

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ И СТРЕССОВЫЕ БЕЛКИ АРАБИДОПСИСА, У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ С ГИПЕРЭКСПРЕССИЕЙ «ВНЕШНЕЙ» NADH-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ (*NDB2*)

Г.Б. Боровский<sup>1</sup>, М.Б. Бороздина<sup>2</sup>, А.И. Катышев<sup>1</sup>, Н.Е. Коротаяева<sup>1</sup>, И.В. Федосеева<sup>1</sup>, А.В. Федяева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, [borovskii@sifibr.irk.ru](mailto:borovskii@sifibr.irk.ru)

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия

**Аннотация.** Впервые проведено исследование влияния гиперэкспрессии гена *ndb2* у арабидопсиса на экспрессию генов и содержание белков энергорассеивающих систем митохондрий, стрессовых белков и других генов. Оказалось, что уровень экспрессии ряда генов семейств *aox*, *ucp*, *ndb*, *nda* и *hsp* существенно возрастает с увеличением экспрессии *ndb2*. Часть изменений в экспрессии генов сказывалась на уровне соответствующих белков. Изменилось также количество АФК, генерируемых в клетке, в контрольных условиях и после гипертермии.

**Ключевые слова:** арабидопсис, стрессовые белки, митохондрии, внешняя NADH-дегидрогеназа *ndb2*, экспрессия генов

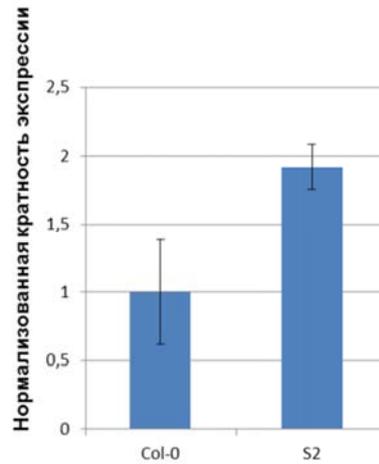
**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-889-892

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 активных форм кислорода (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 литературы, 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.

Трансгенные растения арабидопсиса с гиперэкспрессией *ndb2* были получены нами с использованием конструкции, описанной ранее [Савчин и др., 2017]. С помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) был исследован уровень экспрессии целевого гена в полученных нами трансгенных растениях арабидопсиса. В двух линиях трансформированных растений количество транскрипта гена *ndb2* примерно в 2 раза превышало соответствующие показатели в контрольных растениях (рис. 1).

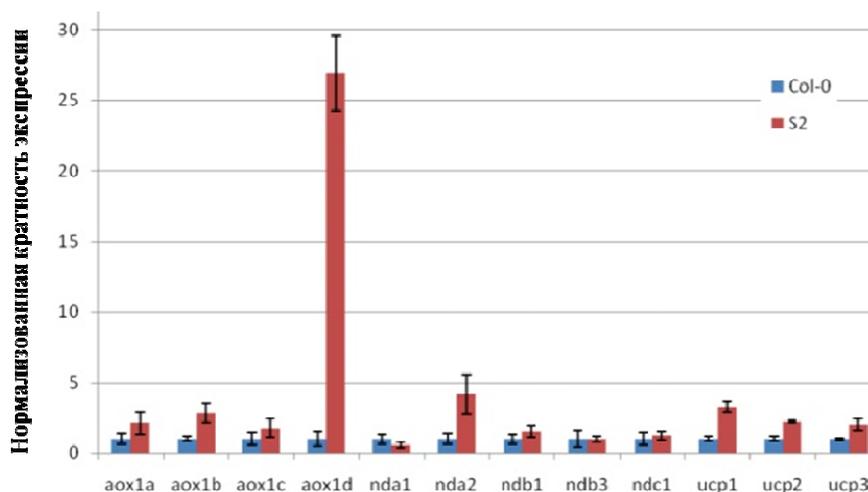
Первоочередный интерес представляло выяснение возможной координации экспрессии генов, кодирующих компоненты альтернативного пути дыхания, в растениях арабидопсиса в контрольных условиях. Было показано, что при увеличении

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*, *ucp3* (рис. 2). 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.



