



УДК 576.315

Митохондриальная регуляция экспрессии гена глутаматдегидрогеназы арабидопсиса как новый пример митохондриально-ядерных взаимодействий

Е. Ю. Гарник¹, В. И. Тарасенко¹, В. Н. Шмаков¹, Г. А. Невинский²,
Ю. М. Константинов¹

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

E-mail: vslav@irk.ru

Аннотация. Показано, что обработка суспензии клеток арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) ингибитором комплекса III дыхательной цепи антимицином А или ингибитором комплекса IV цианидом приводит к увеличению содержания транскриптов гена *gdh2*, кодирующего α -субъединицу митохондриальной глутаматдегидрогеназы. Ингибирование комплекса I не оказывает воздействия на уровень транскриптов *gdh2*. Таким образом, экспрессия *gdh2* специфически реагирует на изменения состояния определенных участков дыхательной цепи. Показана необходимость фосфорилирования белков для передачи сигнала об индукции экспрессии *gdh2* из митохондрий в ядро.

Ключевые слова: глутаматдегидрогеназа, электрон-транспортная цепь, ретроградная регуляция, антимицин А.

Подавляющее большинство генов, кодирующих митохондриальные белки, в том числе все белки метаболизма нуклеиновых кислот, локализованы в ядре. Таким образом, экспрессия генома митохондрий находится под контролем ядра. Однако в последние годы появляется все больше данных о существовании и обратной зависимости – состояние митохондрий может контролировать экспрессию некоторых ядерных генов. Так, ингибирование электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий или нарушение функционирования дыхательных комплексов в результате мутации приводит к индукции генов, кодирующих альтернативные оксидазы (АО), альтернативные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы и компоненты митохондриальных систем импорта белков [5]. Однако детальное изучение механизмов подобной «ретроградной» регуляции производилось лишь в отношении экспрессии генов АО [5]. Мутантные линии табака с нарушенным функционированием комплекса I характеризуются изменениями в экспрессии ферментов антиоксидантной защиты. Более того, митохондриальные сигналы, ассоциированные с нарушениями в дыхательном комплексе, приводят к повышению устойчивости растения к стрессам [2]. Очевидно, что для получения информации о сигналах, вовлеченных в митохондриально-

ядерные взаимодействия, необходимо детальное исследование путей регуляции экспрессии других «митохондриально-зависимых» генов.

Фермент глутаматдегидрогеназа катализирует реакцию присоединения иона аммония к молекуле 2-оксоглутарата с образованием молекулы L-глутамата, играя роль связующего звена между метаболизмом азота и углерода в клетках растений [9]. Остаются невыясненными конкретные сигнальные пути, участвующие в регуляции экспрессии глутаматдегидрогеназы. Нами показано, что экспрессия гена *gdh2*, кодирующего α -субъединицу глутаматдегидрогеназы, активируется при ингибировании ЭТЦ митохондрий.

Материалы и методы

Суспензионную культуру клеток *Arabidopsis thaliana* культивировали при 26 °С в темноте на среде MS [6]. Продолжительность каждого субкультивирования составляла 14 сут. Эксперименты проводили на десятый день субкультивирования в трех повторностях. Выделение клеточной РНК осуществляли методом горячей фенольной экстракции, как описано [11].

Мечение фрагментов ДНК проводили с помощью ПЦР в присутствии [α -³²P]dATP (ФГУП ИРМ, Россия) в количестве 100 мкКи на одну пробу. Общую клеточную РНК разде-

ляли в 1,2%-ном агарозном геле в денатурирующих условиях и переносили на нейлоновую мембрану Hybond N (Amersham, США). Гибридизацию проводили как описано [1].

Результаты и обсуждения

Исследование уровня экспрессии гена *gdh2*, кодирующего α -субъединицу глутаматдегидрогеназы, показало выраженное увеличение содержания транскриптов при обработке клеток антимицином А. Это увеличение обнаруживалось уже через 2 ч после начала обработки и сохранялось на протяжении по крайней мере 8 ч. Уровень транскриптов митохондриального гена *cox3*, кодирующего субъединицу цитохромоксидазного комплекса, и ядерного гена *fro1*, кодирующего субъединицу NADH-дегидрогеназного комплекса, оставался неизменным на всем протяжении обработки. Содержание транскриптов этих генов использовалось в качестве контроля в последующих экспериментах.

