

UDC 576.315

Экспрессия гена *gdh2* арабидопсиса зависит от активности альтернативного пути переноса электронов в митохондриях

В. И. Тарасенко, Е. Ю. Гарник, Ю. М. Константинов

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
Ул. Лермонтова, 132, Иркутск, Российская Федерация, 664033

vslav@inbox.ru

Цель. Исследование уровня экспрессии гена *gdh2*, кодирующего субъединицу митохондриальной глутаматдегидрогеназы, в суспензионных культурах клеток арабидопсиса с генетически модифицированным уровнем альтернативной оксидазы АОХ1а. **Методы.** Полимеразная цепная реакция, Нозерн-блоттинг. **Результаты.** Показано, что при обработке ингибитором основного пути переноса электронов антимисицином А содержание транскриптов *gdh2* возрастает в клетках дикого типа и в клетках со сниженным уровнем альтернативной оксидазы, однако остается неизменным в клетках с ее повышенным содержанием. **Выводы.** Поскольку увеличенный уровень альтернативной оксидазы приводит к уменьшению степени восстановленности пула убихинона в дыхательной цепи, полученные результаты свидетельствуют в пользу модели, согласно которой уровень экспрессии гена *gdh2* зависит от редокс-состояния убихинонового пула.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, электронно-транспортная цепь, альтернативная оксидаза, глутаматдегидрогеназа, антимисицин А.

Введение. Результаты исследований, проведенных в последние годы, показывают, что у растений экспрессия ряда ядерных генов, кодирующих митохондриальные белки, регулируется функциональным состоянием митохондрий. Ингибирование электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий или нарушение функционирования дыхательных комплексов в результате мутации приводит к индукции генов, кодирующих альтернативные оксидазы (АО), альтернативные NAD(P)H-дегидрогеназы, компоненты митохондриальных систем импорта белков и некоторые другие белки [1–3]. Детально механизмы подобной «ретроградной» регуляции изучены в отношении экспрессии генов АО. Многочисленные исследования в этой области продемонстрировали высокую сложность и специфичность процесса активации экспрессии. Так, каждая

из трех изоформ альтернативной оксидазы кукурузы специфически индуцируется в ответ на ингибирование определенного комплекса дыхательной цепи [4]. При этом индукция генов АО зависит от уровня генерации активных форм кислорода (АФК) в ЭТЦ митохондрий и подавляется ингибиторами протеинкиназ и/или протеинфосфатаз в зависимости от конкретного гена [3, 5].

Ранее нами показано [6], что экспрессия гена *gdh2*, кодирующего бета-субъединицу локализованного в митохондриях фермента глутаматдегидрогеназы, также определяется состоянием дыхательной цепи. Обработка суспензии клеток арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) антимисицином А – ингибитором комплекса III дыхательной цепи – приводит к увеличению содержания транскриптов *gdh2* уже через 2 ч обработки. Ингибирование комплекса I при добавлении ротенона не оказывает какого-либо воздействия на уровень транскриптов. В

то же время обработка ингибитором комплекса IV цианидом калия вызывает увеличение содержания транскриптов. Таким образом, экспрессия гена *gdh2*, по-видимому, реагирует на изменения состояния дыхательной цепи на участке, локализованном между первым и третьим комплексом. Отсутствие активации экспрессии гена при обработке суспензии клеток пероксидом водорода и прооксидантом паракватом, а также результаты экспериментов с использованием антиоксидантов позволяют считать, что выявленный эффект не связан с увеличением содержания генерируемых при ингибировании ЭТЦ активных форм кислорода. Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что первичным сигналом, приводящим к индукции экспрессии *gdh2*, является изменение редокс-состояния определенного участка дыхательной цепи.

Дыхательная цепь митохондрий растений обладает рядом особенностей, главная из которых – наличие альтернативных путей транспорта электронов в обход основных дыхательных комплексов. Наиболее важный из этих путей представляет альтернативная оксидаза – белок-гомомер, способный принимать электроны от убихинона и передавать их непосредственно на кислород, минуя при этом два из трех сайтов сопряжения окисления и фосфорилирования в ЭТЦ [7].

Одной из функций АО считается предотвращение возникновения сверхвосстановленного состояния ЭТЦ и связанного с этим возрастания уровня образующихся в дыхательной цепи АФК [5]. Информативной системой для выяснения роли компонентов дыхательной цепи могут служить трансгенные растения с модифицированным уровнем экспрессии кодирующих эти белки генов. Так, использование суспензионных культур клеток трансгенных линий табака дало веские доводы в пользу важной роли АО в предотвращении образования АФК дыхательной цепью. Трансгенные линии, характеризующиеся как сверхэкспрессией, так и сниженной экспрессией АО, обладают существенно уменьшенным и увеличенным уровнями АФК [8].

