

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ДВОЙНОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ RPOТmp 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, RPOТm, RPOТp и RPOТmp (NEP-полимеразы). Первые две осуществляют транскрипцию исключительно митохондриальных и хлоропластных генов, третья, RPOТmp, 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 RPOТmp, характеризуется замедленным ростом, изменениями в морфологии листьев, экспрессии митохондриальных и, возможно, хлоропластных генов, пониженной активностью митохондриальных дыхательных комплексов (Kühn et al., 2009). Роль RPOТmp 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 RPOТm и RPOТmp в митохондриях известно немного. При очевидной, хотя и не до конца изученной роли RpoТmp 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 RPOТmp 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 RPOТmp 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 RPOТm, в другой – с последовательностью, кодирующей транзитный пептид хлоропластной RPOТp (Tarasenko et al., 2016). Данные генетические конструкции были использованы для агробактериальной трансформации растений арабидопсиса дикого типа и мутантной линии *rpotmp*, у которой инактивирована функция RPOТmp, 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 RPOТmp; на основе растений мутанта *rpotmp* - линии с комплементацией функций RPOТmp в митохондриях (*Tmp-M*) и хлоропластах (*Tmp-P*). 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 в митохондриях и хлоропластах.

Анализ фенотипических особенностей линий с гиперэкспрессией RPOТmp 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 RPOТmp, как с митохондриальной адресацией, так и с хлоропластной, было отмечено отсутствие корреляции между количеством вставок трансгена и такими признаками, как уровень экспрессии рекомбинантной RPOТmp и копияность 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. PC-промотор *rrn*-оперона – единственный, для которого достаточно убедительно показана специфичность распознавания РНК-полимеразой RPOТmp (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 PC-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, иницированного с праймера PС, 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 PC-промотора выявлено только для линий, экспрессирующих RPOТmp с хлоропластной адресацией (рис. 1, В).

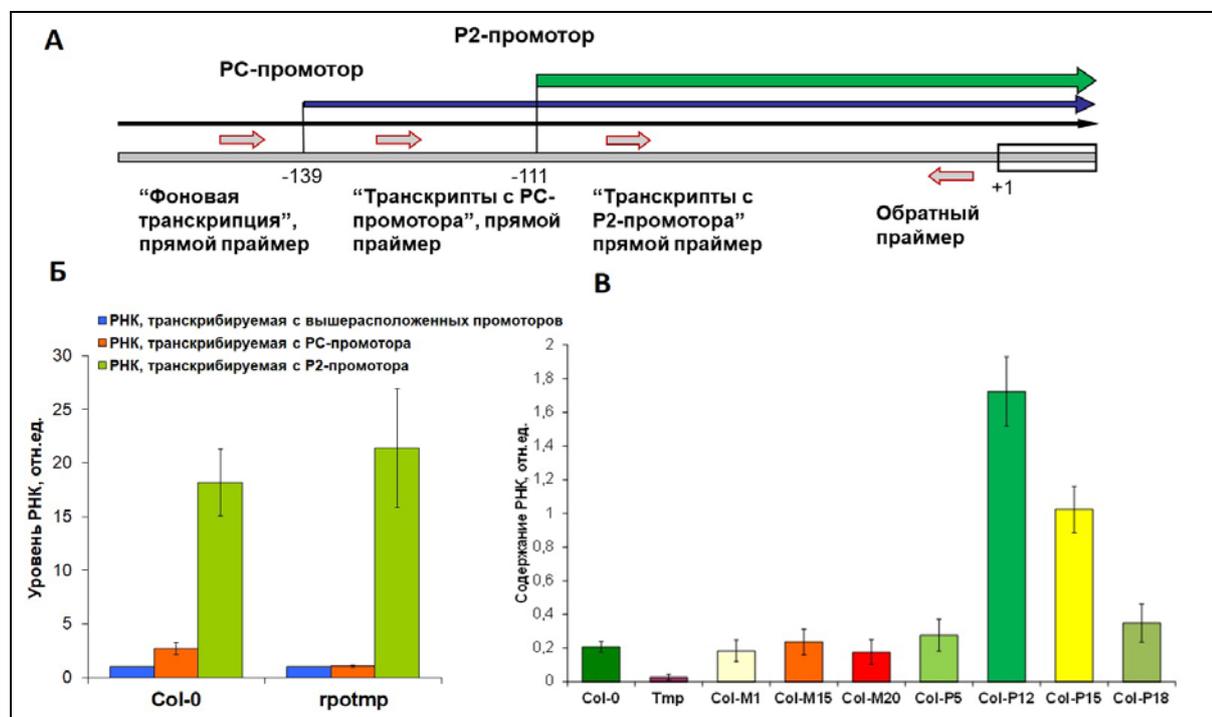


Рис. 1. Анализ уровня предшественников транскриптов, иницированных с промотора PC в диком типе (*Col-0*), мутанте *rpotmp* и линиях-гиперэкспрессорах (*Col-M* и *Col-P*).

(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, иницированных с промотора PC 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 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.
- 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.