

ORIGINAL ARTICLE

Phenotypic Traits of Arabidopsis Plants Deficient in RpoTmp RNA Polymerase

V.I. Tarasenko^{1*}, E.Yu. Garnik¹, M.V. Koulintchenko¹,

Yu.M. Konstantinov^{1,2}

¹ Siberian institute of plant physiology and biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russia

² Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

*E-Mail: yslav@inbox.ru

Received November 24, 2015

In Arabidopsis, three nuclear-encoded RNA polymerases participate in the transcription of organellar genes. RpoTmp is a RNA polymerase that localizes both in mitochondria and chloroplasts, but is involved predominantly in the control of gene expression in mitochondria. Insertion mutant *rpotmp* is characterized by a number of phenotypic and molecular-biological peculiarities including decreased activities of the mitochondrial respiratory complexes I and IV. In the present study we compared growth characteristics of the *rpotmp* mutant and *fro1* mutant which is characterized by the absence of functional complex I. We showed that in spite of the similar molecular defects and phenotypic appearance, the investigated mutants can be distinguished by the growth rate under different photoperiod as well as by the age of leaf senescence onset. Moreover, the growth rate of suspension cell culture of the *rpotmp* line is extremely retarded which clearly distinguished it from the *fro1* suspension cell culture. We propose that unique properties of the *rpotmp* mutant are associated with the decreased level of respiratory complex IV activity.

Key words: Arabidopsis thaliana, RpoTmp RNA polymerase, respiratory complex I, respiratory complex IV, suspension cell culture

Митохондрии и пластиды обладают собственными геномами, очень малыми по сравнению с геномами их бактериальных предков. Экспрессия ограниченного количества генов, кодируемого ими (до 60 (Gualberto *et al.*, 2014) и 100 (Wicke *et al.*, 2011) в митохондриях и хлоропластах высших растений, соответственно), осуществляется транскрипционными механизмами, которые отличаются, тем не менее, большой сложностью (см. обзор Liere *et al.*, 2011). В хлоропластных геномах водорослей и высших растений присутствуют гены *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* и *rpoC2*, кодирующие основные субъединицы РНК-полимеразы цианобактериального типа, называемой сокращенно PEP (от plastid encoded polymerase; Lysenko and Kuznetsov, 2005). В митохондриях почти всех эукариот РНК-полимераза бактериального типа в ходе эволюции была заменена на фермент, гомологичный РНК-полимеразам бактериофагов типа T3/T7. РНК-полимеразы фагового типа состоят из одной субъединицы и кодируются ядерными генами (их называют NEP-полимеразами, от nuclear encoded polymerase, и обычно обозначают RpoT).

Зеленые водоросли, такие как *Chlamydomonas reinhardtii*, *Ostreococcus tauri*, *Thalassiosira pseudonana*, обладают только одним ядерным геном *RpoT*, кодирующим митохондриальную РНК-полимеразу (RpoTm) (Liere *et al.*, 2011). Ядерные геномы злаковых содержат два гена *RpoT* (Chang *et al.*, 2009), один из которых кодирует митохондриальную РНК-полимеразу (RpoTm), другой РНК-полимеразу, функционирующую в пластидах (RpoTp). До настоящего времени РНК-полимеразы двойной адресации, RpoTmp, были идентифицированы помимо мха *Physcomitrella patens* в настоящих двудольных растениях, например, в *Arabidopsis thaliana* (Hedtke *et al.*, 2000) и *Nicotiana tabacum* (Hedtke *et al.*, 2002). РНК-полимеразы RpoTm и RpoTp осуществляют

транскрипцию исключительно митохондриальных и хлоропластных генов, тогда как RpoTmp, транспортируемая как в митохондрии, так и в хлоропласты, предположительно участвует в транскрипции генов обеих органелл (Hedtke *et al.*, 2000; Baba *et al.*, 2004; Kühn *et al.*, 2009).

