТЦ, чувствительный к изменениям условий освещения, является источником сигналов, которые влияют на экспрессию большого количества хлоропластных и ядерных генов (Feu et al., 2005). Изменения экспрессии соответствующих генов направлены на приспособление реакций фотосинтеза к условиям освещения.

С целью изучения роли редокс-состояния пула пластохинона в регуляции светозависимой экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* 14-суточные растения линии *Col-0* выдерживали 18 часов в темноте, после чего обработали розетки растворами ингибиторов фотосинтетического транспорта электронов DCMU или DBMIB. Концентрации DCMU и DBMIB были выбраны согласно данным литературы (Pfannschmidt et al., 2001). Затем один контрольный образец убирали в темноту на 4 часа, а 3 других образца (контроль на свету, и растения, обработанные ингибиторами DCMU и DBMIB) переносили на свет ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) на 4 часа. Схема эксперимента представлена на рис. 21.

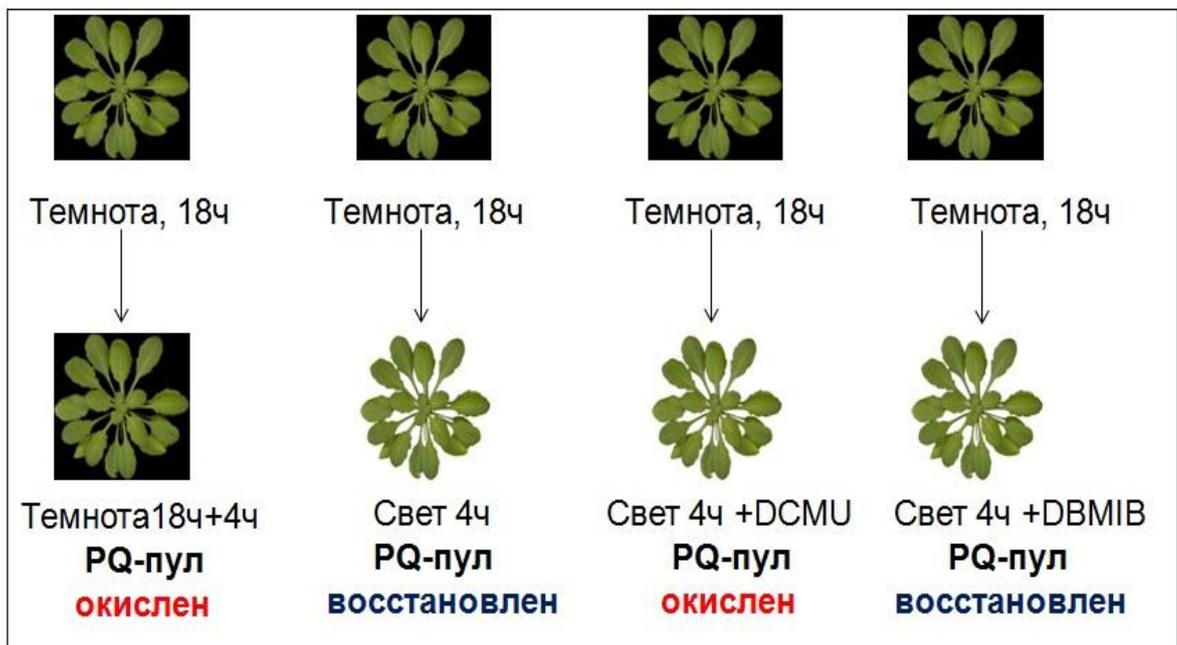


Рис. 21. Схема экспериментов по изучению влияния редокс-состояния пула пластохинона на экспрессию генов *GDH1* и *GDH2*.

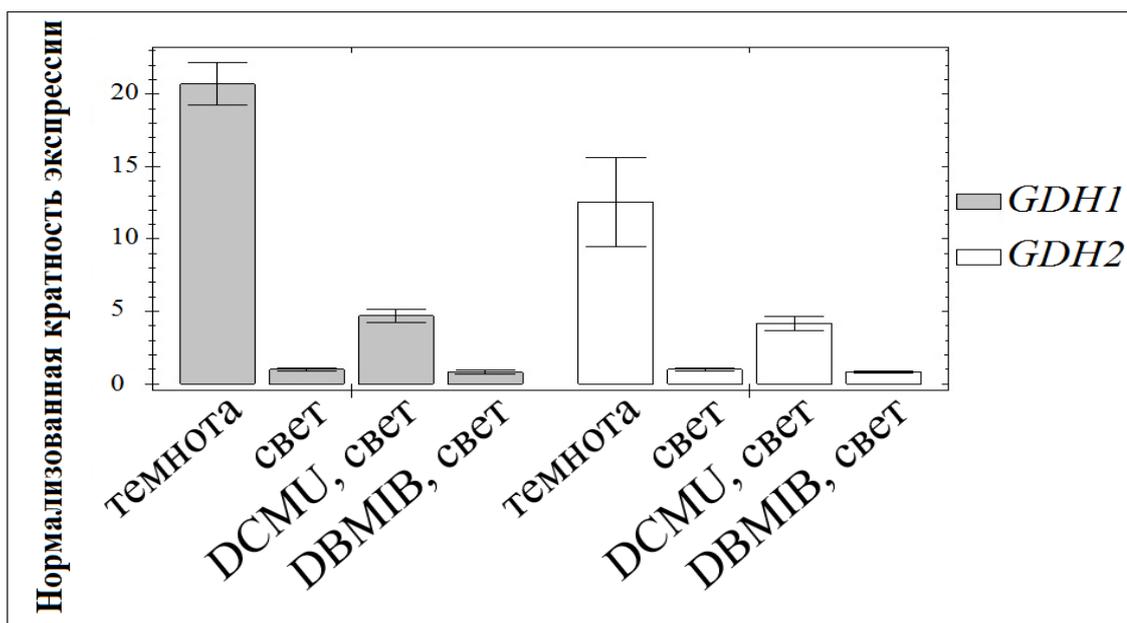
Обозначения: PQ-пул – пул пластохинона. DCMU – 3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметилмочевина (20 мМ). DBMIB – 2,5-дибромо-3-метил-6-изопропилбензохинон (20 мМ). Освещенность в эксперименте – $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

В темноте PQ-пул находится в окисленном состоянии, а на свету – в восстановленном (Pfannschmidt et al., 2001). При переносе растений линии *Ler* из темноты на свет уровень транскриптов генов *GDH1* снижался в 20 раз, а гена *GDH2* – в 12 раз, а у растений линии *Col-0* снижался в 30 раза (для гена *GDH1*) и 100 (для гена *GDH2*) (рис. 22).

При обработке растений ингибитором DCMU, пул пластохинона перестает восстанавливаться и переходит в окисленное состояние, как в темноте (несмотря на то, что растения экспонируются на свету). После обработки ингибитором DCMU экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* повышалась у растений линии *Ler* в 4 раза, а у растений линии *Col-0* в 4 раза (для гена *GDH1*) и 31 раз (для гена *GDH2*) по сравнению с контролем на свету, хотя и не достигала значений, характерных для растений в темноте. При обработке растений ингибитором DBMIB на свету, транспорт электронов по хлЭТЦ блокируется, как и при обработке DCMU, но состояние пластохинона остается восстановленным, как и в контроле на свету (рис. 22). Обработка ингибитором DBMIB не вызывала значительных изменений уровня транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* у линий *Ler* и *Col-0* относительно контроля на свету. Таким образом, уровень транскриптов исследуемых генов изменялся в соответствии с редокс-состоянием пула пластохинона: при окислении пула (в темноте и при обработке DCMU) – повышался, а при восстановлении пула (на свету) – снижался. Поскольку действие ингибиторов DCMU и DBMIB вызывает остановку переноса электронов в хлЭТЦ, это неизбежно приводит к прекращению поступления электронов к конечному акцептору – НАДФ⁺, который переходит в восстановленную форму – НАДФН. Молекулы НАДФН являются необходимым компонентом цикла Кальвина-Бэнсона, в котором происходит фиксация молекул CO₂.

Таким образом, обработка ингибиторами фотосинтеза приводит к снижению синтеза глюкозы. Следовательно, изменение экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* при обработке растений ингибиторами фотосинтеза может быть вызвано изменением уровня эндогенной глюкозы.

А



Б

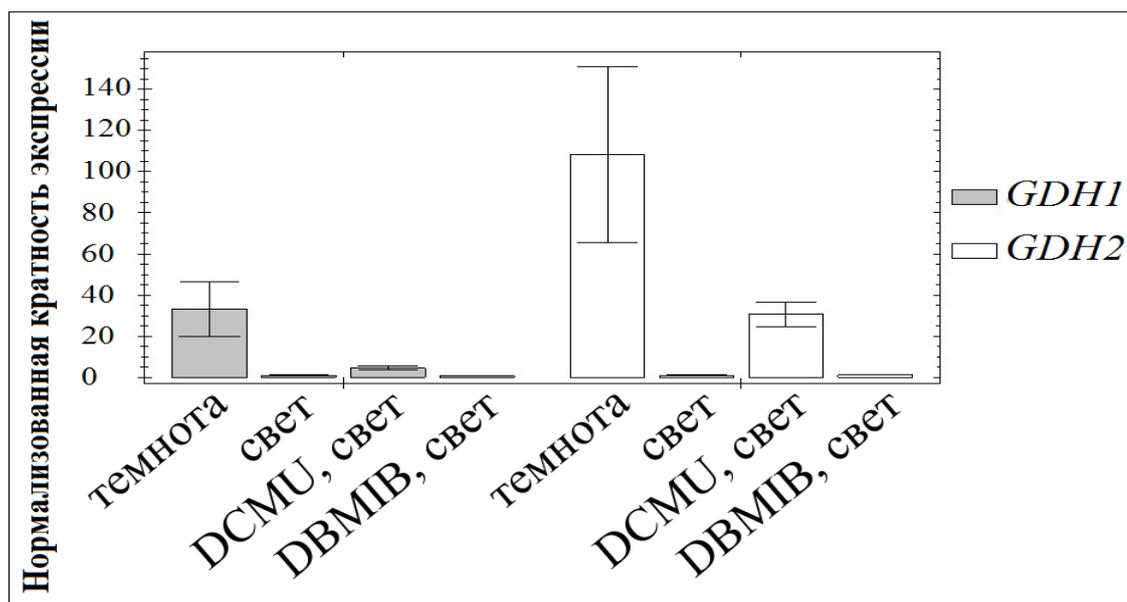


Рис. 22. Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* в розетках 14-суточных растений линий *Ler* (А) и *Col-0* (Б) при изменении редокс-состояния пула пластохинона.

Обозначения: DCMU – обработка растений 3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметилмочевиной (20 мкМ) с последующей 4-часовой экспозицией на свету; DBMIB – обработка растений 2,5-дибромо-3-метил-6-изопропилбензохиноном (20 мкМ) с последующей 4-часовой экспозицией на свету; темнота – растения выдерживали в темноте в течение 22 (18+4) часов; свет – растения выдерживали при освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ в течение 4 часов.

Оценка уровня глюкозы в условиях экспериментов с ингибиторами фотосинтеза показала, что уровень глюкозы снижается на свету как при обработке ингибитором DCMU, так и при обработке ингибитором DBMIB. Достоверных отличий по уровню глюкозы между растениями, обработанными DCMU и DBMIB, не обнаружили. Уровень глюкозы на свету в присутствии DBMIB не отличался от уровня глюкозы в темноте. Все три варианта (темнота, свет +DCMU, свет +DBMIB) достоверно отличались от уровня глюкозы в контроле на свету (рис. 23).

