

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ ОРГАНЕЛ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ

МАТЕРИАЛЫ ДОКЛАДОВ

II Всероссийской
научной конференции
с международным
участием

22-24 мая 2018 г.

Иркутск





СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
СИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ СО РАН
ВАВИЛОВСКОЕ ОБЩЕСТВО ГЕНЕТИКОВ И СЕЛЕКЦИОНЕРОВ
ОБЩЕСТВО ФИЗИОЛОГОВ РАСТЕНИЙ РОССИИ

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ ОРГАНЕЛЛ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ

*Материалы докладов II Всероссийской научной
конференции с международным участием
Иркутск, 22–24 мая 2018 г.*

УДК 57.05
ББК Е07я431
М55

Механизмы регуляции функций органелл эукариотической клетки / Материалы докладов II Всероссийской научной конференции с международным участием (Иркутск, 22–24 мая 2018 г.). – Иркутск: Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2018. – 164 с.

ISBN 978-5-94797-318-1

В сборнике опубликованы материалы докладов II Всероссийской научной конференции с международным участием «Механизмы регуляции функций органелл эукариотической клетки», которая проводится СИФИБР СО РАН при поддержке Всероссийского общества физиологов растений и Вавиловского общества генетиков и селекционеров. Представлены результаты актуальных исследований в области регуляции функций клеточных органелл, регуляции экспрессии митохондриальных и хлоропластных генов, регуляции межорганелльных взаимодействий.

Сборник ориентирован на специалистов в области молекулярной и клеточной биологии, физиологии и биохимии растений, животных и дрожжей, а также может быть полезен преподавателям ВУЗов, аспирантам и студентам соответствующих специальностей.

Редакционная коллегия:

В.Н. Нурминский, к.б.н., СИФИБР СО РАН

В.И. Тарасенко, к.б.н., СИФИБР СО РАН

Е.Ю. Гарник, к.б.н., СИФИБР СО РАН

Издание сборника осуществлено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 18-04-20020_г, а также ООО «СибЛабСервис».



РОССИЙСКИЙ
ФОНД
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ



СИБЛАБСЕРВИС

Материалы воспроизводятся в авторской редакции.

ISBN 978-5-94797-318-1

© Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН, 2018

ПРЕДИСЛОВИЕ

Настоящий сборник содержит материалы второй Всероссийской научной конференции с международным участием «Механизмы регуляции функций органелл эукариотической клетки», организованной при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-04-20020_г). Первая конференция по проблемам регуляции функций растительных органелл состоялась в июне 2014 г. в Иркутске. В ней приняли участие как известные у нас в стране и за рубежом специалисты в области биохимии и молекулярной биологии клеточных органелл, так и молодые, только начинающие свой путь в науке исследователи из разных академических институтов и университетов России, Казахстана и Белоруссии. В связи с актуальностью исследований биологии клеточных органелл, стремительным накоплением фактов о системных, ранее неизвестных функциях органелл, что особенно наглядно видно на примере митохондрий, было принято решение расширить тематику Конференции, не ограничиваясь только растениями, и проводить ее регулярно.

Доклады охватывают весьма широкий круг вопросов. Среди них ключевыми можно назвать (i) регуляцию функций митохондрий, (ii) регуляцию функций хлоропластов, (iii) регуляцию функций вакуоли и тонопласта, (iv) взаимодействие органелл. Митохондрии являются главными энерготрансформирующими органеллами для всех аэробных эукариот. Хотя основной функцией митохондрий считается окислительное фосфорилирование, на сегодняшний день не подвергается сомнению их основополагающая роль в регуляции целого ряда других жизненно важных клеточных процессов. В связи с этим часть материалов сборника составляют доклады с описанием результатов изучения роли митохондрий в формировании устойчивости организмов к стрессам, регуляции различных сценариев программируемой клеточной гибели, включая апоптоз и аутофагию. Ряд сообщений посвящен исследованиям феномена природной компетентности растительных митохондрий к поглощению ДНК, открывающего перспективы для развития такого научно-практического направления, как генетическая трансформация митохондрий. Важные в фундаментальном и прикладном отношении вопросы рассматриваются в докладах, посвященных изучению биосинтетической функции митохондрий, физиологических и патофизиологических функций белков и нуклеиновых кислот митохондрий, особенностей структурной организации и эволюции митохондриальных геномов представителей разных таксонов эукариот.

Роль хлоропластов в клетке, как и митохондрий, не ограничивается единственной функцией. Помимо собственно фотосинтеза, хлоропласты обеспечивают поток регуляторных сигналов, оказывающих влияние на состояние клетки и растительного организма в целом. Согласно современным представлениям, экспрессия пластидных генов сама по себе способна выступать в роли регулирующего механизма для ряда процессов и состоя-

ний. В связи с этим вполне закономерно, что ряд докладов в настоящем сборнике посвящен генетике пластид, регуляции экспрессии пластидного генома, применению генно-инженерных подходов в исследованиях функций хлоропластов.

Устойчивость организмов к неблагоприятным воздействиям тесно связана с состоянием мембранных структур. Вакуоль является одним из наименее изученных клеточных компартментов. В то же время именно эта органелла играет основную роль в запасании первичных и вторичных метаболитов, регуляции клеточного объема, тургора, pH и ионного гомеостаза цитозоля, трансдукции сигналов различной природы, детоксикации и катаболической деградации целого ряда соединений эндогенного и экзогенного происхождения. В сборнике представлены доклады, посвященные изучению изменений состава и структуры вакуолярной мембраны в стрессовых условиях, функциям микродоменов («рафтов») тонопласта, редокс-потенциала центральной вакуоли, транспортной функции тонопласта.

Все органеллы эукариотической клетки так или иначе взаимодействуют между собой, обеспечивая постоянную координацию процессов, протекающих в различных клеточных компартментах. Часть докладов посвящена роли различных органелл в обеспечении фитоиммунитета и растительно-микробных взаимодействиях, значению межмембранных контактов в клеточных процессах, хлоропластно-митохондриальным, а также ядерно-цитоплазматическим взаимодействиям как на физиологическом, так и генетическом уровне, а также вопросам биоинформатики органелл и разработки новых генно-инженерных подходов.

Уместно вспомнить, что в 60–70-х годах прошлого столетия в стране регулярно проводились симпозиумы по биохимии митохондрий, материалы которых издавались в виде одноименных сборников. Как показало время, эти симпозиумы и издаваемые труды сыграли свою роль в формировании российской школы митохондриальной биоэнергетики, известной своими достижениями мирового уровня. В последнее время становится все более очевидным, что развитие системной биологии и биомедицины невозможно без существенного прогресса в области биологии клеточных органелл. И хотя материалы настоящего сборника не претендуют на то, чтобы полностью отразить современное состояние исследований органелл эукариотической клетки, хотелось бы надеяться, что издание настоящего сборника, рассчитанного на молекулярных биологов, биохимиков и физиологов, а также студентов и аспирантов, будет полезным для дальнейшего развития исследований в этой области.

Доктор биологических наук, профессор
Ю.М. Константинов

К ВОПРОСУ О ФЕНОМЕНЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО “АФК-ИНДУЦИРОВАННОГО ВЫБРОСА АФК”

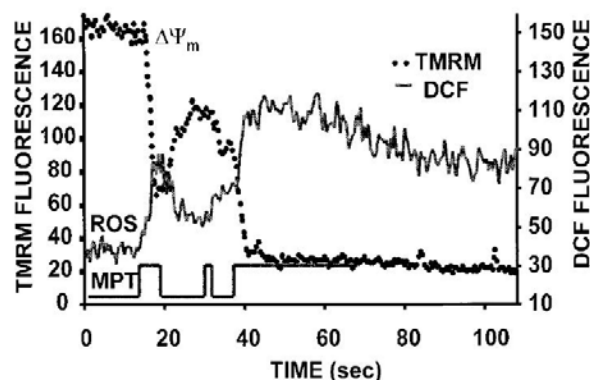
Й.Р. Абдрахимова¹, Ф.А. Абдрахимов²

¹ ФГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Институт фундаментальной медицины и биологии, кафедра биохимии
и биотехнологии, Казань, e-mail: yoldez.abdrahimova@kpfu.ru

² ФГБУН Институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН,
Казань, e-mail: abdrakhimov@mail.knc.ru

Научный интерес к проблеме внутриклеточной генерации активных форм кислорода (АФК или ROS) и их метаболизму не снижается в течение почти полвека, беря свое начало от работ научной школы основателя редокс-биологии В. Chance на выделенных органоидах, ставших уже классическими (Boveris et al., 1972; и др.). На рубеже веков исследования субклеточно-локализованных процессов производства АФК получили “второе дыхание” благодаря прорывному развитию имиджинговых технологий в микроскопии, направленных на увеличение пространственно-временного разрешения, которое позволило наблюдать динамические процессы в живых клетках в режиме реального времени. Одними из таких явились исследования Д.Б. Зорова с соавт. (Zorov et al., 2000, и др.), которые на уровне отдельных митохондрий кардиомиоцитов обнаружили скоординированную противофазность изменений интенсивности флуоресценции специфических красителей – TMRM и DCF, отражающих флуктуации трансмембранного потенциала ($\Delta\psi$) и АФК, соответственно (рис. 1). Фотоактивация флуоресцентных красителей при сканировании образцов лазером вызывала, по мнению авторов, короткую «вспышку» (5-10 с) образования “триггерных” АФК (см первый пик флуоресценции DCF на рис. 1). Это индуцировало, в данном случае через 20 с, большее по амплитуде и длительности увеличение флуоресценции DCF, за что и получило название митохондриального АФК-индуцированного высвобождения АФК (‘ROS-induced ROS release’, RIRR) (Zorov et al., 2000). Связанные с RIRR “зеркальные” изменения $\Delta\psi$, а именно его необратимое падение, было обусловлено, судя по входу в митохондрии инертного флуоресцентного индикатора кальцеина (~620 Да), с открытием митохондриальных мегаканалов или мегапор (MPT, или ‘mitochondrial permeability transition’, на рис. 1). Авторы заключили об обусловленности феномена RIRR индукцией MPT, причем, что представляется важным, был отмечен ее обратимый характер в кластере соседствующих митохондрий (Zorov et al., 2000). Как известно, MPT характеризуется высоко- и низкопроводящими состояниями, которые отличаются, в первую очередь, обратимостью открывания мегаканала в ответ на индуцирующие факторы, в т. ч. АФК. В настоящее время постулируется существование и третьего, промежуточного, состояния MPT, которое обуславливает транзиторные динамические события, наблюдаемые как высокоамплитудные флуктуации интенсивности флуоресценции АФК-детектирующих систем в митохондриях, получивших название “митофлешей” (‘mitoflashes’) (Wang et al., 2008; 2016; Hou et al., 2014).

Рис. 1. Скоординированные изменения интенсивности флуоресценции TMRM ($\Delta\psi$) и DCF (АФК) в митохондриях кардиомиоцитов крысы (по: Zorov et al., 2000).



Вместе с тем в литературе последних лет разгорелась жаркая дискуссия по поводу природы митофлешей (Wang et al., 2008,2016; Schwarzländer et al., 2011; Santo-Domingo et al., 2013; Hou et al., 2014; и др.). Оновным аргументом противников признания АФК-обусловленной природы “митофлешей” является высокая чувствительность к

изменениям pH, а именно защелачиванию, матрикса митохондрий флуоресцентных белков, в первую очередь cpYFP (circularly permuted yellow fluorescent protein) (Santo-Domingo et al., 2013) (рис. 2).

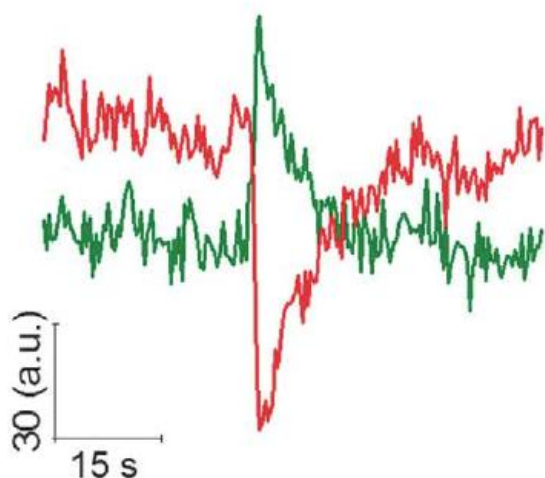


Рис. 2. «Зеркальность» обратимых флуктуаций $\Delta\psi$ и ΔpH матрикса митохондрий клеток HeLa по флуоресценции TMRM (красная кривая) и Mito-SypHer (зеленая), соответственно (по Santo-Domingo et al., 2013).

Нами изучались динамические события с использованием TMRM и DCF, исходя из факта относительной нечувствительности этих синтетических красителей к изменениям pH в диапазоне от 6,0 до 9,5. В качестве объектов исследований были использованы этиолированные проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Мироновская 808), выращенные гидропонным способом (23–25 °C, 3 сут) в темноте. Образцы после двойного окрашивания 0,5 μM TMRM and 10 μM DCF просматривали в Zeiss CLSM META 510 с последующим мультитрековым анализом, что позволило визуализировать “вспышки” как высокоамплитудные флуктуации интенсивности флуоресценции используемых красителей (рис. 3).

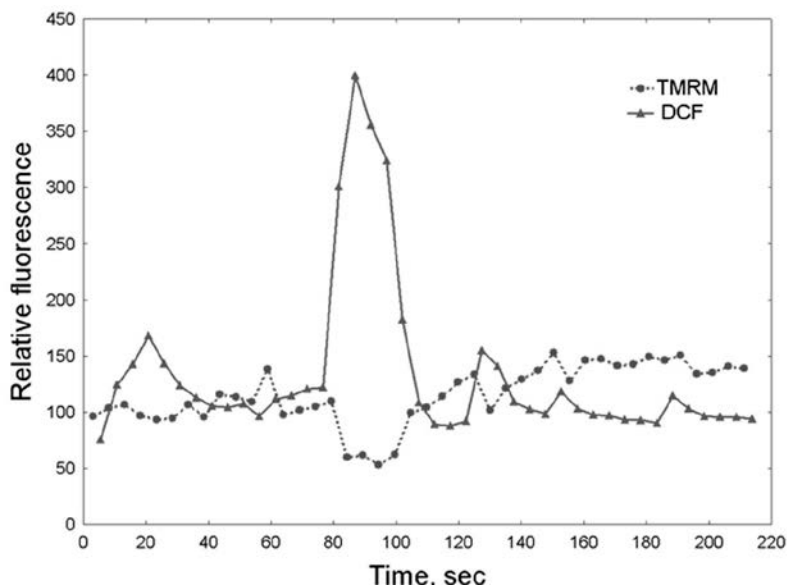


Рис. 3. Динамика изменений флуоресценции TMRM и DCF в индивидуальной митохондрии клетки coleoptilia пшеницы.

Следует отметить, что наблюдаемые динамические события не были связаны с взаимодействием индикаторов между собой и другими побочными эффектами, поскольку детектировались и при их использовании по отдельности. Анализ полученных данных показал, что несмотря на преимущественно “зеркальный” характер транзиторных изменений $\Delta\psi$ и АФК в митохондриях, случаи асинхронности данных процессов тоже были нередки (см. рис. 3). Обращает также внимание на себя тот факт, что относительная интенсивность флуоресценции DCF при этом может изменяться более чем в 3–4 раза, тогда как таковые TMRM были не столь драматичными (см.рис. 3).

Мультитрековый анализ показал, что линейный коэффициент корреляции г-Пирсона между изменениями флуоресценции DCF и TMRM в индивидуальных пульсах варьирует от -0,95 ($P < 0,05$) до менее чем -0,1 (отсутствие корреляции). Последнее позволяет заключить, что обнаруженные нами динамические события, а именно транзиторные высокоамплитудные флуктуации $\Delta\psi$ и генерации АФК, детектируемые по изменениям интенсивности флуоресценции соответствующих индикаторов на уровне индивидуальных митохондрий, не ограничены разными состояниями МРТ.

Литература

- Boveris A., Oshino N., Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide // *Biochem. J.* – 1972. – V. 128. – P. 617–630.
- Hou T., Wang X., Ma Q. *et al.* Mitochondrial flashes: new insights into mitochondrial ROS signaling and beyond // *J Physiol.* – 2014. – V. 592. – P. 3703–3713.
- Santo-Domingo J., Giacomello M., Poburko D. *et al.* OPA1 promotes pH flashes that spread between contiguous mitochondria without matrix protein exchange // *The EMBO Journal.* – 2013. – V. 32. – P. 1927–1940.
- Schwarzländer M., Logan D.C., Fricker M.D. *et al.* The circularly permuted yellow fluorescent protein cpYFP that has been used as a superoxide probe is highly responsive to pH but not superoxide in mitochondria: implications for the existence of superoxide ‘flashes’ // *Biochem. J.* – 2011. – V. 437. – P. 381–387.
- Wang W., Fang H., Groom L. *et al.* Superoxide flashes in single mitochondria // *Cell.* – 2008. – V. 134. – P. 279–290.
- Wang W., Gong G., Wang X. *et al.* Mitochondrial Flash: Integrative Reactive Oxygen Species and pH Signals in Cell and Organelle Biology // *Antiox. Redox Signal.* – 2016. – V. 25. – P. 534–549.
- Zorov D.B., Filburn C.R., Klotz L.O. *et al.* Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes // *J. Exp. Med.* – 2000. – V. 192. – P. 1001–1014.

ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЛАСТИД И МИТОХОНДРИЙ ПРИ АБИОТИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Е.Н. Баранова, А.А. Гулевич, Л.В. Куренина, Н.В. Кононенко, И.А. Чабан
ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии, Москва, e-mail: inna_chaban@rambler.ru

Одним из наиболее значимых стрессовых воздействий является окислительный стресс, вызывающий генерацию активных форм кислорода, которые являются токсичными для растительных клеток и их компартментов. Он индуцирует модификацию состава и формы мембран их целостность и синтез, что находит отражение в функционировании как отдельных компартментов, так и в целом системы органелл клетки. Для нейтрализации этих токсичных соединений растения выработали целый ряд защитных механизмов. Например, возрастание активности ферментов-нейтрализаторов, таких как супероксиддисмутаза (СОД), аскорбатпероксидаза (АсП), глутатионредуктаза (ГР) и другие, а также синтез низкомолекулярных антиоксидантов (Mittler, 2002). Внедрение генов, кодирующих синтез антиокислительных ферментов, - перспективный способ получения растений, обладающих толерантностью ко многим стрессам (Singla-Pareek et al., 2007). Известно, что повышенной устойчивостью к окислительному стрессу могут обладать растения-трансформанты, с суперэкспрессией генов супероксиддисмутазы, аскорбатпероксидазы, глутатион-S-трансферазы и др. (McKersie et al., 1996; Badawi et al., 2004). Установлено, что СОДы хлоропластов играют роль в предотвращении нарушения фотосинтеза, вызываемого окислительным повреждением (Alscher et al., 2002). Остаются малоизученными многие аспекты, связанные с влиянием интродуцированных генов на структурную организацию клеточных органелл. Ранее нами был получен ряд независимых трансформантов томата, у которых имелись различия в ультраструктуре хлоропластов и активности ферментов: СОД и АСП. Ранее мы продемонстрировали, что при таргетинге фермента FeSOD1, ответственного за первые этапы нейтрализации активных форм кислорода, происходит: изменение пигментного комплекса (Широких и др., 2014), структурной организации пластид: структуры тилакоидов стромы, размера пластоглобул и крахмальных зерен, а также ламеллярных образований рядом с нуклеоидами в хлоропластах трансгенных растений (Baranova et al., 2010; Баранова и др., 2011). В условиях *in vitro* растения, особенно при использовании водной культуры, подвергаются многим специфическим воздействиям. Одним из них является перманентный анаэробный стресс, вызываемый аноксией. Изменение структурной организации митохондрий при аналогичных условиях хорошо изучены на разных культурах (Vartapetian et al., 2003). Важная роль взаимодействия митохондрий и пластид в норме и при стрессе активно обсуждается (Noctor et al., 2007).

Целью настоящей работы было получение сравнительных данных о тканеспецифичном изменении пластид и митохондрий в разных тканях у исходных и трансгенных по FeSOD1 растений томата.

Материалы и методы. Ранее, методом агробактериальной трансформации томата сорта Белый Налив с использованием бинарного вектора pBINFe-SOD1 было получено 15 первичных регенерантов, содержащих в своем ядерном геноме ген Fe-SOD1. Ген был снабжен сигнальной последовательностью из гена Rubisco гороха, таргетирующую синтезируемый фермент в пластиду. Для подтверждения экспрессии гена Fe-SOD1 была проведена ПЦР-диагностика (Serenko et al., 2009), сопряженная с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). По результатам ОТ-ПЦР-анализа экспрессия гена Fe-SOD1 была подтверждена у 7 из 15 трансгенных линий.

Трансгенные линии томата, экспрессирующие целевой ген, были размножены в условиях *in vitro*, адаптированы к почвенным условиям и выращены в грунте для получения семенного поколения. В процессе выращивания Т0-трансгенные линии были проанализированы на предмет соматических отклонений от контрольных растений сорта «Белый налив». Установлено, что у ряда линий наблюдались изменения формы и размера листовой пластинки, а также различия в габитусе по сравнению с контролем. Кроме того, показано, что у 3 трансгенных линий происходило отмирание цветков, в результате чего не происходило формирование плодов. После длительного культивирования на этих растениях были получены плоды. Однако они не содержали полноценных семян. Вместо них обнаруживались только мелкие неразвившиеся семязачатки, что свидетельствует о партенокапическом происхождении плодов у этих растений. Размноженные растения подвергали действию солей NaCl и Na₂SO₄ в культуре *in vitro* на бумажных мостиках на водной среде ½ MS без добавления гормонов. Электронная микроскопия проводилась по стандартному протоколу.

Результаты и обсуждение. Нетрансгенные растения томата имели характерные для действия солевого стресса изменения ультраструктуры паренхимных клеток, что было характерно как для пластид, так и для митохондрий. Очевидно, что действие NaCl оказывало деструктивное влияние на структуру пластид, что выражалось в изменении их формы, вероятно связанных с нарушением осмоса, появлении увеличенных пластоглобул. Повреждение митохондрий выражались в значительном уменьшении количества крист и в их неравномерном расположении, изменении формы с округлой на сильно изогнутую, с инвагинациями. При воздействии Na₂SO₄ пластиды исходной формы приобретали неправильную угловатую форму, строма была более плотной, крахмальные зерна окружали неравномерные угловатые светлые участки, от отдельных пластид отшнуровывались окруженные мембраной фрагменты стромы, содержащие ламеллярные структуры, увеличения количества пластоглобул при этом не наблюдалось. Митохондрии были более мелкими, чем в контроле, сохраняли округлую форму и имели небольшое число более длинных, чем в норме, изогнутых крист. Пластиды клеток паренхимы трансгенных линий № 6 и № 8 значительно отличались как от контроля, так и между собой. Пластиды линии № 6 под действием NaCl не имели характерных крупные пластоглобул, изменялась форма пластиды и ее размер, можно было наблюдать нуклеоид, крахмальные зерна сохранялись в некоторых клетках, количество гран оставалось также ниже, чем у исходной формы и линии № 8. Митохондрии линии № 6 при хлоридном засолении были более мелкими, хотя и содержали характерные для нормальных условий для этой линии кристаллические включения, кристы были четко выражены, имели ромбовидную и треугольную форму, плотный матрикс. Изменение митохондрий вероятно, было обратимым. Сульфатное засоление вызывало изменение пластид линии № 6: уменьшение размеров, сохранение значительного количества крахмальных зерен, появление пластоглобул, меньшего, чем в норме для этой линии, но соответствующего размеру пластоглобул у исходной формы и трансгенной линии № 8 в нормальных условиях. Митохондрии линии № 6 в этих условиях не имели значимых изменений структуры. Во многих клетках приобретали характерное для контрольных условий структурное состояние. Ультраструктура хлоропластов линии № 8 имела существенные отличия по сравнению, как с исходной формой, так и с линией № 6, выразившиеся в сохранении овально-линзовидной формы при действии NaCl. Тилакоиды гран и стромы также имели типичное строение, в стромах наблюдали небольшое число нуклеоидов и пластоглобул, что свидетельствовало о сохранности компартмента. Митохондрии клеток паренхимы линии № 8 при хлоридном засолении характеризовались округлой формой, имели развитую структуру крист, несколько большие размеры, чем в нормальных условиях у этой линии, но соответствующую структуре митохондрий у исходной формы без воздействия солей. При сульфатном засолении пластиды линии № 8 были меньше, отмечали незначительные изменения формы, уменьшение количества гран и

тилакоидов в гранах, пластоглобулы – более мелкие. Под действием сульфата натрия митохондрии линии № 8 приобретали овальную продолговатую форму, содержали относительно плотный матрикс и развитую систему крист, структура была аналогична структуре митохондрий у линии № 6 в нормальных условиях. В проведенных экспериментах подтвердилось предположение, что устойчивость к повреждениям при действии засоления, вызываемого сульфатом и хлоридом натрия, на уровне реакции ультраструктуры зависит от активности фермента и принадлежности клетки к определенной ткани.

**Работа проведена в рамках РФФИ 18-04-00558 и госзадания № 0574-2014-0019.*

Литература

Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends in plant science. – 2002. – Т. 7, №. 9. – С. 405–410.

Singla-Pareek S.L., Pareek A., Sopory S. K. Transgenic plants for dry and saline environments // Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops. – Springer, Dordrecht, 2007. – С. 501–530.

Mckersie B.D., Bowley S.R., Harjanto E., Leprince O. Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase // Plant Physiology. – 1996. – 111 (4). – P. 1177–1181.

Badawi G.H., Yamauchi Y., Shimada E., Sasaki R., Kawano N., Tanaka K., Tanaka K. Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts // Plant Science – 2004. – 166 (4). – С. 919–928.

Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants // Journal of experimental botany. – 2002. – Т. 53, № 372. – С. 1331–1341.

Широких И.Г., Бакулина А.В., Огородникова С.Ю., Баранова Е.Н., Лундовских И.А., Гулевич А.А. Влияние встройки Fe-SOD1 гена на рост, перекисный гомеостаз и состояние пигментного комплекса трансгенных растений картофеля // Агрохимия. – 2014. – № 8. – С. 72–78.

Baranova E.N., Serenko E.K., Balachnina T.I., Kosobruhov A.A., Kurenina L.V., Gulevich A.A., Maisuryan A.N. Activity of the photosynthetic apparatus and antioxidant enzymes in leaves of transgenic *Solanum lycopersicum* and *Nicotiana tabacum* plants, with FeSOD1 gene // Russian Agricultural Sciences. – 2010. – V. 36. – P. 242–249.

Баранова Е.Н., Гулевич А.А., Майсурян А.Н., Лаврова Н.В. Ультраструктурная организация клеток трансгенных растений томата с геном Fe-SOD при засолении питательной среды // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2011. – № 1. – С. 90–97.

Vartapetian B.B., Andreeva I.N., Generozova I.P., Polyakova L.I., Maslova I.P., Dolgikh Y.I., Stepanova A.Y. Functional electron microscopy in studies of plant response and adaptation to anaerobic stress // Annals of Botany – 2003. – 91 (2). – С. 155–172.

Noctor G., De Paepe R., Foyer C.H. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants // Trends in plant science – 2007. – 12 (3). – С. 125–134.

ПРОБЛЕМЫ ФОРМИРОВАНИЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПЛАСТИД У ТРАНСГЕННЫХ И ТРАНСПЛАСТОМНЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА

Е.Н. Баранова¹, С.А. Данилова¹, Г.Н. Ралдугина², А.А. Гулевич¹

¹ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, e-mail: a_gulevich@mail.ru

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

Согласно современным представлениям пластиды являются одним из древнейших эндосимбионтов эукариотических организмов (Gray, 2017). В результате длительного совместного эволюционного развития в клетках растений часть генома организма-предшественника пластид, которым, как полагают, была цианобактерия, так же как и часть генома организма-предшественника митохондрий была перенесена в ядерный геном и включена в состав хромосом (Li et al., 2015). Однако часть генетического аппарата сохранилась в виде нуклеоида, кодирующего элементы отличного от цитоплазматического белоксинтезирующего аппарата и ряд специфических ферментов регуляции и функционирования пластид (Bock, 2015). Для доставки важных элементов формирования компартментов пластид, в частности, связанных с фотосинтезом, используется белоксинтезирующая система, контролируемая ядром. Различные полипептиды, таргетируемые в пластиды, содержат специфические сигнальные последовательности, обеспечивающие адресную доставку (Singh et al, 2015). В пластидах осуществляется синтез множества молекул отвечающих за рост, развитие и регуляцию процессов дифференцировки растений. Процесс фотосинтеза обеспечивает накопление крахмала, который потом метаболизируется в сахара и являются важнейшим поставщиком и способом сохранения энергии, белки, витамины, гормоны и липиды также используются клеткой для обеспечения своей жизнедеятельности. Абиотические стрессовые факторы оказывают значительное влияние на структурную организацию пластид как напрямую, так и опосредованно, за счет нарушения осмотического давления, целостности мембран, ограничения таргетинга функциональных белков. Это сказывается на изменении формы, размеров, структурной организации и распределения функциональных субдоменов пластидного компартмента.

Важнейшими доменами пластидного компартмента является внешняя мембрана, нуклеоид, система внутренних ламелл, рибосомы и строма. Существующие системы классификации пластид до сих пор несовершенны и в целом предполагают деление на основе визуализируемого внутреннего содержимого. В ряде случаев это достаточно устойчивые и распространенные формы: амилопласты, лейкопласты, хлоропласты, этиопласты. Однако в большинстве случаев, очевидно, что узкая специализация пластид по сути является реакцией на взаимодействие с условиями их существования и зависит от регуляторной функции ядра.

Генетическая инженерия позволяет эффективно использовать пластиды в качестве стабилизатора клетки от повреждений абиотическими стрессорами (Fuentes P. et al, 2018). Может быть использовано две стратегии: 1) защита целостности и функциональной активности пластидного компартмента; 2) использование специализированных свойств пластиды через регуляцию ее функций. При первом варианте мы исходим из того, что хлоропласты весьма чувствительны к окислительному, осмотическому и токсическому воздействию, вызываемому избыточным ультрафиолетом, температурными стрессами, засухой, действием токсикантов. Отсюда, модификация устойчивости компартмента может быть осуществлена опосредованно, через оптимизацию работы кле-

точного метаболизма регуляцией работы других систем – локализацию токсикантов, изменение осмотического давления таким осмопротектантами как пролин, маннитол и др. При использовании второй стратегии для защиты могут быть задействованы генетически заложенные в его метаболизме возможности, например, наличие в хлоропластах холина, который при достаточно простой модификации может быть превращен в глицинбетаин не так, как у некоторых растений – в две стадии, а с использованием бактериального фермента холиноксидазы – в одну стадию. Осуществление этих двух стратегий может быть выполнено, используя генетическую модификацию одного из трех доступных геномов растительной клетки. Очевидно, что генетическая модификация митохондриального генома до сих пор представляет собой очень сложную проблему (Weber-Lotfi et al., 2015), поэтому можно выбирать между цитоплазматической системой экспрессии (контролируемой ядром) и пластидной, контролируемой как ядром так и нуклеоидом. На сегодняшний день остается много вопросов к тому, какой вариант является более эффективным, и в каком случае следует делать выбор в сторону одного или другого тактического подхода.

В качестве модельного объекта в работе использовали растения табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Sumsun. Семена растений стерилизовали и помещали на агаризованную среду MS для проращивания. Через две недели семядольные листья использовали для агробактериальной и баллистической трансформации по описанным ранее методикам. Дальнейший отбор на антибиотике проводился по стандартным методикам (Baranova E.N. et al., 2010).

В нашей работе мы получили трансгенные и транспластомные растения и табака методом агробактериальной и баллистической, соответственно. После отбора на антибиотике проверяли наличие вставки методом ПЦР и РТ-ПЦР. Для анализа трансгенных линий использовали как первичные трансформанты, так и их семенное потомство. При исследовании транспластомных линий анализировали гомопластомные и гетеропластомные растения и изучили изменения пластид на нескольких линиях в сравнении с нетрансформированным контролем (Данилова С.А. и др., 2014). Выбранные варианты воздействия на ядерный и пластидный геномы показывают эффективность обоих подходов, но различия между линиями трансгенных и транспластомных растений свидетельствуют о необходимости коррекции вариантов подбора стратегии.

В конструкции для агробактериальной трансформации целевой ген был снабжен синтетической хлоропластной сигнальной последовательностью из гена *rbcS*, обеспечивающий таргетинг аминокислотной последовательности в пластиду (Гулевич, Баранова, 2008). Мы отметили наличие изменений в пластидном компартменте в обоих случаях, что выражалось в изменении расположения внутренних доменов хлоропласта, в частности, ламеллярной системы. Однако при применении стрессового воздействия у трансгенных растений изменения затрагивали также ультраструктурную организацию митохондрий и пероксисом, что возможно, может быть связано с нарушением надлежащего осуществления таргетинга в условиях стресса, что представляет самостоятельный интерес и требует дальнейшего изучения. Если это предположение подтвердится, то вероятно, нужно будет произвести отбор сигнальных последовательностей, таргетинг которых остается стабильным при стрессе, и/или использовать только транспластомные растения, как наиболее эффективные для создания защиты пластид от повреждающего действия абиотических стрессов.

Другим возможным вариантом является поддержание адресной доставки структурных и функциональных белков и ферментов путем увеличения адаптивных возможностей цитоплазмы, так как при стрессе меняется осмотическое давление в цитоплазматическом компартменте, нарушается расположение и динамика сборки и разборки филаментов и микротрубочек, нарушается процесс слияния и синтеза мембран тонопласта, в ряде случаев клеточные компартменты локализуются в аутофагосомы, что полностью ингибирует возможность доставки кодируемых в ядерном геноме продуктов

в органеллу. Кроме того, при ряде стрессовых воздействий нарушается целостность пластид и митохондрий (Баранова Е.Н. и др., 2011), нарушение внешней и внутренней мембраны, в результате чего содержимое стромы и матрикса может быть выброшено в цитоплазму или в вакуолярный компартмент (Baranova E.N. et al., 2011; Borgo L. et al., 2015).

**Работа проведена в рамках ГП 14 по теме госзадания № 0574-2015-0004 и при финансовой поддержке РФФИ 13-08-01323.*

Литература

Баранова Е.Н., Гулевич А.А., Майсурян А.Н., Лаврова Н.В. Ультраструктурная организация клеток трансгенных растений томата с геном Fe-SOD при засолении питательной среды // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2011. – № 1. – С. 90–97.

Гулевич А.А., Баранова Е.Н. Создание генно-инженерной конструкции с геном холиноксидазы для улучшенной экспрессии в растениях // Российская сельскохозяйственная наука. – 2008. – № 3. – С. 7–9.

Данилова С.А., Ралдугина Г.Н., Кунакова Е.А., Гулевич А.А., Баранова Е.Н. Получение и анализ хлоропластных трансформантов растений табака *Nicotiana tabacum* L. с маркерной каскадой экспрессии гена *aadA^{su}*, изменяющего окраску листа // Российская сельскохозяйственная наука. – 2014. – № 5. – С. 16–21.

Baranova E.N., Serenko E.K., Balachnina T.I., Kosobruhov A.A., Kurenina L.V., Gulevich A.A., Maisuryan A.N. Activity of the photosynthetic apparatus and antioxidant enzymes in leaves of transgenic *Solanum lycopersicum* and *Nicotiana tabacum* plants, with FeSOD1 gene // Russian Agricultural Sciences. – 2010. – V. 36. – P. 242–249.

Baranova, E.N., Gulevich, A.A., Kalinina-Turner, E.B., Koslov, N.N. Effects of NaCl, Na₂SO₄ and mannitol on utilization of storage protein and transformation of vacuoles in the cotyledons and seedling roots of alfalfa (*Medicago sativa* L.) // Russian Agricultural Sciences. – 2011. – V. 37. – P. 11–19.

Bock R. Engineering plastid genomes: methods, tools, and applications in basic research and biotechnology // Annual Review of Plant Biology. – 2015. – V. 66. – P. 211–241.

Fuentes P., Armarego-Marriott T., Bock R. Plastid transformation and its application in metabolic engineering // Current opinion in biotechnology. – 2018. – V. 49. – P. 10–15.

Gray M.W. Lynn Margulis and the endosymbiont hypothesis: 50 years later // Molecular biology of the cell. – 2017. – V. 28. – P. 1285–1287.

Li, X., Yang, Y., Henry, R. J., Rossetto, M., Wang, Y., Chen, S. Plant DNA barcoding: from gene to genome // Biological Reviews. – 2015. – V. 90. – P. 157–166.

Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Singh, V. P., Prasad, S.M. Retrograde signaling between plastid and nucleus: a review // Journal of plant physiology. – 2015. – V. 181. – P. 55–66.

Weber-Lotfi F., Koulintchenko M.V., Ibrahim N., Hammann P., Milesheva D.V., Dietrich A., Konstantinov Y.M. Nucleic acid import into mitochondria: new insights into the translocation pathways // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Molecular Cell Research. – 2015. – V. 1853. – P. 3165–3181.

Borgo L., Marur C.J., Vieira L.G.E. Effects of high proline accumulation on chloroplast and mitochondrial ultrastructure and on osmotic adjustment in tobacco plants // Acta Scientiarum. Agronomy. – 2015. – V. 37. – P. 191–199.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ МИТОХОНДРИЙ АРАБИДОПСИСА В ИМПОРТЕ ДНК

Т.А. Болотова, В.И. Тарасенко, Ю.М. Константинов, М.В. Кулинченко
ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: bolotova_t.a@mail.ru

Условием нормального функционирования митохондрий высших эукариот является наличие у них мембранных систем транспорта макромолекул (белков и нуклеиновых кислот). Импорт РНК в митохондрии имеет важное значение для экспрессии митохондриальных генов и их регуляции, в то время как импорт ДНК, вероятнее всего, вносит вклад в динамику генома и эволюцию этих органелл. Горизонтальный перенос генетического материала, происходящий в растительные митохондрии с гораздо более высокой частотой, чем в ядерный и хлоропластный геномы (Sanchez-Puerta, 2014), может быть связан с природной способностью этих органелл к активному поглощению ДНК (Koulintchenko et al, 2003; Weber-Lotfi et al, 2009). На настоящий день нами установлено, что процесс импорта ДНК не ограничен участием двух мембранных белков – адениннуклеотидтранслоказы (ANT) во внутренней мембране и порина (VDAC) в наружной мембране (Koulintchenko et al, 2003), а сам процесс импорта может осуществляться с участием нескольких пока нерасшифрованных механизмов, имеющих специфичность в отношении длины и структуры транспортируемых молекул (Ibrahim et al, 2011; Константинов и др., 2016). Однако до сих пор не идентифицированы другие белки внешней мембраны, которые могли бы определять специфичность транспорта молекул ДНК разной длины и структуры в митохондрии.

При проведении протеомного анализа уровней флуоресцентного мечения белков в присутствии и отсутствии ДНК, было показано пятикратное снижение интенсивности мечения для полипептида внутренней мембраны CuBP (Weber-Lotfi et al, 2015). Этот белок является компонентом дыхательного комплекса I и имеет Cu-связывающую активность. Кроме того, с помощью методов биоинформатики в последовательности CuBP было показано наличие ДНК-связывающего сайта (Nair and Rost, 2005). Исходя из этого, интересно было исследовать роль CuBP в импорте ДНК более детально. Ранее была высказана гипотеза (Зоров, 1996) о возможном участии в транспорте ДНК бензодиазепинового рецептора PBR (от: Peripheral Benzodiazepine Receptor), являющегося в митохондриях животных одним из важных компонентов митохондриальной поры сдвига проницаемости MPTP (от: Mitochondrial Permeability Transition Pore). У растений этот белок, известный как TSPO (от: Tryptophan-rich Sensory Protein), также ассоциирован с наружной мембраной митохондрий (Lindemann et al, 2004), хотя, в отличие от животных, его функции остаются малоизученными. При определенных стрессовых ситуациях PBR/TSPO способен формировать транзитную пору (олигомерные комплексы с порином и ANT в местах контакта двух мембран), через которую может осуществляться транспорт ДНК. Известно, что VDAC, один из основных компонентов наружной мембраны транзитной поры MPTP в митохондриях растительного и животного происхождения, способен взаимодействовать не только с ANT, но и с другими представителями суперсемейства митохондриальных переносчиков в составе внутренней мембраны, обозначаемыми как MCF (Haferkamp and Schmitz-Esser, 2012). В растительных митохондриях известны четыре изоформы митохондриального порина (Tateda et al, 2011), функции которых не до конца ясны. Сложная структура митохондриальных мембран дает основания для предположения о полиморфизме MPTP: любой белок-представитель семейства MCF с участием различных изоформ VDAC способен формировать пору, через которую, в определенных условиях, может транслоцироваться ДНК.

С целью характеристики роли мембранных белков (CuBP, TSPO, изоформ VDAC) в процессе импорта ДНК было проведено исследование импорта молекул ДНК разной длины в митохондрии в системе *in organello* и *in vivo* с использованием гомозиготных линий *Arabidopsis thaliana*, мутантных по одному из этих кандидатных белков.

При изучении роли белка внутренней мембраны CuBP в процессе импорта ДНК обнаружено, что отсутствие CuBP ухудшает транспорт ДНК, в особенности через внутреннюю митохондриальную мембрану, причем наиболее существенно этот эффект выражен для транспорта ДНК-субстратов большой длины (9 т.п.н.). CuBP, таким образом, можно рассматривать в качестве нового фактора импорта нуклеиновых кислот, который выступает в роли рецептора в межмембранном пространстве митохондрий.

Анализ характера импорта ДНК разной длины в митохондрии мутантной линии *tspo* показал, что митохондриальный мембранный белок TSPO, скорее всего, не играет существенной роли в импорте молекул ДНК малой длины (фрагментов ДНК $\leq 0,3$ т.п.н.). Тем не менее, не исключено участие TSPO в импорте в митохондрии молекул ДНК средней длины (фрагментов ДНК $> 0,3$ т.п.н.).

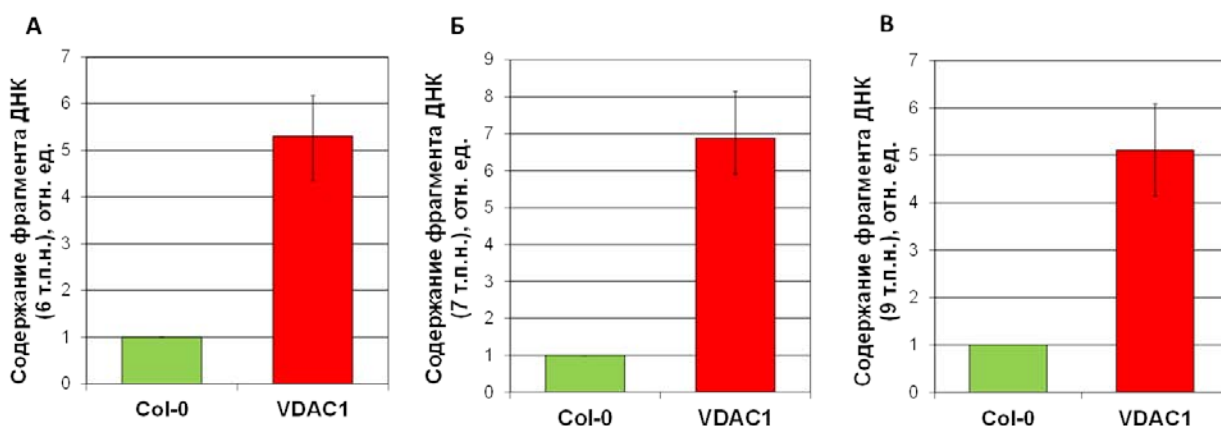


Рис. 1. Анализ эффективности импорта трех фрагментов ДНК большого размера в митохондрии протопластов арабидопсиса дикого типа (Col-0) и мутанта *vdac1* *in vivo*.

На рисунке показано относительное количество ДНК фрагментов размером 6 т.п.н. (А), 7 т.п.н. (Б) и 9 т.п.н. (В), нормированное к содержанию фрагмента гена *NAD4* (митохондриальная ДНК). Количество импортированной ДНК в митохондриях линии *Col-0* принято за 1.

Импорт ДНК в митохондрии, изолированные из линий арабидопсиса *vdac1* и *vdac3*, у которых инактивированы изоформы порина VDAC1 или VDAC3, был осуществлен исходя из того, что для этих линий оказалось возможным выращивать достаточное для выделения органелл количество растительного материала, в отличие от частично стерильных линий *vdac2* и *vdac4*. Показано, что VDAC1 или VDAC3 транспортируют ДНК с большей эффективностью в сравнении с митохондриями дикого типа. При этом, повышенный уровень активности митохондриального импорта у этих мутантов не является специфичным в отношении длины транспортируемой молекулы ДНК: для всех трех тестируемых субстратов, малой (0,27 т.п.н.) и средней (0,85 и 2,7 т.п.н.) длины, мы наблюдали стимуляцию процесса. Следует отметить, что импорт фрагмента 0,27 т.п.н. в митохондрии обоих мутантов был более эффективным (в 5 раз для мутанта *vdac1* и в 3 раза для мутанта *vdac3*) в сравнении с импортом в митохондрии дикого типа, чем импорт фрагментов 0,85 / 2,7 т.п.н. Исходя из представленных данных, следует также, что уровень импорта ДНК, как малой, так и средней длины, существенно выше в митохондриях, изолированных из проростков мутанта *vdac1*, чем в митохондриях мутанта *vdac3*. По-видимому, отсутствие одной из изоформ порина, VDAC1 или VDAC3, может вызывать конформационные изменения в поре, способствуя более эффективной

транслокации фрагментов ДНК. Можно предположить, что VDAS выполняет регуляторную и/или барьерную роль в импорте ДНК.

С помощью разработанного в ходе выполнения работы *in vivo* метода изучения импорта ДНК в митохондрии с использованием протопластов арабидопсиса установлено, что находящаяся в цитоплазме растительной клетки ДНК активно поступает в митохондрии. При трансформации протопластов, полученных из листьев растений арабидопсиса дикого типа (*Col-0*) и мутантной линии *vdac1*, у которой инактивирована изоформа порина VDAS1, набором ДНК-субстратов различной длины (2,7-9 т.п.н.) обнаружено, что для всех использованных субстратов характерна достоверно более высокая активность импорта в митохондрии протопластов линии *vdac1* (рис.1). Эти данные хорошо согласуются с результатом, полученным в экспериментах по импорту ДНК в митохондрии линий *Col-0* и *vdac1* в системе *in organello*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-04-00603), с использованием оборудования ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН.

Литература

- Зоров Д.Б. Митохондриальный транспорт нуклеиновых кислот. Участие бензодиазепинового рецептора // Биохимия. – 1996. – Т. 61. – С. 1320–1332.
- Константинов Ю.М., Дмитриш А., Вебер-Лотфи Ф., Ибрагим Н., Клименко Е.С., Тарасенко В.И., Болотова Т.А., Кулинченко М.В. Импорт ДНК в митохондрии // Биохимия. – 2016. – Т. 81, № 10. – С. 1307–1321.
- Haferkamp I., Schmitz-Esser S. The plant mitochondrial carrier family: functional and evolutionary aspects // Front. Plant Sci. – 2012. – V.3. doi: 10.3389/fpls.2012.00002.
- Ibrahim N., Handa H., Cosset A., Koulintchenko M., Konstantinov Y., Lightowlers R.N., Dietrich A., Weber-Lotfi F. DNA delivery to mitochondria: sequence specificity and energy enhancement // Pharm. Res. – 2011. – V. 28. – P. 2871–2882.
- Koulintchenko M., Konstantinov Y., Dietrich, A. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex // EMBO J. – 2003. – V. 22. – P. 1245–1254.
- Lindemann P., Koch A., Degenhardt B., Hause G., Grimm B., Papadopoulos V. A novel Arabidopsis thaliana protein is a functional peripheral-type benzodiazepine receptor // Plant and cell physiology. – 2004. – V. 45. – P. 723–733.
- Nair R., Rost B. Mimicking cellular sorting improves prediction of subcellular localization // J. Mol. Biol. – 2005. – V. 348 (1). – P. 85–100.
- Sanchez-Puerta M.V. Involvement of plastid, mitochondrial and nuclear genomes in plant-to-plant horizontal gene transfer // Acta Soc. Bot. Pol. – 2014. – V. 83. – P. 317–323.
- Tateda C., Watanabe K., Kusano T., Takahashi Y. Molecular and genetic characterization of the gene family encoding the voltage-dependent anion channel in Arabidopsis // Journal of Experimental Botany. – 2011. – V. 62 (14). – P. 4773–4785.
- Weber-Lotfi F., Ibrahim N., Boesch P., Paulus F., Cosset A., Konstantinov Y., Lightowlers R.N., Dietrich A. Developing a genetic approach to investigate the mechanism of mitochondrial competence for DNA import // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – V. 1787. – P. 320–327.
- Weber-Lotfi F., Koulintchenko M.V., Ibrahim N., Hammann P., Mileschina D.V., Konstantinov Y.M., Dietrich A. Nucleic acid import into mitochondria: New insights into the translocation pathways // Biochim. Biophys. Acta. – 2015. – V. 1853 (12). – P. 3165–3181.

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ЦИАНИД-РЕЗИСТЕНТНОЙ ОКСИДАЗЫ В МИТОХОНДРИЯХ ИЗ ЛИСТЬЕВ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ

О.А. Боровик¹, О.И. Грабельных^{1,2}

¹ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, email: ol.borovik@mail.ru

²ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, Иркутск

Альтернативную цианид-резистентную оксидазу (АО) растений называют белком «выживания», так как активация экспрессии ее генов происходит под действием широкого спектра стрессовых воздействий. Однако остается множество вопросов о функционировании АО в митохондриях и механизмах ее регуляции в стрессовых условиях. Дыхание и фотосинтез занимают центральную роль в метаболизме растительной клетки, и устойчивость этих процессов к действию стрессовых факторов крайне важна для поддержания жизнедеятельности и является определяющим фактором для адаптации растений (Туманов, 1979; Климов, 1998). В последние годы появляется все больше информации о возможном участии АО в становлении фотосинтетического аппарата растений и его защите от фотоингибирования при избыточном освещении (Noguchi and Yoshida, 2008; Garmash et al., 2015; Zhang et al., 2017). Участие митохондрий, в частности альтернативного цианид-резистентного пути дыхания, связанного с функционированием АО, в формировании механизмов защиты растений от низкотемпературного стресса в настоящее время очевидно. Ранее нам было показано, что низкие температуры приводят к активации АО в митохондриях как из этиолированных проростков и листьев, так и из зеленых листьев (Grabelnych et al., 2014; Borovik and Grabelnych, 2016, 2017). Выявлена зависимость функционирования альтернативного цианид-резистентного пути дыхания от обеспеченности растений сахарами при действии низкой температуры и морозоустойчивостью растений (Grabelnych et al., 2014; Borovik and Grabelnych, 2016, 2017). Повышение активности АО при окислении митохондриями глицина после холодового закаливания в условиях непрерывного освещения указывает на важную роль АО в поддержании процессов фотодыхания в условиях низкой температуры (Borovik and Grabelnych, 2017). О функционировании альтернативной оксидазы в митохондриях при действии на растения высоких температур известно очень мало, в основном эти данные связаны с влиянием высокой температуры на уровень экспрессии ее генов. В связи с этим целью работы явилось изучение влияния теплового закаливания и последующего теплового стресса на функционирование альтернативного цианид-резистентного пути дыхания и оценка зависимости его функционирования от теплоустойчивости растений и содержания в листьях водорастворимых углеводов. В работе были использованы зеленые растения яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. (сорт Новосибирская 29). Растения были выращены, закалены и подвергнуты стрессовым обработкам в камерах тепла/холода «Binder» опытной станции Фитотрон СИФИБР СО РАН. Растения выращивали при температуре 23/20 °C (день/ночь), 16 часовом фотопериоде. Освещенность при выращивании, закаливании и стрессировании – 200-250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Тепловое закаливание растений осуществляли при 39 °C в течение 3 ч и 24 ч на свету. Закаленные и контрольные растения были подвергнуты действию стрессирующей температуры 50 °C в течение 1, 3 и 5 ч. Анализировали выживаемость растений, содержание водорастворимых углеводов, интенсивность дыхания, активность цитохромного и альтернативного цианид-резистентного путей дыхания. Для анализа содержания в листьях белков теплового шока (БТШ), водорастворимых углеводов и изолирования из листьев митохондрий использовалась средняя часть листа. Эффективность

теплового закаливания определяли по выживаемости растений после теплового стресса и накоплению в листьях БТШ. Выживаемость оценивалась по выходу электролитов из клеток листьев после закаливания и стрессовых обработок. Дыхательную активность изолированных из листьев митохондрий изучали полярографическим методом. В качестве субстрата дыхания использовали 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата. Для ингибирования цитохромного пути дыхания использовали 1,2 мМ KCN (ингибитор цитохром *c* оксидазы), для ингибирования альтернативного цианид-резистентного пути дыхания – 3 мМ БГК (ингибитор АО).

Тепловое закаливание эффективно повышало теплоустойчивость растений. После закаливания и последующего теплового стресса в листьях яровой пшеницы было отмечено изменения в содержании БТШ. Закаливание приводило к увеличению содержания водорастворимых углеводов в листьях в 2 раза, что указывает на эффективную работу фотосинтетического аппарата в условиях повышенных температур. Не было отмечено положительной корреляции между содержанием водорастворимых углеводов и интенсивностью дыхания. После теплового закаливания наблюдали увеличение содержания водорастворимых углеводов; дыхательная активность митохондрий значительно не изменялась, однако было отмечено значительное увеличение вклада в дыхание альтернативного цианид-резистентного пути. Увеличение вклада АО в дыхание на фоне повышенного содержания водорастворимых углеводов в листьях указывает на ее важную роль в адаптации фотосинтезирующих растений к высоким температурам. Вероятно, что активация АО при повышенных температурах позволяет поддерживать функционирование не только митохондрий, но и фотосинтетического аппарата хлоропластов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-74-10096).

Литература

Грабельных О.И., Боровик О.А., Таусон Е.Л., Побежимова Т.П., Катыхов А.И., Павловская Н.С., Королева Н.А., Любушкина И.В., Баимаков В.Ю., Попов В.Н., Боровский Г.Б., Войников В.К. Митохондриальные энергорассеивающие системы (альтернативная оксидаза, разобщающие белки и «внешняя» NADH-дегидрогеназа) вовлечены в развитие морозоустойчивости проростков озимой пшеницы // Биохимия. – 2014. – Т. 79, вып. 6. – С. 647–662.

Климов С.В. Повышенное соотношение фотосинтез/дыхание при низких температурах – важное условие холодостойкости озимой пшеницы // Физиология растений. – 1998. – Т. 45, № 3. – С. 419–424.

Туманов И.И. Физиология закаливания и морозостойкости растений. – М.: Наука, 1979. – 352 с.

Borovik O.A., Grabelnykh O.I. Distribution of the respiratory pathways in the isolated mitochondria from etiolated leaves of winter wheat and rye after the action of low temperature // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – 2016. – V. 12, N 4. – P. 38–49.

Borovik O., Grabelnykh O. The relationships among an activity of the alternative pathway respiratory flux, a content of carbohydrates and a frost-resistance of winter wheat // FEBS Journal. – 2017. – V. 284, Suppl. 1. – P. 366–367.

Garmash E.V., Grabelnykh O.I., Velegzhaninov I.O., Borovik O.A., Dalke I.V., Voinikov V.K., Golovko T.K. Light regulation of mitochondrial alternative oxidase pathway during greening of etiolated wheat seedlings // J. Plant Physiol. – 2015. – V. 1, N 174. – P. 75–84.

ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ «ВНЕШНЕЙ» NADH-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ (NDB2) МИТОХОНДРИЙ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ И СТРЕССОВЫЕ БЕЛКИ АРАБИДОПСИСА

Г.Б. Боровский¹, S.K. Panda², М.Б. Бороздина¹, А.И. Катыев¹,
Н.Е. Коротаева¹, И.В. Федосеева¹, А.В. Федяева¹

¹ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, borovskii@sifibr.irk.ru

²Assam University, Silchar, India, drskpanda@gmail.com

Кодируемая геном *ndb2* арабидопсиса NAD(P)H-дегидрогеназа является одним из компонентов альтернативного дыхательного пути, играющего существенную роль в таких физиологических процессах как термогенез, регуляция уровня АФК и энергетического баланса в клетках растений (Park et al., 2012). У арабидопсиса компоненты энергорассеивающих митохондриальных систем кодируются несколькими небольшими семействами генов, такими как гены NAD(P)H-дегидрогеназ II типа (*nda1-2*, *ndb1-4* и *ndc1*), альтернативных оксидаз (*aox1a-d*, *aox2*) и разобщающих белков (*ucp1-3*) (Park et al., 2012). NAD(P)H-дегидрогеназы II типа могут быть локализованы на внешней (NDB1-4) или внутренней поверхности внутренней митохондриальной мембраны (NDA1-2, NDC1), в соответствии с этим они подразделяются на внешние и внутренние NDII. Согласно данным Elhafez с соавторами для эффективного окисления NAD(P)H митохондриального матрикса и цитозоля достаточно экспрессии генов *nda2*, *ndb2* и *aox1*, которая меняется координированно в различных условиях, в то время как экспрессия генов *ndc1* и *nda1* изменяется при этом противоположным образом. Экспрессия генов *ucp1* и *ucp2* не координирована в большинстве случаев с экспрессией генов NDII и альтернативной оксидазы (Elhafez et al., 2006). Суммируя имеющиеся на текущий момент литературные данные, можно утверждать, что гены *aox1a*, *ndb2*, *nda2* играют наиболее значимую роль в клетках растений арабидопсиса в различных стрессовых условиях. Мутантных линий арабидопсиса, в которых была бы нарушена транскрибируемая последовательность гена *ndb2*, в банках семян нет, поэтому исследование функции этого гена возможно только с помощью методов генетической инженерии. Растения с пониженной экспрессией данного гена впервые удалось получить нам.

С помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) был исследован уровень экспрессии целевого гена. Были получены две линии трансформированных растений, в которых количество транскрипта гена *ndb2* примерно в 2 раза выше, чем в контрольных растениях. Растений-трансформантов с предполагаемой сниженной экспрессией интересующего нас гена (трансформированных конструкцией с геном *ndb2* в антисенс-ориентации) было получено 20 линий, в двух из которых количество мРНК гена *ndb2* снижено до 6 и 8 % по отношению к таковому у контрольных растений.

Первоочередной интерес представляло выяснение возможной координации экспрессии генов, кодирующих компоненты альтернативного пути дыхания в растениях арабидопсиса в контрольных условиях. Было показано, что при увеличении уровня экспрессии гена *ndb2* в растениях арабидопсиса наблюдается достоверное увеличение экспрессии генов, кодирующих одну из внутренних NAD(P)H дегидрогеназ - *nda2*, альтернативные оксидазы – *aox1a*, *aox1d*, *aox1b* и разобщающие белки UCP1, *ucp2* и *ucp3* (рис. 1). Если увеличение экспрессии генов *nda2* и *aox1a* было ожидаемо, то возрастание экспрессии генов *aox1d*, *aox1b* и *ucp1-3* при повышении экспрессии гена *ndb2* показано впервые. Более того, с точки зрения связи альтернативных путей транспорта электронов с устойчивостью, важно, что в контрольных условиях гиперэкспрессия гена *ndb2* вызывает рост количества транскриптов отдельных стрессовых генов, кодирую-

щих белки теплового шока (*hsp17.6b* – в 9 раз, *hsp17.7* – в 3 раза, *hsp101* – в 3,5 раза), что также продемонстрировано впервые.

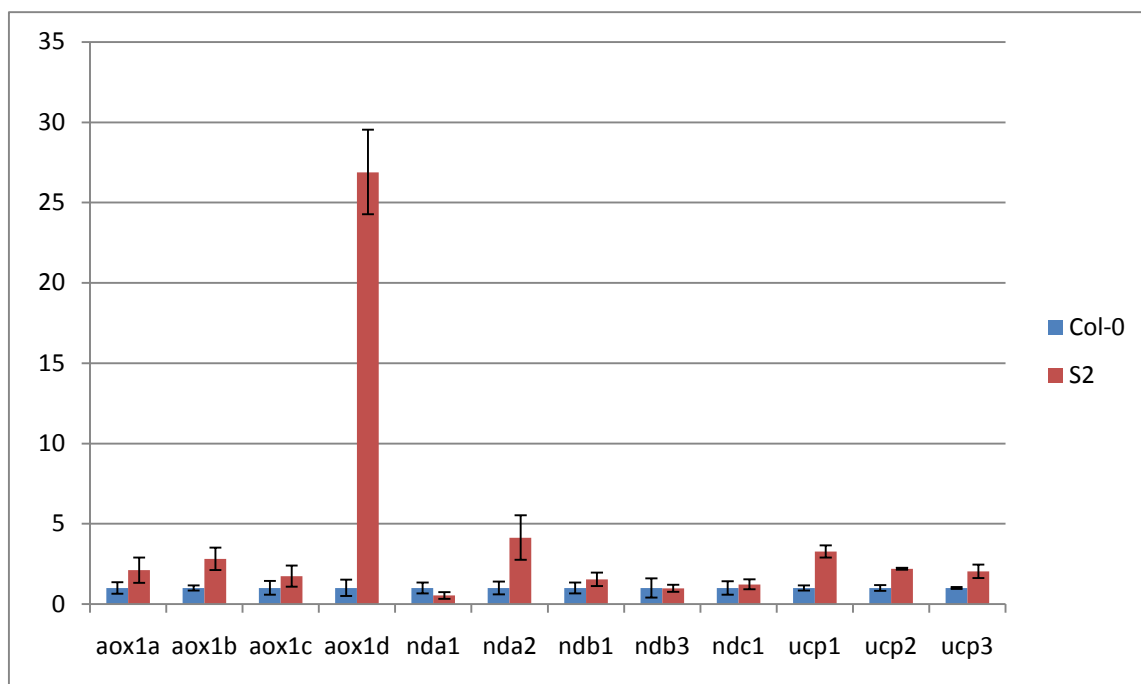


Рис. 1. Сравнительный анализ количества мРНК генов, кодирующих альтернативные NADH-дегидрогеназы, альтернативные оксидазы и разобщающие белки в контрольных растениях и растениях-гиперэкспрессорах *ndb2*.

Также был проведен предварительный анализ изменений в содержании некоторых митохондриальных (NDB и AOX) и стрессовых (HSP101, HSP17.7, HSP70) белков у растений со вставкой в сенс и антисенс ориентации. Данные показали изменения в содержании исследованных белков по сравнению с диким типом растений арабидопсиса в контрольных условиях и после теплового шока, как у тех, так и у других растений. Мы полагаем, что это явление может быть связано с содержанием АФК в растениях с гипо- или гиперэкспрессией *ndb2* и привести к изменениям в базовой и индуцированной устойчивости к различным стрессам.

Исследования роли генов NDII с использованием трансгенных растений со сниженной или повышенной экспрессией начаты относительно недавно (Smith et al., 2011; Wallstrom et al., 2014). В работе Smith с соавторами показано, что снижение экспрессии гена *ndb4* в трансгенных растениях арабидопсиса приводит к повышению экспрессии генов *ndb2* и *aox1a*, что, в свою очередь, приводит к снижению уровня генерации активных форм кислорода в клетках растений и повышенной устойчивости к солевому стрессу. Снижение уровня генерации АФК вследствие высокого уровня экспрессии гена *ndb2* позволяют сделать вывод о том, что он может играть важную роль и в реализации клеточных механизмов ответа на воздействие других стрессовых факторов, в том числе и на температурный стресс. Обнаруженная нами координация экспрессии *ndb2* с генами семейств *aox* и *ucp* в контрольных условиях показывает значительное влияние активности наружной NADH-дегидрогеназы на активность энергорассеивающих систем митохондрий растений.

Работа была поддержана грантами РФФИ 17-54-45090 и DST INT/RUS/RFBR/P-260.

Литература

Elhafez D., Murcha M.W., Clifton R., Soole K.L., Day D.A., Whelan J. Characterization of Mitochondrial Alternative NAD(P)H Dehydrogenases in Arabidopsis: Intraorganelle Location and Expression // Plant Cell Physiology. – 2006. – V. 47 (1). – P. 43–54.

Park B.S., Kim S.-I., Song J.T., Seo H.S. Arabidopsis SIZ1 positively regulates alternative respiratory bypass pathways // BMB Reports. – 2012. – V. 45 (6). – P. 342–347.

Smith C., Barthet M., Melino V., Smith P., Day D., Soole K. Alterations in the Mitochondrial Alternative NAD(P)H Dehydrogenase NDB4 Lead to Changes in Mitochondrial Electron Transport Chain Composition, Plant Growth and Response to Oxidative Stress // Plant Cell Physiology. – 2011. – V. 52 (7). – P. 1222–1237.

Wallstrom S.V., Florez-Sarasa I., Araujo W.L., Escobar M.A., Geisler D.A., Aidemark M., Lager I., Fernie A.R., Ribas-Carbo M., Rasmusson A.G. Suppression of NDA-Type Alternative Mitochondrial NAD(P)H Dehydrogenases in Arabidopsis thaliana Modifies Growth and Metabolism, but not High Light Stimulation of Mitochondrial Electron Transport // Plant Cell Physiology. – 2014. – V. 55 (5). – P. 881–896.

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ МЕТАБОЛИЗМА ХЛОРОФИЛЛОВ У ДВОЙНОГО НОКАУТ-МУТАНТА *ARABIDOPSIS THALIANA* ПО ГЕНАМ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВЫДЕРЖИВАНИИ РАСТЕНИЙ В ТЕМНОТЕ

Д.В. Вильянен¹, Е.Ю. Гарник², В.И. Тарасенко², Ю.М. Константинов²

¹ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет,

Иркутск, e-mail: akella_lksm@mail.ru

²ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,

Иркутск, e-mail: elga74@yandex.ru

Состав и содержание хлорофиллов у растений регулируется как стадией развития, так и внешними условиями (Lim et al., 2007). Известно, что воздействие внешних факторов (холода или тепла, засухи, отсутствия света) может запустить процесс индуцированного старения, который сопровождается, в первую очередь, снижением содержания хлорофиллов и изменением их состава, и визуально проявляется пожелтением листьев (Ougham et al., 2008). Однако в условиях длительного отсутствия света двойной нокаут-мутант *Arabidopsis thaliana* по генам NAD-зависимой глутаматдегидрогеназы демонстрирует более медленное пожелтение, чем растения арабидопсиса дикого типа. Это указывает на возможную связь между функцией глутаматдегидрогеназы и регуляцией экспрессии генов, ответственных за синтез или распад хлорофиллов.

Прекурсором к синтезу всех тетрапирролов является 5-аминолевулиновая кислота (АЛК), поэтому о синтезе хлорофиллов можно судить по экспрессии генов, регулирующих ее биосинтез. Первым из них является *GRS*, который кодирует глутамил-тРНК синтетазу. Следующий ген – *HEMA1* – кодирует глутамил-тРНК редуктазу и регулирует лимитирующую реакцию в биосинтезе АЛК. Ген *GSA1* кодирует глутамат-полуальдегид аминотрансферазу, которая катализирует завершающую реакцию в процессе биосинтеза АЛК (Tanaka et al., 2011).

Распад хлорофиллов, в свою очередь, также регулируется экспрессией ряда генов, среди которых *NYC1*, *PPH*, *PAO*, *SGR1*, *SGR2*, *SGRL* (рис. 1). *NYC1* кодирует хлорофилл *b*-редуктазу, *PAO* – феофорбид *a* оксигеназу, *PPH* – феофитиназу. Гены *SGR1*, *SGR2*, *SGRL* кодируют белки семейства *SGR*, обеспечивающие разборку хлорофилл-белковых комплексов и регулирующие распад хлорофиллов (Tanaka et al., 2011).

В данной работе мы использовали растения арабидопсиса двух линий – дикий тип *Col-0* и двойной нокаут-мутант *gdh1gdh2* – и отслеживали изменения в содержании и составе хлорофиллов при длительном выдерживании растений в темноте. Для этого арабидопсис выращивали в чашках Петри в течение двадцати одного дня, затем убирали в темноту на 0, 4 и 7 суток. Хлорофиллы экстрагировали 80 % ацетоном на холоду (Porra et al., 1989). Содержание и состав хлорофиллов определяли спектрофотометрически, расчет вели по формулам (Ni et al., 2009):

$$C_a = 12,7 * A_{663} - 2,69 * A_{645} \text{ (Chlorophyll } a\text{)}$$

$$C_b = 22,9 * A_{645} - 4,86 * A_{663} \text{ (Chlorophyll } b\text{)}$$

$$C_{a+b} = 8,02 * A_{663} + 20,20 * A_{645} \text{ (Chlorophyll } a+b\text{)}$$

Мы обнаружили, что при выдерживании растений арабидопсиса в темноте более 4 суток происходит снижение содержания как хлорофилла *a*, так и хлорофилла *b*. Через 4 суток в темноте общее содержание хлорофилла у линии *Col-0* снижалось наполовину, через 7 суток снижение продолжалось. У растений *gdh1gdh2* снижение содержания хлорофиллов было выражено существенно слабее (рис. 2).

Снижение содержания хлорофиллов завершалось в течение 6–7 суток у обеих исследуемых линий, однако остаточное содержание хлорофиллов у *Col-0* составляло от 20 до 30 %, у *gdh1gdh2* – от 55 до 60 % (рис. 2). Таким образом, разрушение хлорофиллов у мутанта происходило менее эффективно. У растений *gdh1gdh2* проявлялась тенденция к снижению соотношения хлорофиллов *a/b* в течение 4–7 суток в темноте вследствие относительно более медленного снижения содержания хлорофилла *b*.