Ранее было показано (Baba *et al.*, 2004, Kühn *et al.*, 2009), что инсерционный мутант арабидопсиса по гену, кодирующему RpoTmp, характеризуется рядом отличных от растений дикого типа фенотипических и молекулярно-биологических признаков. Мутантная линия арабидопсиса, в которой отсутствует функциональная полимеразы RpoTmp, проявляет признаки нарушения развития растений: замедленный рост, укорочение корней, изменение формы и размеров листьев, а также снижение уровня транскриптов ряда митохондриальных генов - *matR*, *nad1*, *nad2*, *nad6*, *cox1*, *rps4* и др. (Kühn *et al.*, 2009). Различия в профилях митохондриальных транскриптов между мутантом *rpotmp* и растениями дикого типа остаются стабильными на всех этапах развития растений (Kühn *et al.*, 2009). Показано, что снижение транскрипции определенных митохондриальных генов в растениях *rpotmp* не связано с изменениями в частоте использования конкретных промоторов, что подтверждает установленное *in vitro* (Kühn *et al.*, 2007) отсутствие промоторной специфичности для активности этой РНК-полимеразы в митохондриях. Анализ промоторов генов, которые менее активно транскрибировались в *rpotmp*, и сопоставление их с промоторами других митохондриальных генов не выявили в промоторных последовательностях каких-либо специфических для RpoTmp мотивов (Kühn *et al.*, 2009). Исходя из этого, авторы высказали предположение, что функции RpoTmp, по крайней мере, в митохондриях, являются специфичными не в отношении промоторов, а в отношении генов. Снижение количества ряда

митохондриальных транскриптов приводит к снижению активности комплексов дыхательной цепи I и IV в мутанте *rpotmp*, при этом синтез белка в митохондриях мутанта остается ненарушенным (Kühn et al., 2009).

Отмечено (Kühn et al., 2009), что фенотип растений линии *rpotmp* во многом напоминает фенотип мутантов с нарушениями функционирования митохондриальной электрон-транспортной цепи, в частности растений с инактивированным дыхательным комплексом I. Нами была поставлена задача провести сравнение ростовых характеристик растений и суспензионных культур клеток мутантной линии *fro1*, в которой инактивирован ген, кодирующий Fe-S-содержащую субъединицу комплекса I, и линии *rpotmp*. В результате показано, что линия *rpotmp* проявляет фенотипические особенности, отличающие ее как от линии дикого типа, так и от линии *fro1*.

MATERIALS AND METHODS

Растительный материал и условия культивирования. Семена *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотип *Columbia* (далее *Col-0*) и линии Sail596_E11 (далее *fro1*) были получены из Arabidopsis Biological Resource Center (The Ohio State University, USA). Генотипирование, получение гомозигот и характеристика мутантных растений линии *fro1* описаны ранее (Tarasenko et al., 2010). Семена линии GABI_286E07 (далее *rpotmp*) были получены из коллекции инсерционных мутантов GABI-Kat (Rosso et al., 2003). Растения выращивали на грунте, как описано ранее (Tarasenko et al., 2012), либо стерильно в чашках Петри на средах, содержащих: минеральные соли MS – половинный состав, фитогель («Sigma-Aldrich», США) – 0,8%.

Суспензионную культуру клеток выращивали в 50-мл колбах в темноте при 26 °C на среде MS с добавлением тиамина (1 мг/л), пиридоксина (0,5

мг/л), никотиновой кислоты (0,5 мг/л), инозитола (100 мг/л), 2,4 дихлорфеноксиуксусной кислоты (0,3 мг/л) и сахарозы (30 г/л), объем среды в каждой колбе составлял 15 мл. Для построения кривых роста немедленно после пересадки культуры в свежую среду определяли средний начальный вес клеток в колбе, отфильтровав от среды и взвесив клетки в 3-5 случайно выбранных колбах. Далее аналогичным образом определяли средний вес клеток на 5-ый, 10-ый и 14-ый день после пересадки и выражали его в % от среднего начального веса.