В настоящей работе исследовали уровень экспрессии гена *gdh2* в суспензионных культурах клеток, полученных нами из трансгенных растений арабидопсиса с пониженным и повышенным со-

держанием АО. В результате показано, что при обработке антимицином А уровень транскриптов *gdh2* изменяется разнонаправленно в клетках исследуемых линий, что свидетельствует об участии альтернативного пути транспорта электронов в регуляции экспрессии глутаматдегидрогеназы.

Материалы и методы. Семена арабидопсиса линии Col-0 (растения дикого типа, экотип «Columbia»), линии AS-12 (растения, трансформированные конструкцией, экспрессирующей ген *aox1a* в антисенсовой ориентации под контролем промотора CaMV 35S) и линии XX-2 (растения, трансформированные конструкцией, экспрессирующей ген *aox1a* в сенсовой ориентации) получены из Nottingham Arabidopsis Stock Centre («NASC», Великобритания). Выращивание в почвенной культуре осуществляли при температуре 23 °С, 16-ч световом дне и освещенности 100 мкМ м⁻² с⁻¹, как описано ранее [9]. Субстратом служила смесь компоста для выращивания комнатных растений и вермикулита в соотношении 2:1.

Суспензионную культуру получали из стерильных проростков арабидопсиса в возрасте 7 сут. В 70 мл питательной среды на основе солей МС с добавлением тиамина – 1 мг/л, пиридоксина – 0,5 мг/л, никотиновой кислоты – 0,5 мг/л, инозитола – 100 мг/л, сахарозы – 30 г/л, 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты – 0,3 мг/л помещали 10–15 целых проростков. Культивирование проводили при температуре 25 °С в темноте на ротационном шейкере с частотой вращения 60 об/мин. Через 3–4 недели клетки помещали в 70 мл свежей питательной среды того же состава и далее субкультивировали каждые 12 дней при вышеуказанных условиях. Эксперименты выполняли на шестой день субкультивирования в трех повторностях.

Жизнеспособность суспензионной культуры оценивали по поглощению мертвыми клетками красителя Evans Blue [10].

Скрининг растений и клеток на наличие генетической конструкции проводили с помощью ПЦР. Использовали праймеры АОX.for (5'-GATGATAA CTCGCGGTGGAGCCAA) и АОX.rev (5'-GCCGA ATCCAAGTATGGCTTAAGC), специфичные к кодирующей последовательности гена *aox1a*, и праймеры CMV.for (5'-CGAAAGGCTCAGTCGAAAGA

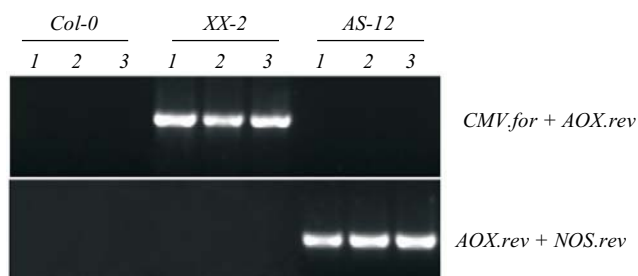


Рис. 1. ПЦР-анализ индивидуальных растений (1–3) линии дикого типа (*Col-0*) и линий с повышенным (*XX-2*) и пониженным (*AS-12*) уровнем АОХ1а. Комбинацию праймеров *CMV.for* и *AOX.rev* использовали для выявления конструкции, несущей ген *aox1a* в сенсовой ориентации; комбинацию праймеров *AOX.rev* и *NOS.rev* – конструкции с *aox1a* в антисенсовой ориентации

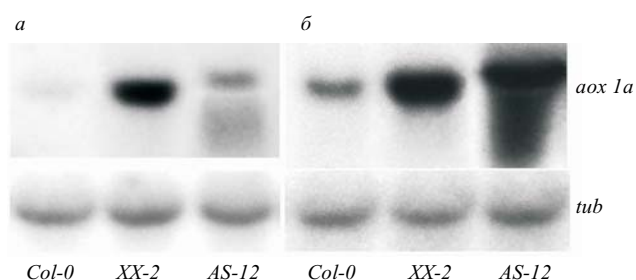


Рис. 2. Нозерн-блот анализ экспрессии гена *aox1a* в растениях (а) и суспензионных культурах клеток (б) линии дикого типа (*Col-0*) и линий с повышенным (*XX-2*) и пониженным (*AS-12*) уровнем АОХ1а. В качестве контроля приведен уровень транскрипта гена бета-тубулина (*tub*)