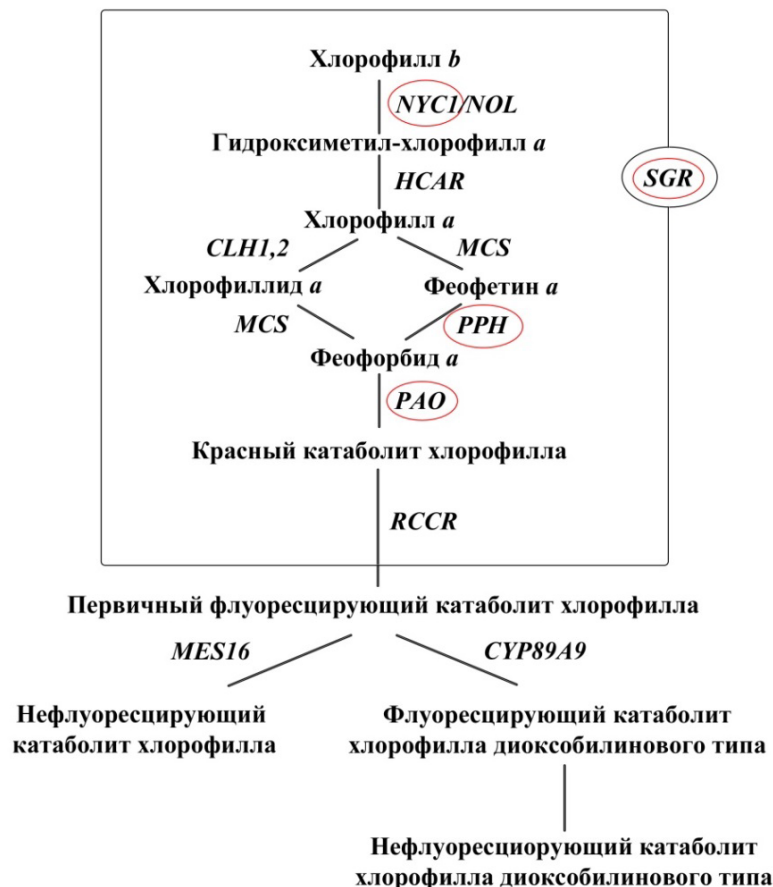


Рис. 1. Схема распада хлорофиллов (по: Oda-Yamamizo et al., 2016).

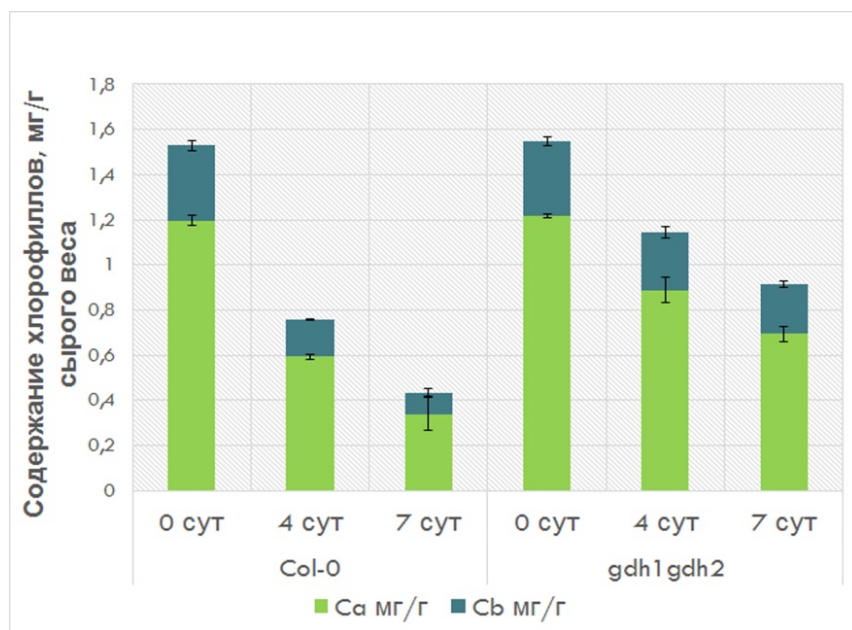


Рис. 2. Содержание и состав хлорофиллов в розетках арабидопсиса после 0, 4 и 7 суток в темноте.

В каждый момент времени содержание хлорофиллов в живой фотосинтезирующей ткани отражает баланс двух процессов: синтеза хлорофиллов и их распада. В целях изучения экспрессии генов, ответственных за синтез и распад хлорофиллов, мы исследовали экспрессию 6 генов, отвечающих за деградацию хлорофиллов (*NYC1*, *PPH*, *PAO*, *SGR1*, *SGR2*, *SGRL*), и 3 генов, регулирующих синтез АЛК (*GRS*, *HEMA1*, *GSA1*), методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией. Экспрессия всех исследованных генов изменялась в процессе индуцированного темнотой старения. При выдерживании растений *Col-0* и мутанта *gdh1gdh2* в течение 4 суток в темноте значительные различия в профиле экспрессии наблюдали для генов *PAO* и *SGR2*. После 7 суток пребывания в темноте экспрессия обоих генов оставалась практически неизменной по сравнению с точкой «4 суток» для обеих линий. Существенных различий в экспрессии генов, обеспечивающих синтез АЛК (*GRS*, *HEMA1* и *GSA1*), между линиями не обнаружено. Это может свидетельствовать о том, что более медленное снижение содержания хлорофиллов у мутанта обуславливается нарушением их распада, а не ускорением синтеза.

Таким образом, индуцированное темнотой старение у мутанта арабидопсиса по генам NAD-зависимой глутаматдегидрогеназы *gdh1gdh2* развивается иначе, чем у линии дикого типа *Col-0*. Снижение содержания хлорофиллов у мутанта происходит значительно медленнее. Ряд генов, ответственных за деградацию хлорофиллов (*PAO*, *SGR2*), в мутантных растениях экспрессируются на более низком уровне, чем у растений *Col-0*, при одних и тех же сроках выдерживания в темноте. Обнаруженные факты хорошо согласуются с визуальными наблюдениями – менее выраженное пожелтение листьев у мутантных растений при длительном выдерживании их в темноте.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН.

Литература

- Lim P.O., Kim J.H., Nam H.G.* Leaf Senescence // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2007. – Vol. 58. – P. 115–136.
- Ni Z., Kim E.D., Ha M., Lackey E., Liu J., Zhang Y., Sun Q., Chen Z.J.* Altered circadian rhythms regulate growth vigor in hybrids and allopolyploids // *Nature.* – 2009. – Vol. 457. – P. 327–331.
- Oda-Yamamizo C., Mitsuda N., Sakamoto S., Ogawa D.* The NAC transcription factor ANAC046 is a positive regulator of chlorophyll degradation and senescence in Arabidopsis leaves // *Scientific Reports.* – 2016. – Vol. 6. – e23609.
- Ougham H., Hörtensteiner S., Armstead I., Donnison I., King I., Thomas H., Mur L.* The control of chlorophyll catabolism and the status of yellowing as a biomarker of leaf senescence // *Plant Biology.* – 2008. – Vol. 10. – P. 4–14.
- Porra R.J., Thompson W.A., Kriedemann P.E.* Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 1989. – Vol. 975. – P. 384–394.
- Tanaka R., Kobayashi K., Masuda T.* Tetrapyrrole metabolism in *Arabidopsis thaliana* // *The Arabidopsis Book.* – 2011. – e0145.

ОСОБЕННОСТИ ИНДУЦИРОВАННОГО СТАРЕНИЯ ЛИСТЬЕВ У ДВОЙНОГО НОКАУТ-МУТАНТА *ARABIDOPSIS THALIANA* ПО ГЕНАМ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

А.А. Власова¹, Е.Ю. Гарник², В.И. Бельков², В.И. Тарасенко², Ю.М. Константинов²

¹ ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет,
Иркутск, e-mail: anfi98@bk.ru

² ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: elga74@yandex.ru

Глутаматдегидрогеназа (GDH, EC1.4.1.2) катализирует окислительное дезаминирование глутамата до 2-оксоглутарата, а также обратную реакцию. Поскольку превращение этих метаболитов является связующим звеном между метаболизмом С и N в растениях, GDH, локализованная в митохондриях, играет важную роль в метаболизме растений. В растениях *Arabidopsis thaliana* были клонированы и охарактеризованы три гена, кодирующие GDH, два из которых – *GDH1* и *GDH2* – ответственны за большую часть активности GDH у арабидопсиса (Fontaine et al., 2013).

Существует жизнеспособный двойной нокаут-мутант по генам GDH *gdh1gdh2* (Miyashita and Good, 2008). Нами обнаружено, что мутант *gdh1gdh2* при длительном (4 суток и более) выдерживании растений в темноте сохраняет зеленый цвет листьев, в отличие от растений дикого типа *Col-0*, листья которых при этом желтеют (рис. 1). Это явление (пожелтение и отмирание листьев при длительном выдерживании в темноте) называется индуцированным старением (Lim et al., 2007).

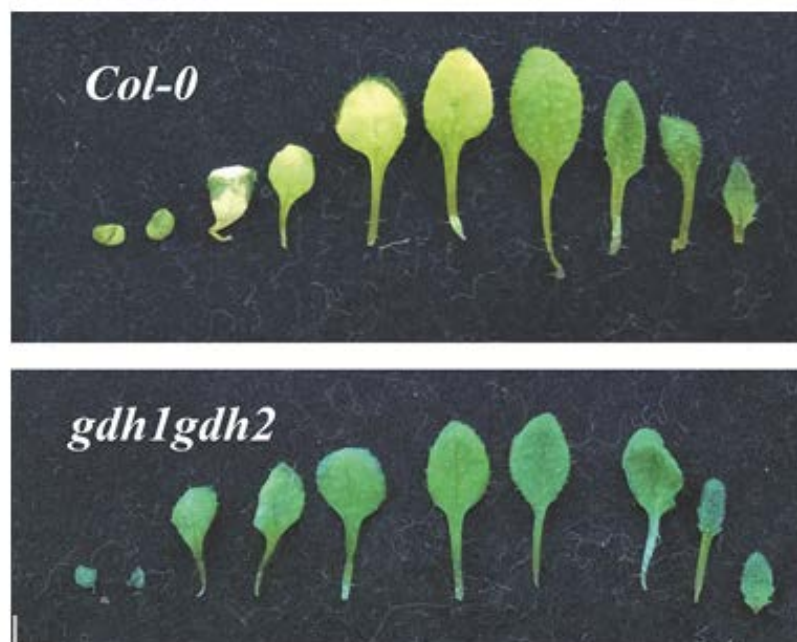


Рис. 1. Полные наборы листьев растений дикого типа Col-0 и мутанта *gdh1gdh2* после 4 суток выдерживания растений в темноте.

Для того, чтобы проследить, как развивается индуцированное старение листа у растений дикого типа и у мутантных, растения выращивали до возраста 3 недели в чашках Петри, либо 4 недели на земле (стадия вегетации), после этого выдерживали в темноте до 6 суток. Собирали для растений дикого типа отдельно желтые, желтеющие и зеленые листья, для растений *gdh1gdh2* – типично окрашенные листья. Выделяли

РНК и оценивали экспрессию генов методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией.

Так как разрушение хлорофилла – главный признак индуцированного старения, а у мутантных растений пожелтение листьев замедлено, то мы исследовали экспрессию генов, ответственных за распад хлорофиллов. Были исследованы следующие гены: *NYC1* – кодирует хлорофилл b-редуктазу, участвующую в деградации хлорофилла b. *PAO* – кодирует феофорбид a оксигеназу, катализирующую превращение феофорбида a в красный катаболит. *PPH* – кодирует феофитиназу, участвующую в деградации хлорофилла. Семейство генов *SGR* (*SGR1*, *SGR2* и *SGRL*) – кодирует группу белков, обеспечивающих разборку хлорофилл-белковых комплексов фотосинтетического аппарата и регуляцию распада хлорофиллов (Tanaka et al., 2011).

Нами обнаружено, что у растений дикого типа по ряду генов экспрессия различается на разных стадиях старения листа: гены экспрессируются на низком уровне в зеленом листе и на высоком уровне в желтеющем. В полностью пожелтевшем листе гены, отвечающие за распад хлорофиллов, экспрессируются либо слабо (*PAO*, *SGR2*), либо на том же уровне, что и в желтеющем листе (*NYC1*, *PPH*, *SGR1*). Вероятно, такие профили экспрессии связаны с завершением распада хлорофиллов. Экспрессия тех же генов в листьях мутанта *gdh1gdh2* находится на таком же низком уровне, как в зеленом листе дикого типа. Это свидетельствует либо о нарушении программы распада хлорофиллов в листьях мутантных растений (что хорошо согласуется с замедлением пожелтения листьев), либо о более раннем начале гибели их листьев. Ранее было показано, что при длительном выдерживании в темноте мутант *gdh1gdh2* начинает погибать раньше, чем растения дикого типа (Miyashita and Good, 2008).

Таким образом, нами обнаружено, что нокаут-мутации по генам *GDH1* и *GDH2* приводят к нарушению механизма развития индуцированного старения.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН.

Литература

Fontaine J.-X., Terce-Laforgue T., Bouton S., Pageau K., Lea P.J., Dubois F., Hirel B. Further insights into the isoenzyme composition and activity of glutamate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* // Plant Signalling and Behavior. – 2013. – Vol. 8, N 3. – e23329.

Lim P.O., Kim J.H., Nam H.G. Leaf senescence // Annu. Rev. Plant Biol. – 2007. – Vol. 58. – P. 115–136.

Miyashita Y., Good A.G. NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation // Journal of Experimental Botany. – 2008. – Vol. 59, N 3. – P. 667–680.

Tanaka R., Kobayashi K., Masuda T. Tetrapyrrole metabolism in *Arabidopsis thaliana* // The Arabidopsis Book. – 2011. – e0145.

МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ ПРИ СТРЕССЕ И АДАПТАЦИИ К ГИПО- И ГИПЕРТЕРМИИ

*О.И. Грабельных^{1,2}, Т.П. Побежимова¹, Н.С. Забанова^{1,2},
О.А. Боровик¹, В.К. Войников¹*

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

²ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет,

Иркутск, e-mail: grolga@sifibr.irk.ru

Митохондрии играют важную роль в энергетическом метаболизме растительной клетки, в процессах адаптации и гибели при стрессе. В нефотосинтезирующих частях растений митохондрии и их электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) вносят основной вклад в продукцию активных форм кислорода (АФК) в клетке (Møller, 2001). При стрессе повышение концентрации АФК в клетке до определенного уровня приводит к запуску защитных реакций (адаптации), а избыточная генерация АФК – к запуску программы клеточной гибели (Креславский и др., 2012; Suzuki, Mittler, 2006). Одним из факторов, вызывающих развитие окислительного стресса в растительных клетках, является неблагоприятная температура – как высокая, так и низкая (Грабельных и др., 2014б; Федяева и др., 2014). Повышение устойчивости растений к перенесению неблагоприятных низких температур происходит в результате низкотемпературной адаптации (холодового закаливания), а к действию же высоких температур – с помощью механизма индуцированной термотолерантности. При низкотемпературной адаптации повышение содержания АФК сопровождается активацией экспрессии ряда холодо-регулируемых генов (cold-regulated, COR-генов) (Suzuki, Mittler, 2006), также как при действии умеренно высокой температуры АФК активируют экспрессию генов белков теплового шока (БТШ) (Volkov et al., 2006). На этиолированных проростках озимой пшеницы показано, что митохондрии являются основным источником генерации АФК при температурном стрессе (Грабельных и др., 2014б). АФК, образующиеся в митохондриях, могут выступать в качестве сигнальных молекул, участвующих в передаче внутриклеточных сигналов, регуляции экспрессии стрессовых генов и активации защитных систем клетки или запуске программ клеточной гибели (Gray et al., 2004; Rhoads et al., 2006). Альтернативные ферменты ЭТЦ митохондрий растений (альтернативная оксидаза (АО) и альтернативные rotenon-нечувствительные НАД(Ф)-Н-дегидрогеназы (НАД(Ф)-Н-ДГ типа II – NDA, NDB)), а также свободные жирные кислоты (СЖК) и связанные с ними разобщающие белки (подобные термогенину животных, UCP-подобные белки) могут регулировать образование АФК в митохондриях и клетке, участвуя в реализации защитной программы или программы клеточной гибели (Грабельных, 2005; Грабельных и др., 2014а). В настоящей работе нами проведен сравнительный анализ функционального состояния митохондрий при действии на растения низких и высоких закаливающих и повреждающих температур, на основании таких параметров как содержание в митохондриях АФК, интактность наружной мембраны, окислительная и фосфорилирующая активность, содержание стрессовых белков, содержание и активность альтернативных ферментов ЭТЦ. Обсуждается связь между функциональной активностью растительных митохондрий при гипо- и гипертермии, жизнеспособностью растений и синтезом стрессовых белков.

В качестве объекта исследования использовали этиолированные проростки озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. (сорт «Иркутская»). Закаливание 3-х сут проростков к низкой температуре проводили при 2 °С в течение 7 сут, к высокой – при 37 °С в течение 2 и 24 ч. Холодовой шок вызывали действием на проростки отрицательной температуры -8 °С (6 ч), тепловой шок – действием высокой температуры 47 °С (30 мин).

Анализировали жизнеспособность проростков, содержание в тканях побегов АФК и стрессовых белков (дегидринов, БТШ), содержание в митохондриях АФК, проницаемость наружной мембраны митохондрий для экзогенного цитохрома *c*, окислительную и фосфорилирующую активность изолированных из побегов проростков митохондрий (дыхание в состояниях 3 и 4, коэффициент дыхательного контроля – ДК, АДФ:О, транспорт электронов по цитохромному и альтернативному путям), содержание в митохондриях дегидринов, БТШ, АО, NDA, NDB, UCP.

Установлено, что холодовой шок приводит к гибели проростков озимой пшеницы, сопровождающейся значительным повышением генерации АФК в тканях побегов и в изолированных из них митохондриях (Грабельных и др., 2014б). Обнаружена прямая зависимость между генерацией АФК и степенью интактности митохондрий, их окислительной и фосфорилирующей активностью. Вероятной причиной ингибирования окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий был выход цитохрома *c* из митохондрий. Установлено резкое снижение скорости окисления митохондриями малата, что указывает на повреждение комплекса I ЭТЦ митохондрий при гипотермии. Снижение окислительной активности митохондрий при холодовом шоке сопровождалось ингибированием активности АО и UCP-подобных белков. Холодовое закаливание проростков озимой пшеницы повышало морозоустойчивость, индуцировало синтез дегидринов (в том числе в митохондриях), снижало генерацию АФК при последующем холодовом шоке как в интактных тканях, так и в изолированных митохондриях. В результате этих событий сохранялась целостность мембран митохондрий и способность органелл осуществлять окислительное фосфорилирование при холодовом шоке. Холодовое закаливание активировало транспорт электронов через АО, индуцировало повышение в митохондриях содержания белков АО и UCP1/2, которые, вероятно, участвуют в поддержании необходимого про/антиоксидантного статуса клеток при гипотермии.

Тепловой шок снижал выживаемость проростков озимой пшеницы, приводил к генерации АФК в тканях побегов и в изолированных из них митохондриях. Повышение содержания АФК в митохондриях сопровождалось снижением интактности мембран митохондрий, резким ингибированием их окислительной и фосфорилирующей активности. Так же как и при действии низкой температуры, обнаружено значительное снижение окислительной активности митохондрий при окислении малата, что указывает на то, что комплекс I ЭТЦ митохондрий – НАДН: убихинон оксидоредуктаза является критическим звеном среди компонентов дыхательной цепи в ответной реакции на температурный стресс. Все негативные последствия теплового шока предотвращались предварительным воздействием на проростки закаливающей температуры (37°C). Воздействие этой температурой в течение 2 и, особенно, 24 часов, приводило к росту теплоустойчивости, связанному с синтезом БТШ (Hsp101, Hsp70, Hsp17,6) в тканях побегов. Эти изменения, наряду с повышением содержания в митохондриях белка и активности АО (через 24 ч воздействия), вероятно, способствовали снижению генерации АФК и сохранению интактности и окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий при последующем тепловом шоке. Поскольку Hsp101 и Hsp17,6 обнаруживались в митохондриях, то можно предполагать, что от взаимодействия БТШ с митохондриями зависит функционирование дыхательной цепи и способность растительных клеток адаптироваться к гипертермии. Примечательно, что на начальном этапе теплового закаливания (2 ч) активность «внутренних» ротенон-нечувствительных НАД(Ф)-Н-ДГ и «внешней» НАДФ-Н-ДГ снижалась, а затем по мере увеличения длительности закаливания (24 ч) возвращались до контрольного уровня. Следует заметить, что аналогичные изменения в активности данных ферментов наблюдали при холодовом закаливании озимой пшеницы (Грабельных и др., 2014а). Высокая скорость окисления экзогенного НАД·Н в митохондриях озимой пшеницы при холодовом и тепловом воздействиях указывает на важную роль «внешней» НАД·Н-ДГ в поддержании функционального состояния митохондрий в гетеротрофных тканях растений при гипо- и гипертермии.

Таким образом, для выживаемости растительных клеток при гипо- и гипертермии важную роль играет их способность синтезировать стрессовые белки, ограничивать развитие окислительного стресса и сохранять функциональную активность митохондрий. Участие альтернативных ферментов дыхания (АО и NDB) необходимо для развития адаптивных реакций и функционирования клетки при температурном стрессе.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 15-04-06533-а.

Литература

Грабельных О.И. Энергетические функции растительных митохондрий в стрессовых условиях // Журнал стресс-физиологии и биохимии. – 2005. – Т. 1. – С. 37–54.

Грабельных О.И., Боровик О.А., Таусон Е.Л., Побежимова Т.П., Катыхиев А.И., Павловская Н.С., Королева Н.А., Любушкина И.В., Баишаков В.Ю., Попов В.Н., Боровский Г.Б., Войников В.К. Митохондриальные энергорассеивающие системы (альтернативная оксидаза, разобщающие белки и «внешняя» NADH-дегидрогеназа) вовлечены в развитие морозоустойчивости проростков озимой пшеницы // Биохимия. – 2014а. – Т. 79. – С. 645–660.

Грабельных О.И., Кириченко К.А., Побежимова Т.П., Боровик О.А., Павловская Н.С., Любушкина И.В., Королева Н.А., Войников В.К. Влияние холодового шока на жирнокислотный состав и функциональное состояние митохондрий закаленных и незакаленных проростков озимой пшеницы // Биологические мембраны. – 2014б. – Т. 31. – С. 204–217.

Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов Вл.В. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // Физиология растений. – 2012. – Т. 59. – С. 163–178.

Федяева А.В., Степанов А.В., Любушкина И.В., Побежимова Т.П., Рихванов Е.Г. Тепловой шок индуцирует продукцию активных форм кислорода и повышает потенциал на внутренней митохондриальной мембране в клетках озимой пшеницы // Биохимия. – 2014. – Т. 79. – С. 1476–1486.

Gray G.R., Maxwell D.P., Villarimo A.R., McIntosh L. Mitochondria/nuclear signaling of alternative oxidase gene expression occurs through distinct pathways involving organic acids and reactive oxygen species // Plant Cell Reports. – 2004. – V. 23. – P. 497–503.

Møller I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species // Plant Physiology. – 2001. – V. 52. – P. 561–591.

Rhoads D.M., Umbach A.L., Subbiah C.C., Siedow J.N. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling // Plant Physiology. – 2006. – V. 141. – P. 357–366.

Suzuki N., Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction // Physiology Plantarum. – 2006. – V. 126. – P. 45–51.

Volkov R.A., Panchuk I.I., Mullineaux P.M., Schoffl F. Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in Arabidopsis // Plant Molecular Biology. – 2006. – V. 61. – P. 733–746.

ПРИМЕНЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ГЕНА СИНТЕЗА ОСМОТИКА ДЛЯ АДРЕСНОЙ ЗАЩИТЫ ХЛОРОПЛАСТА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ПРИ АБИОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

А.А. Гулевич¹, Л.В. Куренина¹, Г.Н. Ралдугина², Е.Н. Баранова¹

¹ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, e-mail: a_gulevich@mail.ru

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

Для защиты культурных растений от осмотического стресса успешно используют трансформацию растений генами, которые усиливают синтез молекул, обладающих осмопротекторными свойствами. К одному из таких соединений, обеспечивающих эффективную защиту клеткам как некоторых прокариот, так и ряда растений, относится глицинбетаин (Park et al., 2007). У ряда почвенных бактерий он синтезируется из предшественника, холина, в один прием ферментом холиноксидазой, тогда как в растительных клетках – в несколько стадий из других предшественников и, минимум, двумя ферментами. Холин присутствует в хлоропластах клеток растений, и это позволяет воспользоваться бактериальным ферментом для проведения синтеза осмотика глицинбетаина в один прием. Для этого необходимо снабдить ген холиноксидазы сигнальной последовательностью, направляющей белковый продукт в пластиду. В генно-инженерных конструкциях наиболее распространена сигнальная последовательность малой субъединицы фермента рибулозобисфосфаткарбоксилазы (rbcS), эффективность которой в таргетинге в хлоропласт доказана довольно давно (Coruzzi et al, 1984). Таким образом, внедрением гена *codA* в ядерный геном можно придать растительным клеткам толерантность к осмотическому стрессу и в дальнейшем завизуализировать на ультраструктурном уровне происходящие при абиотических стрессах изменения внутри клеток как трансгенных, так и нетрансгенных растений. Ранее мы показали, что при таргетинге фермента FeSOD1, ответственного за первые этапы нейтрализации активных форм кислорода, происходит изменение пигментного комплекса (Широких и др., 2014), структурной организации пластид у табака и томата (Baranova et al., 2010): модификация структуры тилакоидов стромы, размера пластоглобул и крахмальных зерен, а также извилистых ламеллярных образований у нуклеоидов в хлоропластах трансгенных растений (Баранова и др., 2011).

Целью настоящей работы была оптимизация условий трансформации растений томата и табака геном *codA* для защиты хлоропластов от повреждений.

Методика. Семена табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Самсун и томата (*Solanum lycopersicon* L.) сорта Белый Налив были поверхностно стерилизованы в 70 %-ном этаноле, а затем 5–6 мин в 30 %-ном водном растворе коммерческого препарата «Белизна». Стерилизованные семена 3 раза промывали стерильной дистиллированной водой и помещали в чашки Петри на агаризованную среду Мурасиге-Скуга (MS) для прорастания. Проростки табака и томата культивировали при температуре 22–25 °С, освещенности 3000 лк и фотопериоде 12 ч (день/ночь). Для трансформации использовали фрагменты семядольных листьев, стеблей и настоящих листьев. Ранее мы сконструировали экспрессионный вектор для агробактериальной трансформации растений (Гулевич, Баранова, 2008) на основе стандартной плазмиды pBI121. Вектор pBIcodA содержал в качестве маркера ген устойчивости к канамицину NPTII и полусинтетический ген холиноксидазы *codA* из почвенной бактерии *Arthrobacter globiformis*. Этот ген находится под контролем промотора CaMV35S и снабжен синтетической хлоропластной сигналь-

ной последовательностью из гена *rbcS* томата. Конструкция была перенесена электропорацией в клетки штамма AGL0 *Agrobacterium. tumefaciens*.

После предкультивации в течение 4 сут растительные экспланты инфицировали бактерией *A. tumefaciens* штамма AGL0. Агробактериальные клетки выращивали 2 сут на качалке (180 мин⁻¹) в жидкой среде Лурия-Бертани (LB) с добавлением канамицина (40 мг/л) при температуре 28°C. Экспланты погружали в бактериальную суспензию и выдерживали в течение 1 ч, затем промывали 3 раза стерильной дистиллированной водой, обсушивали и помещали на чашки Петри с агаризованной средой MS для регенерации с добавлением регуляторов роста в трех комбинациях: 1 – 3,0 мг/л БАП + 0,2 мг/л НУК; 2 – 5,0 мг/л БАП + 0,1 мг/л НУК + 1 мг/л зеатина; 3 – 5,0 мг/л БАП + 0,2 мг/л 2,4-Д. После появления бактериального ореола вокруг эксплантов их снова промывали стерильной дистиллированной водой и помещали на среду MS для регенерации с добавлением аугментина. Через 2 нед растительные экспланты переносили на новую среду для регенерации, куда помимо антибиотиков для подавления агробактерии добавляли также канамицин в концентрации 30–50 мг/л. Для переноса на среду с канамицином отбирали экспланты с зелеными участками каллуса и развивающимися проростками, которые оценивали на наличие целевого гена методом ПЦР.

Результаты и обсуждение. Регенеранты табака и томата получали на среде MS с различным сочетанием гормонов. У обеих культур побеги из различных эксплантов появлялись через 30–40 дней после перенесения на среду для регенерации. Лучшие результаты регенерации побегов из эксплантов томата получены на среде с добавлением 1 мг/л зеатина. Частота регенерации достигала гипокотилей и семядольных листьев соответственно 60 и 35 % на среде без зеатина, в то время как наиболее значимыми были показатели на гипокотильях и настоящих листьях на среде с зеатином до 74 %. На среде без зеатина и с меньшей концентрацией БАП (3 мг/л) процент регенерации оказался ниже. Хуже всего регенерация проходила в среде с 2,4-Д вместо НУК. Частота регенерации была довольно небольшой – 6–12 %, количество регенерантов на экспланте – в среднем меньше одного, и образовывался белый каллус, не индуцирующий побеги. Для индукции побегообразования табака также лучшие результаты отмечены на среде с зеатином: частота регенерации побегов из фрагментов листьев и стеблей составляла 82–77 %, тогда как без зеатина – 61–68 %. Как и у томата, на среде с 2,4-Д вместо зеатина частота регенерации снижалась в несколько раз и составляла 22–34 %, среднее количество побегов на эксплант было меньше и наблюдали более выраженное каллусообразование вместо индукции побегов. По результатам экспериментов была выбрана среда для регенерации, содержащая 5,0 мг/л БАП, 0,1 мг/л НУК и 1,0 мг/л зеатина, которую в дальнейшем использовали для элиминации агробактерии. Аугментин (Ieamkhang et al., 2005) как антибиотик показал высокую результативность при всех изученных концентрациях. Лишь при самой низкой его концентрации в среде (100 мг/л) у отдельных эксплантов табака и томата наблюдали возобновление роста агробактерии, частота контаминации не превышала 4%. При повышении концентрации антибиотика развитие агробактерии ингибировалось полностью. Необходимо отметить, что аугментин не оказывали сильного влияния на развитие регенерантов из трансформированных эксплантов табака и томата. Однако, при 300 мг/л частота регенерации из эксплантов слегка снижалась.

В работе (Makela et al., 2002) было показано, что наличие фермента, синтезированного с помощью интродуцированного гена *codA*, обеспечивает защиту даже в тех случаях, когда отсутствует сигнальный пептид, ответственный за доставку в пластиду. Однако по данным исследований (Park et al., 2007) на трансгенных томатах, при обеспечении таргетинга в пластиду, то есть непосредственно к месту синтеза холина, эффективность защиты повышалась. Экспрессия гена *codA* под контролем стресс-индуцируемого промотора улучшала некоторые физиолого-биохимические показатели растительных тканей (Jiang et al., 2013). При этом ген *codA* не был снабжен сигнальной

последовательностью, и функционирование фермента осуществлялось в цитоплазме. Использование полученной нами конструкции *pVICodA* не препятствует регенерации трансформированных растений и позволяет вести эффективный отбор регенерантов, содержащих интродуцированные в геном табака и томата как маркерный ген *nptII*, так и целевой ген *codA*. Эта конструкция может быть эффективна для обеспечения защиты пластидного компартмента клеток, а также для усиления устойчивости клеток различных тканей и целого растения к окислительному и осмотическому стрессу.

**Работа проведена в рамках ГП 14 по теме госзадания № 0574-2015-0004.*

Литература

Баранова Е.Н., Гулевич А.А., Майсурян А.Н., Лаврова Н.В. Ультраструктурная организация клеток трансгенных растений томата с геном Fe-SOD при засолении питательной среды // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2011. – № 1. – С. 90–97.

Гулевич А.А., Баранова Е.Н. Создание генно-инженерной конструкции с геном холиноксидазы для улучшенной экспрессии в растениях // Российская сельскохозяйственная наука. – 2008. – № 3. – С. 7–9.

Широких И.Г., Бакулина А.В., Огородникова С.Ю., Баранова Е.Н., Лундовских И.А., Гулевич А.А. Влияние встройки Fe-SOD1 гена на рост, перекисный гомеостаз и состояние пигментного комплекса трансгенных растений картофеля // Агрохимия. – 2014. – № 8. – С. 72–78.

Baranova E.N., Serenko E.K., Balachnina T.I., Kosobruhov A.A., Kurenina L.V., Gulevich A.A., Maisuryan A.N. Activity of the photosynthetic apparatus and antioxidant enzymes in leaves of transgenic *Solanum lycopersicum* and *Nicotiana tabacum* plants, with FeSOD1 gene // Russian Agricultural Sciences. – 2010. – V. 36. – P. 242–249.

Coruzzi G., Broglie R., Edwards C., Chua N.-H. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase // EMBO Journal. – 1984. – V. 3. – P. 1671.

Ieamkhang S., Chatchawankanphanich O. Augmentin® as an alternative antibiotic for growth suppression of *Agrobacterium* for tomato (*Lycopersicon esculentum*) transformation // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2005. – P. 82 – P. 213–220.

Jiang J., Li H., He G., Yin Y., Liu M., Liu B., Qiao G., Lin S., Xie L., Zhuo R. Over-expression of the *codA* gene by Rd29A promoter improves salt tolerance in *Nicotiana tabacum* // Pakistan J. Botany. – 2013. – V. 45. – P. 821–827.

Makela P., Kärkkäinen J., Somersalo S. Effect of glycinebetaine on chloroplast ultrastructure, chlorophyll and protein content, and RuBPCO activities in tomato grown under drought or salinity // Biologia Plantarum. – 2000. – V. 43 – P. 471–475.

Park E.J., Jeknic Z., Pino M.T., Murata N., Chen T.H.H. Glycinebetaine accumulation is more effective in chloroplasts than in the cytosol for protecting transgenic tomato plants against abiotic stress // Plant, Cell and Env. – 2007. – V. 30 – P. 994–1005.

ВЛИЯНИЕ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ НА ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ВАКУОЛЯРНОЙ МЕМБРАНЫ

В.В. Гурина, Н.В. Озолина, И.С. Нестёркина, Е.В. Спиридонова
ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: nichka.g@bk.ru

Растения постоянно подвергаются действию изменяющихся условий окружающей среды, поэтому они должны быстро реагировать на любые неблагоприятные факторы для минимизации клеточных повреждений. Первыми на стресс реагируют клеточные мембраны, вызывая изменения в липидном и белковом составе (Лось, 2001). Основная роль в формировании бислойной структуры мембран отводится фосфолипидам. В зависимости от количества или соотношения определенных классов фосфолипидов клеточные мембраны могут переходить из бислойной ламеллярной структуры в гексагональную, формируя сквозные поры.

Целью нашего исследования являлось изучение качественного и количественного состава фосфолипидов вакуолярной мембраны столовой свеклы при гипо-, гиперосмотических и окислительном стрессах. Объектом исследования были вакуолярные мембраны корнеплодов столовой свёклы (*Beta vulgaris* L.), выделенные по методу (Саляев и др., 1981). Для создания гиперосмотического стресса корнеплоды подвергали подсушиванию в течение 3-х суток, для гипоосмотического – в течение суток выдерживали в дистиллированной воде. Для создания окислительного стресса кусочки ткани корнеплода инкубировали в растворе перекиси водорода. В контрольном варианте использовали корнеплоды, не подвергнутые стрессам. Для выяснения влияния осмотического и окислительного стресса были использованы разные контроли, для осмотических стрессов корнеплоды, не подвергнутые стрессам, а для окислительного – кусочки ткани корнеплода, инкубированные в дистиллированной воде. Экстрагирование липидов проводили по методу (Bligh and Dyer, 1959). Для разделения липидов использовали двумерную систему: первое направление - хлороформ–метанол–бензол–28 % - NH_4OH (65:30:10:6), второе направление – хлороформ–метанол–уксусная кислота–ацетон–бензол–вода (70:30:4:5:10:1). Обнаружение и идентификацию фосфолипидов в растительном материале проводили специальными реагентами и сравнивали с литературными данными (Макаренко и др., 1996; Новицкая и др., 1976). Фосфолипиды количественно определяли аналитической тонкослойной хроматографией по неорганическому фосфору методом (Vaskovsky et al., 1975).

В результате наших исследований среди фосфолипидов тонопласта в норме и при стрессах были идентифицированы фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины, фосфатидилинозиты, фосфатидилсерин и фосфатидная кислота. В тонопласте преобладали, как и во всех биологических мембранах, фосфотидилхолины и фосфотидилэтаноламины. В норме было обнаружено большое количество фосфатидной кислоты (20,3 %), относительно высокое содержание этого липида было ранее выявлено только для вакуолей ананаса (Zhou et al., 2014). При изучении других стрессов (солевой, низкотемпературный, раневой) было замечено увеличение фосфатидной кислоты, тогда как в нашем исследовании при стрессовом воздействии происходило снижение фосфатидной кислоты, особенно при гипоосмотическом стрессе (в 6 раз), что вероятно связано со стабилизацией ламеллярной структурой мембраны. При воздействии гиперосмотического стресса содержание фосфотидилхолинов по сравнению с нормой существенно снижалось (на 51 %). При окислительном стрессе количество фосфатидилэтаноламинов достоверно увеличивалось на 35 % от контроля. Интересные результаты были по-

лучены по фосфатидилсеринам – они отсутствовали при окислительном стрессе. Фосфатидилинозиты достоверно увеличивались при осмотических стрессах.

В стрессовых условиях особое значение придается соотношению фосфатидилхолин / фосфатидилэтаноламин в мембранах растений. В наших экспериментах при всех стрессовых воздействиях наблюдалась тенденция к снижению этого соотношения. Снижение соотношения ФХ / ФЭ способствует увеличению проницаемости мембран и приводит к стрессовым повреждениям мембран.

Таким образом, изучен количественный состав фосфолипидов тонопласта корнеплодов красной столовой свеклы при абиотических стрессах. Результаты проведенных экспериментов показали, что динамика фосфолипидов вакуолярной мембраны заметно менялась при стрессовых воздействиях и можно предположить, что выявленные изменения связаны с участием этих мембранных липидов в адаптационных механизмах растительной клетки.

Литература

Лось Д.А. Восприятие сигналов биологическими мембранами: сенсорные белки и экспрессия генов / Д.А. Лось // Соросов. образоват. журн., 2001. – Т. 7, № 9. – С. 14–22.

Макаренко С.П. Химический состав и структура липидов вакуолярных мембран / С.П. Макаренко, Т.А. Коненкина, Р.К. Салаяев // Биол. мембраны. – 1992. – Т. 9, № 3. – С. 290–299.

Новицкая Г.В. Количественное определение липидов мембран хлоропластов / Г.В. Новицкая, Л.А. Руцкая // Физиология растений. – 1976. – Т. 23, вып. 5. – С. 899–905.

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

Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. – 1959. – Can. J. Biochem. Physiol. – V. 37. – P. 911–917.

Vaskovsky V.E., Latyshev N.A. Modified Jungnickel's reagent for detecting phospholipids and other phosphorus compounds on thin-layer chromatograms // J. Chromatogr. – 1975. – V. 115, № 1. – P. 246–249.

Zhou Y., Pan X., Qu H., Underhill S.J. Tonoplast lipid composition and proton pump of pineapple fruit during low-temperature storage and blackheart development // J. Membr. Biol. – 2014. – V. 247. – P. 429–439.

ОСОБЕННОСТИ СОСТАВА СТЕРИНОВ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ *LARIX SIBIRICA* LEDEB.

*Л.В. Дударева¹, И.В. Горбенко², В.Н. Шмаков¹,
Н.В. Семенова¹, Е.Г. Рудиковская¹*

¹ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: laser@sifibr.irk.ru,

²ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, Иркутск

Известно, что растительные стерины являются жизненно важными компонентами мембран, которые играют не только структурную, но и регуляторную роль во многих ключевых клеточных процессах. Наиболее распространенными стеринами растений являются β -ситостерин, стигмастерин и кампестерин, а также холестерин, у которого большинства видов содержится в относительно небольших количествах. Считается, что β -ситостерин и 24-метилхолестерин способны регулировать текучесть и проницаемость растительных мембран, ограничивая подвижность жирных ацильных цепей. Стерины могут быть вовлечены в процессы адаптации растительных мембран к изменениям температуры, влажности, а также модулировать активность мембраносвязанных ферментов (Валитова и др., 2016). Известно, что β -ситостерин и стигмастерин играют ключевую роль в клеточной дифференциации и пролиферации. Полученные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что стерины служат сигнальными и/или регуляторными молекулами, вовлеченными в процессы роста и развития растения. Стерины могут находиться в растении как в свободном состоянии, так и в сопряжении с жирными кислотами, а также в виде стерилгликозидов и ацилстерилгликозидов – углеводных производных стеринов. Широко обсуждается участие стеринов (наряду с другими липидными компонентами, такими, как сфинголипиды) в формировании функциональных мембранных доменов (Silvestro et al., 2013). Особый интерес представляет состав стеринов мембран клеточных органелл. Для растений показано, что свободные стерины локализованы преимущественно в плазматической мембране. В относительно небольших количествах они обнаружены в эндоплазматическом ретикулуме, тонопласте и мембранах митохондрий (Валитова и др., 2016). Показано, что относительно небольшая доля стеринов присутствует в мембранах хлоропластов, но они отсутствуют в мембранах тилакоидов. Возможны, однако, существенные видовые различия в содержании стеринов в клеточных органеллах. Так, для древесной зелени ели обыкновенной показано, что при внутриклеточном распределении стеринов основная их масса содержится в микросомах (мембранах эндоплазматического ретикулума) и в митохондриях (Kimland, Norln, 1972). В целом жирнокислотный и стериновый состав митохондриальных мембран хвойных растений и возможные механизмы участия стеринов в ключевых клеточных процессах этих видов изучены не достаточно. В частности, потому, что изоляция клеточных органелл, в том числе митохондрий, из тканей хвойных, до сих пор представляется трудной задачей. В связи с вышеизложенным целью представляемой работы был анализ качественного и количественного состава стеринов, а также жирнокислотного состава суммарных липидов митохондрий хвои лиственницы сибирской.

Митохондрии из тканей хвои *L. sibirica* изолировали с помощью градиентного центрифугирования. Липиды из полученной фракции экстрагировали по модифицированному методу Фолча. Стерины и жирные кислоты суммарных липидов выделяли и идентифицировали с помощью метода ТСХ (R_f , жирные кислоты – 0.71-0.73, R_f , стерины – 0.19, R_f , эфиры стеринов – 0.87). Зоны целевых компонентов элюировали хлороформом, добавляли внутренний стандарт (эргостерол для стеринов и C19:0 для ЖК), затем дериватизировали стерины с BSTFA, жирные кислоты подвергали метилированию. Полученные про-

изводные анализировали с использованием хромато-масс-спектрометра 5973/6890N MSD/DS Agilent Technologies (США). Условия анализа: детектор – квадрупольный масс-спектрометр, способ ионизации - электронный удар, энергия ионизации 70 эВ, для анализа использовали режим регистрации полного ионного тока. Для разделения использовали капиллярную колонку HP-INNOWAX. Газ-носитель: гелий, скорость потока газа 1 мл/мин. Относительное содержание ЖК определяли методом внутренней нормализации – в весовых процентах (% вес.) от общего их содержания в исследуемом образце, с учетом коэффициента отклика ЖК.

Таблица 1

**Жирнокислотный состав суммарных липидов
митохондрий *Larix sibirica* L.**

№№	Жирная кислота	Сод-е, % вес.
1	C12:0	2,63
2	C14:0	2,67
3	C15:0	0,39
4	C16:0	19,25
5	C16:1(n-9)	0,86
6	C16:1(n-5)	0,55
7	C17:0-a	1,35
8	C17:0	1,12
9	C18:0	6,61
10	C18:1(n-9)	6,52
11	C18:1(n-7)	1,15
12	C18:2(5.9)	0,70
13	C18:2(n-6)	16,17
14	C18:3(5.9.12)	2,65
15	C18:3(n-3)	23,18
16	C18:4(5.9.12.15)	1,54
17	C20:0	1,83
18	C20:1(n-11)	0,24
19	C20:3(5.11.14)	6,10
20	C20:3(7.11.14)	0,49
21	C22:0	4,01

Результаты анализа жирнокислотного и стеринового состава митохондрий из хвои лиственницы сибирской представлены в табл. 1 и на рис. 1, соответственно. Состав жирных кислот митохондрий *L. sibirica* носит, по-видимому, видоспецифичный характер, при этом отличается от тканевого состава ЖК хвои этого вида содержанием отдельных ненасыщенных жирных кислот. Так, содержание линолевой и олеиновой кислот в мембранах митохондрий в 2 раза выше, чем в общей липидной фракции ткани, что объясняется, вероятно, более высокой активностью соответствующих десатураз. Существенные различия обнаружены в содержании полиметилена разделенных Δ-5 ненасыщенных кислот, характерных для хвойных и других эволюционно древних таксонов. В митохондриях таких кислот почти в 2 раза больше, чем в общей фракции липидов. Что касается состава стерinov, то их суммарное содержание в митохондриальной фракции составило $865,8 \pm 118,8$ мг/г. сырого веса, а эфиров стерinov $132,2 \pm 48,7$ мг/г. сырого веса. В пересчете на сухой вес хвои содержание стерinov в митохондриях составляет около 10 % от их общего содержания в этой ткани. В отличие от тканей хвои в митохондриях не обнаружен стигмастерин (рис. 1). Самое высокое содержание показано для β-ситостерина, самое низкое для кампестерина. Дальнейшее изучение динамики содержания стериновых компонентов в митохондриальных мембранах *L. sibirica* при различных условиях роста интактных растений и клеточной культуры позволит полу-

чить информацию об участии этих органелл в защите клеток от стресса и в росте и дифференцировке тканей *in vitro*.

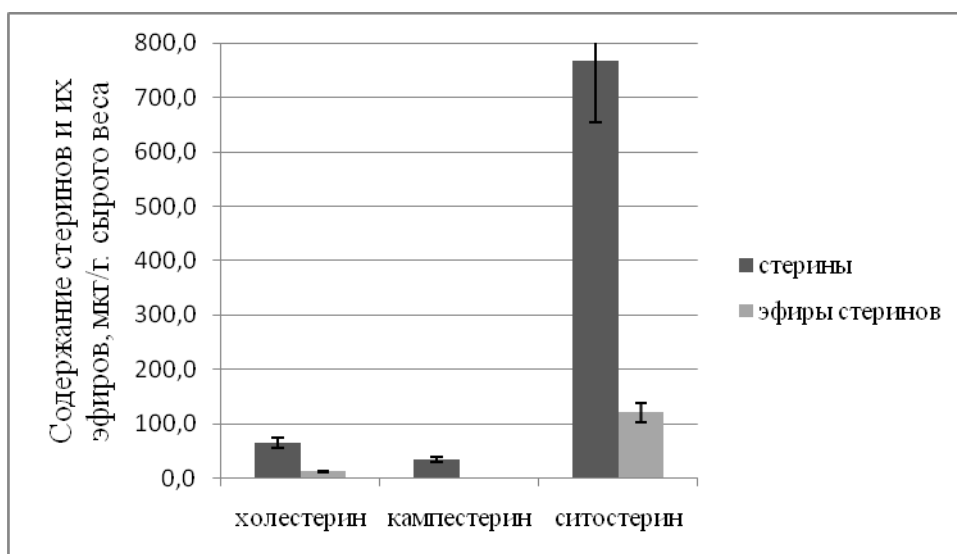


Рис. 1. Содержание стериновых компонентов в митохондриях из хвои *Larix sibirica* L.

Литература

Валитова Ю.Н., Сулкарнаева А.Г., Минибаева Ф.В. Растительные стерины: многообразие, биосинтез, физиологические функции // Биохимия. – 2016. – Т. 81, №8. – С. 1050–1068.

Kimland B., Norln T. Wood extractives of Common Spruce, *Picea abies* (L.) Karst. Svensk Papper slid. – 1972. – V. 75. – P. 403–409.

Silvestro D., Andersen T.G., Schaller H., Jensen P.E. Plant Sterol Metabolism. D7-Sterol-C5-Desaturase (STE1/DWARF7), D5,7-Sterol-D7-Reductase (DWARF5) and D24-Sterol-D24-Reductase (DIMINUTO/DWARF1) Show Multiple Subcellular Localizations in *Arabidopsis thaliana* (Heynh) L. Plos One. 2013. V. 8. (2). DOI: 10.1371/journal.pone.0056429.

РОЛЬ ВАКУОЛЯРНОГО КОМПАРТМЕНТА В МЕТАБОЛИЗАЦИИ АМИНОКИСЛОТ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ АЭРАЦИИ, ГИПОКСИИ И CO₂-СРЕДЫ

А.Н. Ершова, Н.В. Винокурова

ФГБОУ ВО Воронежский государственный педагогический университет,
Воронеж, e-mail: aershova@vspsu.ac.ru

Специфичность в проявлении метаболических свойств одних и тех же соединений достигается их пространственной изоляцией в клетке, т. е. компартментализацией. Вакуоли представляют собой мультифункциональные органеллы (Андреев, 2001). Выступая в качестве донора или акцептора тех или иных соединений, необходимых для выполнения клеточных функций, вакуоль ведет себя как функциональный аналог внеклеточной среды. В вакуолярном соке найдены все аминокислоты, содержащиеся в белках, в то время как небелковые аминокислоты и амиды обычно имели экстравакуолярную локализацию (Farre et al., 2001). Объемы митохондриального фонда аминокислот обычно невелики, вследствие чего анализируют обычно вакуолярный и цитоплазматический фонды аминокислот в клетках растений.

В условиях дефицита кислорода нарушается синтез белка, происходят изменения в обмене кислот цикла Кребса и аминокислот. Предполагается, что одним из механизмов адаптации растений к гипоксии является накопление в их клетках органических кислот малата или сукцината (Rocha et. al., 2010) и аминокислот лизина, ГАМК и аланина, что препятствует развитию клеточного ацидоза. Благодаря значительному накоплению в клетках растений ГАМК и аланина, их стали называть “стрессовыми” аминокислотами. Показано (Ершова, 2007), что накапливающийся при дефиците кислорода в тканях растений CO₂ усиливает все эффекты гипоксии. Вакуоль, являясь мультифункциональным компартментом (Андреев, 2001), играет важную роль и в ответных защитных реакциях растений на стрессовые воздействия. Однако объемы вакуолярного фонда аминокислот для большинства растений практически не исследованы, а для условий гипоксии такие исследования единичны. Исследовали внутриклеточные фонды «стрессовых» и связанных с ними аминокислот, а также влияние условий кратковременного дефицита кислорода и CO₂-среды на скорость их пополнения у растений с использованием мембранотропных соединений.

Анализировали неустойчивые к гипоксии проростки гороха (Рамонский 77), выращенные в лабораторных условиях методом гидропоники при 12-часовом фотопериоде. При выделении цитоплазматического и вакуолярного фондов аминокислот использовали мембранотропное соединение ДМСО по методике (Delmer, 1979) в нашей модификации. В предварительных опытах были подобраны концентрации ДМСО для селективного разрушения плазмалеммы или тонопласта. Нарушение проницаемости тонопласта оценивали по выходу красителя нейтрального красного, разрушение тонопласта контролировали путем микроскопического просмотра. Выход аминокислот анализировали после хроматографического разделения на пластинках с силикагелем G. В опытах по изучению влияния дефицита кислорода надземную часть проростков помещали в темновых условиях в разные газовые среды на 3–6 часов (воздух – контроль, азот и CO₂ из баллонов), после чего анализировали клеточные фонды аминокислот.

Как показали полученные результаты (табл. 1), в клетках растений гороха основным местом локализации ГАМК, аланина, аспаргина и валина служила цитоплазма, а аспартат, глутамат и фенилаланин были приблизительно поровну распределены между цитоплазматическим и вакуолярным фондами клетки.

В условиях дефицита кислорода через 3 часа (табл. 2), содержание ГАМК в клетках увеличивалось на 25 %, а в CO₂ среде на 40 %. С увеличением сроков экспозиции содержание ГАМК возрастало в 1,5 и 2,5 раза соответственно. При этом в первые часы наиболее активно насыщался цитоплазматический фонд этой аминокислоты. Содержание ГАМК в вакуоле не менялось. Только через 6 часов экспозиции растений в условиях разных газовых сред начинал возрастать вакуолярный фонд ГАМК (почти в 3 раза). Пополнение этого фонда происходило более эффективно при действии CO₂–среды, чем инертного газа азота. Содержание глутамата в проростках несколько возрастало во всех вариантах опыта. При этом увеличивались как вакуолярный, так и цитоплазматический его фонды, особенно при действии среды углекислого газа. Содержание другой «стрессовой» аминокислоты аланина в клетках проростков гороха возрастало с увеличением сроков экспозиции, но наиболее эффективно в среде углекислого газа, где содержание этой аминокислоты увеличивалось почти вдвое. В отличие от ГАМК, накопление аланина происходило только за счет возрастания цитоплазматического фонда. Содержание аспартата в клетках при этом, наоборот, уменьшалось как при гипоксии, так и в CO₂–среде. В тоже время цитоплазматический фонд аспартата у растений при дефиците кислорода поддерживался на уровне аэрируемых растений. Снижение количества этой аминокислоты происходило только за счет вакуолярного фонда, где содержание аспартата падало в 2,5 и 6 раз соответственно.

Таблица 1

**Внутриклеточное распределение аминокислот в листьях проростков гороха
(а – мкмоль · г⁻¹ сырой массы)**

Соединения	Содержание					
	В клетках		В цитозоле		В вакуоле	
	а	%	а	%	а	%
Аспартат	8,57±0,13	100	4,30±0,10	50	4,28±0,15	50
Глутамат	6,72±0,31	100	3,56±0,16	53	3,00±0,13	46
Аланин	4,04±0,20	100	2,91±0,09	72	1,13±0,04	26
ГАМК	3,93±0,05	100	2,57±0,10	65	1,30±0,02	33
Аспарагин	0,26±0,01	100	0,15±0,04	60	0,10±0,01	38
Валин	0,63±0,00	100	0,55±0,01	87	0,08±0,02	13
Фенилаланин	1,25±0,06	100	0,73±0,00	58	0,51±0,01	40

Таблица 2

**Влияние гипоксии и CO₂–среды на содержание и локализацию аминокислот
в клетках проростков гороха (мкмоль · г⁻¹ сырой массы, %, Ц – цитоплазматический фонд,
В – вакуолярный фонд)**

Экспозиция, часы	Аминокислоты	Воздух			Гипоксия		CO ₂ –среда	
		Содержание в клетке	%	Ц : В	% от контроля	Ц : В	% от котроля	Ц : В
3	Аспартат	8,89±0,20	100	50:50	82	64:36	88	75:25
	Глутамат	6,09±0,10	100	54:46	115	60:40	132	51:49
	Аланин	4,34±0,10	100	72:26	132	73:27	115	76:24
	ГАМК	3,38±0,09	100	64:36	124	72:28	141	70:30
6	Аспартат	8,34±0,10	100	53:47	70	70:30	58	87:13
	Глутамат	5,68±0,10	100	56:44	131	56:44	161	73:27
	Аланин	3,92±0,07	100	73:27	124	79:21	214	92:8
	ГАМК	3,09±0,08	100	61:39	163	55:45	263	48:52

Проведенные нами опыты показали, что для ГАМК в первые часы действия как гипоксии, так и CO₂–среды быстрее пополнялся цитоплазматический фонд клетки. С увеличением же сроков экспозиции растений начинал возрастать вакуолярный, метаболически инертный фонд ГАМК. Это могло происходить за счет переброса в него избы-

точных количеств накопившейся аминокислоты, как это ранее только предполагалось (Ершова, 2007). Показано, что у проростков гороха накопление ГАМК не сопровождалось значительным изменением цитоплазматического фонда глутамата. Это подтверждает высказанное ранее (Ершова, 2007) предположение о том, что у слабоустойчивых к гипоксии растений гороха увеличение содержания ГАМК не связано с возрастанием активности глутаматдекарбоксилазы, локализованной в цитоплазме, а является, в большей степени, результатом торможения утилизации ГАМК. Накопление другой стрессовой аминокислоты растений – аланина, в отличие от ГАМК, происходило при всех сроках экспозиции проростков в условиях газовых сред, только за счет увеличения цитоплазматического фонда этой аминокислоты. Оно было частично связано с активацией декарбоксилирования аспартата, содержание которого в клетках растений снижалось. Поддержание высокой скорости этой реакции могло осуществляться за счет постоянной переброски аспартата из вакуолей в цитоплазму, что способствовало уменьшению вакуолярного фонда этой аминокислоты на фоне стабилизации ее содержания в цитоплазме.

Таким образом, нашими исследованиями было установлено, что в условиях кратковременного (до суток) дефицита кислорода у растений возрастает роль вакуолярного фонда клеток. Именно в него уводились избыточные количества одних аминокислот (ГАМК) или из которого пополнялись цитоплазматические фонды предшественников других аминокислот (аспартата). Отмечено, что повышенные концентрации диоксида углерода только усиливали скорость образования стрессовых аминокислот, но не меняли характера пополнения клеточных фондов этих соединений в растениях.

Литература

- Андреев И.М. Функции вакуоли в клетках высших растений // Физиология растений. – 2001. – Т. 48 – С. 777–787.
- Ершова А.Н. Метаболическая адаптация растений к гипоксии и повышенному содержанию диоксида углерода. – Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 2007. – 264 с.
- Delmer H. Dimethylsulfoxide as a Potential Tool for Analysis of Compartmentation in Living Plant Cells // Plant Physiol. – 1979. – 64. – P. 623–629.
- Farre E.M., Tressen A., Roessner U., Gelgenberger P., Trettewey R., Willmitzer L. Analysis of the compartmentation of glycolytic intermediates, nucleotides, sugar, organic acids, amino acids and sugar alcohols in potato tubers using a nonaqueous fractionation method // Plant Physiol. – 2001. – 127. – P. 685–600.
- Rocha M., Lucausi F., Araujo W.L., Nunes-Nesi A., Soder K., Fernie A.R., van Dongen J.T. Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus* // Plant Physiol. – 2010. – V. 152. – P. 15011–1513.

КРИТИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ В ВОЗНИКНОВЕНИИ ПАТОЛОГИЙ

*Д.Б. Зоров¹, Е.Ю. Плотников¹, Д.Н. Силачев¹, Л.Д. Зорова¹,
И.Б. Певзнер¹, В.А. Бабенко¹, В.А. Попков^{1,2}, С.Д. Зоров²,
Н.В. Андрианова², Т.И. Данилина², А.В. Марков²*

¹Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ,
Москва, zorov@belozersky.msu.ru

²Факультет биоинформатики и биоинженерии МГУ, Москва

Митохондрии все больше привлекают внимание представителей разных отраслей биомедицины, что объясняется многообразием митохондриальных функций. Предположение, а потом и его укрепление, прокариотического происхождения митохондрий открыло новые перспективы митохондриальных исследований (Зоров и соавт., 2014). В рамках этого предположения становится более понятным неоднозначное и понимаемое нами как эгоистическое поведение митохондрий в клетке, которое уже было трактовано нами как «митохондрии: друзья и враги» (Зоров и соавт., 2007). Так называемое «вражеское» поведение митохондрий проявляется в том, что в громадном большинстве случаев именно митохондрия отдает приказ на убийство клетки хозяина, а следом и органа, в котором находятся эти клетки. Однако, в принципе, эта смертельная функция митохондрий полностью обоснована как необходимая для устранения клеток с неправильными функциями, возникшими в результате повреждения. Наличие в органе неправильно функционирующих клеток может быть крайне вредным для данного органа, а может быть, и для всего организма (Zorov et al., 2017). Для этого процесса устранения механизм оценки «негодности» данной клетки и запуск ее утилизации должен быть очень тонко отрегулирован. Учитывая ключевую роль митохондрий в этом процессе, крайне важным является функциональное состояние митохондрий, ибо нарушение митохондриальных функций приведет к неправильному приказу на уничтожение нужных неповрежденных клеток, прежде всего постмитотических, таких как кардиомиоциты, нейроны, эпителиоциты и пр.

Сегодня является уже доказанным факт, что митохондрии ответственны за множество клеточных, органных и организменных патологий, и становится очевидной роль митохондрий в индукции этих патологий, не опосредованная производством энергии, то есть не связанная с изменением окислительного фосфорилирования (Zorov et al., 1997). Стало ясным, что существует некая паракринная регуляция деятельности клетки, которая исходит от митохондрий. Механизм «разговора» между митохондрией и клеткой, видимо реализуемый на химической основе, особенно сильно проявляет себя на примере перемещения митохондрий из одной клетки в другую, что сопровождается изменением фенотипа клетки-акцептора (Plotnikov et al., 2008, Plotnikov et al., 2010, Babenko et al., 2015).

Для оценки того, насколько «правильно» функционирует митохондрия, необходимо представление критического параметра, который отражает «правильность» или «неправильность» действия. Оценка работы контроля качества митохондрий, в результате которой утилизируются плохо функционирующие митохондрии, дает возможность предположить, что таким фактором является значение трансмембранного потенциала на внутренней мембране митохондрий ($\Delta\psi$) (Зорова и соавт., 2017, Zorova et al., 2018). По непонятным причинам гомеостаз $\Delta\psi$ является основополагающим для митохондрий, и те митохондрии, которые неспособны поддерживать оптимальное значение $\Delta\psi$, подлежат утилизации через ауто(мито)фагию. Особенно четким такое требование проявляется в гипоксических условиях, когда митохондрия сама неспособна к исполнению

окислительного синтеза АТФ, но использует внутриклеточный АТФ для поддержания $\Delta\psi$ за счет обращения работы АТФ синтазного комплекса (Di Lisa et al., 1995). Заметим, что это происходит в условиях энергетического кризиса, когда вся клетка испытывает очень серьезные проблемы, вызванные дисбалансом между продукцией и потреблением АТФ. Однако одной из серьезных причин возникновения патологий или проявления старения системы является нарушение этих связей, которые приводят к тому, что даже митохондрии с неоптимальным значением $\Delta\psi$ не утилизируются в клетке, что приводит к увеличению гетерогенности митохондриальной популяции в клетке. С нашей точки зрения гетерогенность $\Delta\psi$ в клетке является первопричиной возникновения патологий и старения (Попков и соавт., 2015).

В первичной основе создания гетерогенной популяции митохондрий, по нашим представлениям, находится процесс фрагментации (расщепления) митохондриального ретикулума на ряд митохондриальных фрагментов, как ответ на повреждение митохондрий, чаще всего имеющего окислительную природу, то есть опосредованную окислительным стрессом (Zorov et al., 2017, Vorobjev and Zorov, 1983, Зоров и соавт., 2015). При этом наблюдается внутримитохондриальная перестройка с отмишиванием поврежденных внутримитохондриальных структур и интактных частей митохондрий. Следующее за этим асимметрическое деление митохондрий приводит к образованию неповрежденных митохондрий, которые впоследствии за счет слияния образуют в клетке полноценно функционирующий митохондриальный ретикулум, и поврежденные, плохо функционирующие, митохондриальные фрагменты, которые претерпевают процесс переработки (митофагии). Сам процесс митофагии стартует с мечения поврежденных митохондриальных структур с последующим образованием аутофагосомы, которая в дальнейшем сливается с лизосомой, в результате чего поврежденная митохондрия полностью деградирует. Такое постоянное уничтожение поврежденных и ненужных митохондрий является пререквизитом для нормального функционирования клетки и в клетке в идеале существует равновесие между образованием новых и уничтожением старых митохондрий, а сам процесс отбраковки ненужных митохондрий получил название механизма проверки качества митохондрий. Однако в реальных условиях происходит отход от идеала, и поврежденные митохондрии пропускаются через отбор, то ли за счет испорченности машины мечения поврежденных митохондриальных структур, то ли за счет порчи механизма митофагии. Любая из этих причин в конечном счете приведет к отмеченной выше гетерогенности митохондриальной популяции, как движущей силе возникновения патологий и старения.

Правильность указанных выше выводов была нами проверена на целом ряде патологий, включающих ишемическое повреждение органа (мозг или почка), рабдомиолиз, пиелонефрит и старение организма, где прослеживалась связь между изменением сигнальных функций митохондрий и целого ряда биохимических параметров в ткани, не всегда сопутствующих с уничтожением нефункциональных митохондрий (Plotnikov et al., 2007).

Коррекция митохондриальных функций в направлении нормы оказалась возможной при нормализации внутриклеточного и внутримитохондриального редокс уровня, в частности достигаемого добавлением в систему антиоксидантов широкого толка или митохондриально-направленных, или ингибиторов сигнальных систем терминальных элементов апоптотического каскада (например киназы гликогенсинтазы-3 β) (Plotnikov et al., 2007, 2013).

Поддержано Российским научным фондом (грант 14-15-00147).

Литература

Зоров Д.Б., Исаев Н.К., Плотников Е.Ю., Зорова Л.Д., Стельмашук Е.В., Васильева А.К., Архангельская А.А., Хряпенкова Т.Г. Митохондрия как многоликий Янус // Биохимия. – 2007. – Т. 72 (10). – С. 1371–1384.

Зоров Д.Б., Плотников Е.Ю., Силачев Д.Н., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., Зоров С.Д., Бабенко В.А., Янкаускас С.С., Попков В.А., Савина П.С. Микробиота и митобиота. Поставив знак равенства между митохондрией и бактерией // Биохимия. – 2014. – Т. 79 (10). – С. 1252–1268.

Зоров Д.Б., Воробьев И.А., Плотников Е.Ю., Силачев Д.Н., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., Бабенко В.А., Зоров С.Д., Янкаускас С.С., Попков В.А. Фрагментация (дробление) митохондрий. Частные вопросы. Биологические мембраны, 32(5-6):338–345, 2015.

Зорова Л.Д., Попков В.А., Плотников Е.Ю., Силачев Д.Н., Певзнер И.Б., Янкаускас С.С., Зоров С.Д., Бабенко В.А., Зоров Д.Б. Функциональная значимость митохондриального мембранного потенциала // Биологические мембраны – 2017. – Т. 34 (6). – С. 93–100.

Попков В.А., Плотников Е.Ю., Лямзаев К.Г., Силачев Д.Н., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., Янкаускас С.С., Зоров С.Д., Бабенко В.А., Зоров Д.Б. Миторазнообразие // Биохимия. – 2015. – Т. 80(5). – С. 631–641.

Babenko, V.A., Silachev, D.N., Zorova, L.D., Pevzner, I.B., Khutornenko, A.A., Plotnikov, E.Y., Sukhikh, G.T., Zorov, D.B. Improving the Post-Stroke Therapeutic Potency of Mesenchymal Multipotent Stromal Cells by Cocultivation With Cortical Neurons: The Role of Crosstalk Between Cells // Stem Cells Translational Medicine. – 2015. – V. 4 (9). – P. 1011–1020.

Di Lisa, F., Blank, P.S., Colonna, R., Gambassi, G., Silverman, H.S., Stern, M.D., Hansford, R.G. Mitochondrial membrane potential in single living adult rat cardiac myocytes exposed to anoxia or metabolic inhibition // J. Physiol. – 1995 – V. 486 (Pt 1). – P. 1–13.

Plotnikov E.Y., Khryapenkova T.G., Vasileva A.K., Marey M.V., Galkina S.I., Sukhikh G.T., Zorov D.B. Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in coculture // Journal of Cellular and Molecular Medicine. – 2008. – V. 12 (1). – P. 1–12.

Plotnikov, E.Y. Kazachenko, A.V., Vyssokikh, M.Y., Vasileva A.K., Tcvirkun, D.V., Isaev, N.K., Kirpatovskiy, V.I., and Zorov, D.B. The role of mitochondria in oxidative and nitrosative stress during ischemia/reperfusion in the rat kidney // Kidney International. – 2007. – V. 72 (12). – P. 1493–1502.

Plotnikov, E.Y., Morosanov, M.A., Pevzner, I.B., Zorova, L.D., Manskikh V.N., Pulkova, N.V., Galkina, S.I., Skulachev, V.P., Zorov, D.B. Protective effect of mitochondria-targeted antioxidants in an acute bacterial infection // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2013. – V. 110 (33). – P. E3100–E3108.

Plotnikov, E.Y., Chupyrkina, A.A., Pevzner, I.B., Isaev, N.K., Zorov, D.B. Myoglobin causes oxidative stress, increase of no production and dysfunction of kidney's mitochondria // Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease. – 2009. – V. 1792 (8). – P. 796–803.

Plotnikov, E.Y., Khryapenkova, T.G., Galkina, S.I., Sukhikh, G.T., Zorov, D.B. Cytoplasm and organelle transfer between mesenchymal multipotent stromal cells and renal tubular cells in co-culture // Experimental Cell Research. – 2010. – V. 316.(15). – P. 2447–2455.

Vorobjev, I.A., Zorov, D.B. Diazepam inhibits cell respiration and induces fragmentation of mitochondrial reticulum // FEBS letters. – 1983. – V. 163. – P. 311–314.

Zorov, D.B., Krasnikov, B.F., Kuzminova, A.E., Vysokikh, M., Zorova, L.D. Mitochondria revisited. Alternative functions of mitochondria // Bioscience Reports. – 1997. – V. 17. – P. 507–520.

Zorov, D.B., Popkov, V.A., Zorova, L.D., Vorobjev, I.A., Pevzner, I.B., Silachev, D.N., Zorov, S.D., Jankauskas, S.S., Babenko, V.A., Plotnikov, E.Y. Mitochondrial aging: Is there a mitochondrial clock? // Journals of Gerontology Series A Biological Sciences and Medical Sciences. – 2017. – T. 72 (9). – С. 1171–1179.