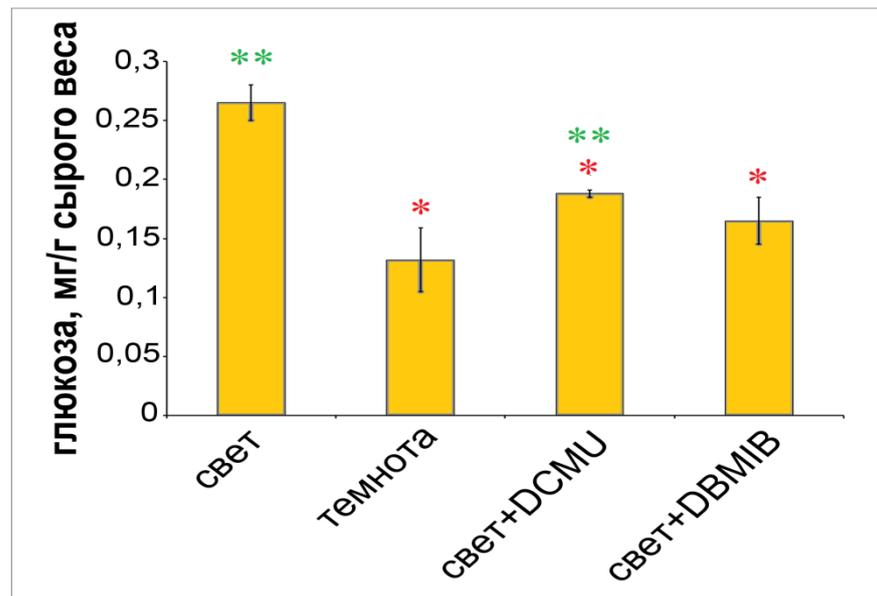


Рис. 23. Уровень глюкозы в листьях растений *Col-0*, обработанных ингибиторами DCMU и DBMIB.

Обозначения: Одинарной звездочкой (*) показаны достоверные отличия от контроля на свету ($p < 0,05$), двойной звездочкой (**) показаны достоверные отличия от контроля в темноте ($p < 0,05$). DCMU – 3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметилмочевина (20 мкМ), DBMIB – 2,5-дибромо-3-метил-6-изопропилбензохинон (20 мкМ). Темнота – растения выдерживали в темноте в течение 22 (18+4) часов; свет – растения выдерживали при освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ в течение 4 часов.

Уровень глюкозы на свету в присутствии DCMU, однако, достоверно отличался как от уровня глюкозы в темноте, так и от уровня на свету. Это может быть результатом неполного ингибирования транспорта электронов данным ингибитором. В таком случае это может объяснять, почему уровень

транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* не поднимался до уровня у контрольных растений в темноте.

Исходя из полученных данных, обработка ингибиторами DCMU и DBMIB приводит к снижению уровня глюкозы на свету (рис. 23). При этом экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* повышается только при обработке растений ингибитором DCMU и не изменяется при обработке ингибитором DBMIB (рис. 22). Из этого следует, что изменения экспрессии исследуемых генов в экспериментах с ингибиторами фотосинтеза не являются следствием снижения уровня глюкозы.

Поскольку глюкоза и фруктоза являются первыми гексозами, образующимися в результате фотосинтеза, и являются предшественниками в синтезе других сахаров, способных выполнять сигнальную функцию в регуляции экспрессии генов (трегалоза и сахароза), то мы полагаем, что изменения экспрессии исследуемых генов, которые мы наблюдали в экспериментах с ингибиторами фотосинтеза, не зависели от сахаропосредованных сигналов.

3.3.2.3. Уровень АФК в условиях экспериментов с ингибиторами фотосинтеза

Блокирование электрон-транспортных цепей почти неизбежно приводит к изменению уровня АФК в соответствующих органеллах, а затем и в клетке в целом. Однако в хлоропластах на свету источником АФК могут быть не только различные участки электрон-транспортной цепи, но и компоненты стромы (Иванов и др., 2013), поэтому трудно предсказать, как именно будет изменяться уровень общих клеточных АФК в конкретных условиях освещенности в присутствии ингибиторов. Чтобы выяснить, не были ли связаны изменения экспрессии исследуемых генов с уровнем АФК, мы провели оценку уровня АФК при обработке листьев арабидопсиса DCMU и DBMIB.

С целью оценки возможной роли АФК в изменении экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* под действием ингибиторов фотосинтеза листья 14-суточных растений арабидопсиса линии *Col-0*, выдерживали сутки в темноте до начала эксперимента, инфильтровали раствором НСТ с добавлением DCMU,

DBMIB, либо без ингибиторов фотосинтеза. Контрольные образцы экспонировали на свету при $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ либо в темноте до выпадения формазана в осадок (30-40 минут) в контроле на свету. Образцы, инфильтрованные DCMU или DBMIB, экспонировали на свету такое же время.

Количество выпавшего в осадок формазана (темно-синего цвета) пропорционально уровню супероксидного радикала в тканях листа. Как видно из рисунка 24, уровень супероксидного радикала был выше в образцах на свету, чем в темноте. Обработка ингибитором DCMU вызывала снижение уровня супероксидного радикала на свету. В присутствии DBMIB уровень супероксидного радикала существенно не отличался от его уровня в контроле на свету (рис. 24).

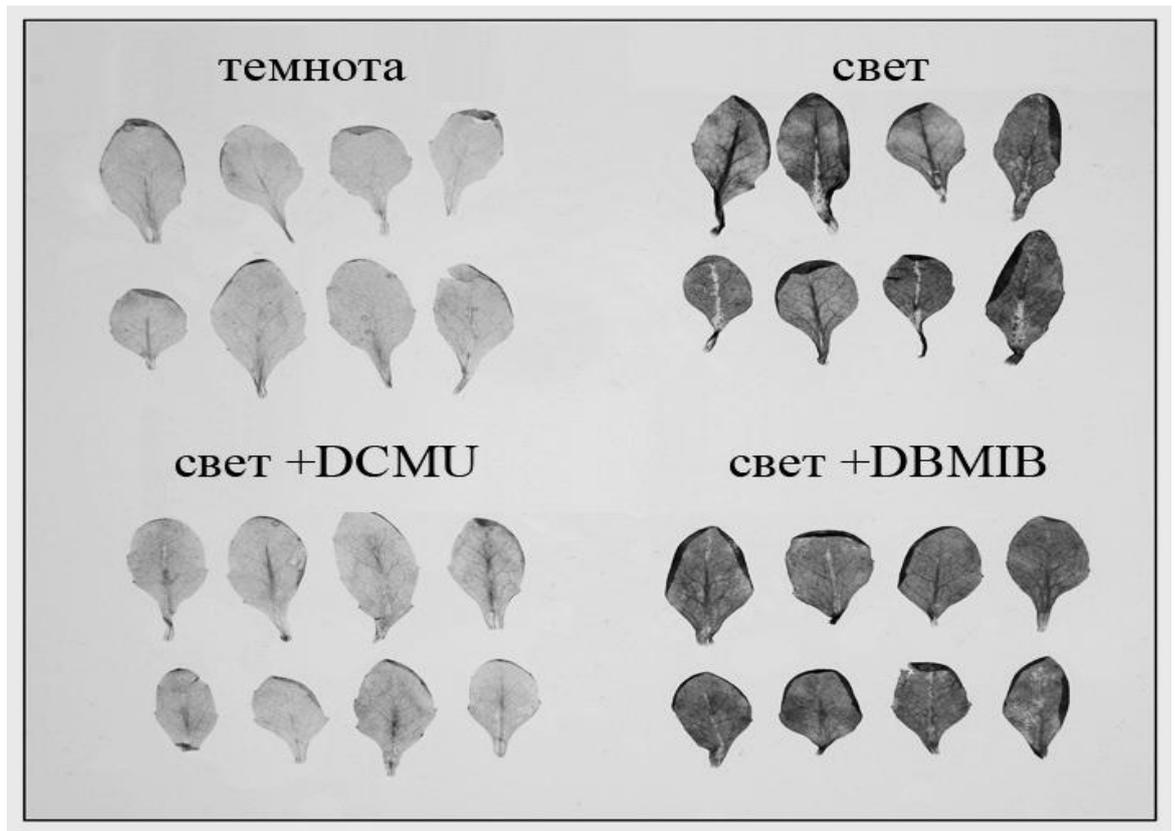


Рис. 24. Качественная оценка уровня супероксидного радикала в листьях растений *Col-0* в присутствии DCMU и DBMIB.

Обозначения: Темнота – растения выдерживали 18 часов в темноте; свет – растения выдерживали 40 минут на свету; свет+DCMU – растения выдерживали 40 минут на свету в присутствии (20 мкМ) DCMU; свет+DBMIB – растения выдерживали 40 минут на свету в присутствии (20 мкМ) DBMIB. Освещенность в эксперименте – $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Из полученных данных следует, что обработка ингибитором DCMU приводила к снижению уровня супероксидного радикала на свету до значений, близких к контролю в темноте (рис. 24), а обработка ингибитором DBMIB существенных отличий от контроля на свету не вызывала. При этом экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* повышается только при обработке растений ингибитором DCMU и не изменяется при обработке ингибитором DBMIB (рис. 22). Из этого следует, что изменения уровня экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* в экспериментах с ингибиторами фотосинтеза могут быть вызваны не только изменением редокс-состояния пула пластохинона, но и изменением уровня АФК в клетке.

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

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

АФК в клетке растения могут выполнять функцию сигнальных молекул и участвовать в регуляции экспрессии ядерных генов. Так, экспрессия генов *APX2*, *AOX1A*, *ZAT10* и *ZAT12* повышается при увеличении уровня эндогенной H_2O_2 (Suzuki et al., 2012). Окислительный стресс, вызванный повышением уровня АФК, способен индуцировать экспрессию генов белков теплового шока (*HSPA*, *DNAJ*). Генерация 1O_2 приводит к повышению экспрессии генов MAP-киназ (*MKK9*, *MPK17*) и биосинтеза гормонов этилена и жасмоната (*ATERF-2*, *CEJ1*, *LOX2*, *OPR1*, *AOC1*, *AOC*), а также снижает экспрессию генов, участвующих в росте и развитии растения (*EXPA8*, *EXPA11* и *XTH4*) (Nott et al., 2006; Barajas-Lopez et al., 2013). Поскольку обработка ингибиторами DCMU и DBMIB стимулирует генерацию АФК в электрон-транспортной цепи хлоропластов, следующим этапом наших исследований стало изучение вопроса о влиянии АФК в светозависимой регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*.

Использовали 14-суточные растения, выращенные вертикально на чашках Петри, которые выдерживали 18 часов в темноте, после чего обраба-

тывали перекисью водорода (10 мкМ) и экспонировали 2 часа и 4 часа на свету либо в темноте. Дополнительно оценивали экспрессию гена – нашего исследмаркера хлоропластной дисфункции *DNAJ* (Van Aken, Whelan, 2012).

Как показано на рис. 25, экспрессия гена *DNAJ* выше в образцах на свету относительно контроля в темноте в 8 раз. Обработка перекисью водорода на свету повышала экспрессию гена *DNAJ* в 2 раза по сравнению с контролем. Обработка перекисью водорода в темноте приводила к повышению экспрессии гена *DNAJ* в 8-11 раз относительно контроля. Наблюдали схожий уровень транскриптов гена-маркера *DNAJ* между контрольными проростками на свету и обработанных перекисью водорода в темноте. Генерация АФК на свету – неизбежное явление, возникающее вследствие потока электронов по хлЭТЦ (Иванов и др., 2013).