Выделение митохондрий из листьев арабидопсиса. Выделение митохондрий из 3-недельных розеток арабидопсиса проводили согласно модифицированному методу, описанному в (Sweetlove et al., 2007). Растительный материал (в количестве 15-25 г) гомогенизировали в буфере, содержащем 0,3 М сахарозы, 25 мМ Na₄P₂O₇, 10 мМ KН₂PO₄, 2 мМ ЭДТА, 1 % PVP-40, 1 % БСА, 20 мМ аскорбата натрия, 20 мМ цистеина, pH 7.5 (в соотношении 1:5). После фильтрации через слой капроновой ткани (50 мкм) и слой ткани Miracloth, гомогенат дважды подвергали дифференциальному центрифугированию при 2450 g (5 мин) и 17400 g (20 мин), с последовательным отбором сначала супернатанта, затем митохондриального осадка и промежуточным ресуспендированием осадка в среде промывания (СП), содержащей 0,3 М сахарозы, 20 мМ MOPS, 1 мМ ЭДТА, 0,2 % БСА, pH 7.2. Митохондриальную фракцию далее подвергали очистке центрифугированием в градиенте плотности PVP-40 (0 % - 4,4 %) в СП, содержащей 28 % Percoll, при 40000 g в течение 40 мин. Отобранные митохондрии дважды промывали в СП с последующим центрифугированием при 31000 g в течение 15 мин.

Определение активности дыхательных

комплексов методом BN-PAGE. Для сольubilизации митохондриальных мембран использовали буфер, содержащий тритон X-100 (состав буфера: 5 мМ NaCl, 2 мМ аминокaproновая кислота, 1 мМ ЭДТА, 50 мМ имидазол-HCl, 5 мМ фенилметилсульфонилфторид), соотношение количества белка и детергента составляло 1:1. В супернатант, обогащенный митохондриальными мембранными комплексами, полученный после центрифугирования при 16000 g (30 мин), добавляли 5% раствор красителя Coomassie brilliant blue G-250 (СВВ). Электрофорез митохондриальных белковых комплексов проводили согласно протоколу (Heinemeyer *et al.*, 2007). В качестве разделяющего геля использовали линейный градиент, 5-13 % (в/о) акриламида, концентрирующий гель содержал 4 % акриламида. Состав катодного буфера в электрофоретической камере - 50 мМ трицин; 15 мМ бис-трис; 0,02 % Coomassie G-250; pH 7,0, анодного - 50 мМ бис-трис, pH 7,0. Проба, которую наносили на гель, содержала по 100 мкг белка. По окончании электрофореза гель помещали в раствор, содержащий 5 % СВВ в 10 %-ной уксусной кислоте. Для определения активности комплекса I использовали раствор, содержащий 0,1 М трис-HCl, pH 7,4, 0,225 мМ NADH, 157 мкг/мл нитросинего тетразолия (Sabar *et al.*, 2005). Время инкубации геля в растворе составляло 10 минут.

RESULTS AND DISCUSSION

На первом этапе работы мы сравнили активность дыхательного комплекса I в мембранах митохондрий, выделенных из растений линии дикого типа (*Col-0*), линии *fro1* с инактивированным геном, кодирующим Fe-S-содержащую субъединицу комплекса I митохондриальной дыхательной цепи, и линии *rpotmp* с инактивированным геном, кодирующим РНК-полимеразу RpoTnp (рис. 1). Активность комплекса I (представленная преимущественно

суперкомплексом, состоящим из комплексов I и III) легко детектировалась в растениях дикого типа. При этом его активность полностью отсутствовала в растениях линии *fro1*, а в растениях линии *rpotmp* обнаруживались только следовые количества комплекса I. Таким образом, мы подтвердили, что линии *rpotmp* и *fro1* проявляют сходный молекулярный дефект в отношении содержания и активности комплекса I.

Далее нами было проведено исследование фенотипических характеристик растений арабидопсиса линии *rpotmp*. Выращивание растений на грунте показало замедленный рост и более позднее образование цветоносного побега. Для листьев мутантных растений была характерна темно-зеленая окраска и складчатая поверхность листовой пластинки, что соответствует имеющимся в литературе данным (Kühn *et al.*, 2009). Следует отметить, что фенотипические характеристики растений *rpotmp*, такие как замедленное прорастание семян, позднее цветение, складчатость и темно-зеленая окраска листьев, характерны для мутантов с нарушенными митохондриальными функциями, и в особенности для растений с инактивированными компонентами дыхательного комплекса I (de Longevialle *et al.*, 2007; Kühn *et al.*, 2011). Действительно, все эти признаки проявляли и растения линии *fro1*. Это позволяет предположить, что на молекулярном уровне основной дефект, приводящий к фенотипическим отличиям мутанта *rpotmp*, состоит в сниженном уровне активности комплексов дыхательной цепи (или, возможно, только комплекса I).

