

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ДВОЙНОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ RPOТmp ИЗ *ARABIDOPSIS THALIANA* В РАННЕМ РАЗВИТИИ РАСТЕНИЙ И В РЕАКЦИИ НА СТРЕСС

В.И. Тарасенко, Е.Ю. Гарник, А.И. Катышев, В.И. Бельков, Т.В. Яковлева, В.В. Черникова, Ю.М. Константинов, М.В. Кулинченко

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *mk100171@yahoo.com*

Аннотация. RPOТmp является белком, локализующимся в митохондриях и в хлоропластах, однако основные функции данной NEP связаны с митохондриями. На основе растений дикого типа арабидопсиса были получены линии с митохондриальной (*Col-M*) и хлоропластной (*Col-P*) гиперэкспрессией RPOТmp. Показано, что, по сравнению с диким типом семена растений *Col-M* и *Col-P* имеют более высокий процент прорастания без стимуляции светом, имеют пониженную чувствительность к репрессирующему действию высоких концентраций сахарозы и к абсцизовой кислоте.

Ключевые слова: митохондрии *Arabidopsis thaliana*, РНК-полимеразы фагового типа, экспрессия генов растительных органелл, регуляция абсцизовой кислотой

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-998-1002

Геномы митохондрий и пластид очень малы по сравнению с геномами их бактериальных предков, однако транскрипционные механизмы этих органелл отличаются большой сложностью. У двудольных растений, включая арабидопсис, транскрипцию генов органелл осуществляют три РНК-полимеразы фагового типа, кодируемые в ядре, RPOТm, RPOТmp и RPOТp (NEP от *nuclear encoded polymerase*). RPOТp наряду с РНК-полимеразой эубактериального типа PEP (от *plastid encoded polymerase*) функционирует в хлоропластах, в митохондриях растений основную функцию выполняет RPOТm. RPOТmp, импортируется как в митохондрии, так и в хлоропласты, и предположительно участвует в контроле экспрессии генов обеих органелл. Роль RPOТmp в митохондриальной транскрипции подтверждается многими исследованиями [Emanuel et al., 2006; Courtois et al., 2007; Kühn et al., 2009 и др.]: было показано, что инсерционный мутант арабидопсиса по гену *rpot2*, кодирующему RPOТmp, характеризуется замедленным ростом, изменениями в морфологии листьев, экспрессии митохондриальных и, возможно, хлоропластных генов, пониженной активностью митохондриальных дыхательных комплексов I и IV [Kühn et al., 2009]. О потенциальном разделении в транскрипционной активности между RPOТm и RPOТmp в митохондриях известно немного. Функции же данной NEP-полимеразы в хлоропластах двудольных растений до сих пор остаются неясными и, вероятнее всего, ограничены ранними стадиями прорастания семян. Предполагают, что NEP-полимеразы транскрибируют гены в нефотосинтезирующих пластидах, поддерживая их метаболическую активность, а также необходимы в пропластидах для запуска транскрипции с участием PEP-полимеразы и их подготовки к дифференцировке в функциональные хлоропласты. Поскольку локализация и активность RPOТmp связана с двумя органеллами, очень различающимися по своим функциям и по типу экспрессии генов, выяснение роли этой РНК-полимеразы, специфички в осуществлении транскрипции генов органелл представляет собой значительный интерес. В то же время, двойная локализация RPOТmp делает весьма затруднительным анализ специфической роли, которую данный фермент играет в каждой из органелл, в особенности на уровне *in vivo*. Целью данной работы является изучение роли RPOТmp

в экспрессии генов органелл и потенциального влияния функций этой РНК-полимеразы на функции других NEP и в регуляции раннего развития растений.