СТGG) и *NOS.rev* (5'-GACACCGCGCGGATAATTTATCC), специфичные к последовательности вектора. Метод ПЦР с парой праймеров *CMV.for* и *AOX.rev* позволил выявить наличие конструкции, содержащей последовательность гена *aox1a* в сенсовой ориентации, а ПЦР с парой праймеров *AOX.rev* и *NOS.rev* – наличие конструкции с *aox1a* в антисенсовой ориентации. Амплификацию ДНК проводили в стандартных условиях. В качестве матрицы для ПЦР использовали тотальную ДНК индивидуального растения, полученную согласно [11].

Для выделения тотальной РНК клетки суспензионной культуры измельчали в жидком азоте, после чего добавляли 450 мкл буфера TE, 50 мкл SDS (10 %) и 500 мкл фенола («ICN»). Дальнейшее выделение осуществляли методом горячей фенольной экстракции, как описано ранее [12]. Тотальную РНК из растений выделяли с помощью тризола (TRI reagent, «ICN») согласно рекомендациям производителя. Тотальную РНК разделяли в 1,2 %-м агарозном геле в денатурирующих условиях и перено-

сили на нейлоновую мембрану Hybond N («Amersham», США). Гибридизацию и мечение фрагментов ДНК проводили по [6]. В качестве субстрата для получения ДНК-зондов к генам *aox1a* и *tub* использовали кДНК, выделенную, как в работе [13].

Результаты и обсуждение. *Подтверждение наличия и экспрессии трансгена в растениях и клеточных культурах исследуемых линий.* Линии арабидопсиса, трансформированные конструкциями, несущими ген *aox1a* под контролем промотора *SAMV35S* в прямой (*XX-2*) либо в антисенсовой ориентации (*AS-12*), получены ранее группой американских исследователей [14]. Необходимо отметить, что, несмотря на наличие в геноме арабидопсиса генов, кодирующих пять различных изоформ альтернативной оксидазы, только изоформа АОХ1а экспрессируется на высоком уровне и активно индуцируется под воздействием стрессов или при ингибировании основного пути транспорта электронов [1]. Таким образом, растения с модифицированным уровнем экспрессии белка АОХ1а являются адекватной модельной системой для изучения последствий изменения активности альтернативного пути транспорта электронов. Семена вышеуказанных линий (поколение Т3) получены из общедоступного банка семян арабидопсиса. Потомство растений, выращенных из этих семян (поколение Т4), использовали в последующих исследованиях. Из проростков этого поколения мы получили суспензионные культуры исследуемых линий.

На первом этапе работы необходимо было убедиться в том, что чужеродный генетический материал сохраняется и экспрессируется в изучаемых растениях и суспензионных культурах. Проверка наличия ДНК-вставки в геноме растений посредством ПЦР с использованием комбинаций праймеров, специфичных к каждой из генетических конструкций, дала положительный результат (рис. 1). Далее исследовали уровень транскрипта *aox1a* в каждой из трех линий методом Нозерн-гибридизации. Как видно из рис. 2, содержание транскрипта *aox1a* в листьях индивидуальных растений и клетках суспензии линии *XX-2* многократно повышено по сравнению с линией дикого типа (*Col-0*). В растениях и клетках линии *AS-12* транскрипт, соответствующий по размеру транскрипту гена *aox1a*, не

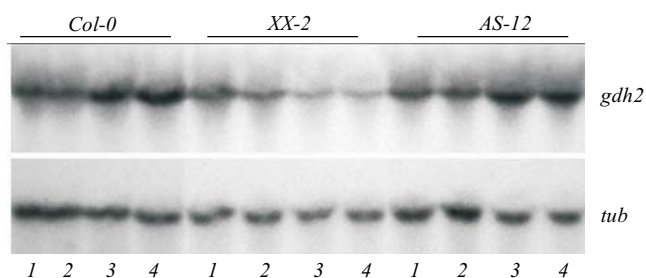


Рис. 3. Нозерн-блот анализ экспрессии гена *gdh2* в суспензионных культурах клеток линии дикого типа (*Col-0*) и линий с повышенным (*XX-2*) и пониженным (*AS-12*) уровнем альтернативной оксидазы в нормальных условиях и при обработке антимицином А. Клетки инкубировали в течение 3 (1, 3) и 5 (2, 4) ч в отсутствие (1, 2) и в присутствии (3, 4) антимицина А (10 μМ). В качестве контроля приведен уровень транскрипта гена бета-тубулина (*tub*)

обнаружен. При этом в образцах присутствовал транскрипт большего размера, отвечающий продукту экспрессии антисенсовой конструкции, а также шлейф низкомолекулярной РНК, по-видимому, соответствующий продуктам происходящей в клетке деградации транскрипта *aox1a*. Исходя из полученных данных нами сделан вывод о сохранении высокого уровня экспрессии трансформированного генетического материала как в растениях, так и в клетках суспензионной культуры.