Далее мы сравнили влияние ингибиторов I, III и IV комплексов ЭТЦ на экспрессию гена *gdh2*. Ингибирование комплекса I при добавлении 20 мкМ ротенона не воздействовало на уровень транскриптов (рис. 1). В то же время обработка ингибитором комплекса IV цианидом калия вызывала увеличение содержания транскриптов *gdh2*. Степень данной индукции экспрессии была сопоставима с наблюдаемой при обработке антимицином А (рис. 1).

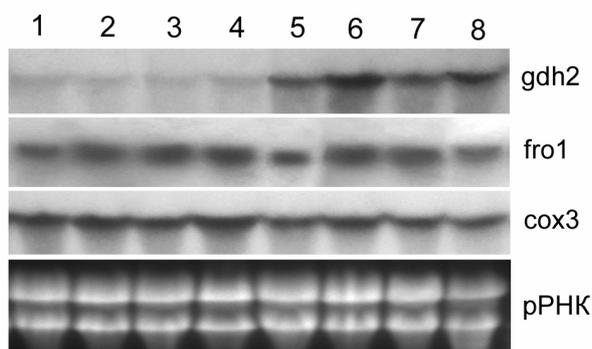


Рис. 1. Влияние ингибиторов трех комплексов ЭТЦ (ротенон, 20 мкМ, антимицин А, 10 мкМ, цианид калия, 1 мМ) на содержание транскриптов гена *gdh2* в суспензии клеток арабидопсиса. В качестве контроля приведен уровень транскриптов генов *fro1* и *cox3*. 1 – Контроль, 3 ч; 2 – контроль, 6 ч; 3 – ротенон, 3 ч; 4 – ротенон, 6 ч; 5 – антимицин А, 3 ч; 6 – антимицин А, 6 ч; 7 – KCN, 3 ч; 8 – KCN, 6 ч

Блокирование переноса электронов по ЭТЦ приводит к возрастанию степени восстановленности участка дыхательной цепи «левее» места воздействия соответствующего ингибитора [7].

Можно предположить, что экспрессия гена *gdh2* реагирует на изменения редокс-состояния участка дыхательной цепи, локализованного между комплексами I и III. Поскольку данный участок ЭТЦ содержит убихинон, редокс-состояние убихинонового пула является наиболее вероятным кандидатом на роль первичного сигнала для индукции экспрессии *gdh2*. Для хлоропластов установлена модуляция экспрессии генов хлоропластной (*psaA*, *psbA*) и ядерной (*apx2*, *fed1*) локализации в зависимости от редокс-состояния пула пластохинона [8], что свидетельствует в пользу существования аналогичных путей регуляции в митохондриях.

Увеличение степени восстановленности ЭТЦ, возникающее при ее ингибировании, в свою очередь, приводит к повышенному образованию активных форм кислорода (АФК) [7]. Логично предположить, что повышение внутриклеточного содержания АФК и является сигналом к активации экспрессии. Для проверки этого предположения был поставлен эксперимент с использованием антиоксиданта N-ацетилцистеина. Мы предобработали клетки N-ацетилцистеином за 30 мин до добавления антимицина А. В случае если АФК, генерируемые при ингибировании дыхательной цепи, участвуют в передаче сигнала об индукции экспрессии в ядро, следовало ожидать снятия эффекта антимицина А. В наших экспериментах (рис. 2, а) этого не наблюдалось. Таким образом, мы полагаем, что именно изменение редокс-состояния ЭТЦ при воздействии антимицина А, а не происходящее при этом повышение уровня АФК, является первичным сигналом для усиления экспрессии гена *gdh2*.

Реакции фосфорилирования/ дефосфорилирования белков – широко распространенные посредники в процессах сигнальной трансдукции. Для исследования возможности участия протеинкиназ и/или протеинфосфатаз в передаче сигнала об изменении экспрессии *gdh2* в ядро нами был поставлен эксперимент, в котором суспензия клеток предобрабатывалась ингибитором протеинкиназ стауроспорином и ингибитором фосфатаз эндоталом. Дополнительно изучали уровень транскриптов гена альтернативной оксидазы *aox1a*. В соответствии с полученными ранее данными [3], обработка антимицином А приводила к индукции гена *aox1a*. Присутствие ингибитора серин/треониновых фосфатаз эндотала никак не влияло на накопление транскриптов *gdh2* и *aox1a* под воздействием антимицина А (рис. 2, б). В то же время обработка ингибитором се-

рин/треониновых протеинкиназ стауроспорином приводила к снятию активирующего действия антимицина А на экспрессию *gdh2*, при этом уровень транскриптов *aox1a* оставался неизменным. Можно сделать вывод, что фосфорилирование белков, осуществляемое серин/треониновыми протеинкиназами – необходимый этап в процессе передачи сигнала об изменении экспрессии *gdh2* в ядро.