Zorova, L.D., Popkov, V.A., Plotnikov, E.Y., Silachev, D.N., Pevzner, I.B., Jankauskas, S.S., Babenko, V.A., Zorov, S.D., Balakireva, A.V., Juhaszova, M., Sollott, S.J., Zorov, D.B. Mitochondrial membrane potential // Analytical Biochemistry. – 2018.

МЕХАНИЗМЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ O_2 В ХЛОРОПЛАСТАХ. ВОЗМОЖНОЕ ВЛИЯНИЕ МЕСТА ОБРАЗОВАНИЯ H_2O_2 НА ЕЕ СИГНАЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ

Б.Н. Иванов, М.М. Борисова-Мубаракшина,
М.А. Козулева, И.А. Найдов, Д.В. Ветошкина
Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
Пушино, e-mail: ivboni@rambler.ru

Восстановление молекул кислорода, O_2 , в хлоропластах происходит, в основном, в фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ФЭТЦ). Первичный продукт этого процесса – супероксидный анион радикал, $O_2^{\cdot-}$ (Allen and Hall, 1973). Компоненты ФЭТЦ, способные восстановить O_2 , расположены на акцепторной стороне Фотосистемы 2 (ФС2), в пластохиноновом пуле (ПХ-пуле) и на акцепторной стороне Фотосистемы 1 (ФС1). Организация ФС2 и особенности переноса электронов между ее кофакторами предотвращают восстановление O_2 в этой фотосистеме в неповрежденных тилакоидах.

В работе (Khorobrykh and Ivanov, 2002) было экспериментально показано, что молекула O_2 способна восстанавливаться до $O_2^{\cdot-}$ в ПХ-пуле, и получены свидетельства, что это восстановление осуществляется свободным пластосемихином. ФС1 – часть ФЭТЦ, где протекают основные процессы восстановления O_2 . Растворимый белок ферредоксин, восстанавливаемый терминальными акцепторами ФС1, часто предполагался как важный восстановитель O_2 . Однако анализ имеющихся данных литературы и результаты прямых измерений показали, что его вклад в этот процесс *in vivo* незначителен, и основными восстановителями O_2 в ФС1 служат мембраносвязанные кофакторы (Kozuleva and Ivanov, 2010). Исследование восстановления O_2 комплексами ФС1, выделенными из цианобактерий дикого типа и мутантов с заблокированным синтезом филлохинона (сайт A_1), в которых филлохинон замещается на ПХ (Kozuleva *et al.*, 2014) и в которых редокс-потенциалы $A_1/A_1^{\cdot-}$ примерно на 100 мВ более положительны, выявило разную зависимость этого процесса в указанных комплексах от интенсивности света, – при высокой интенсивности света скорость восстановления O_2 в комплексах из дикого типа становилась существенно выше. Полученные результаты свидетельствовали, что в ФС1 восстановление O_2 осуществляется как терминальными акцепторами F_A/F_B , так и филлохином; при этом первые играют основную роль при низких интенсивностях света, тогда как с увеличением интенсивности второй путь становится доминирующим.

С помощью детекторов $O_2^{\cdot-}$, циклических гидроксиламинов, обладающих разной липофильностью, было установлено, что генерация $O_2^{\cdot-}$ может происходить внутри мембраны, и что увеличение общей продукции $O_2^{\cdot-}$ при увеличении интенсивности света – следствие, в основном, увеличения его внутримембранного образования (Kozuleva *et al.*, 2011; Borisova-Mubarakshina *et al.*, 2012). Эти результаты хорошо согласуются с участием в восстановлении O_2 филлохинона, расположенного внутри мембраны, и с увеличением вклада данного кофактора в этот процесс на высоком свете.

Супероксидные радикалы, образующиеся при восстановлении O_2 или ферредоксином (при нарушении его использования при восстановлении НАДФ⁺), или терминальными акцепторами ФС1 на поверхности мембраны, или стромальными оксидазами, превращаются в стромах хлоропласта в перекись водорода, H_2O_2 , в реакции, катализируемой супероксиддисмутазой (СОД), а также в результате восстановления аскорбатом. Было, однако, показано, что H_2O_2 на свету образуется и в пределах тилакоидной мембраны (Mubarakshina *et al.*, 2006), и что при увеличении интенсивности света общее образование H_2O_2 при функционировании ФЭТЦ возрастает за счет данного процесса

(Borisova-Mubarakshina *et al.*, 2012). Это соответствует возрастанию генерации $O_2^{\bullet-}$ внутри мембраны при увеличении интенсивности света. Обнаружение генерации $O_2^{\bullet-}$ внутри мембраны в присутствии ферредоксина и НАДФ⁺ свидетельствует о внутри-мембранной продукции этих радикалов и H_2O_2 в физиологических условиях (Kozuleva *et al.*, 2016).

Сопоставление характеристик образования H_2O_2 внутри мембраны с данными об участии ПХ-пула в продукции H_2O_2 при функционировании полной ФЭТЦ привело к предположению об образовании H_2O_2 внутри мембраны в реакции $O_2^{\bullet-}$ с молекулами пластогидрохинона, ПХН₂ (Иванов, 2008; Mubarakshina and Ivanov, 2010). Возможность протекания этой реакции в тилакоидной мембране была проверена путем изучения влияния на окислительно-восстановительное состояние ПХ-пула подачи $O_2^{\bullet-}$ в мембрану извне. Было найдено, что в изолированных тилакоидах такая подача $O_2^{\bullet-}$ от системы ксантин-ксантиноксидаза приводила к увеличению доли открытых центров ФС2 (Vetoshkina *et al.*, 2017), к увеличению площади над кривой ОЖР-кинетики флуоресценции хлорофилла при высокой интенсивности света (рис. 1), и к существенному замедлению возрастания флуоресценции хлорофилла при низкой интенсивности, что во всех случаях свидетельствовало об окислении молекул ПХН₂ в мембране.

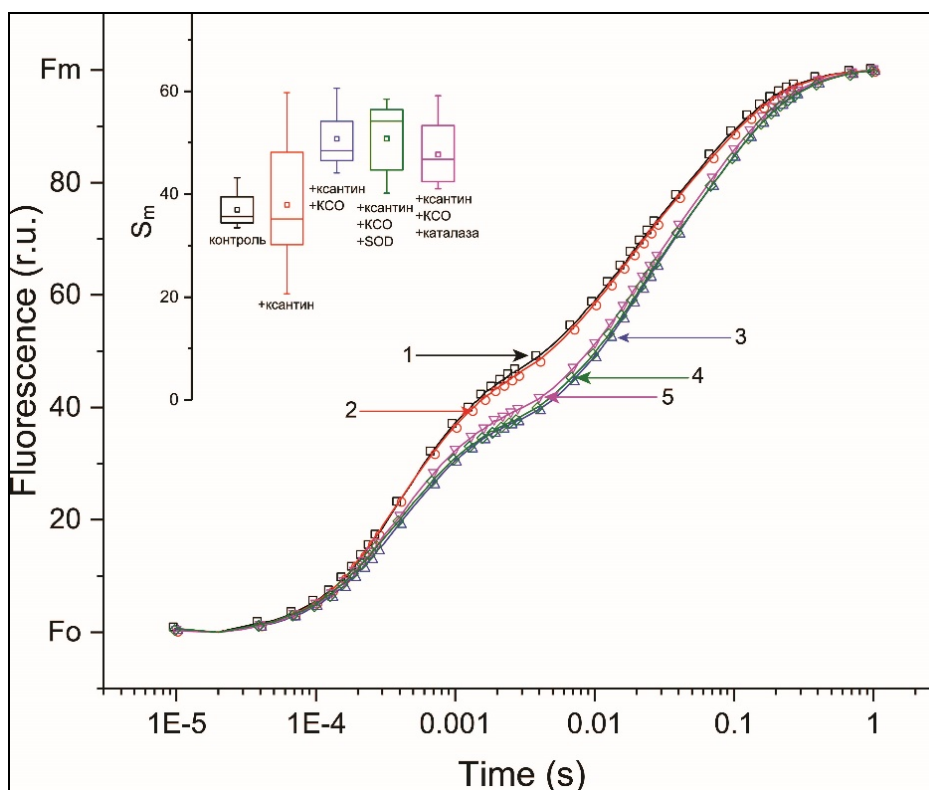


Рис. 1. ОЖР-кинетики флуоресценции хлорофилла *a* в суспензии изолированных тилакоидов.

1) без добавок, 2) + ксантин, 3) + ксантин, + ксантин оксидаза, 4) + ксантин, + ксантин оксидаза, +супероксиддисмутаза (SOD), 5) + ксантин, + ксантин оксидаза, + каталаза.

Данные о механизмах формирования H_2O_2 в хлоропласте, позволяют оценить, как изменения в условиях окружающей среды влияют на сигнал, передаваемый с помощью H_2O_2 , системам клетки, обеспечивающим акклимацию фотосинтетического аппарата растения к новым условиям. Мы предполагаем, что место формирования H_2O_2 , а именно, в пределах или вне тилакоидной мембраны, важно для специфичности ее сигнального действия. Образование H_2O_2 за счет ФЭТЦ вне мембраны на высоком свете относительно общей ее продукции невелико (Borisova-Mubarakshina *et al.*, 2012). Замедление цикла Кальвина должно приводить к возрастанию продукции H_2O_2 в строме и ее влияния на экспрессию хлоропластных генов. Геном хлоропласта сохранил контроль

над компонентами ФЭТЦ, которые определяют скорость фотосинтетического переноса электронов (Allen *et al.*, 2011), и поэтому сигнал стромальной H_2O_2 может способствовать быстрому приспособлению цикла Кальвина к новым условиям.

Увеличение интенсивности света стимулирует продукцию молекул H_2O_2 в тилакоидной мембране. Диффундируя в люмен, где отсутствует система нейтрализации H_2O_2 , они могут затем поступать в цитоплазму с возможностью передачи сигнала в ядро. Так как внутри мембраны H_2O_2 формируется с участием ПХ-пула, ее количество может отражать состояние этого пула, которое, как неоднократно показано, контролирует адаптивные изменения фотосинтетического аппарата (Pfannschmidt *et al.*, 1999). Было найдено, что накопление H_2O_2 в листьях моделирует влияние увеличенной интенсивности света на экспрессию ядерных генов, кодирующих антенные белки фотосинтетического аппарата (Borisova-Mubarakshina *и др.*, 2015). Мы предполагаем, что H_2O_2 , сформированная в пределах мембраны тилакоидов с участием ПХ-пула, обеспечивает ретроградную сигнализацию об условиях окружающей среды, выступая мессенджером между окислительно-восстановительным состоянием ПХ-пула и системами адаптации фотосинтезирующих клеток.

Литература

- Иванов Б.Н. Кооперация Фотосистемы I и пула пластохинона в восстановлении кислорода в хлоропластах высших растений // Биохимия. – 2008. – Т. 73. – С. 137–144.
- Allen J.F., de Paula W.B.M., Puthiyaveetil S., Nield J. A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis // Trends in Plant Science. – 2011. – V. 16. – P. 645–655.
- Allen J.F., Hall D.O. Superoxide reduction as a mechanism of ascorbate-stimulated oxygen-uptake by isolated chloroplasts // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1973. – V. 52. – P. 856–862.
- Borisova-Mubarakshina M.M., Ivanov B.N., Vetoshkina D.V. *et al.* Long-term acclimatory response to excess excitation energy: evidence for a role of hydrogen peroxide in the regulation of photosystem II antenna size // Journal of Experimental Botany. – 2015. – V. 66. – P. 7151–7164.
- Khorobrykh S.A., Ivanov B.N. Oxygen reduction in a plastoquinone pool of isolated pea thylakoids // Photosynthesis Research. – 2002. – V. 71. – P. 209–219.
- Kozuleva M., Goss T., Twachtmann M. *et al.* Ferredoxin: NADP (H) oxidoreductase abundance and location influences redox poise and stress tolerance // Plant Physiology. – 2016. – V. 172. – P. 1480–1493.
- Kozuleva M., Klenina I., Proskuryakov I., Kirilyuk I., Ivanov B. Production of superoxide in chloroplast thylakoid membranes: ESR study with cyclic hydroxylamines of different lipophilicity // FEBS Letters. – 2011. – V. 585. – P. 1067–1071.
- Kozuleva M.A., Ivanov B.N. Evaluation of the participation of ferredoxin in oxygen reduction in the photosynthetic electron transport chain of isolated pea thylakoids // Photosynthesis Research. – 2010. – V. 105. – P. 51–61.
- Kozuleva M.A., Petrova A.A., Mamedov M.D., Semenov A.Yu., Ivanov B.N. O_2 reduction by photosystem I involves phyloquinone under steady-state illumination // FEBS Letters. – 2014. – V. 588. – P. 4364–4368.
- Mubarakshina M., Khorobrykh S., Ivanov B. Oxygen reduction in chloroplast thylakoids results in production of hydrogen peroxide inside the membrane // Biochimica Biophysica Acta. – 2006. – V. 1757. – P. 1496–1503.
- Mubarakshina M.M., Ivanov B.N. The production and scavenging of reactive oxygen species in the plastoquinone pool of chloroplast thylakoid membranes // Physiol. Plantarum. – 2010. – V. 140. – P. 103–110.
- Mubarakshina M.M., Kozuleva M.A., Rudenko N.N. *et al.* The photosynthetic electron flow to oxygen and diffusion of hydrogen peroxide through the chloroplast envelope via aquaporins // Biochimica Biophysica Acta. – 2012. – V. 1817. – P. 1314–1321.
- Pfannschmidt T., Nilsson A., Allen J.F. Photosynthetic control of chloroplast gene expression // Nature. – 1999. – V. 397. – P. 625–628.
- Vetoshkina D.V., Ivanov B.N., Khorobrykh S.A., Proskuryakov I.I., Borisova-Mubarakshina M.M. Involvement of the chloroplast plastoquinone pool in the Mehler reaction // Physiologia Plantarum. – 2017. – V. 161. – P. 45–55.

СПЛАЙСИНГ мРНК И ФОТОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ В ХЛОРОПЛАСТАХ КУКУРУЗЫ В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННЫХ ТЕМПЕРАТУР

А.А. Клаус¹, Н.Л. Пишбытко², Е.А. Лысенко¹

¹ФБГУН Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва,
e-mail: alexander87klaus@gmail.com; genlysenko@mail.ru

²Институт биофизики и клеточной биологии, Минск

Воздействие повышенных температур на организмы растений – актуальная тема современной физиологии растений из-за предсказанного глобального потепления на Земле. В растительных клетках при повышенных температурах происходят нарушения многочисленных процессов метаболизма из-за неоптимальных условий работы ферментов, денатурации структурных белков (Mogk et al., 2003; Müller et al., 2007), снижения стабильности мембран (Wahid, Shabbir, 2005), повышения уровня АФК (Königshofer et al., 2008). Все эти события непосредственно затрагивают хлоропласты, в частности, отражаясь на его фотохимической активности и метаболизме, включая экспрессию генов. Повышение температуры вызывает инактивацию фотосистемы II (PSII), что, например, выражено в снижении максимального квантового выхода разделения зарядов фотосистемы II (Fv/Fm), эффективного квантового выхода фотосистемы II (ФPSII), фотохимического тушения флуоресценции (qP) (Law, Crafts-Brandner, 1999; Sinsawat et al., 2004). Уровень нефотохимического тушения флуоресценции, по данным литературы, напротив, возрастает. В ходе выполненной нами работы на растениях кукурузы сорта «Лучистая», аналогичные эффекты были вызваны воздействием температуры 42 °С в течение двух суток.

В данном исследовании мы изучили уровень мРНК всех содержащих интроны генов хлоропластов. На некоторые из них ранее уже было обращено внимание исследователей. Например, созревание мРНК *ndhB* табака, ген которой содержит интрон группы IIB, происходит менее эффективно при повышении температуры: после двух суток выращивания при 42 °С, но не при 37 °С, сплайсинг начинает протекать менее эффективно (Karcher, Bock, 2002). Полученные нами результаты согласуются с этими данными. Причём, при 42 °С мы наблюдаем снижение эффективности сплайсинга мРНК всех рассмотренных генов, а при 37 °С встречается большое разнообразие возможных реакций от отсутствия эффекта (*ndhB*) до практически полного исчезновения мРНК с вырезанным интроном (*ycf3-2*).

Таким образом, нами показано, что при нелетальном воздействии повышенных температур на растения кукурузы одновременно с подавлением фотохимической активности хлоропластов происходит ингибирование сплайсинга хлоропластных пре-мРНК.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 14-14-00584.

Литература

Karcher D., Bock R. Temperature sensitivity of RNA editing and intron splicing reactions in the plastid *ndhB* transcript // Curr. Genet. – 2002. – V. 41, – P. 48–52.

Königshofer H., Tromballa H.W., Löppert H.G. Early events in signalling hightemperature stress in tobacco BY2 cells involve alterations in membrane fluidity and enhanced hydrogen peroxide production // Plant Cell Environ. – 2008. – V. 31. – P. 1771–1780.

Law R.D., Crafts-Brandner S.J. Inhibition and acclimation of photosynthesis to heat stress is closely correlated with activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase // Plant Physiol. – 1999. – V. 120. – P. 173–181.

Mogk A., Schlieker C., Friedrich K. L., Schönfeld H.-J., Vierling E., Bukau B. Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278 (33). – P. 31033–31042.

Müller J., Menzel D., Samaj J. Cell-type-specific disruption and recovery of the cytoskeleton in *Arabidopsis thaliana* epidermal root cells upon heat shock stress // Protoplasma. – 2007. – V. 230. – P. 231–242.

Sinsawat V., Leipner J., Stamp P., Fracheboud Y. Effect of heat stress on the photosynthetic apparatus in maize (*Zea mays* L.) grown at control or high temperature // Environ. Exp. Bot. – 2004. – V. 52. – P. 123–129.

Wahid A., Shabbir A. Induction of heat stress tolerance in barley seedlings by pre-sowing seed treatment with glycinebetaine // Plant Growth Reg. – 2005. – V. 46. – P. 133–141.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ И ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА В ИМПОРТЕ ДНК

Е.С. Клименко, В.В. Шмаков, Т.А. Болотова, И.Ю. Субота,
В.И. Тарасенко, М.В. Кулинченко, Ю.М. Константинов
ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: katia.klimenko@gmail.com

В настоящее время общепринято считать, что взаимодействие митохондрий и эндоплазматического ретикулума (ЭР) является обязательным условием функционирования эукариотической клетки. Структурные взаимодействия митохондрий и ЭР достигаются за счет формирования белковых комплексов, что оказывает значительное влияние на морфологию митохондрий, процессы их слияния и деления, репликацию мтДНК, передачу различного рода сигналов и ионов (в особенности ионов кальция), а также импорт белков и липидов в митохондрии (Kornmann et al., 2009, 2010; Wiedemann et al., 2009).

Ранее нами было показано, что изолированные митохондрии растений обладают способностью импортировать молекулы ДНК (Koulintchenko et al., 2003). Тем не менее, нельзя исключить, что структурно-функциональные комплексы в зонах мембранных контактов, участвующие в процессах обмена различных метаболитов между ЭР и митохондриями, могут оказывать свое влияние также и на транспорт ДНК в митохондрии. Исходя из этого, мы попытались осуществить реконструкцию внутриклеточных взаимодействий митохондрий и эндоплазматического ретикулума с целью изучения влияния мембран ЭР на импорт ДНК. Для этой цели импорт ДНК в системе *in organello* проводили в присутствии общей микросомальной фракции (фрагментированных мембран ЭР). Подобный способ реконструкции внутриклеточных взаимодействий между митохондриями и ЭР был использован для изучения импорта липидов в изолированные митохондрии дрожжей и млекопитающих (Vance et al., 1990; Achleitner et al., 1999).

В результате проведенного исследования обнаружен значительный стимулирующий эффект микросомальных мембран на активность импорта ДНК в изолированные митохондрии картофеля. Присутствие 5 мкг микросомального белка усиливало импорт фрагмента ДНК размером 717 п.н. примерно в 30 раз (рис. 1, А). Для фрагмента ДНК длиной 9 т.п.н. степень активации была значительно ниже (рис. 1, Б).

С целью выявления специфичности влияния мембранной фракции ЭР нами протестировано проявление эффекта микросом на импорт ДНК в митохондрии и митопласты (митохондрии, у которых была удалена внешняя мембрана). Добавление в среду инкубации 5 мкг микросомального белка стимулировало импорт ДНК в изолированные митохондрии картофеля, в среднем в 20–29 раз, а в митопласты – в 4–6 раз (рис. 1, В). Таким образом, для активации импорта ДНК необходимо взаимодействие микросомальной фракции либо с внешней мембраной митохондрий, либо с контактными сайтами обеих митохондриальных мембран. Очевидно, что именно белки внешней мембраны митохондрий играют ключевую роль в формировании структурно-функциональных комплексов между митохондриями и мембранными структурами ЭР.

В специальной серии экспериментов установлено, что активирующее влияние микросомальной фракции имеет выраженный видоспецифический характер. Активация транспорта ДНК в митохондрии такого представителя двудольных растений как картофель в присутствии микросом, полученных из двудольных растений (*Solanum tuberosum*, *Arabidopsis thaliana*), была значительно выше по сравнению с эффектом микросомальной фракции кукурузы (*Zea mays*), являющейся представителем однодольных.

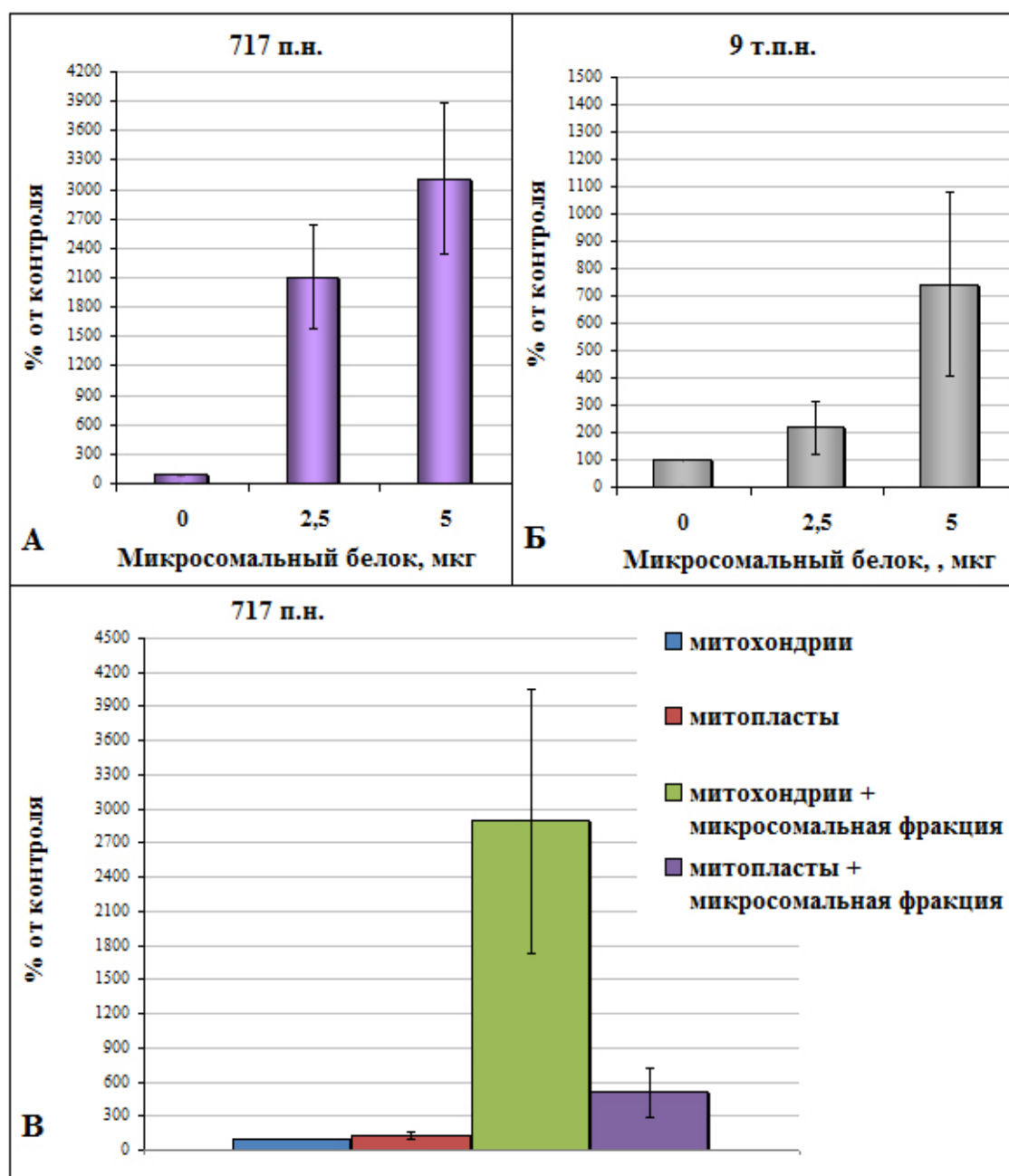


Рис. 1. Импорт ДНК в изолированные митохондрии *S. tuberosum* в присутствии микросомальной фракции.

Анализ эффективности импорта фрагментов ДНК длиной 717 п.н. (А) и 9 т.п.н. (Б). 0 – импорт ДНК в изолированные митохондрии (без микросомальной фракции). (В) Импорт фрагмента ДНК длиной 717 п.н. в присутствии микросомальной фракции картофеля (5 мкг). Митохондрии – импорт фрагмента ДНК длиной 717 п.н. в изолированные митохондрии (без микросомальной фракции). Митопласты – импорт ДНК в митопласты. Анализ активности импорта проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени.

Несмотря на то, что в настоящее время практически отсутствует информация о составе этих белковых комплексов в растениях, на основании полученных данных мы предполагаем, что, помимо митохондриальных белков, в формировании определенных каналов/пор, способствующих импорту ДНК в митохондрии в условиях *in vivo*, очевидно, могут принимать участие и белки ЭР.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №18-04-00603), с использованием оборудования ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН.

Литература

Achleitner G., Gaigg B., Krasser A., Kainersdorfer E., Kohlwein S.D., Perktold A., Zellnig G., Daum G. Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact // *Eur J Biochem.* – 1999. – V. 264 (2). – P. 545–553.

Kornmann B., Currie E., Collins S.R., Schuldiner M., Nunnari J., Weissman J. S., Walter P. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen // *Science.* – 2009. – V. 325. – P. 477–481.

Koulintchenko M., Konstantinov Y., Dietrich A. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex // *EMBO J.* – 2003. – V. 22 (6). – P. 1245–1254.

Vance J.E. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria // *J Biol Chem.* – 1990. – V. 265 (13). – P. 7248–7256.

Wiedemann N., Meisinger C., Pfanner N. Connecting organelles // *Science.* – 2009. – V. 325. – P. 403–404.

ИЗМЕНЕНИЕ В СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ВАКУОЛЯРНОГО КОМПАРТМЕНТА КЛЕТОК КАЛЛУСА ЯЧМЕНЯ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ АЛЮМИНИЯ

Н.В. Кононенко¹, Е.Н. Баранова¹, И.А. Чабан¹, О.Н. Щуплецова², И.Г. Широких²

¹ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии,
Москва, e-mail: nilava@mail.ru

²ФГБНУ Зональный научно-исследовательский институт сельского хозяйства
Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого, Киров, e-mail: irgenal@mail.ru

Согласно современным представлениям, одним из механизмов цитотоксического действия алюминия является окислительный стресс (ApeI, 2004). На него указывает обнаруженная в растениях, подвергнутых воздействию токсичных концентраций алюминия, активация генов пероксидазы и глутатион-S-трансферазы. Защита осуществляется функционированием антиоксидантной системы, которая включает как антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и каталаза) так и низкомолекулярные антиоксиданты, которые перехватывают свободные радикалы, восстанавливают активные формы кислорода (АФК) и продукты окислительного метаболизма (Креславский и др., 2012; Van Breusegem et al., 2001; ApeI, 2004).

На клеточном уровне потенциальными мишенями токсического действия алюминия являются клеточные стенки и плазматические мембраны (Kochian et al., 2005), ядерная ДНК (Silva et al., 2000), ядрышки (Qin et al., 2010) и цитоскелет (Sivaguru et al., 2003).

Цель настоящей работы – изучить действие алюминия на структурную организацию вакуолярного компартмента клеток каллуса гибридной линии ячменя Дуэт × Биос.

С использованием метода электронной микроскопии проведен сравнительный анализ структурной организации каллусов гибридной линии ячменя Дуэт × Биос, выращенных в стандартных условиях культивирования и на средах, содержащих ионы алюминия (20 мг/л и 40 мг/л).

В структуре периферической зоны каллуса, растущего в среде без алюминия, наблюдали дифференцированные клетки с многочисленными мелкими округлыми вакуолями с незначительными инвагинациями мембраны тонопласта, заполненные однородным материалом (рис. а, б).

Некоторые клетки содержали более крупные вакуоли, с плотными серповидными включениями и плотные глобулы (рис. в, г). Другой тип клеток включал вакуоли, содержащие глобулярные включения, окруженные дебрисом (рис. д, е).

Каллус, выращенный в селективных условиях (20 мг/л алюминия), формирует на своей поверхности многочисленные шаровидные выросты, в центральной области которых располагаются зоны меристематических клеток (морфогенные зоны), а на периферии морфогенных зон – дифференцированные клетки. Ближе к периферии каллуса располагаются клетки с многочисленными вакуолями, имеющими неровный край с глубокими инвагинациями со светлым содержимым (рис. ж, з), а также клетки, имеющие мелкие вакуоли с множественными плотными включениями, примыкающие к мембране тонопласта (рис. и, к) или клетки с вакуолями неправильной формы с различной плотностью (рис. л, м).

Основным структурным элементом каллусов, выращенных в условиях жесткого отбора (40 г/л алюминия, рН 4,0), являются крупные комплексы, сформированные из компактно расположенных клеток. В зоне темных клеток, ближе к периферии комплекса, располагаются дифференцированные клетки. В отдельных клетках наблюдали крупную вакуолярную сеть с темным гомогенным содержимым и неровным краем

(рис. *н, о*). Наиболее часто встречаются клетки с многочисленными крупными вакуолями, в которых депонирован глобулярный материал и плотные отложения вдоль мембраны тонопласта (рис. *н, р*). Также имеет место отсутствие вакуолей в ряде клеток, в которых формируются зоны, различающиеся по плотности (рис. *с, т*).

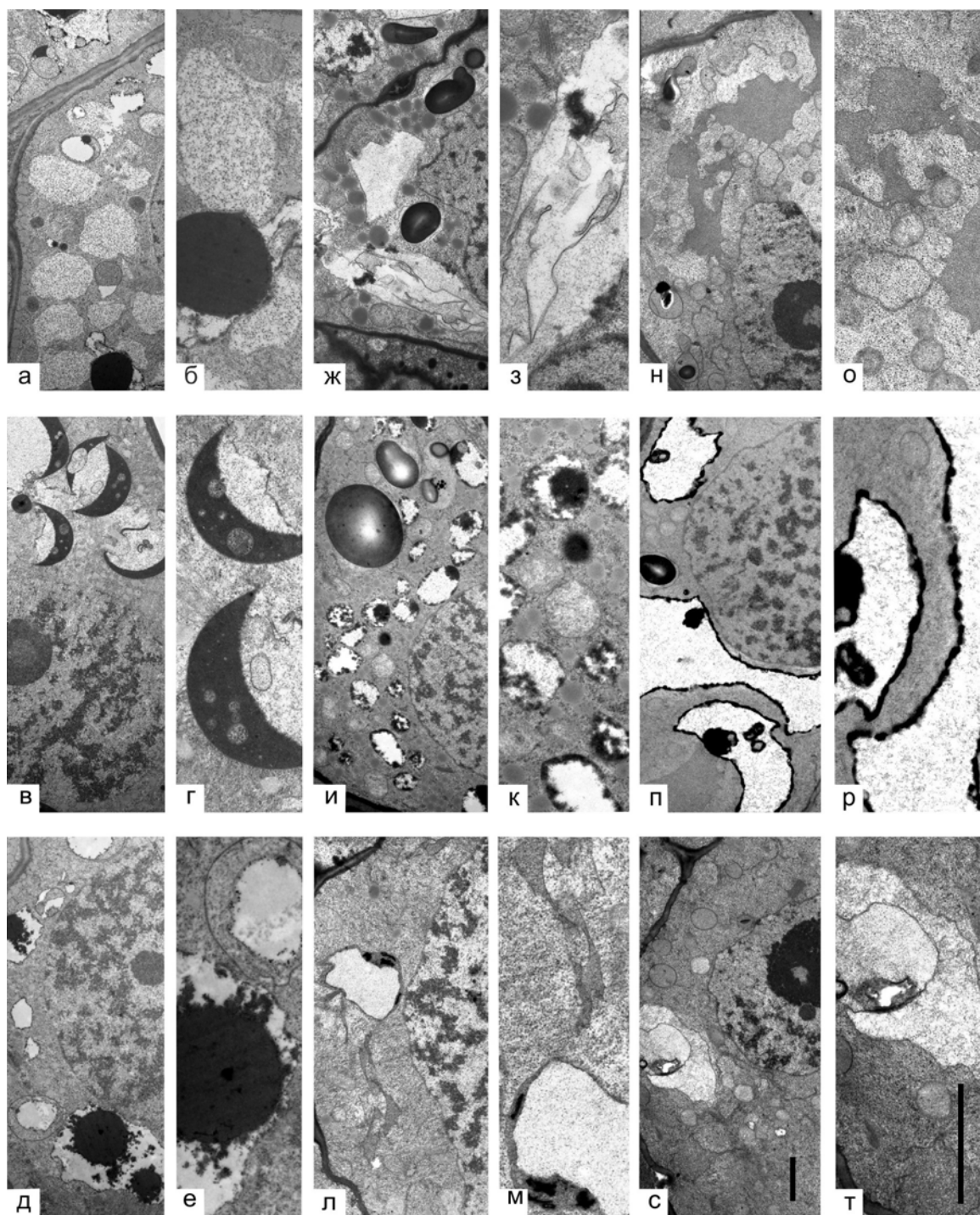


Рис. Ультраструктура клеток каллуса гибридной линии ячменя Дуэт х Биос:

а-е – контроль; *ж-м* – 20 мг/л алюминия; *н-т* – 40 мг/л алюминия. Масштабный отрезок 5 мкм.

Полученные в работе данные показывают, что на ультраструктурном уровне мишенью токсического действия алюминия на клетки ячменя являются вакуоли. По мере увеличения концентрации алюминия вакуоли изменяют структурную организацию от многочисленных мелких, иногда заполненных различающимся содержимым, до круп-

ных вакуолей с включением светлого или плотного материала в виде глобул и/или имеющих плотный прилегающий к мембране тонопласта материал. Можно предположить, что аккумуляция алюминия не препятствует синтезу мембран тонопласта, слиянию вакуолей, но оказывает влияние на состав внутреннего содержимого вакуолей, на их осмотические свойства и депонирование осmioфильного материала вдоль мембраны тонопласта. Возможно, что внутриклеточными механизмами, обеспечивающими толерантность клеток каллуса к действию алюминия, является активация экспрессии генов, кодирующих синтез белков тонопластной мембраны и влияющих на компарментализацию алюминия в вакуоли.

Литература

- Креславский В.Д., Лось Д.А., Алахвердиев С.И., Кузнецов В.В.* Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // Физиология растений. – 2012. – Т. 59. – С. 163–178.
- Apel K., Hirt H.* Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction // *Ann. Rev. Plant Biol.* – 2004. – V. 55. – P. 373–399.
- Kochian L.V., Pineros M.A., Hoekenga O.A.* The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity // *Root Physiology: from Gene to Function*. Eds Kochian L.V. – 2005. – Netherlands: Springer. – P. 175–195.
- Qin F.J., Sun Q.W., Huang L.M., Chen X.S., Zhou D.X.* Rice SUVH histone methyltransferase genes display specific functions in chromatin modification and retrotransposon repression // *Molecular plant.* – 2010. – V. 3 (4). – P. 773–782.
- Silva I. R., Smyth T.J., Moxley D.F., Carter T.E.* Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy // *Plant Physiology.* – 2000. – V. 123 (2). – P. 543–552.
- Sivaguru M., Ezaki B., He ZH, Tong H., Osawa H., Baluska F., Volkmann D., Matsumoto H.* Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in Arabidopsis // *Plant Physiology.* – 2003. – V. 132 (4). – P. 2256–2266.
- Van Breusegem F., Vranova E., Dat J.F., Inzé D.* The role of active oxygen species in plant signal transduction // *Plant Sci.* – 2001. – V. 161. – P. 405–414.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАКТОРОВ ИМПОРТА ДНК В МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ

Ю.М. Константинов^{1,2}, М.В. Кулинченко¹, Е.С. Клименко¹,
Т.А. Болотова¹, В.И. Тарасенко¹, В.Н. Шмаков¹

¹ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: yukon@sifibr.irk.ru

²ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, Иркутск

Генетическую систему митохондрий высших растений отличает от других представителей эукариот высокая динамичность и чрезвычайно большие размеры митохондриальной хромосомы, а также наличие видоспецифических наборов кольцевых и линейных плазмид. Такие особенности митохондриального генома растений связывают с активно протекающими в этих органеллах процессами горизонтального переноса генов, которые происходят, по всей вероятности, с участием механизма импорта ДНК в митохондрии (Константинов и др., 1988, 1989; Koulintchenko et al., 2003; Клименко и др., 2011). Мы предположили, что набор участвующих в импорте ДНК белков не ограничивается, как показано ранее порином (VDAC) в наружной мембране и адениннуклеотид-трансферазой (АНТ) во внутренней мембране органелл (Koulintchenko et al., 2003), а перенос молекул ДНК разной длины может происходить с участием нескольких мембранных каналов. В данной работе предпринята попытка выявления и расшифровки альтернативных путей импорта ДНК разной длины и структуры в митохондрии растений. Основными используемыми подходами были: (1) ингибиторный анализ активности ряда мембранных переносчиков, предположительно вовлеченных наряду с транспортом метаболитов в процессы переноса ДНК в митохондрии; (2) использование мутантных линий арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) с инактивированными генами, кодирующими потенциальные белковые факторы импорта нуклеиновых кислот; (3) изучение импорта ДНК в митохондрии протопластов. Общеизвестно также, что важную роль в нормальном функционировании митохондрий играет постоянное взаимодействие этих органелл с эндоплазматическим ретикуломом (ЭР) (Camara et al., 2010; Lebedzinska et al., 2009). В частности, межмембранные контакты митохондрий и ЭР необходимы для импорта синтезируемых в ЭР липидов в митохондрии (Flis, Daum., 2013). В связи с этим нами был изучен также митохондриальный импорт ДНК в реконструированной системе, включающей изолированные митохондрии клубней картофеля (*Solanum tuberosum*) и микросомальную фракцию мембран ЭР нескольких видов растений. Для получения изолированных митохондрий использовали растительный материал *Solanum tuberosum*, *Brassica rapa*, *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*. Импорт ДНК в митохондрии проводили в системе *in organello* с использованием радиоактивно меченой ДНК (Koulintchenko et al., 2003) и/или методом ПЦР в реальном времени (Клименко и др., 2011). Для выявления и характеристики возможных альтернативных путей транспорта ДНК в митохондрии использовали набор ДНК-субстратов длиной от 100 п.н. до 12000 п.н., разбитый условно на группы субстратов малой (100–300 п.н.), средней (700–3000 п.н.) и большой (> 6000 п.н.) длины. Для изучения роли структурных особенностей ДНК-субстратов импорта использовали набор конструкций, различающихся наличием или отсутствием концевых инвертированных повторов (КИП) линейной плазмиды 11,6 т.п.н. митохондрий репы (*Brassica rapa*) или линейных S1, S2 плазмид кукурузы (*Zea mays*).

В ходе выполнения работы получены следующие результаты. Чтобы выяснить вопрос о возможном существовании независимых путей импорта ДНК разной длины в митохондрии, мы определили кинетические параметры поглощения ДНК-субстратов

малой и средней длины изолированными митохондриями *S. tuberosum*. В случае импорта ДНК малой длины (265 п.н.) обнаружено практически полное отсутствие насыщения транспорта по мере увеличения концентрации субстрата: количество поглощенной ДНК увеличивалось пропорционально содержанию ДНК, добавленной в среду инкубации митохондрий. В случае импорта фрагмента ДНК средней длины (2732 п.н.) выявилась другая зависимость эффективности поглощения субстрата от его содержания в среде инкубации: при содержании от 0,063 до 0,25 мкг наблюдается незначительное увеличение количества поглощенной ДНК; затем при концентрациях от 0,5 до 1,5 мкг происходит резкое увеличение активности поглощения, в 2 раза, и, далее, при содержании 2–4 мкг наблюдалось еще одно резкое увеличение уровня поглощения, в 2,5–3 раза. Полученные данные, позволяют заключить, что импорт ДНК малой и средней длины происходит, по всей видимости, с помощью различных механизмов, поскольку в случае импорта ДНК-субстрата 265 п.н. не происходило насыщения процесса в использованных условиях, тогда как для импорта ДНК-субстрата 2732 п.н. характерно ступенчатое насыщение процесса. Ступенчатый характер насыщения в последнем случае указывает на то, что транспорт молекул ДНК средней длины осуществляется не только с участием VDAC во внешней и АНТ во внутренней митохондриальной мембранах (Koulintchenko et al., 2003). Вероятно, при насыщении конкретного транспортного пути импорта ДНК в процесс последовательно включаются другие способы транспортировки ДНК через двойную мембрану митохондрий, основанные на работе альтернативных белков-переносчиков. Определение кинетики транспорта ДНК малой длины (265 п.н.) в митохондрии показало, что ДНК такого размера может переноситься в органеллы как с участием VDAC и АНТ, так и посредством других мембранных каналов без участия специфической рецепции белками внешней мембраны митохондрий. Изучение участия VDAC (порина) в механизме импорта ДНК с использованием инсерционных мутантов арабидопсиса с инактивированными генами At3g01280 и At5g15090, кодирующими изоформы митохондриального порина VDAC1 и VDAC3, соответственно, позволило установить, что митохондрии, выделенные из мутантов с отсутствием одной из этих изоформ порина (VDAC1 или VDAC3) транспортируют ДНК с большей эффективностью по сравнению с митохондриями растений дикого типа. При этом импорт ДНК малой и средней длины в большей степени активируется в митохондрии мутанта *vdac1* по сравнению с митохондриями мутанта *vdac3*.

Примечательно, что усиление активности митохондриального импорта у этих мутантов не было специфичным в отношении длины транспортируемой молекулы ДНК. В настоящее время пока трудно найти объяснение наблюдаемому нами явлению стимуляции митохондриального импорта ДНК в отсутствие изоформ VDAC. Можно предположить, что в случае этих мутаций нарушена барьерная («запирающая») функция порина в наружной митохондриальной мембране, в большей степени, выраженная в отношении транспорта молекул ДНК малой длины. В специальной серии экспериментов установлено, что микросомальная фракция клетки (мембраны ЭР) оказывает выраженное стимулирующее действие на транспорт ДНК в митохондрии. Активирующее влияние микросом на митохондриальный импорт ДНК имело выраженный видоспецифический характер. Активация импорта ДНК в митохондрии такого представителя двудольных растений как картофель (*S. tuberosum*) в присутствии микросом, полученных из двудольных растений, была значительно выше по сравнению с эффектом микросомальной фракции из проростков такого представителя однодольных как кукуруза (*Zea mays*). Полученные результаты служат указанием на важную роль взаимодействий митохондрий и эндоплазматического ретикула в импорте ДНК в митохондрии *in vivo*. Для получения более детальных представлений о возможной физиологической и генетической значимости импорта ДНК в митохондрии *in vivo* была разработана специальная система, основанная на получении изолированных протопластов *Arabidopsis thaliana*. С использованием протопластов установлено, что находящаяся в цитоплазме ДНК может активно поступать в митохондрии. Содержание импортированного в мито-

хондрии ДНК-субстрата при этом существенно выше в условиях импорта *in vivo* по сравнению с условиями *in organello*. Показано, что количество молекул ДНК, импортировавшихся в митохондрии в условиях *in vivo*, уменьшается с увеличением размера импортируемого субстрата. При трансформации ДНК протопластов, изолированных из листьев растений дикого типа (*Col-0*) и двух мутантных линий *vdac1* и *vdac3*, происходила активация транспорта ДНК в митохондрии в протопластах мутанта с инактивированной изоформой порина VDAC1 по сравнению с уровнем митохондриального импорта в протопластах дикого типа и *vdac3*. Сходные зависимости, полученные в экспериментах по изучению импорта ДНК в изолированных митохондриях и в протопластах, свидетельствуют в пользу того, что обнаруженные закономерности импорта ДНК *in organello* отражают процессы, протекающие *in vivo*. Совокупность полученных в данной работе фактов в пользу существования в митохондриях растений нескольких механизмов импорта ДНК наглядно, на наш взгляд, подтверждает необходимость активного продолжения исследований в этом направлении, поскольку выяснение детальных механизмов импорта ДНК позволит в будущем разработать эффективные методы манипуляций с митохондриальным геномом для решения фундаментальных и прикладных задач молекулярной и клеточной биологии, биотехнологии и биомедицины.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты 15-04-05046, 15-54-16010, 18-04-00603).

Литература

Клименко Е.С., Милейко В.А., Морозкин Е.С., Лактионов П.П., Константинов Ю.М. Характеристика импорта и экспорта ДНК в митохондриях картофеля (*Solanum tuberosum*) с использованием метода количественной ПЦР // Биологические мембраны. – 2011. – Т. 28 (3). – С. 199–205.

Константинов Ю.М., Подсосонный В.А., Луценко Г.Н. Синтез ДНК бактериальной векторной плазмиды pBR322 в изолированных митохондриях кукурузы // Доклады АН СССР. – 1988. – Т. 298. – С. 502–504.

Константинов Ю.М., Подсосонный В.А., Луценко Г.Н., Ривкин М.И. Транслокация бактериальных векторных плазмид в митохондрии проростков кукурузы // Биохимия. – 1989. – Т. 54. – С. 154–158.

Camara A.K.S., Lesnevsky E.J., Stowe D.F. Potential therapeutic benefits of strategies directed to mitochondria // Antioxidants & Redox Signaling. – 2010. – V. 13 (3). – P. 279–347.

Flis V.V. and Daum G. Lipid transport between the endoplasmic reticulum and mitochondria // in: The Endoplasmic Reticulum. A Subject Collection from Cold Spring Harbor Perspectives in Biology (Ferro-Novick S., Rapoport T.A. and Schekman R., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA. – 2013. – P. 109–130.

Koulintchenko, M., Konstantinov, Y. and Dietrich, A. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex // The EMBO Journal. – 2003. – V. 22. – P. 1245–1254.

Lebedzinska M., Szabadkai G., Jones A.W.E., Duczynski J., Wieckowski M.R. Interactions between the endoplasmic reticulum, mitochondria, plasma membranes and other subcellular organelles // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. – 2009. – V. 41. – P. 1805–1816.

РАЗЛИЧИЯ В МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ ТЕБУКОНАЗОЛА И ТЕБУКОНАЗОЛ-СОДЕРЖАЩЕГО ПРОТРАВИТЕЛЯ НА АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

*А.В. Корсукова^{1,2}, О.А. Боровик¹, Т.П. Побежимова¹,
Н.С. Забанова^{1,2}, Н.В. Дорофеев¹, О.И. Грабельных^{1,2}*

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

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

Системные фунгициды – ингибиторы синтеза стерина – получили наибольшее развитие и применяются в сельском хозяйстве против болезней растений, вызываемых базидиомицетами (ржавчинные и головнёвые грибы), аскомицетами (парша, мучнистая роса, склеротиния, септориоз) и некоторыми дейтеромицетами. Азолы, содержащие триазольную группу и относящиеся к ингибиторам C^{14} -деметилювания, занимают лидирующую позицию в области синтетических фунгицидов и активно используются не только для борьбы с возбудителями болезней растений, но и в качестве ретардантов (Попов и др., 2003). Ретарданты – производные 1,2,4-триазола – способствуют замедлению роста растений посредством нарушения синтеза гиббереллина и увеличения содержания абсцизовой кислоты (Прусакова, Чижова, 1998; Чижова и др., 2005). Поиск химических соединений, способствующих повышению холодо- и морозоустойчивости растений, в настоящее время является одним из приоритетных направлений. Митохондрии, играющие ведущую роль в жизни растений, участвуют и в механизмах их адаптации к низким температурам (Грабельных и др., 2014). Переход растений в состояние покоя и формирование устойчивости к неблагоприятным температурам сопровождается ингибированием процессов дыхания (Трунова, 2007; Титов, Таланова, 2011). Известно, что фунгициды, в том числе триазольной природы, являются ингибиторами митохондриального дыхания, и их действие направлено на комплекс I дыхательной цепи митохондрий (Сафина-Осташевская, Гордон, 1984). В связи с этим можно предположить, что тебуконазол (1-(4-хлорфенил)-4,4-диметил-3-(1H-1,2,4-триазол-1-илметил)-3-пентанол) будет оказывать влияние на окислительную и фосфорилирующую активность митохондрий. Изучение данного вопроса явилось целью настоящей работы в рамках исследования участия тебуконазола в механизмах низкотемпературной адаптации растений.

Объектом исследования выступали этиолированные (выращенные в темноте при 24 °С) проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт «Иркутская»).

Для обработки семян озимой пшеницы использовали тебуконазол-содержащий фунгицид (содержание тебуконазола 60 г/л) – протравитель (1,5 мкл препарата на г семян, мкл/г) «Бункер» (ЗАО Фирма «Август»), а для обработки 2-х суточных проростков – 1 мМ раствор тебуконазола (Tebuconazol PESTANAL, “Sigma-Aldrich”, Германия).

Доза ретарданта «Бункер» – 1,5 мкл/г семян – была подобрана в ходе лабораторных исследований по изменению ростовых параметров coleoptилей проростков озимой пшеницы (Korsukova et al., 2015). Степень ингибирования длины coleoptилей проростков злаков препаратом «Бункер» 1,5 мкл/г семян статистически значимо отличалась от величины ингибирования при 0,5 (рекомендуемой производителем для достижения фунгицидного эффекта), 1 и 3 мкл/г семян, в то же время между вариантами 3 и 4 мкл/г семян статистически значимых отличий не наблюдали (Корсукова, 2016).

Концентрация тебуконазола 1 мМ также подбиралась экспериментально. Так, тебуконазол в концентрации 1 мМ вызывал ингибирование длины coleoptилей, стати-

стически значимо не отличающееся от ингибирования, которое оказывал препарат «Бункер» в концентрации 1,5 мкл/г семян.

В течение 7-ми суток при 2 °С проводили холодное закаливание 3-х суточных проростков.

Выделение митохондрий из побегов этиолированных проростков проводили по методике (Побежимова и др., 2004).

Полярнографическим методом определяли окислительную и фосфорилирующую активность изолированных митохондрий. Для полярнографического анализа использовали платиновый электрод закрытого типа (электрод Кларка) и полярнограф Oxytherm system (“Hansatech Inst.”, Англия), используя объём ячейки 1,4 мл. В качестве субстратов окисления использовали 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата; 8 мМ сукцинат в присутствии 5 мМ глутамата и 3 мкМ ротенона; 1 мМ НАД·Н; 2 мМ аскорбат плюс 0,2 мМ тетраметил-п-фенилендиамин. Глутамат добавляли для устранения оксалоацетатного ингибирования. При окислении НАД·Н из состава среды инкубации исключали ЭДТА и для активации «внешней» ротенон-нечувствительной НАД·Н дегидрогеназы включали 0,06 мМ CaCl₂ (Møller et al., 1981). Для ингибирования цитохромного пути использовали 0,4 мМ KCN, для ингибирования альтернативного пути – 1 мМ бензгидроксамовую кислоту. Вклад цитохромного пути рассчитывали как дыхание, ингибируемое KCN, а вклад альтернативного пути, связанного с функционированием цианид-резистентной альтернативной оксидазы (АО), как дыхание, ингибируемое бензгидроксамовой кислотой в присутствии KCN (потенциальная активность АО).

В ходе исследования были выявлены различия в действии тебуконазол-содержащего протравителя «Бункер» и тебуконазола на окислительную и фосфорилирующую активность митохондрий озимой пшеницы и вклад в дыхание цитохромного и альтернативного путей переноса электронов как при обычной температуре выращивания, так и при закаливании растений.

Так, в контрольных условиях тебуконазол значительно снижал скорость окисления митохондриями малата, действуя на комплекс I дыхательной цепи, и не приводил к статистически значимому снижению скоростей дыхания митохондрий при окислении сукцината и НАД·Н, в отличие от препарата «Бункер», подавляющего в целом перенос электронов по дыхательной цепи. При этом тебуконазол ингибировал цитохромный путь дыхания, в то время как тебуконазол-содержащий протравитель подавлял транспорт электронов и по цитохромному, и по альтернативному путям. Учитывая, что препарат «Бункер» и тебуконазол оказывают ростингибирующее действие на проростки злаков (Korsukova et al., 2015; Корсукова, 2016), и при этом митохондрии, изолированные из таких проростков, обладают сниженным дыханием, можно предполагать, что такое изменение носит адаптивный характер и направлено на снижение потребления субстратов дыхания, в первую очередь сахаров, и повышение устойчивости незакалённых растений (Корсукова, 2016).

На холодозакалённых проростках озимой пшеницы тебуконазол приводил к незначительной стимуляции дыхания митохондрий независимо от использованного субстрата окисления. У закалённых проростков озимой пшеницы из семян, обработанных препаратом «Бункер», тенденцию к увеличению скоростей дыхания митохондрий наблюдали при окислении малата, а при окислении сукцината и НАД·Н происходило снижение скоростей дыхания митохондрий. Таким образом, в митохондриях из холодозакалённых растений действие тебуконазола и препарата «Бункер» было связано с некоторым усилением их окислительной активности, главным образом при использовании в качестве субстрата малата. При этом наблюдали увеличение вклада альтернативного пути дыхания. Вероятно, при холодном закаливании реализуется защитный механизм, направленный на поддержание скоростей дыхания митохондрий и активацию альтернативного пути, связанного с функционированием АО, необходимой для адаптации растений к низким температурам (Грабельных и др., 2014).

Выявленные различия в действии тебуконазол-содержащего протравителя «Бункер» и тебуконазола свидетельствуют о том, что влияние промышленного препарата «Бункер» на параметры дыхания митохондрий опосредовано не только входящим в его состав тебуконазолом, но и вспомогательными соединениями.

Литература

Грабельных О.И., Боровик О.А., Таусон Е.Л. (и др.). Митохондриальные энергорассеивающие системы (альтернативная оксидаза, разобщающие белки и «внешняя» NADH-дегидрогеназа) вовлечены в развитие морозоустойчивости проростков озимой пшеницы // Биохимия. – 2014. – Т. 79, № 6. – С. 645–660.

Корсукова А.В. Изменение холодо- и морозоустойчивости проростков злаков под действием тебуконазол-содержащего протравителя семян: Дис. ... канд. биол. наук: 03.01.05. – Иркутск, 2016. – 181 с.

Побежимова Т.П., Колесниченко А.В., Грабельных О.И. Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез; Отв. ред. чл.-корр. РАН Р.К. Салеев. – М.: ООО «НПК ПРОМЭКОБЕЗОПАСНОСТЬ», 2004. – 98 с.

Попов С.Я., Дорожкина Л.А., Калинин В.А. Основы химической защиты растений: Учебное пособие. – М.: Арт-Лион, 2003. – 208 с.

Прусакова Л.Д., Чижова С.И. Применение производных триазола в растениеводстве // Агрохимия. – 1998. – № 10. – С. 37–44.

Сафина-Осташевская Г.Ф., Гордон Л.Х. Действие фунгицидов на дыхательный газообмен корней пшеницы // Физиология растений. – 1984. – Т. 31, № 5. – С. 896–901.

Титов А.Ф., Таланова В.В. Локальное действие высоких и низких температур на растения. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2011. – 166 с.

Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс. – М.: Наука, 2007. – 54 с.

Чижова С.И., Павлова В.В., Прусакова Л.Д. Содержание абсцизовой кислоты и рост растений ярового ячменя под действием триазолов // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 1. – С. 108–114.

Korsukova A.V., Borovik O.A., Grabelnych O.I. (et al.). The tebuconazole-based protectant of seeds “Bunker” induces the synthesis of dehydrins during cold hardening and increases the frost resistance of wheat seedlings // Journal of Stress Physiology and Biochemistry. – 2015. – V. 11, N 4. – P. 118–127.

Møller I.M., Johnston S.P., Palmer J.M. A specific role for Ca^{2+} in the oxidation of exogenous NADH by Jerusalem-artichoke (*Helianthus tuberosus*) mitochondria // J. Biochem. – 1981. – V. 194, N 2. – P. 487–495.

АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ТРАНСПЛАСТОМНЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА

Б.Р. Кулуев, А.В. Князев, З.Р. Вершинина, Ал.Х. Баймиев, А.В. Чемерис
Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
ФГБУН Уфимского федерального исследовательского центра РАН,
Уфа, e-mail: kuluev@bk.ru

Многие лекарственные препараты представляют собой вторичные метаболиты растений, извлекаемые из их надземных или подземных частей. При этом некоторые лекарственные растения занесены в Красные книги и/или встречаются на ограниченной территории, что затрудняет либо даже исключает заготовку в массовых количествах ценного лекарственного сырья из них. В этой связи удобной альтернативой служит биотехнологическое производство подобных препаратов с помощью культивирования отдельных органов таких растений в искусственных условиях на специализированных биофабриках или биореакторах. Помимо вторичных метаболитов, с помощью биотехнологии в генетически-модифицированных растениях производится наработка веществ первичного метаболизма, главным образом, рекомбинантных белков. Для этого еще в конце прошлого века были созданы трансгенные растения, в которых нарабатываются животные белки медицинского назначения. На их основе также были получены культуры бородатых корней (hairy roots), продуцирующие такие препараты. К важным недостаткам трансгенных растений-продуцентов, как и бородатых корней можно отнести сравнительно низкий уровень содержания целевого белка в растении, которое часто оказывается ниже 1 % от общего количества растворимого белка. Преодолеть эти проблемы частично удастся за счет получения транспластомных растений. В отличие от трансгенных растений, в случае с транспластомными растениями трансформации подвергаются хлоропласты, а чужеродные гены внедряются в геном пластид – пластоому. Повышение уровня экспрессии чужеродного белка в случае с транспластомными растениями, в том числе, достигается за счет увеличения дозы трансгена, так как каждый хлоропласт содержит до 100 копий пластома, причем в каждой клетке содержится до 100 хлоропластов.

Первые трансгенные растения были созданы в 1977 году (Ackermann, 1977), примерно в это же время были созданы первые бородатые корни (Anderson, Moore, 1979). Первые транспластомные растения были получены в 1990 году З. Сваб, П. Хайдукевич и П. Малига (Svab et al., 1990). Спустя 25 лет после этого нами было решено объединить технологии получения транспластомных растений и бородатых корней. Целью нашей работы было создание транспластомных растений табака, а также агробактериальная трансформация этих растений *Agrobacterium rhizogenes*.

Для создания транспластомных растений табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana был использован вектор pKMS8 с геном устойчивости к спектиномицину (*aadA*) без целевых генов. Эксперименты по пластидной трансформации были проведены методом бомбардировки микрочастицами при помощи прибора PDS-1000/He (Bio-Rad, США) согласно протоколу описанному ранее (Данилова, 2011). В ходе работы были получены три разных линии спектиномицин и стрептомицин-устойчивых растений табака, транспластомность которых была подтверждена методами ПЦР по конечной точке, количественного ПЦР в реальном времени, экспериментами по анализу у проростков расщепления признака устойчивости к спектиномицину, а также анализами эффективности передачи признаков антибиотикоустойчивости через пыльцу. Далее экспланты листьев транспластомных растений табака были использованы для агробактериальной трансформации при помощи штамма 15834 *A. rhizogenes*. Были получены бо-

родатые корни табака, способные к росту на питательной среде со спектиномицином. ПЦР-анализ полученных бородачатых корней показал в них наличие как *rol*-генов А и В, так и гена *aadA*. Планируется проведение определения уровня экспрессии ядерных и пластидных генов в полученных бородачатых корнях табака. Предполагается, что полученные нами бородачатые корни с трансформированными пластидами могут стать перспективной растительной системой для продуцирования рекомбинантных белков.

Литература

Данилова С.А. Получение транспластомных растений табака методом баллистической трансформации // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / под ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012. – 487 с.

Ackermann C. Pflanzen aus agrobacterium rhizogenes-tumoren annicotiana tabacum // Plant Science Letters. – 1977. – V. 8. – P. 23–30.

Anderson A.R., Moore L.W. Host specificity in the genus Agrobacterium // Phytopathology. – 1979. – V. 69. – P. 320–323.

Svab Z., Hajdukievich P., Maliga P. Stable transformation of plastids in higher plants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1990. – V. 87. – P. 8526–8530.

ТЕХНОЛОГИИ ВЗЛОМА ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДА МИТОХОНДРИЙ ЧЕЛОВЕКА

И.О. Мазунин

ФГАОУ ВО Балтийский федеральный университет им. И. Канта,
Калининград, IMazunin@kantiana.ru

Несмотря на значительный прогресс последних лет в редактировании ядерной ДНК, возможность направленного изменения нуклеотидной последовательности митохондриальной ДНК (мтДНК) млекопитающих до сих пор не реализована. Однако создание системы редактирования мтДНК позволило бы решить ряд задач, как фундаментальных, так и прикладных. В частности открыты вопросы подходов к генной терапии заболеваний митохондриальной этиологии, вопросы динамики митохондриальных нуклеотидов, вопросы функционирования определенных элементов в геноме митохондрий. До настоящего времени единственным подходом к устранению мутаций мтДНК в клеточных линиях человека является использование сайт-специфических нуклеаз: направляемые в митохондрии клеток человека эндонуклеазы рестрикции, TAL-эффекторные нуклеазы и нуклеазы типа “цинковые пальцы”. Перечисленные подходы базируются на использовании принципа узнавания белковой молекулой специфической нуклеотидной последовательности мтДНК, внесения в нее двухцепочечного разрыва и последующей элиминацией. Технологии, основанные на системах CRISPR кажутся более гибкими и перспективными, поскольку используют РНК для узнавания ДНК по принципу Уотсона-Крика. Ограничением повсеместного использования таких систем в отношении мтДНК является их двухкомпонентная природа: РНК-направляемая ДНК-нуклеаза и направляющая молекула РНК. Успешная доставка РНК в митохондрии во многом остается под вопросом, хотя существуют доказательства такого импорта. Для запуска репарации по типу гомологичной рекомбинации дополнительно требуется доставка ДНК матрицы (1).

Мы добились эффективного импорта нуклеаз SpCas9 и AsCpf1 в митохондрии путем добавления к их генам последовательности для импорта белков в митохондрию с 5'-конца и последовательности для импорта мРНК к поверхности митохондрий с 3'-конца. Первые эксперименты были проведены с плазмидными векторами (2), затем получены стабильные линии Phoenix, экспрессирующие нуклеазы из ядра. Внутриклеточная локализация нуклеаз была подтверждена методами иммуноцитохимии и белкового блоттинга. Модифицированные варианты нуклеаз были названы MitoCas9 и MitoAsCpf1. Модификация направляющих РНК осуществлялась путем добавления к их последовательности детерминант импорта РНК в митохондрии. Внутри-митохондриальная локализация направляющих РНК была оценена методом цифровой капельной ПЦР с обратной транскрипцией, а также нозерн-блота. Для точной оценки количества копий мтДНК до и после воздействия на клетки РНК-направляемыми ДНК-нуклеазами также использовалась цифровая капельная ПЦР, специально адаптированная для подобных задач (3). Трансфекция клеточной линии, стабильно экспрессирующей MitoCas9, модифицированной направляющей РНК привела к статистически значимому уменьшению количества копий мтДНК (4).

Тем не менее, иной подход нам кажется более продуктивным - это доставка в митохондрии фрагмента двухцепочечной ДНК, который будет кодировать как направляющую РНК для нуклеаз SpCas9 или AsCpf1, так и ДНК-матрицу для обеспечения репарации по пути гомологичной рекомбинации. Доставка такой ДНК в митохондрии могла бы быть обеспечена с помощью рекомбинантного белка, состоящего из детерминанты импорта белка в митохондрии, слитой с TAL-эффектором, специфично узнающим выбранную нуклеотидную последовательность на молекуле ДНК. Такой подход

является абсолютно новым и представляется реализуемым в свете накопленного нами опыта по доставке макромолекул внутрь митохондрий.

Работа поддержана грантом РНФ 17-75-20015.

Литература

Верещагина Н.А., Константинов Ю.М., Каменский П.А., Мазунин И.О. Импорт белков и нуклеиновых кислот в митохондрии // Биохимия. – 2018 (в печати).

Орищенко К.Е., Софронова Ю.К., Чупахин Е.Г., Лунев Е.А., Мазунин И.О. Импорт нуклеазы Cas9 в митохондрии // Гены & Клетки. – 2016. – № 2. – С. 100–105.

Skuratovskaya, D.A., Sofronova, J.K., Zatolokin, Popadin, K.Y., P.A., Vasilenko, M.A., Litvinova, L.S., Mazunin, I.O. Additional evidence of the link between mtDNA copy number and the body mass index // Mitochondrial DNA Part A. – 2018. (DOI: 10.1080/24701394.2018.1436170)

Vereschagina N., Orishchenko K., Shevtsova A., Nikitchina N., Mazunin I. Modified CRISPR/Cas9 system shifts down mtDNA copy number. EMBO/FEBS Advanced Lecture Course. – 2017. – Mitochondria in Life, Death and Disease. Brindisi, Italy. – October 9–13, 2017.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И АУТОФАГИЯ В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ: РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ

Ф.В. Минибаева^{1, 2}

¹Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанского научного центра РАН
²ФГАОУ ВО Казанский федеральный университет, Казань, e-mail: minibayeva@kibb.knc.ru

Накопление активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА) является универсальным маркером стресса в клетках живых организмов. Существует тесная связь между метаболическими и сигнальными путями, контролирующими редокс-статус, энергетический метаболизм и аутофагию в растениях, испытывающих воздействие стрессовых факторов. Аутофагия – это эволюционно консервативный путь деградации окисленных, поврежденных и нефункционирующих клеточных макромолекул и органелл. У эукариот аутофагическая деградация необходима для поддержания метаболического гомеостаза, формирования иммунитета и жизнеспособности организма. В 2016 году Нобелевская премия в области физиологии и медицины была вручена Yoshinori Ohsumi за открытия в области изучения механизмов аутофагии. Несмотря на большой прогресс, достигнутый в изучении механизмов аутофагии в клетках дрожжей и млекопитающих, наше понимание относительно того, как этот процесс функционирует в растениях, остается чрезвычайно ограниченным. Это обусловлено сложностью генома растений, наличием ряда биохимических процессов, значительным разнообразием метаболитов и защитных механизмов ввиду автотрофности и прикрепленного образа жизни растений. В настоящей работе мы демонстрируем, что в проростках пшеницы абиотические стрессы, такие как окислительный, нитрозильный и температурный стрессы, а также поранение и обезвоживание, индуцируют формирование аутофагосомальных везикул (аутофагосом) и стимулируют активность аутофагических генов *TaATG4*, *TaATG6*, *TaATG8*. Эти процессы, как правило, сопровождаются падением митохондриального мембранного потенциала и снижением энергетического статуса клеток. Было показано, что при воздействии агрессивных прооксидантов отдельные митохондрии могут являться мишенью для изолирования в аутофагосомах и последующей деградации. Кроме того, некоторые фармакологические агенты, например, ингибиторы митохондриальной ЭТЦ и мембранотропы, также индуцируют повышение уровня АФК, аккумуляцию аутофагосом и вызывают энергетический кризис, выражающийся в снижении митохондриального мембранного потенциала и падении уровня АТФ. Предполагается, что снижение уровня АТФ может активировать SnRK1, ортолог АМФ-зависимой протеинкиназы (АМРК) в клетках млекопитающих. Эта протеинкиназа является триггером аутофагии посредством снятия блока негативного регулятора аутофагии киназы TOR и взаимодействия с аутофагическими белками (Baena-González, Hanson, 2017). Интересно, что экзогенное воздействие на корни интактных проростков естественных NO доноров, например, полиамина спермина, может индуцировать аутофагию без изменения энергетического статуса. В клетках млекопитающих полиамины индуцируют аутофагию вследствие истощения нуклеотидозольного пула ацетил коэнзима А и последующего деацетилирования гистоновых белков еще до падения уровня АТФ (Mariño et al., 2014). Этот процесс также опосредован быстрой активацией АМРК и инактивацией МТОРC1. До сих пор неизвестно, работает ли подобный механизм в растениях. В заключение, механизмы, контролирующие функции аутофагии по выживанию и/или гибели клеток в стрессированных растениях, во многом, зависят от обратимости сдвигов редокс-баланса и энергетического метаболизма.

Литература

- Baena-González E., Hanson J.* Shaping plant development through the SnRK1-TOR metabolic regulators // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2017. – V. 35. – P. 152–157.
- Mariño G., Pietrocola F., Madeo F., Kroemer G.* Caloric restriction mimetics: natural/physiological pharmacological autophagy inducers // *Autophagy*. – 2014. – V. 10. – P. 1879–1882.

ВВЕДЕНИЕ ГЕНА *DES*A Δ 12-АЦИЛ-ЛИПИДНОЙ ДЕСАТУРАЗЫ *SYNECHOCYSTIS* ВЛИЯЕТ НА СТРУКТУРУ ХЛОРОПЛАСТОВ ПРИ ЗАКАЛИВАНИИ КАРТОФЕЛЯ К ГИПОТЕРМИИ

Н.В. Нарайкина, Н.В. Астахова, Т.И. Трунова

Институт физиологии растений РАН, Москва, e-mail: narai@yandex.ru

Устойчивость и адаптация растений к низкой температуре является многокомпонентным процессом и рассматривается как одна из фундаментальных проблем физиологии растений. Несмотря на существенные достижения в этой области, остаются недостаточно исследованными механизмы формирования устойчивости при закаливании растений, относящихся к группе холодостойких, которые, в отличие от теплолюбивых, переносят любые низкие температуры вплоть до замораживания и отличаются от морозостойких растений тем, что гибнут при образовании в них льда.