*Исследование уровня экспрессии гена *gdh2* в суспензионных культурах клеток изучаемых линий.* Изучение уровня транскриптов гена *gdh2* в суспензиях клеток с измененным уровнем АО и клеток дикого типа показало, что в нормальных условиях ген экспрессируется на сходном уровне во всех трех линиях (рис. 3). Поскольку ранее нами показано, что экспрессия *gdh2* индуцируется в присутствии ингибитора комплекса III электронно-транспортной цепи митохондрий антимицина А, в следующем эксперименте мы сравнили уровень транскриптов *gdh2* в трех линиях при обработке этим соединением. Как видно из рис. 3, уровень экспрессии исследуемого гена под воздействием антимицина А изменяется по-разному. Содержание транскриптов *gdh2* возрастает при обработке антимицином А суспензий клеток дикого типа и клеток линии со сниженным уровнем альтернативной оксидазы. Однако воздействие антимицина А на клетки линии с повышенным содержанием альтернативной оксидазы не приводит к возрастанию уровня транскриптов. Более того, при добавлении антимицина наблюдается даже

некоторое снижение уровня экспрессии гена *gdh2*. Таким образом, в условиях повышенной активности альтернативного пути дыхания, характерной для клеток линии *XX-2* [14], наблюдается изменение направленности ответа гена *gdh2* на обработку ингибитором основного пути переноса электронов.

Известно, что активация альтернативной оксидазы приводит к возрастанию потока электронов по альтернативному пути дыхания и, соответственно, уменьшению потока через основные дыхательные комплексы. В результате этого снижается степень восстановленности пула убихинона в ЭТЦ [7]. Ранее на основании результатов экспериментов с использованием ингибиторов различных участков ЭТЦ мы предложили модель, согласно которой редокс-состояние пула убихинона служит основным источником сигнала об индукции гена *gdh2* [6]. По этой гипотезе, увеличение степени восстановленности пула убихинона, возникающее при воздействии ингибиторов комплексов III и IV либо при различных стрессах в условиях *in vivo*, приводит к возрастанию уровня экспрессии гена *gdh2*. Поскольку повышенная активность АО в клетках линии *XX-2* ведет к снижению степени восстановленности пула убихинона, отсутствие в этом случае индукции экспрессии *gdh2* при ингибировании основного пути переноса электронов хорошо вписывается в предложенную гипотезу.

Выводы. Полученные в экспериментах с трансгенными линиями арабидопсиса результаты свидетельствуют в пользу предложенной нами ранее модели, согласно которой уровень экспрессии ядерного гена *gdh2* зависит от редокс-состояния убихинонового пула в дыхательной цепи митохондрий. При этом полученные данные свидетельствуют о том, что модулятором уровня экспрессии *gdh2* может быть состояние не только основного, но и альтернативного пути транспорта электронов. Поскольку активность альтернативного пути переноса электронов в растительной клетке изменяется под действием многих факторов, включая разнообразные стрессы, данный механизм может играть важную роль в регуляции экспрессии глутаматдегидрогеназы *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Интеграционного междисциплинарного проекта СО

РАН № 59, гранта РФФИ 12-04-01148-а и Министерства образования и науки Российской Федерации (2012-1.1-12-000-2008-6400).

V. I. Tarasenko, E. Yu. Garnik, Yu. M. Konstantinov

Expression of *Arabidopsis gdh2* gene depends on activity of alternative electron transfer pathway in mitochondria

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
132, Lermontova Str., Irkutsk, Russian Federation, 664033

Summary

Aim. We studied the expression level of *gdh2* gene, encoding subunit of mitochondrial glutamate dehydrogenase, in *Arabidopsis* suspension culture cells with genetically modified level of alternative oxidase *AOX1a*. **Methods.** Polymerase chain reaction, Northern-blotting. **Results.** The treatment with main electron transfer pathway inhibitor antimycin A led to an increase in *gdh2* transcript level in the wild-type cells and the cells with decreased level of alternative oxidase, but not in the cells with elevated level of alternative oxidase. **Conclusions.** It is known that an increase in alternative oxidase level in the plant cell results in more oxidized state of ubiquinone pool in respiratory chain. Therefore, the obtained results support the earlier proposed model according to which the expression level of *gdh2* gene depends on the redox state of ubiquinone pool.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, electron transport chain, alternative oxidase, glutamate dehydrogenase, antimycin A.