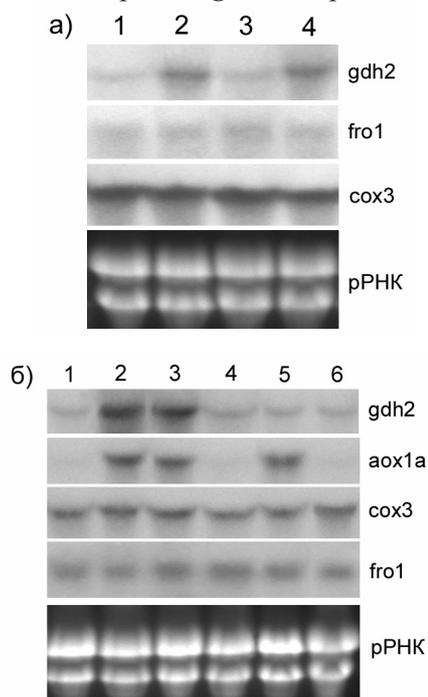


Рис. 2. а) Влияние N-ацетилцистеина на индукцию экспрессии *gdh2* антимицином А. Клетки предобрабатывали N-ацетилцистеином (2 мМ) за 30 мин до добавления антимицина А (10 мкМ). После добавления антимицина клетки инкубировали в течение 2 ч. 1 – контроль; 2 – антимицин А; 3 – N-ацетилцистеин; 4 – N-ацетилцистеин + антимицин А; б) Влияние ингибиторов протеинкиназ и протеинфосфатаз на индукцию гена *gdh2* под воздействием антимицина А. Клетки предобрабатывали эндоталом (50 мкМ) и стауроспорином (0,4 мкМ) за 30 мин до добавления антимицина А (10 мкМ). В качестве контроля приведен уровень транскриптов генов *fro1* и *cox3*. 1 – контроль; 2 – антимицин А; 3 – эндотал + антимицин А; 4 – эндотал; 5 – стауроспорин + антимицин А; 6 – стауроспорин

Ранее была показана роль электрохимического потенциала митохондриальных мембран в передаче сигнала об индукции экспрессии белков теплового шока [10]. Участниками другой сигнальной системы, задействованной в регуляции экспрессии генов АО, являются АФК митохондриального происхождения [3]. Поставленные нами эксперименты не подтвердили участия этих двух сигнальных путей в регуляции экс-

прессии гена *gdh2*. В генерации сигнала об изменении экспрессии *gdh2* центральную роль, по видимому, играет редокс-состояние пула убихинона. Таким образом, обнаруженный нами новый пример ретроградной регуляции экспрессии ядерного гена иллюстрирует разнообразие специфичных для определенных генов сигнальных путей, точкой пересечения которых является растительная митохондрия.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (07-04-01341-а) и программы «Научные школы» (НШ-4812.2006.1).

Литература

1. Гарник Е. Ю. Дифференциальная экспрессия митохондриальных генов кукурузы при изменении редокс-состояния митохондрий / Е. Ю. Гарник [и др.] // Физиология растений. – 2006. – Т. 53, № 4. – С. 518–24.
2. Dutilleul C. Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance / C. Dutilleul [et al.] // Plant Cell. – 2003. – Vol. 15. – P. 1212–1226.
3. Dojcinovic D. Identification of a region of the AOX1a promoter necessary for mitochondrial retrograde regulation of expression / D. Dojcinovic [et al.] // Plant Mol. Biol. – 2005. – Vol. 58. – P. 159–175.
4. Karpova O. V. Differential expression of alternative oxidase genes in maize mitochondrial mutants / E. V. Kuzmin, T. E. Elthon, K. J. Newton // Plant Cell. – 2002. – Vol. 14. – P. 3271–3284.
5. Lister R. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in Arabidopsis thaliana / R. Lister [et al.] // Plant Physiol. – 2004. – Vol. 134. – P. 777–789.
6. Murashige T. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
7. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species / I. M. Moller // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 2001. – Vol. 52. – P. 561–591.
8. Phanschmidt T. Photosynthetic control of chloroplast gene expression / T. Phanschmidt, A. Nilson, J. F. Allen // Nature. – 1999. – Vol. 397. – P. 625–628.
9. Purnell M. P. Tobacco isoenzyme 1 of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase catabolizes glutamate in vivo / M. P. Purnell, J. R. Botella // Plant Physiology. – 2007. – Vol. 143. – P. 530–539.
10. Rikhvanov E. G. Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in Arabidopsis cell culture / E. G. Rikhvanov [et al.] // Plant J. – 2007. – Vol. 52. – P. 763–778.
11. Vervoerd T. C. A small-scale procedure for rapid isolation of plant RNAs / T. C. Vervoerd, B. M. Dekker, A. Hoekema // Nucl. Acids Res. – 1989. – Vol. 17. – P. 2362.

