

Влияние гиперэкспрессии гена митохондриальной альтернативной «внешней» NAD(P)H-дегидрогеназы арабидопсиса на продукцию активных форм кислорода в клетках табака при низкотемпературном стрессе

*Боровский Г.Б. *, д.б.н., зам. дир.; Горбылева Е.Л., к.б.н., м.н.с.; Катышев А.И., к.б.н., с.н.с.; Коротаева Н.Е., к.б.н., с.н.с.; Полякова Е.А., вед. инж.; Пятрикас Д.В., к.б.н., н.с.; Сидоров А.В., вед. инж.; Степанов А.В., к.б.н., с.н.с.; Федосеева И.В., к.б.н., с.н.с.; Шигарова А.М., к.б.н., с.н.с.*

ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия

**email: borovskii@sifibr.irk.ru*

С помощью трансгенных по гену NDB2 (альтернативная «внешняя» NAD(P)H-дегидрогеназа митохондрий) растений табака было показано участие данного белка и альтернативной цепи транспорта электронов в митохондриях в снижении продукции АФК при низкотемпературном стрессе в фотосинтезирующих клетках. В то же время в нефотосинтезирующих клетках трансгенных растений при низкой температуре происходило некоторое увеличение продукции АФК. Это свидетельствует о важной роли хлоропластно-митохондриальных энергетических связей и ферментов альтернативной дыхательной цепи в стрессовой и адаптивной реакции растений на холод.

Ключевые слова: табак, ген NDB2, альтернативная NAD(P)H-дегидрогеназа, низкая температура, активные формы кислорода.

The effect of overexpression of the mitochondrial Arabidopsis alternative “external” NAD(P)H dehydrogenase gene on the production of reactive oxygen species in tobacco cells under low temperature stress

*Borovskii G.B. *, Gorbyleva E.L., Katyshev A.I., Korotaeva N.E., Polyakova E.A., Pyatrikas D.V., Sidorov A.V., Stepanov A.V., Fedoseeva I.V., Shigarova A.M.*

Siberian institute of plant physiology and biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russia

**email: borovskii@sifibr.irk.ru*

Using tobacco plants transgenic for the NDB2 gene (alternative “external” mitochondrial NAD(P)H dehydrogenase), the participation of this protein and the alternative electron transport chain in mitochondria in reducing ROS production under low-temperature stress in photosynthetic cells was shown. At the same time, in non-photosynthetic cells of transgenic plants at low temperatures there was a slight in-

crease in ROS production. This indicates the important role of chloroplast-mitochondrial energy connections and enzymes of alternative respiratory chain in the stress and adaptive response of plants to cold.

Key words: tobacco, NDB2 gene, alternative NADH dehydrogenase, low temperature, reactive oxygen species.

При энергозапасующем окислении NADH митохондриями функционирует комплекс I дыхательной цепи, который является одной из точек генерации мембранного потенциала. У большинства организмов его работа ингибируется ротеноном. Ряд организмов, в том числе растения, также имеет дыхание, не чувствительное к ротенону. NAD(P)H при этом окисляется ферментами, локализованными на наружной или на внутренней стороне внутренней митохондриальной мембраны. У арабидопсиса найдены три группы таких NAD(P)H-дегидрогеназ второго типа (ND II): NDA (два гена), NDB (четыре гена), и NDC (один ген) [1]. NDB1–NDB4 являются «внешними» (расположены на наружной стороне внутренней мембраны митохондрий), а NDA1–NDA2 и NDC1 – «внутренними» (обращены к митохондриальному матриксу) [2]. Точные физиологические функции конкретных белков семейства NDII не определены. Наиболее распространенной точкой зрения является их вовлеченность (вместе с альтернативной оксидазой (АОХ)) в формирование нефосфорилирующей дыхательной цепи при стрессах и метаболическом дисбалансе [3, 4]. При многих стрессах, например, при засухе, практически все гены, кодирующие белки альтернативных путей митохондриального транспорта электронов, участвуют в стрессовой реакции растений и адаптации [5]. Ранее было показано, что ген *NDB2* играет роль в устойчивости арабидопсиса к засухе при сильном освещении [4], а устойчивые к засухе разновидности демонстрируют значительно более высокую экспрессию *NDB2* (как и ряда других генов альтернативных путей дыхания), чем чувствительные к данному стрессовому фактору растения [6]. Прямых экспериментов, указывающих на защитную роль экспрессии *NDB2* при низкой температуре, ранее проведено не было. В качестве модельного объекта нами были созданы трансгенные растения табака (*Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1), гиперэкспрессирующие ген *A. thaliana At_NDB2* [7]. Было получено подтверждение митохондриальной локализации и высокой активности белка NDB2, формирование нефосфорилирующей дыхательной цепи в митохондриях. Далее выяснили, что устойчивость растений трансгенного по *NDB2* табака к отрицательной температуре не изменилась по сравнению с диким типом [7, 8].

Целью данной работы была оценка влияния гена *At_NDB2* и работы нефосфорилирующей дыхательной цепи при низкотемпературном стрессе в фотосинтезирующих и нефотосинтезирующих клетках на генерацию АФК.