Поскольку механизмы повреждения холодостойких, теплолюбивых и морозостойких растений неодинаковые, можно предположить у первых наличие особенностей и в процессах закаливания к низкой температуре (НТ), направленных на сохранение функциональной активности клеток при НТ. Такие особенности, прежде всего, могут быть связаны с поддержанием нативности клеточных мембран в условиях НТ, так как хорошо известно, что одной из важнейших причин повреждения растений НТ является фазовый переход мембранных липидов из жидко-кристаллического состояния в гель.

Для поддержания функций мембран у растений, имеющих прикрепленный образ жизни, выработан механизм снижения температуры плавления за счет изменения состава липидов путем увеличения в них доли полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Известно, что повышение содержания ненасыщенных ЖК, т. е. образование двойных связей в молекулах насыщенных ЖК, входящих в состав мембранных липидов, происходит в результате активации ферментов-десатураз ЖК, превращающих одинарные (C-C) связи между атомами углерода в ацильных цепях в двойные (C=C) (Лось, 2001; Wada et al., 1990). Роль десатураз ЖК в устойчивости к гипотермии хорошо изучена на примере одноклеточных синезеленых водорослей *Synechocystis* (Лось, 2014), однако у высших растений этот вопрос исследован недостаточно. В связи с этим изучение изменений жирнокислотного состава мембранных липидов при низкотемпературной адаптации (закаливание) имеет большое значение для понимания физиологических процессов, обеспечивающих формирование устойчивости растений к НТ.

Другим важным функциональным показателем закаливания растений к НТ является активность и устойчивость их фотосинтетического аппарата. Установлено, что среди органелл (ядро, митохондрии, пластиды) растительной клетки первыми на НТ реагируют хлоропласты (Kratch, Wise, 2000). Однако вопрос об адаптации ультраструктуры и мембран хлоропластов в результате низкотемпературного закаливания, в том числе у трансформированных растений картофеля с повышенным содержанием липидов, остается мало исследован.

В связи с этим цель настоящей работы состояла в изучении у растений картофеля изменений ультраструктурной организации хлоропластов и уровня устойчивости к гипотермии индуцируемые низкой закалывающей температурой и введением гена *desA* Δ 12-ацил-липидной десатуразы цианобактерий.

Использовали нетрансформированные растения картофеля *Solanum tuberosum* L. сорта Десница (контроль) и трансформированные геном *desA* Δ 12-ацил-липидной десатуразы цианобактерий (*desA-lic*ВМЗ растения). Растения размножали черенкованием, выращивали на нейтральном субстрате (перлит) при 22°C, 16-часовом фотопериоде и освещенности 100 мкмоль квантов/(м²с) в течение 8 недель. Закаливание проводили при температуре 5°C, в течение 6 дней, на свету. С помощью метода прямого промора-

живания целых растений и определения выхода электролитов из листьев (Нарайкина и др., 2016) показано повышение устойчивости картофеля в результате низкотемпературного закаливания. При этом трансформанты имели достоверно более высокую устойчивость по сравнению с контролем. Кроме того, изучение влияния низкотемпературного закаливания на развитие окислительного стресса (ОС) и активность антиоксидантных ферментов клеток (Нарайкина и др., 2014), не выявили у растений картофеля развивающегося в этих условиях ОС и перекисного окисления липидов, что также свидетельствует о достаточно высокой устойчивости мембранной системы клеток исследуемых растений к НТ.

С помощью методов электронной микроскопии и морфометрии было показано, что в результате закаливания контрольных растений, по сравнению с незакаленными, площадь среза хлоропласта и общая площадь крахмальных зерен, рассчитанная на 1 хлоропласт, снижались почти на 40%, тогда как общая площадь пластоглобул (площадь пластоглобулы $\times$ число пластоглобул в одном хлоропласте) и общее число тилакоидов (число гран $\times$ число тилакоидов в одном хлоропласте) увеличивались на 80 и 35 %, соответственно (табл. 1). Увеличение количества мембран и пластоглобул свидетельствует о сохранении интенсивности липидного метаболизма при снижении температуры.

Таблица 1

Изменения ультраструктурной организации хлоропластов контрольных и *desA-licBM3* растений картофеля после закаливания при $5\pm 0,5^\circ\text{C}$, 6 суток

Объект	Вариант опыта	Площадь хлоропласта (мкм ²)	В одном хлоропласте		
			Общая площадь		Общее число тилакоидов
			Крахмальных зерен (мкм ²)	Пластоглобул (мкм ²)	
контроль	$22\pm 0,5^\circ\text{C}$	$8,98 \pm 0,16$	$3,08 \pm 0,11$	$0,07 \pm 0,005$	$86 \pm 3,65$
<i>desA-licBM3</i>		$9,05 \pm 0,19$	$2,63 \pm 0,08$	$0,08 \pm 0,006$	$154 \pm 7,08$
контроль	$5\pm 0,5^\circ\text{C}$	$6,98 \pm 0,23$	$1,91 \pm 0,05$	$0,15 \pm 0,008$	$112 \pm 6,23$
<i>desA-licBM3</i>		$6,04 \pm 0,30$	$2,71 \pm 0,07$	$0,14 \pm 0,014$	$152 \pm 6,76$

Что касается трансформантов, то они уже до закаливания отличались от контроля почти вдвое большим числом тилакоидных мембран. После закаливания достоверных изменений мембран хлоропластов *desA-licBM3* растений не выявлено, но общее число тилакоидов у них оставалось $\sim$ на 35 % выше, по сравнению с контролем. Общая площадь крахмальных зерен, рассчитанная на один хлоропласт, также оставалась выше у трансформантов, т. е. они имели больше запасных углеводов к концу закаливания.

О функциональной активности хлоропластов в процессе закаливания свидетельствуют данные по содержанию сахаров в листьях. Как видно из табл. 2, в период закаливания контрольных и трансформированных растений происходило повышение количества исследованных сахаров (сахарозы, глюкозы и фруктозы) более чем в 3,5 раза.

Важно отметить, что у *desA-licBM3* растений уже в первые сутки закаливания наблюдали резкое повышение содержания сахаров (глюкозы – в 2 раза, сахарозы – в 5 раз). После шести суток закаливания содержание фруктозы в листьях контрольных растений возросло почти в 44 раза, а в листьях *desA-licBM3* растений – только в 6 раз. Отсутствие заметных изменений в содержании фруктозы у трансформантов, скорее всего, объясняется большим вовлечением ее в метаболизм.

Таким образом, при закаливании картофеля, как типичного представителя холодостойких растений, в ультраструктуре хлоропластов происходят изменения, свидетельствующие об их адаптации к действию НТ. При этом хлоропласты трансформантов уже до закаливания обладали некоторыми признаками закаленных растений, например, отличались большим числом тилакоидных мембран. Это свидетельствует о важной роли липидного метаболизма и, вероятно, способствует поддержанию функциональной активности и снижению повреждений фотосинтетического аппарата, особенно в начале

низкотемпературного закаливания, о чем свидетельствует резкое повышение сахаров уже после первых суток действия НТ у трансформированных растений.

Таблица 2

Изменение содержания растворимых сахаров у контрольных и *desA-licBM3* растений картофеля в динамике закаливания при температуре $5 \pm 0,5$ °C в течение 6 суток, мг/г сырой массы

Сахара	До закаливания	Длительность закаливания, суток		
		1	3	6
Контрольные растения				
Фруктоза	0,20 ± 0,10	0,50 ± 0,10	4,68 ± 0,32	8,73 ± 0,84
Глюкоза	3,41 ± 0,35	4,84 ± 0,43	5,64 ± 0,58	8,52 ± 0,74
Сахароза	2,97 ± 0,40	6,15 ± 0,81	9,22 ± 1,67	13,06 ± 1,46
Σ сахаров	6,58 ± 0,84	11,49 ± 1,12	19,54 ± 1,81	25,31 ± 2,80
DesA-licBM3 растения				
Фруктоза	1,05 ± 0,30	2,7 ± 0,54	1,35 ± 0,26	6,43 ± 0,83
Глюкоза	3,15 ± 0,56	6,37 ± 0,83	6,80 ± 0,75	6,39 ± 0,94
Сахароза	2,13 ± 0,60	10,30 ± 1,25	10,69 ± 2,90	10,44 ± 1,77
Σ сахаров	6,33 ± 1,42	19,37 ± 3,23	18,84 ± 2,04	23,26 ± 3,41

Литература

Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 163–198.

Лось Д.А. Десатуразы жирных кислот. – М.: Научный мир, 2014. – 372 с.

Нарайкина Н.В., Синькевич М.С., Демин И.Н., Селиванов А.А., Мошков И.Е., Трунова Т.И. Изменения активности изоформ супероксиддисмутазы у растений картофеля дикого типа и трансформированных геном $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы // Физиология растений. – 2014. – Т. 61. – С. 359–366.

Нарайкина Н.В., Дерябин А.Н., Трунова Т.И. Оценка устойчивости холодостойких растений картофеля к гипотермии // Факторы устойчивости растений и микроорганизмов: Материалы Всерос. науч. конф. с междунар. участием и школы молодых ученых. – Иркутск: Изд-во Ин-та географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2016. – С. 269–270.

Kratsch H.A., Wise R.R. The ultrastructure of chilling stress // Plant, cell and Environment. – 2000. – V. 23. – P. 337–350.

Wada H. Gombos Z. Murata N. Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation // Nature. – 1990. – V. 347. – P. 200–303.

ФУНКЦИИ МИКРОДОМЕНОВ ВАКУОЛЯРНОЙ МЕМБРАНЫ

*И.С. Нестёркина¹, Н.В. Озолина¹, Е.В. Спиридонова¹,
В.В. Гурина¹, В.Н. Нурминский¹, А.В. Третьякова²*

¹ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: nirinka24@mail.ru

²ФГБОУ ВПО Иркутский государственный университет, Иркутск

По современным представлениям, биологические мембраны содержат в своём составе различные липид-белковые микродомены, которые отличаются по биохимическим характеристикам и выполняемым функциям. В 2006 г. на симпозиуме по липидным рафтам и клеточным функциям (Keystone Symposium of Lipid Rafts and Cell Function) мембранные микродомены были определены как упорядоченные, наноразмерные (10–200 нм), гетерогенные, высоко динамичные домены, которые могут принимать участие в регуляции клеточных процессов (Pike, 2006).

Липидные рафты содержат в большом количестве гликосфинголипиды, ганглиозиды, стеринны и липиды с насыщенными жирными кислотами, что обеспечивает более существенную, чем в мембране, упорядоченность липидного бислоя и даёт возможность их выделения из мембран неионными детергентами при низкой температуре (Плескова и др., 2015). Повышенная концентрация сфинголипидов, в частности ганглиозида GM1, и холестерина является характерным признаком этих структур. Мембранные микродомены участвуют в таких клеточных процессах, как эндоцитоз, сортировка и доставка белков, через эти структуры осуществляется проникновение вирусов внутрь клетки и взаимодействие с внеклеточным матриксом. Микродомены участвуют в импорте и экспорте различных молекул, обеспечивают процессы передачи клеточных сигналов (сигнальную трансдукцию) внутри и вне клетки (Asano et al., 2009; Mongrand et al., 2010).

На данный момент рафты в растениях выявлены в плазматической мембране, в мембранах эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи, в мембранах митохондрий и в мембранах хлоропластов (Mongrand et al., 2010; Нестеров и др., 2017). В вакуолярной мембране присутствие этих микродоменов впервые было показано в наших исследованиях (Ozolina et al., 2013). Несколько позже эти данные были подтверждены японскими коллегами (Yoshida et al., 2013). Кроме рафтов вакуолярной мембраны растений, активно исследуются рафты вакуолярной мембраны дрожжей (Tsuji et al., 2017).

Известно, что вакуоль в клетках растений выполняет ряд важных функций: накопление питательных веществ, деградация конечных продуктов метаболизма, детоксикация вредных для клетки веществ и др. Вакуоли клеток растений функционируют аналогично лизосомам в клетках животных, они участвуют в запрограммированной гибели клеток. По последним данным рафты вакуолярной мембраны могут принимать участие в выполнении почти всех перечисленных функций.

Доказано, что в микродоменах тонопласта содержатся белки обеспечивающие транспорт метаболитов через вакуолярную мембрану, такие как V-АТФаза, ионные транспортеры, переносчики сахаров, Са-АТФаза, аквапорины. В связи, с чем сделан вывод, что рафты вовлечены в главную функцию тонопласта – регулирование процессов мембранного транспорта. Интересно, что некоторые белки семейства SNF7, которые являются частью эндосомального сортировочного комплекса, локализованы в липидных рафтах. В настоящее время считается, что комплекс ESCRT участвует в сортировке трансмембранных белков в вакуоле. Кроме того, в рафтах вакуолярной мембраны найдены белки DRP1A, 1C, 2A и 2B, на основании чего предполагается, что рафты тонопласта могут участвовать в аутофагии (Yoshida et al., 2013; Нестеркина и

др., 2016). Участие вакуолярных рафтов в аутофагии было подтверждено при исследовании роли белка NPC (белок транспортирующий холестерин) в микроаутофагии в клетках дрожжей (Tsuji et al., 2017). Авторами данной работы был сделан вывод, что расширенные с помощью микроаутофагического механизма рафтовые домены поглощают липидные капли (см. рис. 1).

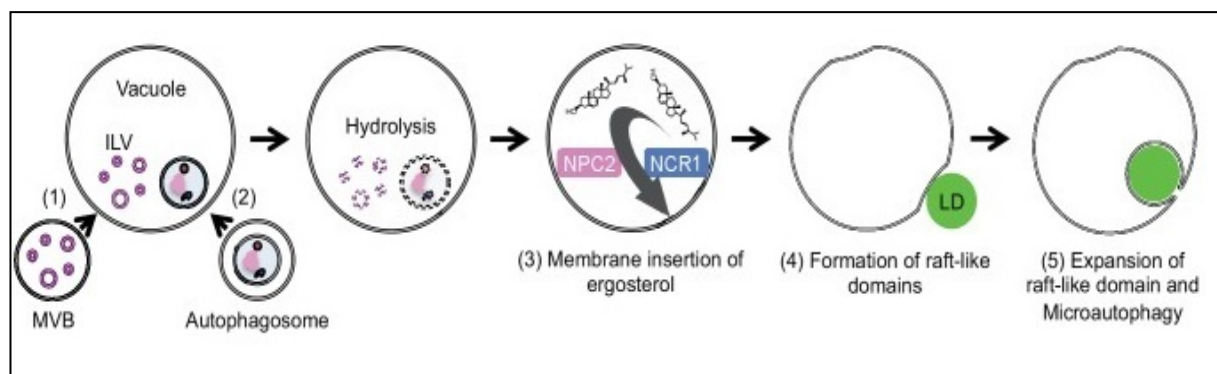


Рис. 1. Цитировано по: Tsuji et. al., 2017. Предполагаемый механизм микроаутофагии, способствующий образованию рафтов, происходящий в вакуолях дрожжей.

(1) Активированный MVB (мульти-везикулярные тела) путь доставляет обогащенные стеролом ILV (интралюминальные везикулы) к вакуоле; (2) аутофагосомы сливаются с вакуолярной мембраной для доставки сфинголипидов; (3) белки NPC транспортируют стерол от разрушенной ILV до вакуолярной мембраны; (4) формируется рафтовый домен; (5) рафтовый домен расширяется, чтобы поглотить вещества, способствующие микроаутофагии.

Таким образом, можно сделать вывод, что успешное выполнение вакуолью её функций во многом зависит от присутствия на вакуолярной мембране рафтовых структур.

Литература

- Нестёркина И.С., Озолина Н.В., Бадуев Б.К., Федорова Г.А., Нурминский В.Н., Спиридонова (Колесникова) Е.В., Саляев Р.К. Рафты вакуолярной мембраны столовой свеклы содержат V-H⁺-АТФ-азу // Биологические мембраны. – 2016. – Т. 33, № 6. – С. 450–453.
- Нестеров В.Н., Нестёркина И. С., Розенцвиг О.А., Озолина Н.В., Саляев Р.К. Обнаружения липид-белковых микродоменов (рафтов) и изучение их функциональной роли в хлоропластных мембранах галофитов // Доклады академии наук. – 2017. – Т. 476, № 3. – С. 350–352.
- Плескова С.Н., Крылов В.Н., Дерюгина А.В. Функциональные особенности планарных рафтов и кавеол в клеточной физиологии // Успехи современной биологии. – 2015. – Т. 135, № 6. – С. 590–598.
- Asano A., Selvaraj V., Buttke D., Nelson J., Green K., Evans J., Travis A. Biochemical characterization of membrane fractions in murina sperm: identification of three distinct sub-types of membrane rafts // J. Cell. Physiol. – 2009. – V. 218 (3). – P. 537–548.
- Mongrand S., Stanislas T., Bayer E., Lherminier J., Simon-Plas F. Membrane rafts in plant cell. // Trends Plant Sci. – 2010. – V. 15 (12). – P. 656–663.
- Ozolina N.V., Nesterkina I.S., Kolesnikova E.V., Salyaev R.K., Nurminsky V.N., Rakevich A.L., Martynovich E.F., Chernyshov M.Yu. Tonoplast of Beta vulgaris L. contains detergent-resistant membrane microdomains. // Planta. – 2013. – V. 237 (3). – P. 859–871.
- Pike L. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function // J. Lipid Res. – 2006. – V. 47. – P. 1597–1598.
- Tsuji T., Fujimoto M., Tatematsu T., Cheng J., Orii M., Takatori S., Fujimoto T. Niemann-Pick type C proteins promote microautophagy by expanding raft-like membrane domains in the yeast vacuole, eLife 2017;6:e25960 DOI: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.25960>.
- Yoshida K., Ohnishi M., Fukao Y., Okazaki Y., Fujiwara M., Song C., Nakanishi Y., Saito K., Shimmen T., Suzaki T., Yayashi F., Fukaki H., Maeshima M., Mimura T. Studies on vacuolar membrane microdomains isolated from Arabidopsis suspension-cultured cells: local distribution of vacuolar membrane proteins // Plant Cell Physiol. – 2013. – V. 54 (10). – P. 1571–1584.

ВЛИЯНИЕ НАНОКОМПОЗИТОВ СЕЛЕНА И СЕРЕБРА НА РАСТЕНИЯ КАРТОФЕЛЯ *IN VITRO*

О.А. Ножкина¹, А.И. Перфильева¹, А.Г. Павлова², И.А. Граскова¹, Б.Г. Сухов³

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

²Иркутский государственный университет, Иркутск, pavlovaantonina2013@yandex.ru

³ФГБУН Иркутский институт химии СО РАН, Иркутск, e-mail: boris_sukhov@mail.ru

Нами синтезирован ряд наноконпозитов различного состава. Наночастицы селена или серебра упакованы в следующие полимерные матрицы природного происхождения: природный полисахарид из Лиственницы Сибирской – арабиногалактан, крахмал, гуминовые вещества (пеллоиды, угли, сланцы). По результатам ранее проведенных экспериментов был выявлен бактериостатический и бактерицидный эффект исследуемых наноконпозитов (Папкина и др., 2015, Perfileva et al., 2017; Перфильева и др., 2018). Для возможности применения наноконпозитов в целях оздоровления картофеля от патогенных бактерий нами были проведены исследования на растениях картофеля *in vitro*. На первом этапе был изучен наноконпозит селена и арабиногалактана с содержанием селена 1,23%, полученный из неорганического предшественника. Не было выявлено негативного эффекта наноконпозита селена и арабиногалактана на прирост и активность пероксидазы картофеля (Parkina et al., 2015). Далее мы исследовали влияние наноконпозитов серебра и гуминовых веществ на вегетацию и жизнеспособность картофеля.

Эксперименты проводили на картофеле *in vitro* сорта Лукьяновский. Микроклональное размножение пробирочных растений осуществляли с помощью черенкования на агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга (4,2 г/л) с добавлением 30 г/л сахарозы, 1 мл/л пиридоксина, 1 мл/л тиамина и 1 мл/л феруловой кислоты, pH 5,8–6,0. Черенки культивировали при 26 °С, освещенности 5–6 кЛк. Черенкование проводили через 20 дней.

Гуминовые вещества выделяли щелочной экстракцией из объектов монгольских месторождений: ГВ-гр – из пеллоидов озера Гурван-Нуур, ГВ-уг – из бурых углей Багануур, а также ГВ-уг – из сланцевых месторождений Монголии. НК серебра на основе гуминовых веществ, выделенных из лечебных грязей, сланцев и углей, получали следующим способом: к водно-щелочному раствору гуминовых веществ (0,45 г в 30 мл 0,2 % NaOH) добавили раствор AgNO₃ (0,1 г в 5 мл воды). Смесь перемешивали при нагревании на водяной бане при температуре 90°С в течение 15 минут. НК высаживали в этиловый спирт, промывали несколько раз. Выход наноконпозита составил: 78 и 99 % с содержанием серебра 9,8 и 12 %.

Для изучения влияния наноконпозитов на растения, картофель *in vitro* выращивали в факторостатных условиях в течение двух недель, затем в среду роста вносили водный раствор наноконпозитов и их предшественников (ГВ и AgNO₃). Далее растения инкубировали 10 дней, отслеживая прирост побегов, пигментацию растений, длину междоузлий, размеры корней и активность пероксидазы во всех органах - листьях, корнях и стеблях. Активность растворимой и слабосвязанной пероксидазы определяли по методу Бояркина (Бояркин, 1951).

Полученные результаты были статистически обработаны с использованием пакета программ Microsoft Excel.

При исследовании влияния НК на растения было выявлено, что AgNO₃, ГВ-гр, ГВ-сл, НК ГВ-гр/Ag, НК ГВ-сл/Ag более чем в 2 раза снижали активность пероксидазы в тканях картофеля (рис. 1). Из литературы известно, что молекулы гуминовых веществ

содержат множество активных центров, что может приводить к инактивации металлоферментов и их ингибированию. Например, гуминовые препараты, полученные из сажистых углей ингибировали процесс прорастания семян *Phacelia tanacetifolia* Benth. при всех исследуемых концентрациях (Неверова и др., 2013). Установлено также ингибирующее действие гуминовых кислот торфов Среднего Приобья на активность липазы, предлагается рассматривать такой эффект как меру биологической активности гуминовых веществ (Сартаков и др., 2011).

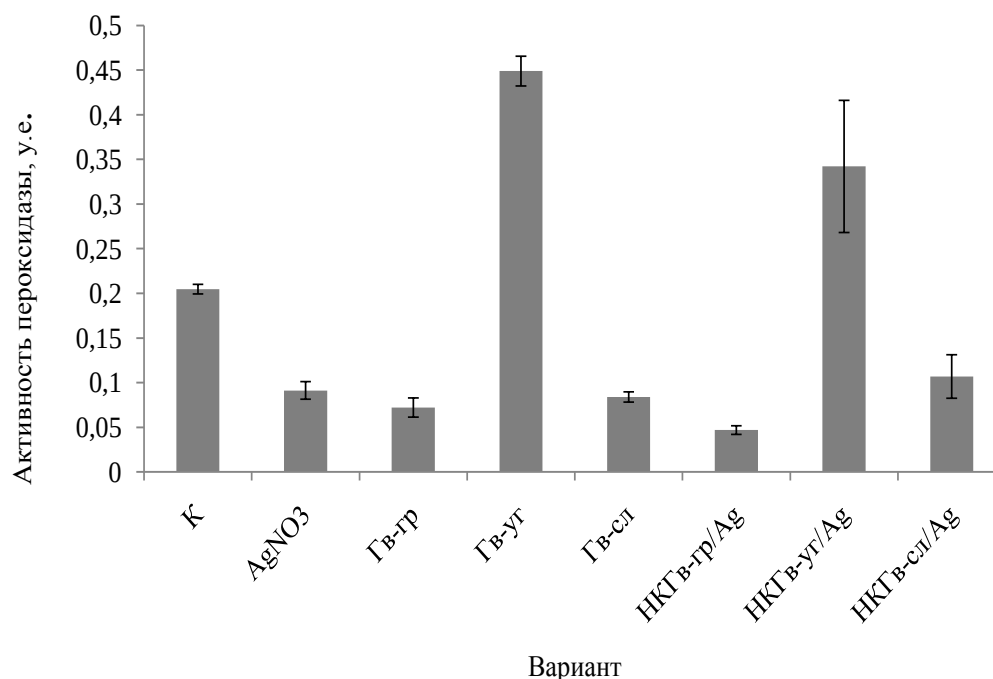


Рис. 1. Влияние нанокмпозитов серебра (НК ГВ-гр/Ag, НК ГВ-сл/Ag и НК ГВ-уг/ГВ) в различных матрицах, а также их предшественников (ГВ-гр, ГВ-уг, ГВ-сл и AgNO₃) на активность пероксидазы в тканях картофеля *in vitro* по сравнению с контролем (К).

Результаты показали, что AgNO₃ негативно влиял на биометрические показатели растений. ГВ-гр не влияли на прирост растений, при этом снижали количество листьев на них. ГВ-уг снижали прирост растений и количество листьев. Это свидетельствует о негативном влиянии углей на картофель, наличии стрессового состояния. ГВ-сл на прирост растений в начале периода наблюдения не оказывали влияние, за тем снижали этот показатель, при этом стимулировали образование листьев у картофеля. Нанокмполит на основе пеллоидов НК ГВ-гр/Ag характеризовался небольшим снижением прироста растений, количество листьев было на уровне контроля. Обработка картофеля НК ГВ-уг/Ag приводила к снижению прироста по сравнению с контролем, количество листьев было как у необработанных растений. Нанокмполит на основе сланцев НК ГВ-сл/Ag понижал пророст растений картофеля, однако стимулировалось образование листьев по сравнению с контрольными растениями.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов с рядом веществ – как нанокмполитов, так и их предшественников, были выявлены агенты обладающие антибактериальной активностью и отсутствием негативного влияния на растения картофеля. Положительным влиянием на растения характеризовались ГВ-сл нанокмполит из них НК ГВ-сл/Ag. Также не оказывал выраженного негативного эффекта на картофель НК ГВ-гр/Ag. Представленные данные свидетельствуют о возможности использования нанокмполитов с наночастицами серебра и селена для обработки культурных растений против бактериальных заболеваний.

Результаты получены с использованием коллекции ЦКП «Биоресурсный центр Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН». Работа выполнена

при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-416-380001 p_a).

Литература

Неверова О.А., Егорова И.Н., Жеребцов С.И., Исмаилов З.Р. Влияние гуминовых препаратов на процесс прорастания и активность амилалитических ферментов семян *Phacelia tanacetifolia* Benth // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 2. – URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=8624>.

Папкина А.В., Перфильева А.И., Живетьев М.А., Боровский Г.Б., Граскова И.А., Лесничая М.В., Клименков И.В., Сухов Б.Г., Трофимов Б.А. Влияние нанокompозита селена и арабиногалактана на жизнеспособность фитопатогена *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* // Доклады академии наук. – 2015. – Т. 461, № 2. – С. 239–241.

Перфильева А.И., Ножкина О.А., Граскова И.А., Сидоров А.В., Лесничая М.В., Александрова Г.П., Долмаа Г., Клименков И.В., Сухов Б.Г. Синтез нанобиокompозитов селена и серебра и их влияние на фитопатогенную бактерию *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* // Известия РАН. Серия химическая. – 2018. – № 1. – С. 157–163.

Сартаков М.П., Леонов В.В., Югорский Г.У. Биологическая активность гуминовых кислот торфов Среднего Приобья // Известия Оренбург. гос. аграрного ун-та. – 2011. – Т. 3. – № 31-1. – С. 303–304.

Papkina A.V., Perfileva A.I., Zhivet'yev M.A., Borovskii G.B., Graskova I.A., Klimenkov I.V., Lesnichaya M.V., Sukhov B.G., Trofimov B.A. Complex Effects of Selenium-Arabinogalactan Nanocomposite on both Phytopathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and Potato Plants // Nanotechnologies in Russia. – 2015. – V. 10, № 5–6. – P. 484–491.

Perfileva A.I., Moty'leva S.M., Klimenkov I.V., Arsent'ev K.Yu., Graskova I.A., Sukhov B.G., Trofimov B.A. Development of Antimicrobial Nano-Selenium Biocomposite for Protecting Potatoes from Bacterial Phytopathogens // Nanotechnologies in Russia. – 2017. – V. 12, № 9–10. – P. 553–558.

Бояркин А.Н. Быстрый метод определения активности пероксидазы // Биохимия. – 1951. – Т. 16. – С. 352–355.

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ВАКУОЛЯРНОЙ МЕМБРАНЫ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

В.Н. Нурминский, И.С. Нестеркина, Н.В. Озолина
ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: cell@sifibr.irk.ru

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) – одна из разновидностей сканирующей зондовой микроскопии (Binning et al., 1986). АСМ широко применяется в исследованиях по физике, химии, материаловедению, а также в биологии и медицине (Lu et al., 2005; Müller and Dufrêne, 2011). Первоначально биологические образцы для АСМ подвергали высушиванию на воздухе. Однако воздушная сушка сильно влияет на морфологию образцов, и полученные таким образом образцы теряют свою нативность (Butt et al., 1990). Хорошо исследовано влияние химической фиксации на клетки и ткани, и, как известно, биологические образцы также теряют нативность после химической обработки (Nowakowski et al., 2001). В последнее время активно исследуют биологические мембраны, живые клетки и ткани, и происходящие в них процессы *in vivo* с помощью АСМ. Этот метод не только выявляет топографию поверхности биологических образцов в физиологических условиях, но также обеспечивает изучение микромеханических свойств с высоким разрешением (Radmacher, 2002; Matzke et al., 2001).

Биологические мембраны – тонкие (не более 10 нм толщиной) липопротеидные пленки, состоящие из двойного слоя липидных молекул, в который включены молекулы разнообразных белков. Плоские по своей структуре мембраны, заполненные белками, выступающими всего на несколько нм над поверхностью, вполне пригодны для высокоуровневой визуализации с помощью АСМ (Frederix et al., 2009).

Одной из принципиальных особенностей растительной клетки является наличие в ней центральной вакуоли, которая в зрелом состоянии может занимать большую часть объема клетки. Основные функции вакуоли заключаются в участии в процессах ионного гомеостаза цитозоля, запасания первичных и вторичных метаболитов, осмотической регуляции, детоксикации ксенобиотиков, формирования защитных ответных реакций клеток, например, метаболических реакций на токсины, и в процессах запрограммированной клеточной смерти (Андреев, 2001, 2012).

Вакуоль растительной клетки представляет собой активно функционирующую органеллу, способную к динамичным морфологическим перестройкам. Вакуолярная система растительной клетки отличается сложной пространственной структурой. Регистрировали инвагинации вакуолярной мембраны, сопровождающиеся отделением везикул (Sheahan et al., 2007; Assani et al., 2009). Установлено, что через вакуоль проходят многочисленные цитоплазматические тяжи, соединенные с вакуолярной мембраной и ограниченные мембраной (Нурминский и др., 2012). Прослеживается связь вакуоли с элементами цитоскелета (Sheahan et al., 2007; Gao et al., 2009), а именно с актиновыми микрофиламентами (Sheahan et al., 2007).

Ранее было показано, что вакуолярная мембрана характеризуется высокой упорядоченностью липидов, присутствующих в ней в виде участков свободного жидкого липидного бислоя и участков, связанных с мембранными белками. Известно, что в вакуолярной мембране преобладают полярные липиды с высоким содержанием ненасыщенных жирнокислотных остатков. Преобладание таких липидов придает мембране высокую эластичность и пониженную микровязкость (Макаренко, Салаяев, 1998). Сравнительно недавно в вакуолярной мембране были обнаружены липидные домены (рафты), обладающие более плотной упаковкой липидов, по сравнению с остальной частью мембраны (Ozolina et al., 2013). Однако детали ультраструктуры вакуолярной мембрана-

ны и ее роль в адаптации к стрессовым воздействиям остаются исследованными недостаточно.

В настоящей работе проведено исследование вакуолярной мембраны корнеплодов столовой свеклы с помощью АСМ: подобраны условия для приготовления высушенных препаратов мембран изолированных вакуолей и получены изображения поверхности вакуолярных мембран (рис. 1–3).

Рис. 1. Визуализация структуры мембран изолированных вакуолей с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ), 3D-изображение.

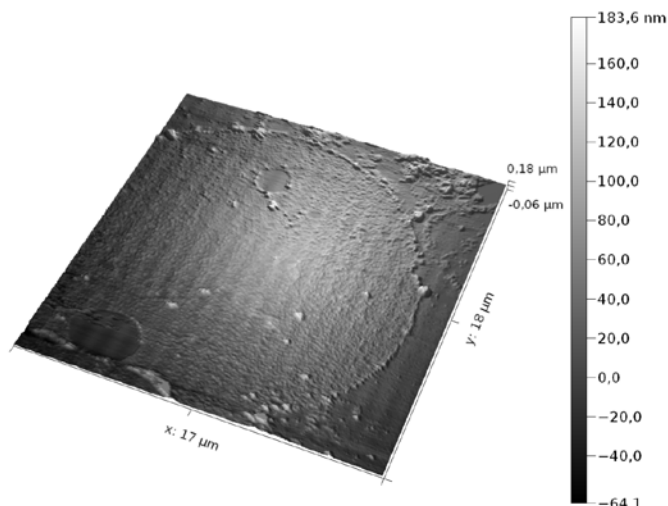


Рис. 2. Поверхность мембраны высушенного образца изолированной вакуоли.

3D-изображение, полученное с помощью АСМ. Бугорки на поверхности мембраны (стрелка).

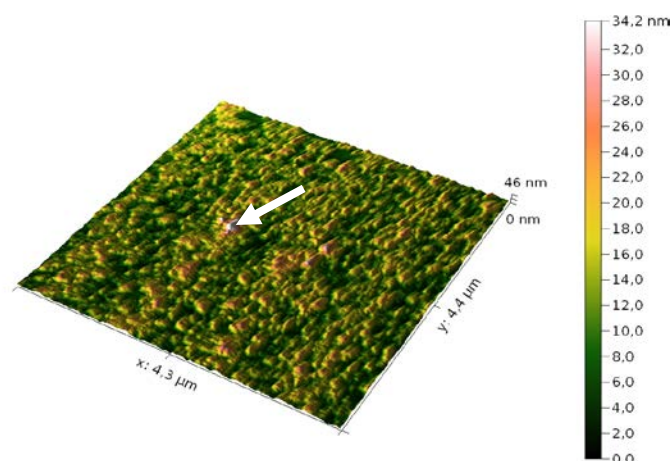
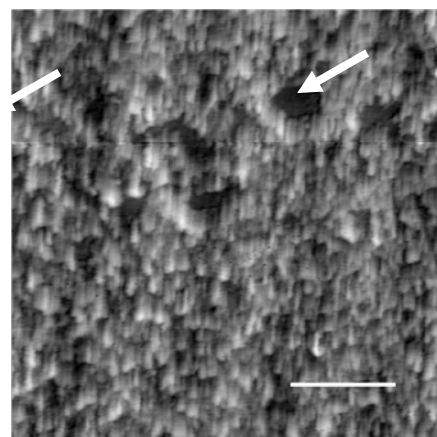


Рис. 3. Рельеф поверхности мембраны высушенного образца изолированной вакуоли.

Неспецифические стрессовые поры в мембране (стрелка). Масштабный отрезок – 3 мкм.



Выявлена неоднородность рельефа поверхности мембраны. Предположено, что мелкие (порядка 30–40 нм в диаметре) бугорки (возвышенности) на поверхности мембраны могут представлять более плотноупакованные рафтовые структуры тонопласта (рис. 2). Выявлены также углубления в рельефе поверхности мембраны, в виде неспецифических стрессовых пор диаметром 1–2 мкм (рис. 3).

Литература

- Андреев И.М. Роль вакуоли в редокс-гомеостазе растительных клеток // Физиология растений. – 2012. – Т. 59 (5). – С. 660–667.
- Андреев И.М. Функции вакуоли в клетках высших растений // Физиология растений. – 2001. – Т. 48 (5). – С. 777–787.
- Макаренко С.П., Салеев Р.К. Структура вакуолярных мембран растений по данным ИК-спектроскопии // Биол. мембраны. – 1998. – Т. 15 (3). – С. 309–321.
- Assani A., Moundanga S., Beney L., Gervais P. Vesicle formation in the membrane of onion cells (*Allium cepa*) during rapid osmotic dehydration // Ann. Bot. – 2009. – V. 104. – P. 1389–1395.
- Binning G., Quate C.F., Gerber C. Atomic force microscopy // Physical Review Letters. – 1986. – V. 56. – P. 930–933.
- Butt H.J., Wolff E.K., Gould S.A.C., Dixon Northern B., Peterson C.M., Hansma P.K. Imaging cells with the atomic force microscope // J Struct Biol. – 1990. – V. 105. – P. 54–61.
- Frederix P.L.T.M., Bosshart P.D., Engel A. Atomic force microscopy of biological membranes // Biophys J. – 2009. – V. 96 (2). – P. 329–338.
- Gao X.Q., Wang X.L., Ren F., Chen J., Wang X.C. Dynamics of vacuoles and actin filaments in guard cells and their roles in stomatal movement // Plant Cell Environ. – 2009. – V. 32. – P. 1108–1116.
- Lu Z.X., Zhang Z.L., Pang D.W. Atomic force microscopy in cell biology // Chinese Science Bulletin. – 2005. – V. 50. – P. 1409–1414.
- Matzke R., Jacobson K., Radmacher M. Direct, high-resolution measurement of furrow stiffening during division of adherent cells // Nat Cell Biol. – 2001. – V. 3. – P. 607–610.
- Müller D.J., Dufrêne Y.F. Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface // Trends Cell Biol. – 2011. – 21 (8). – P. 461–469.
- Nowakowski R., Luckham P., Winlove P. Imaging erythrocytes under physiological conditions by atomic force microscopy // BBA-Biomembranes. – 2001. – V. 1514. – P. 170–176.
- Ozolina N.V., Nesterkina I.S., Kolesnikova E.V., Salyaev R.K., Nurminsky V.N., Rakevich A.L., Martynovich E.F., Chernyshov M.Yu. Tonoplast of *Beta vulgaris* L. contains detergent-resistant membrane microdomains // Planta. – 2013. – V. 237. – P. 859–871.
- Radmacher M. Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope // Methods Cell Biol. – 2002. – V. 68. – P. 67–90.
- Sheahan M.B., Rose R.J., McCurdy D.W. Actin-filament-dependent remodeling of the vacuole in cultured mesophyll protoplasts // Protoplasma. – 2007. – V. 230. – P. 141–152.

РОЛЬ МЕЖМЕМБРАННЫХ КОНТАКТОВ В ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ КЛЕТКИ

Н.В. Озолина

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

Впервые зоны контакта между органеллами были обнаружены с помощью электронной микроскопией в 1950-х годах на препаратах печени крыс (Bernhard, Rouiller, 1956). В 1990–1997 гг. был опубликован ряд статей, в которых обсуждалось присутствие в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) растительной клетки большого количества разных типов доменов. Так, в обзоре (Staehelin, 1997) показано 16 типов доменов, образованных ЭР совместно с органеллами и элементами цитоскелета, основанное на электронных микрофотографиях, приготовленных методом замораживания-скалывания (high pressure frozen/freeze-fractured). Большая часть этих доменов представляет собой зоны контакта между ЭР и органеллами клетки.

Успешное развитие таких методов как трансмиссионная электронная микроскопия, электронная томография, конфокальная микроскопия позволило выявить большое количество межмембранных контактов, которые обеспечивают взаимодействие между всеми органеллами клетки. Изучение структуры, биохимического состава и функций межмембранных контактов в настоящее время являются предметом интенсивного изучения. Выявлены центры взаимодействия между ЭР и органеллами, между разными органеллами, между ЭР и плазматической мембраной (ПМ), между органеллами и ПМ (рис. 1). Результаты исследования этих центров показывают различия в биохимических характеристиках не только в зависимости от местоположения в клетке, но и от объектов исследования. Так, обнаружены существенные различия в составе белков, входящих в зоны контакта между ЭР и митохондриальной мембраной в клетках животных и дрожжей (Herrera-Cruz, Simmen, 2017). Значительно меньше информации о липидах, участвующих в образовании разных межмембранных контактов. На сегодня известно, что контактные центры между митохондриями и ЭР в клетках животных принадлежат к рафтовым структурам и упорядоченность липидов в зонах межмембранных контактов выше, чем в мембранах органелл, взаимодействие между которыми они обеспечивают. Но рафтовые структуры разных контактных центров могут иметь достаточно существенные различия по составу сфинголипидов, ганглиозидов, стерина и липидов с насыщенными жирными кислотами, которые образуют эти структуры. Пока существенные различия выявлены только между белками, входящими в состав контактных центров. Именно белки обеспечивают большое разнообразие функций, в выполнении которых принимают активное участие межмембранные контактные центры. Особый интерес к изучению этих межмембранных структур связан с тем, что, как недавно было показано, они играют важную роль в регуляции жизнедеятельности клетки. В 2017 году вышла монография, посвящённая роли нарушений в зонах межмембранных контактов в клетках человека и животных в связи с такими серьёзными патологиями как диабет, онкология, инфекционные и нейродегенеративные заболевания (Tagaya M., Simmen T., 2017).

Функции, в выполнении которых принимают участие межмембранные контактные центры, очень разнообразны. Доказано их участие в таких жизненно важных для клетки процессах, как транспорт липидов, кальциевый обмен, тирозинкиназный сигналинг, образование аутофагосом, динамика органелл, рост нейритов и т. д. (Eden 2016). В настоящее время наиболее полно изучено участие межмембранных контактов в транспорте липидов. Перенос липидов в межмембранных контактных центрах обеспе-

чивает невезикулярный транспорт этих соединений, и связан, главным образом, с липид-переносящими белками (LTP, lipid-transport proteins). Наличие этих белков установлено в зонах внутриклеточных контактов (Stefan et al., 2011). Во многих мембранных контактах идентифицированы белки высоко консервативного семейства, осуществляющие транспорт стерина (Ltc/Lam). В переносе стерина также могут принимать участие гомологи оксистерин-связывающих белков (Osh-белки), которые выявлены в разных межмембранных контактах (Schultz et al., 2009). Кроме транспорта липидов хорошо доказанной функцией зон контакта является участие в транспорте ионов, и, что особенно важно, ионов кальция. В контактных центрах поток Ca^{2+} может регулироваться: выделены два белка (MICU1 и MICU2), которые регулируют поток Ca^{2+} из ЭР в митохондрии (Antony et al., 2016). Недавно выяснено, что межмембранные контакты ЭР-митохондрия принимают участие в таких процессах, как деление митохондрий, разделение митохондриальной ДНК и митофагия (Bockler, Westermann, 2014). Динамика архитектуры и формы органелл также является одной из функций межмембранных контактов, поскольку в их состав могут входить белки, которые обеспечивают взаимодействие между мембраной и цитоскелетом – мембран-актиновые адапторы. Межмембранные контакты принимают активное участие в защитных механизмах при стрессовых воздействиях. Известно, что строение и структура межмембранных контактов изменяется при стрессе (Bravo et al., 2011). Через межмембранные контакты происходит перенос сигнальных молекул и генетического материала (Helle et al., 2013).

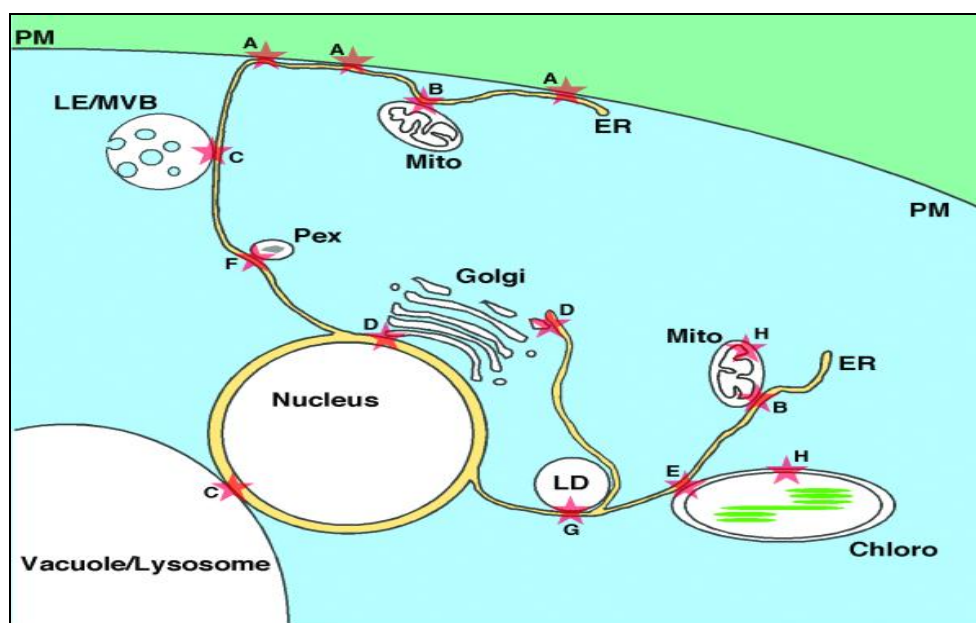


Рис. 1. Расположение мембранных контактных центров в клетках дрожжей.

А. Эндоплазматический ретикулум (ER) – плазматическая мембрана (PM) В. ER – Митохондрия (Mito) С. ER–Зрелаяэндосома (LE) / мультивезикулярные тела (MVB) и ER – лизосома. D. ER – комплекс Гольджи. E. ER и хлоропласт. F. ER – пероксисома (Pex) G. ER и липидные капли (LD). H. контактные центры между внутренней и внешней мембранами у митохондрий и хлоропластов (Tourlmay, Prinz, 2011).

Проведённые исследования по изучению строения и функционирования межмембранных контактов привели к изменению наших представлений о внутриклеточных органеллах как изолированных мембранных структурах. В соответствии с полученными в последние годы результатами, органелла определяется как динамический мембранный компартмент, который функционирует в тесном координированном взаимодействии с другими органеллами. Благодаря большим функциональным возможностям межмембранные контакты в значительной мере могут регулировать работу органелл и всей клетки в целом. Присутствие в этих межмембранных контактах элементов цито-

скелета обеспечивает координированную регуляцию всех процессов во время нормального функционирования клетки и при стрессовых воздействиях. Координация клеточной активности происходит с использованием сети контактных центров между мембранами разных органелл. Эта сеть не только динамично объединяет все органеллы, но и тесно связана с метаболизмом клетки. Высказано предположение о том, что контактные центры между различными органеллами являются «сердцем» координации клеточной физиологии (Honscher et al., 2014). Понимание механизмов функционирования межмембранных контактов даст возможность управлять метаболизмом клетки и эффективно формировать защиту при стрессе.

Литература

- Antony A.N., Paillard M., Moffat C., Juskevicius E., Correnti J., Bolon B., Rubin E., Csordas G., Seifert E.L., Hoek J.B. MICU1 regulation of mitochondria Ca^{2+} uptake distates survival and tissue regeneration // *Nat. Commun.* – 2016. – V. 7. – P. 10995.
- Bernhard W., Rouiller C. Close topographical relationship between mitochondria and ergastoplasm of liver cells in a definite phase of cellular activity // *J. Biophys. Biochem. Cytol.* – 1956. – V. 2. – P. 73–78.
- Bockler S., Westermann B. ER-mitochondria contacts as sites of mitophagosome formation // *Autophagy.* – 2014. – V. 10. – P. 1346–1347.
- Bravo R., Vicencio C., Parra V., Troncoso R., Munoz J.P., Bui M., Quiroga C., Rodriguez A.E., Verdejo H.E., Ferreira J. Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress // *J. Cell Sci.* – 2011. – V. 124. – P. 2143–2152.
- Eden E.R. The formation and function of ER-endosome membrane contact sites // *Biochem. Biophys. Acta.* – 2016. – V. 1861 (8 Pt B). – P. 874–879.
- Helle S.C., Kanfer G., Kolar K., Lang A., Michel A.H., Kornmann B. Organization and function of membrane contact sites // *Biochem. Biophys. Acta.* – 2013. – V. 1833. – P. 2526–2541.
- Herrera-Cruz M., Simmen T. 2017. Over six decades of discovery and characterization of the architecture at mitochondria-associated membranes (MAMs) // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2017. – V. 997. – P. 13–31.
- Honscher C., Mari M., Auffarth K., Bohnert M., Griffith J., Geerts W., van de Laan M., Cabrera M., Reggiori F., Ungermann C. Cellular metabolism regulates contact sites between vacuoles and mitochondria // *Dev. Cell.* – 2014. – V. 30 (1). – P. 86–94.
- Schultz T.A., Choi M.-G., Raychaudhuri S., Mears J.A., Ghirlando R., Hinshaw J.E. Lipid-regulated sterol transfer between closely apposed membranes by oxysterol-binding protein homologues. // *J. Cell Biol.* – 2009. – V. 187. – P. 889–903.
- Staehelin L.A. The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domain // *Plant J.* – 1997. – V. 11 (6). – P. 1151–1165.
- Stefan C.J., Manford A.G., Baird D., Yamada-Hanff, Mao Y., Emr S.D. Osh proteins regulate phosphoinositide metabolism at ER-plasma membrane contact sites. // *Cell.* – 2011. – V. 144. – P. 389–401.
- Tagaya M., Simmen T. Organelle contact sites. From molecular mechanism to disease. – Springer, 2017. DOI 10.1007/978-981-10-4567-7_1
- Toulmay A., Prinz W.A. 2011. Lipid transfer and signaling at organelle contact sites: the tip of the iceberg // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2011. – V. 23 (4). – P. 458–463.

КЛАСТЕРЫ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА ВОДНЫЙ СТРЕСС В ЯДЕРНОМ ГЕНОМЕ *TRITICUM AESTIVUM* L.

С.В. Осипова^{1, 4}, Т.А. Пшеничникова², А.В. Пермяков¹,
М.Д. Пермякова¹, Е.Г. Рудиковская¹, А.А. Дорошков²,
В.В. Верхотуров⁵, И.Н. Леонова², У. Лохвасер³, А. Бернер³

¹ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: svetlanaosipova2@mail.ru

²ФГБУН ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН,
Новосибирск, e-mail: wheatpsh@bionet.nsc.ru

³Институт генетики растений и изучения культурных растений им. Лейбница,
Гатерслебен, e-mail: boerner@ipk-gatersleben.de

⁴ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет,
Иркутск, e-mail: svetlanaosipova2@mail.ru

⁵ФГБОУ ВО Иркутский национальный исследовательский технический университет,
Иркутск, e-mail: vervv@mail.ru

Поиск путей улучшения засухоустойчивости пшеницы *Triticum aestivum* L. на клеточном и молекулярном уровнях является сложным, но перспективным направлением геномных исследований пшеницы. На хромосоме 2А мягкой пшеницы, насыщенной SNP – маркерами, было проведено картирование локусов количественных признаков (QTL), ассоциированных с физиологическими и биохимическими характеристиками засухоустойчивости. В работе использовали 100 рекомбинантных линий пшеницы, созданных в Институте цитологии и генетики СО РАН на генетической базе засухоустойчивого сорта Саратовская 29 и генотипированных в Гатерслебене. Для картирования использовали результаты фенотипирования пяти различных вегетаций картирующей популяции Саратовская 29 (Янецкис Пробат 2А), одной полевой, трёх тепличных и одной - в климатической камере Plant Master. В полевых и тепличных вегетациях были собраны фенологические характеристики линий и данные по компонентам урожая. В контролируемых условиях климатической камеры – данные по биомассе главного побега, параметрам газообмена и флуоресценции хлорофилла, содержанию фотосинтетических пигментов, активности липоксигеназы и четырех ферментов аскорбат-глутатионового цикла в листьях. Фенотипирование по комплексу физиологических и биохимических признаков было проведено в контрастных условиях водообеспечения.

На длинном плече хромосомы 2А в положениях 102 сМ и 108,5–109,2 сМ были картированы QTL, ассоциированные с устойчивостью вышеперечисленных физиологических признаков, а также компонентов урожая и фенологических характеристик, таких как число дней до цветения, до кущения, до восковой спелости (неопубликованные данные).

По результатам биоинформационного анализа в позиции 108,5–109,2 сМ был выявлен кластер из двадцати девяти генов. Четыре из них, по-видимому, являются транспозонами или ретротранспозонами. Функции трех генов остаются пока невыясненными. Остальные 22 гена кодируют 16 различных белков или важных регуляторных субъединиц, функции которых, по имеющимся для *Arabidopsis thaliana* данным, связаны с развитием растений и реакцией на внешние сигналы, в том числе на водный дефицит. Большая часть из этих белков у пшеницы не изучена.

Как минимум два гена могут быть кандидатами на роль триггеров, регулирующих активность генной сети, индуцируемой при адаптации растений пшеницы в ответ на водный дефицит. Ген, кодирующий субъединицу В7 высококонсервативного транскрипционного фактора ядерной локализации NF-Y, связанного с регуляцией развития.

NF-YB в комплексе с белками NF-YA/NF-YC регулирует цветение, зависящее от фото-периода (Siriwardana et al., 2016). Два гена, локализованные в обнаруженном нами кластере, кодируют субъединицу SWI3A АТФ-зависимого хроматин-ремодулирующего комплекса SWI/SNF ядерной локализации, который усиливает или подавляет ген-специфичные транскрипционные факторы, регулируя взаимодействие сигнализации нескольких гормональных путей (Sarnowska et al., 2016).

Помимо генов, участвующих в регуляции транскрипции, в позиции 108,5–109,2 сМ были выявлены гены белков, содержащих PPR-повторы, суперсемейства (TPR)-подобных белков. Эти белки участвуют в редактировании РНК большого числа пластидных транскриптов, они связаны с регуляцией экспрессии митохондриальных генов и, предположительно, функционируют в регуляции гомеостаза АФК в митохондриях во время абиотических и биотических стрессовых реакций путем участия в ретроградной регуляции (Laluk et al., 2011).

В позиции 108,5–109,2 сМ были локализованы гены белков, участвующих в регуляции различных посттрансляционных модификаций, которые имеют решающее значение при адаптации растений к условиям абиотического стресса (Hashiguchi and Komatsu, 2016). Среди них 3 гена, кодирующих белки семейства протеинкиназ, обогащенных лейциновыми повторами. В том же участке хромосомы 2А были локализованы гены белков, участвующих в регуляции убиквитин-протеасомной системы, которая является центральным регулятором гормональной сигнализации (Moon et al., 2004).

В этом же генном кластере были локализованы гены субъединицы фосфатидилинозитол N-ацетилглюкозаминил трансферазы и фосфолипазы С (PLC). Первый белок участвует в образовании гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-якоря и биосинтезе гликановых структур. Белки, содержащие GPI-якорь, играют ключевые роли в самых разных биологических процессах, включая поддержание водного гомеостаза (Shears, 2015). PLC, расщепляющая фосфоглицериновую связь, приводит к выделению GPI-связанных белков из клеточной мембраны. PLC продуцирует или модулирует три различных сигнальных молекулы: инозитол 1,4,5-трифосфат, диацилглицерин и фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат. Все три молекулы регулируют ионные каналы и участвуют в Ca^{2+} -сигнализации (Putney and Tomita, 2012).

Среди генов, кодирующих белки, участвующие в редокс регуляции, ген регуляторной субъединицы NAD-зависимой изоцитратдегидрогеназы, которая является аллостерическим регулятором скорости-лимитирующей стадии цикла Кребса, а также два гена альдо-кето редуктазы 4, действующей на широкий диапазон субстратов. Этот фермент участвует в ответных реакциях на холодовой, солевой и водный стрессы, функционирует как детоксикант, а также вовлечен в процесс биосинтеза L- аскорбиновой кислоты.

В позиции 108,5–109,2 сМ генома пшеницы были обнаружены также гены белков суперсемейства P-loop содержащих нуклеозид трифосфат гидролаз, которые участвуют в сигнальной трансдукции, регуляции транскрипции и деградации белков протеасомой. В этом же участке локализован ген белка DUF231, который у *Arabidopsis thaliana* представляет собой ацетилтрансферазу, катализирующую моноацетилирование ксилана вторичной клеточной стенки, что требуется для структурной целостности поверхности листа и оказывает глобальное воздействие на стрессовые реакции растений (Nafis et al., 2015).

В позиции 102 сМ биоинформационным анализом был выявлен кластер из тринадцати генов, среди которых десять кодируют белки с функциями, важными для адаптации и устойчивости растений. Это серин/треонин протеин киназы, белки семейства цитохромов P450, Ca^{2+} -связывающие белки. Функции многих белков этих близлежащих кластеров взаимосвязаны и реализуются в широком диапазоне биохимических и молекулярных процессов, обеспечивая разнообразные ответы на внешние воздействия.

Таким образом, на хромосоме 2А гексаплоидной пшеницы *Triticum aestivum* L. мы выявили важные регуляторные QTL, содержащие в общей сложности 33 белоккодирующих гена. Функции этих генов, изученные главным образом у *Arabidopsis thaliana*, позволяют предположить, что при адаптации мягкой пшеницы к водodefициту активизируется генная сеть, перестраивающая метаболизм растений. В условиях засухи индуцировались посттрансляционные модификации белков, такие как фосфорилирование, ацетилирование, гликолипирование, сукцинирование, модулировалась транскрипция генов, регулирующих цикл Кребса и активность убиквитин-протеасомной системы. Эти изменения были связаны с активацией и взаимодействием нескольких гормональных сигнальных путей, включая жасмонатную. АБК - и Ca^{2+} - зависимые пути. Вероятно, триггером этой генной сети являются транскрипционный фактор NF-Y и АТФ - зависимый хроматин ремодулирующий комплекс SWI/SNF.

Работа поддержана грантами РФФИ 15-04-02762 и 18-04-00481. Все эксперименты были проведены на экспериментальной базе Байкальского аналитического центра коллективного пользования "Фитотрон СИФИБР СО РАН" и на экспериментальных базах двух ЦКП ИЦИГ СО РАН «Лаборатория искусственного выращивания растений» и «Селекционно-генетическая лаборатория».

Литература

- Hashiguchi A., Komatsu S. Impact of Post-Translational Modifications of Crop Proteins under Abiotic Stress // *Proteomes*. – 2016. – V. 4 (4). – P. 42.
- Laluk K., Abuqamar S., Mengiste T. The *Arabidopsis* mitochondria-localized pentatricopeptide repeat protein PGN functions in defense against necrotrophic fungi and abiotic stress tolerance // *Plant Physiol.* – 2011. – 156 (4). – 2053–68.
- Moon J., Parry G., Estelle M. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development // *Plant Cell*. – 2004. – V. 16. – P. 3181–3195.
- Nafis M., Stranne M., Fimognari L., Atwell S., Martens H.J., Pidas P.R., Hansen S.F., Nawrath C., Scheller H.V., Kliebenstein D.J., Sakuragi Y. Acetylation of cell wall is required for structural integrity of the leaf surface and exerts a global impact on plant stress responses // *Front. Plant Sci.* – 2015, <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00550>.
- Putney J.W., Tomita T. Phospholipase C signaling and calcium flux // *Adv. Biol. Regul.* – 2012. – 52 (1). – P. 152–164.
- Sarnowska E., Gratkowska D.M., Sacharowski S.P., Cwiek P., Tohge T., Fernie A.R., Siedlecki J.A., Koncz C., Sarnowski T.J. The role of SWI/SNF chromatin remodeling complexes in hormone crosstalk // *Trends in Plant Science*. – 2016. – V. 21 (7). – P. 594–608.
- Shears S. B. Inositol pyrophosphates: why so many phosphates? // *Adv Biol Regul.* – 2015. – V. 57. – P. 203–216.
- Siriwardana C.L., Gnesutta N., Kumimoto R.W., Jones D.S., Myers Z.A., Mantovani R, et al. Nuclear factor Y, Subunit A (NF-YA) Proteins Positively Regulate Flowering and Act Through flowering locus T. // *PLoS Genet.* – 2016. – V. 12(12): e1006496. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006496>.

PLANT MITOCHONDRIA GROUP II INTRONS SPLICING: A WINDOW INTO THE EVOLUTION OF THE NUCLEAR SPLICEOSOMAL MACHINERIES

Oren Ostersetzer-Biran

Department of Plant and Environmental Sciences,
The Alexander Silberman Institute of Life Sciences,
The Hebrew University of Jerusalem, Givat-Ram, Jerusalem, Israel

Mitochondria serve as principal sites for cellular energy metabolism and play pivotal roles in the biosynthesis of many essential metabolites for the (plant) cell. As descendants of a free-living organism, mitochondria contain their own genome, the mtDNA. The mtDNAs in plants are notably larger and more complex in structure than their corresponding ones in Animalia. Plant mitochondria are also remarkable with respect to the presence of numerous group II introns that reside in many organellar genes. The removal of the introns from the coding sequences they interrupt is essential for respiratory functions and is mediated by enzymes that belong to a diverse set of protein-families. These include intron-encoded related proteins (*i.e.* maturases) that function in the splicing of group II introns in bacteria and mitochondria in fungi and plants, usually with high specificity towards the intron in which they are encoded. While the splicing of group II introns *in vivo* is facilitated by maturase factors, canonical group II introns are catalytic RNAs that are able to excise themselves from their pre-RNA hosts *in vitro*, in the absence of the protein cofactors, using a mechanism identical to that utilized by the spliceosome. Structural analyses and phylogenetic data may indicate that the spliceosomal RNAs have evolved from group II intron-related ancestors. Yet, it remains unclear how could such general players in spliceosomal splicing evolve from the monospecific bacterial systems (*i.e.* a group II intron RNAs and their highly specific intron-encoded maturase factors). Analysis of the organellar splicing machinery in plants may provide us with important clues into the evolution of the nuclear splicing machineries. Genetic and biochemical studies led to the identification of different protein factors that facilitate the splicing of many of the mitochondrial introns in plants. We established the native RNA targets of different maturase factors in plants and analyzed the organellar and developmental defects associated with their mutant lines *in vivo*. Interestingly, while model maturases in bacteria and fungi mitochondria act specifically on their cognate intron RNAs, the plant maturases are acting on multiple mtRNA targets, thus seem to be acting as organellar proto-spliceosomal factors. The ability of the mitochondrial maturases in plants to act on different intron targets further support the notion that the early organellar self-splicing and mobile group II RNAs spread in the eukaryotic genomes and later ‘degenerated’ into the universal splicing system, known as the spliceosome. The similarities between maturases and the core spliceosomal factor, Prp8, may support this intriguing hypothesis.

ОПТИМИЗАЦИЯ КЛОНИРОВАНИЯ ДЛИННОРАЗМЕРНЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК В КОНСТРУКЦИИ pGEM, СОДЕРЖАЩЕЙ КОНЦЕВЫЕ ИНВЕРТИРОВАННЫЕ ПОВТОРЫ ЛИНЕЙНЫХ ПЛАЗМИД ИЗ МИТОХОНДРИЙ *ZEА МАУS*

А.В. Панфилов¹, Ю.М. Константинов², М.В. Кулинченко²

¹ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, Иркутск,
e-mail: panfilov.alexander@mail.ru

²ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: mk100171@yahoo.com

Оптимизация условий (реакционное пространство, термодинамические и кинетические факторы) клонирования молекул длинноразмерных фрагментов ДНК является важной практической и экспериментальной задачей в современной молекулярной биологии, генетических исследованиях и структурной биохимии. Анализ реакционного пространства подразумевает оптимизацию проведения условий реакции в водной, водно-органической среде с изменением pH состава, концентрации реагента и субстрата, катализатора (фермента) и кофактора матричной реакции (Parker et al., 2007). Термодинамический параметр включает в себя изменение энтропийного фактора, другими словами, изменение температурного режима матричного синтеза двунитевой и кольцевой ДНК при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР). Осуществление матричного синтеза возможно в том случае, если ферментативный процесс протекает, в основном, с наименьшим энергетическим барьером (так называемая энергия активации реакции E_a) или ферментативная реакция идет по-другому кинетическому маршруту -это кинетический фактор (Лаврик, 2012).

Клонирование позволяет “гибко манипулировать” ДНК-последовательностями, что облегчает матричный синтез заданных молекулярных конструкций, как двунитевых, так и кольцевых молекул ДНК (Marchand et al., 2012). Целью работы является оптимизация условий клонирования (рис.1) молекул ДНК размером 7-10 т.п.н. в генетических конструкциях pGEM-IRSI-IR2.3 и pGEM-IR2.3 (размером 3,4 и 3,24 т.п.н. соответственно), содержащих концевые инвертированные повторы линейных митохондриальных плазмид из кукурузы (*Zea mays*), SI (6,4 т.п.н.) и S3 (2,3 т.п.н.).

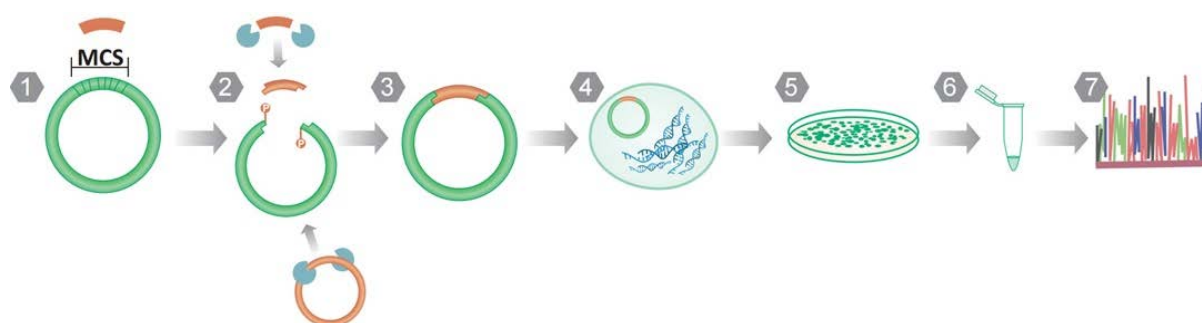


Рис. 1. Схема клонирования (по: GenScriptUSAInc, 2012).

1 – амплифицируемая плазмида и длинноразмерный фрагмент ДНК, содержащие сайты рестрикции; 2 – ферментативный гидролиз фосфодиэфирных связей субстрата ПЦР и вектора эндонуклеазами рестрикции; 3 – лигирование продуктов рестрикции; 4, 5 – биотрансформация клеточной культуры *E.coli*; 6 – изолирование рекомбинантной плазмиды, 7 – секвенирование рекомбинантной последовательности ДНК.

В представленной работе использовалась классическая амплификация интересующей последовательности фрагмента ДНК из митохондриального генома *Brassica napus* (GenBank: AP006444.1; позиции 120051-130588) с помощью олигонуклеотидов (праймеров), в последовательности которых, в позиции 5', включены сайты для распознавания эндонуклеазами рестрикции. В нашей схеме клонирования были использованы сайты рестрикции *Bam*HI, *Eco*RV, *Mlu*I, *Nco*I, *Pst*I. Для оптимизации условий обработки ДНК эндонуклеазами рестрикции реакцию проводили в 20 мкл и варьировали следующие параметры: буферный раствор, способ очистки ДНК, объем пробы ДНК. Буферный раствор добавляли исходя из концентрации полученного субстрата (ПЦР продукта) и сайта рестрикции соответствующего длинноразмерного фрагмента ДНК по 2 мкл (рис. 2):

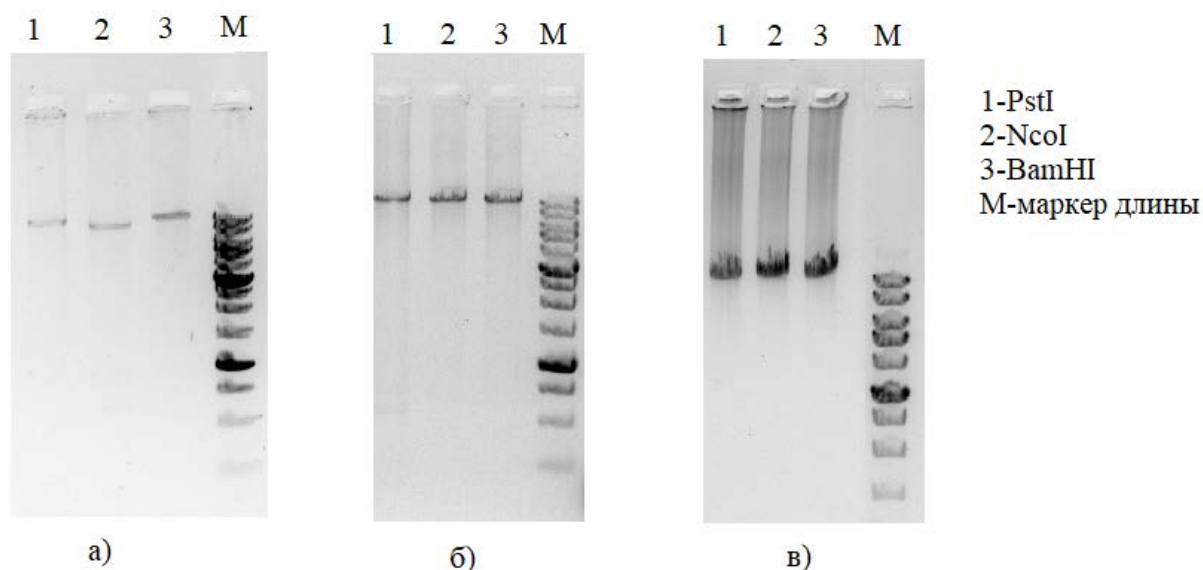


Рис. 2. Результаты электрофоретического разделения рестрицированного продукта ПЦР в зависимости от условий проведения матричного синтеза:

а) оптимизация буферного раствора; б) оптимизация условий очистки; в) оптимизация объема пробы ДНК.