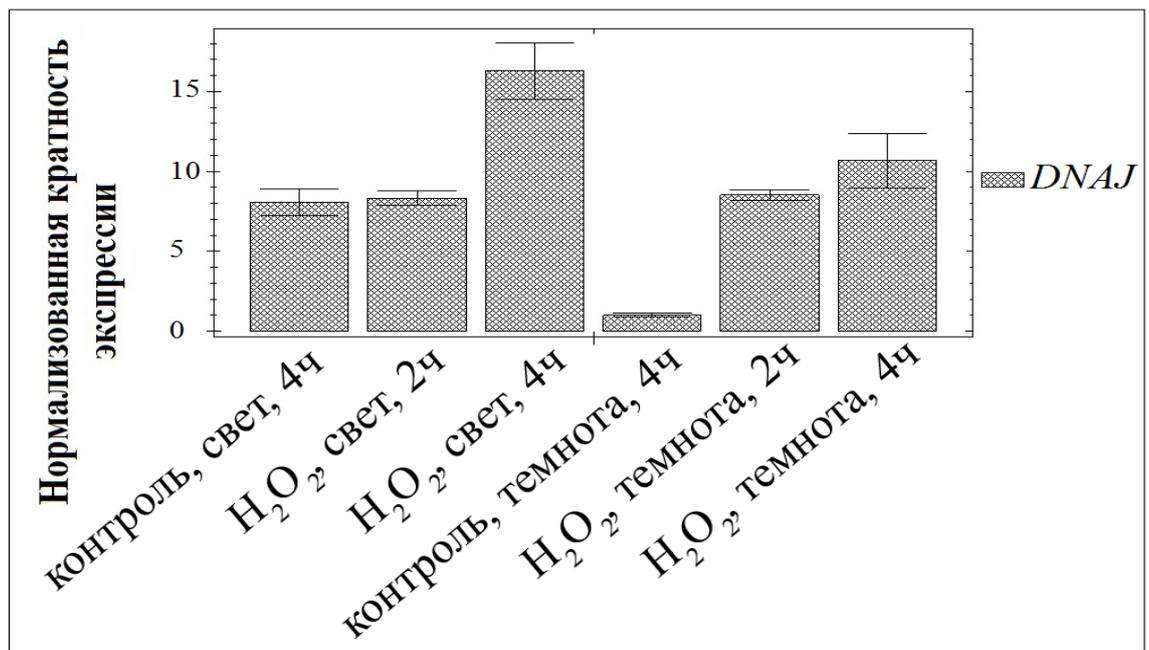


Рис. 25. Экспрессия гена *DNAJ* в 14-суточных розетках линии *Col-0* после обработки корней растений 10 мМ перекисью водорода.

Обозначения: Контроль – без обработки; H₂O₂ – листья опрысканы 10 мМ раствором перекиси водорода; темнота – экспозиция в темноте; свет – экспозиция на свету. Освещенность в эксперименте составляла 120 мкмоль*м⁻²с⁻¹.

Экспрессия гена *GDH2* повышалась в 5-6 раз в образцах, обработанных перекисью водорода на свету (рис. 26, А). В темноте экспрессия гена *GDH2*

повышалась при обработке растений перекисью водорода в 2-2,5 раза (ген *GDH2*) относительно контроля (рис. 26, Б). Достоверных изменений в уровне транскриптов гена *GDH1* не наблюдали.

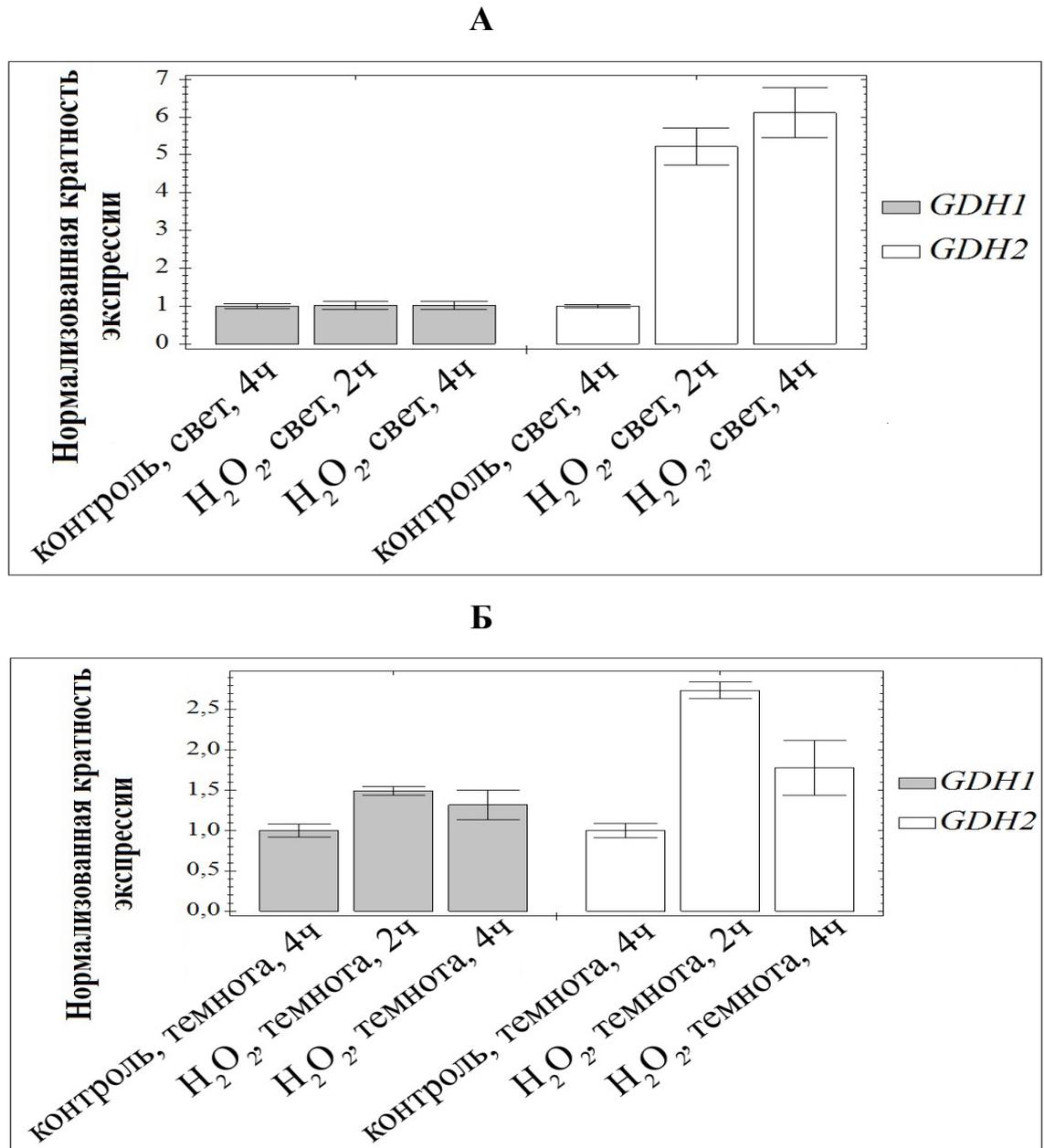


Рис. 26. Экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* у 14-суточных растений линии *Col-0* на свету (А) и в темноте (Б) после обработки листьев 10 мМ перекисью водорода.

Обозначения: Контроль – без обработки; H_2O_2 – листья опрысканы 10 мМ раствором перекиси водорода; темнота – экспозиция в темноте; свет – экспозиция на свету. Освещенность в эксперименте составляла $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Таким образом, действие экзогенной перекиси водорода вызывает повышение экспрессии гена *GDH2* как на свету, так и в темноте. Для гена *GDH1* такой закономерности не наблюдали.

В следующей серии экспериментов изучали действие избыточной освещенности на экспрессию исследуемых генов. Растения арабидопсиса дикого типа выдерживали в течение 10 минут при освещенности $920 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Контрольные растения находились при стандартных условиях освещенности ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). Для оценки уровня АФК использовали ген *NOD1*, экспрессия которого индуцируется при повышении уровня синглетного кислорода (рис. 27) (Shaini et al., 2011).

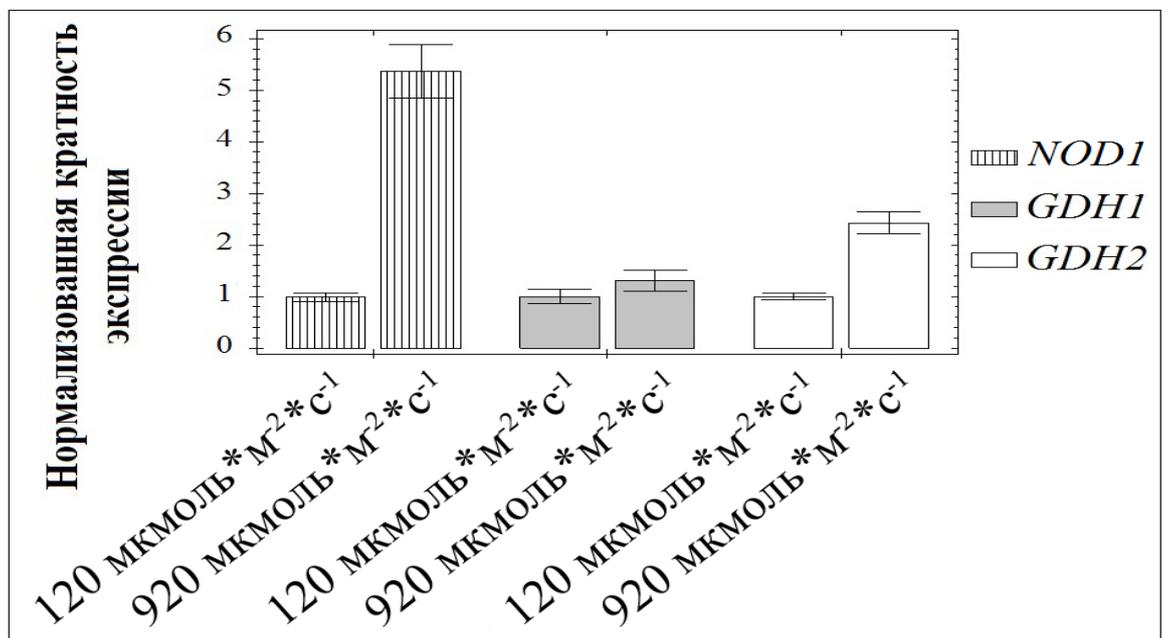


Рис. 27. Экспрессия генов *NOD1*, *GDH1* и *GDH2* в 14-суточных розетках растений линий *Col-0* при повышенной освещенности ($920 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) в течение 10 минут.

Обозначения: *nod1* – ген-маркер уровня синглетного кислорода. $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, $920 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ – уровень освещенности.

В растениях, выдержанных 10 минут при освещенности $920 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, наблюдали повышение экспрессии гена *NOD1* в 5,5 раз, что указывает на то, что использованного времени было достаточно для повышения уровня АФК и формирования транскрипционного ответа клеток (рис. 27). Экспрес-

сия гена *GDH2* повышалась в 2,5 раза в растениях, выдержанных при освещенности $920 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. При тех же условиях достоверных изменений уровня транскриптов гена *GDH1* не происходило.

Согласно исследованиям, проведенным Eddy с коллегами, освещенность выше $300 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ является для арабидопсиса избыточной (Eddy et al., 2008). В наших экспериментах экспрессия гена *GDH2* повышается в образцах, экспонированных в условиях избыточной освещенности. По-видимому, причиной этого повышения была генерация АФК, поскольку обработка перекисью водорода также приводила к повышению уровня транскриптов гена *GDH2*. Интересно, что ни при обработке растений перекисью водорода, ни в условиях избыточной освещенности, повышение экспрессии гена *GDH1* не наблюдали. В экспериментах по изучению сахарозависимой регуляции экспрессии исследуемых генов мы также наблюдали слабые изменения или отсутствие изменений экспрессии гена *GDH1* в тех условиях, когда экспрессия гена *GDH2* изменялась значительно (рис. 9 и 12). По-видимому, экспрессия гена *GDH1* в меньшей степени подвергается регуляции, чем *GDH2*.