Изучение уровня генерации АФК в трансгенных по гену *NDB2* клетках табака в сравнении с диким типом проводили на протопластах из листьев растений и на корнях проростков, используя свечение 2',7'-дихлорофлуоресцеина (DCF) в качестве параметра, отражающего уровень АФК в клетках, с помощью флуоресцентной микроскопии.

При обычных условиях (25 °C) интенсивность флуоресценции DCF в протопластах, полученных из листьев растений дикого типа и трансгенных растений, находилась примерно на одном уровне. Добавление 10 мМ пероксида водорода вызывало значительное повышение флуоресценции DCF. В протопластах трансгенной линии (13S) наблюдали меньшее повышение флуоресценции DCF. Холод (5 °C) и субоптимальная (15 °C) температура приводила к повышению флуоресценции DCF у протопластов из табака дикого типа, которого не наблюдалось в протопластах трансгенной линии (рис. 1).

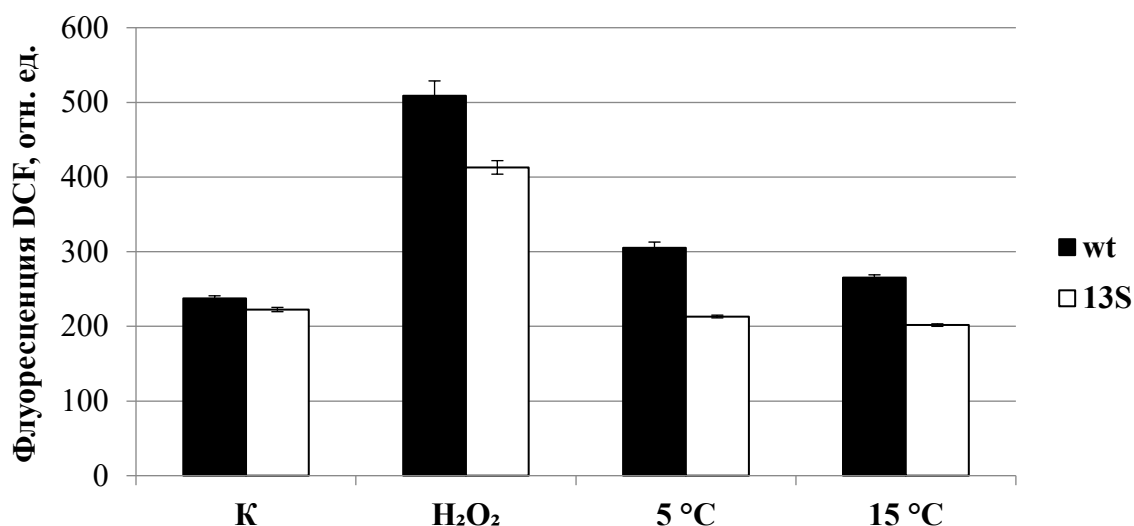


Рис. 1. Уровень АФК в протопластах из листьев табака дикого типа (wt) и трансгенных по гену *At_NDB2* (13S) при контрольной (25 °C) и пониженных температурах

В корнях растений дикого типа и трансгенных флуоресценция DCF при обычных условиях (25 °C) была одинаковой (рис. 2). Значительное повышение флуоресценции DCF при добавлении пероксида водорода регистрировалось в обоих случаях, однако у дикого типа повышение было несколько выше. Инкубирование корней растений при 5 и 15 °C сопровождалось повышением флуоресценции DCF только в корнях трансгенных растений.

Таким образом, исходя из полученных данных, можно видеть, что трансгенный табак (с введенным геном *At_NDB2*) в клетках листьев и корней в норме генерирует примерно равное количество АФК в сравнении с исходным типом растений. Клетки листьев более устойчиво поддерживают гомеостаз в уровне АФК при низкотемпературном воздействии. В то же время в корнях картина об-

ратная. Повышение генерации АФК было выше у трансгенного табака (за исключением реакции на пероксид водорода). Это ведет к предположению, что рост генерации АФК в протопластах листьев является реакцией хлоропластов на изменение температуры. Митохондрии с увеличенным содержанием NDB2 и активной «альтернативной дыхательной цепью» могут генерировать даже больше АФК при низкотемпературных стрессах, однако в фотосинтезирующих клетках они существенно снижают рост генерации АФК. Скорее всего это происходит в ходе их взаимодействия с хлоропластами и окисления восстановленных эквивалентов в «альтернативной цепи транспорта электронов» в митохондриях.