Однако дальнейшее более детальное сравнение растений линии *rpotmp* с растениями линии *fro1* показало, что линия *rpotmp* обладает рядом специфических свойств. В частности, показана различная зависимость роста растений этих линий от продолжительности фотопериода. В

то время как в условиях длинного светового дня растения линий *rpotmp* и *fro1* обладали сходной скоростью роста (16 ч света и 8 ч темноты), при коротком световом дне (10 ч света и 14 ч темноты) растения линии *rpotmp* росли существенно быстрее, чем растения линии *fro1* (рис. 2).

Следует отметить, что для растений линии *fro1* (и других мутантов по комплексу I) ранее было показано, что отсутствие функционального комплекса I приводит к подавлению программ клеточной гибели листа и отсрочке увядания зеленых частей растения (Meyer et al., 2009, Tarasenko et al., 2010). Однако в настоящей работе мы показали, что листья растений линии *rpotmp*, выращиваемых в условиях короткого светового дня, напротив, проявляют признаки раннего увядания, образуя зоны некроза раньше, чем листья растений линии *fro1* и листья растений дикого типа

(рис. 3). Хотя предполагается, что отсутствие РНК-полимеразы *rpotmp* отражается главным образом на митохондриальных, но не хлоропластных функциях (Kühn et al., 2009), нельзя исключать и участие этого белка в функционировании хлоропластов. Можно предположить, что выявленные нами фенотипические различия между линиями *rpotmp* и *fro1* связаны либо с последствиями сниженной активности комплекса IV, либо с гипотетическими изменениями в хлоропластах в растениях *rpotmp*. Однако, последняя возможность представляется нам маловероятной, поскольку у растений *rpotmp* не отмечены такие характерные для подавляющего большинства хлоропластных мутантов, включая мутанты по основной хлоропластной NEP-полимеразе арабидопсиса *RpoTr*, признаки, как светлая окраска листьев, ассоциированная со сниженным содержанием хлорофилла.

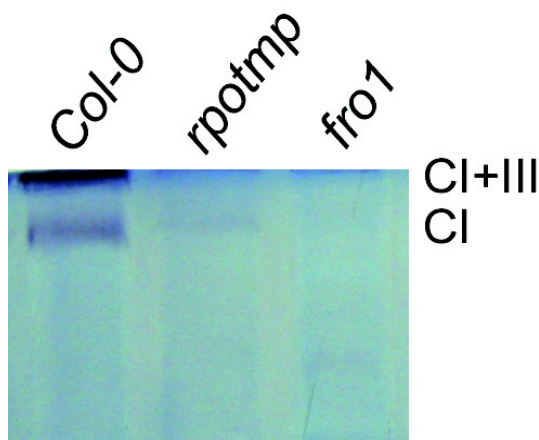


Figure 1. Активность дыхательного комплекса I в митохондриях растений дикого типа (*Col-0*) и мутантных линий *rpotmp* и *fro1*. После выделения митохондрий из листьев растений полученные фракции белков внутренней мембраны были разделены в полиакриламидном геле. CI – комплекс I, CI+III – суперкомплекс, состоящий из комплексов I и IV.

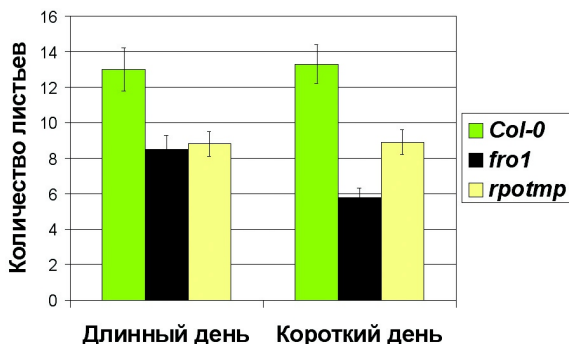


Figure 2. Зависимость числа листьев у растений линии дикого типа (*Col-0*) и мутантных линий *rpotmp* и *fro1* от продолжительности светового дня. Измерения проводили на 30-е сутки при выращивании в условиях длинного светового дня (16 ч света и 8 ч темноты) и на 40-е сутки при выращивании в условиях короткого светового дня (10 ч света и 14 ч темноты).