Поскольку, согласно нашим данным, повышение уровня АФК вызывает повышение экспрессии гена *GDH2*, оно не может быть причиной снижения экспрессии этого гена на свету. Следовательно, изменения экспрессии исследуемых генов в экспериментах с ингибиторами фотосинтеза (рис. 22, 24) действительно были вызваны изменением редокс-состояния пула пластохинона, а не уровня АФК.

3.3.2.5. Особенности регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* у мутанта *ch1-1*

Мутант арабидопсиса *chlorinal* (*ch1-1*) имеет дефект гена хлорофилл а оксигеназы (*AtIG44446*), вследствие чего растения *ch1-1* полностью лишены хлорофилла b (Sakuraba et al., 2007). Растения линии *ch1-1* имеют делецию размером 31 п.н. в 8 экзоне, что приводит к сдвигу рамки считывания и образованию укороченного нефункционального продукта, содержащего 415 ами-

нокислотных остатков (у линии дикого типа – 536 аминокислотных остатков) (Oster et al., 2000).

Для улавливания энергии света фотосинтезирующие организмы используют светособирающие антенны, которые состоят из комплекса белков и хлорофиллов а и b, т.н. *light-harvesting chlorophyll a and b-protein complexes* (ЛНС), а также каротиноидов. Изменение размера антенны светособирающего комплекса происходит вследствие изменения количества комплексов ЛНС на фотосистему (Sakuraba et al., 2007). Так, размер антенны ФС II зависит от количества ЛНС, ассоциированных с ФС II (ЛНСII). Размер антенны ЛНСII намного ниже у мутантов, накапливающих меньшее количество хлорофилла b (Yamasato et al., 2005). Таким образом, у мутантов линии *chl-1* не происходит естественный синтез хлорофилла b, и растения имеют уменьшенный размер ФС II. Мутант характеризуется замедленным ростом и развитием по сравнению с растениями линии дикого типа.

Можно предположить, что вследствие уменьшенного размера антенны светособирающего комплекса ФС II у растений линии *chl-1* пул пластохинона имеет более окисленное состояние, чем у растений дикого типа в условиях низкой и умеренной освещенности. Если наша гипотеза о ведущей роли редокс-состояния пула пластохинона в светозависимой регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* верна, то можно ожидать, что в одних и тех же условиях освещенности у растений линии *chl-1* уровень экспрессии исследуемых генов будет выше.

14-суточные растения линий *Col-0* и *chl-1*, выращенные горизонтально на чашках Петри при освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, адаптировали к условиям пониженной освещенности (2, 20, 35 и $80 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) в течение двух суток, затем выделяли РНК (после 4 часов непрерывного освещения) и оценивали уровень экспрессии гена *GDH2*. Как у растений линии дикого типа, так и у линии *chl-1* экспрессия гена *GDH2* снижалась при увеличении уровня освещенности (рис. 28).

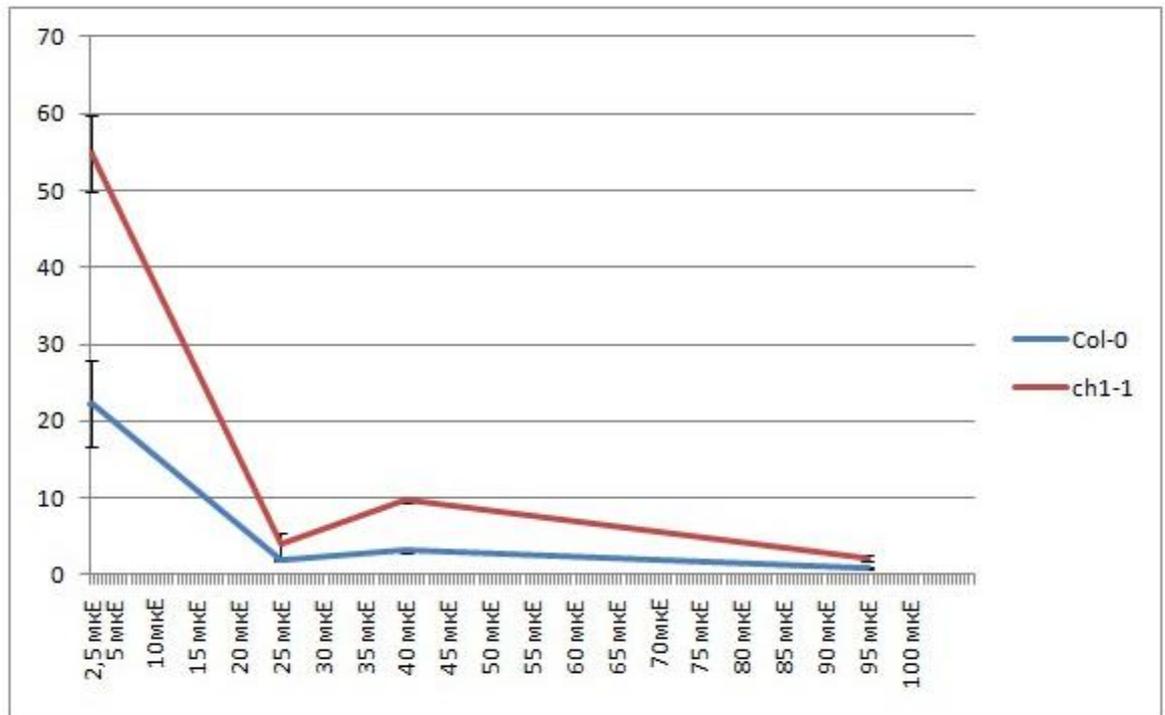


Рис. 28. Уровень экспрессии гена *GDH2* в 14-суточных листьях растений линий *Col-0* и *ch1-1* при разной освещенности.

Уровень транскриптов гена *GDH2* проявлял наибольшую чувствительность при низкой освещенности для обеих линий: отмечали быстрое снижение уровня транскриптов гена *GDH2* при переходе от освещенности 2 к 20 мкмоль*м⁻²с⁻¹. При всех значениях освещенности экспрессия гена *GDH2* была выше у растений линии *ch1-1*. Максимальные различия наблюдали при низких значениях (2 и 20 мкмоль*м⁻²с⁻¹), при повышении освещенности разница между линиями снижалась.

Таким образом, мутант *ch1-1* имеет повышенную экспрессию гена *GDH2*, что может быть связано с более окисленным состоянием пула пластохинона вследствие уменьшения размера светособирающего комплекса ФС II.

В экспериментах с ингибиторами фотосинтеза экспрессия гена *GDH2* у растений дикого типа *Col-0* понижалась на свету (в 120 раз) относительно растений в темноте, а при обработке ингибитором DCMU повышалась (в 12 раз) относительно контроля на свету (рис. 29).

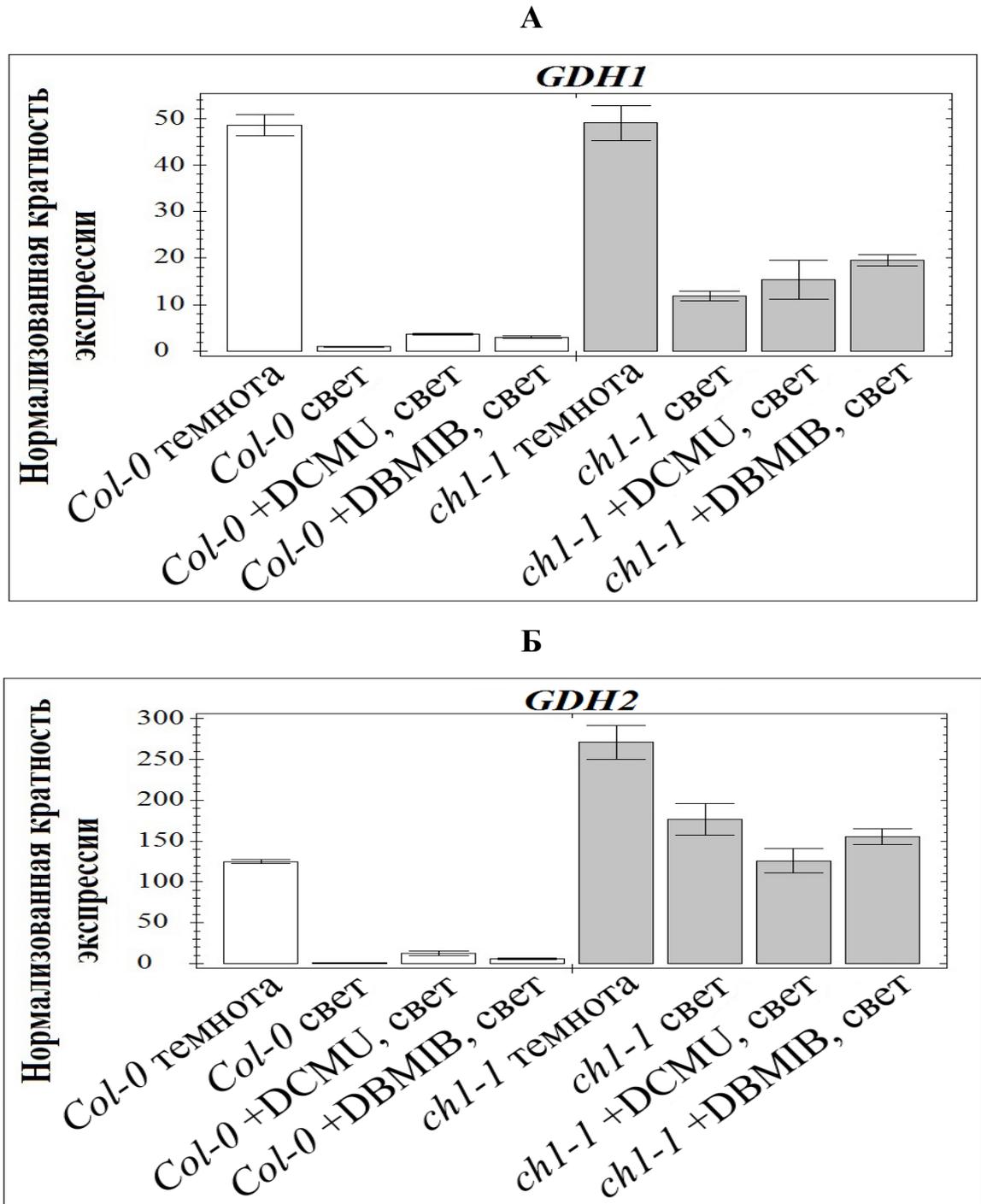


Рис. 29. Экспрессия генов *GDH1* (А) и *GDH2* (Б) в розетках 14-суточных растений линий *Col-0* и *ch1-1* при изменении редокс-состояния пула пластохинона.

Обозначения: DCMU – 3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметилмочевина (20 мкМ), DBMIB – 2,5-дибромо-3-метил-6-изопропилбензохинон (20 мкМ). Темнота – растения экспонировали в темноте в течение 22 (18+4) часов; свет – растения экспонировали при освещенности $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ в течение 4 часов.

Для гена *GDH1* наблюдали те же тенденции, но менее выраженные. У растений линии *chl-1* разница между экспрессией гена *GDH2* на свету и в темноте была менее выражена, чем для линии дикого типа. Для растений *chl-1* не наблюдали достоверных изменений экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* в присутствии ингибиторов фотосинтеза DCMU и DBMIB: уровень транскриптов оставался таким же, как в контроле на свету.

Мы полагаем, что причиной сильно сглаженного профиля экспрессии исследуемых генов у растений *chl-1* в экспериментах с ингибиторами фотосинтеза является уменьшенный размер антенны светособирающего комплекса ФС II и, как следствие, более окисленное состояние пула пластохинона. В контроле на свету при использованном уровне освещенности пул пластохинона у растений *chl-1* более окислен, чем у растений дикого типа. Поэтому блокирование потока электронов от ФС II (применение DCMU) не приводит к существенным изменениям его редокс-состояния, тогда как у растений дикого типа обработка DCMU переводит пул пластохинона из восстановленного состояния в окисленное.