Анализируя результат электрофоретического разделения ПЦР продукта при оптимизации буферной среды (рис. 2, а), следует сделать вывод, что полученные молекулы ПЦР не фрагментированы, содержат минимальную концентрацию олигомерных фрагментов и не включившихся белок-ДНК комплексов. Что касается оптимизации условий очистки ПЦР продукта (рис. 2, б), наилучшие результаты были достигнуты при экстракции водно-органической фазой фенол-хлороформ-изопропанольным раствором, при этом мы наблюдаем увеличение концентрации ПЦР продукта. Оптимизируя объем рестрикционной среды (реакционное пространство составляло 40 мкл), рассчитанный из единицы активности фермента, пришли к результату, что увеличение реакционного объема приводит к полной фрагментации субстрата ПЦР (рис. 2, в). При этом, мы наблюдаем частичную фрагментацию ПЦР продукта, возможно это происходит из-за того, что фенол частично вступает во взаимодействие с кофактором (Mg^{2+}) полимеразной реакции.

Таким образом, при пошаговом анализе условий клонирования длинноразмерных фрагментов ДНК, мы пришли к следующим заключениям: (1) не единичный, а комбинация буферов позволяет синтезировать в ходе полимеразной цепной реакции цельные фрагменты молекул ДНК, (2) для получения заданных молекулярных конструкций определенной размерности в реакции рестрикции оптимально использовать интервал реакционного объема 10–20 мкл.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-04-00603), с использованием оборудования ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН.

Литература

Лаврик О.И., Дырхеева Н.С. Основы ферментативного катализа. – М.: Наука, 2012. – С. 95.

Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. Molecular Cell Biology, 4th edition. – New York Book. – 2000.

Marchand J.A., Peccoud J. Building block synthesis using the polymerase chain assembly method // *Methods Mol Biol.* – 2012. – V. 852. – P. 3–10.

Parker J.B., Bianchet M.A., Krosky D.J., Friedman J.I. Enzymatic capture of an extrahelical thymine in the search for uracil in DNA // *Nature.* – 2007. – V. 449. – P. 433–437.

THE COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOMES OF FOUR ENDEMIC BAIKAL MOLLUSKS (MOLLUSCA: CAENOGASTROPODA)

T.E. Peretolchina, T.Ya. Sitnikova, D.Yu. Sherbakov

Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, e-mail: tatiana.peretolchina@gmail.com

Mollusks are one of the important components of Baikal fauna. There are more than 180 species of mollusks in the lake and 41 of them belong to the endemic subfamily Baicaliinae Fisher, 1885, which is considered as a subfamily of the big family Amnicolidae Tyron, 1863 by molecular data (Wilke et al. 2013). Here we present the complete mitochondrial (mt) genomes of four snails belonging to the different genus of Baicaliinae. These mollusks inhabit littoral zone of Lake Baikal and mainly differ by ecological behavior and substrate preferences: *Korotnewia korotnewii* and *Godlewskia godlewskia* are mobile detritophages and inhabit sandy bottoms, while *Baicalia turriiformis* and *Maackia herderiana* are sestonophages and prefer rocks surfaces. The result provides fundamental data for resolving phylogenetic relationships and evolution problems.

Mollusks were collected by scuba divers in southeastern (Murinskaya banka, 51°29'13.00"N 104°19'3.20"E) and southwestern (Varnachka bay, 51°53'54.27"N 105°7'10.74"E) littoral of Lake Baikal at depths of 10 to 20 meters in August – September of 2015. Typically they were brought live into the laboratory, but some samples were fixed in 80% ethanol in the field. Genomic DNA was extracted by modified method of Sokolov (2000) from the muscle tissue. Sequencing was performed by “GENOTEK” (Moscow) using Illumina HiSeq2000 system with read length 100PE (Illumina, San Diego, CA). The quality trimming and removing of adapters from reads was made by Trimmomatic-0.32 (Bolger et al., 2014). Processed reads were assembled de novo with MIRA 4 (Chevreux, 1999) using MITObim 1.8 (Hahn et al 2013). The mitochondrial genome of *Potamopyrgus estuarinus* (Neiman et al 2010) was used to identify mitochondrial scaffolds of *K. korotnewii*, *G. godlewskia*, *B. turriiformis* and *M. herderiana* in the assembly using BLAST. The mitochondrial DNA sequences were annotated using MITOS pipeline (Bernt et al., 2013). Resulting gene boundaries were determined by alignment with homologous regions of published mitochondrial genomes (mitogenomes) of gastropods and by findings the ORFs employing the invertebrate mitochondrial genetic code. Nucleotide composition of mitogenome sequences was calculated using Mega 6 (Tamura et al., 2013).

All mt genome sequences were deposited in GenBank (KY697386 – KY697389). Their total length ranges from 15,127 bp (*B. turriiformis*) to 15,224 bp (*G. godlewskia*) and coincides with average caenogastropod mitogenomes sequenced (11.1 – 16.7 Kbp) (Wang et al., 2017). Their A+T content vary non-significantly from 66.5% (*G. godlewskia*) to 67.5 % (*B. turriiformis*).

All mitochondrial genomes sequenced, like most metazoan mt genomes, contain 13 protein-coding genes, two ribosomal RNA genes (L-rRNA and S-rRNA), 22 transfer RNA genes. Most of genes are encoded on the heavy strand (+), and only eight tRNA genes (Met, Tyr, Cys, Trp, Gln, Gly, Glu, Thr) on the light strand (–) that is typical for Caenogastropoda. Twenty two tRNA genes vary from 62 to 79 bp in length. Among 13 protein-coding genes, the maximum is ND5 with 1717 bp and the minimum is ATP8 with only 159 bp. S-rRNA and L-rRNA genes are 861-864 and 1374-1383 bp located between the tRNA^{Glu} and tRNA^{Leu} genes and separated by the tRNA^{Val} gene. The most common initiation codon was predicted to be ATG. Initiation codon ATA was observed only one time (ND4 gene) in *B. turriiformis* and *M. herderiana* species. Stop codons were either TAA or TAG (one – three times in different species of *Baicalia*). The absence of D loop is also typical for the Gastropoda (Liu et al. 2012; Zeng et al. 2015; Zhou et al. 2016).

Gene arrangement and distribution of Baikal mollusks mitogenomes studied are similar to the most of Caenogastropoda (Wang et al. 2017; Yang et al 2016; Simison et al 2006; Bandyopadhyay et al 2006). The majority of all living sea and freshwater gastropods are classified within the Caenogastropoda (Mollusca: Gastropoda) clade, which comprises approximately 136 extant families of snails (Colgan et al., 2007). Among all mitogenomes of Caenogastropoda sequenced and available in GeneBank, majority of them exhibited highly conserved gene order with minor discrepancies connected with the position of some tRNAs, and among of representatives of two superfamilies only (Vermetoidea and Cerithioidea) gene arrangement was different (Wang et al., 2017). Caenogastropoda is supposed retain ancestral gene arrangement (Grande et al., 2008).

Results of the analysis of mitogenome sequences of these mollusks can be used for further study of the scenarios of speciation and evolution of the Baikal mollusks fauna.

References

- Bernt M., Donath A., Ju"hling F., Externbrink F., Florentz C., Fritzsch G., Putz J., et al. MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2013. – V. 69. – P. 313–19.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. // *Bioinformatics*. – 2014. – V. 30. – P. 2114–20.
- Chevreur B., Wetter T. and Suhai S. Genome Sequence Assembly Using Trace Signals and Additional Sequence Information. // *Computer Science and Biology: Proceedings of the German Conference on Bioinformatics (GCB)*. – 1999. – V. 99. – P. 45–56.
- Colgan D.J., Ponder W.F., Beacham E., Macaranas J. Molecular phylogenetics of Caenogastropoda (Gastropoda: Mollusca). // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2007. – V. 42 (3). – P. 717–37.
- Grande C., Templado J., Zardoya R. Evolution of gastropod mitochondrial genome arrangements. // *BMC Evolutionary Biology*. – 2008. – V. 8, № 1. – P. 61.
- Hahn C, Bachmann L, Chevreur B. Reconstructing mitochondrial genomes directly from genomic next-generation sequencing reads—a baiting and iterative mapping approach // *Nucleic Acid Research*. – 2013. – V. 41. – 13: e129.
- Liu G.H., Wang S.Y., Huang W.Y., Zhao G.H., Wei S.J., Song H.Q., Xu M.J., Lin R.Q., Zhou D.H., Zhu X.Q. The complete mitochondrial genome of *Galba perversa* (Gastropoda: Mollusca), an intermediate host snail of *Fasciola* spp. // *PLoS One*. – 2012. – 7:e42172.
- Simison W.B., Lindberg D.R., Boore J.L.: Rolling circle amplification of metazoan mitochondrial genomes. // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2006. – V. 39. – P. 562–567.
- Sokolov E.P. An improved method for DNA isolation from mucopolysaccharide-rich molluscan tissues. // *Journal of Molluscan Studies*. – 2000. – V. 66. – P. 573–575.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis, Version 6.0. // *Molecular Biology and Evolution*. – 2013. – V. 30. – P. 2725–2729. (doi: 10.1093/molbev/mst197).
- Wang J.G., Zhang D., Jakovlić I., Wang W.M. Sequencing of the complete mitochondrial genomes of eight freshwater snail species exposes pervasive paraphyly within the Viviparidae family (Caenogastropoda) // *PloS one*. – 2017. – V. 12, № 7. – P. e0181699.
- Wilke T., Haase M., Hershler R., Liu H.-P., Misof B., Ponder W. Pushing short DNA fragments to the limit: 'hydrobioid' gastropods (Caenogastropoda: Rissoidea) // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2013. – V. 66. – P. 715–736. doi: 10.1016/j.ympev.2012.10.025.
- Yang H., Zhang J. E., Deng Z., Luo H., Guo J., He S., ... & Zhao, B. The complete mitochondrial genome of the golden apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) // *Mitochondrial DNA Part B*. – 2016. – V. 1, № 1. – P. 45–47.
- Zeng T, Yin W, Xia R, Fu C, Jin B. Complete mitochondrial genome of a freshwater snail, *Semilucospora libertina* (Cerithioidea: Semilucosporidae). // *Mitochondrial DNA*. – 2015. – V. 26, № 6. – P. 897–8.
- Zhou X., Chen Y., Zhu S., Xu H., Liu Y., Chen L. The complete mitochondrial genome of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) // *Mitochondrial DNA*. – 2016. – V. 27, № 2. – P. 884–5.

ЭФФЕКТЫ ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ ОТДАЛЕННОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ РАСТЕНИЙ

Л.А. Першина, Н.В. Трубачеева
ФГБУН ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН,
Новосибирск, e-mail: pershina@bionet.nsc.ru

Скоординированные взаимодействия между ядерным и органелльными геномами определяют как «ядерно-цитоплазматические взаимодействия» (Michalak de Jimenez *et al.*, 2013), а в случае их нарушения возникают ядерно-цитоплазматические конфликты. Один из примеров такого конфликта у растений – цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС), ассоциированная с мутациями генов митохондриального генома, (Yang *et al.*, 2008). Более сложные механизмы межгеномных взаимодействий, в том числе связанных с нарушениями эволюционно сложившегося ядерно-цитоплазматического баланса, проявляются при отдаленной гибридизации. Это определяется тем, что у отдаленных гибридов в одном ядре объединяются два разных родительских генома, внедренных в большинстве случаев в материнскую цитоплазму.

Успех образования отдаленных гибридов, их жизнеспособность и способность к восстановлению фертильности во многом определяется эффектами ядерно-цитоплазматических взаимодействий, связанных с направлением скрещиваний. Ядерно-цитоплазматические взаимодействия рассматривают как один из механизмов несовместимости при отдаленной гибридизации (Pershina, Trubacheeva, 2017), которая вносит существенный вклад в видообразование покрытосеменных растений, а также обеспечивает перенос генов между видами, расширяя их потенциал к адаптации (Rieseberg, Wills, 2007). В экспериментальных условиях отдаленные скрещивания широко используют для получения новых генотипов культурных растений с целью увеличения генетического разнообразия (Pershina, 2014).

В качестве моделей для изучения ядерно-цитоплазматических взаимодействий рассматривают реципрокные гибриды и аллоплазматические линии (ядерно-цитоплазматические гибриды). Реципрокные гибриды сочетают один и тот же ядерный гибридный геном с разной цитоплазмой, поэтому при наличии различий между парами реципрокных гибридов их можно отнести за счет влияния цитоплазмы или особенностей ядерно-цитоплазматических взаимодействий. Одно из ограничений использования реципрокных гибридов связано с тем, что не для всех гибридных комбинаций возможно осуществить оба направления скрещиваний из-за генетически детерминированной презиготической репродуктивной изоляции.

Что касается аллоплазматических линий (алло-линий), то они получены для ряда видов культурных растений, включая виды пшеницы. Новые ядерно-цитоплазматические взаимодействия при замещении цитоплазмы вызывают эпигенетическую модификацию ядерных генов (Soltani *et al.*, 2016). У алло-линий наблюдается изменчивость признаков в развитии растений, их устойчивости к стрессовым факторам (Булойчик и др., 2002) и проявлении хозяйственно-ценных признаков (Климушина и др., 2013). Степень выраженности ядерно-цитоплазматического конфликта или ядерно-цитоплазматической совместимости зависит от филогенетической отдаленности видов, сочетающих ядерный геном и цитоплазму, ядерного бэкграунда, условий выращивания растений. При этом основная роль принадлежит действию ядерных генов, контролирующих восстановление фертильности на чужой цитоплазме (*Rf*-гены), и определяющих ядерно-цитоплазматическую совместимость (*scs*-гены) (Michalak de Jimenez *et al.*, 2013). На примере алло-линий (*H.vulgare*)-*T.aestivum*, полученных в наших работах, выявлены сорта мягкой пшеницы закрепители стерильности и восстановители фер-

тильности *T.aestivum* на цитоплазме культурного ячменя, а также индивидуальные хромосомы пшеницы, на которых локализованы гены – восстановители фертильности.

Теоретически для образования аллоплазматических линий должно происходить полное замещение материнского ядерного генома на отцовский в процессе возвратных скрещиваний гибридов с отцовским видом, а также передача оргanelльных геномов строго по материнской линии (Tsunewaki, 1993). Вместе с тем, при отдаленных скрещиваниях, в том числе мягкой пшеницы, может происходить нарушение передачи оргanelльных геномов строго по материнской линии (Kitagawa *et al.*, 2002; Aksyonova *et al.*, 2005), а в процессе беккроссирования гибридов и образования аллоплазматических линий наблюдаться изменчивость не только ядерного, но и оргanelльных (митохондриальных и хлоропластных) геномов. Такие закономерности описаны на примере образования алло-линий пшеницы, несущих цитоплазму определенных видов *Aegilops* (Hattori *et al.*, 2002), а также в наших работах, при изучении беккроссных потомков ячменно-пшеничных гибридов (*H.vulgare* × *T.aestivum*) и (*H.marinum* ssp.*gussoneanum* × *T.aestivum*) (Трубачеева и др., 2009; 2012; Першина и др., 2014). Эти результаты указывают на то, что аллоплазматические линии не являются результатом простого сочетания ядерного генома одного вида, а цитоплазмы другого. В процессе становления аллоплазматических линий происходит процесс ядерно-цитоплазматической коадаптации, связанный со структурно-функциональной изменчивостью ядерного и оргanelльных геномов.

Аллоплазматические линии, полученные у разных видов культурных растений и характеризующиеся проявлением ЦМС, рассматривают как одну из систем для получения гибридных семян в гетерозисной селекции (Pelletie, Budar, 2007). Кроме того, благодаря тому, что даже у фертильных аллоплазматических линий из-за изменений регуляции между ядром и оргanelльными геномами происходят изменения на уровне транскрипции и метаболизма (Crosatti *et al.*, 2013), растения алло-линий, как вновь сформированные генотипы, могут представлять интерес для практических целей. Один из результатов наших работ – получение с использованием интрогрессивных алло-линий (*H.vulgare*)-*T.aestivum* совместно с селекционерами новых сортов яровой мягкой пшеницы (Белан и др., 2017).

Работа выполнена в рамках бюджетного проекта № 0324-2016-0001 и при поддержке гранта РФФИ (проект 17-04-01738).

Литература

Белан И.А., Россеева Л.П., Мешкова Л.В., Блохина Н.П., Першина Л.А., Трубачеева Н.В. Создание сортов мягкой пшеницы устойчивых к грибным заболеваниям для условий Западной Сибири и Урала // Вестник Алтайского гос. аграрного ун-та. – 2017. – № 1 (147). – С. 5–7.

Булойчик А.А., Волуевич Е.А., Михно А.М. Эффекты генома и плазмона на экспрессию преодоленных генов устойчивости пшеницы к бурой ржавчине // Цитология и генетика. – 2002. – Т. 36. – С. 11–19.

Климушина М.В., Дивашук М.Г., Мухаммед Т.А.К., Семенов О.Г., Карлов Г.И. Анализ аллельного состава генов, связанных с хлебо-пекарными качествами, у аллоцитоплазматических гибридов пшеницы // Генетика. – 2013. – Т. 49. – С. 617–625.

Першина Л.А., Трубачеева Н.В., Синявская М.Г., Девяткина, Кравцова Л.А. Ядерно-цитоплазматическая совместимость и состояние районов митохондриальной и хлоропластной днк у аллоплазматических рекомбинантных и интрогрессивных линий (*H. vulgare*)-*T.aestivum* // Генетика. – 2014. – Т. 50. – С. 1154–1162.

Трубачеева Н.В., Ефремова Т.Т., Бадаева Е.Д., Кравцова Л.А., Белова Л.И., Девяткина Э.П., Першина Л.А. Получение аллоплазматических и эуплазматических пшенично-ячменных дителосомно замещенных линий 7Н1L^{mar}(7D) и изучение 18S/5S митохондриального повтора у этих линий // Генетика. – 2009. – Т. 45. – С. 1627–1633.

Трубачеева Н.В., Кравцова Л.А., Девяткина Э.П., Ефремова Т.Т., Синявская М.Г., Шумный В.К., Першина Л.А. Гетероплазматическое и гомоплазматическое состояние митохондрии

- альной и хлоропластной ДНК у потомков отдаленных гибридов мягкой пшеницы разного происхождения // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Т. 16. – С. 160–169.
- Aksyonova E., Sinyavskaya M., Danilenko N., Pershina L., Nakamura C., Davydenko O. Heteroplasmy and paternally oriented shift of the organellar DNA composition in barley-wheat hybrids during backcrosses with wheat parents // *Genome*. – 2005. – V. 48. – P. 761–769.
- Crosatti C., Quansah L., Maré C., Giusti L., Roncaglia E., Atienza S.G., Cattivelli L., Fait A. Cytoplasmic genome substitution in wheat affects the nuclear-cytoplasmic cross-talk leading to transcript and metabolite alterations // *BMC Genomics*. – 2013. – V. 14. – P. 868–889.
- Hattori N., Kitagawa K., Takumi S., Nakamura C. Mitochondrial DNA heteroplasmy in wheat, *Aegilops* and their nucleus-cytoplasm hybrids // *Genetics*. – 2002. – V. 160. – P. 1619–1630.
- Kitagawa K., Takumi S., Nakamura C. Evidence of paternal transmission of mitochondrial DNA in a nucleus-cytoplasm hybrid of timopheevi wheat // *Genes. Genet. Syst.* – 2002. – V. 77. – P. 243–250.
- Michalak de Jimenez M.K., Bassi F.M., Ghavami F., Simons K., Dizon R., Seetan R.I., Alnemer L.M., Denton A.M., Doğramacı M., Šimková H., Doležel J., Seth K., Luo M.-C., Dvorak J., Gu Y.Q., Kianian S.F. A radiation hybrid map of chromosome 1D reveals synteny conservation at a wheat speciation locus // *Funct Integr Genomics*. – 2013. – V. 13. – P. 19–32.
- Pelletier G., Budar F. The molecular biology of cytoplasmically inherited male sterility and prospects for its engineering // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2007. – V. 18. – P. 121–125.
- Pershina L.A., Trubacheeva N.V. Interspecific incompatibility in wide hybridization of plants and ways to overcome. *Russian Journal of Genetics: Applied Research* // 2017. – V. 7. – P. 358–368.
- Pershina L.A. Plant chromosome engineering is area of Biotechnology // *Russian Journal of genetics: Applied Research* // 2014. – V. 4. – P. 311–317.
- Rieseberg L.H., Wills J.H. Plant speciation // *Science*. – 2007. – V. 317. – P. 910–913.
- Soltani A., Ajay Kumar, Mohamed Mergoum, Seyed Mostafa Pirseyedi, Justin B. Hegstad, Mona Mazaheri, Shahryar F. Kianian. Novel nuclear-cytoplasmic interaction in wheat (*Triticum aestivum*) induces vigorous plants // *Funct Integr Genomics*. – 2016. – V. 16. – P. 171–182.
- Tsunewaki K. Genome-plasmon interactions in wheat // *Jpn J Genet.* – 1993. – V. 68. – P. 1–34.
- Yang J., Zhang M., Yu J. Mitochondrial retrograde regulation tuning fork in nuclear genes expressions of higher plants // *J Genet Genomics*. – 2008. – V. 35. – P. 65–71.

МОГУТ ЛИ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ БЫТЬ ДОНОРАМИ ОРГАНЕЛЛ: МЕЖКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ МИТОХОНДРИЙ

*Е.Ю. Плотников^{1, 2}, В.А. Бабенко^{1, 2}, Д.Н. Силачев^{1, 2}, И.Б. Певзнер^{1, 2},
Л.Д. Зорова^{1, 2}, Г.Т. Сухих², Д.Б. Зоров^{1, 2}*

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ
им. М.В. Ломоносова, Москва, e-mail: plotnikov@belozersky.msu.ru

²Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии
и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова, Москва

Транспорт митохондрий в клетках впервые обнаружен в нейронах, имеющих длинные аксоны, где митохондрии способны перемещаться из тела клетки на периферию, в область синаптических контактов (антероградный транспорт) и обратно с периферии в перинуклеарную зону (ретроградный транспорт). Считается, что подобное перемещение митохондрий служит для передачи энергии в места наибольших энергозатрат. Относительно недавно, в 2006 году, была открыта возможность межклеточного транспорта митохондрий. Активное исследование этого транспорта началось вместе с открытием туннельных нанотрубочек (ТНТ) – межклеточных структур, для которых наиболее широко описаны механизмы транспорта органелл между клетками. Более того, некоторые исследователи считают, что наличие ТНТ является необходимым и достаточным условием транспорта митохондрий. Интересно, что большинство работ, описывающих передачу митохондрий между клетками, касается стволовых клеток, хотя есть свидетельства транспорта митохондрий и между другими типами клеток, например, опухолевыми. Поскольку существует множество заболеваний, связанных с нарушением митохондриальных функций, очень привлекательной становится возможность замены неправильно функционирующих митохондрий здоровыми органеллами донорских клеток, в качестве которых могут выступать стволовые клетки.

В течение нескольких последних лет мы изучали передачу митохондрий между мезенхимальными мультипотентными стромальными клетками (ММСК) и различными типами дифференцированных соматических клеток: нейронами, кардиомиоцитами, клетками почечного эпителия.

Передачу митохондрий изучали на модели сокультивирования ММСК с дифференцированными клетками, а передачу митохондрий оценивали с помощью конфокальной микроскопии и проточной цитометрии. Чтобы дифференцировать митохондрии в разных типах клеток, их окрашивали специфическими митохондриальными зондами или генетически кодируемыми белками, имеющими митохондриальный адрес.

При анализе совместной культуры клеток мы наблюдали передачу митохондрий из ММСК в нейроны, почечный эпителий и кардиомиоциты. Например, после 24 ч сокультивирования ММСК и нейронов митохондрии, несущие специфический красный флуоресцентный белок мито-DsRed, наблюдались в нейронах, собственные митохондрии которых имели зеленый флуоресцентный белок мито-GFP, однако обратной картины не наблюдалось. Аналогичные наблюдения были сделаны для кардиомиоцитов и почечного эпителия. При этом в случае почечного эпителия была использована гетерологическая система, при которой человеческие ММСК сокультивировали с почечными клетками крысы. В этом случае передача митохондрий подтверждалась иммунофлуоресценцией с видоспецифическими антителами против цитохромоксидазы человека. Крысиные клетки исходно не окрашивались этими антителами, тогда как после сокультивирования в них появлялись митохондрии, позитивные по цитохромоксидазе человека, то есть переданные из человеческих клеток.

Интересно, что параллельно с транспортом митохондрий наблюдалась и передача между клетками низкомолекулярных компонентов цитоплазмы. При этом направление транспорта цитоплазмы было различным в разных клеточных системах. При сокультивировании ММСК и кардиомиоцитов цитоплазма передавалась в обоих направлениях: и из ММСК в кардиомиоциты, и обратно. При сокультивировании с почечным эпителием преобладал транспорт цитоплазмы из эпителиоцитов в ММСК, а при сокультивировании с нейронами транспорта цитоплазмы из ММСК в нейроны не наблюдалось вообще. Однако во всех системах направление передачи митохондрий было одинаковым – из ММСК в клетку-реципиент, хотя эффективность такого транспорта была довольно низкой: не более 10% клеток в культуре получали митохондрии от ММСК.

Мы обнаружили, что уровень белка Miro1 (Rho-ГТФазы, ответственной за транспорт митохондрий) увеличивался вдвое в ММСК, сокультивированных с нейронами. Основываясь на этом наблюдении, мы получили культуру ММСК, сверхэкспрессирующих белок Miro1. При их сокультивировании с нейральными клетками число клеток, получивших митохондрии от ММСК, увеличивалось в два раза.

Очень важным явилось наблюдение восстановления биоэнергетических функций после передачи митохондрий. Исследовались нейрон-подобные клетки PC12, в которых митохондриальную ДНК повреждали бромистым этидием. Такие клетки из-за нарушенного дыхания основную часть энергии получают путем гликолиза, в результате чего увеличивается продукция лактата. После сокультивирования этих клеток с ММСК количество лактата в среде снижалось, что говорит о восстановлении процессов окислительного фосфорилирования.

Таким образом, мы показали, что ММСК могут служить донорами функционально активных митохондрий, передавая их в различные соматические клетки. Такая передача митохондрий, вероятно, влияет на восстановление функции митохондрий в клетках-реципиентах, нарушенной в условиях стресса. Возможно, именно транспорт митохондрий из ММСК в поврежденные клетки обеспечивает различные положительные эффекты клеточной терапии при трансплантации ММСК на фоне различных патологий, связанных с повреждением митохондрий.

Работа частично поддержана грантом Президента РФ МД-2065.2018.4.

СИНТЕЗ СТРЕССОВЫХ БЕЛКОВ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ГИПЕРТЕРМИИ

Т.П. Побежимова¹, Н.С. Забанова^{1,2}, О.И. Грабельных^{1,2}, В.К. Войников¹

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

²ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, Иркутск,
e-mail: pobezhimova@sifibr.irk.ru

Выживаемость растительных клеток в условиях высокотемпературного стресса зависит от содержания в клетке в момент воздействия стрессовых белков, особенно белка теплового шока Hsp101 (БТШ101) (Queitsch et al., 2000). Известно, что другие БТШ, а именно – низкомолекулярные (нмБТШ), защищают при стрессе дыхательную цепь митохондрий (Downs, Heckathorn, 1998; Hamilton, Heckathorn, 2001). Одной из причин гибели растений при температурном стрессе может быть окислительный стресс, связанный с избыточной генерацией активных форм кислорода (АФК) (Marchi et al., 2012). В ряде работ показано усиление образования АФК в растительных клетках при повышении температуры (Федяева и др., 2014). При этом в этиолированных тканях растений основной вклад в продукцию АФК в клетке вносят митохондрии и их электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) (Møller, 2001). Регуляция функционирования митохондрий важна для поддержания клеточного гомеостаза в клетках растений при стрессе (Schwarzlander, Finkemeir, 2013). Ранее нами на этиолированных проростках кукурузы было показано, что флуктуации температур вызывают изменения в способности митохондрий растений генерировать АФК, при этом происходят изменения целостности митохондрий и их окислительной и фосфорилирующей активности (Grabelnych et al., 2015). Однако связь между синтезом стрессовых белков и функциональной активностью растительных митохондрий при температурном стрессе не изучалась. Целью работы явилось изучение связи между содержанием АФК, синтезом стрессовых белков и функциональной активностью митохондрий озимой пшеницы.

В качестве объекта исследования в работе использовали этиолированные проростки озимой пшеницы (сорт «Иркутская»). Проростки выращивали до возраста 3-х суток (контроль) и подвергали действию закалывающей температуры 37 °С (2 и 24 ч) (тепловое закалывание, ТЗ) с последующим действием на закаленные проростки повреждающей температуры 47 °С, 30 мин (тепловой шок, ТШ). Жизнеспособность клеток после теплового шока оценивали кондуктометрически по выходу электролитов из тканей побегов, а выживаемость проростков по их отрастанию через 7 суток после воздействия. Определение содержания АФК в побегах пшеницы проводили с использованием 1 мкМ H₂DCF·DA (Грабельных и др., 2014). Выделение митохондрий из побегов проростков и очистку в градиенте плотности перколла проводили по методике (Побежимова и др., 2004). Интактность и активность митохондрий оценивали полярографически с использованием платинового электрода и Oxytherm Oxygen Electrode Unit system (Hansatech). Интактность внешней митохондриальной мембраны определяли по скорости аскорбат-зависимого цитохром *c*-стимулируемого KCN-чувствительного поглощения кислорода в отсутствие и в присутствии 0,04 % Тритона X-100. Для анализа окислительной активности митохондрий использовали смеси субстратов: 10 мМ малат + 10 мМ глутамат, 8 мМ сукцинат + 5 мМ глутамат и 3 мкМ ротенона, 1 мМ НАД·Н, 1 мМ НАДФ·Н, 2 мМ аскорбат + 0,2 мМ тетраметил-п-фенилендиамин (ТМФД). При окислении НАД·Н и НАДФ·Н из состава среды инкубации исключали ЭДТА и включали 0,06 мМ CaCl₂. Для определения активности альтернативной внутренней НАД·Н-дегидрогеназы (НАД·Н-ДГ) использовали 10 мМ малат + 10 мМ глутамат и 3 мкМ ротенон. В качестве ингибитора цитохромного пути дыхания использовали 0,4 мМ KCN,

а альтернативного пути дыхания, связанного с функционированием альтернативной оксидазы (АО), – 1 мМ бензгидроксамовую кислоту (БГК). Для изучения синтеза стрессовых белков общие клеточные и митохондриальные белки разделяли электрофоретически в денатурирующих условиях и проводили иммуноблоттинг с антителами против Hsp101, Hsp70/Hsc70, Hsp17,6 (I и II Classes), AOX1/2, используя актин и порин как внутренние контроли.

Наши результаты показали, что предварительный прогрев проростков озимой пшеницы при 37 °С в течение 2 ч приводит к повышению устойчивости мембран к действию температуры 47 °С, о чем свидетельствует отсутствие повышения выхода электролитов в раствор из тканей закаленных проростков и выживаемость самих проростков после отрастания. Увеличение длительности обработки до 24 ч приводило к некоторому росту устойчивости проростков к тепловому шоку.

С использованием H₂DCF-DA было выявлено, что тепловой шок приводит к развитию окислительного стресса в побегах озимой пшеницы, который можно предотвратить предварительной обработкой проростков закалывающей температурой. Так, при обработке незакаленных проростков температурой 47 °С содержание АФК в тканях побегов озимой пшеницы значительно возрастало, а при действии 47 °С на закаленные проростки содержание АФК было на уровне контроля.

Анализ содержания ряда БТШ в тканях побегов озимой пшеницы при тепловом воздействии показал, что обработка проростков температурой 37 °С (2 и 24 ч) приводит к синтезу Hsp101, Hsp70 и Hsp17.6 (I и II Classes). В отличие от Hsp101, Hsp70 и Hsp17.6 (CII) накопление Hsp17.6 (CI) зависело от длительности обработки, и было наибольшим через 24 ч. Ранее было показано, что у арабидопсиса цитоплазматический Hsp101 обнаруживается после теплового стресса преимущественно в митохондриальной фракции (Rikhvanov et al., 2007). Это позволяет предположить, что Hsp101 может связываться с митохондриями при тепловом стрессе и модулировать их активность. Нами также показано, что Hsp101 ассоциирует с митохондриями озимой пшеницы при действии на проростки закалывающей температуры, причем Hsp101 детектировался в митохондриальной фракции и после ее очистки в градиенте плотности перколла. Наряду с Hsp101 в митохондриальной фракции озимой пшеницы после теплового воздействия обнаруживался Hsp17.6 (I и II Classes).

Поскольку прогрев при 37 °С приводил к синтезу стрессовых белков, часть из которых обнаруживалась в митохондриальной фракции, и защищал проростки озимой пшеницы от гибели при последующем тепловом шоке, необходимо было изучить функциональную активность митохондрий из незакаленных и закаленных проростков при ТШ. Тепловой шок приводил к нарушению интактности внешней мембраны митохондрий из незакаленных проростков, значительному снижению их окислительной и фосфорилирующей активности. Предварительная обработка температурой 37 °С предотвращала нарушение целостности митохондрий при ТШ и не приводила к снижению их окислительной и фосфорилирующей активности. Интересно, что воздействие закалывающей температурой в течение 2 ч приводило к снижению окислительной активности митохондрий, однако не влияло на степень сопряжения процессов окисления и фосфорилирования (на это указывают значения коэффициента ДК и отношения АДФ:О). Дальнейшая экспозиция проростков при 37 °С (до 24 ч) приводила к некоторому повышению скоростей окисления митохондриями малата в присутствии ротенона, сукцината, НАДФ Н и ТМФД. Так же как и в случае 2-х часовой обработки параметры сопряжения процессов окисления и фосфорилирования не снижались. Следует отметить, что скорость окисления экзогенного НАД Н митохондриями оставалась на уровне значения контрольных проростков. Были выявлены различия в активности внешних НАД(Ф) Н-ДГ, при этом, как оказалось, НАДФ·Н-дегидрогеназа в митохондриях озимой пшеницы менее активна. Изучение потенциальной активности АО выявило, что при 2-х ч воздействии температурой 37 °С она не изменяется независимо от субстрата

окисления, в то время как 24-х часовое воздействие приводит к увеличению активности АО при функционировании внутренних ротенон-нечувствительных НАД(Ф) Н-ДГ и внешней НАДФ-Н-ДГ. Наряду с активностью в митохондриях растёт и содержание белка АО.

Таким образом, действие неповреждающей высокой температуры приводит к синтезу стрессовых белков в проростках озимой пшеницы, при этом ряд цитоплазматических БТШ (Hsp101, Hsp17.6) обнаруживается в митохондриях, что позволяет им функционировать при тепловом шоке. Возможно, Hsp101 и нмБТШ оказывают влияние на функциональную активность митохондрий и предотвращают повреждения дыхательной цепи, вызываемые тепловым шоком, при этом снижается риск развития окислительного стресса. Сохранение сопряжения процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях является необходимым условием для развития адаптивных реакций в клетке.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-04-06533-а.

Литература

Грабельных О.И., Боровик О.А., Таусон Е.Л. (и др.). Митохондриальные энергорассеивающие системы (альтернативная оксидаза, разобщающие белки и «внешняя» NADH-дегидрогеназа) вовлечены в развитие морозоустойчивости проростков озимой пшеницы // Биохимия. – 2014. – Т. 79, № 6. – С. 645–660.

Побежимова Т.П., Колесниченко А.В., Грабельных О.И. Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез; Отв. ред. чл.-корр. РАН Р.К. Саляев. – М.: ООО «НПК ПРОМЭКОБЕЗОПАСНОСТЬ», 2004. – 98 с.

Федяева А.В., Степанов А.В., Любушкина И.В., Побежимова Т.П., Рихванов Е.Г. Тепловой шок индуцирует продукцию активных форм кислорода и повышает потенциал на внутренней митохондриальной мембране в клетках озимой пшеницы // Биохимия. – 2014. – Т. 79, № 11. – С. 1476–1486.

Downs C.A., Heckathorn S.A. The mitochondrial small heat-shock protein protects NADH: ubiquinone oxidoreductase of the electron transport chain during heat stress in plants // FEBS Lett., 1998. – V. 430 – P. 246–250.

Grabelnych O.I., Pobezhimova T.P., Koroleva N.A. (et al.). Temperature stress and consequences of its influence on functional activity of mitochondria in maize etiolated seedlings // J. Stress Physiology and Biochemistry. – 2015. – V. 11, N 3. – P. 82–93.

Hamilton E.W., Heckathorn S.A. Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine // Plant Physiol. – 2001. – V. 126. – P. 1266–1274.

Marchi S., Giorgi C., Suski J.M. (et al.). Mitochondrial-ROS crosstalk in the control of cell death and aging // J. Signal Transduction. – 2012. – V. 2012. – P. 329635.

Møller I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species // Plant Physiol. – 2001. – V. 52. – P. 561–591.

Queitsch C., Hong S.W., Vierling E., Lindquist S. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis // Plant Cell. – 2000. – V. 12, № 4. – P. 479–492.

Rikhvanov E.G., Gamborg K.Z., Varakina N.N. (et al.). Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in Arabidopsis cell culture // Plant J. – 2007. – V. 52, № 4. – P. 763–768.

Schwarzlander M., Finkemeir I. Mitochondrial energy and redox signaling in plants // Antioxid. Redox Signal. – 2013. – V. 18. – P. 2122–2144.

РЕДОКС-АКТИВНЫЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ВАКУОЛЕЙ, ПЛАСТИД И МИТОХОНДРИЙ КЛЕТОК КОРНЕПЛОДОВ СТОЛОВОЙ СВЕКЛЫ

Е.В. Прадедова¹, О.Д. Нимаева¹, А.Б. Карпова², Р.К. Салеев¹

¹ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: praded@sifibr.irk.ru

²ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, г. Иркутск,
e-mail: KarpovaAB@yandex.ru

Для нормального функционирования субклеточных структур, в которых протекают разнообразные окислительно-восстановительные процессы, необходима «восстанавливающая» среда. Она поддерживает электрохимический градиент и обеспечивает условия для перемещения электронов (Koffler et al., 2013). Внутренняя среда компартментов, которую формируют разнообразные низкомолекулярные редокс-соединения (доноры/акцепторы электронов), служит своеобразным редокс-буфером. Глутатион, аскорбиновая кислота и НАД(Ф)Н – важные редокс-элементы внутренней среды многих компартментов клетки. Признанным клеточным редокс-буфером считается пара глутатиона, включающая восстановленный (GSH) и окисленный (GSSG) глутатион (Go et al., 2008; Koffler et al., 2013). Повсеместное присутствие и высокая концентрация глутатиона позволили использовать его в качестве основного маркера редокс-состояния клетки и ее структур. Например, интенсивность редокс-процессов в митохондриях, пластидах и цитозоле оценивается редокс-соотношением (GSH/GSSG) (Go et al., 2008; Noctor et al., 2011). Редокс-потенциал этих клеточных структур также характеризуется редокс-потенциалом глутатиона. В норме, как правило, поддерживается относительно высокий восстановленный потенциал (Go et al., 2008).

Редокс-состояние субклеточных структур изменяется при повышении окислительных процессов. Триггерным механизмом зачастую служит генерация активных форм кислорода (АФК). Система глутатиона и АФК в последние годы рассматриваются как главные регуляторы окислительно-восстановительных процессов в цитозоле, пластидах и митохондриях (Noctor et al., 2011). Согласно сложившимся представлениям, в клеточных структурах, в которых поддерживаются кислые условия, например, клеточной стенке, лизосомах и вакуолях, GSH и особенно GSH-зависимые системы, из-за низкой активности в кислой среде, могут быть малоэффективными (Go et al., 2008). По всей видимости, в таких компартментах основным редокс-буфером служит аскорбиновая кислота (АК), которая обратимо окисляется до дегидроаскорбиновой кислоты (ДГА) (Pignocchi et al., 2003). Элементы системы аскорбиновой кислоты и системы глутатиона регулируют редокс-состояние пула АК (АК/ДГА), которое также служит характеристикой редокс-состояния компартментов.

В системе глутатиона и аскорбиновой кислоты основными донорами электронов служат НАДФН и НАДН. С другой стороны, эти динуклеотиды могут быть донорами электронов для O_2 и таким образом способствуют образованию АФК (Lopez-Mirabal, Winther, 2008). В связи с этим редокс-состояние компартментов клетки обусловлено не только редокс-состоянием глутатиона и аскорбиновой кислоты, но и в определенной мере редокс-состоянием динуклеотидов НАД(Ф)⁺/НАД(Ф)Н.

Проводилось исследование редокс-состояния вакуолей, пластид и митохондрий клеток покоящихся корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). В изолированных органеллах было определено содержание восстановленной и окисленной форм глутатиона, аскорбиновой кислоты и НАД(Н). Редокс-соотношение перечисленных соединений служило показателем редокс-состояния исследуемых органелл. Полученные результаты продемонстрировали разное распределение GSH, АК и НАД по внутриклеточным

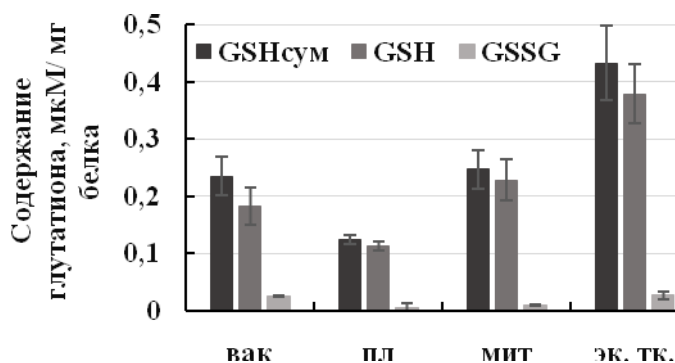


Рис. 1. Содержание глутатиона в изолированных вакуолях (вак), пластидах (пл) и митохондриях (мит), а также экстрактах ткани (эк. тк.).

GSH – восстановленная форма глутатиона. GSSG – окисленная форма глутатиона, GSHсум – суммарная концентрация GSH и GSSG.

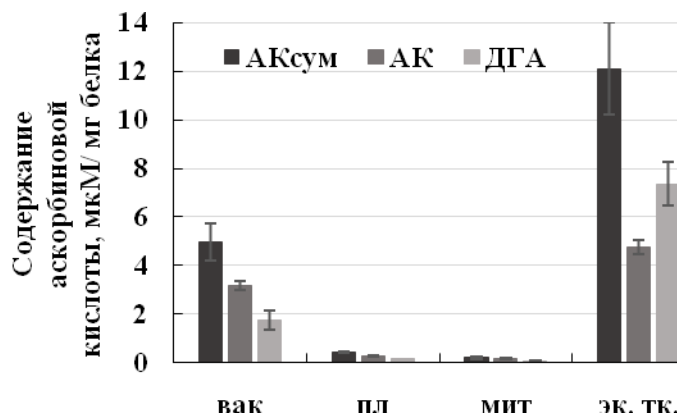


Рис. 2. Содержание аскорбиновой кислоты в исследуемых образцах.

АК – восстановленная форма аскорбиновой кислоты. ДГА – дегидроаскорбиновая кислота. АКсум – суммарная концентрация АК и ДГА.

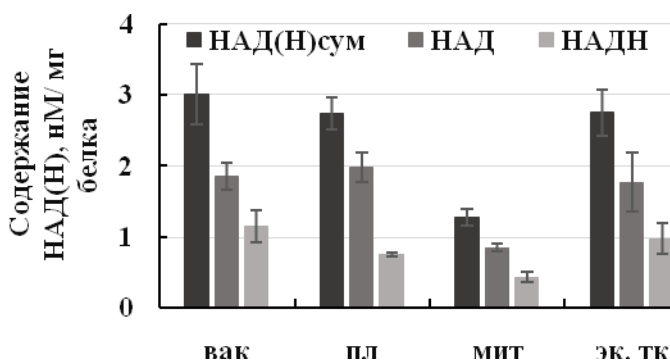


Рис. 3. Содержание НАД(Н) в исследуемых образцах.

НАД(Н)сум – суммарная концентрация НАД и НАДН.

структурам в клетках корнеплодов столовой свеклы (рис. 1, 2, 3).

Наибольшее содержание глутатиона выявлено в митохондриях, а наименьшее – в пластидах (см. рис. 1). Пул глутатиона в вакуолях оказался более окисленным, тогда как в митохондриях он был более восстановленным (табл. 1).

По сравнению с исследуемыми органеллами вакуоли содержали наибольшее количество аскорбиновой кислоты (см. рис. 2). Наименьшее количество АК выявлено в митохондриях. Однако величины редокс-соотношений АК/ДГА так же, как и в случае с редокс-соотношениями GSH/GSSG, были наибольшими у митохондрий и наименьшими у вакуолей (см. табл. 1). Пул аскорбиновой кислоты в вакуолях оказался более окисленным, чем в пластидах и митохондриях.

Согласно сложившимся представлениям, в вакуолях для пиридиннуклеотид -зависимых ферментов основным косубстратом может служить НАД(Н). Однако содержание этого динуклеотида в вакуолях практически не исследовалось. В клетках корнеплодов столовой свеклы этот динуклеотид в относительно высоких концентрациях сосредоточен не только в пластидах, но и вакуолях (см. рис. 3). Вакуоли характеризовались наиболее восстановленным пулом НАД(Н), по сравнению с пластидами и митохондриями (см. табл. 1). Более окисленное состояние глутатиона и аскорбиновой кислоты, на фоне более восстановленного состояния НАД(Н), в

вакуолях говорило об интенсивных окислительных процессах, протекающих в этом компартменте. В вакуолярном содержимом выявлены ферменты, для которых эти низкомолекулярные доноры электронов могут служить субстратом: глутатион-S-

трансферазы, фенольная пероксидаза, аскорбатпероксидаза, аскорбатоксидаза, альдегиддегидрогеназа и др. (Carter et al., 2004; Szponarski et al., 2004; Jaquinod et al., 2007).

Таблица 1

**Редокс-соотношение глутатиона, аскорбиновой кислоты и НАД(Н)
в исследуемых образцах**

	GSH / GSSG	АК / ДГА	НАД / НАДН
Вакуоли	7,4	1,81	1,62
Пластиды	19,8	1,85	2,61
Митохондрии	23,7	2,8	1,93
Экстракт ткани	13,9	0,64	1,81

В то же время, в лейкопластах более окисленное состояние НАД и более восстановленное состояние GSH и АК, несмотря на низкое содержание последних, свидетельствовало о высокой интенсивности восстановительных процессов, в которых НАД и АК могли служить донорами электронов. Более восстановленное состояние глутатиона и аскорбиновой кислоты у митохондрий, указывало на преобладание восстановительных процессов. Пластиды и митохондрии также содержат большое количество разнообразных редокс-ферментов, взаимодействующих с GSH, АК и НАД(Н), и изменяющих их редокс-состояние. Кроме того, редокс-состояние низкомолекулярных доноров электронов изменяют АФК, постоянно генерируемые в этих клеточных структурах.

Полученные результаты позволяют прийти к заключению, что наиболее значимым компонентом редокс-буфера у вакуолей является аскорбиновая кислота, а у митохондрий и пластид – глутатион. Кроме того, у пластид весомый вклад в формирование редокс-условий вносит НАД. В целом, полученные результаты еще раз показали, что в вакуолях пул основных редокс-соединений более окисленный, чем у пластид и митохондрий.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВИРУСНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ НА ПРИМЕРЕ ОМЕГА ЛИДЕРА ВТМ ПРИ ЯДЕРНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ

Н.И. Рекославская^{1, 2}, Р.К. Салыев¹, А.С. Столбиков¹

¹ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: salyaev@sifibr.irk.ru

²ФГБУН Иркутский научный центр СО РАН, Иркутск

Основным и наиболее изученным генетическим регуляторным элементом вирусных РНК+ геномов являются 68 нуклеотидов в 5'НТО ВТМ, известные как последовательность омега (Ω). Омега представляет собой трансляционный энхансер, усиливающий кэп-зависимую трансляцию с кэпированных мРНК на порядок, то есть в 10 раз, в растительных или животных системах как *in vitro*, так и *in vivo*. Особенностью последовательности Ω 5'НТО является то, что они представляют собой структурную последовательность, лишенную почти полностью гуанозиновых остатков, но имеющих повторяющийся 11 раз САА мотив: 5'GUAUUUUUACAACAUAUACCAACAAC AA-CAAACAACAACAACAUAACAUAUACUAUUUACAUAUACAAUACAA3' (Salyaev et al., 2016).

Усиливающая трансляцию активность обусловлена отсутствием канонической спирали, при этом снижается зависимость от фактора eIF4A, являющегося геликазой, и от основных факторов АТФ-зависимого сканирования мРНК. Полагают также, что омега лидер способствует более быстрой интернализации вирусной частицы (её "раздеванием") и более эффективной доступности рибосом при взаимодействии с омега лидером ВТМ. Вследствие неподверженности нуклеотидов, входящих в состав трехцепочечной спирали, составленной на основе САА-элементов омеги, для РНКаз, повышается стабильность мРНК ВТМ и пролонгируется её использование в качестве матрицы.

Мы использовали последовательность омега лидера ВТМ для усиления экспрессии гена HPV16 L1 в растительной экспрессионной системе на основе плодов трансгенного томата. На рис.1 представлен дизайн генетической конструкции с геном HPV16 L1 размером в 2601 пн. Конструкция синтезирована в фирме Genscript (США), проведена секвенированием и помещена в вектор pBINPLUS/ARS.

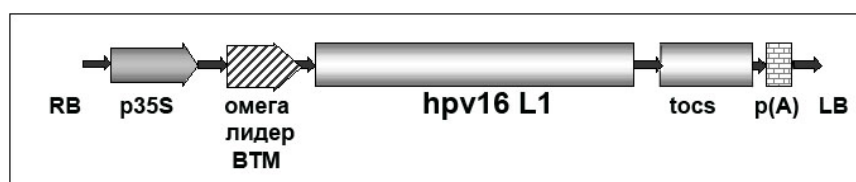
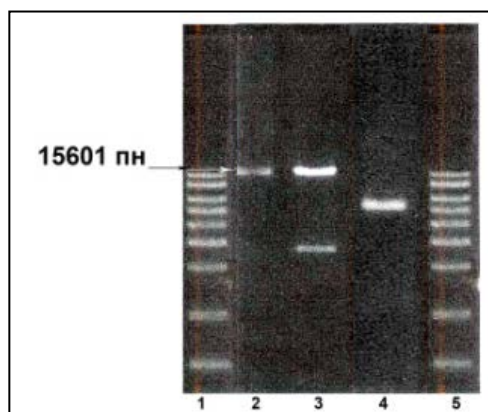


Рис. 1. Схема генетической конструкции pBINPLUS/ARSHPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ размером в 2601 пн



На рис. 2, 3 и 4 приведены доказательства присутствия гена HPV16 L1 в плазмиде pBINPLUS/ARSHPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ (15601 пн), вставленного по сайту HindIII.

Рис. 2. Электрофорез продуктов рестрикции pBINPLUS/ARS HPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ.

1 – маркеры (ladder 10000 пн), 2 – интактная плазмида 15601 пн, 3 – рестрикт HindIII (2601 пн), 4 – рестрикт по сайту SalI, 5 – маркеры (ladder 10000 пн).

Из рис. 5 следует, что практически все трансформированные плоды томата экспрессировали целевой белок HPV16 L1, причем в достаточно большом количестве.

По данным денатурирующего и нативного электрофорезов (рис. 6, А и Б) можно видеть, что количество синтезированного антигенного белка HPV16 L1 достаточно велико, так как во много раз превышает стандарт 2,5 мкг HPV16 L1 (Gen Way Biotech., США).



Рис. 6. А – ДСН электрофорезэкстрактов плодов томата, Б – нативный электрофорез экстрактов плодов томата.

1, 2, 3, 4, 5 и 6 – образцы экстрактов плодов, К – контроль, М – маркер 55 кДа, Нанесен стандартный раствор 2,5 мкг HPV16 L1 в пятно.

Количественный анализ проводили с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) (рис. 7). Содержание общего растворимого белка (ОРБ) определяли по Брэдфорд. По данным ИФА количество антигенного белка HPV16 L1 (см. рис. 7) составляло до 2330 нг/мг ОРБ.

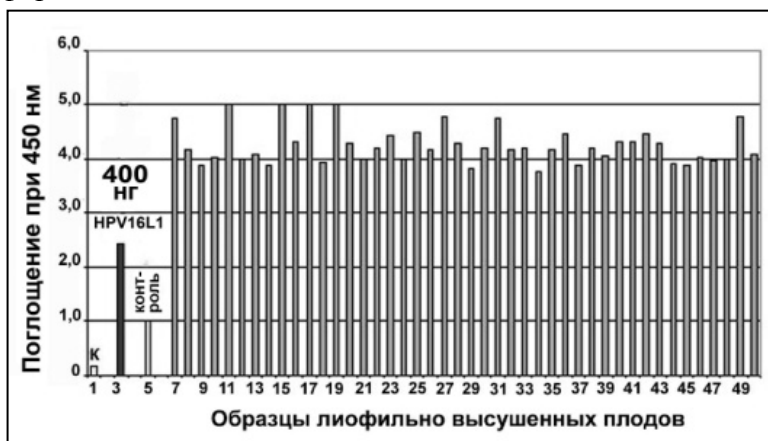


Рис. 7. ИФА HPV16 L1.

1 – К – отрицательный контроль, 3 – 400 нг стандарта HPV16 L1, 5 – контроль, контрольный плод, 7–50 – экстракты индивидуальных плодов томата, трансгенного по гену HPV16 L1.

Таким образом, в нашей работе была создана эффективная инновационная растительная экспрессионная система для синтеза антигенного белка HPV16 L1 путем ядерной трансформации плодов томата генетической конструкцией, содержащей антигенный белок HPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ. Количество продуцируемого антигенного белка достигало 2330 нг/мг ОРБ. В наших предыдущих работах без использования омега лидера ВТМ уровень антигенного белка TBI-HBS составлял 20–25 нг/мг ОРБ (Salyaev et al., 2009), а содержание антигенного белка PreS2-S (Salyaev et al., 2012) было в пределах 130–211 нг/мг ОРБ, что в 100 и 10 раз меньше, соответственно, чем при использовании омега лидера. Поэтому введение вирусных регуляторных генетических элементов представляется весьма перспективным для увеличения продукции гетерологичных белков в растительных экспрессионных системах.

Литература

- Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I., Stolbikov A.S., Hammond R.W., Shchelkunov S.N. Retention of the ability to synthesize HIV-1 and HBV antigens in generations of tomato plants transgenic for the TBI-HBS gene // *Doklady Biochemistry Biophysics*. – 2009. – V. 425. – P. 120–123.
- Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I., Stolbikov A.S., Tretyakova A.V. Candidate mucosal vaccine against hepatitis B based on tomatoes transgenic for the preS2-S gene // *Doklady Biochemistry Biophysics*. – 2012. – V. 446. – P. 237–239.
- Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I., Stolbikov A.S., Tretyakova A.V. Using the omega leader sequence of tobacco mosaic virus to transform tomato fruits with papillomavirus hpv16 L1 gene to enhance production of the antigenic protein HPV16 L1 // *Doklady Biochemistry Biophysics*. – 2016. – V. 468. – P. 187–189.

АДФ/АТФ ТРАНСЛОКАТОР И РЕАКЦИЯ КЛЕТКИ НА СТРЕССОВОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ

Е.Г. Рихванов, И.В. Федосеева, Н.Н. Варакина, Т.М. Русалева,
А.В. Федяева, А.В. Степанов, Г.Б. Боровский
ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: eugene@sifibr.irk.ru

Митохондрия является основным источником получения энергии в клетке, но кроме своей непосредственной функции митохондрии могут регулировать экспрессию ядерных генов в результате процесса, известного как ретроградная регуляция. Ранее было показано, что мягкое тепловое воздействие приводит к повышению митохондриального мембранного потенциала в клетках дрожжей и растений (Rikhvanov et al., 2005; 2007), и это событие является сигналом, запускающим синтез белков теплового шока (БТШ). Однако остался неизвестным механизм повышения $mt\Delta\psi$ при тепловом воздействии. Теоретически повышение $mt\Delta\psi$ может наблюдаться в клетке в двух случаях: при повышении уровня NADH или недостатке АДФ. Уровень АДФ в митохондриях контролирует митохондриальный АДФ/АТФ транслокатор, который в клетках *Saccharomyces cerevisiae* кодируется ядерными генами AAC1, AAC2 и AAC3. Поэтому целью настоящей работы являлось изучение роли этих белков в термотолерантности дрожжевой клетки, активации экспрессии БТШ, продукции АФК и изменении $mt\Delta\psi$ при тепловом воздействии.

Методы

В работе использовали штаммы *Saccharomyces cerevisiae* W303-1B и изогенные ему мутанты, несущие делеции в генах, кодирующих АДФ/АТФ транслокатор: *aac2Δ* и *aac1Δaac2Δaac3Δ*. В качестве дополнительного контроля использовали мутант *petite*, лишенный митохондриальной ДНК. Выращивание дрожжей, определение термотолерантности, SDS-электрофорез, иммуноблоттинг, определение уровня АФК и значения $mt\Delta\psi$ проводили согласно ранее опубликованным методикам (Fedoseeva et al., 2017).

Результаты и обсуждение

Энергетический метаболизм *S. cerevisiae* легко контролируется. В процессе логарифмического роста на глюкозе способность митохондрий дрожжей производить АТФ репрессируется, клетки получают энергию, главным образом, за счет гликолиза. В стационарной фазе энергетический метаболизм активируется. В этих условиях происходит истощение в среде глюкозы, и клетки утилизируют образовавшийся в среде инкубации этанол в ходе митохондриального окислительного фосфорилирования. Поэтому, чтобы установить роль АДФ/АТФ транслокатора в реакции дрожжей на тепловое воздействие использовали клетки, находящиеся в логарифмической и стационарной фазах роста.

Для изучения базовой термотолерантности дрожжи, выращенные при 30 °С на среде с глюкозой до логарифмической или стационарной фазы, обрабатывали при 45 °С. В логарифмической фазе не наблюдалось достоверных различий между термотолерантностью изучаемых мутантов и родительского типа. Термотолерантность мутанта *petite*, напротив, повышалась (рис. 1, а). Совершенно другие результаты были получены в стационарной фазе роста. В этих условиях эксперимента тройной мутант *aac1Δaac2Δaac3Δ* значительно лучше переживал летальное тепловое воздействие (рис. 1, б). Таким образом, в условиях репрессированного дыхательного метаболизма утрата АДФ/АТФ транслокатора не оказывает влияния на базовую термотолерантность, но повышает ее при активации энергетического метаболизма.

Для изучения индуцированной термотолерантности дрожжи, выращенные при 30 °С на среде с глюкозой до логарифмической фазы роста, предварительно обрабатывали при 39 °С, для индукции защитной реакции, затем подвергали жесткому тепловому

му шоку при 50 °С. Результаты показали (рис. 1, в), что несмотря на подавление глюкозой дыхательной активности митохондрий, функционирование АДФ/АТФ транслокатора имеет важное значение для развития индуцированной термотолерантности. Делеция гена *AAC2*, а также тройная делеция генов *AAC1*, *AAC2* и *AAC3* приводили к снижению способности клеток развивать индуцированную термотолерантность. В то же время, утрата мтДНК в клетках мутанта *petite* никак не влияла на этот процесс. Следовательно, даже в условиях репрессированного дыхательного метаболизма АДФ/АТФ транслокатор участвует в развитии защитной реакции дрожжей на тепловое воздействие.

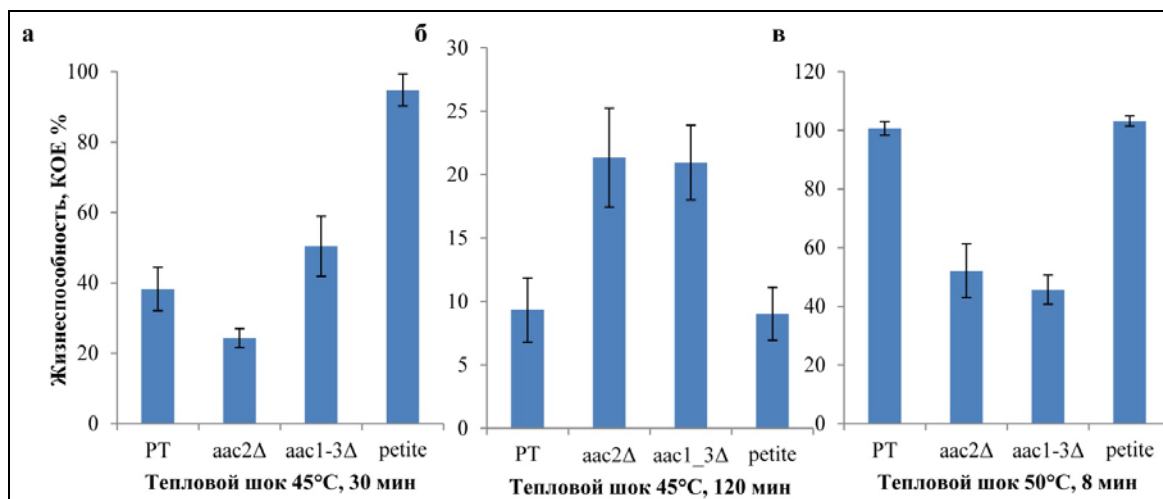


Рис. 1. Базовая (а и б) и индуцированная (в) термотолерантность в клетках РТ и мутантов *aac2Δ* и *aac1Δaac2Δaac3Δ*.

Клетки выращивали на среде с глюкозой до достижения логарифмической (а, в) или стационарной фазы роста (б) и подвергали действию теплового шока. Индуцированную термотолерантность (в) определяли после предварительной тепловой обработки при 39°C.

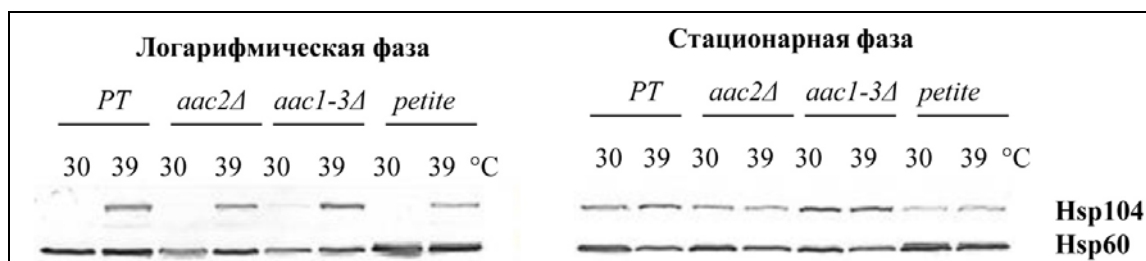


Рис. 2. Синтез Hsp104 и Hsp60 в клетках РТ и мутантов *aac2Δ* и *aac1Δaac2Δaac3Δ*.

Клетки выращивали на среде с глюкозой до достижения логарифмической или стационарной фазы роста, подвергали действию теплового шока, выделяли общий белок и проводили вестерн-блоттинг.

Развитие индуцированной термотолерантности определяется активацией экспрессии генов БТШ. Действительно, в логарифмической фазе роста при 30 °С не наблюдалось синтеза Hsp104. Обработка при 39 °С значительно повышала его количество, что сопровождалось развитием индуцированной термотолерантности. Несмотря на то, что делеции *aac2Δ* и *aac1Δaac2Δaac3Δ* приводили к подавлению индуцированной термотолерантности (рис. 1, в), не было обнаружено эффекта изучаемых делеций на индукцию синтеза Hsp104 (рис. 2). Переход клеток дрожжей в стационарную фазу значительно повышал конститутивный уровень синтеза Hsp104, тепловое воздействие при 39 °С уже не приводило к увеличению его синтеза. Также как в логарифмической фазе роста, в стационарной фазе не было обнаружено эффекта делеций *aac2Δ* и *aac1Δaac2Δaac3Δ* на синтез Hsp104. В то же время, синтез Hsp104 снижался приблизительно в два раза у мутанта *petite*, как в логарифмической фазе, так и в стационарной фазе роста (см. рис. 2).

Развитие индуцированной термотолерантности определяется активацией экспрессии генов БТШ. Действительно, в логарифмической фазе роста при 30 °С не наблюдалось синтеза Hsp104. Обработка при 39 °С значительно повышала его количество, что сопровождалось развитием индуцированной термотолерантности. Несмотря на то, что делеции *aac2Δ* и *aac1Δaac2Δaac3Δ* приводили к подавлению индуцированной термотолерантности (см. рис. 1, в), не было обнаружено эффекта изучаемых делеций на индукцию синтеза Hsp104 (см. рис. 2). Переход клеток дрожжей в стационарную фазу значительно повышал конститутивный уровень синтеза Hsp104, тепловое воздействие при 39 °С уже не приводило к увеличению его синтеза. Также как в логарифмической фазе роста, в стационарной фазе не было обнаружено эффекта делеций *aac2Δ* и *aac1Δaac2Δaac3Δ* на синтез Hsp104. В то же время, синтез Hsp104 снижался приблизительно в два раза у мутанта *petite*, как в логарифмической фазе, так и в стационарной фазе роста (см. рис. 2).

Развитие индуцированной термотолерантности и синтез БТШ при тепловом воздействии сопровождаются повышением mtΔψ (Rikhvanov et al., 2005; Rikhvanov et al., 2007). По-видимому, повышение mtΔψ играет важную роль в развитии индуцированной термотолерантности и экспрессии генов БТШ, поскольку агенты, снижающие mtΔψ, подавляют оба этих процесса. Что же является причиной повышения mtΔψ? Нами было показано, что повышение mtΔψ в клетках дрожжей зависит от функционирования внешней NADH-дегидрогеназы. Делеция гена *NDE1*, кодирующего внешнюю NADH-дегидрогеназу, подавляла повышение mtΔψ (Fedoseeva et al., 2017). Этот результат позволил предположить, что при тепловом шоке повышается уровень NADH, что и является причиной повышения mtΔψ. Однако делеция *nde1Δ* снижала mtΔψ только в условиях активного дыхательного метаболизма и не влияла на этот процесс в логарифмической фазе, в условиях глюкозной репрессии дыхания (Fedoseeva et al., 2017). Поэтому было предположено, что повышение mtΔψ при тепловом воздействии может происходить также в результате ингибирования АДФ/АТФ транслокатора. АДФ/АТФ транслокатор осуществляет обмен АДФ на АТФ через внутреннюю митохондриальную мембрану. Нарушение этого процесса теоретически должно приводить к нарушению функционирования F₀F₁-АТФ синтазы и, соответственно, к повышению mtΔψ. Действительно предварительные эксперименты, проведенные с использованием клеток дрожжей в стационарной фазе, показали, что тепловой шок вызывает гораздо более значительное повышение mtΔψ клетках *aac1Δaac2Δaac3Δ*, чем в клетках родительского типа (рис. 3). Полученные результаты указывают, что подавление активности АДФ/АТФ транслокатора при тепловом воздействии одна из причин повышения mtΔψ, что, в свою очередь, является триггером для запуска экспрессии БТШ.

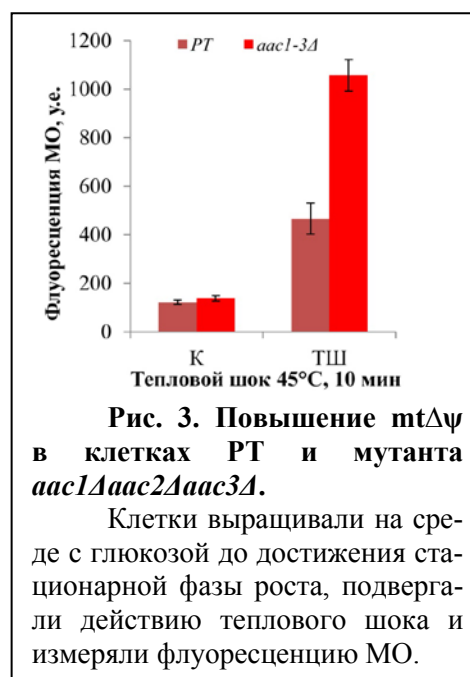


Рис. 3. Повышение mtΔψ в клетках PT и мутанта *aac1Δaac2Δaac3Δ*.

Клетки выращивали на среде с глюкозой до достижения стационарной фазы роста, подвергали действию теплового шока и измеряли флуоресценцию МО.

Литература

- Rikhvanov E.G., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Rachenko E.I., Knorre D.A., Voinikov V.K. Do Mitochondria regulate the heat-shock response in *Saccharomyces cerevisiae*? // Curr. Genet. – 2005. – V. 48. – P. 44–59.
- Rikhvanov E.G., Gamburg K.Z., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Fedoseeva I.V., Tauson E.L., Stupnikova I.V., Stepanov A.V., Borovskii G.B., Voinikov V.K. Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in *Arabidopsis* cell culture // Plant J. – 2007. – V. 52. – P. 763–778.
- Fedoseeva I.V., Pyatrikas D.V., Stepanov A.V., Fedyeva A.V., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Borovskii G.B., Rikhvanov E.G. The role of flavin-containing enzymes in mitochondrial membrane hyperpolarization and ROS production in respiring *Saccharomyces cerevisiae* cells under heat-shock conditions // Sci. Rep. – 2017. – V. 7: 2586.

СУБКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ РЕГУЛИРУЕМЫХ ЦИКЛИЧЕСКИМИ НУКЛЕОТИДАМИ ИОННЫХ КАНАЛОВ (CNGC) В КЛЕТКАХ КОРНЕЙ КАРТОФЕЛЯ ПРИ БИОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

А.С. Романенко, Л.А. Ломоватская, Н.В. Филинова

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

Сигнальная трансдукция вторичного мессенджера кальция через кальциевые каналы используется растениями для восприятия и ответа на различного рода стрессы. Одним из путей транслокации ионов кальция являются открываемые циклическими нуклеотидами ионные каналы (cyclic nucleotide-gated ion channels, CNGCs). CNGCs представляют собой неселективные катионные каналы, представленные в животных и растительных клетках (Kaplan et al., 2007). Биологическая роль и регуляция этих каналов у животных хорошо изучены, тогда как исследование CNGCs растений началось сравнительно недавно (Chin et al., 2009). CNGCs активируются (открываются) при связывании циклических нуклеотидов (сAMP или сGMP) с одним доменом и подавляются (закрываются) при взаимодействии Ca^{2+} -кальмодулина с другим доменом. Полагают, что некоторые CNG-каналы локализованы на плазматической мембране растений, однако до сих пор остается открытым вопрос, присутствуют ли такие каналы в мембранах клеточных органелл.