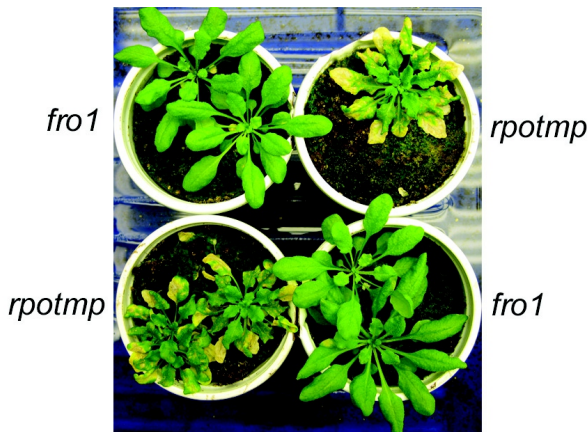


Figure 3. Листья растений линии *rpotmp* образуют зоны некроза раньше, чем листья растений линии *fro1*. Возраст растений составлял 45 сут, выращивание производилось в условиях короткого светового дня.

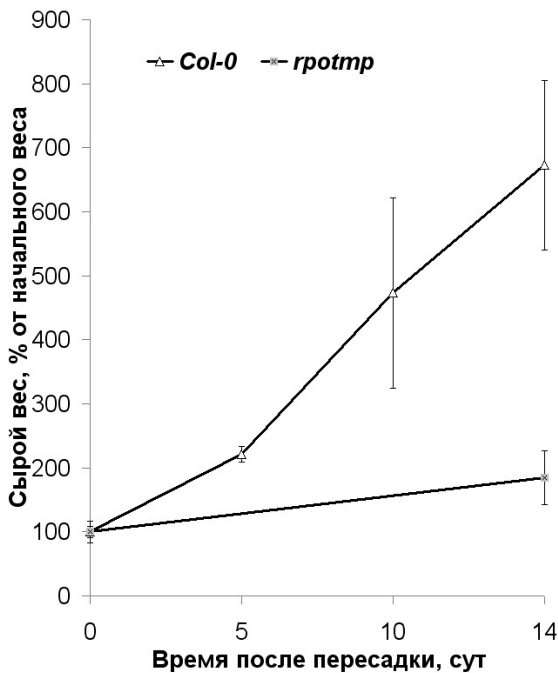


Figure 4. Динамика роста суспензионных культур клеток, полученных из растений дикого типа (*Col-0*) и мутантной линии *rpotmp*.

На следующем этапе работы нами была получена суспензионная культура клеток линии *rpotmp*. Отмечена существенно (в 4-5 раз) меньшая скорость нарастания массы клеток в суспензионной культуре мутантной линии по сравнению с культурой клеток, полученной из растений дикого типа. Ранее нами было показано, что рост суспензионной культуры клеток линии *fro1* был замедлен по сравнению с ростом клеток дикого типа не более чем на 20% (Тарасенко и др., 2014). Таким образом, несмотря на сходные проявления на уровне целых растений, отсутствие РНК-полимеразы *RpoTmr* (приводящее в первую очередь к снижению активности дыхательных комплексов I и IV в митохондриях) в культуре клеток

вызывает существенно более серьезные дефекты роста сравнительно с отсутствием дыхательного комплекса I. Причины данного различия пока неясны. Поскольку гетеротрофная суспензионная культура клеток лишена функциональных хлоропластов, представляется маловероятным, чтобы отличия в скорости роста объяснялись ролью, которую РНК-полимераза могла бы играть в хлоропластах. Можно предположить, что в проявлении этого признака играет роль существенное снижение содержания комплекса IV. Это позволяет высказать гипотезу о том, что полноценный уровень активности комплекса IV является особенно важным для роста гетеротрофных культур клеток, и пониженное

содержание этого комплекса приводит к гораздо более выраженному эффекту, нежели полное отсутствие комплекса I в линии *fro1*.

