

**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. Коротяева¹, 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.

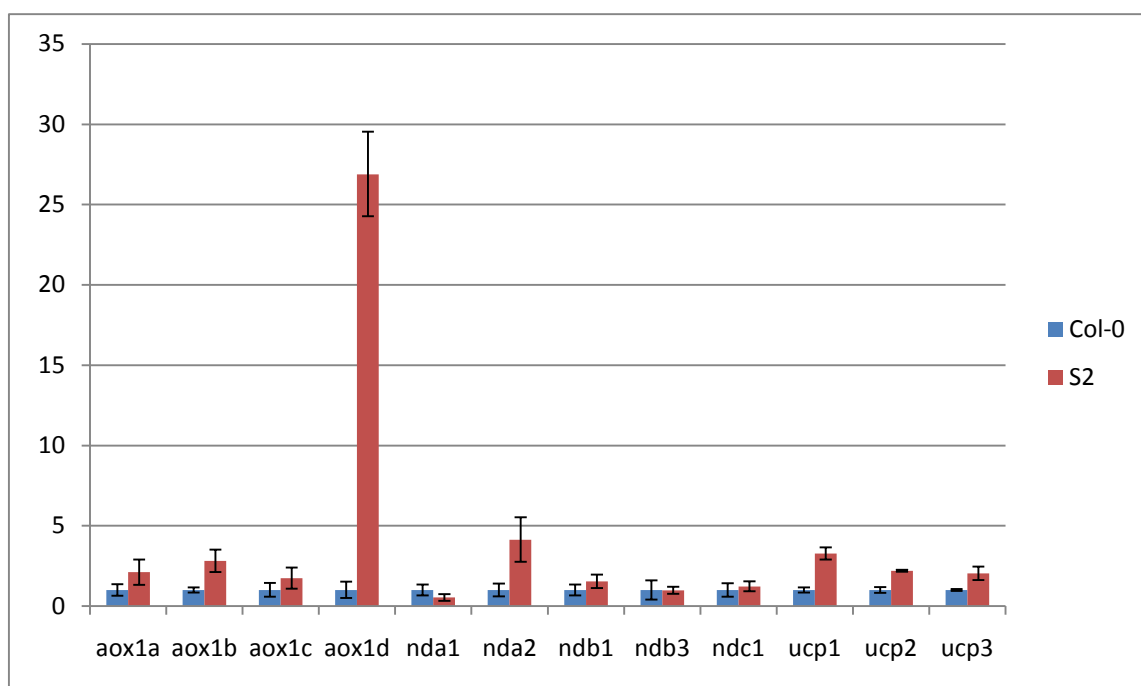


Рис. 1. Сравнительный анализ количества мРНК генов, кодирующих альтернативные NADH-дегидрогеназы, альтернативные оксидазы и разобщающие белки в контрольных растениях и растениях-гиперэкспрессорах *ndb2*.

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., Barthelet 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.