**Рис. 1.** Сравнительный анализ количества мРНК гена *ndb2* в контрольных и трансгенных растениях с повышенной экспрессией данного гена.

С точки зрения связи альтернативных путей транспорта электронов с устойчивостью, важно также, что в контрольных условиях гиперэкспрессия гена *ndb2* вызывает рост количества транскриптов отдельных стрессовых генов, кодирующих белки теплового шока (*hsp17.6b* – в 9 раз, *hsp17.7* – в 3 раза, *hsp101* – в 3,5 раза), что также продемонстрировано впервые (данные не представлены).



**Рис. 2.** Сравнительный анализ количества мРНК генов, кодирующих альтернативные NADH-дегидрогеназы, альтернативные оксидазы и разобщающие белки, в контрольных растениях и растениях-гиперэкспрессорах *ndb2*.

Интересно было исследовать, влияет ли изменение экспрессии *ndb2* на экспрессию генов, кодирующих компоненты основного дыхательного пути

митохондрий. Гены, кодирующие отдельные субъединицы дыхательных комплексов, представлены как в ядерном, так и в митохондриальном геномах. Количество транскриптов ядерных генов, кодирующих субъединицы митохондриальных дыхательных комплексов (CA2, Nd-F, *sdh1-1*, MPP-beta, CytC2, *CoxVc*, *CoxX2-1* и *Atp3*), в контрольных условиях в растениях линии арабидопсиса с повышенной экспрессией *ndb2* достоверно не изменялось (данные не представлены). В то же время в исследуемых растениях был увеличен уровень экспрессии ряда митохондриальных генов, таких как *nadb*, *cox1*, *matR*, *orf153a* и *cob* (данные не представлены).

Также был проведен предварительный анализ изменений в содержании некоторых митохондриальных (NDB и AOX) и стрессовых (HSP101, HSP17.7, HSP70) белков у растений-гиперэкспрессоров *ndb2*. Данные показали изменения в содержании некоторых исследованных белков по сравнению с диким типом растений арабидопсиса в контрольных условиях и после теплового шока (рис. 3). Мы полагаем, что это может быть связано со сниженным уровнем генерации АФК в растениях с гиперэкспрессией *ndb2* (данные не представлены) и привести к изменениям в базовой и индуцированной устойчивости к различным стрессам.