V. I. Тарасенко, Е. Ю. Гарник, Ю. М. Константинов

Експресія гена *gdh2* арабідопсису залежить від активності альтернативного шляху перенесення електронів у мітохондріях

Резюме

Мета. Дослідити рівень експресії гена *gdh2*, кодуючого субодиницю мітохондріальної глутаматдегідрогенази, у суспензійних культурах клітин арабідопсису з генетично модифікованим рівнем альтернативної оксидази *АОХ1а*. **Методи.** Полімеразна ланцюгова реакція. **Результати.** Показано, що за обробки інгібітором основного шляху перенесення електронів антимицином А вміст транскриптів *gdh2* зростає у клітинах дикого типу і в клітинах зі знизеним рівнем альтернативної оксидази, однак він лишається незмінним у клітинах з її підвищеним вмістом. **Висновки.** Оскільки збільшений рівень альтернативної оксидази спричиняє зменшення ступеня відновлення пулу убіхінону у дихальному ланцюгу, отримані результати свідчать на користь моделі, згідно з якою рівень експресії гена *gdh2* залежить від редокс-стану убіхінонового пулу.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana*, електронно-транспортний ланцюг, альтернативна оксидаза, глутаматдегідрогеназа, антимицин А.

REFERENCES

1. Clifton R., Lister R., Parker K. L., Sappl P. G., Elhafez D., Millar A. H., Day D. A., Whelan J. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana* // Plant Mol. Biol.—2005.—**58**, N 2.—P. 193–212.
2. Lister R., Chew O., Lee M. N., Heazlewood J. L., Clifton R., Parker K. L., Millar A. H., Whelan J. A transcriptomic and proteomic characterization of the *Arabidopsis* mitochondrial protein import apparatus and its response to mitochondrial dysfunction // Plant Physiol.—2004.—**134**, N 2.—P. 777–789.
3. Vanlerberghe G. C., Robson C. A., Yip J. Y. Induction of mitochondrial alternative oxidase in response to a cell signal pathway down-regulating the cytochrome pathway prevents programmed cell death // Plant Physiol.—2002.—**129**, N 4.—P. 1829–1842.
4. Karpova O. V., Kuzmin E. V., Elthon T. E., Newton K. J. Differential expression of alternative oxidase genes in maize mitochondrial mutants // Plant Cell.—2002.—**14**, N 12.—P. 3271–3284.
5. Vanlerberghe G. C., McIntosh L. Alternative oxidase: from gene to function // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.—1997.—**48**.—P. 703–734.
6. Tarasenko V. I., Garnik E. Yu., Shmakov V. N., Konstantinov Yu. M. Induction of *Arabidopsis gdh2* gene expression during changes in redox state of the mitochondrial respiratory chain // Biochemistry (Moscow).—2009.—**74**, N 1.—P. 47–53.
7. Moller 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.—**52**.—P. 561–591.
8. Maxwell D. P., Wang Y., McIntosh L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells // Proc. Natl Acad. Sci. USA.—1999.—**96**, N 14.—P. 8271–8276.
9. Tarasenko V. I., Garnik E. Yu., Konstantinov Yu. M. Characterization of *Arabidopsis* mutant with inactivated gene coding for Fe-S subunit of mitochondrial respiratory chain complex I // Russ. J. Plant Physiol.—2010.—**57**, N 3.—P. 392–400.
10. Baker C. J., Mock N. M. An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using Evans blue // Plant Cell. Tissue and Organ. Culture.—1994.—**39**.—P. 7–12.
11. Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid isolation program for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull.—1987.—**19**.—P. 11–15.
12. Garnik E. Yu., Tarasenko V. I., Kobsev V. F., Konstantinov Yu. M. Differential expression of maize mitochondrial genes as dependent on mitochondria redox state // Russ. J. Plant Physiol.—2006.—**53**, N 4.—P. 463–468.
13. Tarasenko V. I., Katyshev A. I., Kobzev V. F., Konstantinov Yu. M. Comparative analysis of nuclear and mitochondrial DNA topoisomerase I from *Zea mays* // Mol. Biol. (Mosk.).—2008.—**42**, N 1.—P. 88–95.
14. Umbach A. L., Fiorani F., Siedow J. N. Characterization of transformed *Arabidopsis* with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue // Plant Physiol.—2005.—**139**, N 4.—P. 1806–1820.

Received 10.05.12