В работе использовали растения картофеля *in vitro* двух сортов, контрастных по устойчивости к возбудителю кольцевой гнили *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) (сорт Луговской – резистентный, сорт Лукьяновский – восприимчивый) и экзополисахариды (ЭПС) вирулентного и мукоидного штамма Cms 5369. Корни, не отделенные от растений картофеля, выдерживали в течение 7 ч в среде роста (контроль) или инкубировали такое же время в среде с добавлением в конечной концентрации 0,03 % ЭПС Cms (опыт). Фрагменты корней длиной 5–8 мм от их кончика фиксировали по стандартной для электронной микроскопии схеме, подробно описанной в (Романенко, Ломоватская, 2017). Для проведения иммуноцитохимической реакции использовали первичные поликлональные кроличьи антитела (ПАТ), полученные к синтетическому полипептидному фрагменту (21 аминокислотный остаток) канала CNGC α 2 крысы (NCBI, NP_037060.1) (Ruiz et al., 1996) и вторичные козы антитела (БАТ), меченные золотом с размером частиц 20 нм. Для проверки вероятности специфического связывания ПАТ с предполагаемыми CNG каналами клеток картофеля программой BLASTP проводили анализ сходства аминокислотных последовательностей между пятым трансмембранным участком S5 и участком поры канала CNG α 2 предсердия крысы, к которым были получены ПАТ (Ruiz et al., 1996) с аминокислотными последовательностями 20 CNG каналов картофеля. Максимальное сходство (38 %) наблюдалось при сравнении последовательностей аминокислот исследуемого полипептидного фрагмента канала крысы с аналогичным фрагментом канала CNGC18 картофеля. Аминокислотные последовательности анализируемых фрагментов остальных 19 CNG каналов картофеля имели гораздо меньшее совпадение с фрагментом канала CNGC α 2 крысы. Количественную оценку локализации CNG каналов проводили в пределах каждого изображения участков клеток на ультратонких срезах, производя замеры длины пограничной мембраны и мембран клеточных органелл с последующим подсчетом в них электроноплотных частиц маркера вторичных антител, отражающих локализацию CNG каналов, используя программу SigmaScanPro 5. Полученные величины пересчитывали на 1 мкм длины мембран анализируемого компартмента. По каждому варианту использовали 15–18 изображений, результаты обрабатывали статистически с использованием программы SigmaPlot 12.

Результаты показали, что конъюгированные с вторичными антителами коллоидные частицы золота наблюдались в таких мембранных образованиях клеток корня картофеля, как плазмалемма, в том числе, в районе плазмодесм, тонопласт, наружная мембрана и кристы митохондрий, а также эндоплазматический ретикулум. Неспецифическая реакция вторичных антител с клеточными структурами (обработка ультратонких срезов только ВАТ или козьей немеченой золотом иммунной сывороткой, затем ВАТ, меченными золотом), за редким исключением, отсутствовала.

Сравнение контрольных вариантов резистентного и восприимчивого сортов показало, что в зависимости от сортовой устойчивости распределение меток по компартментам заметно различалось (табл. 1). Так, в клетках растений восприимчивого сорта присутствовало в 2 раза меньшее количество частиц на плазмалемме, тонопласте и на мембранах эндоплазматического ретикулума по сравнению с соответствующими компартментами клеток растений резистентного сорта. В варианте обработки корней ЭПС *Sms* количество частиц золота существенно снизилось на плазмалемме и тонопласте клеток резистентного сорта, отсутствовало на тонопласте клеток восприимчивого сорта, но возросло на плазмалемме и появилось в небольшом количестве на мембранах крист митохондрий клеток восприимчивого сорта и на наружной мембране митохондрий клеток резистентного сорта. Соотношение частиц золота (контроль/опыт) в мембранах эндоплазматического ретикулума в пределах каждого сорта почти не изменилось (см. табл. 1).

Таблица 1

Количество гранул золота, шт./мкм, на плазмалемме и мембранах компартментов клеток сортов картофеля, контрастных по устойчивости к кольцевой гнили

Сорт	Вариант	Мембраны				ЭР
		Плазмалемма	Тонопласт	Митохондрия		
				НМ	Кристы	
Луговской (резистентный)	- ЭПС	0,18±0,04	0,25±0,02	0,03±0,01	0,05±0,01	0,38±0,10
	+ ЭПС	0,07±0,02 (<i>p</i> < 0,05)	0,05±0,01 (<i>p</i> < 0,01)	0,22±0,08 (<i>p</i> = 0,02)	0	0,35±0,09 (<i>p</i> = 0,8)*
Лукьяновский (восприимчивый)	- ЭПС	0,08±0,01	0,13±0,03	0	0	0,17±0,06
	+ ЭПС	0,22±0,01 (<i>p</i> < 0,01)	0 (<i>p</i> < 0,01)	0,04±0,01	0,17±0,04 (<i>p</i> < 0,01)	0,16±0,04 (<i>p</i> > 0,8)*

Известно, что в клетках картофеля обоих сортов функционируют трансмембранная и растворимая аденилатциклазы (АЦ), причём, активность обеих АЦ в ответ на обработку корней растений ЭПС была многократно выше и возникала значительно раньше в клетках корней резистентного сорта, в отличие от активности АЦ восприимчивого сорта (Ломоватская и др., 2007). Следует добавить, что АЦ могут быть кальций-зависимыми ферментами, как это показано на вакуолях клеток столовой свеклы (Ломоватская и др., 2014). Кроме того, ранее на плазмалемме клеток картофеля тех же сортов были обнаружены рецепторы к ЭПС, проявляющие свойства элиситоров для устойчивого сорта, и супрессоров – для восприимчивого сорта. В литературе продемонстрирована интернализация рецепторов путём эндоцитоза совместно с сигнальным лигандом (Клячко, 2010) и, вероятно, с CNG каналами. Благодаря такому процессу, возможно, под воздействием ЭПС, в плазмалемме устойчивого сорта снижается количество CNG каналов, которые сбрасываются в вакуоль путем слияния эндосом с тонопластом. В клетках восприимчивого сорта возрастание количества CNG каналов на плазмалемме можно объяснить перемещением каналов из отдаленных участков плазматической мембраны к её фронтальным краям (путём направленного движения вдоль мембраны или обратным встраиванием в неё эндосом) для повышения эффективности восприятия рецепторами клетки внешнего сигнала тревоги. В отношении других мембран клеточных органелл, в частности митохондрий, считается доказанным, что наружная мембра-

на митохондрий как таковая не существует, фактически являясь протяжёнными и высокомолекулярными образованиями эндоплазматического ретикулума (ЭР), по тяжам которого передвигаются эти органеллы, обладающие только внутренней мембраной, представляющей собой кристы (Гамалей, 2006). В этом случае каналы в так называемой наружной мембране будут периодически появляться в нужном месте (при наличии стрессового сигнала) и исчезать (после прохождения сигнала вглубь клетки) по мере продвижения митохондрий внутри ЭР.

Таким образом, представленные результаты позволяют сделать вывод о том, что на плазмалемме и в мембранах клеточных органелл растений картофеля, вероятно, присутствуют активируемые циклическими нуклеотидами Ca^{2+} -каналы, локализация которых может количественно изменяться в ответ на биотический стресс.

Литература

Гамалей Ю.В. Подвижная сетевая организация пластид и митохондрий растительных клеток // Цитология. – 2006. – Т. 48 (4). – С. 271–282.

Клячко Н.Л. Сигналищие эндосомы и транспорт эндосом у растений // Физиология растений. – 2010. – Т. 57 (2). – С. 304–311.

Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Криволапова Н.В., Копытчук В.Н. Функционирование «растворимой» и связанной с мембраной форм аденилатциклазы в органеллах растительных клеток при биотическом стрессе // Биологические мембраны. – 2007. – Т. 24 (5). – С. 363–371.

Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Рыкун О.В. Влияние Ca^{2+} и H_2O_2 на изменение уровня сАМР в вакуолях клеток корнеплодов столовой свеклы при биотическом стрессе // Биологические мембраны. – 2014. – Т. 31 (3). – С. 194–203.

Романенко А.С., Ломоватская Л.А. Влияние экзополисахаридов бактериального возбудителя кольцевой гнили на субклеточную локализацию регулируемых циклическими нуклеотидами ионных каналов (CNGC) в клетках корней картофеля // Биологические мембраны. – 2017. – Т. 34. – С. 1–8.

Chin K., Moeder W., Yoshioka K. Biological roles of cyclic-nucleotide-gated ion channels in plants: What we know and don't know about this 20 member ion channel family // Botany. – 2009. – V. 87. – P. 668–677.

Kaplan B., Sherman T., Fromm H. Cyclic nucleotide-gated channels in plants // FEBS Lett. – 2007. – V. 581. – P. 2237–2246.

Romanenko A.S., Lomovatskaya L.A., Shafikova T.N., Borovskii G.B., Krivolapova N.V. Potato cell plasma membrane receptors to ring rot pathogen extracellular polysaccharides // J. Phytopathol. – 2003. – V. 151. – P. 1–6.

Ruiz M.L., London B., Nadal-Ginard B. Cloning and characterization of an olfactory cyclic nucleotide-gated channel expressed in mouse heart // J. Mol. Cell Cardiol. – 1996. – V. 28. – P. 1453–1461.

РЕМОЛДИНГ ГЕНОВ ТРАНСПОРТНЫХ РНК В МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОМАХ

Е.В. Романова¹, Ю.С. Букин¹, В.В. Алёшин², Д.Ю. Щербаков¹

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

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

Митохондриальные (мт) геномы большинства многоклеточных обычно содержат стандартный набор из генов 37 генов: 13 белок-кодирующих генов, 22 генов транспортных РНК (тРНК) и двух рибосомных генов. тРНК служат адаптером для перевода с нуклеотидной последовательности в аминокислотную, тем самым играя ключевую роль в процессе биосинтеза белка (Crick, 1958). 22 митохондриальных тРНК, достаточно, чтобы провести трансляцию всего мт генома, так как присутствие урацила в первой позиции антикодона (wobble position) позволяет распознавать любой из четырех нуклеотидов в третьей позиции кодона (Barrel et al., 1980). Тем не менее, в мт геномах разных организмов были замечены дополнительные копии генов тРНК. В некоторых случаях сходство первичных структур аллоакцепторных тРНК позволило предположить смену идентичности тРНК за счет мутаций в антикодоне. Это явление, названное впоследствии тРНК ремолдинг (tRNA remolding) (Cantatore et al., 1987), выявляет возможность эволюции тРНК генов независимо от их генетического кода.

Увеличение количества полных мт и ядерных геномов в базах данных, произошедшее, в том числе, благодаря широкому применению технологии высокопроизводительного секвенирования, позволило понять, что ремолдинг – весьма нередкое явление в мт геномах, менее часто происходящее в ядерных геномах (Rawlings et al., 2003, Rogers and Griffiths-Jones, 2014, Sahyoun, et al., 2015). Большинство случаев ремолдинга было выявлено в результате *in silico* анализа. Так ремолдинг показан у губок (Lavrov, Lang, 2005), насекомых (Jiang et al., 2016), моллюсков (Rawlings et al., 2003), членистоногих (Jiang et al., 2016) и других групп животных. Экспериментально были подтверждены случаи изменения генетического кода, вызванные мутациями в антикодоне тРНК гена в геноме *E.coli* (Saks et al., 1998), в ядерных геномах *Candida* (Bezerra et al., 2013), дрожжей (Mühlhausen et al., 2016), инфузорий (Heaphy et al., 2016), что доказало возможность функционирования дополнительных копий тРНК. Таким образом, корректная аннотация тРНК генов в геномах различных организмов исключительно важна в контексте исследования их эволюции и в виду возможного влияния на точность трансляции.

Недавно мы провели исследование мт геномов десяти видов амфипод из озера Байкал (Romanova et al., 2016). Для них характерна большая вариабельность по длине, порядку генов, а также наличие дополнительных копий генов тРНК в пяти из десяти видов (*Eulimnogammarus vittatus*, *Acanthogammarus victorii*, *Garjajewia cabanisii*, *Gmelinoides fasciatus* и *Pallaseopsis kesslerii*). Низкий процент сходства первичных последовательностей некоторых копий позволил предположить, что произошла смена идентичности тРНК за счет мутаций в антикодоне (тРНК ремолдинг). Мы провели исследование принадлежности дополнительных копий генов тРНК к определенному классу на основе анализа их первичной структуры. Был произведен анализ достоверности различий между распределениями попарных генетических дистанций в выборках изоакцепторных тРНК, содержащих разные копии удвоенных тРНК генов. В четырех из пяти случаях принадлежность удвоенного гена к группе тРНК генов, не соответствующей антикодону, была подтверждена с высокой степенью статистической значимости. Полученный результат (принадлежность к определенному классу тРНК генов) был

подтвержден также байесовским анализом на основе выравненных последовательностей всех генов тРНК из мт геномов байкальских амфипод с учетом вторичной структуры РНК. Таким образом, мы показали, что дополнительные копии в мт геноме *G. fasciatus*, первоначально идентифицированные по последовательности антикодона как принадлежащие валиновой и глутаминовой тРНК, обе являются гистидиновыми. В мт геноме *A. victorii* тРНК ген аспарагиновой кислоты также оказался геном гистидиновой тРНК. Дополнительная копия гена пролиновой тРНК в мт геноме *E. vittatus* была отнесена нами к классу генов лейциновых тРНК. Интересно, что мт геном вида *P. kesslerii* содержит дополнительную копию тРНК с четырьмя основаниями в антикодоне (квадруплетный антикодон), но по первичной структуре он показывает наибольшее сходство с геном триптофановой тРНК. В мт геноме *G. cabanisii* нами была подтверждена принадлежность обеих копий к лейциновым генам тРНК. Биоинформатический анализ тРНК генов позволил отделить случаи простого удвоения тРНК от случаев тРНК ремодлинга в мт геномах байкальских амфипод. Примечательно, что в данной группе видов в мт геномах присутствуют тРНК гены на разных стадиях своей эволюции, в том числе и тРНК с квадруплетным антикодом. Наиболее вероятно, что одна из двух копий со временем накопит замены и превратится в псевдоген, хотя существуют примеры функционирования дополнительных копий тРНК генов, приведшие к смене аминокислоты, узнаваемой тРНК (Sengupta and Higgs, 2015). Считается, что случаи удвоения тРНК генов и ремодлинга наблюдаются в геномах с повышенной скоростью мутирования (Sengupta and Higgs, 2015). Вероятно, условия среды в Байкале способствуют ускоренной эволюции мт геномов амфипод.

Литература

- Barrell B.G., Anderson S., Bankier A.T., de Bruijn M.H., Chen E., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J., Staden R., Young I.G. Different pattern of codon recognition by mammalian mitochondrial tRNAs // Proc Natl Acad Sci USA. – 1980. – V. 77(6). – P. 3164–3166.
- Cantatore, P., Gadaleta, M.N., Roberti, M., Saccone, C. and Wilson, A.C. Duplication and remoulding of tRNA genes during the evolutionary rearrangement of mitochondrial genomes // Nature. – 1987. – V. 329. – P. 853–855.
- Crick, F.H.C. On protein synthesis // Symp. Soc. Exp. Biol. – 1958. – V. 12. – P. 138–163.
- Jiang P., Li H., Song F., Cai Y., Wang J., Liu J., Cai W. Duplication and remolding of tRNA genes in the mitochondrial genome of *Reduvius tenebrosus* (Hemiptera: Reduviidae) // Int J Mol Sci. – 2016. – V. 17(6). pii: E951. doi: 10.3390/ijms17060951.
- Lavrov D.V., Lang B.F. Transfer RNA gene recruitment in mitochondrial DNA // Trends Genet. – 2005. – V. 21. – P. 129–133.
- Rawlings T.A., Collins T.M., Bieler R. Changing identities: tRNA duplication and remolding within animal mitochondrial genomes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – V. 100. – P. 15700–15705.
- Rogers HH, Griffiths-Jones S. tRNA anticodon shifts in eukaryotic genomes // RNA. – 2014. – V. 20 (3). – P. 269–281.
- Romanova E.V., Aleoshin V.V., Kamaltynov R.M., Mikhailov K.V., Logacheva M.D., Sirotinina E.A., Gornov A.Y., Anikin A.S., Sherbakov D.Y. Evolution of mitochondrial genomes in Baikalian amphipods // BMC Genomics. – 2016. – V. 17 (14). doi: 10.1186/s12864-016-3357-z.
- Sahyoun A.H., Hölzer M., Jühling F., Höner zu Siederdissen C., Al-Arab M., Tout K., Marz M., Middendorf M., Stadler P.F., Bernt M. Towards a comprehensive picture of alloacceptor tRNA remolding in metazoan mitochondrial genomes // Nucleic Acids Res. – 2015. – V. 43 (16). – P. 8044–8056.
- Sengupta S., Higgs P. Pathways of genetic code evolution in ancient and modern organisms // J Mol Evol. – 2015. – V. 80. – P. 229–243.

**ВЛИЯНИЕ ВОЗДУШНОЙ ЗАСУХИ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАБОТЫ
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ЯБЛОНИ СИБИРСКОЙ *MALUS
BACCATA (L.) BORKH.* В УСЛОВИЯХ ЗОНЫ КОНТАКТА ЛЕСА
И СТЕПИ СЕЛЕНГИНСКОЙ ДАУРИИ**

А.В. Рудиковский, Е.Г. Рудиковская, Л.В. Дударева
ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: rudikovalex@mail.ru; rudal69@mail.ru; lviss12@gmail.com

Эколого-физиологические исследования по изучению влияния засухи на древесные растения в экотонах лес–степь недостаточно представлены в литературе. В природных условиях абиотические стрессы, такие как засуха и повышенная температура, редко действуют отдельно, чаще – это сложный процесс, определяемый сочетанием этих факторов. При этом стрессирующие воздействия могут быть синергетическими, антагонистическими, может наблюдаться перекрывание наблюдаемых эффектов (Valladares and Pearcy, 1997). Один тип стрессовых воздействий в природных условиях может способствовать возникновению другого. Так закрытие устьиц уменьшает охлаждение листьев из-за испарения, что приводит к тепловому стрессу в результате увеличения температуры на 5° или 6 °С в зависимости от температуры воздуха. Увеличение температуры воздуха увеличивает дефицит давления паров воды (vapor pressure deficit), что усиливает эффект засухи (Will et al., 2013). Также степень закрытости устьиц увеличивается, если воздушная засуха сопровождается почвенной (Perez-Martin et al., 2009).

Способность растений к адаптации к различным условиям прямо или косвенно связана с пластичностью фотосинтеза, которая в сочетании с другими процессами, определяет рост и развитие растений и, в конечном итоге, успешное размножение. Как ключевой процесс первичного метаболизма, фотосинтез играет центральную роль в процессе адаптации растения к условиям засухи (Chaves et al., 2003, 2009).

Наше исследование включало: анализ фотосинтетических пигментов, изучение параметров флюоресценции хлорофилла, а также определение уровня ассимиляции углекислого газа в листьях яблони сибирской (*Malus baccata* L. Borkh), растущих в зоне контакта леса и степи Селенгинской Даурии (с. Ягодное) (Рудиковский и др., 2008) в условиях повышенной температуры и весенне-летней воздушной засухи. Экспериментальные растения были в достаточной степени обеспечены почвенной влагой, поступающей от протекающего вблизи ручья. Контрольными растениями служили деревья яблони сибирской, произрастающие в г. Иркутске.

Цель исследования заключалась в проверке гипотезы о том, что воздушная засуха приводит (1) к изменению содержания хлорофиллов и каротиноидов, (2) изменению эффективности работы ФС-2, (3) влияет на ассимиляцию углекислого газа.

Основной особенностью климата района исследований, Селенгинской Даурии, является его резкая континентальность: короткий вегетационный период – 100–130 дней; резкие колебания суточных и среднемесячных температур воздуха; майско-июньская засуха, снижающая урожай растений; высокая интенсивность солнечной радиации; недостаточное увлажнение и неравномерное выпадение осадков. Годовая сумма осадков в среднем течении Селенги – 210–250 мм, в июле-августе выпадает 80–90 %. Климат Иркутска в сравнении с Селенгинской Даурией менее континентальный. Он значительно смягчен водохранилищами Ангарского каскада. Среднегодовое количество осадков составляет 472 мм, из которых больше половины приходится на летний период.

Проведенный анализ полученных результатов показал, что содержание суммы хлорофиллов в листьях яблони сибирской возросло в июле в сравнении с июнем, что вполне согласуется с данными, представленными в литературе. При этом сумма хлорофиллов в июне и июле была меньше у деревьев природной популяции, растущих в окрестностях с. Ягодное. Не было отмечено достоверных различий в соотношении хлорофиллы/каротиноиды у деревьев в контрольных и опытных группах. В условиях высокой освещенности и вынужденного закрытия устьиц, листьям довольствуются меньшим количеством хлорофилла для протекания нормальных фотосинтетических процессов. Главным положительным следствием снижения содержания суммы хлорофиллов является уменьшение образования активных форм кислорода, оказывающих повреждающее действие на функционирование растительных клеток.

Анализ флуоресценции хлорофилла показал, что растения яблони сибирской, произрастающие в условиях зоны контакта леса и степи, несмотря на действие весенне-летней воздушной засухи, имеют вполне работоспособный фотосинтетический аппарат. Показатель F_0 не увеличен, максимальный фотохимический квантовый выход фотосистемы II (F_v/F_m) находится на достаточно высоком уровне, показатель R_{ABS} не показывает значительных отличий в сравнении с контрольными растениями. В целом влияние воздушной засухи на ФС2 приводит к уменьшению доли световой энергии, расходуемой на фотохимическую работу. В то же время увеличивается квантовый выход нефотохимического тушения флуоресценции $Y(NPQ)$, свидетельствующий о большем тепловом рассеивании поглощенной растениями световой энергии. Нефотохимическое рассеивание во всех фотосинтезирующих организмах тесно связано с регулированием эффективности фотосинтеза и защищает фотосинтетический аппарат в тех условиях, когда абсорбированная энергия превышает возможности растения для утилизации света. Негативное влияние неблагоприятных условий на ФС-2 листьев яблони в июне выявлялось в полуденные часы, когда температура воздуха в солнечный день достигала значений выше $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. При этом происходило уменьшение показателя F_v/F_m и индекса R_{ABS} . В этих условиях у деревьев увеличен показатель V_j , что свидетельствует об увеличении доли закрытых реакционных центров к их общему числу. У яблони сибирской, растущей в г. Иркутске, выше, по сравнению с природной популяцией, показатель F_v/F_0 , характеризующий способность антенных комплексов к захвату энергии и также большее значение показателя ET_0/TR_0 , говорящее о большей вероятности переноса электрона с $QA\sim$ в пул хинонов.

Данные о скорости ассимиляции углекислого газа свидетельствуют о значительных различиях между контрольным и опытными вариантами, обусловленных условиями окружающей среды. В утренние часы яблоня, растущая в Иркутске, ассимилирует углекислый газ более интенсивно. Это объясняется прежде всего наличием влаги в почве и более высокой влажностью воздуха, что позволяет держать устьица открытыми, обеспечивая необходимое поступление углекислого газа к сайтам карбоксилирования. Пониженная влажность воздуха в опытном варианте приводило к тому, что для снижения неоправданно большой потери воды в листьях яблони более чем в два раза снижалась проводимость устьиц для паров воды и транспирация. Все это приводило, в конечном счете, к уменьшению скорости ассимиляции углекислоты более чем на 27 % в сравнении с контрольным вариантом (г. Иркутск). Наличие механизмов, направленных на оптимизацию водопотребления (закрывание устьиц и, следовательно, уменьшение их проводимости) приводило к тому, что коэффициент использования воды в процессах фотосинтеза у природных растений, был более чем на 42 % выше, чем у контрольных.

Таким образом, показано, что под влиянием специфических условий зоны контакта леса и степи у растений яблони сибирской происходят адаптация фотосинтетического аппарата. В первую очередь уменьшалось содержание суммы хлорофиллов в листьях. В условиях высокой освещенности и вынужденного закрытия устьиц, листьям ста-

новится достаточно меньшего количества хлорофилла для протекания нормальных фотосинтетических процессов. В целом воздушная засуха уменьшала долю световой энергии, расходуемой на фотохимическую работу. В то же время увеличивался квантовый выход нефотохимического тушения флуоресценции $Y(NPQ)$, свидетельствующий о большем тепловом рассеивании поглощенной растениями световой энергии. Повышение температуры (свыше 25 °C) на фоне пониженной влажности воздуха в полуденное и послеполуденное время неблагоприятно воздействовало на ФС-2 яблони сибирской, вызывая незначительное снижение показателя сопряженности F_v/F_m (фотоингибирование) и снижение эффективности фотосинтеза (P_{ABS}). Пониженная влажность воздуха приводит к значительному (более чем в два раза) снижению проводимости устьиц для паров воды и транспирации. В конечном счете это приводило к уменьшению скорости ассимиляции углекислоты более чем на 27% в сравнении с контрольным вариантом (г. Иркутск).

Исследования выполнены при финансовой поддержке СО РАН, интеграционный проект № 105.

Литература

Chaves M.M., Maroco J.P., Pereira J.S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant // *Functional Plant Biology*. – 2003. – Vol. 30. – P. 239–264.

Chaves M.M., Flexas J., Pinheiro C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell // *Annals of Botany*. – 2009. – Vol. 103, N 4. – P. 551–560.

Perez-Martin A., Flexas J., Ribas-Carbo M., Bota J., Tomas M., Infante J.M., Diaz-Espejo A. Interactive effects of soil water deficit and air vapour pressure deficit on mesophyll conductance to CO₂ in *Vitis vinifera* and *Olea europaea* // *Journal of Experimental Botany*. – 2009. – Vol. 60, N 8. – P. 2391–2405.

Valladares, F. Pearcy, R.W. Interactions between water stress, sunshade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia* // *Plant, Cell and Environment*. – 1997. – Vol. 20, N 1. – P. 25–36.

Will R.E., Wilson S.M., Zou C.B. Hennessey T.C. Increased vapor pressure deficit due to higher temperature leads to greater transpiration and faster mortality during drought for tree seedlings common to the forest–grassland ecotone // *New Phytology*. – 2013. – Vol. 200, N 2. – P. 366–374.

Рудиковский А.В., Рудиковская Е.Г., Дударева Л.В., Кузнецова Е.В. Уникальные и редкие формы яблони сибирской Селенгинского района Бурятии // *Сибирский экологический журнал*. – 2008. – N 2. – С. 327–333.

ОСОБЕННОСТИ АНТИГЕН-АНТИТЕЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ У РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА (ВПЧ) ПРИ ЯДЕРНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ

Р.К. Салаяев¹, Н.И. Рекославская^{1,2}, А.С. Столбиков¹

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

²ФГБУН Иркутский научный центр СО РАН, Иркутск

В настоящее время наблюдается широкое распространение различных папилломатозов: от сравнительно безвредных "бородавок на ножке", имеющих почти у каждого человека, до высокоонкогенных ВПЧ, вызывающих раковые опухоли. Выявлено около 200 типов ВПЧ, почти 40 из которых являются высокоонкогенными. Низкоонкогенные ВПЧ могут также вызывать весьма неприятные заболевания типа аногенитальных папилломатозов (скопления остроконечных кондилом) с достаточно серьезными последствиями.

При разработке четырёхкомпонентной пероральной вакцины против цервикального рака, создаваемой на базе растительных экспрессионных систем, мы обнаружили необычные антиген-антителные взаимодействия, заключающиеся в том, что антитела к высокоонкогенному типу вируса ВПЧ 16 способны взаимодействовать не только со "своими" антигенами ВПЧ16 L1, но и с некоторыми другими антигенами ВПЧ, вызывающими цервикальный рак. Оказалось, что антитела к ВПЧ16 L1 способны активно реагировать ещё и с антигенами ВПЧ18 L1, ВПЧ31 L1 и ВПЧ45 L1, также принадлежащими к семейству высокоонкогенных ВПЧ. Этот факт позволил предположить о более широком (не строго специфичном) перекрестном антиген - антителном взаимодействии между четырьмя типами высокоонкогенных ВПЧ.

Более глубокое изучение перекрестного взаимодействия специально поставленными экспериментами с использованием иммуноферментного анализа, а также методами вестерн-блот-гибридизации подтвердили наличие обнаруженного ранее перекрестного антиген-антителного взаимодействия между ВПЧ16, ВПЧ18, ВПЧ31 и ВПЧ45 типами онкогенных вирусов папилломы человека.

Иммуноферментный анализ проводили (рис. 1), определяя содержание антигенных белков всех четырёх типов вирусов в экстрактах лиофилизированных плодов томата, предварительно генетически трансформированных методом *in fructo* суспензиями *A.tumefaciens* с генетическими конструкциями pBINHPV16 L1, pBINHPV18 L1, pBINHPV31 L1 и pBINHPV45 L1.

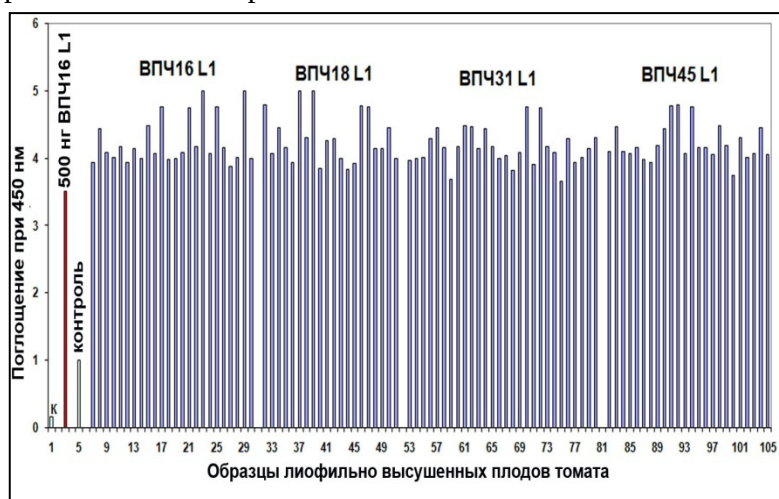


Рис. 1. ИФА содержания антигенных белков ВПЧ:

16 L1, 18 L1, 31 L1 и 45 L1 в экстрактах лиофильно высушенных плодов трансгенного томата. К – отрицательный контроль, 500 нгHPV16 L1 – положительный контроль стандарта, контроль – нетрансформированные плоды, 6–105 – экстракты образцы индивидуальных плодов трансгенного томата. Первичные антитела –

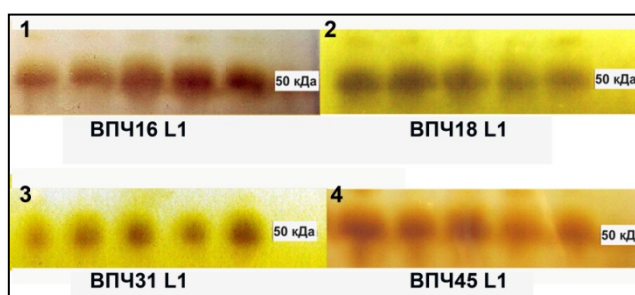
сыворотка крови мышей, вакцинированных ВПЧ16 L1. Вторичные антитела – конъюгат с пероксидазой, субстрат – ТМВ.

При анализах в качестве первичных антител использовали сыворотку крови мышей, перорально вакцинированных лиофилизированным вакцинным материалом плодов томата, трансгенных по ВПЧ16 L1. Вторичные антитела - конъюгат с пероксидазой хрена, субстрат – тетраметилбензидин (ТМБ). Результаты ИФА показали (рис. 1), что содержание антигенных белков ВПЧ16 L1, ВПЧ18 L1, ВПЧ31 L1 и ВПЧ45 L1 при использовании первичных антител к ВПЧ16 L1 было достаточно высоким, отличалось униформностью и в пересчете на общий растворимый белок (ОРБ) составило 25–27 мкг/мг ОРБ.

Электрофоретические исследования подтвердили установленное иммуноферментным анализом активное взаимодействие антител к ВПЧ16 L1 с антигенами ВПЧ16 L1, ВПЧ18 L1, ВПЧ31 L1 и ВПЧ45 L1 (рис. 2). То есть двумя независимыми методами было подтверждено перекрестное взаимодействие антигенных белков L1 всех четырех типов онкогенных папилломавирусов с антителами против ВПЧ16 сыворотки крови мышей, предварительно перорально вакцинированных антигенным белком ВПЧ16 L1.

Рис. 2. ДСН электрофорез и вестерн-блот-гибридизация экстрактов плодов томата с ВПЧ четырех типов: 16 L1 (1), 18 L1 (2), 31 L1 (3) и 45 L1 (4).

Первичные антитела – сыворотка крови мышей, вакцинированных ВПЧ16 L1, вторичные антитела – конъюгат с пероксидазой, субстрат – ортофенилендиамин.



Поскольку обнаруженные результаты относились к перекрестному взаимодействию между антителами и антигенами четырех типов вируса, относящихся к одному семейству вирусов, вызывающих цервикальный рак, представляло интерес проверить, будет ли подобное взаимодействие наблюдаться между антителами и антигенами "неродственных" групп папилломавирусов, вызывающих другие заболевания. Для выяснения этого вопроса были взяты, как и ранее, антитела к вирусу ВПЧ16, вызывающего цервикальный рак, а антигены использовались от совершенно другого типа папилломавируса ВПЧ6, вызывающего аногенитальные папилломатозы (так называемые остроконечные кондиломы).

Был разработан дизайн генетической конструкции с целевым геном ВПЧ6 L1 (рис. 3), осуществлен её синтез, проведена генетическая трансформация плодов томата и получен вакцинный материал с антигенами ВПЧ6 L1. Антителами в этом случае служила сыворотка крови мышей к антигенам ВПЧ16 L1 (рис. 4).

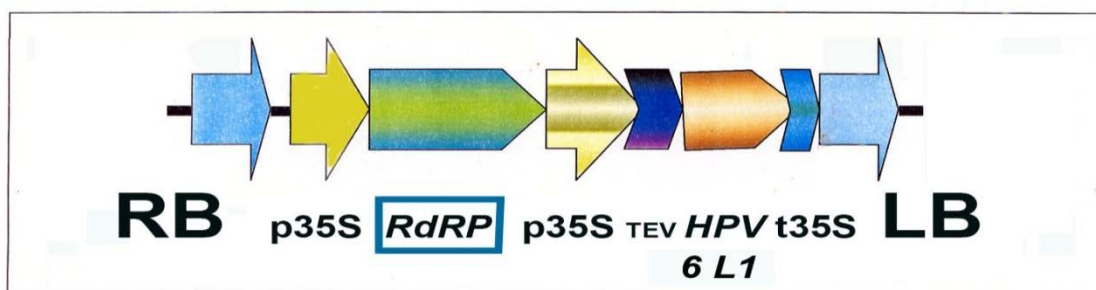


Рис. 3. Дизайн генетической конструкции ВПЧ6 L1.

RB и LB – левая и правая границы ТДНК *A.tumefaciens*, p35S – промотор гена РНКвируса CaMV (использованы некомплементарные последовательности для генов RdRP и ВПЧ6 L1), RdRP – ген, кодирующий репликазу ВТМ, TEV – 5' НТО лидера вируса гравировки листьев табака, HPV6 L1 – ген, кодирующий белок оболочки вируса ВПЧ6 L1 аногенитального типа, t35S – последовательность терминатора вируса CaMV.

Из рис. 4 видно, что в результате иммуноферментного анализа получен высокий выход антигенного белка ВПЧ6L1 при использовании в качестве первичных антител сыворотки крови мышей, предварительно вакцинированных перорально ВПЧ16 L1.

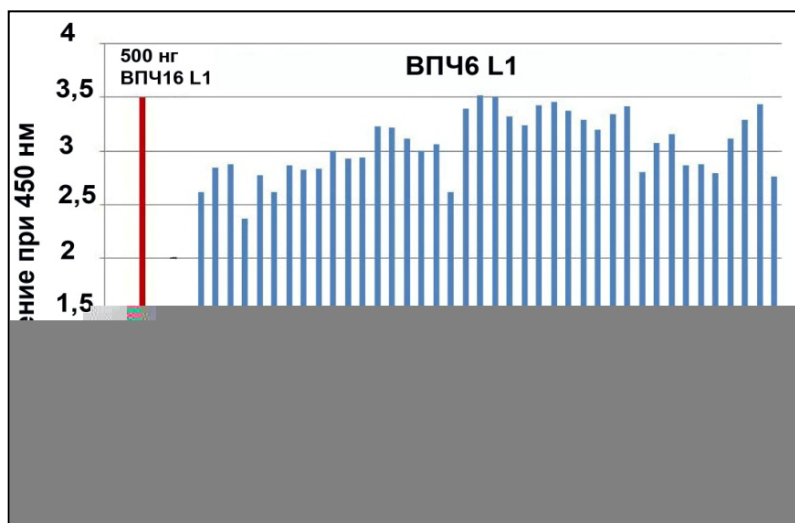


Рис. 4. ИФА содержания антигенного белка ВПЧ6 L1 в экстрактах высушенных плодов трансгенного томата.

1 – К – отрицательный контроль, 2 – 500 нг HPV16 L1 – положительный контроль стандарта, 3 – контроль – не трансформированные плоды, 4–42 – экстракты образцы индивидуальных плодов трансгенного томата. Первичные

антитела – сыворотка крови мышей, вакцинированных ВПЧ16 L1. Вторичные антитела – конъюгат с пероксидазой, субстрат – ТМВ.

Для проверки изучали вестерн-блоттингом антиген-антительное взаимодействие между "неродственными" типами папилломавирусов ВПЧ16 и ВПЧ6 (рис. 5). В итоге были получены результаты, однозначно подтверждающие перекрестный тип антиген-антительного взаимодействия между антигенами ВПЧ6 L1 и антителами к ВПЧ16 L1.

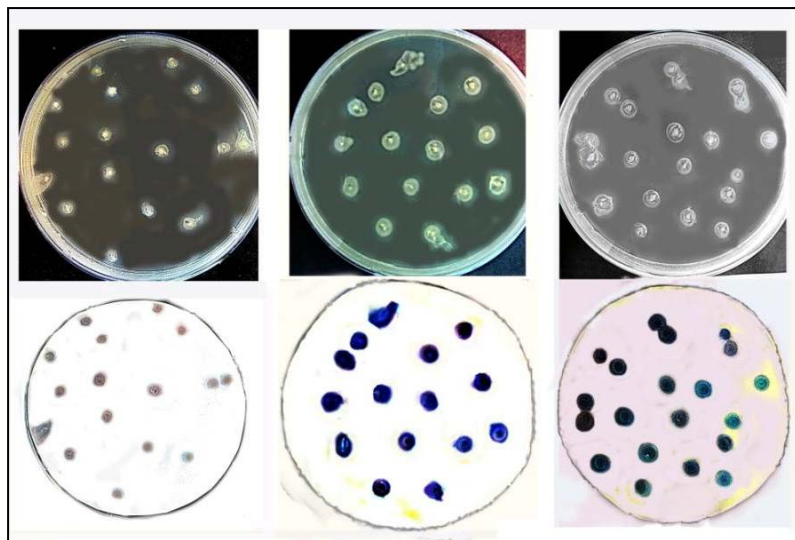


Рис. 5. Колонии *E. coli* BL21 с pUC57 HPV6 L1 (вверху), выросшие на среде LB с 50 мг/л ампициллина и вестерн-блот-гибридизации с антителами (внизу):

Слева – стандартные антитела к HPV16 L1 фирмы Santa Cruz Biotechnology (США), посередине – антитела сыворотки крови мышей, перорально вакцинированных плодами трансгенного томата

с HPV16 L1, справа - маркерные стандартные антитела к фрагменту теломеразы *smc-tag*, включенному в конструкцию. Вторичные антитела – конъюгат с щелочной фосфатазой, субстрат - 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат и нитротетразолий синий.

Таким образом, в настоящей работе было показано, что антитела против антигенного белка ВПЧ16 L1 могут перекрестно узнавать антигенные белки ВПЧ18 L1, ВПЧ31 L1 и ВПЧ45 L1. Кроме того, получены новые данные о том, что такое перекрестное взаимодействие между антигенами и антителами может возникать и между отдалёнными семействами вирусов, такими как ВПЧ16 (цервикальный рак) и ВПЧ6 (аногени- тальные папилломатозы).

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПОРЯДКА МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ У БАЙКАЛЬСКИХ АМФИПОД

Е.А. Сиротинина¹, Е.В. Романова², Д.Ю. Щербаков²

¹ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет,
Иркутск, e-mail: haleo.inc@gmail.com

²ФГБУН Лимнологический институт СО РАН, Иркутск,
e-mail: ERA_85@inbox.ru; dysh007@gmail.com

Порядки организации генов в полногеномных митохондриальных картах амфипод являются одними из наиболее разнообразных среди Crustacea и Arthropoda. Особенно высокой изменчивостью отличаются генетические карты у байкальских видов, где не наблюдается полностью идентичного порядка генов даже внутри одного семейства (например, Eulimnogammaridae), и представленных, в случае отдельных семейств, новыми уникальными порядками генов, совершенно не схожими даже между собой (Romanova, 2016).

Чтобы оценить произошедшие изменения в митохондриальных геномах у этих видов и их направление пошагово, мы попарно в различных комбинациях проанализировали 13 полных митохондриальных геномов байкальских видов (включая недавно собранные и аннотированные полные митохондриальные геномы видов *G.lacustris* и *M.branickii*), а также 5 небайкальских видов амфипод, то есть всего 18 полных митохондриальных геномов. Все митохондриальные геномы были секвенированы NGS-методом на платформе Illumina 1.9, собраны и аннотированы при помощи пайплайна биоинформатических инструментов (Bernt, 2013; Bankevich, 2012). За контроль взяли генетическую карту митохондриального генома, общую для всех ракообразных (Pan-crustacean ground pattern), с которой сравнивали порядки генов каждого вида (Kilpert, 2006), отмечая различия и их значение как индивидуально для вида, так и для всех видов внутри филогрупп амфипод, выделяя общие события в признаки, вероятно, характерные для всей группы или семейства. Особый интерес представляет группа семейства Micturorodidae, поскольку именно в этой группе наблюдаются наиболее обширные перестановки, и картина изменений не универсальна для входящих в нее видов.

Мы проводили расчеты методами общих интервалов, построив деревья на основе устойчивых общих интервалов при помощи программы CREx (Common Interval Rearrangement Explorer) (Bernt, 2007), что позволило сначала определить и оценить последовательность определенного набора генов в целом как общий интервал для двух имеющихся порядков генов (независимо от их реального точного порядка), обозначив в целом некоторую функциональную связь этих блоков генов и их сохранность в эволюции, а затем упростить реконструкцию (Bernt, 2007; Perseke, 2008). Преимущество данного метода – возможность пошагово оценить произошедшие изменения в порядке генов и определить направление, в котором реконструкция более вероятна, т.к. предсказанное оптимальным путем событие требует меньше затрат эволюционного времени и энергии.

Данным методом мы успешно реконструировали возможные сценарии генных перестановок. 5 возможных сценариев включали в себя такие общие механизмы их возникновения, как случайная дупликация и потеря блоков генов (TDRL), инверсная TDRL (iTDRL), единичная транспозиция, единичная инверсия кодирующей цепи и единичная инверсная транспозиция (Xia, 2016; Jühling, 2012). Оценивали количество каждого типа перестановок у выборки амфипод и назначили цену события перестановки гена (k), т. к. в одном случае могли быть затронуты только блоки tРНК генов или отдельные tРНК, а в другом – протяженные блоки генов, включая многие белок-

кодирующие гены. Установленные уровни и вес перестановок обозначили на филогенетическом дереве, построенном в MrBayes v3.1 по транслированным нуклеотидным последовательностям 13 белок-кодирующих генов мтДНК с моделью нуклеотидных замен GTR+I+T.

Результат анализа сценариев генных перестановок хорошо согласуется с филогенетическим деревом и подтверждает гипотезу о неоднократном вселении в озеро Байкал предка амфиподной фауны (Romanova, 2016), поскольку по количеству и характеру перестановок среди байкальских видов можно выделить 2 группы – более молодую группу Eulimnogammaridae-Acanthogammaridae с большим количеством ($k = 7$) простых одношаговых перестановок, в основном, в результате транспозиций отдельных тРНК, и древнюю группу Micrurapadidae с относительно небольшим количеством комплексных перестановок (от $k = 3$ до 6), геномы которых, вероятно, изменили порядок генов посредством происходившей неоднократно дупликации и случайной потери блоков генов (2–3 события TDRL на геном) и инверсий, причем у всех видов этой группы. Возможно, что на возникновение инверсий кодирующей цепи мтДНК оказали влияние события меж- или внутримолекулярной рекомбинации.

Подобные механизмы изменения порядка генов и отдельные схожие перестановки блоков обнаружены у более ранних ветвей небайкальских амфипод, что подтверждает древний возраст группы Micrurapadidae и ее близость к общему небайкальскому предку, с той особенностью, что Micrurapadidae демонстрируют, вероятно, гораздо большую скорость накопления и фиксации изменений в генетической организации при их меньшем количестве и сопоставимой сложности механизмов образования ($k = 7-8$ у небайкальских амфипод и $k = 3-5$ у Micrurapadidae). Установили, что для вида *L.vortex* внутри группы Micrurapadidae сложность и количество перестановок – наименьшее из всех исследованных амфипод. Генетическая карта *L.vortex* представляет собой, вероятно, наиболее близкое к предковому состоянию организации генома с $k=3$ простого типа (необходимо всего 2 транзиции тРНК и 1 обратная транзиция тРНК для превращения его генетической карты в карту базального предка), что может указывать на возможное неизмененное состояние предка этой группы, другие потомки которого лишь в ходе эволюции в озере Байкал претерпели обширные и относительно быстрые перестановки генов. Также это может говорить в пользу оценки возраста вида *L.vortex* как значительно более молодого относительно других видов семейства Micrurapadidae. Факт наличия среди этого древнего семейства амфипод вида с генетической картой, настолько близкой к “оригиналу” и лишенной присущих его близким родственникам серьезных изменений является важной подсказкой, фокусируя внимание на этой группе и открывая возможности для поиска объяснения причин и механизмов, задействованных в столь беспрецедентно быстрых изменениях.

При аннотации событий перестановок на дереве MrBayes наиболее мобильные гены тРНК вынесли к общим узлам дерева в точках, где произошли данные смещения в генетических картах, что позволило отметить последовательность и иерархию их перемещений в геномах в ходе эволюции. Данную аннотацию проводили вручную, визуально сравнивая все схемы митохондриальных геномов амфипод между собой и предковым порядком генов (Pancrustacean ground pattern), учитывая данные анализа филогенетического дерева. Также мы отметили узлы и ветви дерева, в которых произошли ряд дупликаций и переназначений (ремолдинга) отдельных тРНК. Так, у группы Acanthogammaridae-Eulimnogammaridae в настоящий момент времени наблюдается текущий процесс дупликаций и ремолдинга для гена *trnL1*. У вида *G.cabanisii* внутри этой клады единично дублированный ген *trnL1-2* еще не прошел процесс ремолдинга в, вероятно, ген *trnP2*, как это произошло у находящегося в этой же кладе вида *E.vittatus*, что делает копию *trnL1* у *G.cabanisii* «горячей точкой» данной перестановки, поскольку в остальных геномах этот ген уже подвергся модификации. Также, в группе Gammaroidea-Eulimnogammaridae происходит аналогичный процесс для гена *trnH* (произошла его

единичная дупликация и ремолдинг в ген *trnD2*), и при этом наблюдается случайная потеря оригинальной *trnD1* и ее вставка в локус вблизи области контрольного региона, что показывает наличие более сложных механизмов у группы *Acanthogammaridae*.

Все возникшие единичные копии, как и TDRL-блоки генов, в основном, находятся в геномах вблизи контрольных регионов, также являющихся «горячей точкой» для возникновения перестановок. Анализируя небольшие имеющиеся некодирующие участки, а также данные области, выявили наличие тандемных повторов, микросателлитных повторов и ряд псевдогенов тРНК и частей белок-кодирующих генов, в отдельных случаях могущих являться остатками от удаленных ранее из генома копий блоков генов в результате TDRL (что характерно для других таксонов ракообразных (Kilpert, 2006) и также других таксонов организмов, в т. ч. позвоночных).

Вероятным представляется наличие в окружающей среде озера Байкал особых условий, влияющих на скорость и характер возникновения генных перестановок у амфипод, хотя в настоящий момент неизвестно, каким образом и в какой степени данная группа организмов может отвечать на воздействие подобных факторов (Газиев, 2010).

Литература

- Газиев А.И., Шайхаев Г.О. Ядерно-митохондриальные псевдогены // Молекулярная биология. – 2010. – Т. 44 (3). – С. 405–417.
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing // Journal of Computational Biology. – 2012.
- Bernt M., Donath A., Jühling F., Externbrink F. MITOS: Improved de novo Metazoan Mitochondrial Genome Annotation // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2013. – V. 69 (2). – P. 313–319.
- Bernt M., Merkle D., Ramsch K., Fritzsch G. CREx: Inferring Genomic Rearrangements Based on Common Intervals // Bioinformatics. – 2007. – V. 23 (21). – P. 2957–2958.
- Jühling F., Pütz J., Bernt M., Donath A. Improved systematic tRNA gene annotation allows new insights into the evolution of mitochondrial tRNA structures and into the mechanisms of mitochondrial genome rearrangements // Nucleic Acids Res. – 2012. – V. 40 (7). – P. 2833–2845.
- Kilpert F., Podsiadlowski L. The complete mitochondrial genome of the common sea slater, *Ligia oceanica* (Crustacea, Isopoda) bears a novel gene order and unusual control region features // BMC Genomics. – 2006. – V. 7. – P. 241.
- Perseke M., Fritzsch G., Ramsch K., Bernt M. Evolution of Mitochondrial Gene Orders in Echinoderms // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2008. – V. 47 (2). – P. 855–864.
- Romanova E.V., Aleoshin V.V., Kamaltynov R.M., Mikhailov K.V. Evolution of mitochondrial genomes in Baikalian amphipods // BMC Genomics. – 2016. – V. 17 (14). – P. 1016.
- Xia Y., Zheng Y., Murphy R.W., Zeng X. Intraspecific rearrangement of mitochondrial genome suggests the prevalence of the tandem duplication-random loss (TDLR) mechanism in *Quasipaa boulengeri* // BMC Genomics. – 2016. – V. 17. – P. 965.

УЧАСТИЕ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ В РАБОТЕ ВАКУОЛЯРНЫХ ПРОТОННЫХ ПОМП

Е.В. Спиридонова, И.С. Нестеркина, В.В. Гурина, Н.В. Озолина
ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: yatakol@mail.ru

Оксид азота (NO), монооксид углерода (CO) и сульфид водорода (H₂S) в настоящее время относят к газотрансмиттерам, которые представляют собой эндогенные газовые сигнальные молекулы. Все они имеют низкий молекулярный вес и обладают липофильными свойствами (Wang, 2002). Важная роль оксида азота и монооксида углерода, в протекании биохимических процессов, в клетке была показана многими исследователями, в то время как изучением сульфида водорода занялись сравнительно недавно (Christou et al., 2013). На сегодняшний день уже известны пути биосинтеза этих соединений в клетке и молекулярные механизмы их действия, однако основная часть этих знаний получена на животных объектах (Новицкий и др., 2011; Gusakova et al., 2017). Не смотря на это, появляется все больше работ по изучению влияния газотрансмиттеров на метаболические процессы растительной клетки. Уже известно, что они принимают участие в регуляции многих процессов протекающих в клетке, в том числе при действии стрессов (Besson-Bard et al., 2008; He, He 2014; Jin, Pei, 2015). Однако до сих пор в литературе недостаточно информации по участию исследуемых газотрансмиттеров в транспортных процессах на биологических мембранах, особенно связанных с протонными помпами (H⁺-АТФазой и H⁺-пирофосфатазой). Известно, что в присутствии сульфида водорода наблюдалось снижение токсического действия алюминия на проростки ячменя благодаря увеличению активности H⁺-АТФазы плазмалеммы (Dawood et al., 2012). Оксид азота в свою очередь способствовал увеличению экспрессии генов H⁺-АТФазы плазмалеммы и субъединицы с вакуолярной H⁺-АТФазы в условиях солевого стресса (Chen et al., 2013). Также показано, что присутствие алюминия приводило к увеличению активности митохондриальной H⁺-АТФазы (He et al., 2006). Кроме того, экзогенный оксид азота индуцировал активность H⁺-АТФазы и H⁺-пирофосфатазы плазмалеммы и тонопласта смягчая тем самым ингибирование роста растений томата вызванное медью (H. Siddiqui et al., 2011). Могут ли известные нам газотрансмиттеры оказывать регуляторное влияние на протонтранспортирующие системы вакуолярной мембраны еще предстоит установить. Работы в этом направлении ведутся, например, было выяснено, что оксид азота увеличивает активность протонных помп тонопласта в условиях солевого стресса (Zhang et al., 2006, Shi et al., 2007).

В наших исследованиях изучалось влияние экзогенных доноров NO, CO и H₂S на активность вакуолярных протонных помп (H⁺-АТФазы и H⁺-пирофосфатазы) в условиях окислительного стресса. H⁺-АТФаза и H⁺-пирофосфатаза важные компоненты вакуолярной мембраны создающие протонный и электрохимический градиент необходимый для вторичного активного транспорта (Silva et al., 2009). Было интересно посмотреть, как поведут себя протонные помпы в присутствии газотрансмиттеров и смогут ли они смягчить влияние условий окислительного стресса на растительные клетки. Результаты проведенных экспериментов показали, что в нормальных условиях газотрансмиттеры не оказывали значимого влияния на работу как H⁺-АТФазы, так и H⁺-пирофосфатазы. Уровень транспортной активности этих ферментов практически не отклонялся от нормы. Другая картина наблюдалась в условиях окислительного стресса, который создавали при помощи пероксида водорода в концентрации 50 мМ. Интересно отметить, что транспортная активность H⁺-АТФазы при этом стрессовом воздействии снижалась на 55,3% в то время как активность H⁺-пирофосфатазы изменялась не существенно. Воз-

можно в данной ситуации, пероксид водорода оказывал непосредственное влияние на сульфгидрильные группы периферического комплекса АТФ-зависимого фермента, что и приводило к снижению его активности (Seidel et al., 2012). При добавлении газотрансмиттеров на фоне стрессового воздействия происходило увеличение протон-транслоцирующей активности H^+ -АТФазы, но она не восстанавливалась полностью. Наблюдаемое увеличение отмечалось только для оксида азота и сульфида водорода, монооксид углерода наоборот усиливал негативное действие пероксида водорода.

По итогам выполненного исследования, можно сказать, что газотрансмиттеры принимают участие в снижении воздействия окислительного стресса на транспортные процессы протекающие в растительной клетке за счет изменения активности вакуолярной H^+ -АТФазы.

Литература

- Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Старикова Е.Г., Таширева Л.А. Регуляция апоптоза клеток с использованием газовых трансмиттеров (оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода) // Вестник науки Сибири. – 2011. – Т. 1 – С. 635–649.
- Besson-Bard A., Pigun A., Wendehenne D. New insights into nitric oxide signaling in plants Annu // Rev. Plant Biol. – 2008. – V. 59. – P. 21–39.
- Chen J., Xiong D-Y., Wang W-H., Hu W-J., Simon M., Xiao Q., Chen J., Liu T-W., Liu X., Zheng H-L. Nitric oxide mediates root K^+ / Na^+ balance in a mangrove plant, *Kandelia obovata*, by enhancing the expression of AKT1-type K^+ channel and Na^+ / H^+ antiporter under high salinity // PLOS ONE. – 2013. – V. 8. – e71543.
- Christou A., A. Manganaris G., Papadopoulos I., Fotopoulos V. Hydrogen sulfide induces systemic tolerance to salinity and non-ionic osmotic stress in strawberry plants through modification of reactive species biosynthesis and transcriptional regulation of multiple defence pathways // Experimental Botany. – 2013. – V. 64. – P. 1953–1966.
- Dawood M., Cao F., Jahangir M.M., Zhang G., Wu F. Alleviation of aluminum toxicity by hydrogen sulfide is related to elevated ATPase, and suppressed aluminum uptake and oxidative stress in barley // J Hazard Mater. – 2012. – V. 30. – P. 209–210.
- Gusakova S.V., Smaglyi L.V., Birulina Y.G., Kovalev I.V., Nosarev V., Petrova I.V., Reutov V.P. Molecular mechanisms of action of gas transmitters NO, CO and H_2S in smooth muscle cells and effect of NO-generating compounds (nitrates and nitrites) on average life expectancy // Usp Fiziol Nauk. – 2017. – V. 48 (1). – P. 24–52.
- H. Siddiqui M., H. Al-Whaibi M., O. Basalah M. Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress // Protoplasma. – 2011. – V. 248. – P. 447–455.
- He H., He L. The role of carbon monoxide signaling in the responses of plants to abiotic stress // Nitric oxide. – 2014. – V. 42. – P. 40–43.
- He H.Y., He L.F., Li X.F., Gu M.H. Effects of sodium nitroprusside on mitochondrial function of rye and wheat root tip under aluminum stress // Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Bao. – 2006. – V. 32 (2). – P. 239–44.
- Jin Z., Rei Y. Physiological implications of hydrogen sulfide in plants: pleasant exploration behind its unpleasant odour // Oxid Med Cell Longev. – 2015. – V. 2015. – P. 397502.
- Seidel T., Scholl S., Krebs M., Rienmuller F., Marten I., Hedrich R., Hanitzsch M., Janetzki P., Dietz K.-J., Schumacher K. Regulation of the V-type ATPase by redox modulation // Biochem. J. – 2012. – V. 448. – P. 243–251.
- Shi Q., Ding F., Wang X., Wei M. Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress // Plant Physiol. Biochem. – 2007. – V. 45. – P. 542–550.
- Silva P., Geros H. Regulation by salt of vacuolar H^+ -ATPase and H^+ -pyrophosphatase activities and Na^+ / H^+ exchange // Plant Signaling and Behavior. – 2009. – V. 4 (8). – P. 718–726.
- Wang K. Two's company, three's a crowd: can H_2S be third endogenous gaseous transmitter? // FASEB J. – 2002. – V. 16. – P. 1792–1798.
- Zhang Y., Wang L., Liu Y., Zhang Q., Wei Q., Zhang W. Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na^+ / H^+ antiport in the tonoplast // Planta. – 2006. – V. 224. – P. 545–555.

ЯДЕРНЫЙ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ГЕНОМЫ ПТИЦ: МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ – ГОМОЛОГИЧНАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ

Л.Н. Спиридонова

ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, Владивосток, e-mail: spiridonova@biosoil.ru

Обмен генетической информацией между клеточными органеллами и ядром считается общим феноменом для всех эукариот (Сингер и др., 1998). Факты переноса митохондриальной (мт)ДНК в ядерный геном известны (Lopez et al., 1994; Podnar et al., 2007; и др.), однако механизм переноса оставался не описанным. В настоящее время способы перемещения и интеграции ДНК между митохондриями и ядром широко изучаются *in vitro* (Weber-Lotfi, 2015; Константинов, 2016; и др.). Ядерные копии мт-генов (NUMT) выявлены у разных групп организмов, но факты обратной симметрии, то есть внедрения последовательностей ядерной (я)ДНК в митохондриальный геном ранее до наших исследований не были известны. В природных популяциях детектировать сам процесс взаимодействия и обмен генетическим материалом между двумя органеллами клетки – ядром и митохондриями – практически невозможно как иногда по причине высокого сходства ДНК этих органелл, так и, наоборот, по глубокой дивергенции паралогов мтДНК до неузнаваемости, связанной с рекомбинационными и другими (мутационными и пр.) процессами в ядерном геноме. Однако последствий гомологичных межгеномных взаимодействий (гомологичной рекомбинации) в природе оказывается не так уж мало (Спиридонова и др., 2016; Спиридонова и др., 2017; неопубл. данные).

Анализ филогеографии гена *cyt b* мтДНК соловья-красношейки *Calliope calliope* (Pallas, 1776) выявил глубокую дивергенцию подвидоспецифичных мт-гаплотипов ($D = 0,16$) (Спиридонова и др., 2013), в несколько раз превышающую среднее внутривидовое значение по этому маркеру для других представителей отряда Passeriformes ($D = 0,04$) (Guo et al., 2004). Наши дальнейшие исследования мтДНК и ее ядерных копий позволили рассмотреть гипотезу взаимодействия между я- и мтДНК путем обычной гомологичной рекомбинации и установить источник новых вариантов мт-гаплотипов – ядерные копии мтДНК (Спиридонова и др., 2016). Присутствие ядерных копий мтДНК у каждого из подвидов соловья-красношейки, сходных с мт-гаплотипом другого подвида, косвенно указывает на прошедший генетический обмен между ядерным и митохондриальным геномами. Еще более удивительным оказалось присутствие у некоторых особей *C. calliope* варианта NUMT, гомологичного мтДНК близкородственного вида *C. pectoralis* Gould, 1837 (рис. 1, а). Это позволило не только установить новый случай межгеномного кроссинговера, но и предложить гипотезу возникновения *C. pectoralis* путем межвидовой гибридизации *C. calliope* × *C. obscura*. Еще один факт предполагаемой гомологичной рекомбинации обнаружен для *Phylloscopus borealis* (J.H. Blasius, 1858). В результате полногеномного секвенирования мтДНК двух особей подвида *Ph. b. examinandus*, у одной из них выявлен фрагмент NUMT, гомологичный мтДНК подвида *Ph. b. xanthodryas* (рис. 1, б).

В приведенных выше случаях мт-гаплотипы значительно дифференцированы, что позволило отличить по известным признакам мтДНК от ее ядерной копии. Нужно отметить, что в этих примерах различия в степени гомологии ядерных паралогов и соответствующих мт-гаплотипов могут являться следствием длительного пребывания первых в ядерном геноме. Как можно объяснить такую гомологию последовательностей из разных геномов и у разных таксонов? Теоретически существует два пути формирования дивергированных гаплотипов мтДНК: первый – постепенное накопление замен в результате длительного пребывания популяций в изоляции и второй – межвидовая гибридизация, в результате которой появляется новый вариант гаплотипа, не свойствен-

ный данному таксону. Однако сходство распределения полиморфных сайтов для мтДНК одних таксонов и ядерных копий мтДНК других, невозможно объяснить ни одним из этих путей. Третий путь, который здесь рассматривается и логично поясняет такое распределение, – обычная гомологичная рекомбинация между ядерным и митохондриальным геномами, которая внезапно приводит к смене мт-гаплотипа на новый, уже имеющийся в ядерном геноме паралог мтДНК.

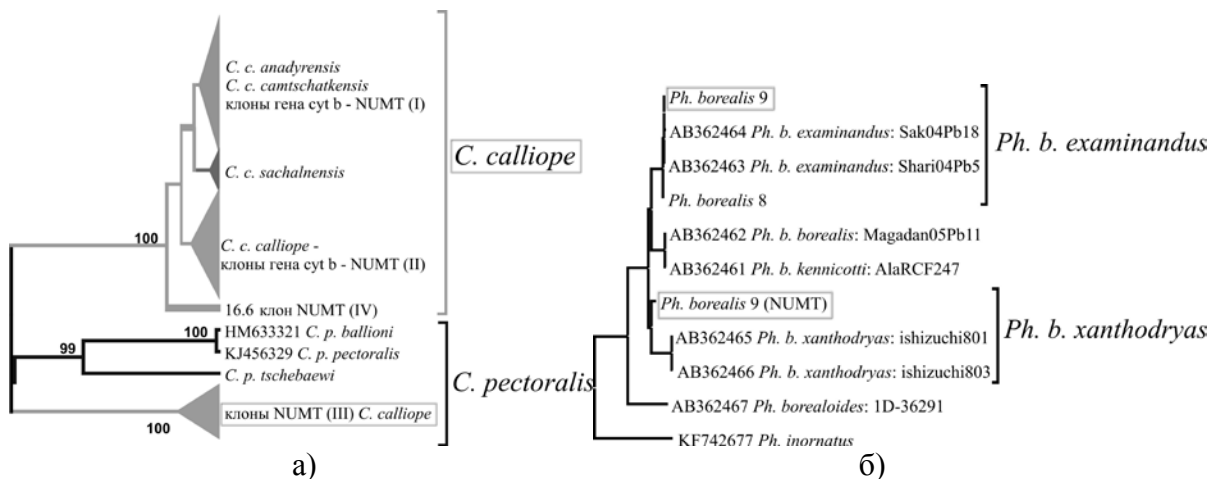


Рис. 1. Примеры обнаружения ядерных копий мтДНК (NUMT) одних таксонов птиц, сходных смтДНК других близкородственных таксонов (неопubl. данные).

Межгеномная рекомбинация я- и мтДНК обуславливается, прежде всего, наличием копий мтДНК в ядерном геноме. Причем, их размер может достигать 99% мтДНК, как например, у мыши или человека (Richly et al., 2004). Кодирование яДНК большей части белков, необходимых для жизнедеятельности и функционирования митохондрий, а также контроль размножения митохондрий ядром косвенно указывают на их тесное взаимодействие, как единой сопряженной системы. Таким образом, митохондрии являются результатом сотрудничества двух геномов и двух аппаратов транскрипции и трансляции.

Особо следует указать на роль триплета TGA, выполняющего разные функции в ядерном и митохондриальном геномах (Спиридонова и др., 2016). В зависимости от того, в каком геноме находится TGA-триплет, он может либо кодировать аминокислоту триптофан (мтДНК), либо играть роль терминирующего фактора (яДНК). После предполагаемого обмена гомологичными участками, активный в митохондриальном геноме рекомбинантный фрагмент автоматически становится в ядерном геноме неактивным, т. е. псевдогеном. Также не требуется каких-либо случайных мутаций и длительного времени, чтобы молчащий ядерный псевдоген стал активным в мтДНК.

Гомологичная рекомбинация между я- и мтДНК вероятно проходит в цитоплазме, что объясняется известными фактами и вытекающими из них предположениями. На стадии профазы I мейоза ядерная ДНК после разрушения ядерной оболочки свободно проникает в цитоплазму. Выход мтДНК в клеточное пространство, по общепринятому мнению, маловероятен. Тем не менее, в литературе обсуждается огромное количество причин и механизмов для перемещения мтДНК в цитоплазму, которое, по-видимому, может случаться под влиянием как генетических, так и экологических факторов (Colluga et al., 1996). Причины, влияющие на утечку мтДНК из митохондрий, включают действие мутагенных агентов и других форм клеточного стресса, которые могут привести к повреждению митохондрий или их мембран (Blanchard et al., 1996).

Для ряда широко распространенных в Палеарктике видов птиц установлено наличие нескольких значительно дивергированных групп мт-гаплотипов. Обычно это традиционно объясняют последствиями оледенений, приводивших к обособлению популяций в условиях длительной изоляции в удаленных рефугиумах, где накапливались

мутации. В свете полученных нами данных, дивергенция гаплотипов может получить новое объяснение. В условиях непрерывных ареалов случайные межгеномные рекомбинации гораздо быстрее приводят к появлению иных вариантов мт-гаплотипов, по сравнению с процессами спонтанных мутаций в митохондриальном геноме, и могут представлять собой альтернативную причину таких различий. Процесс дивергенции NUMT сопровождается не только случайными нуклеотидными заменами в ядерном геноме, но и рекомбинационными перестройками, которые происходят в нем чаще, чем в мтДНК. Это подтверждается высокой вариабельностью клонированных ядерных копий мтДНК у исследованных нами птиц и служит еще одной причиной появления новых последовательностей мт-генов в результате межгеномного обмена.

Таким образом, обычная гомологичная рекомбинация, случающаяся между мтДНК и ее ядерными копиями, является механизмом, с помощью которого может использоваться грандиозный резерв молекулярной изменчивости копий мтДНК ядерного генома, что указывает на их значение в микроэволюционных процессах и формообразовании.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-04-01304.