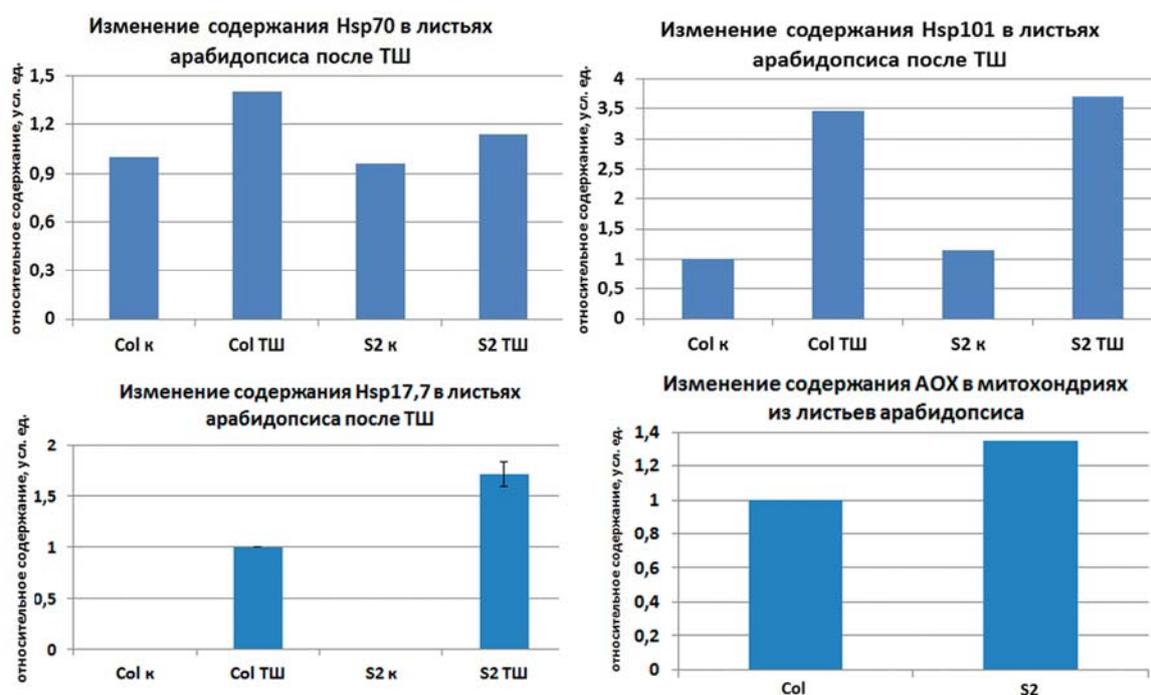


Рис. 3. Сравнительный анализ содержания белков Hsp70, Hsp101 и Hsp17,7 в контрольных условиях и после теплового шока (45 °С, 1 час), а также белка альтернативной оксидазы (АОХ) в гиперэкспрессорах *ndb2* (S2) и растениях исходного типа (Col) по данным вестерн-блоттинга.

Исследования роли генов NDI с использованием трансгенных растений со сниженной или повышенной экспрессией начаты относительно недавно [Smith et al., 2011; Wallstrom et al., 2014]. В работе [Smith et al., 2011] 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* позволяет сделать вывод о том, что это белок может играть важную роль и в

реализации клеточных механизмов ответа на воздействие других стрессовых факторов. Показанная нами координация экспрессии *ndb2* с генами семейств *aox* и *ucp* в контрольных условиях демонстрирует значительное влияние активности наружной NADH-дегидрогеназы на активность других энергорассеивающих систем митохондрий растений, а также вероятное воздействие уровня экспрессии данного гена на генерацию АФК и устойчивость клеток к температурному стрессу.

Работа была поддержана грантами РФФИ 17-54-45090 и DST INT/RUS/RFBR/P-260. Работа выполнена с использованием коллекций ЦКП «Биоресурсный Центр» СИФИБР СО РАН и приборов ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН.

#### Литература

Савчин Д.В., Кузмицкая П.В., Урбанович О.Ю., Федосеева И.В., Боровский Г.Б. Создание трансгенных растений *Nicotiana tabacum* с геном *ndb2 Arabidopsis thaliana* для изучения ответа на стресс // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. бiял. навук. – 2017. – № 1. – С. 54–61.

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. – 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. – 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. – 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. – P. 881–896.

### EXPRESSION OF GENES, CODING MITOCHONDRIAL AND HEAT SHOCK PROTEINS OF ARABIDOPSIS IN TRANSGENIC PLANTS WITH HYPEREXPRESSION OF "EXTERNAL" NADH-DEHYDROGENASE (*NDB2*)

G.B. Borovskii<sup>1</sup>, M.B. Borozdina<sup>2</sup>, A.I. Katyshev<sup>1</sup>, N.E. Korotaeva<sup>1</sup>, I.V. Fedoseeva<sup>1</sup>, A.V. Fedyayeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, [borovskii@sifibr.irk.ru](mailto:borovskii@sifibr.irk.ru)

<sup>2</sup>Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

**Abstract.** For the first time the effect of overexpression of the *ndb2* gene in *Arabidopsis* on the expression of genes and proteins of other energy-dissipation mitochondrial systems, heat shock proteins and other genes were studied. It turned out that the expression level of a number of genes of the families *aox*, *ucp*, *ndb* and *nda* increased significantly, as did the expression of a number of *hsp* genes. Part of the changes in gene expression affected the level of the corresponding proteins. The amount of ROS generated in the cell under control conditions and after hyperthermia also changed.

**Keywords:** *arabidopsis*, *stress proteins*, *mitochondria*, *external NADH-dehydrogenase ndb2*, *gene expression*