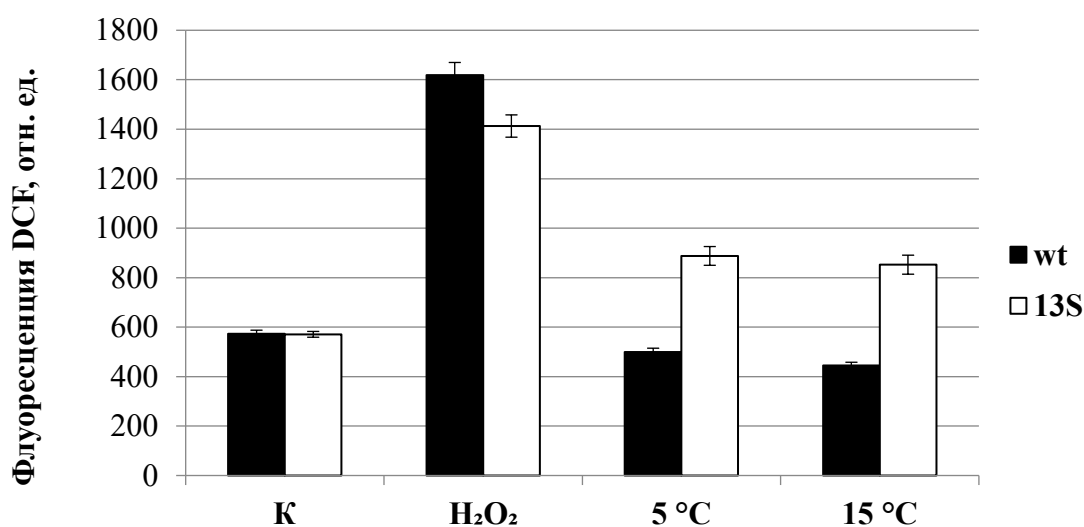


Рис. 2. Уровень АФК в корнях табака дикого типа (wt) и трансгенных по гену *At_NDB2* (13S) при контрольной (25 °C) и пониженных температурах

Для фотоавтотрофных клеток растений необходимо поддержание равновесия между энергией, улавливаемой фотохимическими реакциями, и энергией, используемой в ходе метаболизма, роста и развития [9]. Дисбаланс между поступающей и используемой энергией возникает, когда величина, поглощаемой фотосистемами энергии, превышает ее использование при зависящих от температуры нефотохимических процессах. Такой дисбаланс приводит к росту генерации АФК в фотосинтезирующих клетках [10] и потенциально опасен для клеток. Как нам удалось выяснить, ему препятствует активное функционирование в митохондриях альтернативной нефосфорилирующей дыхательной цепи с участием NDB2 и AOX.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00097 (<https://rscf.ru/project/23-24-00097/>).

Список литературы

- 1 Michalecka A.M., Svensson A.S., Johansson F.I., Agius S.C., Johanson U., Brennicke A., et al. Arabidopsis genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light // *Plant Physiology*. 2003. V. 133. № 2. P. 642–652.
- 2 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 and Cell Physiology*. 2006. V. 47. № 1. P. 43–54.
- 3 Møller I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 2001. V. 52. № 1. P. 561–591.
- 4 Sweetman C., Waterman C.D., Rainbird B.M., Smith P.M.C., Jenkins C.D., Day D.A., et al. AtNDB2 is the main external NADH dehydrogenase in mitochondria and is important for tolerance to environmental stress // *Plant Physiology*. 2019. V. 181. № 2. P. 774–788.
- 5 Yerlikaya B.A., Ates D., Abudureyimu B., Aksoy E. Effect of climate change on abiotic stress response gene networks in Arabidopsis thaliana // *Principles and practices of OMICS and genome editing for crop improvement* / eds C.S. Prakash, S. Fiaz, S. Fahad. Cham: Springer, 2022. P. 149–172.
- 6 Alizadeh R., Kumleh H.H., Rezadoost M.H. The simultaneous activity of cytosolic and mitochondrial antioxidant mechanisms in neutralizing the effect of drought stress in soybean // *Plant Physiology Reports*. 2023. V.28. №1. P.78–91.
- 7 Коротаева Н.Е., Шигарова А.М., Катышев А.И., Федосеева И.В., Федяева А.В., Савчин Д.В. [и др.]. Влияние экспрессии гетерологичного гена NDB2 Arabidopsis thaliana на рост и дыхательную активность Nicotiana tabacum // *Физиология растений*. 2023. Т. 70. № 5. С. 461–471.
- 8 Боровский Г.Б., Горбылева Е.Л., Катышев А.И., Коротаева Н.Е., Полякова Е.А., Пятрикас Д.В., [и др.]. Влияние гиперэкспрессии гена альтернативной внешней NADH-дегидрогеназы арабидопсиса на устойчивость трансформированных растений табака к отрицательной температуре // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2023. Т. 12. № 4. С. 409–415.
- 9 Kurepin L.V., Dahal K.P., Savitch L.V., Singh J., Bode R., Ivanov A.G., et al. Role of CBFs as integrators of chloroplast redox, phytochrome and plant hormone signaling during cold acclimation // *International journal of molecular sciences*. 2013. V. 14. № 6. P.1 2729–12763.
- 10 Khanal N., Bray G.E., Grisnich A., Moffatt B.A., Gray G.R. Differential mechanisms of photosynthetic acclimation to light and low temperature in Arabidopsis and the extremophile Eutrema salsugineum // *Plants*. 2017. V. 6. №. 3. 32.