Литература

- Константинов Ю.М., Дмитриш А., Вебер-Лотфи Ф., Ибрагим Н., Клименко Е.С., Тарасенко В.И., Болотова Т.А., Кулинченко М.В. Импорт ДНК в митохондрии // Биохимия. – 2016. – Т. 81, № 10. – С. 1307–1321.
- Сингер М., Берг П. Гены и геномы. – М.: Мир. – 1998. – Т. 2. – 373 с.
- Спиридонова Л.Н., Вальчук О.П., Белов П.С., Масловский К.С. Внутривидовая генетическая дифференциация соловья-красношейки (*Luscinia calliope*): данные секвенирования гена цитохрома b мтДНК // Генетика. – 2013. – Т. 49, № 6. – С. 735–742.
- Спиридонова Л.Н., Вальчук О.П., Редькин Я.А. и др. Филогеография и демографическая история соловья-красношейки *Luscinia calliope* // Генетика. – 2017. – Т. 49, № 6. – С. 735–742.
- Спиридонова Л.Н., Редькин Я.А., Вальчук О.П., Крюков А.П. Ядерные копии митохондриальных генов – источник новых вариантов гаплотипов гена цитохрома b *Luscinia calliope* (Muscicapidae, Aves) // Генетика. – 2016. – Т. 52, № 9. – С. 1069–1080.
- Blanchard J.L., Schmidt G.W. Pervasive migration of organellar DNA to the nucleus in plants. // J. Mol. Evol. – 1996. – V. 13, N 6. – P. 537–548.
- Collura R.V., Auerbach M.R. A quick, direct method that can differentiate expressed mitochondrial genes from their nuclear pseudogenes // Cure Biol. – 1996. – V. 6, N 10. – P. 1337–1339.
- Guo H., Niu L., Ma Y., Bai S. Phylogenetic relationships of 34 passerines based on mitochondrial cytochrome b sequences // Acta Ecol. Sinica. – 2010. – V. 30. – P. 304–309.
- Lopez J.V., Yuhki N., Masuda R. et al. Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat // J. Mol. Evol. – 1994. – V. 39. – P. 174–190.
- Podnar M., Haring E., Pinsker W., Mayer W. Unusual origin of a nuclear pseudogene in the Italian wall lizard: intergenomic and interspecific transfer of a large section of the mitochondrial genome in the genus *Podarcis* (Lacertidae) // Journal of Molecular Evolution. – 2007. – V. 64, N 3. – P. 308–320.
- Richly E., Leister D. NUMTs in Sequenced Eukaryotic Genomes // Mol. Biol. Evol. – 2004. – V. 21, N 6. – P. 1081–1084.
- Weber-Lotfi F., Koulintchenko M.V., Ibrahim N., Hammann P., Mileschina D.V., Konstantinov Y.M., Dietrich A. Nucleic acid import into mitochondria: New insights into the translocation pathways // Biochim. Biophys. Acta. – 2015. – V. 1853 (12). – P. 3165–3181.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОРГАНЕЛЛ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

А.В. Степанов

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

Методы флуоресцентной микроскопии получают всё большее распространение для оценки различных физиологических параметров и определённых локальных внутриклеточных событий, происходящих в живой клетке в норме и при различных патологических состояниях или неблагоприятных условиях. Большинство растений, как и животных, состоит из более чем одного слоя клеток и, таким образом, не являются идеальным объектом для световой микроскопии вообще, и в частности, для флуоресцентной микроскопии. Кроме того, каждая клетка окружена жёсткой клеточной стенкой и имеет большую центральную вакуоль. Вся совокупность протопласта со всеми присутствующими ему органеллами составляет лишь небольшую пристеночную область, находящуюся, к тому же, в постоянном движении. Всё это вместе затрудняет наблюдение процессов происходящих внутри клеток *in vivo*. Особенно это связано с наблюдением за функционированием органелл.

В целом, использование флуоресцентных методов в физиологии растений связано с двумя проблемами: прохождением возбуждающего и испускаемого красителями света (либо его размыванием) и поступлением в клетку самих красителей. Первую проблему можно решить либо получением оптических срезов (с использованием специальной дорогостоящей аппаратуры), либо биотехнологически – получением суспензионной культуры клеток. Вторая проблема решается только ферментативным удалением клеточной стенки – протопластированием.

Целью данной работы явилось обобщение более чем десятилетнего опыта работы в области флуоресцентной микроскопии для изучения органелл растительных клеток, большей частью митохондрий.

Современная химическая промышленность предоставляет широкий спектр специфических красителей, достаточный для селективного окрашивания практически любого клеточного компартмента, молекулы, либо физиологического параметра. Однако только малая их часть подходит для прижизненного исследования клеток. Так как не все из них имеют подходящие размеры и заряд для прохождения через плазмалемму, и ещё меньше – способны оставаться долгое время внутри, осуществлять свои специфические функции, не причиняя при этом особого вреда клетке. Следует также помнить, что разрабатываются все эти красители и проходят апробацию в основном на животных клетках, которые не имеют клеточной стенки и вакуоли и являются гораздо более благоприятными объектами, чем растения и микроорганизмы. Часто приобретённые красители оказываются не способными проникать через клеточную стенку, либо сорбируются на ней, экранируя и маскируя внутренние целевые структуры. Использование метода протопластирования часто успешно решает эти проблемы. Клеточная стенка ферментативно растворяется, а использование гипертоничных растворов для поддержания целостности протопластов уменьшает отношение вакуоли к протоплазме, что также благотворно сказывается на процессе микроскопирования, однако само помещение клеток в гипертоничный раствор является определённым стрессом для них.

Следующим подводным камнем при использовании флуоресцентных зондов в частности для изучения стресс-адаптации является то, что производитель гарантирует адекватную работу красителя только в физиологически нормальных условиях. Если применяемое воздействие коренным образом нарушает работу клетки – как поведёт се-

бя краситель при этом, никто не знает. И вам потребуется проведение дополнительных контролей адекватности работы красителей.

По нашим данным, использование флуоресцентных зондов без контролей специфичности их работы не допустимо. Так, например, митохондриальные красители работают по принципу максимального отрицательного заряда, так как в физиологически нормальных условиях он там максимален. Однако при отсутствии большой разницы эти красители хорошо красят и другие компартменты и соединения, обладающие отрицательным зарядом, например липидные капли, масла, другие мембраны, клеточные стенки.

Большинство витальных красок не фиксибельны, то есть исследования можно проводить только в момент воздействия или прохождения нужного процесса, что также создаёт определённые неудобства. Существует ряд фиксибельных красителей, например, на митохондрии, которые действуют как градусник. Однако эти красители следует использовать ещё более осторожно. При сопоставлении сигналов из живых и фиксированных клеток, интенсивность флуоресценции на порядок снижается, и форма митохондрий заметно изменяется. Здесь нужно тщательно подбирать способ фиксации, чтобы артефакты были минимальными.

У нативных фотосинтезирующих клеток растений около 80 % объёма занимают хлоропласты, что затрудняет изучение других компартментов клеток (например, митохондрий). В этом случае удобнее использовать гетеротрофные темновые суспензионные культуры клеток, а уже потом ключевые моменты подтверждать на суспензионных культурах клеток, выращенных на свету, или протопластах, полученных из зеленых листьев.

По сравнению с отдельными растениями и проростками суспензионные культуры клеток представляют стабильный, однородный в генетическом отношении материал, который можно нарабатывать регулярно и в любых объёмах.

Таким образом, изучение физиологии органелл растительных клеток методом флуоресцентной микроскопии не такое простое занятие и использование гетеротрофных суспензионных культур и протопластов существенно помогает в этом процессе.

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ РАЗЛИЧИЙ ПОПУЛЯЦИИ МИТОХОНДРИЙ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ С ИХ СПЕЦИАЛИЗАЦИЕЙ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ И АДАПТИВНЫХ ФУНКЦИЙ

И.Ю. Субота, М.В. Кулинченко, Т.А. Болотова, Ю.М. Константинов
ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: isubota@mail.ru

В последние три десятилетия морфология и динамика митохондрий изучалась достаточно пристально. Показано, что например, сферические митохондрии защитных клеток табака значительно отличаются от трубчатых митохондрий дрожжей (*S. cerevisiae*) или от сложной митохондриальной сети в культивируемых раковых клетках человека. Митохондрии растений обычно не формируют непрерывную сеть и локализируются рядом с хлоропластами. Кроме того, митохондрии растений отличаются от митохондрий других организмов по целому ряду признаков, включая разные стратегии биогенеза, генетического кодирования, регуляции экспрессии генов и сегрегации органелл (Bodenstein-Lang et al., 1989; Mackenzie & McIntosh, 1999; Rebeille et al., 2007 и др.). Еще одной отличительной особенностью митохондрий растений является гораздо большее количество митохондриальных белков по сравнению с другими эукариотами. Считается, что митохондриальный протеом арабидопсиса представлен около 3000 белками, в то время как в дрожжах не более 1000 белков, а в митохондриях клеток человека около 1500 белков (Bogorad, 2008; Premisler, 2009). С чем связаны подобные различия до сих пор непонятно, так как основные функции митохондрий эукариот, включающие генерацию АТФ, β -окисление жирных кислот, биогенез пиридинов, нуклеотидов и фосфолипидов, а также участие в клеточном гомеостазе ионов Ca^{2+} и программируемой клеточной смерти сходны в этих организмах, хотя имеют определенные особенности.

Впервые о гетерогенности митохондрий в пределах одной клетки упоминается в работе Kuff и Schneider (1954). Авторы показали различный уровень гетерогенности митохондрий, полученных из печени крысы, в отношении активности сукцинатдегидрогеназы. С появлением современных методов визуализации и оценки ряда функциональных параметров митохондрий представления о наличии различных митохондриальных популяций все больше расширяются.

Одна из гипотез о необходимости «разделения труда» в клеточной митохондриальной популяции - существование конфликта двух основополагающих функций митохондрий, их роли в окислительном фосфорилировании, сопровождаемым постоянной генерацией АТФ и активных форм кислорода (АФК) и их собственным генетическим воспроизводством (Logan, 2006). Специализация одних митохондрий на выполнении биоэнергетических функций, а других на сохранении и воспроизводстве мтДНК может быть одним из самых простых способов, позволяющих снизить скорость мутаций в мтДНК и сохранить функциональность митохондрий в череде поколений.

В задачи работы входило исследование субпопуляций митохондрий, полученных из этиолированных проростков кукурузы (*Zea mays*) и корнеплодов репы (*Brassica rapa*) как со стороны морфологических и биохимических особенностей, так и в отношении ряда функциональных характеристик, таких как, активность дыхательных комплексов и др.

Для получения митохондриальных субпопуляций кукурузы были использованы 3х-дневные этиолированные проростки гибрида ВИР 42. Митохондрии получали методом дифференциального центрифугирования с последующим разделением в линейном градиенте плотности сахарозы (0.3 - 1.2 М). Визуально в градиенте плотности можно вы-

делить 2–3 фракции. Основная фракция митохондрий находилась на уровне градиента плотности, соответствующем 0,5–0,8 М сахарозы – мы ее разделяли на две фракции, 2-ю и 3-ю; слабо заметная фракция более легких митохондрий локализовалась приблизительно в зоне 0,3–0,4 М концентрации сахарозы – фракция 1.

Митохондриальные фракции корнеплодов репы очищали в ступенчатом градиенте плотности перколлы (45 % – 21 % – 18 %, об./об.) Основная фракция митохондрий располагалась на границе между 45 % и 21 % перколлы – фракция 3. Первая фракция представляла собой фракцию самых лёгких митохондрий и находилась во всех случаях в верхней части 18 % перколлы. После отбора фракций митохондрии отмывали от избытка сахарозы или перколлы и использовали для дальнейших исследований.

Митохондриальные белки различных субфракций были разделены с помощью электрофореза в ПАА-геле в денатурирующих условиях. При анализе электрофореграммы можно обнаружить некоторые различия в белковых спектрах различных митохондриальных субфракций. Наблюдаемые различия связаны не с изменениями в белковых спектрах фракций, а с количественным соотношением некоторых бандов, в частности белков с мол. массой ~80 кДа и 100–110 кДа (рис.1, А-Б).

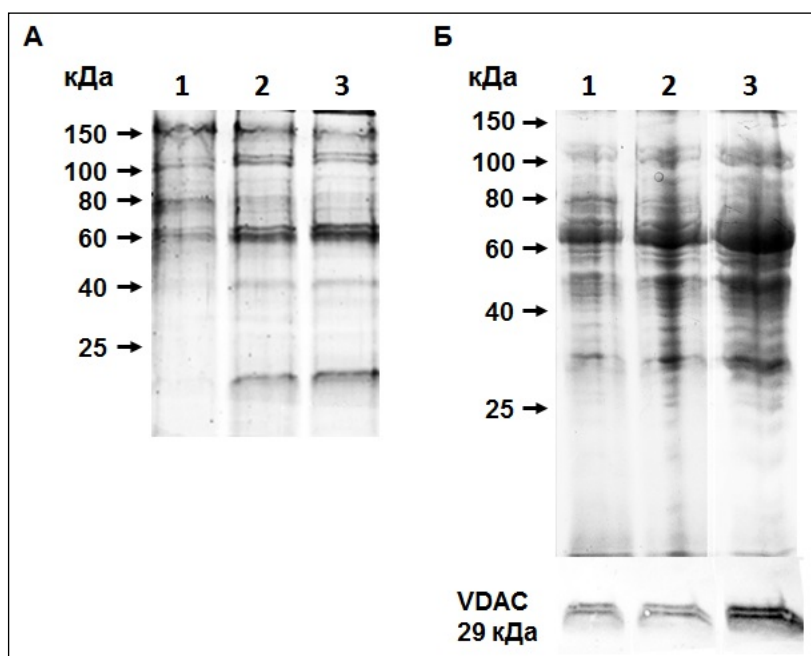


Рис. 1. Анализ профиля митохондриальных белков различных фракций, разделенных с помощью электрофореза в ПАА-геле.

На рисунке представлены электрофореграммы белков трех митохондриальных фракций (обозначены 1, 2 и 3), полученных из проростков кукурузы (А) и репы (Б). После фракционирования в денатурирующем ПАА-геле митохондриальные белки были окрашены с помощью Кумасси R-250. (Б) Иммуноблоттинг митохондриальных белков репы с антителами против VDAC1 (Agrisera, США).

В качестве маркеров использовали наборы фирмы НПО "СибЭнзим" (Россия), содержащие смесь из 12 рекомбинантных высокоочищенных белков, образующих дискретные полосы в диапазоне 10–250 кДа.

Для качественной характеристики субпопуляций митохондрий была начата идентификация мажорных митохондриальных белков, располагающихся в различных компартментах митохондрий с помощью иммуноблоттинга. Одними из мажорных белков наружной мембраны митохондрий являются порины или VDAC (voltage-dependent anion-selective channel). Эти белки необходимы для транспорта ионов и метаболитов между митохондриями и остальными частями клетки. В нашей работе мы использовали антитела против VDAC1. Вестерн-блот проводили, согласно методике Timmons и Dunbar (1990). Митохондриальные белки после фракционирования в SDS-ПААГ переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Затем мембрану инкубировали в растворе первичных антител в разведении (1: 1000). Иммунореактивные группы выявляли с помощью вторичных антител, конъюгированных со щелочной фосфатазой. В работе использовали поликлональные антитела против VDAC1 ("Agrisera", США). Показано, что порин присутствовал во всех субфракциях митохондрий. Данный факт в совокупности с дан-

ными о сходном полипептидном составе субфракций указывает на тот факт, что мы имеем дело с популяциями митохондрий, а не с артефактами, возникшими в процессе выделения митохондрий.

Одной из важнейших функциональных характеристик митохондрий является дыхание – потребление кислорода, сопряженное с фосфорилированием АДФ. При изучении дыхательной активности митохондриальных фракций, полученных из этиолированных проростков кукурузы, было показано, что все три фракции поглощали кислород и были сопряжены. В ряде экспериментов для первой фракции («легких» митохондрий) был характерен более высокий уровень дыхательной активности, однако этот показатель фракции 1 был нестабильным. В целом уровень дыхательной активности всех трех митохондриальных фракций кукурузы был низким, коэффициент дыхательного контроля, показывающий сопряженность дыхания и фосфорилирования митохондрий, варьировал от 2 до 3. При добавлении к сопряженным фракциям митохондрий протонофора СССР (карбонилцианид *m*-хлорофенилгидразон) происходило разобщение дыхания и фосфорилирования.

Оценка дыхательной активности митохондриальных фракций, полученных из корнеплодов репы также позволила установить, что все три изучаемые фракции поглощали кислород и характеризовались сопряжением дыхания и фосфорилирования. Наиболее высоким показателем дыхательной активности (около 4) обладали митохондрии 2-ой и 3-ей субфракций. Митохондрии фракции 1 характеризовались более низким уровнем дыхательной активности (около 2), или же, в ряде случаев, сопряжение дыхания и фосфорилирования в этой фракции вовсе отсутствовало.

С целью дальнейшей характеристики субпопуляций митохондрий мы провели анализ активности мембранных дыхательных комплексов с помощью метода BN-PAGE. Все пробы солиобилизованных митохондриальных мембран были нормализованы по содержанию белка. Исходя из результатов окрашивания белков Кумасси, обнаружено, что спектр белков мембранных комплексов митохондриальной фракции 1 кукурузы соответствует таковым во фракциях 2 и 3, за исключением слабо выраженных двух комплексов в верхней трети геля, белковые комплексы 2-й и 3-й фракций не различаются. Активность комплекса I дыхательной цепи в 1-ой фракции митохондрий кукурузы и репы незначительно снижена. Активность комплекса II дыхательной цепи в 1-й фракции снижена как у репы, так и у кукурузы, у кукурузы в большей степени. При этом у репы в 1-й фракции этот комплекс имеет большую молекулярную массу по сравнению с фракциями 2 и 3. Мы оценили также активность IV комплекса в митохондриях репы и кукурузы и установили, что в 1-й фракции этот комплекс не функционирует.

Обобщая полученные результаты, следует отметить, что 1-я митохондриальная фракция имеет значительные различия в составе и функционировании мембранных комплексов. По всей видимости, данная фракция представляет собой незрелые митохондрии, в мембране которых комплексы дыхательной цепи еще только формируются и не функционируют в полной мере. Эти наблюдения совпадают с данными других исследований, описанных выше, в которых выделяли три популяции митохондрий в зависимости от стадии их развития.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 15-54-16010.

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ И ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

*Н.П. Судаков^{1, 2, 3}, Т.П. Попкова¹, Е.С. Клименко⁴, И.В. Клименков³, С.Б. Никифоров¹,
О.А. Гольдберг¹, Б.Г. Пушкарев¹, С.Д. Ежикеева⁵, М.Н. Тен⁵, Ю.М. Константинов^{2, 4}*

¹ФГБНУ Научный центр хирургии и травматологии,
Иркутск, e-mail: npsudakov@rambler.ru

²ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет,
Иркутск, e-mail: npsudakov@rambler.ru

³ФГБУН Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, e-mail: iklimen@mail.ru

⁴ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: yukon@sifibr.irk.ru

⁵ГБУЗ Иркутская орден «Знак Почета» областная клиническая больница,
Иркутск, e-mail: npsudakov@rambler.ru

Цель работы: оценить диагностическую перспективу цитохимического и молекулярного анализа митохондриальной дисфункции на ранних сроках развития дислипидопроотеидемии, а также в динамике острого ишемического повреждения миокарда.

Дислипидопроотеидемию моделировали атерогенной диетой на кроликах породы "Шинишила". Животные были разделены на две группы (для каждой группы $n = 10$): экспериментальная дислипидопроотеидемия (ежедневная атерогенная диета: 350 мг холестерина на 1 кг веса животного) и группа контроля (стандартная диета вивария). Срок эксперимента составил 14 суток.

Инфаркт миокарда моделировали на самцах крыс линии «Вистар» подкожными инъекциями адреналина (0,2 мг на 100 г. массы животного). Крыс, получивших инъекции адреналина, выводили из эксперимента с целью взятия крови и аутопсии через 24 ($n = 6$), 48 ($n = 6$) и 72 часа ($n = 6$) наблюдения. Животным группы контроля ($n=6$) подкожно вводили физиологический раствор.

Активность ферментов-биомаркеров цитолиза в сыворотке крови: общей креатинфосфокиназы (КФК), креатинфосфокиназы МВ (КФК-МВ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), липидный спектр (концентрацию триацилглицеридов, общего холестерина, холестерина ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП) анализировали с использованием наборов реагентов «Human Diagnostics GmbH» (Германия) на биохимическом анализаторе Beckman synchro 4 (Beckman coulter, США). Количественный анализ свободно-циркулирующей митохондриальной ДНК осуществляли методом ПЦР в реальном времени. Митохондриальную ДНК выделяли из плазмы крови после удаления из нее тромбоцитов (Chiu R.W. et al, 2003). Анализ уровня мтДНК в пробах проводили на амплификаторе «DT lite» (ДНК-технология, Россия) с использованием реакционной смеси, содержащей SYBR Green (MaximaTM SYBR Green/ROX qPCR Master Mix – Thermo Fisher Scientific Inc., США). Амплифицировали фрагмент гена 16S рРНК (крысы – прямой праймер: 5'- TGCAGAAGCTATTAATGGTTTCG-3', обратный праймер: 5'-TTGGCTCTGCCACCCTAATA-3'; кролики – прямой праймер: 5'-GTGTAGCCGCTATTAAAGGTTTCG-3', обратный праймер: 5'-GGCTCTGCCACCTTAAGTAGCT-3') длиной 230 п.н. (Ellinger J. et al, 2008; Sudakov N.P. et al, 2012). Анализ состояния липидных частиц и митохондрий в клетках печени осуществляли с помощью лазерного конфокального микроскопа LSM-710 (Carl Zeiss, Германия). Фрагменты ткани печени фиксировали 2 % параформальдегидом. Ядра клеток окрашивали DAPI (Sigma-Aldrich, США), липидные капли – Nile red (Sigma-Aldrich, USA), функционально-активные митохондрии – Mitotracker orange (Life Technologies, USA). В программной среде Imaris Bitplane 7.2.3. оценивали объем липидных капель,

количество функционально-активных митохондрий в $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ ткани печени. Морфологические изменения миокарда и печени анализировали световой микроскопией гистологических препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином. Все манипуляции с лабораторными животными проводились с соблюдением положений Хельсинкской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (2000 г.) и Директивы Европейского сообщества 86/609 ЕЕС о гуманном отношении к экспериментальным животным (1986 г.). Статистический анализ полученных данных проводили в программе Statistica 10, используя непараметрические методы. Межгрупповые различия оценивали по критериям Манна-Уитни, Краскела-Уоллиса.

На модели дислипидотеидемии показано, что на 14 сутки наблюдения у экспериментальных животных уровень общего холестерина крови возрастает в 14 раз ($p \leq 0,05$), при этом дисбаланс его атерогенной (ЛПНП и ЛПОНП) и антиатерогенной (ЛПВП) фракций увеличивается в сравнении с контролем в 6 раз ($p \leq 0,05$). Это отражает ослабление способности печени сдерживать развитие нарушений обмена липидов крови. При этом активность АСТ и АЛТ сохраняется на уровне контроля в течении данного срока наблюдения, что свидетельствует об отсутствии выраженных повреждений клеток печени. Тем не менее, трехмерное сканирование ткани печени с помощью лазерной конфокальной микроскопии показало, что на этом сроке наблюдения уже развиваются структурно-функциональные нарушения в гепатоцитах. Установлено, что на 14 сутки атерогенной диеты в гепатоцитах регистрируется статистически значимое ($p \leq 0,05$) трехкратное возрастание общего объема липидных капель в сравнении с контролем. Анализ функционально-активных митохондрий на 14 сутки выявил двукратное снижение их количества в клетках печени животных экспериментальной группы ($p \leq 0,05$). Таким образом, анализ препаратов печени, окрашенных флюорисцентными красителями Nile red и Mitotracker orange с помощью лазерной конфокальной микроскопии позволяет уже в течении первых недель экспериментальной дислипидотеидемии выявить возрастание объема липидных капель, способствующее снижению количества функционально-активных митохондрий в клетках печени, что служит основой для прогрессирования нарушений липидного обмена в данном органе. Интересно отметить, что на фоне зарегистрированных нарушений метаболизма липидов крови и структурно-функциональных изменений в клетках печени наблюдается тенденция к трехкратному возрастанию концентрации свободно циркулирующей мтДНК в крови в сравнении с контролем ($p = 0,6$). Это характеризует перспективу данного показателя в качестве одного из ранних нетканеспецифичных биомаркеров развития нарушений в клетках-мишенях при дислипидотеидемии и атеросклерозе и предопределяет необходимость изучения его динамики на более поздних сроках экспериментальной дислипидотеидемии.

При моделировании инфаркта миокарда установлено, что через 24 часа после введения адреналина в крови экспериментальных животных наблюдается значимое возрастание активности КФК, КФК-МВ, ЛДГ и АСТ. Это объективно свидетельствует о развитии литических процессов в кардиомиоцитах на данном сроке наблюдения. Уровень свободно циркулирующей мтДНК крови при этом возрастает в 1,5 раза в сравнении с контролем. Через 48 часов активность КФК, КФК-МВ и ЛДГ проявляет тенденцию к снижению, оставаясь, тем не менее, выше значений контроля. Активность АСТ при этом уже находится на уровне контроля. Уровень свободно циркулирующей мтДНК в крови экспериментальных животных статистически значимо возрастает в 2 раза ($p \leq 0,05$). Через 72 часа после введения адреналина, активность всех исследуемых маркеров цитолиза снижается до показателей контроля. Гистологические исследования миокарда экспериментальных животных на этом сроке наблюдения показали формирование в сердечной мышце множественных очагов лизиса мышечных волокон, с признаками воспаления. Об этом объективно свидетельствует инфильтрация данных очагов макрофагами и полиморфноядерными фагоцитами. На фоне описанных выше измене-

ний, уровень свободной мтДНК плазмы экспериментальных животных на данном сроке наблюдения увеличен в 1,5 раза в сравнении с группой контроля ($p \leq 0,05$). Таким образом, пик возрастания уровня свободно циркулирующей мтДНК крови после подкожных инъекций адреналина формируется на сутки позднее увеличения активности известных кардиомаркеров. Наибольшее значение концентрации мтДНК крови достигается уже на этапе снижения активности данных ферментов и развитии воспалительного процесса в зонах некроза миокарда. Для объективного понимания информационного потенциала данного показателя для клинической кардиологии необходимо выявление и изучение процессов, определяющих его изменения.

Таким образом, полученные нами данные характеризуют высокий диагностический потенциал цитохимического анализа объема липидных частиц и количества функционально-активных митохондрий, определяемых методом трехмерного сканирования образцов ткани с помощью лазерной конфокальной микроскопии для исследований биоптата печени с целью ранней диагностики внутриклеточных нарушений при формировании липидной инфильтрации данного органа. Данные анализа уровня свободно циркулирующей мтДНК на ранних сроках развития дислипидотеидемии, а также в динамике острого ишемического повреждения миокарда определяют необходимость детального изучения динамики данного показателя и механизмов изменения его уровня при атеросклерозе и острых ишемических повреждениях миокарда.

В целом, полученные результаты будут создавать основу для создания технологий диагностического мониторинга развития дислипидотеидемии, атеросклероза, а также острых ишемических повреждений миокарда и требует дальнейших исследований.

Литература

Chiu R.W., Chan L.Y., Lam N.Y. et al. Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma // *Clin. Chem.* – 2003. – V. 49. – P. 719–726.

Ellinger J., Müller S.C., Wernert N. et al. Mitochondrial DNA in serum of patients with prostate cancer: a predictor of biochemical recurrence after prostatectomy // *BJU Int.* – 2008. – V. 102. – P. 628–632.

Sudakov N.P., Popkova T.P., Novikova M.A. et al. The level of blood plasma mitochondrial DNA upon acute myocardium damage in experiment // *Biopolymers and Cell.* – 2012. – Vol. 28, N 4. – P. 321–324.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ДВОЙНОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ RPO_{Tmp} В МИТОХОНДРИЯХ И ХЛОРОПЛАСТАХ

В.И. Тарасенко, Е.Ю. Гарник, А.И. Катышев, В.И. Бельков, Т.В. Яковлева,
В.В. Черникова, Ю.М. Константинов, М.В. Кулинченко
ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: mk100171@yahoo.com

У двудольных растений, включая арабидопсис, транскрипцию генов органелл осуществляют три РНК-полимеразы фагового типа, кодируемые в ядре, RPO_{Tm}, RPO_{Tr} и RPO_{Tmp} (NEP-полимеразы). Первые две осуществляют транскрипцию исключительно митохондриальных и хлоропластных генов, третья, RPO_{Tmp}, транспортируется как в митохондрии, так и в хлоропласты, и предположительно участвует в транскрипции генов обеих органелл. Ранее было показано, что инсерционный мутант арабидопсиса по гену *rpot2*, кодирующему RPO_{Tmp}, характеризуется замедленным ростом, изменениями в морфологии листьев, экспрессии митохондриальных и, возможно, хлоропластных генов, пониженной активностью митохондриальных дыхательных комплексов (Kühn et al., 2009). Роль RPO_{Tmp} в митохондриальной транскрипции была подтверждена многими исследованиями (Emanuel et al., 2006; Courtois et al., 2007; Kühn et al., 2009 и др.). Однако о потенциальном разделении в транскрипционной активности между RPO_{Tm} и RPO_{Tmp} в митохондриях известно немного. При очевидной, хотя и не до конца изученной роли Rpo_{Tmp} в митохондриальной транскрипции, функция данной NEP-полимеразы в хлоропластах двудольных растений является предметом дискуссии. Хлоропласты низших растений, включая водоросли за возможным исключением *Physcomitrella*, транскрибируют свои гены только с участием РЕР-полимеразы: какие преимущества для покрытосеменных дает использование NEP-полимеразы, а для настоящих двудольных - даже двух ферментов фагового типа, остается неясным. Многие генетические элементы в пластидах и митохондриях регулируются различными типами промоторов, что предполагает конкурирующую или совместную транскрипцию генов различными типами ферментов. Поскольку локализация и активность RPO_{Tmp} связана с двумя органеллами, очень различающимися по своим функциям и по типу экспрессии генов, выяснение роли этой РНК-полимеразы, специфики в осуществлении транскрипции генов органелл представляет собой значительный интерес. В то же время, двойная локализация RPO_{Tmp} делает весьма затруднительным анализ специфической роли, которую данный фермент играет в каждой из органелл, в особенности на уровне *in vivo*.

Ранее нами были получены две генетические конструкции, в одной из которых последовательность каталитической части гена *rpot2* арабидопсиса была объединена с последовательностью, кодирующей транзитный пептид митохондриальной РНК-полимеразы RPO_{Tm}, в другой – с последовательностью, кодирующей транзитный пептид хлоропластной RPO_{Tr} (Tarasenko et al., 2016). Данные генетические конструкции были использованы для агробактериальной трансформации растений арабидопсиса дикого типа и мутантной линии *rpotmp*, у которой инактивирована функция RPO_{Tmp}, с последующим отбором линий, экспрессирующих данную NEP с адресацией либо в митохондрии, либо в хлоропласты. На основе растений дикого типа были получены линии с митохондриальной (*Col-M*) и хлоропластной (*Col-P*) гиперэкспрессией RPO_{Tmp}; на основе растений мутанта *rpotmp* - линии с комплементацией функций RPO_{Tmp} в митохондриях (*Tmp-M*) и хлоропластах (*Tmp-P*). С помощью линий *Tmp-M* и *Tmp-P* было проведено исследование, позволившее установить, что функции RPO_{Tmp} связаны именно с митохондриями (Tarasenko et al., 2016). Для дальнейшего изучения роли

RPO_{Tmp} в экспрессии генов органелл и регуляции раннего развития растений, потенциального влияния функций этой РНК-полимеразы на функции других NEP были использованы линии с гиперэкспрессией RPO_{Tmp} в митохондриях и хлоропластах.

Анализ фенотипических особенностей линий с гиперэкспрессией RPO_{Tmp} в сравнении с растениями дикого типа и мутантом *rpotmp* показал, что линии трансформантов *Col-M*, в основном, сходны в своих признаках (внешнем облике, скорости роста растений, копияности митохондриального генома) с диким типом; линии трансформантов *Col-P*, в целом, характеризуются большей вариативностью этих признаков, а некоторые из них проявляют черты, сходные с мутантом *rpotmp*. У всех исследованных линий с гиперэкспрессией RPO_{Tmp}, как с митохондриальной адресацией, так и с хлоропластной, было отмечено отсутствие корреляции между количеством вставок трансгена и такими признаками, как уровень экспрессии рекомбинантной RPO_{Tmp} и копияность митохондриального генома. Для всех этих линий на фоне гиперэкспрессии RPO_{Tmp} характерно существенное снижение экспрессии всех трех нативных NEP, что также не коррелирует с фенотипом, проявляемым растениями той или иной линии. РС-промотор *rrn*-оперона – единственный, для которого достаточно убедительно показана специфичность распознавания РНК-полимеразой RPO_{Tmp} (Courtois et al., 2007). Активность транскрипции с этого промотора наблюдается в основном на экстремально ранних стадиях развития растения, т. е. при набухании и прорастании семян. Нами был проанализирован уровень транскрипции с РС-промотора в растениях дикого типа, мутанте *rpotmp* и в полученных линиях с комплементацией (*Tmp-M* и *Tmp-P*) и гиперэкспрессией (*Col-M* и *Col-P*) данной NEP в митохондриях и хлоропластах. Показано, что уровень продукта, инициированного с праймера РС, примерно в 10 раз ниже, чем с праймера P2, и примерно в 15 раз ниже при вычитании уровня, зафиксированного при использовании «фонового» праймера (рис. 1, Б). Повышение транскрипции с РС-промотора выявлено только для линий, экспрессирующих RPO_{Tmp} с хлоропластной адресацией (рис. 1, В).

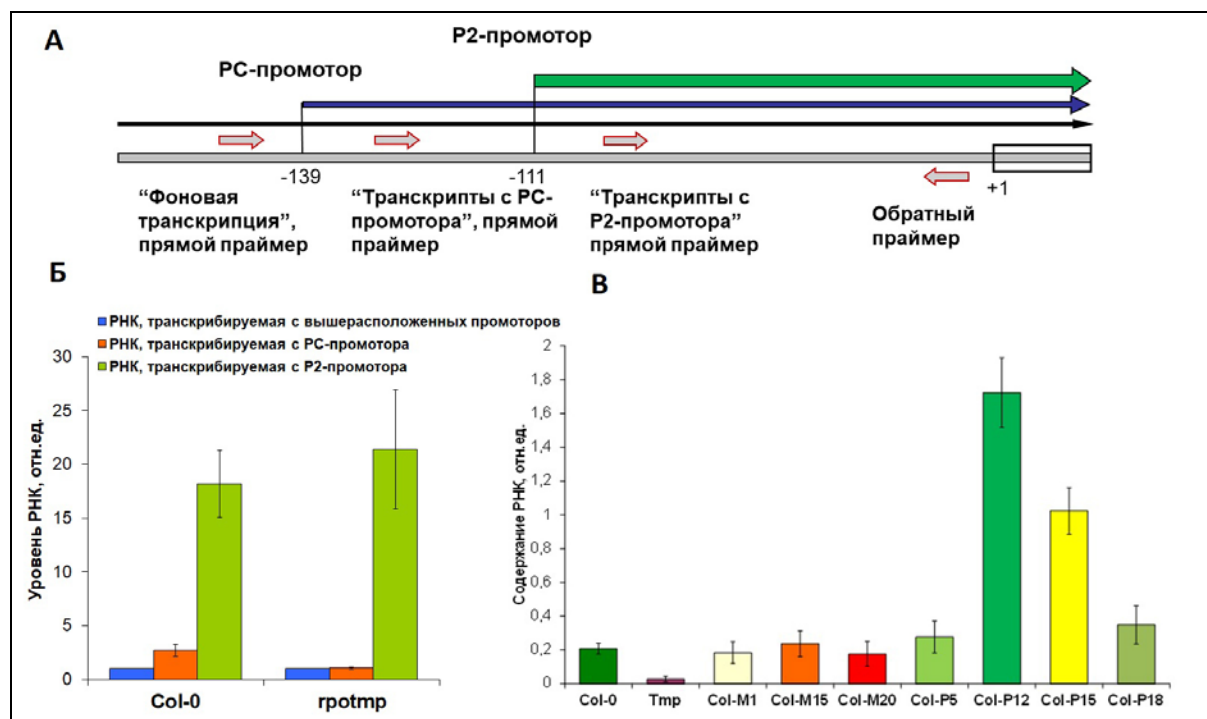


Рис. 1. Анализ уровня предшественников транскриптов, инициированных с промотора РС в диком типе (*Col-0*), мутанте *rpotmp* и линиях-гиперэкспрессорах (*Col-M* и *Col-P*).

(А) Схематическая репрезентация сайтов инициации транскрипции оперона *rrn* в арабидопсисе, и наборы праймеров, использованные для оценки в колОТ-ПЦР уровней предшественников РНК. Позиции праймеров указаны короткими стрелками. (Б) Уровни транскриптов, инициированные с промотора РС в прорастающих семенах дикого типа (*Col-0*) и мутантной линии

rpotmp. (В) Уровни предшественников транскриптов, инициированных с промотора РС в растениях дикого типа (*Col-0*), мутанте *rpotmp* и линиях-гиперэкспрессорах (*Col-M* и *Col-P*). Возраст проростков - 12 суток после прорастания. Изменения в уровне транскрипта нормализованы к уровню РНК, инициированной с вышерасположенных промоторов, принятому за 1.

У линий арабидопсиса с гиперэкспрессией RPOTmp как в митохондриях, так и в хлоропластах установлена пониженная чувствительность прорастания семян к репрессирующему действию высоких концентраций сахарозы, указывая на возможную роль абсцизовой кислоты в регуляции экспрессии ядерного гена, кодирующего данную РНК-полимеразу. При изучении характера прорастания семян изучаемых линий на средах, содержащих абсцизовую кислоту, была установлена высокая чувствительность к АБК у нокаут-мутанта *rpotmp*, при этом гиперэкспрессия RPOTmp, напротив, приводила к снижению чувствительности семян к АБК по сравнению с линией дикого типа. Анализ данных, полученных методом ДНК-микрочипирования, позволил выявить снижение экспрессии ряда генов, кодирующих белки, участвующие в механизмах, регулируемых с участием абсцизовой кислоты. Мы предполагаем, что повышение уровня RPOTmp вызывает изменение в работе каких-то клеточных факторов, играющих особую роль в реакции растения на стресс, и что эти факторы на уровне регуляции экспрессии хлоропластных генов могут иметь отношение к раннему прорастанию семян, судя по активации транскрипции с характерного для этого этапа развития промотора РС оперона *rrn16*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 16-04-00626).

Литература

- Courtois F., Merendino L., Demarsy E., Mache R., Lerbs-Mache S. Phage-type RNA polymerase RPOTmp transcribes the *rrn* operon from the PC promoter at early developmental stages in *Arabidopsis* // *Plant Physiology*. – 2007. – V. 145. – P. 712–721.
- Emanuel C., von Groll U., Müller M., Börner T., Weihe A. Development- and tissue-specific expression of the RPOT gene family of *Arabidopsis* encoding mitochondrial and plastid RNA polymerases // *Planta*. – 2006. – V. 223. – P. 998–1009.
- Kühn K., Richter U., Meyer E., Delannoy E., de Longevialle A.F., O'Toole N., Börner T., Millar H., Small I., Whelan J. Phage-type RNA polymerase RPOTmp performs gene-specific transcription in mitochondria of *Arabidopsis thaliana* // *The Plant Cell*. – 2009. – V. 21. – P. 2762–2779.
- Tarasenko V.I., Katyshev A.I., Yakovleva T.V., Garnik E.Y., Chernikova V.V., Konstantinov Y.M., Koulintchenko M. RPOTmp, an *Arabidopsis* RNA polymerase with dual targeting, plays an important role in mitochondria, but not in chloroplasts // *J Exp Bot*. – 2016. – V. 67 (19). – P. 5657–5669.

CONTRIBUTION OF MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN THE DEVELOPMENT OF SPORADIC ALZHEIMER'S DISEASE: EVIDENCE FROM OXYS RATS

*Mikhail A. Tyumentsev¹, Natalia A. Muraleva¹,
Valentin A. Vavilin², Natalia A. Stefanova¹, Nataliya G. Kolosova¹*

¹Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, e-mail: kolosova@bionet.nsc.ru

²Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk

Many lines of evidence suggest that decreased mitochondrial function is a hallmark of aging and that mitochondrial dysfunction has a central role in Alzheimer's disease (AD), the most common type of age-related dementia worldwide, which has no cure. The central role of mitochondria in aging was first proposed by Denham Harman, on the basis of his original theory that aging is caused by the accumulation of damage resulting from reactive oxygen species (ROS) (Harman, 2009). However, recent findings suggest that formation of ROS is neither the primary nor the initial cause of aging. Moreover, transient stress on mitochondria, including mitochondrial ROS (playing a critical role in a number of intra- and extracellular processes), elicits beneficial changes that extend the lifespan (Rose et al., 2017). Clearly, mitochondrial function regulates the rate of aging, and mitochondrial dysfunction takes the center stage in the pathophysiology of age-related neurodegenerative disorders, but the underlying mechanisms remain unclear. We explored the role of mitochondrial dysfunction in the development of sporadic late-onset AD, which accounts for ~95 % of all disease cases, using senescence-accelerated OXYS rats. This rat model simulates key characteristics of AD including tau protein hyper-phosphorylation, synaptic losses, neuronal cell death, behavioral alterations, and a decrease in cognitive functions on the background of increase in APP levels, enhanced accumulation of A β , and formation of amyloid plaques in the brain. The genome of OXYS rats lacking the mutations in the App, Psen1, and Psen2 genes, which are specific for the early form of AD, also speaks in favor of the this model matching the particular criteria of sporadic AD (Stefanova et al., 2014). According to our data, the development and progression of AD-like pathology in OXYS rats may be caused by mitochondrial dysfunction (Stefanova et al., 2014-2016, Kolosova et al., 2017, Tyumentsev et al., 2018). Here we summarize our evidence supporting the validity of this assertion.

First, already at the age of 20 days, i.e., at the preclinical stage of the development of AD-like pathology, OXYS rats showed some characteristic changes in hippocampal mitochondria, which increased in size during the manifestation (the age of 5 months) and progression of these pathological changes (18 months). Even at this early age, OXYS rats show significantly lower respiratory complex IV activity and a tendency toward a decrease in the activity of complexes I and V. The persistent depression of respiratory chain activity in the hippocampal mitochondria of OXYS rats is observed throughout the lifespan. Simultaneously this decreased activity, OXYS rats show increased fusion, which leads to formation of larger mitochondria. Such fused highly integrated mitochondrial phenotype is thought to be geared toward upregulation of energy supply via ATP synthesis. Therefore, we did not detect any signs of energy deficiency in OXYS rats' brain up to the age of 3 months, when we estimated the brain energy metabolism by ³¹P NMR spectroscopy. What's more, we have previously detected an increased phosphate potential in 2- to 3-week-old OXYS rats compared to Wistar rats (elevated creatine phosphateto inorganic phosphate (PCr/Pi) and (PCr/ATP) ratios) which could be a consequence of adaptation of the brain to hypoxic conditions (Sergeeva et al., 2006). Later, we have shown that the prevalence of the mitochondrial common deletion (4834 bp in mtDNA; which is the most typical form of mtDNA oxidative damage associated with aging and degenerative diseases) in the hippocampus of OXYS rats is increased, especially at the stage of completion of brain development in the postnatal period (Loshenova et al., 2015).

This level remained elevated not only at the stages preceding the manifestation and the development of the signs of AD but also during their progression.

By the age of 20 days, final maturation of the brain takes place, during which many brain regions, including the hippocampus, undergo development and histogenesis associated with the formation of interneuronal contacts and elimination of “transitional” cell populations by apoptosis. High apoptotic activity and, according to the latest data, neurogenesis, point to enhanced ROS production. It is noteworthy that we found that early age (20 days) is the only period when brain mitochondria from OXYS rats show signs of increased production of ROS. It should be noted that increased production of ROS occurs much earlier than amyloid plaque accumulation, tau hyperphosphorylation, or behavioral abnormalities in OXYS rats (Stefanova et al., 2015). For a long time overproduction of ROS has been regarded as the cornerstone of mitochondrial pathology and of neurodegenerative diseases in which mitochondrial pathology plays an important part (Srivastava, 2017). In contrast, we did not see enhanced formation of ROS by mitochondria isolated from the brain of 5- and 24-month-old rats when the AD-like pathology developed and progressed and well-pronounced structural disturbances in mitochondria were revealed in the hippocampus of OXYS rats by electron microscopy. We hypothesized that the state of mitochondria in OXYS rats may be characterized as mild uncoupling, which can decrease ROS production by lowering the membrane potential; this change increases the rate of electron transfer and oxygen consumption while maintaining respiratory complexes in a more oxidized state (Korshunov et al., 1997).

Second, according data of RNA-seq (Stefanova et al., 2015) the expression profile of mitochondrial genes in the brain of OXYS rats is significantly different from that of normal control rats, including the possible mitochondrial energy deficiency. Progression occurs against the background of alteration in the cortex of the genes associated with the metabolic pathway of AD, including those related to processing of the precursor protein A β , aggregation and degradation of A β , synaptic processes, and mitochondrial dysfunction. Our results are consistent with RNA-Seq data on changes in the transcriptome of the prefrontal cortex of patients with AD.

Data on the change of mitochondrial mass during brain aging are limited but overall suggest that with advancing age, this parameter increases or tends to increase (Swerdlow, 2011). In 2-year-old Wistar rats, we observed a tendency toward an increase in the number of mitochondria in hippocampal neurons. Furthermore, in OXYS rats, their amount decreased by age 5 months, remained at this level at 24 months and was significantly lower than that in Wistar rats. Starting at the age of 4 months and until age 24 months, we observed a shift from mitochondrial fusion toward fission as evidenced by increasing DRP1 content. Decreased mitochondrial fusion and formation of a fragmented mitochondrial phenotype is a characteristic sign of many models of neurodegenerative diseases. Mitochondrial fission itself may also contribute to the removal of mitochondria through subsequent mitophagy contributing to the diminishing number of mitochondria. Overall, the observed events appear to signify a mismatch between the intensities of biogenesis and mitophagy; this phenomenon as a whole is also considered a hallmark of age-associated neurodegenerative diseases.

Mitochondria are physically and biochemically in contact with ER via formation of mitochondria-associated membranes harboring various effector and signaling proteins positioned in lipid rafts. In addition to mitochondrial dynamics, ER contact sites play a pivotal role in mitophagy, membrane lipid transport, and calcium signaling. We showed increased formation of ER contact sites on neuronal mitochondria of OXYS rats during manifestation of AD signs (age 5 months) that may be a part of an ongoing compensatory reaction aimed at increasing the supply of ATP and improving the quality control of the remaining mitochondria. Similarly, OXYS neuronal mitochondria starting from a young age are more frequently positioned next to the nucleus, with the frequency increasing threefold during the rats' lifespan, suggesting that starting at the age of the first signs of AD, the demand for ATP in the neuronal nucleus increases. Notably, in OXYS rats, formation of ER contact sites after an increase at the age of 5 months underwent a significant decrease later, at the age of active progression of

AD-like pathology. This change in ER contact sites is accompanied by signs of AD, such as A β accumulation, tau hyperphosphorylation, synaptic impairment, and neuronal death. These data suggest that by the late age (24 months), an initial compensatory response aimed against A β accumulation no longer functions. Additionally, at this age, OXYS rats accumulate more severely damaged mitochondria as compared to Wistar rats; this finding indicates that OXYS mitochondria are under a significant workload, where quality control mechanisms become insufficient.

Summarizing the results of our studies, we compared the age-dependent changes in neuronal mitochondria with the development of AD signs in OXYS rats. We can see that already at the age of 20 days in the absence of any signs of AD, OXYS rats show decreased activity of complex IV of the respiratory chain, increased ROS production, and accumulation of deletions in mitochondrial DNA. Manifestation of behavioral aberrations and deterioration of cognitive abilities in OXYS rats take place at the age of 3–4 months during the increase in mitochondrial aberrations and hyperphosphorylation of tau protein. Increased accumulation of A β in the brain of OXYS rats occurs at age 7–12 months, concurrently with well-pronounced neurodegenerative changes, and becomes a secondary event in relation to mitochondrial dysfunction. The key role of mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of AD is confirmed by the ability of mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 to alleviate the neurodegenerative alterations via improvement of structural and functional state of mitochondria in OXYS rats. Namely, SkQ1 prevents the neuronal loss and synaptic damage, enhances neurotrophic supply, and decreases the amounts of toxic forms of A β and tau hyperphosphorylation in the hippocampus of OXYS rats, thereby resulting in improvement of cognitive function (Stefanova et al., 2014, 2016; Kolosova et al., 2017). Collectively, these data allow us to conclude that mitochondrial dysfunction appears at least to mediate or possibly even initiate pathological molecular cascades of AD-like pathology in OXYS rats. Therefore, mitochondrial dysfunction may be considered a predictor of the early development of the late-onset form of AD in humans. If so, mitochondrial dysfunction actually constitutes a mechanistic link between brain aging and AD.

References

- Harman D. Origin and evolution of the free radical theory of aging: A brief personal history, 1954-2009 // *Biogerontology*. – 2009. – Vol. 10, N 6. – P. 773–781.
- Kolosova N.G. et al. Antioxidant SkQ1 Alleviates Signs of Alzheimer ' s Disease-like Pathology in Old OXYS Rats by Reversing Mitochondrial Deterioration // *Curr. Alzheimer Res.* – 2017. – Vol. 14, N 12. – P. 1283–1292.
- Korshunov S.S., Skulachev V.P., Starkov A.A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria // *FEBS Lett. Federation of European Biochemical Societies*. – 1997. – Vol. 416, N 1. – P. 15–18.
- Loshchenova P.S. et al. Influence of antioxidant SkQ1 on accumulation of mitochondrial DNA deletions in the hippocampus of senescence-accelerated OXYS rats // *Biochem.* – 2015. – Vol. 80, N 5. – P. 596–603.
- Rose G., Santoro A., Salvioli S. Mitochondria and mitochondria-induced signalling molecules as longevity determinants // *Mech. Ageing Dev. Elsevier Ireland Ltd*, 2017. – Vol. 165. – P. 115–128.
- Sergeeva et al., 2006.
- Stefanova N.A. et al. Amyloid accumulation is a late event in sporadic Alzheimer's disease-like pathology in nontransgenic rats // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6, N 3. – P. 1396–1413.
- Stefanova N.A. et al. Senescence-accelerated OXYS rats: A model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer disease // *Cell Cycle*. – 2014. – Vol. 13, N 6. – P. 898–909.
- Stefanova N.A. et al. An antioxidant specifically targeting mitochondria delays progression of Alzheimer's disease-like pathology // *Aging (Albany, NY)*. – 2016. – Vol. 8, N 11. – P. 2713–2733.
- Stefanova N.A. et al. Alzheimer's disease-like pathology in senescence-accelerated OXYS rats can be partially retarded with mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 // *J. Alzheimer's Dis.* – 2014. – Vol. 38, N 3. – P. 681–694.
- Tyumentsev M.A., Stefanova N.A., Muraleva N.A., Rumyantseva Y.V., Kiseleva E., Vavilin V.A., Kolosova N.A. Mitochondrial dysfunction as a predictor and driver of Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats // *J. Alzheimer's Dis.* – 2018. – Vol. 63, N 3.

**РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ И АНТИАПОПТОЗНОГО БЕЛКА BCL-2
ВО ВЗАИМООТНОШЕНИЯХ МИКОБАКТЕРИЙ С КЛЕТКАМИ-ХОЗЯЕВАМИ
В ГРАНУЛЕМАХ МЫШЕЙ С ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ**

Е.Г. Уфимцева

НИИ биохимии, Новосибирск, e-mail: ufim1@ngs.ru

Макрофаги являются клетками-хозяевами для вызывающих туберкулез (ТБ) микобактерий, которые способны персистировать в макрофагах годами и даже десятилетиями (Lawn, Zumla, 2011). Латентный бессимптомный этап ТБ инфекции характеризуется образованием провоспалительных гранул – структурных скоплений иммунных клеток: макрофагов, дендритных клеток, нейтрофилов, содержащих микобактерии. Апоптоз клеток, инфицированных микобактериями, считается одним из главных механизмов борьбы организма животных и человека с ТБ инфекцией (Behar, et al., 2011).

В наших исследованиях мышинных гранул в культуре *ex vivo* не были выявлены морфологические признаки гибели клеток-хозяев с разной степенью зараженности микобактериями вакцины БЦЖ (аттенюированный штамм *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin, BCG) ни по механизмам апоптоза, ни по пути некроза при латентной ТБ инфекции мышей линии BALB/c (Ufimtseva, 2013, 2015, 2016). С помощью световой и конфокальной микроскопии препаратов клеток, окрашенных иммуноцитохимически и/или иммунофлуоресцентно, в данной работе были проанализированы мышинные гранулы и контрольные макрофаги на наличие индукторов, ингибиторов и маркеров апоптозной гибели клеток.

Во всех гранулах из селезенки исследованных мышей обнаружили значительное количество макрофагов как с микобактериями, так и без микробов, цитоплазма которых была окрашена на провоспалительный цитокин и индуктор апоптоза TNF α , часто очень интенсивно. При этом рецептор CD30, входящий в подгруппу рецепторов выживания суперсемейства рецепторов к белку TNF α и модулирующий влияние цитокина на жизнеспособность клеток, выявили на плазматической мембране только небольшого числа макрофагов гранулы.

Мультифункциональный скэвинджер-рецептор CD36, один из активаторов каспаз и апоптоза, обнаружили на мембранах большого числа макрофагов, дендритных клеток и лимфоцитов гранулы. Следовательно, макрофаги гранулы мышей с повышенным количеством рецепторов CD36 были предрасположены не только к поглощению погибших лимфоцитов и тромбоцитов гранулы, что ранее наблюдали, но и к своей деструкции по каспазозависимым механизмам апоптоза в процессе развития у мышей латентной ТБ инфекции.

Большинство клеток гранулы мышей также содержали рецептор смерти Fas/CD95 в повышенном количестве как в микродоменных структурах, так и по всей поверхности плазматической мембраны клеток и, соответственно, были готовы к реализации запуска апоптоза по одному из рецепторных механизмов.

Для обнаружения проапоптозных белков Bax и Bad использовали антитела, выявлявшие их общие формы без учета конформационно-измененных или фосфорилированных форм. Белки Bax и Bad выявили во всех клетках гранулы мышей, поскольку они являются конститутивными белками клеток млекопитающих и всегда присутствуют в цитоплазме. Однако колокализация белков Bax и Bad на небольших округлых структурах разного размера, расположенных дискретно на периферии от ядра и, возможно, являющихся митохондриями, указывала на их совместное проапоптозное действие в клетках гранулы мышей.

Белок P53, при накоплении в клетках запускающий программу стресс-зависимого митохондриального пути апоптоза, не наблюдали ни в цитоплазме, ни в ядрах макрофагов и дендритных клеток гранулем как содержащих микобактерии, так и не имевших микробов. Следовательно, стабилизации и накопления белка P53 в клетках гранулем мышей не установили, что также указывало, вместе с неизменной морфологией их ядер без признаков конденсации хроматина и сегрегации ядрышек, на отсутствие повреждений ДНК в клетках гранулем и, опосредованно, на недостаток митохондриальных активаторов этого процесса.

Активацию каспазы-3, как одного из главных маркеров развития апоптозной гибели клеток, анализировали с использованием антител к экзекUTORной форме этого фермента и обнаружили в цитоплазме только единичных макрофагов, дендритных клеток, фибробластов и мегакариоцитов гранулем мышей.

Таким образом, в гранулемах на латентной стадии ТБ инфекции мышей при повышенном содержании индуктора апоптоза TNF α , проапоптозных белков Bax и Bad, рецептора смерти Fas/CD95 и скэвинджер-рецептора CD36 не выявили ни стабилизации белка P53, ни активации каспазы-3 в макрофагах и дендритных клетках вне зависимости от присутствия в них микобактерий. Соответственно, блокирование развития апоптозной гибели клеток могло происходить, вероятно, на стадии обратимых изменений до начала действия митохондриальных и постмитохондриальных факторов и эфТОКТОРОВ апоптоза.

Белок Bcl-2 считается одним из главных защитников клеток от нарушений проницаемости мембраны митохондрий и развития апоптоза (Van Loo, et al., 2002). При иммуноцитохимическом выявлении белка Bcl-2 наблюдали интенсивное окрашивание на данный маркер цитоплазмы подавляющего большинства макрофагов, дендритных клеток, фибробластов и других клеток гранулем мышей. При иммунофлуоресцентной визуализации выявили как диффузное окрашивание на Bcl-2 антиген цитоплазмы макрофагов гранулем, и с микобактериями и без них, так и интенсивное мечение небольших округлых структур разного размера, дискретно расположенных по всему пространству клеток. Часть дискретных структур, окрашенных на белок Bcl-2, колокализовалась с красителем митохондрий MitoTracker Deep Red FM. Белок Bcl-2 также колокализовался с флуоресцентным прижизненным потенциал-зависимым красителем митохондрий DiOC₆ на небольших дискретных структурах аналогичного размера, как и при окраске MitoTracker, по всей цитоплазме макрофагов гранулем. Также выявили колокализацию белка Bcl-2 с проапоптозным белком Bax в клетках гранулем. В макрофагах культур клеток костного мозга и перитонеального экссудата интактных мышей, контрольных или зараженных BCG микобактериями *in vitro*, активации продукции белка Bcl-2 не обнаружили в течение 4-120 ч анализа (Ufimseva, 2017). Таким образом, гранулемы мышей с латентной ТБ инфекцией характеризовались повышенным содержанием белка Bcl-2 в различных компартментах клеток, в том числе и на митохондриях, вне зависимости от присутствия в клетках микобактерий.

Во время анализа на конфокальном микроскопе клеток гранулем, выделенных из селезенки мыши 23 и окрашенных с использованием антител на белок Bcl-2 и красителя DiOC₆, а затем фиксированных, наблюдали постепенное исчезновение зеленого сигнала в процессе тестирования. Это событие указывало на постепенную миграцию красителя DiOC₆ из митохондрий в результате деполяризации их мембран и снижения величины мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) в погибших после фиксирования макрофагах гранулем, тогда как интенсивность красного сигнала, соответствующего белку Bcl-2, не изменялась. Также отметим, что после прижизненной длительной процедуры окрашивания макрофаги гранулем мыши 23 сохранили неизменную морфологию и самих клеток и митохондрий в них, как и целостность ядер.

Однако в аналогичных опытах с контрольными перитонеальными макрофагами интактных мышей обнаружили проапоптозные изменения их морфологии при отсутст-

вии окраски на белок Bcl-2 и минимальной флуоресценции красителя DiOC₆. Также выявили фрагментацию ядер перитонеальных макрофагов, характерную для апоптозной гибели клеток, и точечные сигналы красителя DiOC₆ в околоядерных районах, указывавшие на сниженный $\Delta\Psi_m$ митохондрий. Вероятно, в процессе окрашивания из-за отсутствия белка Bcl-2 происходило быстрое развитие гибели контрольных перитонеальных макрофагов с разрушением их ядер и пространственно ориентированной сети митохондрий с перемещением органелл в зону ядра.

Ранее мы установили (Ufimtseva, 2015), что треть макрофагов гранулем из селезенки мыши 23 содержали значительное количество микобактерий, в том числе и размножающиеся в колониях с корд-морфологией, что является признаком вирулентности микобактерий. Однако во всех макрофагах гранулем мыши 23, интенсивно окрашенных на антиапоптозный белок Bcl-2, не наблюдали морфологических признаков гибели клеток ни по механизмам апоптоза, ни по пути некроза. Следовательно, белок Bcl-2, обнаруженный в больших количествах и в цитоплазме и на митохондриях макрофагов гранулем мыши 23, мог быть одним из факторов защиты клеток от гибели как при проведении длительных процедур прижизненной окраски в культуре *ex vivo*, так, вероятно, и *in vivo* в гранулемах с большим числом инфицированных клеток.

В результате, по совокупности полученных данных предположили, что именно повышенная продукция антиапоптозного белка Bcl-2 в клетках гранулем и его локализация в больших количествах на митохондриях могли внести существенный вклад в сохранение жизнеспособности клеток гранулем не только в культуре *ex vivo* или в процессе прижизненного окрашивания на ряд маркеров, но и в организме мышей на разных сроках латентной ТБ инфекции при значительном давлении микобактериальных, провоспалительных и проапоптозных факторов.

Литература

Behar S., Martin C., Booty M., Nishimura T., Zhao X., Gan H., Divangahi M., Remold H. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis* // *Mucosal Immunology*. – 2011. – V. 4. – P. 279–287.

Lawn S., Zumla A. Tuberculosis // *Lancet*. – 2011. – V. 378. – P. 57–72.

Ufimtseva E. Differences between *Mycobacterium*-host cell relationships in latent tuberculous infection of mice *ex vivo* and mycobacterial infection of mouse cells *in vitro* // *Journal of Immunology Research*. – 2016. – Article ID 4325646. – P. 1–21.

Ufimtseva E. Investigation of functional activity of cells in granulomatous inflammatory lesions from mice with latent tuberculous infection in the new *ex vivo* model // *Clinical and Developmental Immunology*. – 2013. – Article ID371249. – P. 1–14.

Ufimtseva E. *Mycobacterium*-host cell relationships in granulomatous lesions in a mouse model of latent tuberculous infection // *BioMed Research International*. – 2015. – Article ID948131. – P. 1–16.

Ufimtseva E. The control of apoptotic death in the cells of granulomatous inflammatory lesions from mice with latent tuberculous infection in the *ex vivo* model // *Immunome Research*. – 2017. – V. 13. – Article 128. – P. 1–19.

Van Loo G., Saelens X., van Gurp M., MacFarlane M., Martin S., et al. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death and Differentiation*. – 2002. – V. 9. – P. 1031–1042.

**НАНОЧАСТИЦЫ МЕТАЛЛИЧЕСКОГО СЕРЕБРА Ag(0) ВЫЗЫВАЮТ
АПОПТОЗ МАКРОФАГОВ МЫШЕЙ, *IN VITRO* ИНФИЦИРОВАННЫХ
МИКОБАКТЕРИЯМИ ВАКЦИНЫ БЦЖ, БЕЗ ИНДУКЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО
СТРЕССА В ЦИТОПЛАЗМЕ И МИТОХОНДРИЯХ**

Е.Г. Уфимцева

НИИ биохимии, Новосибирск, e-mail: ufim1@ngs.ru

Туберкулез (ТБ), вызываемый внутриклеточным макрофагальным патогеном *Mycobacterium tuberculosis*, остается одной из значимых проблем здравоохранения. Отрицательной тенденцией последних лет в мире стало прогрессирующее увеличение числа случаев первичного заражения антибиотико-устойчивыми штаммами *M. tuberculosis* с развитием остро-прогрессирующих форм лекарственно-резистентного ТБ с тяжелым клиническим течением и значительной распространенностью патологического процесса. Все более широкое распространение штаммов микобактерий с множественной лекарственной устойчивостью к антибиотикам ставит в качестве актуальной задачи поиск новых способов и подходов как для подавления инфекции, так и для сокращения сроков лечения ТБ без снижения его эффективности. Одним из перспективных вариантов может быть применение препаратов наночастиц серебра, проявляющих высокую селективную бактерицидную активность в отношении прокариот (Rudramurthy et al., 2016; Wang et al., 2017).

Человек заражается *M. tuberculosis* в результате аэрозольной инфекции. Макрофаги легких захватывают микобактерии путем фагоцитоза и уничтожают их в фаголизосомах с помощью активных форм кислорода и азота, лизосомальных гидролаз и токсических пептидов в среде с низким значением pH. В основе развития туберкулезного заболевания лежит, как правило, неспособность макрофагов разрушать поглощенные микобактерии.

Ранее при исследовании культур клеток костного мозга и перитонеальных макрофагов мышей линии BALB/c, *in vitro* инфицированных микобактериями вакцины БЦЖ (аттенуированный штамм *M. bovis*, Bacillus Calmette-Guérin, BCG), мы обнаружили бактерицидную активность препаратов наночастиц металлического серебра Ag(0) размером 2–5, 10–15 и 35–40 нм, предоставленных для тестирования И.Д. Ивановым (Институт молекулярной биологии и биофизики, Новосибирск), в концентрации 5,0 мкг/мл (Уфимцева и др., 2016). Для инфицирования мышинных клеток была использована вакцина БЦЖ, поскольку при тестировании ряда антимикробных препаратов было найдено хорошее соответствие между результатами, полученными в экспериментах со штаммами *M. tuberculosis* и BCG микобактериями (Altaf et al., 2010). Также, BCG микобактерии – один из модельных объектов для исследования патогенеза микобактерий туберкулезного комплекса в клетках-хозяевах, поскольку имеют тот же состав клеточной стенки, что и возбудители туберкулеза, но безопасны для человека (Shiloh et al., 2010). Однако при совместном культивировании в фосфатном буфере на +37 °C в бактериологических экспериментах наночастицы серебра Ag(0) разного размера в концентрации 5,0 мкг/мл не снижали жизнеспособность грамположительных BCG микобактерий в течение 2–72 ч анализа, одновременно эффективно предотвращая размножение грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* и микрококков в этих растворах. Следовательно, анализ механизмов бактерицидного действия наночастиц серебра на внутриклеточные микобактерии в клетках-хозяевах остается актуальной задачей как для развития нанобиотехнологических исследований, так и для использования продуктов нанобиотехнологии в связи с повсеместным распространением штаммов микобактерий с множественной лекарственной устойчивостью к антибиотикам.

Исследование механизмов бактерицидного действия наночастиц серебра Ag(0) разного размера в концентрации 5,0 мкг/мл провели в культурах мышинных перитонеальных макрофагов, как инфицированных BCG микобактериями, так и в контрольных клетках без заражения, с добавлением или без добавления в разных сочетаниях индукторов образования активных форм кислорода (перекись водорода H₂O₂), апоптоза и аутофагии (ABT 737), антиоксидантов (восстановленный глутатион GSH или митохондриально направленный LiCl), противотуберкулезного лекарства изониазида. На 2, 4, 6 и 24 ч тестирования в культуры макрофагов вносили прижизненные красители для детекции образования в мышинных клетках активных форм кислорода в цитоплазме (CellROX Deep Red Reagent и H₂DCFDA) и митохондриях (MitoSOX Red Indicator), активации каспаз 3/7 (CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent), развития апоптоза по определению фосфатидилсерина на внешней плазматической мембране (Annexin V-FITC) или некроза (Hoechst 33342 и PI). Затем флуоресцентные метки проанализировали на приборе In Cell Analyzer 2200. Иммунофлуоресцентно окрашенные препараты культур макрофагов также исследовали на конфокальном микроскопе LSM-780 на активацию продукции iNOS, провоспалительных цитокинов TNF α , IFN γ и IL-1 α , генотоксического стресса с определением стабилизации белка P53 в цитоплазме и ядре клеток мышей и образования двунитевых разрывов в ДНК по появлению γ H2AX-меченых фокусов в ядрах макрофагов.

В результате в мышинных макрофагах, инфицированных BCG микобактериями или нет, на 2, 4 и 6 ч тестирования только после добавления наночастиц серебра Ag(0) разного размера наблюдали активацию каспаз 3/7 и развитие апоптоза при отсутствии образования активных форм кислорода: H₂O₂ (детекция с H₂DCFDA), митохондриального O₂⁻ (детекция с MitoSOX Red Indicator) и других типов (детекция с CellROX Deep Red Reagent). Проведенный анализ не выявил активации продукции провоспалительных цитокинов TNF α , IFN γ и IL-1 α , iNOS и развития генотоксического стресса во всех исследованных культурах макрофагов, инкубированных как с BCG микобактериями, так и с наночастицами серебра Ag(0) разного размера, в том числе при совместном культивировании на всех сроках тестирования. Увеличение образования активных форм кислорода (детекция с CellROX Deep Red Reagent) обнаружили на 24 ч эксперимента только в культурах макрофагов, инфицированных BCG микобактериями, при культивировании с наночастицами серебра Ag(0) размером 35-40 нм (23,1 $\pm$ 0,4 % CellROX-положительных клеток), которое снижалось до цифр, выявленных в контрольных клетках (3,4 $\pm$ 0,3 % CellROX-положительных клеток), при добавлении антиоксиданта GSH (1,4 $\pm$ 0,2% CellROX-положительных клеток), но не LiCl (16,3 $\pm$ 0,4 % CellROX-положительных клеток). Однако во всех культурах макрофагов не обнаружили увеличения производства ни H₂O₂ (детекция с H₂DCFDA), ни митохондриального O₂⁻ (детекция с MitoSOX Red Indicator). Вероятно, увеличение окислительных продуктов, детектируемых с помощью CellROX Deep Red Reagent, именно в инфицированных макрофагах произошло из-за усиления элиминации микобактерий в лизосомах клеток, поскольку в этот период времени наблюдали появление колокализации BCG микобактерий, визуализированных с использованием антител на главный гликолипид клеточной стенки микобактерий липоарабиноманнан, со структурами, окрашенными маркером лизосом LysoTracker Red DND-99.

В итоге, проведенное исследование показало, что в основе бактерицидного и проапоптозного действия использованных наночастиц серебра Ag(0) в мышинных макрофагах, инфицированных *in vitro* микобактериями вакцины БЦЖ, нет активации ни окислительного, ни генотоксического стрессов, которые по данным литературы (Dayem et al., 2017; Wang et al., 2017) предполагались основными механизмами действия использованных препаратов. Также не обнаружили активации продукции провоспалительных молекул и цитокинов в исследованных мышинных клетках. Следовательно, необходимо

продолжение поиска механизмов действия наночастиц серебра Ag(0) разного размера на микобактерии в макрофагах мышей.

Благодарим за препараты наночастиц серебра Ag(0) И.Д. Иванова, за помощь в работе на конфокальном микроскопе LSM-780 С.И. Байбородина (Центр коллективного пользования по микроскопическим исследованиям ФНЦ ИЦиГ СО РАН, Новосибирск) и на приборе In Cell Analyzer 2200 Е.В. Воронцову (Институт молекулярной биологии и биофизики, Новосибирск).

Литература

Уфимцева Е.Г., Попов А.В., Иванов И.Д. Биологическая активность наночастиц металлического серебра разного размера в клетках костного мозга и перитонеальной полости мышей, инфицированных вакциной БЦЖ *in vitro* // Биофармацевтический журнал. – 2016. – Т. 8. – С. 52-60.

Altaf M., Miller C.H., Bellows D.S., O'Toole R. Evaluation of the *Mycobacterium smegmatis* and BCG models for the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* inhibitors // Tuberculosis. – 2010. – V. 90. – P. 333–337.

Dayem A.A., Hossain M.K., Lee S.B., Kim K., Saha S.K., Yang G.-M., Choi H.Y., Cho S.-G. The role of reactive oxygen species (ros) in the biological activities of metallic nanoparticles // International Journal of Molecular Sciences. – 2017. – V. 18. – Article 120. – P. 1–21.

Rudramurthy G.R., Swamy M.K., Sinniah U.R., Ghasemzadeh A. Nanoparticles: alternatives against drug-resistant pathogenic microbes // Molecules. – 2016. – V. 21. – Article 836. – P. 1–30.