Таким образом, эксперименты с мутантом *chl-1* подтверждают нашу гипотезу о ключевой роли редокс-состояния пула пластохинона в светозависимой регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*.

3.3.2.6. Светозависимая регуляция генов *GDH1* и *GDH2* и ее возможное физиологическое значение

В результате проведенных исследований светозависимой регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*, установлено участие хлоропластно-ядерных сигналов, возникающих при изменении редокс-состояния пула пластохинона хлоропластов. Данный тип сигналов не зависит ни от сахарозависимой регуляции, ни от сигналов, передаваемых через АФК.

Таким образом, впервые показано, что светозависимая регуляция экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* опосредуется редокс-состоянием пула пластохинона.

Причиной светозависимой регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*, по-видимому, является использование клеткой молекул L-глутаминовой кислоты (L-глутамата), которая является субстратом для GDH. L-глутамат занимает центральное место в метаболизме аминокислот у растений: служит источником аминогруппы для переноса на другие аминокислоты под действием различных аминотрансфераз. Концентрация этого соединения в клетке играет важную роль в адаптации растений к условиям внешней среды за счет участия в тонкой регуляции метаболизма азота и углерода. Данная аминокислота синтезируется в больших количествах в корнях и транспортируется по ксилеме в листья.

В свете настоящей работы особенно важно, что с молекулы L-глутамата начинается длительный путь биосинтеза хлорофиллов, а также гемовых групп цитохромов, которые необходимы для фотосинтеза (Nott et al., 2006).

Также глутамат принимает участие в синтезе глутатиона, компонента антиоксидантной защиты – это способствует приспособлению растений к условиям освещения и предотвращает их от губительного действия АФК на свету (Kopriva, Rennenberg, 2004). Из этого следует, что в присутствии света в метаболизме растений может происходить конкуренция за субстрат между несколькими ферментами (рис. 30).

Когда растение находится в темноте, идут процессы дезаминирования молекул L-глутамата и образование 2-оксоглутаровой кислоты, которая участвует в цикле Кребса и, как следствие, поддерживается рост и развитие меристем, в которых локализуется GDH (Fontaine et al., 2013).

Если на растение падает свет, экспрессия генов *GDH1* и *GDH2* снижается, и молекулы L-глутамата могут использоваться для адаптации к условиям освещенности: биосинтеза фотосинтетических пигментов и, по необходимости, для синтеза глутатиона (рис. 30).

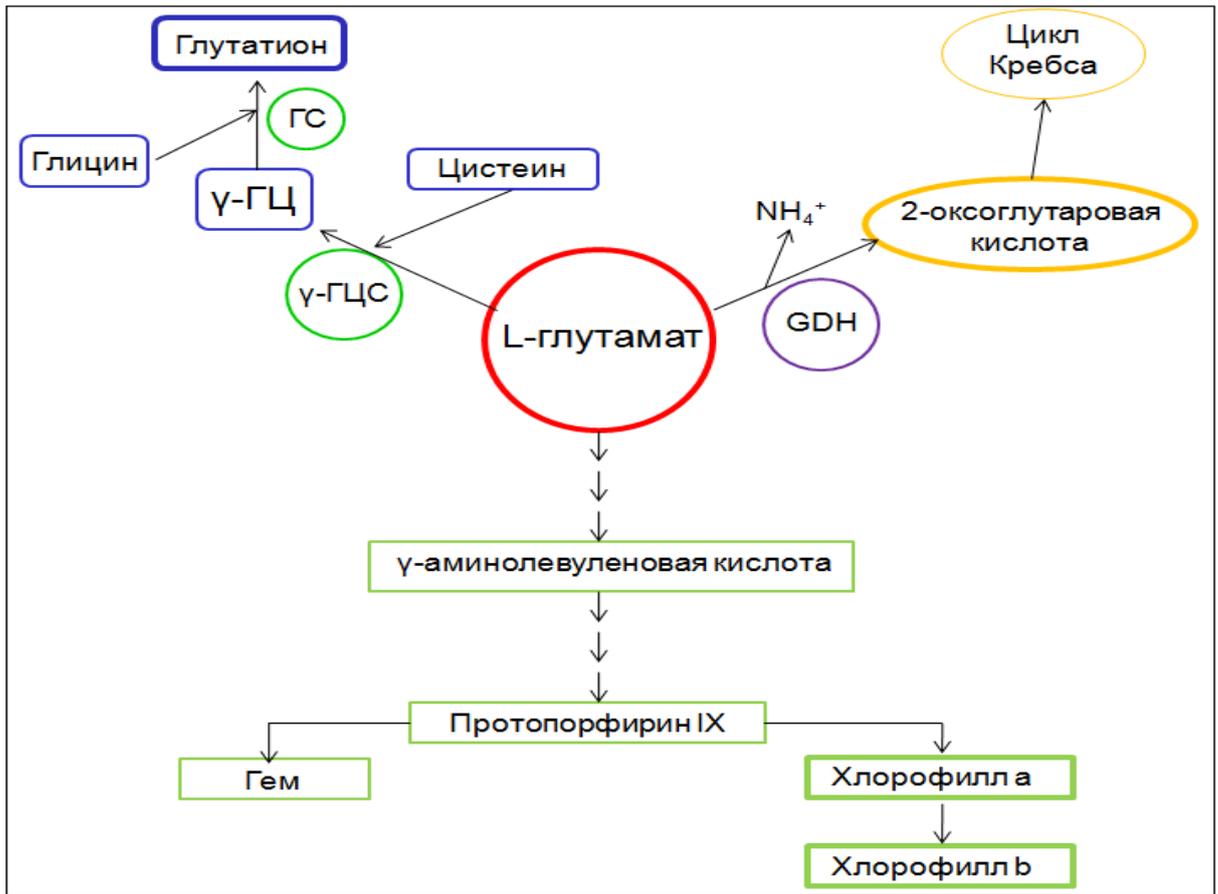


Рис. 30. Схематическое изображение реакций с участием L-глутамата в метаболизме растений.

Обозначения: γ -ГЦС – γ -глутамилцистеинсинтаза, γ -ГЦ – γ -глутамилцистеин, ГС – глутатионсинтаза, GDH – глутаматдегидрогеназа.

Таким образом, GDH, как один из ферментов, использующий L-глутамат, косвенно участвует в приспособлении метаболизма растений к смене освещенности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы получены принципиально новые данные о характере регуляции экспрессии ядерных генов *GDH1* и *GDH2*, кодирующих НАД(Н)-зависимую глутаматдегидрогеназу. Ранее было высказано предположение, что светозависимые изменения экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* обусловлены действием сигналов, которые зависят от доступности углерода в виде углеводов, уровень которых выше на свету, чем в темноте возникающих при изменении уровня сахаров в клетке растений (Miyashita, Good, 2008). В рамках данной работы предпринята попытка определить ключевые компоненты молекулярного механизма сахарозависимой регуляции генов *GDH1* и *GDH2*. Исследовали возможное участие НХК1, как наиболее изученного посредника передачи глюкозозависимых сигналов, и транскрипционного фактора ABI4, координирующего множество различных сигнальных путей в растительной клетке, в том числе разнообразные сахарозависимые сигналы. На основании полученных данных установлено, что НХК1 не причастна к регуляции экспрессии гена *GDH2*, а транскрипционный фактор ABI4 участвует в передаче сахарозависимого сигнала, приводящего к репрессии гена *GDH2*.

Выращивание растений арабидопсиса на средах, содержащих норфлурозон (ингибитор фитоендесатуразы), приводит к обесцвечиванию проростков вследствие фотодеструкции хлоропластов. У этой группы растений нарушалась хлоропластно-ядерная координация экспрессии генов. В представленной работе впервые описано изменение экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* в присутствии норфлурозона: установлено, что добавление норфлурозона в среду для выращивания приводит к повышению уровня транскриптов генов *GDH1* и *GDH2*. Следовательно, для светозависимого снижения экспрессии генов *GDH1* и *GDH2* растениям необходимы функционально активные хлоропласты, что указывает на участие ретроградных сигналов. Полученные данные позволяют предположить, что причиной светозависимых изменений экспрессии исследуемых генов не являются передаваемые через

криптохромы и фитохромы сигналы, локализованные вне хлоропластов. Использование мутантов *gun1* и *gun1gun5* позволило установить, что сигналы, возникающие при синтезе тетрапирролов в хлоропластах, не являются причиной светозависимой регуляции экспрессии исследуемых генов.

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

Поскольку при переходе «темнота-свет» в растительной клетке неизбежно повышается уровень АФК, мы также исследовали возможное участие АФК в светозависимой регуляции экспрессии генов глутаматдегидрогеназы. Для этого мы обрабатывали растения арабидопсиса линии дикого типа раствором перекиси водорода (10 мкМ), либо экспонировали 15 минут при избыточной освещенности ($920 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). Экспрессия гена *GDH2* повышалась при обработке перекисью водорода на свету и в темноте, а также при экспонировании в условиях избыточной освещенности. Экспрессия гена *GDH1* существенно не изменялась. По-видимому, экспрессия гена *GDH1* в меньшей степени подвергается регуляции, чем *GDH2*. Таким образом, сигналы, образующиеся при обработке растений перекисью водорода, либо в условиях избыточной освещенности, приводят к повышению экспрессии гена *GDH2*.

Нами показано, что обработка листьев ингибитором DBMIB на свету приводит к повышению, а DCMU – к понижению уровня супероксидного

радикала в листьях арабидопсиса. Поскольку, согласно нашим данным, повышение уровня АФК вызывает повышение экспрессии гена *GDH2* (на свету и в темноте), оно не может служить причиной снижения экспрессии этого гена на свету. Следовательно, изменения экспрессии исследуемых генов в экспериментах с ингибиторами фотосинтеза (рис. 22, 24) действительно были вызваны изменением редокс-состояния пула пластохинона, а не уровня АФК.

Полученные результаты можно суммировать и представить в виде схемы (рис. 31).

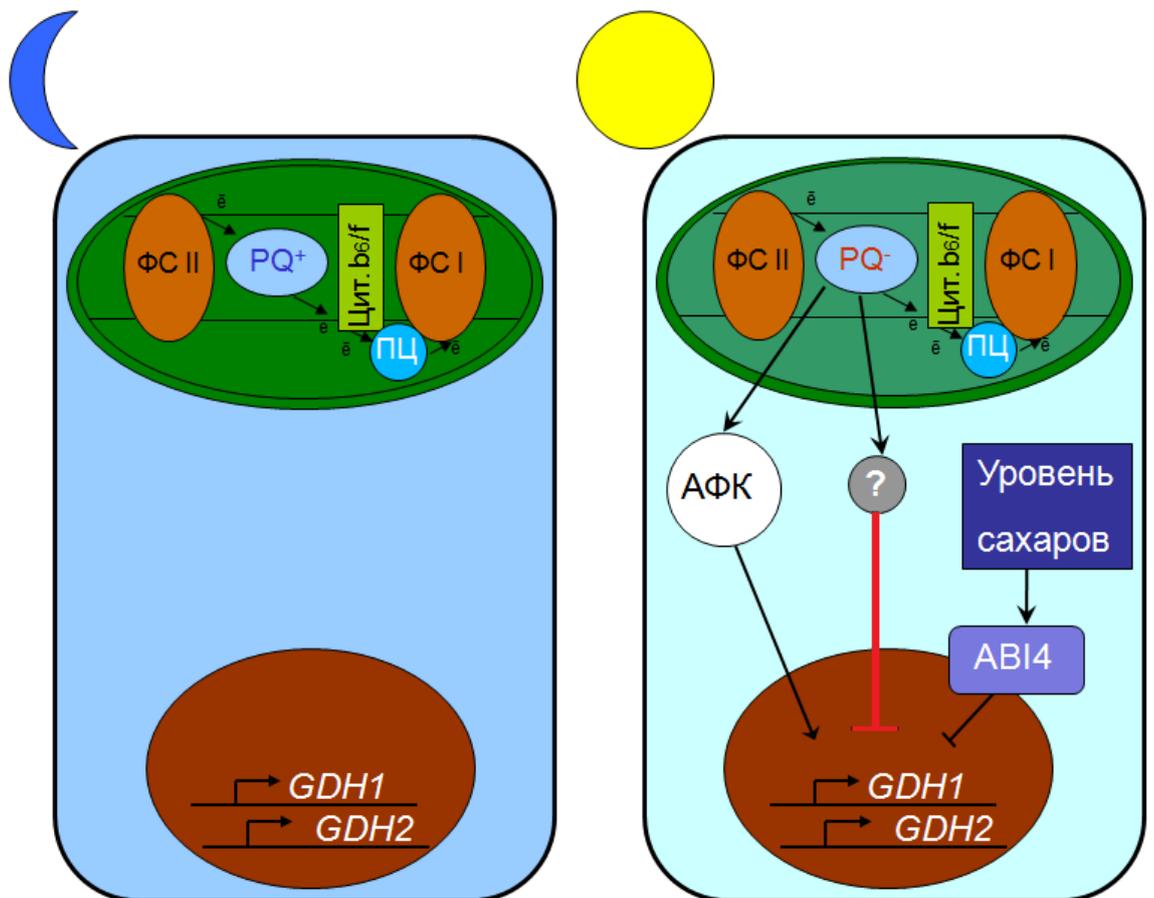


Рис. 31. Схема светозависимой хлоропластно-ядерной регуляции экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*.