Mitochondrial regulation of arabidopsis glutamate dehydrogenase gene expression as a new example of mitochondrial-nuclear interactions

E. Yu. Garnik¹, V. I. Tarasenko¹, V. N. Shmakov¹, G. A. Nevinsky², Yu. M. Konstantinov¹

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch RAS, Novosibirsk

Abstract. The treatment of *Arabidopsis thaliana* suspension cell culture with an inhibitor of respiratory complex III antimycin A or with an inhibitor of respiratory complex IV potassium cyanide led to a rapid increase of transcript content of *gdh2* gene encoding alpha-subunit of glutamate dehydrogenase. Inhibition of complex I upon the addition of rotenone had no influence on the transcript level. We suggest that *gdh2* expression responds to changes of the state of specific respiratory chain regions. We showed that protein phosphorylation is essential component of signal transduction into nucleus leading to *gdh2* expression induction.

Key words: glutamate dehydrogenase, respiratory chain, retrograde regulation, antimycin A.

Гарник Елена Юрьевна
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317
научный сотрудник
лаборатории генетической инженерии растений
тел. (395 2) 42-49-03, факс(395 2) 51-07-54 E-mail:
garnik@sifibr.irk.ru

Garnik Elena Yurievna
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry
SB RAS
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.
research scientist
Laboratory of Plant Genetic Engineering
phone: (3952) 42-49-03, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: garnik@sifibr.irk.ru

Тарасенко Владислав Игоревич
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник
лаборатории генетической инженерии растений
тел. (395 2) 42-49-03, факс (395 2) 51-07-54
E-mail: vslav@irk.ru

Tarasenko Vladislav Igorevitch
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry
SB RAS
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.
Ph. D. in Biology, senior research scientist Laboratory
of Plant Genetic Engineering
phone: (3952) 42-49-03, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: vslav@irk.ru

Шмаков Владимир Николаевич
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник
лаборатории генетической инженерии растений
тел. (395 2) 42-49-03, факс (395 2) 51-07-54
E-mail: shmakovv@sifibr.irk.ru

Shmakov Vladimir Nikolaevitch
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry
SB RAS
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.
Ph. D. in Biology, senior research scientist Laboratory
of Plant Genetic Engineering
phone: (3952) 42-49-03, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: shmakovv@sifibr.irk.ru

Невинский Георгий Александрович
Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН
630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8
докто химических наук, профессор,
зав. лабораторией ферментов репарации
тел. (383) 335-62-26 факс:(383) 333-36-77
E-mail: nevinsky@niboch.nsc.ru.

Nevinsky Georgi Aleksandrovitch
Institute of Chemical Biology and Fundamental
Medicine SB RAS
630090, Novosibirsk, 8, Lavrentiev Ave.
D. Sc. in Chemistry, Prof., Head of Laboratory of Repair
Enzymes
Phone: (383) 335-62-26, fax: (383) 333-36-77
E-mail: nevinsky@niboch.nsc.ru.

Константинов Юрий Михайлович
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317
доктор биологических наук
заведующий лабораторией генетической инженерии
растений
тел. (395 2) 42-49-03, факс (395 2) 51-07-54
E-mail: yukon@sifibr.irk.ru

Konstantinov Yuri Mikhailovitch
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry
SB RAS
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.
D. Sc. in Biology, Head of Laboratory of Plant Genetic
Engineering
phone: (3952) 42-49-03, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: yukon@sifibr.irk.ru