Shiloh M., DiGiuseppe Champion P.A. To catch a killer. What can mycobacterial models teach us about *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis? // Current Opinion in Microbiology. – 2010. – V. 13. – P. 86–92.

Wang L., Hu C., Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future // International Journal of Nanomedicine. – 2017. – V. 12. – P. 1227–1249.

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ И ЯДЕРНАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ WEN1 И WEN2 ИЗ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM* L. И МОДУЛЯЦИЯ КОРОТКИМИ ПЕПТИДАМИ ИХ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Л.И. Федорева^{1, 2}, Б.Ф. Ванюшин^{1, 2}

¹ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАН, Москва, e-mail: fedlara@inbox.ru

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, e-mail: vanyush@belozersky.msu.ru

В стареющих колеоптилях проростков пшеницы обнаружены везикулы, представляющие собой различного размера фрагменты цитоплазмы, содержащие одну или несколько митохондрий (Bakeeva, 1999). Цитоплазма в обнаруженных везикулах не имеет признаков деструкции, в отличие от содержимого окружающей их гигантской вакуоли. Из фракции везикул нами выделены и охарактеризованы две эндонуклеазы WEN1 и WEN2 (Fedoreyeva, 2007, Федорева, 2008).

Эндонуклеазы WEN1 и WEN2 чувствительны к статусу метилирования ДНК. Эндонуклеаза WEN2 предпочтительно расщепляет неметилированную, а WEN1 метилированную ДНК. S-аденозил-L-метионин (SAM) значительно усиливает действие эндонуклеазы WEN2 и ингибирует WEN1. Тем самым, открыт новый механизм разнонаправленной регуляции активности растительных эндонуклеаз SAMом. Нуклеазы WEN1 и WEN2 являются нейтральными Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимыми ферментами. Ионы Mg^{2+} активируют эндонуклеазу WEN1 и эндонуклеазу WEN2. Ионы Ca^{2+} сильно активируют эндонуклеазу WEN1 и заметно ингибируют эндонуклеазу WEN2. Такая разнонаправленная зависимость действия эндонуклеаз WEN1 и WEN2 от ионов Ca^{2+} вероятно является важной для их функционирования в клетке.

В молодых проростках активность WEN1 локализуется в митохондриях. В процессе развития проростков WEN1 обнаруживается в ядрах и везикулярной фракции, содержащей митохондрии. Нуклеазная активность (НА) WEN2 в молодых проростках локализуется в ядерной фракции, в процессе развития проростков этот фермент обнаруживается в везикулярной фракции. Резкое увеличение НА после 6-го дня развития проростка, по-видимому, связано с нуклеазами, участвующими в апоптозной межнуклеосомной фрагментацией ДНК. При выращивании этиолированных проростков в присутствии этрела (продуцент этилена) в них наблюдается резкое увеличение (примерно в 6 раз) НА. В присутствии антиоксиданта ионола (BHT) в проростках ингибируется апоптозная фрагментация ДНК. Мы установили, что при этом суммарная нуклеазная активность в проростках уменьшается и фрагментация ДНК не происходит. WEN1 и WEN2 в стареющих колеоптилях индуцируются при увядании и стимулируются «гормоном старения» – этиленом.

В изолированных ядрах фермент WEN2 расщеплял ядерную ДНК на крупные, а WEN1 – на более короткие фрагменты. При одновременном воздействии эндонуклеаз WEN1 и WEN2 на изолированные ядра проростков пшеницы выявлялась типичная картина межнуклеосомной фрагментации ДНК с образованием так называемой «лестницы» из фрагментов ДНК.

Из везикулярной фракции стареющих колеоптилей проростков пшеницы выделена и охарактеризована адениновая ДНК-метилтрансфераза (WAD). Это – первая адениновая ДНК-метилтрансфераза, обнаруженная у эукариот вообще (Fedoreyeva, 2002).

WAD предпочитает метилировать одноцепочечную ДНК, ее максимальная активность связана с репликацией митохондриальной ДНК. Предполагается, что WAD участвует в репликации мтДНК. Не исключено, что контроль за репликацией мтДНК аде-

ниновым ДНК-метилованием в известной мере сходен с явлением хозяйской рестрикции-модификации (R-M), свойственной бактериям

Не исключено, что эндонуклеазы WEN1 и WEN2 могут принимать участие и в репарации и рекомбинации митохондриальной активно реплицирующейся ДНК.

Короткие пептиды (из 2–4 аминокислотных остатков) модулируют гидролиз ДНК эукариотическими CNG- и CG-сайт специфическими пшеничными эндонуклеазами WEN1 и WEN2 в зависимости от статуса метилирования ДНК. Модуляция активности этих ферментов пептидами может быть обусловлена тем, что пептиды связываются с определенными сайтами ДНК. Кроме того, действие пептидов может быть опосредовано гистонами. Это очень важный факт, поскольку в клетке пептиды изначально должны найти в хроматине те места, которые доступны для связывания с ДНК, а эта доступность может определяться гистонами. Все исследованные нами пептиды модулируют также гидролиз однотяжевых и двутяжевых олигонуклеотидов, содержащих CNG и CG-сайты, и эта модуляция зависит от наличия метильной группы в олигонуклеотидах (Хавинсон, 2011). Предполагается, что сайт-специфические взаимодействия пептидов с ДНК могут эпигенетически контролировать генетические функции клетки.

Работа выполнена по госзаданию АААА-А17-117091460012-8 и поддержана РФФИ (№ 18-016-00150).

Литература

Федорева Л.И., Александрушкина Н.И., Дунаевский Я.Е., Белозерский М.А., Ванюшин Б.Ф. Влияние продуцента этилена этрела и антиоксиданта ионола (ВНТ) на протеолитический аппарат в coleoptiles проростков пшеницы при сопровождающем ранний онтогенез апоптозе // Биохимия. – 2003. – Т. 68. – С. 570–576.

Федорева Л.И., Соболев Д.Е., Ванюшин Б.Ф. S-аденозил-L-метионинзависимая и чувствительная к статусу метилирования ДНК. эндонуклеаза WEN2 из coleoptiles пшеницы // Биохимия. – 2008. – Т. 73. – С. 1243–1251.

Хавинсон В.Х., Федорева Л.И., Ванюшин Б.Ф. Короткие пептиды модулируют действие эукариотических эндонуклеаз из проростков пшеницы // Докл. РАН. – 2011. – Т. 437. – С. 124–127.

Bakeeva, L.E., Kirnos, M.D., Aleksandrushkina, N.I., Kazimirchuk, S.B., Shorning, B.Yu., Zamyatnina, V.A., Yaguzhinsky, L.S., and Vanyushin, B.F. Subcellular reorganization of mitochondria producing heavy DNA in aging wheat coleoptiles // FEBS Lett. – 1999. – V. 457. – P. 122–125.

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

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

УЧАСТИЕ ВНУТРЕННЕЙ И ВНЕШНИХ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ NADH ДЕГИДРОГЕНАЗ В ОТВЕТЕ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* НА ТЕПЛОВОЙ ШОК

И.В. Федосеева, Д.В. Пятрикас, А.В. Степанов,
А.В. Федяева, Н.Н. Варакина, Е.Г. Рихванов

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

Мягкий тепловой стресс индуцирует синтез белков теплового шока (БТШ) и развитие устойчивости к жесткому тепловому шоку. Это явление известно как индуцированная термотолерантность. Ранее было показано, что митохондрии участвуют в активации экспрессии БТШ (Рихванов и др., 2014). Продукция АФК рассматривается как вероятный триггер синтеза БТШ, а митохондрии могут быть его основным источником (Рихванов и др., 2014). Ранее нами было показано, что внутренние и внешние митохондриальные NADH–дегидрогеназы дрожжей участвуют в повышении продукции АФК (Fedoseeva et al., 2017). В клетках дрожжей функционируют две внешние NADH–дегидрогеназы (*Nde1p* и *Nde2p*) и одна внутренняя (*Ndi1p*). Поэтому целью настоящей работы являлось изучение роли этих ферментов в ответе дрожжевой клетки на тепловое воздействие. Для этого сравнивали термотолерантность, индуцированную термотолерантность, индукцию синтеза *Hsp104p* и продукцию АФК в клетках дрожжей с нарушением функционирования митохондриальных NADH–дегидрогеназ.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A (родительский тип, РТ) и мутанты, в которых отсутствуют внешние (*nde1Δ* и *nde2Δ*) и внутренняя (*ndi1Δ*) NADH–дегидрогеназы. Эксперименты выполняли по методикам, опубликованным ранее (Fedoseeva et al., 2017).

Результаты

При выращивании дрожжей в качестве источника углерода использовали глюкозу (репрессированный дыхательный метаболизм) или галактозу (активный дыхательный метаболизм). Глюкоза подавляет дыхательный метаболизм митохондрий, в том числе, активность митохондриальных NADH–дегидрогеназ. Галактоза – слабо ферментируемый сахар и, соответственно, активирует NADH–дегидрогеназы. Сравнение базовой термотолерантности на среде с глюкозой показало, что клетки *ndi1Δ* мутанта отличаются повышенной устойчивостью к тепловому воздействию. У мутанта *nde2Δ* также незначительно повышалась термотолерантность. Различий между *nde1Δ* мутантом и РТ не было обнаружено. При активации дыхательного метаболизма на среде с галактозой различий по термотолерантности не наблюдалось. Таким образом, делеция гена *NDI* и в меньшей степени *NDE2* повышает термотолерантность в условиях репрессированного дыхательного метаболизма. Этот эффект подавляется при активации дыхательного метаболизма.

На следующем этапе изучали эффект делеций изучаемых генов на развитие индуцированной термотолерантности. Для этого клетки, выращенные при 30 °С на среде с глюкозой или галактозой, обрабатывали при 39 °С и подвергали жесткому тепловому воздействию 50 °С. Как и ожидалось, предварительная обработка 39 °С повышала устойчивость клеток при последующем жестком тепловом воздействии. На среде с глюкозой утрата *NDE1* не влияла на развитие индуцированной термотолерантности, а делеция генов *NDE2* и *NDI*, напротив, ее стимулировала (рис. 1, а). Другие результаты были получены при использовании галактозы (см. рис. 1, а). Не было обнаружено различий между клетками мутантов *nde2Δ* и *ndi1Δ* и РТ. Интересно отметить, что отсутствие гена *NDE1* снижало развитие индуцированной термотолерантности.

Синтез Hsp104p повышается при мягком тепловом воздействии 39 °С (рис. 1, б). Несмотря на то, что утрата изучаемых генов по-разному влияла на индуцированную термотолерантность (см. рис. 1, а), не было обнаружено значительных различий по уровню синтеза Hsp104p в клетках РТ и мутантов как при инкубации клеток на среде с глюкозой, так и с галактозой (см. рис. 1, б).

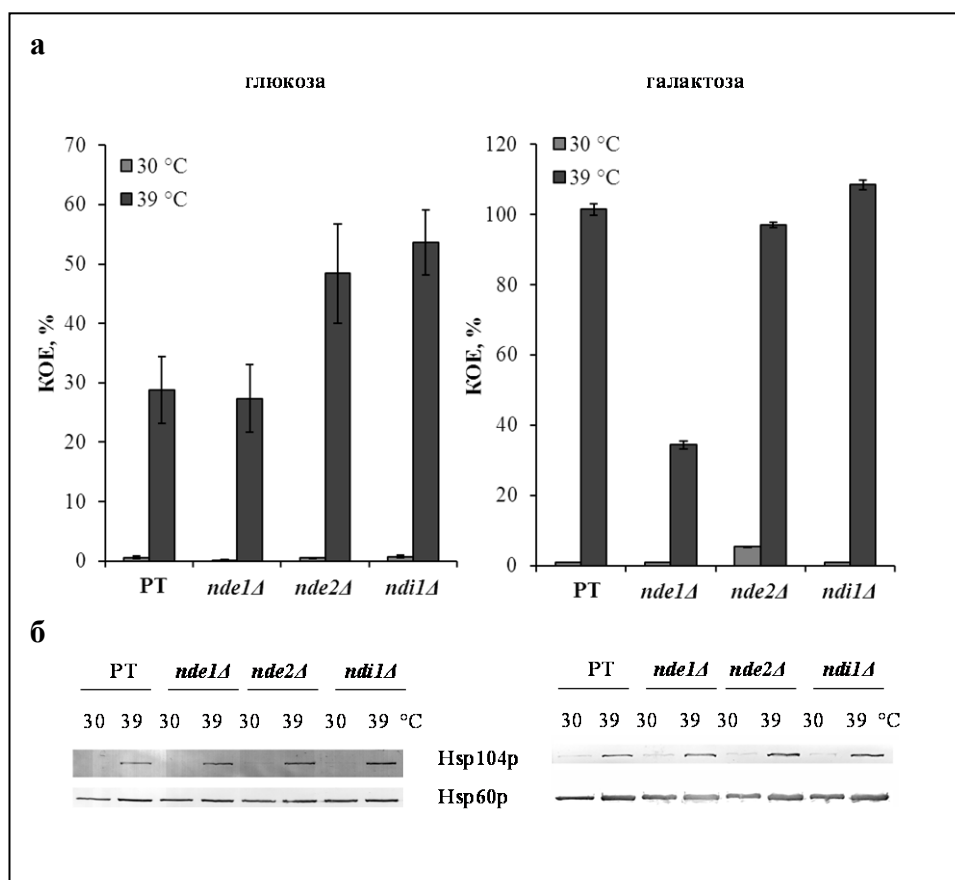


Рис. 1. Индуцированная термотолерантность (а) и индукция синтеза Hsp104p (б) в клетках мутантов *nde1Δ*, *nde2Δ* и *ndi1Δ*.

Клетки штаммов родительского типа W303-1A (РТ) и мутантов *nde1Δ*, *nde2Δ* и *ndi1Δ* выращивали на среде с глюкозой или галактозой инкубировали при 39 °С (30 мин) и (а) подвергали действию теплового шока 50 °С (глюкоза – 8 мин; галактоза – 16 мин), после чего определяли выживаемость с помощью подсчёта колониеобразующих единиц (КОЕ) спустя 24-48 ч инкубации при 30 °С, или (б) выделяли общий белок и проводили вестерн-блоттинг. Представлены данные трёх или четырёх независимых экспериментов $\pm$ SE.

Повышение продукции АФК рассматривается как индуктор экспрессии стрессовых генов (Рихванов и др., 2014). Тепловой шок 45 °С вызывал значительное усиление продукции АФК как на глюкозе, так и на галактозе (рис. 2). На среде с глюкозой не наблюдалось различий по уровню АФК. Напротив, на среде с галактозой утрата генов *NDE1* и *NDI1* снижала продукцию АФК.

Обсуждение

В условиях репрессированного дыхательного метаболизма (при выращивании на глюкозе) наблюдается снижение активности ряда митохондриальных ферментов, в том числе митохондриальных NADH–дегидрогеназ (Mailloux, 2015). Полученные результаты показывают, что, несмотря на репрессию АТФ-генерирующих функций митохондрий, Nde2p и Ndi1p играют важную роль в ответе дрожжевой клетки на тепловое воздействие. Делеция генов, кодирующих эти ферменты, не влияла на синтез Hsp104p, но повышала базовую и индуцированную термотолерантность. Утрата этих генов не приводила к достоверному снижению продукции АФК. Поэтому не наблюдалось связи

между развитием индуцированной термотолерантности, синтезом Hsp104p и усилением продукции АФК при тепловом шоке.

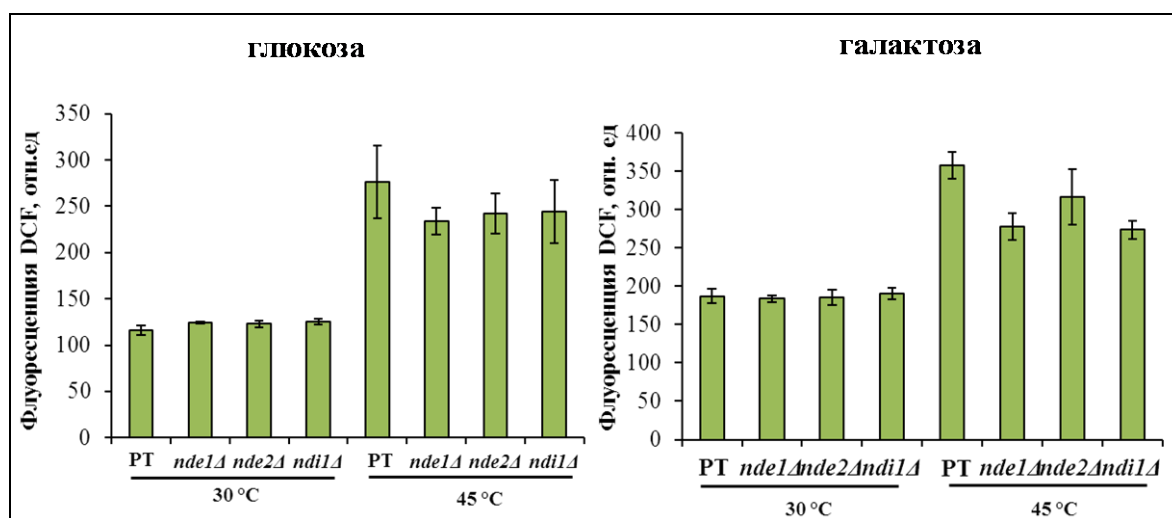


Рис. 2. Продукция АФК в клетках одиночных *nde1Δ*, *nde2Δ* и *ndi1Δ* мутантов при тепловом шоке.

Клетки штаммов родительского типа W303-1A (PT), одиночных *nde1Δ*, *nde2Δ* и *ndi1Δ* мутантов выращивали на среде с глюкозой или галактозой и инкубировали при 45 °C. Флуоресценцию DCF (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate) измеряли сразу же после окончания теплового шока 45 °C, 10 мин. Представлены данные трёх или четырёх независимых экспериментов ± SE.

Ген *NDI1* *S. cerevisiae* кодирует внутреннюю митохондриальную NADH-дегидрогеназу и является дрожжевым митохондриальным гомологом фактора, вызывающего апоптоз у млекопитающих (Li et al., 2006). Белок Ndi1p участвует в апоптозе при различных стимулах. Делеция этого гена повышает устойчивость к H₂O₂, ионам Mn и уксусной кислоте (Cui et al., 2012). Участие Ndi1p в апоптозе не зависит от его NADH-дегидрогеназной активности и определяется выходом N-конца этого белка из митохондрий в цитозоль.

Мы полагаем, что в условиях репрессированного дыхания Nde2p и Ndi1p выполняют аналогичную функцию в клетках дрожжей при тепловом шоке. Тепловое воздействие вызывает выход Ndi1p и, возможно, Nde2p из митохондрий в цитозоль, в результате смещается равновесие между защитной программой и программой клеточной гибели.

Литература

- Рихванов Е.Г., Федосеева И.В., Пятрикас Д.В., Степанов А.В., Боровский Г.Б., Войников В.К. Механизм функционирования кальциевой сигнальной системы у растений при действии теплового стресса. Роль митохондрий в этом процессе // Физиология растений. – 2014. – Т. 61. – С. 155–169.
- Cui Y., Zhao S., Wu Z., Dai P., Zhou B. Mitochondrial release of the NADH dehydrogenase Ndi1 induces apoptosis in yeast // Mol. Biol. Cell. – 2012. – V. 23. – P. 4373–4382.
- Li W., Sun L., Liang Q., Wang J., Mo W., Zhou B. Yeast AMID homologue Ndi1p displays respiration-restricted apoptotic activity and is involved in chronological aging // Mol. Biol. Cell. – 2006. – V. 17. – P. 1802–1811.
- Mailloux R.J. Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species // Redox Biol. – 2015. – V. 4. – P. 381–398.
- Fedosееva I.V., Pyatrikas D.V., Stepanov A.V., Fedyayeva A.V., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Borovskii G.B., Rikhvanov E.G. The role of flavin-containing enzymes in mitochondrial membrane hyperpolarization and ROS production in respiring *Saccharomyces cerevisiae* cells under heat-shock conditions // Sci. Rep. – 2017. V. 7: 2586.

УЧАСТИЕ МИТОХОНДРИЙ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ В РАЗВИТИИ ГИБЕЛИ ПРИ ОБРАБОТКЕ ДИУРОНОМ

А.В. Федяева¹, И. Ли², И.В. Любушкина^{1,3}, А.В. Сидоров^{1,4}, Е.Г. Рихванов¹

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

²ФГБОУ ВО Иркутский государственный аграрный университет им. А.А. Ежевского,
Иркутская обл., пос. Молодёжный, e-mail: li05161020@163.com

³ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет,
Иркутск, e-mail: ostrov1873@yandex.ru

⁴ФГБОУ ВО Иркутский государственный медицинский университет Минздрава России,
Иркутск, e-mail: a_v_sidorov@mail.ru

Известно, что митохондрии клеток растений являются одним из основных сайтов продукции активных форм кислорода (АФК) (Møller, 2001). Митохондрии принимают участие в развитии устойчивости клетки к стрессовому воздействию (Huang et al., 2016), либо при сильном действии стресса вовлечены в регуляцию клеточной гибели (Yao et al., 2004). Гербициды могут оказывать фитотоксичный эффект за счет их влияния на митохондрии (Palmeira et al., 1994). Гербицид диурон является ингибитором транспорта электронов. Ранее было показано (Федяева и др, 2014), что тепловой шок приводит в культуре клеток озимой пшеницы к увеличению митохондриального мембранного потенциала (ММП) и повышению АФК, более того, наблюдалась связь между этими процессами.

В связи с чем целью настоящего исследования было изучить влияние диурона на жизнеспособность культуры клеток арабидопсиса, а также оценить его влияние на изменение АФК, митохондриального мембранного потенциала и выявить связь между этими явлениями.

Материалы и методы

В работе использовали гетеротрофную суспензионную культуру клеток арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*). В культуру клеток добавляли диурон (200 мкМ) и инкубировали 1, 24 и 48 ч. Жизнеспособность клеток оценивали с использованием флуоресцентных красителей: FDA и PI. Изменение уровня АФК определяли с использованием флуоресцентного красителя H₂DCF • DA. Определение ММП оценивали по флуоресценции красителя JC-1. Работа проводилась с использованием флуоресцентного микроскопа Axio Observer Z1. Опыты повторяли не менее 3 раз. Полученные данные были обработаны статистически, приведены среднеарифметические значения и стандартные ошибки.

Результаты

Сначала необходимо было оценить влияние гербицида диурона на жизнеспособность культуры клеток арабидопсиса. Динамика инкубации клеток с диуроном показала, что происходило снижение числа живых клеток (рис. 1, а). Через 1 ч после воздействия агента жизнеспособность составляла 60 %, спустя 24 ч – 40%. Гибель почти всех клеток происходила в конце эксперимента (48 ч). Параллельная оценка морфологии клеток показала, что увеличения числа конденсированных клеток не происходило через 1 ч после воздействия диурона, но повышение степени конденсации наблюдалось через 24 и 48 ч инкубации до 24 и 55 %, соответственно (рис. 2, б).

Затем проводилась оценка влияния диурона на развитие окислительного стресса и изменение ММП. Повышение уровня АФК в культуре клеток арабидопсиса происходило только через 1 ч после воздействия диуроном (рис. 1, в). Сходные данные получены

при измерении ММП. Как показано на рис 1, *з*, повышение ММП регистрировалось только у клеток арабидопсиса, которые инкубируются с диуроном в течение 1 ч.

Таким образом, обработка гербицидом диуроном приводит к кратковременному повышению потенциала на внутренней митохондриальной мембране и к развитию окислительного стресса, что сопровождается гибелью клеток, имеющей признак программируемой клеточной гибели (ПКГ).

Обсуждение

Известно, что гербицид диурон является токсичным агентом для клеток растений (Chesworth et al., 2004), животных (Bouilly et al., 2007) и человека (Huovinen et al., 2015). Используемая в данной работе концентрация диурона, вызывала гибель клеток (рис. 1а), что сопровождалось конденсацией протопласта (рис. 1, б), одним из параметров ПКГ (Affenzeller et al., 2009). Поэтому можно предполагать, что обработка диуроном вызывает гибель клеток по типу ПКГ. Другим признаком ПКГ является развитие в клетке окислительного стресса. Как показано в данной работе, сразу после воздействия гербицидом происходило повышение уровня АФК (рис. 1, в). Полученные данные согласуются с результатами других работ, свидетельствующих, что диурон приводит к развитию окислительного стресса в клетках животных (Huovinen et al., 2015) и повышению активности ферментов антиоксидантной защиты в клетках растений (Jin et al., 2017).

Одним из сайтов продукции АФК являются митохондрии (Møller, 2001). Ранее нами было показано, что холодовое и тепловое воздействие приводит к увеличению и одновременному повышению АФК. Более того, наблюдалась зависимость между этими процессами (Lyubushkina et al., 2013; Федяева и др., 2014). Подобная зависимость наблюдалась и в данной работе. Кратковременная обработка диуроном повышала ММП в клетках арабидопсиса, параллельно наблюдалось усиление продукции АФК (рис. 1, *з*). Данные, полученные с использованием диурона, подтверждают причинно-следственную связь между повышением ММП и продукцией АФК.

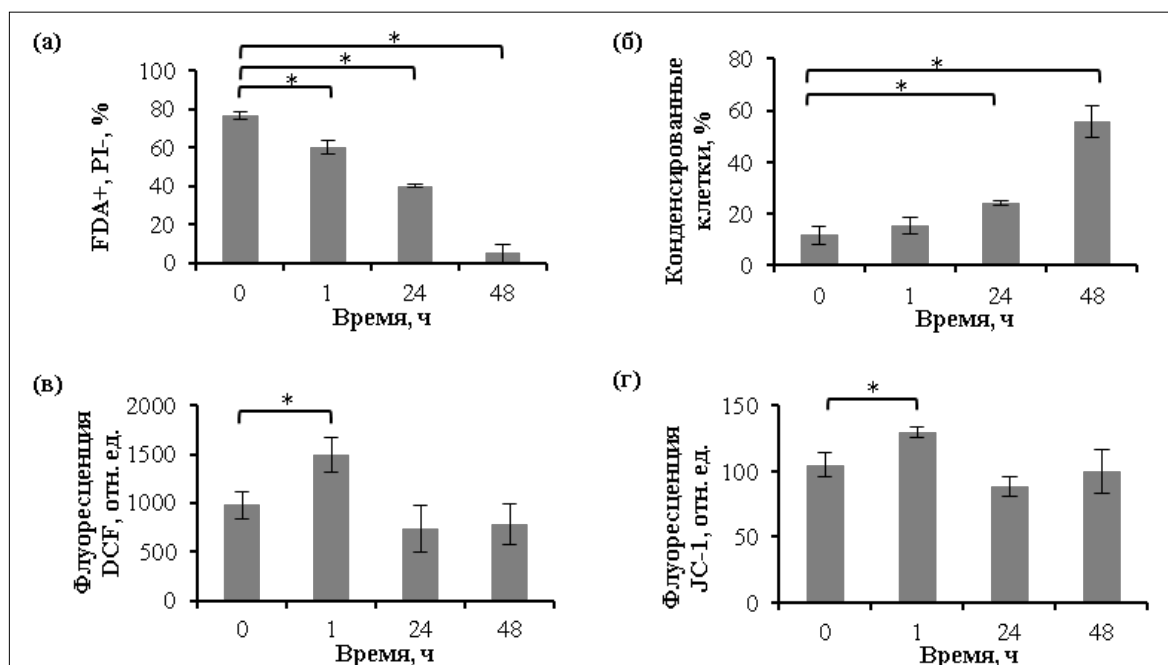


Рис. 1. Временная динамика изменения жизнеспособности (а), конденсации протопласта (б), активных форм кислорода (в), митохондриального мембранного потенциала в культуре клеток арабидопсиса после воздействия гербицида диурона (200 мкМ) в течение 1, 24 и 48 ч.

Количественный обсчет клеток. $n = 3$, $M \pm S.E.$ * – достоверные различия по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

Повышение АФК до критического уровня может иметь отрицательный эффект на жизнеспособность. Поэтому одной из вероятных причин фитотоксического эффекта диурона является его способность вызывать окислительный взрыв в митохондриях растений в результате повышения ММП.

Коллектив авторов выражает благодарность за помощь в научной работе А.В. Степанову.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

Литература

Федяева А.В., Степанов А.В., Любушкина И.В., Побежимова Т.П., Рихванов Е.Г. Тепловой шок индуцирует продукцию активных форм кислорода и повышает потенциал на внутренней митохондриальной мембране в клетках озимой пшеницы // Биохимия. – 2014. – Т. 79. – С. 1476–1486.

Affenzeller M.J., Darehshouri A., Andosch A., Lütz C., Lütz-Meindl U. Salt stress-induced cell death in the unicellular green alga *Micrasterias denticulate* // J Exp Bot. – 2009. – V. 60. – P. 939–954.

Bouilly K., Bonnard M., Cagnaire B., Renault T., Lapègue S. Impact of diuron on aneuploidy and hemocyte parameters in pacific oyster, *Crassostrea gigas* // Arch. Environ. Contam. Toxicol. – 2007. – V. 52. – P. 58–63.

Chesworth J.C., Donkin M.E., Brown M.T. The interactive effects of the antifouling herbicides Irgarol 1051 and Diuron on the seagrass *Zostera marina* (L.) // Aquat Toxicol. – 2004. – V. 66. – P. 293–305.

Huang S., Van Aken O., Schwarzländer M., Belt K., Millar A.H. The roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress response in plants // Plant Physiol. – 2016. – V. 171. – P. 1551–1559.

Huovinen M., Loikkanen J., Naarala J., Vähäkangas K. Toxicity of diuron in human cancer cells // Toxicol In Vitro. – 2015. – V. 29. – P. 1577–1586.

Jin Y., Chen S., Fan X., Song H., Li X., Xu J., Qian H. Diuron treatment reveals the different roles of two cyclic electron transfer pathways in photosystem II in *Arabidopsis thaliana* // Pestic Biochem Physiol. – 2017. – V. 137. – P. 15–20.

Lyubushkina I.V., Grabelnykh O.I., Pobezhimova T.P., Stepanov A.V., Fedyaeva A.V., Fedoseeva I.V., Voinikov V.K. Winter wheat cells subjected to freezing temperature undergo death process with features of programmed cell death // Protoplasma. – 2014. – V. 251. – P. 615–623.

Møller I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 2001. – V. 52. – P. 561–591.

Palmeira C.M., Moreno A.J., Madeira V.M. Interactions of herbicides 2,4-D and dinoseb with liver mitochondrial bioenergetics // Toxicol Appl Pharmacol. – 1994. – V. 127. – P. 50–57.

Yao N., Eisfelder B.J., Marvin J., Greenberg J.T. The mitochondrion – an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* // The Plant Journal. – 2004. – V. 40. – P. 596–610.

АССОЦИАЦИЯ СТРЕССОВЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СВЕТОИНДУЦИРУЕМЫХ БЕЛКОВ С КОМПЛЕКСАМИ ТИЛАКОИДНЫХ МЕМБРАН

Л.С. Шарапова, Н.П. Юрина

ФГБУН Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, e-mail: lubasha1707@mail.ru, nyurina@inbi.ras.ru

Свет необходим для процесса фотосинтеза, однако избыточное освещение приводит к повреждению фотосинтетического аппарата. У растений, водорослей и цианобактерий существуют различные механизмы защиты от светового стресса. Одним из таких механизмов является синтез светоиндуцируемых низкомолекулярных белков тилакоидов, содержащих одну трансмембранную спираль (One-helix protein; ОНР). Эти консервативные белки обнаружены у всех изученных фотосинтезирующих эукариот (оксигенных фототрофов). Показано, что данные белки играют существенную роль в сборке и стабилизации фотосинтетических пигмент-белковых комплексов тилакоидных мембран и, особенно, в реакционных центрах (Beck et al., 2017). У цианобактерий, считающихся эволюционными предшественниками хлоропластов, они называются Hlips (high light-inducible proteins) или SCP (small Cab-like proteins). У *Synechocystis* sp. PCC 6803 идентифицированы пять белков Hli, четыре из которых представляют собой низкомолекулярные белки HliA/HliB, HliC/HliD; пятый белок является С-концевым фрагментом феррохелатазы. Предполагают, что Hlip/Scp белки цианобактерий имеют большое число функций, такие как фотопротекция, сборка и репарация фотосистемы 2 (ФС2), регуляция биосинтеза тетрапирролов и содействие, в качестве вспомогательного фактора, интеграции хлорофилла с хлорофилл-связывающими белками (Юрина и др., 2013; Wang et al., 2008). Таким образом, низкомолекулярные светоиндуцируемые белки играют важную роль в защите фотосинтетического аппарата от фотодеструкции и рассматриваются как одна из защитных систем клетки. Однако вопрос об основной функции Hlip/Scp и их локализации в мембранах тилакоидов остаётся недостаточно исследованным. Данная работа посвящена изучению ассоциации низкомолекулярных светоиндуцируемых белков с комплексами тилакоидных мембран. В качестве объекта исследований были выбраны два вида цианобактерий – *Synechocystis* sp. PCC 6803 (клетки дикого типа и мутанты) и *Arthrospira platensis*. Исследование проводилось с помощью двумерного электрофореза и масс-спектрометрии MALDI-TOF. Для решения поставленных задач тилакоидные мембраны, выделенные из клеток цианобактерий, лизировали мягким неионным детергентом (n-додецил-β-D-мальтозидом). Мембранные белковые комплексы, выделенные из клеток цианобактерий, фракционировали с помощью нативного неокрашенного электрофореза в ПААГ (Clear Native PAGE), затем во втором направлении проводили электрофорез в SDS-PAGE (Акулиникова и др., 2015). На электрофореграмме, полученной в результате фракционирования лизата тилакоидных мембран *Synechocystis* sp., выявлены следующие комплексы: тримеры и мономеры комплекса ФС1, димеры и мономеры комплекса ФС2, цитохромный комплекс, АТФ-азный комплекс, комплекс NAD(P)H-хинон-оксидоредуктазы, а также зона свободных белков. HliA/HliB белки были идентифицированы с помощью иммуноблоттинга. Масс-спектрометрический анализ показал, что Hlips ассоциированы с тримерами фотосистемы 1 (ФС1), комплексами ФС2 и мономерами ФС1. Кроме того, они были обнаружены в зоне свободных белков. Фракционирование лизата тилакоидных мембран *Synechocystis* sp. и *Arthrospira platensis* позволило выявить сходство профилей распределения хлорофилл-белковых комплексов этих цианобактерий. Проведённые исследования ассоциации HliA/HliB белков с фотосистемами *Synechocystis* sp. с использовани-

ем мутантов, дефицитных по ФС2 показали, что HliA/HliB белки ассоциированы не только с тримерами, но и с мономерами ФС1. Ассоциация HliA/HliB белков как с ФС1, так и с комплексом ФС2 указывает на универсальную роль этих белков в защите хлорофилл-белковых комплексов от светового стресса. Белки HliA/HliB обнаружены в тилакоидных мембранах клеток мутантов, не содержащих ФС1 и ФС2. Из полученных данных следует, что белки HliA/HliB синтезируются в клетках цианобактерий даже в отсутствие фотосистем, что указывает на их участие в других клеточных процессах, например, в регуляции биосинтеза хлорофилла.

Работа подготовлена при поддержке программы президиума РАН № 18 «Молекулярная и клеточная биология и постгеномные технологии» и гранта РФФИ № 16-04-01626А.

Литература

Акуликина Д.В., Большевцева Ю.В., Еланская И.В., Карапетян Н.В., Юрина Н.П. // Биохимия. – 2015. – Т. 80. – С. 1522–1531.

Юрина Н.П., Мокерова Д.В., Одинцова М.С. Светоиндуцируемые стрессовые белки пластид фототрофов // Физиол. растений. – 2013. – Т. 60. – С. 611–624.

Beck J., Lohscheider J.N., Albert S., Andersson U., Mendgen K.W., Rojas-Stütz M.C., Adamska I., Funck D. Small One-Helix Proteins Are Essential for Photosynthesis in Arabidopsis // Frontiers in Plant Sci. – 2017. – V. 8. – P. 1–14.

Wang, Q., Jantaro, S., Lu, B., Majeed, W., Bailey, M., and He, Q. The high light-inducible polypeptides stabilize trimeric photosystem I complex under high light conditions in Synechocystis PCC 6803 // Plant Physiol. – 2008. – V. 147. – P. 1239–1250.

РОЛЬ ОРГАНЕЛЛ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ У ЖИВОТНЫХ И ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

*Е.К. Шематорова¹, И.Ю. Словохотов¹, Е.Н. Баранова², М.Р. Халилуев²,
О.Г. Бабак³, В.Н. Клыков¹, Д.Г. Шпаковский¹, С.Г. Спивак^{3,4}, Г.В. Шпаковский¹*

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

²ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии», Москва, e-mail: marat131084@rambler.ru

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

⁴Белорусский государственный медицинский университет,
Минск, Беларусь, e-mail: Sve_spivak@mail.ru

Гормональные функции стероидов как особого класса химических соединений и основные пути их биосинтеза были вначале выяснены у животных. Биосинтез стероидных гормонов в организме млекопитающих включает окислительное расщепление боковой цепи холестерина с последующим регио- и стереоселективным гидрокселированием, которое осуществляется цитохромами P450 – P450_{scs}, P450_{c17}, P450_{c21}, P450_{c11}, P450_{c18} и P450_{c19} [Payne and Hales, 2004; Miller, 2013]. Этапом, лимитирующим скорость стероидогенеза, является доставка холестерина к внутренней мембране митохондрий – процесс, контролируемый целым рядом белковых факторов [Sewer et al., 2007]. Согласно классической схеме стероидогенеза у животных, ключевую роль в биосинтезе стероидных гормонов играет цитохром P450_{scs} (от англ. «side chain cleavage»), который локализован во внутренней мембране митохондрий клеток стероидогенных тканей (прежде всего, коры надпочечников) и, с участием двух других компонентов митохондриальной электротранспортной цепи, аденодоксина (Ad) и аденодоксинредуктазы (AdR), катализирует реакции 22- и 20-гидрокселирования и реакцию расщепления связи C20–C22 с удалением боковой цепи холестерина и превращением его в прегненолон – общий предшественник всех стероидных гормонов животных. Образовавшийся прегненолон, являющийся прогормоном, покидает митохондрии и попадает в эндоплазматический ретикулум. Здесь дальнейшие стадии стероидогенеза катализируют P450_{c17} (осуществляет 17 α -гидрокселирование и лиазную реакцию C17–C20) и P450_{c21} (осуществляет 21-гидрокселирование). Помимо перечисленных цитохромов в стероидогенезе в эндоплазматическом ретикулуме участвует 3 β -гидроксистероиддегидрогеназа / $\Delta^4 \rightarrow \Delta^5$ изомераза (3 β -ГСД). На следующем этапе промежуточные продукты синтеза – 11-дезоксикортикостерон и 11-дезоксикортизол – вновь поступают в митохондрии или секретируются в кровь. В митохондриях клеток коры надпочечников под действием P450_{c18} (двухстадийное 18-окисление) и P450_{c11} (11 β -гидрокселирование) из них образуются соответственно два наиболее важных представителя кортикостероидов – альдостерон и кортизол.

Как видно из вышеизложенного, при биосинтезе стероидных гормонов четко выражен принцип компартментализации. В коре надпочечников цитохромы P450_{scs}, P450_{c18} и P450_{c11} функционируют в митохондриях вместе с FAD-содержащим флавопротеидом аденодоксинредуктазой (AdR) и [2Fe-2S]-ферредоксином (аденодоксин, Ad). Цитохромы P450_{c21} и P450_{c17} осуществляют гидрокселирование стероидов в эндоплазматическом ретикулуме совместно с FAD/FMN-флавопротеидом NADPH-цитохром P450 редуктазой (CPR). Качественные различия состава ферментов стероидогенеза, содержащихся в различных тканях и субклеточных компартментах, а также их

субстратная специфичность определяют последовательности путей биосинтеза кортикостероидов, прогестиннов и половых гормонов.

В отличие от животных и дрожжей, у которых практически единственными стеринами (стероидными липидами) являются соответственно холестерин и эргостерин, в растениях присутствуют по крайней мере четыре вида фитостеринов: β -ситостерин, кампестерин, стигмастерин и холестерин. Поскольку гомологи генов, кодирующих CYP11A1 (P450_{scs}) и другие митохондриальные цитохромы P450 (клан 'mito CYP') во всех уже многочисленных просеквенированных геномах растений так и не обнаружены, начальный этап описанной выше классической схемы биосинтеза стероидных гормонов должен осуществляться в растениях каким-то другим путём. Действительно, от кампестерина ведёт своё начало путь биосинтеза brassinosteroidов – фитогормонов, которые участвуют в регуляции роста и развития растений. В то же время, недавно у различных видов растений был обнаружен целый ряд стероидных гормонов животных (прегненолон сульфат, прогестерон, 17-гидроксипрогестерон, 16-дегидропрогестерон, андростендион) [Simerský et al., 2009; Pauli et al., 2010], митохондриальные адренодоксинподобные ферредоксины MFDX1 и MFDX2 и структурный гомолог адренодоксинредуктазы MFDR [Шематорова и др., 2014], мембранные рецепторы прогестерона [Yang et al., 2005], а также гомологи белков, ответственных за доставку холестерина в митохондрии клеток животных. Все эти данные указывают на то, что помимо уже довольно хорошо охарактеризованной к настоящему времени brassinosteroidной системы, растения сохранили и некоторые элементы классической схемы биосинтеза стероидных гормонов, свойственной животным – по первому, и, по-видимому, наиболее древнему гормону в этом ряду, эту регуляторную систему можно назвать «прогестероновой» [Shpakovski et al., 2017]. Решающую роль в доказательстве существования у растений этой гормональной системы сыграли результаты, полученные нами на трансгенных растениях табака, наперстянки и томата, экспрессирующих кДНК гена CYP11A1 млекопитающих, который кодирует уже упоминавшийся ключевой фермент стероидогенеза животных цитохром P450 холестерингидроксилазу/20,22-лиазу или P450_{scs}, отсутствующий у представителей царства растений [Спивак и др., 2009; Спивак и др., 2010; Шематорова и др., 2014; Shpakovski et al., 2017]. Мы показали, что значительное (в 3–5 раз) повышение в этих трансгенных растениях уровня эндогенного прогестерона приводит к таким гормональным эффектам, как ускорение процессов роста и развития растений, существенное повышение их устойчивости к абиотическим и биотическим стрессам. Формирование вышеупомянутых успешных фенотипов у полученных трансгенных растений семейства Паслёновые, экспрессирующих кДНК цитохрома P450_{scs} (CYP11A1) млекопитающих, подразумевает, что прогестерон можно считать очень древним биорегулятором растительных клеток и, пожалуй, первым настоящим гормоном, общим для растений и животных. Нами также установлено, что и у растений сохраняется принцип компартментализации: по крайней мере некоторые (вероятнее всего, начальные) стадии стероидогенеза могут осуществляться в митохондриях: зрелый цитохром CYP11A1, как и P450_{scs} у животных, локализуется во внутренней митохондриальной мембране, конкурируя за место в ней с нативными белками растений. В результате происходят существенные изменения в этих органеллах: исследование ультраструктурной организации клеток мезофилла семядольных листьев контрольных и трансгенных растений табака и томата показало, что у последних наблюдалось существенное изменение размера, формы и структурной организации митохондрий. По сравнению с диким типом, митохондрии в клетках мезофилла трансгенных растений, экспрессирующих кДНК CYP11A1 цитохрома P450_{scs}, отличаются существенно меньшим размером и большей гранулированностью [Shpakovski et al., 2017]. В качестве партнёров CYP11A1 выявлены адренодоксинподобные [2Fe-2S] ферредоксины растений MFDX1 и MFDX2, которые участвуют в переносе электронов при реакциях гидроксилирования, формируя электронтранспортную цепь [Шематорова и др., 2014]. Полу-

ченные результаты свидетельствуют об определённом сходстве путей биосинтеза стероидных соединений и систем стероидного регулирования у растений и животных и могут быть использованы в новых биотехнологиях для сельского хозяйства и фармакологии.

Данная работа осуществлялась при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) в рамках инициативного проекта № 18-04-01262 и совместного российско-белорусского исследовательского проекта № 18-54-00038.

Литература

Спивак С.Г., Бердичевец И.Н., Литвиновская Р.П., Драч С.В., Картель Н.А., Шпаковский Г.В. Некоторые особенности метаболизма стероидов в трансгенных растениях табака *Nicotiana tabacum*, несущих кДНК CYP11A1 цитохрома P450_{SCC} из коры надпочечников быка // Биоорганическая химия. – 2010. – Т. 36, № 2. – С. 241–250.

Спивак С.Г., Бердичевец И.Н., Ярмолинский Д.Г., Манешина Т.В., Шпаковский Г.В., Картель Н.А. Создание и характеристика трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L., экспрессирующих кДНК CYP11A1 цитохрома P450_{SCC} // Генетика. – 2009. – Т. 45, № 9. – С. 1217–1224.

Шематорова Е.К., Словохотов И.Ю., Халилуев М.Р., Бердичевец И.Н., Баранова Е.Н., Бабак О.Г., Шпаковский Д.Г., Спивак С.Г., Шпаковский Г.В. Митохондрии как возможное место инициации синтеза стероидных гормонов в растениях. Журнал стресс-физиологии и биохимии. – 2014. – Т. 10, № 4. – С. 85–97.

Miller W.L. Steroid hormone synthesis in mitochondria // Molecular and Cellular Endocrinology. – 2013. – V. 379, N 1–2. – P. 62–73.

Pauli G.F., Friesen J.B., Gödecke T., Farnsworth N.R., Glodny B. Occurrence of progesterone and related animal steroids in two higher plants // Journal of Natural Products. – 2010. – V. 73. – N 3. – P. 338–345.

Payne A.H., Hales D.B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones // Endocr. Rev. – 2004. – V. 25, N 6. – P. 947–970.

Sewer M.B., Dammer E.B., Jagarlapudi S. Transcriptional regulation of adrenocortical steroidogenic gene expression // Drug Metabol. Rev., 2007. – V. 39. – N 2–3. – P. 371–388.

Shpakovski G.V., Spivak S.G., Berdichevets I.N., Babak O.G., Kubrak S.V., Kilchevsky A.V., Aralov A.V., Slovokhotov I.Yu., Shpakovski D.G., Baranova E.N., Khaliluev M.R., Shematorova E.K. A key enzyme of animal steroidogenesis can function in plants enhancing their immunity and accelerating the processes of growth and development // BMC Plant Biology. – 2017. – V. 17. – Suppl 1: 189. – P. 119–131. PMID: 29143658.

Simerský R., Novák O., Morris D.A., Pouzar V., Strnad M. Identification and quantification of several mammalian steroid hormones in plants by UPLC-MS/MS // Journal of Plant Growth Regulation. – 2009. – V. 28. – N 3. – P. 125–136.

Yang X.H., Xu Z.H., Xue H.W. Arabidopsis membrane steroid binding protein 1 is involved in inhibition of cell elongation // Plant Cell. – 2005. – V. 17. – N 1. – P. 116–131.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Абдрахимов Ф.А., 5
Абдрахимова Й.Р., 5
Алёшин В.В., 109
Андреянова Н.В., 41
Астахова Н.В., 66
Бабак О.Г., 155
Бабенко В.А., 41, 92
Баймиев Ал.Х., 61
Баранова Е.Н., 8, 11, 30, 52, 155
Бельков В.И., 25, 133
Бернер А., 80
Болотова Т.А., 14, 49, 55, 127
Борисова-Мубаракишина М.М., 44
Боровик О.А., 17, 27, 58
Боровский Г.Б., 19, 103
Бороздина М.Б., 19
Букин Ю.С., 109
Ванюшин Б.Ф., 145
Варакина Н.Н., 103, 147
Верхотуров В.В., 80
Вершинина З.Р., 61
Ветошкина Д.В., 44
Вильянен Д.В., 22
Винокурова Н.В., 38
Власова А.А., 25
Войников В.К., 27, 94
Гарник Е.Ю., 22, 25, 133
Гольдберг О.А., 130
Горбенко И.В., 35
Грабельных О.И., 17, 27, 58, 94
Граскова И.А., 71
Гулевич А.А., 8, 11, 30
Гурина В.В., 33, 69, 120
Данилина Т.И., 41
Данилова С.А., 11
Дорофеев Н.В., 58
Дорошков А.А., 80
Дударева Л.В., 35, 111
Ежикеева С.Д., 130
Ершова А.Н., 38
Забанова Н.С., 27, 58, 94
Зоров Д.Б., 41, 92
Зоров С.Д., 41
Зорова Л.Д., 41, 92
Иванов Б.Н., 44
Карпова А.Б., 97
Катышев А.И., 19, 133
Клаус А.А., 47
Клименко Е.С., 49, 55, 130
Клименков И.В., 130
Клыков В.Н., 155
Князев А.В., 61
Козулева М.А., 44
Кононенко Н.В., 8, 52
Константинов Ю.М., 3, 14, 22, 25, 49, 55, 84, 127, 130, 133
Кортаева Н.Е., 19
Корсукова А.В., 58
Кулинченко М.В., 14, 49, 55, 84, 127, 133
Кулуев Б.Р., 61
Куренина Л.В., 8, 30
Леонова И.Н., 80
Ли И., 150
Ломоватская Л.А., 106
Лохвасер У., 80
Лысенко Е.А., 47
Любушкина И.В., 150
Мазунин И.О., 63
Марков А.В., 41
Минибаева Ф.В., 65
Найдов И.А., 44
Нарайкина Н.В., 66
Нестёркина И.С., 33, 69, 74, 120
Никифоров С.Б., 130
Нимаева О.Д., 97
Ножкина О.А., 71
Нурминский В.Н., 69, 74
Озолина Н.В., 33, 69, 74, 77, 120
Осипова С.В., 80
Павлова А.Г., 71
Панфилов А.В., 84
Певзнер И.Б., 41, 92

- Пермяков А.В., 80
 Пермякова М.Д., 80
 Перфильева А.И., 71
 Першина Л.А., 89
 Плотников Е.Ю., 41, 92
 Побежимова Т.П., 27, 58, 94
 Попков В.А., 41
 Попкова Т.П., 130
 Прадедова Е.В., 97
 Пушкарев Б.Г., 130
 Пшеничникова Т.А., 80
 Пишбытко Н.Л., 47
 Пятрикас Д.В., 147
 Ралдугина Г.Н., 11, 30
 Рекославская Н.И., 100, 114
 Рихванов Е.Г., 103, 147, 150
 Романенко А.С., 106
 Романова Е.В., 109, 117
 Рудиковская Е.Г., 35, 80, 111
 Рудиковский А.В., 111
 Русалева Т.М., 103
 Саляев Р.К., 97, 100, 114
 Семенова Н.В., 35
 Сидоров А.В., 150
 Силачев Д.Н., 41, 92
 Сиротинина Е.А., 117
 Словохотов И.Ю., 155
 Спивак С.Г., 155
 Спиридонова Е.В., 33, 69, 120
 Спиридонова Л.Н., 122
 Степанов А.В., 103, 125, 147
 Столбиков А.С., 100, 114
 Субота И.Ю., 49, 127
 Судаков Н.П., 130
 Сухих Г.Т., 92
 Сухов Б.Г., 71
 Тарасенко В.И., 14, 22, 25, 49, 55, 133
 Тен М.Н., 130
 Третьякова А.В., 69
 Трубачеева Н.В., 89
 Трунова Т.И., 66
 Уфимцева Е.Г., 139, 142
 Федореева Л.И., 145
 Федосеева И.В., 19, 103, 147
 Федяева А.В., 19, 103, 147, 150
 Филинова Н.В., 106
 Халилуев М.Р., 155
 Чабан И.А., 8, 52
 Чемерис А.В., 61
 Черникова В.В., 133
 Шарапова Л.С., 153
 Шематорова Е.К., 155
 Широких И.Г., 52
 Шмаков В.В., 49
 Шмаков В.Н., 35, 55
 Шпаковский Г.В., 155
 Шпаковский Д.Г., 155
 Щербаков Д.Ю., 109, 117
 Щуплецова О.Н., 52
 Юрина Н.П., 153
 Яковлева Т.В., 133
 Kolosova Nataliya G., 136
 Muraleva Natalia A., 136
 Ostersetzer-Biran Oren, 83
 Panda S.K., 19
 Peretolchina T.E., 87
 Sherbakov D.Yu., 87
 Sitnikova T.Ya., 87
 Stefanova Natalia A., 136
 Tyumentsev Mikhail A., 136
 Vavilin Valentin A., 136

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Константинов Ю.М.</i> ПРЕДИСЛОВИЕ	3
<i>Абдрахимова Й.Р., Абдрахимов Ф.А.</i> К ВОПРОСУ О ФЕНОМЕНЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО “АФК-ИНДУЦИРОВАННОГО ВЫБРОСА АФК”	5
<i>Баранова Е.Н., Гулевич А.А., Куренина Л.В., Кононенко Н.В., Чабан И.А.</i> ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЛАСТИД И МИТОХОНДРИЙ ПРИ АБИОТИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ	8
<i>Баранова Е.Н., Данилова С.А., Ралдугина Г.Н., Гулевич А.А.</i> ПРОБЛЕМЫ ФОРМИРОВАНИЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПЛАСТИД У ТРАНСГЕННЫХ И ТРАНСПЛАСТОМНЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА	11
<i>Болотова Т.А., Тарасенко В.И., Константинов Ю.М., Кулинченко М.В.</i> ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ МИТОХОНДРИЙ АРАБИДОПСИСА В ИМПОРТЕ ДНК	14
<i>Боровик О.А., Грабельных О.И.</i> ВЛИЯНИЕ ВЫСОКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ЦИАНИД-РЕЗИСТЕНТНОЙ ОКСИДАЗЫ В МИТОХОНДРИЯХ ИЗ ЛИСТЬЕВ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ	17
<i>Боровский Г.Б., Randa S.K., Бороздина М.Б., Катыхиев А.И., Коротаева Н.Е., Федосеева И.В., Федяева А.В.</i> ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ «ВНЕШНЕЙ» NADH-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ (NDB2) МИТОХОНДРИЙ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ И СТРЕССОВЫЕ БЕЛКИ АРАБИДОПСИСА	19
<i>Вильянен Д.В., Гарник Е.Ю., Тарасенко В.И., Константинов Ю.М.</i> ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ МЕТАБОЛИЗМА ХЛОРОФИЛЛОВ У ДВОЙНОГО НОКАУТ-МУТАНТА <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> ПО ГЕНАМ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВЫДЕРЖИВАНИИ РАСТЕНИЙ В ТЕМНОТЕ	22
<i>Власова А.А., Гарник Е.Ю., Бельков В.И., Тарасенко В.И., Константинов Ю.М.</i> ОСОБЕННОСТИ ИНДУЦИРОВАННОГО СТАРЕНИЯ ЛИСТЬЕВ У ДВОЙНОГО НОКАУТ-МУТАНТА <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> ПО ГЕНАМ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ	25
<i>Грабельных О.И., Побежимова Т.П., Забанова Н.С., Боровик О.А., Войников В.К.</i> МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ ПРИ СТРЕССЕ И АДАПТАЦИИ К ГИПО- И ГИПЕРТЕРМИИ	27
<i>Гулевич А.А., Куренина Л.В., Ралдугина Г.Н., Баранова Е.Н.</i> ПРИМЕНЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ГЕНА СИНТЕЗА ОСМОТИКА ДЛЯ АДРЕСНОЙ ЗАЩИТЫ ХЛОРОПЛАСТА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ПРИ АБИОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ	30
<i>Гурина В.В., Озолина Н.В., Нестёркина И.С., Спиридонова Е.В.</i> ВЛИЯНИЕ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ НА ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ВАКУОЛЯРНОЙ МЕМБРАНЫ	33
<i>Дударева Л.В., Горбенко И.В., Шмаков В.Н., Семенова Н.В., Рудиковская Е.Г.</i> ОСОБЕННОСТИ СОСТАВА СТЕРИНОВ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ <i>LARIX SIBIRICA</i> LEDEB	35

<i>Ершова А.Н., Винокурова Н.В.</i> РОЛЬ ВАКУОЛЯРНОГО КОМПАРТМЕНТА В МЕТАБОЛИЗАЦИИ АМИНОКИСЛОТ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ АЭРАЦИИ, ГИПОКСИИ И CO ₂ -СРЕДЫ.....	38
<i>Зоров Д.Б., Плотников Е.Ю., Силачев Д.Н., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., Бабенко В.А., Попков В.А., Зоров С.Д., Андрианова Н.В., Данилина Т.И., Марков А.В.</i> КРИТИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ В ВОЗНИКНОВЕНИИ ПАТОЛОГИЙ.....	41
<i>Иванов Б.Н., Борисова-Мубаракишина М.М., Козулева М.А., Найдов И.А., Ветошкина Д.В.</i> МЕХАНИЗМЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ O ₂ В ХЛОРОПЛАСТАХ. ВОЗМОЖНОЕ ВЛИЯНИЕ МЕСТА ОБРАЗОВАНИЯ H ₂ O ₂ НА ЕЕ СИГНАЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ	44
<i>Клаус А.А., Пишбытко Н.Л., Лысенко Е.А.</i> СПЛАЙСИНГ мРНК И ФОТОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ХЛОРОПЛАСТАХ КУКУРУЗЫ В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННЫХ ТЕМПЕРАТУР	47
<i>Клименко Е.С., Шмаков В.В., Болотова Т.А., Субота И.Ю., Тарасенко В.И., Кулинченко М.В., Константинов Ю.М.</i> ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ И ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА В ИМПОРТЕ ДНК	49
<i>Кононенко Н.В., Баранова Е.Н., Чабан И.А., Щуплецова О.Н., Широких И.Г.</i> ИЗМЕНЕНИЕ В СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ВАКУОЛЯРНОГО КОМПАРТМЕНТА КЛЕТОК КАЛЛУСА ЯЧМЕНЯ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ АЛЮМИНИЯ.....	52
<i>Константинов Ю.М., Кулинченко М.В., Клименко Е.С., Болотова Т.А., Тарасенко В.И., Шмаков В.Н.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ФАКТОРОВ ИМПОРТА ДНК В МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ	55
<i>Корсукова А.В., Боровик О.А., Побежимова Т.П., Забанова Н.С., Дорофеев Н.В., Гребельных О.И.</i> РАЗЛИЧИЯ В МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ ТЕБУКОНАЗОЛА И ТЕБУКОНАЗОЛ-СОДЕРЖАЩЕГО ПРОТРАВИТЕЛЯ НА АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ	58
<i>Кулуев Б.Р., Князев А.В., Вершинина З.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В.</i> АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ТРАНСПЛАСТОМНЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА	61
<i>Мазунин И.О.</i> ТЕХНОЛОГИИ ВЗЛОМА ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДА МИТОХОНДРИЙ ЧЕЛОВЕКА	63
<i>Минибаева Ф.В.</i> ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И АУТОФАГИЯ В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ: РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ	65
<i>Нарайкина Н.В., Астахова Н.В., Трунова Т.И.</i> ВВЕДЕНИЕ ГЕНА DESA Δ12-АЦИЛ-ЛИПИДНОЙ ДЕСАТУРАЗЫ <i>SYNCHOCYSTIS</i> ВЛИЯЕТ НА СТРУКТУРУ ХЛОРОПЛАСТОВ ПРИ ЗАКАЛИВАНИИ КАРТОФЕЛЯ К ГИПОТЕРМИИ.....	66
<i>Нестёркина И.С., Озолина Н.В., Спиридонова Е.В., Гурина В.В., Нурминский В.Н., Третьякова А.В.</i> ФУНКЦИИ МИКРОДОМЕНОВ ВАКУОЛЯРНОЙ МЕМБРАНЫ	69
<i>Ножкина О.А., Перфильева А.И., Павлова А.Г., Граскова И.А., Сухов Б.Г.</i> ВЛИЯНИЕ НАНОКОМПОЗИТОВ СЕЛЕНА И СЕРЕБРА НА РАСТЕНИЯ КАРТОФЕЛЯ <i>IN VITRO</i>	71
<i>Нурминский В.Н., Нестеркина И.С., Озолина Н.В.</i> ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ВАКУОЛЯРНОЙ МЕМБРАНЫ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ.....	74

<i>Озолина Н.В.</i> РОЛЬ МЕЖМЕМБРАННЫХ КОНТАКТОВ В ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ КЛЕТКИ	77
<i>Осипова С.В., Пшеничникова Т.А., Пермьяков А.В., Пермьякова М.Д., Рудиковская Е.Г., Дорошков А.А., Верхотуров В.В., Леонова И.Н., Лохвасер У., Бернер А.</i> КЛАСТЕРЫ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА ВОДНЫЙ СТРЕСС В ЯДЕРНОМ ГЕНОМЕ <i>TRITICUM AESTIVUM</i> L.	80
<i>Ostersetzer-Biran Oren</i> PLANT MITOCHONDRIA GROUP II INTRONS SPLICING: A WINDOW INTO THE EVOLUTION OF THE NUCLEAR SPLICEOSOMAL MACHINERIES	83
<i>Панфилов А.В., Константинов Ю.М., Кулинченко М.В.</i> ОПТИМИЗАЦИЯ КЛОНИРОВАНИЯ ДЛИННОРАЗМЕРНЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК В КОНСТРУКЦИИ pGEM, СОДЕРЖАЩЕЙ КОНЦЕВЫЕ ИНВЕРТИРОВАННЫЕ ПОВТОРЫ ЛИНЕЙНЫХ ПЛАЗМИД ИЗ МИТОХОНДРИЙ <i>ZEA MAYS</i>	84
<i>Peretolchina T.E., Sitnikova T.Ya., Sherbakov D.Yu.</i> THE COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOMES OF FOUR ENDEMIC BAIKAL MOLLUSKS (MOLLUSCA: CAENO GASTROPODA).....	87
<i>Першина Л.А., Трубачеева Н.В.</i> ЭФФЕКТЫ ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ ОТДАЛЕННОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ РАСТЕНИЙ.....	89
<i>Плотников Е.Ю., Бабенко В.А., Силачев Д.Н., Певзнер И.Б., Зорова Л.Д., Сухих Г.Т., Зоров Д.Б.</i> МОГУТ ЛИ СТЕВЛОВЫЕ КЛЕТКИ БЫТЬ ДОНОРАМИ ОРГАНЕЛЛ: МЕЖКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ МИТОХОНДРИЙ.....	92
<i>Побежимова Т.П., Забанова Н.С., Грабельных О.И., Войников В.К.</i> СИНТЕЗ СТРЕССОВЫХ БЕЛКОВ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ГИПЕРТЕРМИИ	94
<i>Прадедова Е.В., Нимаева О.Д., Карпова А.Б., Саяев Р.К.</i> РЕДОКС-АКТИВНЫЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ВАКУОЛЕЙ, ПЛАСТИД И МИТОХОНДРИЙ КЛЕТОК КОРНЕПЛОДОВ СТОЛОВОЙ СВЕКЛЫ.....	97
<i>Рекославская Н.И., Саяев Р.К., Столбиков А.С.</i> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВИРУСНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ НА ПРИМЕРЕ ОМЕГА ЛИДЕРА ВТМ ПРИ ЯДЕРНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ.....	100
<i>Рихванов Е.Г., Федосеева И.В., Варакина Н.Н., Русалева Т.М., Федяева А.В., Степанов А.В., Боровский Г.Б.</i> АДФ/АТФ ТРАНСЛОКАТОР И РЕАКЦИЯ КЛЕТКИ НА СТРЕССОВОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ	103
<i>Романенко А.С., Ломоватская Л.А., Филинова Н.В.</i> СУБКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ РЕГУЛИРУЕМЫХ ЦИКЛИЧЕСКИМИ НУКЛЕОТИДАМИ ИОННЫХ КАНАЛОВ (CNGC) В КЛЕТКАХ КОРНЕЙ КАРТОФЕЛЯ ПРИ БИОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ	106
<i>Романова Е.В., Букин Ю.С., Алёшин В.В., Щербаков Д.Ю.</i> РЕМОЛДИНГ ГЕНОВ ТРАНСПОРТНЫХ РНК В МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОМАХ.....	109
<i>Рудиковский А.В., Рудиковская Е.Г., Дударева Л.В.</i> ВЛИЯНИЕ ВОЗДУШНОЙ ЗАСУХИ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАБОТЫ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ЯБЛОНИ СИБИРСКОЙ <i>MALUS BACCATA</i> (L.) VORKH. В УСЛОВИЯХ ЗОНЫ КОНТАКТА ЛЕСА И СТЕПИ СЕЛЕНГИНСКОЙ ДАУРИИ.....	111
<i>Саяев Р.К., Рекославская Н.И., Столбиков А.С.</i> ОСОБЕННОСТИ АНТИГЕН- АНТИТЕЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ У РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА (ВПЧ) ПРИ ЯДЕРНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ	114

<i>Сиротинина Е.А., Романова Е.В., Щербаков Д.Ю.</i> ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПОРЯДКА МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ У БАЙКАЛЬСКИХ АМФИПОД	117
<i>Спиридонова Е.В., Нестеркина И.С., Гурина В.В., Озолина Н.В.</i> УЧАСТИЕ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ В РАБОТЕ ВАКУОЛЯРНЫХ ПРОТОННЫХ ПОМП	120
<i>Спиридонова Л.Н.</i> ЯДЕРНЫЙ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ГЕНОМЫ ПТИЦ: МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ – ГОМОЛОГИЧНАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ...122	
<i>Степанов А.В.</i> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОРГАНЕЛЛ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ.....	125
<i>Субота И.Ю., Кулинченко М.В., Болотова Т.А., Константинов Ю.М.</i> ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ РАЗЛИЧИЙ ПОПУЛЯЦИИ МИТОХОНДРИЙ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ С ИХ СПЕЦИАЛИЗАЦИЕЙ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ И АДАПТИВНЫХ ФУНКЦИЙ	127
<i>Судаков Н.П., Попкова Т.П., Клименко Е.С., Клименков И.В., Никифоров С.Б., Гольдберг О.А., Пушкарев Б.Г., Ежикеева С.Д., Тен М.Н., Константинов Ю.М.</i> ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ И ИНФАРКТЕ МИОКАРДА	130
<i>Тарасенко В.И., Гарник Е.Ю., Катыхов А.И., Бельков В.И., Яковлева Т.В., Черникова В.В., Константинов Ю.М., Кулинченко М.В.</i> ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ДВОЙНОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ RPOTrp В МИТОХОНДРИЯХ И ХЛОРОПЛАСТАХ	133
<i>Tyumentsev Mikhail A., Muraleva Natalia A., Vavilin Valentin A., Stefanova Natalia A., Kolosova Nataliya G.</i> CONTRIBUTION OF MITOCHONDRIAL DISFUNCTION IN THE DEVELOPMENT OF SPORADIC ALZHEIMER'S DISEASE: EVIDENCE FROM OXYS RATS	136
<i>Уфимцева Е.Г.</i> РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ И АНТИАПОПТОЗНОГО БЕЛКА BCL-2 ВО ВЗАИМООТНОШЕНИЯХ МИКОБАКТЕРИЙ С КЛЕТКАМИ-ХОЗЯЕВАМИ В ГРАНУЛЕМАХ МЫШЕЙ С ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ	139
<i>Уфимцева Е.Г.</i> НАНОЧАСТИЦЫ МЕТАЛЛИЧЕСКОГО СЕРЕБРА Ag(0) ВЫЗЫВАЮТ АПОПТОЗ МАКРОФАГОВ МЫШЕЙ, <i>IN VITRO</i> ИНФИЦИРОВАННЫХ МИКОБАКТЕРИЯМИ ВАКЦИНЫ БЦЖ, БЕЗ ИНДУКЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ЦИТОПЛАЗМЕ И МИТОХОНДРИЯХ	142
<i>Федореева Л.И., Ванюшин Б.Ф.</i> МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ И ЯДЕРНАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ WEN1 И WEN2 ИЗ ПШЕНИЦЫ <i>TRITICUM AESTIVUM</i> L. И МОДУЛЯЦИЯ КОРОТКИМИ ПЕПТИДАМИ ИХ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ	145
<i>Федосеева И.В., Пятрикас Д.В., Степанов А.В., Федяева А.В., Варакина Н.Н., Рихванов Е.Г.</i> УЧАСТИЕ ВНУТРЕННЕЙ И ВНЕШНИХ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ NADH ДЕГИДРОГЕНАЗ В ОТВЕТЕ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> НА ТЕПЛОВОЙ ШОК	147
<i>Федяева А.В., Ли И., Любушкина И.В., Сидоров А.В., Рихванов Е.Г.</i> УЧАСТИЕ МИТОХОНДРИЙ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ В РАЗВИТИИ ГИБЕЛИ ПРИ ОБРАБОТКЕ ДИУРОНОМ.....	150
<i>Шарапова Л.С., Юрина Н.П.</i> АССОЦИАЦИЯ СТРЕССОВЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СВЕТОИНДУЦИРУЕМЫХ БЕЛКОВ С КОМПЛЕКСАМИ ТИЛАКОИДНЫХ МЕМБРАН	153

<i>Шематорова Е.К., Словохотов И.Ю., Баранова Е.Н., Халилуев М.Р., Бабак О.Г.,</i>	
<i>Клыков В.Н., Шпаковский Д.Г., Спивак С.Г., Шпаковский Г.В.</i>	
РОЛЬ ОРГАНЕЛЛ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ СТЕРЕОИДНЫХ	
ГОРМОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ У ЖИВОТНЫХ И ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ	155
Авторский указатель.....	158

Научное издание

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ ОРГАНЕЛЛ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ

*Материалы докладов II Всероссийской научной
конференции с международным участием
Иркутск, 22–24 мая 2018 г.*

Технический редактор *А.И. Шеховцов*
Дизайнер *И.М. Батова*

Подписано в печать 18.05.2018 г.
Формат 60×90/16. Гарнитура Times New Roman. Бумага Ballet.
Уч.-изд. л. 15,8. Усл. печ. л. 18,9. Тираж 300 экз. Заказ № 812.

Издательство Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН
664033, Иркутск, ул. Улан-Баторская, 1