Обозначения: ФС I – фотосистема 1. ФС II – фотосистема 2. PQ^+ – пул пластохинона в окисленном состоянии. PQ^- – пул пластохинона в восстановленном состоянии. ABI4 – транскрипционный фактор. АФК – активные формы кислорода. ПЦ – пластоцианин. Цит. b_6/f – комплекс цитохромов.

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

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

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

ВЫВОДЫ

На основании результатов проведенных исследований сделаны следующие выводы:

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

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

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

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

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванов, Б.Н. Роль кислорода и его активных форм в фотосинтезе // Б.Н. Иванов, С.А. Хоробрых, М.А. Козулева, М.М. Борисова-Мубаракшина / Фотосинтез: открытые вопросы и что мы знаем сегодня: сб. науч. ст. – Институт компьютерных исследований Москва-Ижевск. – 2013. – С. 243-298.
2. Креславский, В.Д. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // В.Д. Креславский, Д.А. Лось, С.И. Аллахвердиев, В.В. Кузнецов / Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 2. – С. 163-178.
3. Тарасенко, В.И. Интенсивность альтернативного пути транспорта электронов в митохондриях арабидопсиса влияет на экспрессию гена глутаматдегидрогеназы *gdh2* // В.И. Тарасенко, Е.Ю. Гарник, Ю.М. Константинов / Доклады академии наук. - 2013. - Т. 452, № 1. - С. 106–109.
4. Acevedo-Hernandez, G.J. Sugar and ABA responsiveness of a minimal RBCS light-responsive unit is mediated by direct binding of ABI4 / G.J. Acevedo-Hernandez, P. Leon, L. Herrera-Estrella // The Plant Journal. – 2005. – V. 43. – P. 506-519.
5. Ando, E. Twin Sister of FT, *gigantea*, and *constans* have a positive but indirect effect on blue light-induced stomatal opening in *Arabidopsis* / E. Ando, M. Ohnishi, Y. Wang et al. // Plant Physiology. – 2013. – V.162. – P. 1529-1538.
6. Apel, K. Reactive Oxygen Species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction / K. Apel, H. Hirt // Annual Review of Plant Biology. – 2004. – V. 55. – P. 373-399.
7. Arenas-Huertero, F. Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar/ F. Arenas-Huertero, A. Arroyo, L. Zhou et al. // Genes and development. – 2000. – V. 14. – P. 2085-2096.

8. Arroyo, A. Three genes that affect sugar sensing (abscisic acid insensitive 4, abscisic acid insensitive 5, and constitutive triple response 1) are differentially regulated by glucose in *Arabidopsis* / A. Arroyo, F. Bossi, R. Finkelstein et al. // *Plant Physiology*. – 2003. – V. 133. – P. 231-242.
9. Arsova, B. Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*/ B. Arsova, U. Hoja, M. Wimmelbacher et al. // *The Plant Cell*. – 2010. – V. 22. – P.1498-1515.
10. Asada, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions / K. Asada // *Plant Physiology*. – 2006. – V. 141. – P. 391-396.
11. Baier, M. Characterization of mutants in *Arabidopsis* showing increased sugar-specific gene expression, growth, and developmental responses / M. Baier, G. Hemmann, R. Holman et al. // *Plant Physiology*. – 2004. – V. 134. – P. 81-91.
12. Baier, M. Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: a discussion on chloroplast redox signals in the context of plant physiology / M. Baier, K-J. Dietz // *Journal of Experimental Botany*. – 2005. – V. 56. – P. 1449-1462.
13. Barajas-Lopez, J. Plastid-to-nucleus communication, signals controlling the running of the plant cell / J. Barajas-Lopez, N. Blanco, A. Strand // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2013. – V. 1833. – P. 425-437.
14. Baudry, A. F-box proteins FKF1 and LKP2 act in concert with ZEITLUPE to control *Arabidopsis* clock progression / A. Baudry, S. Ito, Y. Song et al. // *The Plant Cell*. – 2010. – V. 22. – P. 606-622.
15. Blasing, O. Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis* / O. Blasing, Y. Gibon, M. Gunther et al. // *The Plant Cell*. – 2005. – V. 17. – P. 3257-3281.

16. Bradford, M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – V. 72. – P. 248-254.
17. Chen, M. Phytochrome signaling mechanism and the control of plant development / M. Chen, J. Chory // *Trends in Cell Biology*. – 2011. – V. 21, No 11. – P. 664-671.
18. Cheng, W.-H. A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions / W.-H. Cheng, A. Endo, L. Zhou et al. // *The Plant Cell*. – 2002. – V. 14. – P. 2723-2743.
19. Chi, W. Intracellular signaling from plastid to nucleus / W. Chi, X. Sun, L. Zhang // *Plant Biology*. – 2013. – V. 64. – P. 10.1-10.24.
20. Chibani, K. Biochemical properties of poplar thioredoxin z / K. Chibani, L. Tarrago, P. Schurmann et al. // *FEBS letters*. – 2011. – V. 585. – P. 1077-1081.
21. Cho, Y-H. Glucose signaling through nuclear hexokinase1 complex in *Arabidopsis* / Y-H. Cho, S-D. Yoo, J. Sheen // *Plant signaling and behavior*. – 2007. – V. 2, No 2. – P. 123-124.
22. Cho, Y-H. Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling / Y-H. Cho, S-D. Yoo, J. Sheen // *Cell*. – 2006. – V. 127. – P. 579-589.
23. Christie, J. Plant flavoprotein photoreceptors/ J. Christie, L. Blackwood, J. Petersen et al. // *Plant Cell Physiology*. – 2015. – V. 56, No 3. – P.401-413.
24. Cui, H. Scarecrow has a Short-Root-independent role in modulating the sugar response / H. Cui, Y. Hao, D. Kong // *Plant physiology*. – 2012. – V. 158. – P. 1769-1778.
25. Davis, B. Disc electrophoresis-II: method and application to human serum proteins / B. Davis // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1964. – V. 121. – P. 404-427.
26. Davletova, S. The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis* / S. Davletova, K.

- Schlauch, J. Coutu, R. Mittler // *Plant Physiology*. – 2005. – V. 139. – P. 847-856.
27. Dietzel, L. Identification of early nuclear target genes of plastidial redox signals that trigger the long-term response of *Arabidopsis* to light quality shifts // L. Dietzel, C. Glaber, M. Liebers et al. // *Molecular Plant*. – 2015. – V. 8. – P. 1237-1252.
28. Eddy, R. 101 ways to try to grow *Arabidopsis*: what light intensity worked best in this study? Can high intensity discharge lights be used? / R. Eddy, D. Hahn, L. Aschenbeck// Purdue e-Pubs. 2008. – <http://docs.lib.purdue.edu/pmag/13>.
29. Espineda, C. The AtCAO gene, encoding chlorophyll a oxygenase, is required for chlorophyll b synthesis in *Arabidopsis thaliana* / C. Espineda, A. Linford, D. Devine et al. // *Plant Biology*. – 1999. – V. 96. – P. 10507-10511.
30. Estavillo, G. Evidence for a SAL1-PAP chloroplast retrograde pathway that functions in drought and high light signaling in *Arabidopsis* / G. Estavillo, P. Crisp, W. Pornsiriwong et al. // *The Plant Cell*. – 2011. – V. 23. – P. 3992-4012.
31. Estavillo, G. Reconsidering the nature and mode of action of metabolite retrograde signals from the chloroplast / G. Estavillo, K. Chan, S. Phua et al. // *Plant Physiology*. – 2013. – V. 3. – P. 1-9.
32. Fey, V. Retrograde plastid redox signals in the expression of nuclear genes for chloroplast proteins of *Arabidopsis thaliana* / V. Fey, R. Wagner, K. Brautigam et al. // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – V. 280. – P. 5318-5328.
33. Finkelstein, R. Accumulation of the transcription factor ABA-insensitive (ABI)4 is tightly regulated post-transcriptionally / R. Finkelstein, T. Lynch, W. Reeves et al. // *Journal of Experimental Botany*. – 2011. – V. 62. – P. 3971-3979.

34. Finkelstein, R. The *Arabidopsis* abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA2 domain protein / R. Finkelstein, M. Wang, T. Lyuch et al. // *The Plant Cell*. – 1998. – V. 10. - P. 1043-1054.
35. Flores-Perez, U. Pleiotropic Regulatory Locus 1 (PRL1) integrates the regulation of sugar responses with isoprenoid metabolism in *Arabidopsis* / U. Flores-Perez, J. Pere-Gil, M. Closa et al. // *Molecular Plant*. – 2010. – V. 3. – P. 101-112.
36. Fontaine, J-X. Characterization of a NADH-dependent glutamate dehydrogenase mutant of *Arabidopsis* demonstrates the key role of this enzyme in root carbon and nitrogen metabolism / J-X. Fontaine, T. Terce-Laforgue, P. Armengaud et al. // *Plant Cell*. – 2012. – V. 24, No 10. – P. 4044-4065.
37. Fontaine, J-X. Further insights into the isoenzyme composition and activity of glutamate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* / J-X. Fontaine, T. Terce-Laforgue, S. Bouton et al. // *Plant signaling and behavior*. – 2013. – V. 3. – P. 1-5.
38. Forde, B. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signaling / B. Forde, P. Lea // *Journal of Experimental Botany*. – 2007. – V. 58. – P. 2339-2358.
39. Foyer, C. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses / C. Foyer, G. Noctor // *Plant Cell*. – 2005. – V. 17, No 7. – P. 1866-1875.
40. Foyer, C. The ABA-INSENSITIVE-4 (*ABI4*) transcription factor links redox, hormone and sugar signaling pathways / C. Foyer, P. Kerchev, R. Hancock // *Plant signaling and behavior*. – 2012. – V. 7. – P. 276-281.
41. Gibson, S. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signaling network / S. Gibson // *Journal of Experimental Botany*. – 2004. – V. 55. – P. 253-264.
42. Gonzalez-Perez, S. Early transcriptional defense responses in *Arabidopsis* cell suspension culture under high-light conditions / S. Gonzales-Perez, J. Gutier-