Ранее нами были разработаны две генетические конструкции, в которых последовательность каталитической части гена *rpot2* арабидопсиса объединена с последовательностью, кодирующей транзитный пептид митохондриальной РНК-полимеразы RPOТm или с последовательностью, кодирующей транзитный пептид хлоропластной RPOТр [Tarasenko et al., 2016]. Данные генетические конструкции были использованы для агробактериальной трансформации растений арабидопсиса дикого типа (*Col-0*) и мутантной линии *rpotmp*, у которой в результате инсерции Т-ДНК инактивирован ген *rpot2* и не происходит образования функциональной РНК-полимеразы, с последующим отбором линий, экспрессирующих данную NEP с адресацией либо в митохондрии, либо в хлоропласты [Tarasenko et al., 2016]. На основе растений дикого типа были получены линии с митохондриальной (*Col-M*) и хлоропластной (*Col-P*) гиперэкспрессией RPOТmp; на основе растений мутанта *rpotmp* – линии с комплементацией функций RPOТmp в митохондриях (*Tmp-M*) и хлоропластах (*Tmp-P*). Растения арабидопсиса с гиперэкспрессией и комплементацией функций RPOТmp в митохондриях и хлоропластах представляют собой интересную модельную систему для изучения процессов митохондриально-ядерной и хлоропластно-ядерной ретроградной регуляции экспрессии генов. Известно, что дисфункция органелл является источником сигналов, передающихся в ядро и запускающих регуляторные механизмы, приводящие к изменению экспрессии ядерных генов. Растения, мутантные по компонентам митохондриальной дыхательной цепи (большая часть известных мутантов связана с инактивацией дыхательного комплекса I), широко используются для изучения ретроградной регуляции. Мутант *rpotmp* интересен тем, что имеет дефект функционирования всей дыхательной цепи, обусловленный в первую очередь сниженной активностью комплекса IV, мутанты по которому для арабидопсиса неизвестны. Полученные нами линии *Tmp-P* позволяют исследовать последствия нарушения функционирования дыхательной цепи митохондрий независимо от возможных побочных эффектов отсутствия RPOТmp в хлоропластах, равно как и возможные последствия отсутствия RPOТmp только в митохондриях – линии *Tmp-M*. В свою очередь, повышение уровня RPOТmp в митохондриях/хлоропластах также может активировать ретроградные сигналы, приводящие к изменению экспрессии ядерных генов, поэтому растения-гиперэкспрессоры RPOТmp в различных клеточных компартментах (линии *Col-M* и *Col-P*) могут быть использованы для выявления генов-мишеней подобной регуляции.

С помощью линий *Tmp-M* и *Tmp-P* было проведено исследование, позволившее установить, что функции RPOТmp связаны именно с митохондриями [Tarasenko et al., 2016]. Для дальнейшего изучения роли RPOТmp в экспрессии генов органелл и регуляции раннего развития растений, потенциального влияния функций этой РНК-полимеразы на функции других NEP были использованы линии с гиперэкспрессией RPOТmp, *Col-M* и *Col-P*. Линии трансформантов *Col-M*, в основном, сходны в своих признаках (внешнем облике, скорости роста растений, копийности 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 RPOТmp, вне зависимости от адресации белка, было отмечено отсутствие корреляции между количеством вставок трансгена и такими признаками, как уровень экспрессии рекомбинантной RPOТmp и копийность митохондриального генома. Для всех этих линий на фоне гиперэкспрессии RPOТmp характерно существенное снижение

экспрессии всех трех нативных NEP, что также не коррелирует с фенотипом, проявляемым растениями той или иной линии.

Дальнейшие исследования показали, что семена растений, гиперэкспрессирующих RPO7mp как митохондриальной (*Col-M*), так и пластидной (*Col-P*) адресации, имеют более высокий процент прорастания в полной темноте, без стимуляции светом, что не характерно для семян арабидопсиса дикого типа. Было установлено, что все линии арабидопсиса с гиперэкспрессией RPO7mp (*Col-M* и *Col-P*) демонстрируют пониженную чувствительность к репрессирующему действию высоких концентраций сахарозы при прорастании семян. Мы предположили, что это снижение чувствительности, как и способность семян гиперэкспрессоров к прорастанию без световой стимуляции, обусловлены изменениями в системе передачи/восприятия регуляторных сигналов, связанных с абсцизовой кислотой (АБК). Известно, что повышение уровня абсцизовой кислоты в растительной клетке является естественным физиологическим ответом на повышение уровня сахаров [Ramon et al., 2008]. Нарушения регуляции периода покоя семени также контролируются уровнем АБК.

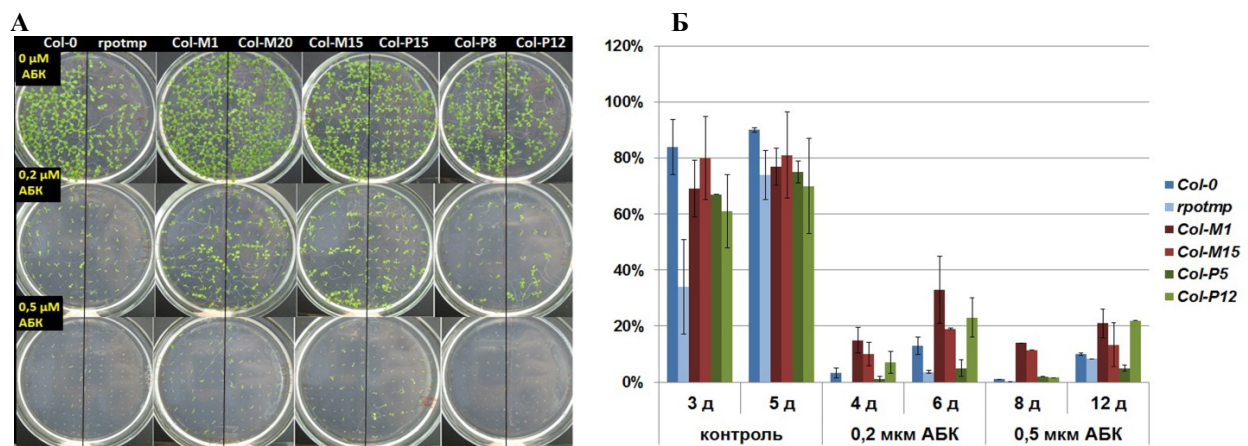


Рисунок. Прорастание семян нескольких линий с гиперэкспрессией RPO7mp, Col-M (M1, M15, M20) и Col-P (P5, P8, P12, P15), мутанта rpotmp и линии дикого типа (Col-0) на среде, содержащей абсцизовую кислоту. А. Прорастание семян на питательных средах, содержащих абсцизовую кислоту (АБК 0, 0,2 μM и 0,5 μM) на 10 сутки после окончания стратификации. Б. График прорастания семян шести линий арабидопсиса (*Col-0*, *rpotmp*, *Col-M1*, *Col-M15*, *Col-P5* и *Col-P12*) на средах, содержащих 0, 0,2 μM и 0,5 μM АБК. Представлен процент проросших семян, определенный от числа посаженных, через 3, 5 (контроль), 4, 6 (0,2 мкM АБК) и 8, 12 (0,5 мкM АБК) суток после окончания стратификации (данные не менее трех независимых биологических повторностей).

С целью выявления возможных физиологических путей регуляции РНК-полимеразы RPO7mp мы провели серию экспериментов, в которой тестировали влияние абсцизовой кислоты на прорастание семян линии дикого типа арабидопсиса *Col-0*, нокаут-мутанта по *rpot2* (*rpotmp*) и нескольких линий гиперэкспрессоров RPO7mp с митохондриальной (*Col-M*) и пластидной (*Col-P*) адресацией. На средах с 0,2 μM АБК доля проросших семян линии дикого типа через 3 и 4 суток после окончания стратификации была очень незначительной по сравнению с контрольными условиями и оставалась сниженной на 6 суток (рисунок, Б). Семена мутанта *rpotmp* начинали прорастать на сутки позже, как в контроле, так и на среде с 0,2 μM АБК. Семена линий гиперэкспрессоров прорастали с близкой к дикому типу всхожестью в контрольных условиях (без АБК). В присутствии 0,2 μM АБК семена линий с гиперэкспрессией RPO7mp начали прорастать через 4 суток после окончания