- rez, F. Garcia-Garcia et al. // *Plant Physiology*. – 2011. – V. 156, No 3. – P. 1439-1456.
43. Gould, P. Network balance via CRY signaling controls the *Arabidopsis* circadian clock over ambient temperatures / P. Gould, N. Ugarte, M. Domijan et al. // *Molecular Systems Biology*. – 2013. – V. 9. – P. 1-13.
44. Granot, D. Hexose kinases and their role in sugar-sensing and plant development / D. Granot, R. David-Schwartz, G. Kelly // *Plant Physiology*. – 2013. – V. 4. – P. 1-17.
45. Grant, M. Hormone (Dis)harmony moulds plant health and disease / M. Grant, J. Jones // *Science*. – 2009. – V. 324. – P. 750-752.
46. Gururani, M. Photo-biotechnology as a tool to improve agronomic traits in crops / M. Gururani, M. Ganesan, P. Song // *Biotechnology Advances*. – 2014. – V. 33. – P. 53-63.
47. Hanson, J. Sugar perception and signaling – an update / J. Hanson, S. Smeeckens // *Current opinion in Plant Biology*. – 2009. – V. 12. – P. 562-567.
48. Hanson, J. The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of ASPARAGINE SYNTHETASE1 and PROLINE DEHYDROGENASE2 / J. Hanson, M. Hanssen, A. Wiese et al. // *The Plant Journal*. – 2008. – V. 53. – P. 935-949.
49. Hausler, R. How sugars might coordinate chloroplast and nuclear gene expression during acclimation to high light intensities / R. Hausler, L. Heinrichs, J. Schmitz et al. // *Molecular Plant*. – 2014. – V. 7. – P. 1121-1137.
50. Herbel, V. Lifetimes of *Arabidopsis* cryptochrome signaling states in vivo / V. Herbel, C. Orth, R. Wenzel et al. // *The Plant Journal*. – 2013. – V. 74. – P. 583-592.
51. Hong, S. Identification and testing of superior reference genes for a starting pool of transcript normalization in *Arabidopsis* / S. Hong, S. Sahn, A. Lyu et al. // *Plant Cell Physiology*. – 2010. – V. 51, No 10. – P. 1694-1706.

52. Igarashi, D. Reproductive organs regulate leaf nitrogen metabolism mediated by cytokinin signal / D. Igarashi, Y. Izumi, Y. Dokiya et al. // *Planta*. – 2009. – V. 229. – P. 633-644.
53. Imaizumi, T. FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis* / T. Imaizumi, H. Tran, T. Swartz et al // *Nature*. – 2003. – V. 426. – P. 302-306.
54. Inaba, T. Bilateral communication between plastid and the nucleus: plastid protein import and plastid-to-nucleus retrograde signaling / T. Inaba // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2010. – V. 74, No 3. – P. 471-476.
55. Ito, S. LOV domain-containing F-box proteins: light-dependent protein degradation modules in *Arabidopsis* / S. Ito, Y. Song, T. Imaizumi // *Molecular Plant*. – 2012. – V. 5. – P. 573-582.
56. Jeong, J. Phytochrome-interacting factors have both shared and distinct biological roles / J. Jeong, G. Choi // *Molecules and Cells*. – 2013. – V. 35. – P. 371-380.
57. Karve, A. *Arabidopsis* hexokinase-like1 and hexokinase1 from a critical node in mediating plant glucose and ethylene responses / A. Karve, X. Xia, B. Moore // *Plant Physiology*. – 2012. – V. 158. – P. 1965-1975.
58. Kelly, G. The pitfalls of transgenic selection and new roles of AtHXK1: a high level of AtHXK1 expression uncouples hexokinase1-dependent sugar signaling from exogenous sugar / G. Kelly, R. David-Schwartz, N. Sade et al. // *Plant Physiology*. – 2012. – V. 1459. – P. 47-51.
59. Kim, C. ¹O₂-mediated and EXECUTER-dependent retrograde plastid-to-nucleus signaling in norflurazon-treated seedlings of *Arabidopsis thaliana* / C. Kim, K. Apel // *Molecular Plant*. – 2013. – V. 6. – P. 1580-1591.
60. Kim, C. Chloroplast of *Arabidopsis* are the source and a primary target of a plant-specific programmed cell death signaling pathway / C. Kim, R. Meskauskiene, S. Zhang et al. // *The Plant Cell*. – 2012. – V. 24. – P. 3026-3039.

61. Kim, C. Singlet oxygen-mediated signaling in plants: moving from flu to wild type reveals an increasing complexity / C. Kim, K. Apel // *Photosynthesis research*. – 2013. – V. 116. – P. 455-464.
62. Kleine, T. Plastid signalling to the nucleus: messengers still lost in the mists? / T. Kleine, C. Voigt, D. Leister // *Trends in genetics*. – 2009. – V. 25, No 4. – P. 185-192.
63. Kline, T. Retrograde signals galore / T. Kline, D. Leister // *Plant Physiology*. – 2013. – V. 4. – P. 1-3.
64. Kopriva, S. Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism / S. Kopriva, H. Rennenberg // *Journal of Experimental Botany*. – 2004. – V. 55, No 404. – P. 1831-1842.
65. Koussevitzky, S. Signals from chloroplast converge to regulate nuclear gene expression / S. Koussevitzky, A. Nott, T. Mockler et al. // *Science*. – 2007. – V. 316. – P. 715-719.
66. Labuz, J. The expression of phototropins in *Arabidopsis* leaves: developmental and light regulation // J. Labuz, O. Sztatelman, A. Banas, H. Gabrys // *Journal of Experimental Botany*. – 2012. – V. 63, No 4. – P. 1763-1771.
67. Leister, D. Identification of target genes and transcription factors implicated in translation-dependent retrograde signaling in *Arabidopsis* / D. Leister, I. Romani, L. Mittermayr et al. // *Molecular Plant*. – 2014. – V. 7. – P. 1228-1247.
68. Leister, D. Intracompartamental and intercompartmental transcriptional networks coordinate the expression of genes for organellar functions / D. Leister, X. Wang, G. Haberer et al. // *Plant Physiology*. – 2011. – V. 157. – P. 386-404.
69. Lepisto, A. Retrograde signaling from functionally heterogeneous plastids / A. Lepisto, J. Toivola, L. Nikkanen et al. // *Plant Physiology*. – 2013. – V. 3. – P. 1-9.
70. Li, Y. Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in *Arabidopsis* by microarray analysis and promoter classification using a Re-

- levance Vector Machine / Y. Li, K. Lee, S. Walsh et al. // *Genome research*. – 2006. – V. 16. – P. 414-427.
71. Lin, C. Blue light receptors and signal transduction / C. Lin // *The Plant Cell*. – 2002. – V. 14. – P. 207-225.
72. Little, D. The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues / D. Little, H. Rao, S. Oliva et al. // *PNAS*. – 2005. – V. 102. – P. 13693-13698.
73. Loreti, E. Glucose repression of alpha-amylase in barley embryos is independent of GAMYB transcription / E. Loreti, C. Matsukura, A. Alpi et al. // *Plant Molecular Biology*. – 2000. – V. 44. – P. 85-90.
74. Malamy, J. Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis* / J. Malamy, K. Ryan // *Plant Physiology*. – 2001. – V. 127. – P. 889-909.
75. Mao, K. Cloning of the cryptochrome-encoding PeCRY1 gene from *Populus euphratica* and Functional Analysis in *Arabidopsis* / K. Mao, L. Jiang, W. Bo et al. // *PLOS one*. – 2014 – DOI:10.1371/journal.pone.0115201. – P. 1-23.
76. Marchi, L. Glutamate dehydrogenase isoenzyme 3 (GDH3) of *Arabidopsis thaliana* is regulated by a combined effect of nitrogen and cytokinin / L. Marchi, F. Degola, E. Polverini et al. // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2013. – V. 73. – P. 368-374.
77. Martinez-Garcia, J. The shade avoidance syndrome in *Arabidopsis*: the antagonistic role of phytochrome A and B differentiates vegetation proximity and canopy shade / J. Martinez-Garcia, M. Gallemi, M. Molina-Contreras et al. // *PLOS one*. – 2014. – V. 9. – P. 1-11.
78. Melo-Oliveira, R. *Arabidopsis* mutant analysis and gene regulation define a nonredundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation / R. Melo-Oliveira, I. Oliveira, G. Coruzzi // *Plant Biology*. – 1996. – V. 93. – P. 4718-4723.
79. Meyer, Y. Thioredoxins in *Arabidopsis* and other plants / Y. Meyer, J. Reichheld, F. Vignols // *Photosynthesis Research*. – 2005. – V. 86. – P. 419-433.

80. Miyashita, Y. NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation / Y. Miyashita, A. Good // *Journal of Experimental Botany*. – 2008. – V. 59. – P. 667-680.
81. Mochizuki, N. The steady-state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of plastid-to-nucleus signaling in *Arabidopsis* / N. Mochizuki, R. Tanaka, A. Tanaka // *PNAS*. – 2008. – V. 105. – P. 15184-15489.
82. Moulin, M. Tetrapyrrole profiling in *Arabidopsis* seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation / M. Moulin, A. McCormac, M. Terry et al. // *PNAS*. – 2008. – V. 105. – P. 15178-15183.
83. Muller, P. Searching for the mechanism of signalling by plant photoreceptor cryptochrome / P. Muller, J.-P. Bouly // *FEBS letters*. – 2014. – V. 589. – P. 189-192.
84. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiologia plantarum*. – 1962. – V. 15, No 3. – P. 473-497.
85. Ni, W. Multisite light-induced phosphorylation of the transcription factor PIF3 is necessary for both its rapid degradation and photoreceptor phyB levels in *Arabidopsis* / W. Ni, S-L. Xu, R. Chalkley et al. // *The Plant Cell*. – 2013. – V. 25. – P. 2679-2698.
86. Niu, X. Maize ABI4 binds coupling element1 in abscisic acid and sugar response genes / X. Niu, T. Helentjaris, N. Bate // *The Plant Cell*. – 2002. – V. 14. – P. 2565-2575.
87. Nott, A. Plastid-to-nucleus retrograde signaling / A. Nott, H-S. Jung, S. Koussevitzky et al. // *Plant Biology*. – 2006. – V. 57. – P. 739-59.
88. Op den Camp, R. Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis* / R. op den Camp, D. Przybyla, C. Ochsenbein et al. // *The Plant Cell*. – 2003. – V. 15. – P. 2320-2332.

89. Oster, U. Cloning and functional expression of the gene encoding the key enzyme for chlorophyll b biosynthesis (CAO) from *Arabidopsis thaliana* / U. Oster, R. Tanaka, A. Tanaka, W. Rudiger // *The Plant Journal*. – 2000. – V. 21, No 3. – P. 305-310.
90. Oswald, O. Plastid redox state and sugars: interactive regulators of nuclear-encoded photosynthetic gene expression / O. Oswald, T. Martin, P. Dominy et al. // *PNAS*. – 2001. – V. 98. – P. 2047-2052.
91. Palenchar, P. Genome-wide patterns of carbon and nitrogen regulation of gene expression validate the combined carbon and nitrogen (CN)-signaling hypothesis in plants / P. Palenchar, A. Kouranov, L. Lejay et al. // *Genome Biology*. – 2004. – V. 5. – P. 1-15.
92. Pesaresi, P. *Arabidopsis* STN7 kinase provides a link between short- and long-term photosynthetic acclimation / P. Pesaresi, A. Hertle, M. Pribil et al. // *The Plant Cell*. – 2009. – V. 21. – P. 2402-2423.
93. Pfalz, J. Environmental control of plant nuclear gene expression by chloroplast redox signals / J. Pfalz, M. Liebers, M. Hirth et al. // *Plant Physiology*. – 2012. – V. 3. – P. 1-9.
94. Pfannschmidt, T. A novel mechanism of nuclear photosynthesis gene regulation by redox signals from the chloroplast during photosystem stoichiometry adjustment / T. Pfannschmidt, K. Schutze, M. Brost // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – V. 276. – P. 36125-36130.
95. Pfannschmidt, T. Photosynthetic control of chloroplast gene expression / T. Pfannschmidt, A. Nilsson, J. Allen // *Nature*. – 1999. – V. 397. – P. 625-628.
96. Pfannschmidt, T. Plastidial retrograde signaling – a true «plastid factor» or just metabolite signatures? / T. Pfannschmidt // *Trends in Plant Science*. – 2010. – V. 15. – P. 427-435.
97. Pfannschmidt, T. Potential regulation of genes expression in photosynthetic cells by redox and energy state: approaches towards better understanding / T. Pfannschmidt, K. Brautigam, R. Wagner et al. // *Annals of Botany*. – 2009. – V. 103. – P. 599-607.