стратификации, хотя и со значительно более сниженной эффективностью (рисунок, А). При этом прорастание семян линий гиперэкспрессоров на среде с АБК коррелировало не с адресацией RPOTmp, а с фенотипическими признаками этих линий: линии, характеризующиеся фенотипом, близким к дикому типу (*Col-M1*, *Col-M15*, *Col-M20*, *Col-P12*), имели лучшую всхожесть на средах с АБК; линии с фенотипом, близким к *rpotmp* (*Col-P5*, *Col-P8*), проявляли сходную с мутантом чувствительность к АБК. На средах, содержащих 0,5 мМ АБК, прорастание семян дикого типа было отмечено лишь через 8 дней после окончания стратификации, семена мутанта *rpotmp* так и не проросли. Семена линий с гиперэкспрессией *Col-M* начали прорасти через 6-7 суток (рисунок, Б).

На основании данных, полученных с помощью метода ДНК-микрочипов (microarray), был проведен анализ изменения уровня транскриптов ядерных, хлоропластных и митохондриальных генов в линиях с гиперэкспрессией RPOTmp в митохондриях и хлоропластах (*Col-M15*, *Col-M20*, *Col-P5*, *Col-P12*) в сравнении с растениями дикого типа. Большинство генов, для которых было выявлено изменение в экспрессии, являются ядерными, следовательно, наблюдаемые изменения могут быть отнесены к ретроградной регуляции, то есть зависящей от изменений, происходящих в органеллах. Более детальный анализ характера изменения экспрессии генов у исследуемых линий позволил выявить ряд интересных фактов. Повышение уровня экспрессии RPOTmp приводит к запуску каких-то ядерных и цитоплазматических сигналов, изменяющих экспрессию генов ряда регуляторных и метаболических путей, вне зависимости от адресации этой РНК-полимеразы в митохондрии или хлоропласты. Прежде всего, стоит отметить, что наблюдаемая нами повышенная способность семян линий с гиперэкспрессией RPOTmp к прорастанию на средах, содержащих абсцизовую кислоту, в сравнении с диким типом, находит отражение в снижении экспрессии генов, кодирующих белки и факторы, участвующие в механизмах, регулируемых с участием АБК (было выявлено 7 таких генов). Многие другие выявленные гены кодируют продукты, имеющие отношение к реакции растительного организма на стресс.

Мы полагаем, что дальнейшее изучение экспрессии избранных генов во всех имеющихся в нашем распоряжении линиях арабидопсиса с комплементацией функций RPOTmp и с гиперэкспрессией RPOTmp на разных стадиях развития растений и в различных стрессовых условиях позволит нам детально охарактеризовать роль данной NER двойной локализации не только в различных клеточных компартментах, митохондриях и хлоропластах, но и в развитии всего организма.

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 RPO 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.

Ramon M., Rolland F., Sheen J. Sugar Sensing and Signaling // *The Arabidopsis Book*. – 2008. – No. 6. – e0117.

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. – P. 5657–5669.

**STUDY OF ROLE OF THE ARABIDOPSIS DUAL-TARGETING RNA
POLYMERASE RPOTmp IN EARLY PLANT DEVELOPMENT AND IN STRESS
RESPONSES**

V.I. Tarasenko, E.Yu. Garnik, A.I. Katyshev, V.I. Belkov, T.V. Yakovleva,
V.V. Chernikova, Yu.M. Konstantinov, M.V. Koulintchenko

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian
Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, *mk100171@yahoo.com*

Abstract. RPOTmp is a protein localized both in mitochondria and chloroplasts, but main functions of this NEP are associated with mitochondria. Using the Arabidopsis wild type plants, we obtained lines with the mitochondrial (*Col-M*) and chloroplast (*Col-P*) RPOTmp overexpression. It was shown that compared to the wild type the germination of *Col-M* and *Col-P* seeds is less effected by the absence of light stimulation, less sensitive to the repressing effect of high sucrose concentrations and to abscisic acid.

Keywords: *Arabidopsis thaliana* mitochondria, phage-type RNA polymerase, expression of plant organelle genes, regulation of abscisic acid