98. Pfannschmidt, T. The hidden function of photosynthesis: a sensing system for environmental conditions that regulates plant acclimation responses / T. Pfannschmidt, C. Yang // *Protoplasma*. – 2012. – V. 249. – P. 125-136.
99. Pogson, B. Plastid signaling to the nucleus and beyond / B. Pogson, N. Woo, B. Forster et al. // *Trends in Plant Science*. – 2008. – V. 13. – P. 602-609.
100. Ramel, F. Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants / F. Ramel, S. Birtic, C. Ginies et al. // *PNAS*. – 2012. – V. 109. – P. 5535-5540.
101. Ramon, M. Extensive expression regulation and lack of heterologous enzymatic activity of the class II trehalose metabolism proteins from *Arabidopsis thaliana* / M. Ramon, I. Smet, L. Vandesteene et al. // *Plant, Cell and Environment*. – 2009. – V. 32. – P. 1015-1032.
102. Ramon, M. Sugar sensing and signaling / M. Ramon, F. Rolland, J. Sheen // *The Arabidopsis Book*. – 2008. – doi: 10.1199/tab.0117.
103. Rasmusson, A. Light and diurnal regulation of plant respiratory gene expression / A. Rasmusson, M. Escobar // *Physiologia plantarum*. – 2007. – V. 129. – P. 57-67.
104. Restivo, F. Molecular cloning of glutamate dehydrogenase genes of *Nicotiana plumbaginifolia*: structure analysis and regulation of their expression by physiological and stress conditions / F. Restivo // *Plant Science*. – 2004. – V. 166. – P. 971-982.
105. Richly, E. Covariations in the nuclear chloroplast transcriptome reveal a regulatory master-switch / E. Richly, A. Dietzmann, A. Biehl et al. // *EMBO Reports*. – 2003. – V. 4. – P. 491-498.
106. Robinson, S. Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures / S. Robinson, G. Stewart, R. Phillips // *Plant Physiology*. – 1991. – V. 98. – P. 1190-1195.

107. Roitsch, T. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein / T. Roitsch, M. Balibrea, M. Hofmann et al. // *Journal of Experimental Botany*. – 2003. – V. 54, No 382. – P. 513-524.
108. Rolland, F. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms / F. Rolland, E. Baena-Gonzalez, J. Sheen // *Annual Review of Plant Biology*. – 2006. – V. 57. – P. 675-709.
109. Rook, F. Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling / F. Rook, F. Corke, R. Card et al. // *The Plant Journal*. – 2001. – V. 26. – P. 421-433.
110. Rosse, J. Systemic and intracellular responses to photooxidative stress in *Arabidopsis* / J.B. Rossel, B. Wilson, D. Hussain et al. // *The Plant Cell*. – 2007. – V. 19. – P. 4091-4110.
111. Rossel, J. A mutation affecting Ascorbate Peroxidase 2 gene expression reveals a link between responses to high light and drought tolerance / J. Rossel, P. Walter, L. Hendrickson et al. // *Plant, Cell and Environment*. – 2006. – V. 29. – P. 269-281.
112. Saini, G. «Happy on norflurazon» (hon) mutations implicate perturbation of plastid homeostasis with activating stress acclimatization and changing nuclear gene expression in norflurazon-treated seedlings / G. Saini, R. Meskauskiene, W. Pijacka et al. // *The Plant Journal*. – 2011. – V. 65. – P. 690-702.
113. Sakuraba, Y. Functional analysis of N-terminal domains of *Arabidopsis* chlorophyllide a oxygenase / Y. Sakuraba, A. Yamasato, R. Tanaka, A. Tanaka // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2007. – V. 45. – P. 740-749.
114. Salewski, J. Structure of the biliverdin cofactor in the Pfr state of bathy and prototypical phytochromes / J. Salewski, F. Escobar, S. Kaminski et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – V. 288, No 23. – P. 16800-16814.

115. Salomon, M. Mapping of low- and high-fluence autophosphorylation sites in phototropin 1 / M. Solomon, E. Kneib, T. Zeppelin, W. Rudiger // *Biochemistry*. – 2003. – V. 42. – P. 4217-4225.
116. Schroter, Y. Analysis of oligomeric protein complexes in the chloroplast subproteome of nucleic acid-binding proteins from mustard reveals potential redox regulators of plastid gene expression / Y. Schroter, S. Steiner, K. Matthal et al. // *Proteomics*. – 2010. – V. 10. – P. 2191-2204.
117. Schultz, T. A role for LKP2 in the circadian clock of *Arabidopsis* / T. Schultz, T. Kiyosue, M. Yanovsky et al. // *The Plant Cell*. – 2001. – V. 13. – P. 2659-2670.
118. Schurmann, P. Plant thioredoxin system revisited / P. Schurmann, J.-P. Jacquot // *Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. – 2000. – V. 51. – P. 371-400.
119. Schwarzlander, M. Mitochondrial energy and redox signaling in plants // M. Schwarzlander, I. Finkemeier // *Antioxidants and redox signaling*. – 2013. – V. 00. – P. 1-23.
120. Shkolnik-Inbar, D. ABI4 mediates abscisic acid and cytokinin inhibition of lateral root formation by reducing polar auxin transport in *Arabidopsis* / D. Shkolnik-Inbar, D. Bar-Zvi // *The Plant Cell*. – 2010. – V. 22. – P. 3560-3573.
121. Sinha, A. Metabolizable and non-metabolizable sugars activate different signal transduction pathways in tomato / A. Sinha, M. Hofmann, U. Romer et al. // *Plant Physiology*. – 2002. – V. 128. – P. 1480-1489.
122. Skopelitis, D. The isoenzyme 7 of Tobacco NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase exhibits high deaminating and low aminating activities in vivo / D. Skopelitis, N. Paranychianakis, A. Kouvarakis et al. // *Plant Physiology*. – 2007. – V. 145. – P. 1726-1734.
123. Smeekens, S. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth / S. Smeekens, J. Ma, J. Hanson et al. // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2010. – V. 13. – P. 274-279.

124. Strand, A. Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX / A. Strand, T. Asami, J. Alonso et al. // Nature. – 2003. – V. 421. – P. 79-83.
125. Susek, R. Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development / R. Susek, F. Ausubel, J. Chory // Cell. – 1993. – V. 74. – P. 787-799.
126. Suzuki, N. ROS and redox signaling in the response of plants to abiotic stress / N. Suzuki, S. Koussevitzky, R. Mittler et al. // Plant, Cell and Environment. – 2012. – V. 35. – P. 259-270.
127. Szechynska-Hebda, M. Light intensity-dependent retrograde signalling in higher plants / M. Szechynska-Hebda, S. Karpinski // Journal of Plant Physiology. – 2013. – V. 170 – P. 1501-1516.
128. Tanaka, R. Tetrapyrrole metabolism in *Arabidopsis thaliana* / R. Tanaka, K. Kobayashi, T. Masuda // The Arabidopsis Book. – 2011. – doi: 10.1199/tab.0145.
129. Tarasenko, V.I. Induction of *Arabidopsis gdh2* gene expression during changes in redox state of the mitochondrial respiratory chain / V. Tarasenko, E.Yu. Garnik, V.N. Shmakov, Yu.M. Konstantinov // Biochemistry. – 2009. – V. 74. – P. 62-69.
130. Jang, J.-C. Hexokinase as a sugar sensor in Higher plants / J.-C. Jang, P. Leon, L. Zhou, J. Sheen // The Plant Cell. – 1997. – V. 9. – P. 5-19.
131. Thomas, B. Light signals and flowering / B. Thomas // Journal of Experimental Botany. – 2006. – V. 57, No13. – P. 3387-3393.
132. Tissen, A. Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers / A. Tissen, K.Prescha, A. Branscheid et al. // The Plant Journal. – 2003. – V. 35. – P. 490-500.

133. Trebst, A. On a new inhibitor of photosynthetic electron-transport in isolated chloroplasts / A. Trebst, E. Harth, W. Draber // *Naturforsch.* – 1970. – V. 23b. – P. 1157-1159.
134. Turano, F. Characterization and expression of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase genes in *Arabidopsis* / F. Turano, S. Thakkar, T. Fang et al. // *Plant Physiology.* – 1997. – V. 113. – P. 1329-1341.
135. Van Aken, O. Comparison of transcriptional changes to chloroplast to chloroplast and mitochondrial perturbations reveals common and specific responses in *Arabidopsis* / O. Van Aken, J. Whelan // *Plant Physiology.* – 2012. – V. 3. – P. 1-18.
136. Villadsen, D. Identification of more than 200 glucose-responsive *Arabidopsis* genes none of which responds to 3-O-methylglucose or 6-deoxyglucose / D. Villadsen, S. Smith // *Plant molecular biology.* – 2004. – V. 55. – P. 467-477.
137. Wan, Y-L. The subcellular localization and blue-light-induced movement of phototropin 1-GFP in etiolated seedlings of *Arabidopsis thaliana* / Y-L. Wan, W. Eisinger, D. Ehrhardt et al. // *Molecular Plant.* – 2008. – V. 1, No 1. – P. 103-117.
138. Wang, Y. *Arabidopsis* noncoding RNA mediates control of photomorphogenesis by red light / Y. Wang, X. Fan, G. He et al. // *PNAS.* – 2014. – V. 111. – P. 10359-10364.
139. Watanabe, M. Redox and translational regulation of glutamate dehydrogenase α subunits in *Brassica napus* under wounding stress / M. Watanabe, Y. Itho, Y. Jo et al. // *Plant Science.* – 2007. – V. 172. – P. 1182-1192.
140. Waters, M. The making of a chloroplast / M. Waters, J. Langdale // *The EMBO Journal.* – 2009. – V. 28. – P. 2861-2873.
141. Wind, J. Sucrose: metabolite and signaling molecule / J. Wind, S. Smeekens, J. Hanson // *Phytochemistry.* – 2010. – V. 71. – P. 1610-1614.
142. Woodson, J. Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes / J. Woodson, J. Chory // *Nature.* – 2008. – V. 9. – P. 383-395.

143. Woodson, J. Heme synthesis by plastid ferrochelatase I regulates nuclear gene expression in plants / J. Woodson, J. Perez-Ruiz, J. Chory // *Current Biology*. – 2011. – V. 21. – P. 897-903.
144. Xiao, Y. Retrograde signaling by the plastidial metabolite MEcPP regulates expression of nuclear stress-response genes / Y. Xiao, T. Savchenko, E. Baidoo // *Cell*. – 2012. – V. 149. – P. 1525-1535.
145. Yamasato, A. The N-terminal domain of chlorophyllide a oxygenase confers protein instability in response to chlorophyll b accumulation in *Arabidopsis* / A. Yamasato, N. Nagata, R. Tanaka, A. Tanaka // *The Plant Cell*. – 2005. – V. 17. – P. 1585-1597.
146. Yu, J. A genome approach to mitochondrial-nuclear communication in *Arabidopsis* / J. Yu, R. Nickels, L. McIntosh // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2001. – V. 39. – P. 345-353.
147. Zhang, Z-W. The plastid hexokinase pHXK: a node of convergence for sugar and plastid signals in *Arabidopsis* / Z-W. Zhang, S. Yuan, F. Hui et al. // *FEBS letters*. – 2010. – V. 584. – P. 3573-3579.