Несмотря на косвенный характер полученных данных о возможных фенотипических проявлениях сниженного уровня дыхательного комплекса IV, эти данные имеют определенную ценность по причине отсутствия жизнеспособных мутантов арабидопсиса по генам, кодирующим компоненты этого комплекса. По-видимому, подавляющее большинство мутаций по коровым субъединицам комплекса IV в высших растениях являются летальными. Единственными охарактеризованными на сегодняшний день мутантами по комплексу IV являются линии кукурузы *NCS5* и *NCS6*, несущие делеции в участке митохондриальной ДНК, кодирующей субъединицу COX2 (Lauer et al., 1990). Растения этих линий проявляют гетероплазмю и содержат клетки как с мутантными, так и с нормальными митохондриями. Таким образом, с помощью мутантов по РНК-полимеразе RpoTmp нами впервые получены данные, указывающие на возможные фенотипические последствия сниженного уровня дыхательного комплекса IV для растений. Кроме того, продемонстрированные нами дефекты роста суспензионной культуры клеток линии *rpotmp* свидетельствуют о перспективности ее использования в качестве системы для селекции клеток, митохондрии которых трансформированы генетической конструкцией, несущей кодирующий RpoTmp ген.

ACKNOWLEDGMENT

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-04-05046, а также РФФИ и Правительства Иркутской области (постановление № 545-пп от 29 октября 2015) в рамках научного проекта 14-44-04001 p_сибирь_a. В работе использовано оборудование Байкальского аналитического центра (ЦКП) СО

РАН при Президиуме ИИЦ СО РАН, а также оборудование ЦКП Фитотрон СИФИБР СО РАН.

REFERENCES

- Baba K., Schmidt J., Espinosa-Ruiz A., Villarejo A., Shiina T., Gardestrom P., Sane A.P., Bhalerao R.P. (2004) Organellar gene transcription and early seedling development are affected in the RpoT;2 mutant of Arabidopsis. *Plant J*, **38**, 38–48.
- Chang C-C., Sheen J., Bligny M., Niwa Y., Lerbs-Mache S., Stern D.B. (1999) Functional analysis of two maize cDNAs encoding T7-like RNA polymerases. *Plant Cell*, **11**, 911–926.
- Gualberto J.M., Mileshina D., Wallet C., Niazi A.K., Weber-Lotfi F., Dietrich A. (2014) The plant mitochondrial genome: dynamics and maintenance. *Biochimie*, **100**, 107-120.
- Hedtke B., Börner T., Weihe A. (2000) One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO reports*, **11(54)**, 435-440.
- Hedtke B., Legen J., Weihe A., Herrmann R.G., Börner T. (2002) Six active phage-type RNA polymerase genes in *Nicotiana tabacum*. *The Plant Journal*, **30(5)**, 625-637.
- Heinemeyer J., Lewejohann D., Braun H.P. (2007) Blue-native gel electrophoresis for the characterization of protein complexes in plants. *Methods Mol. Biol.*, **355**, 343-352.
- Kühn K., Bohne A.V., Liere K., Weihe A., Börner T. (2007) *Arabidopsis* phage-type RNA polymerases: Accurate in vitro transcription of organellar genes. *Plant Cell*, **19**, 959–971.
- Kühn K., Richter U., Meyer E., Delannoy E., de Longevialle A.F., O'Toole N., Börner T., Millar A., Small I., Whelan J. (2009) Phage-type RNA polymerase RPOTmp performs gene-specific transcription in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **21**, 2762–2779.
- Kühn K., Carrie C., Giraud E., Wang Y., Meyer E.H.,

- Narsai R., des Francs-Small C.C., Zhang B., Murcha M.W., Whelan J. (2011) The RCC1 family protein RUG3 is required for splicing of nad2 and complex I biogenesis in mitochondria of Arabidopsis thaliana. *Plant J.*, **67**, 1067-1080.
- Lauer M., Knudsen C., Newton K.J., Gabay-Laughnan S., Laughnan J.R. (1990) A partially deleted mitochondrial cytochrome oxidase gene in the NCS6 abnormal growth mutant of maize. *New Biol.*, **2**, 179-186.
- Liere K., Weihe A., Börner T. (2011) The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: Composition, function, and regulation. *Journal of Plant Physiology*, **168**, 1345-1360.
- de Longevialle A.F., Meyer E.H., Andres C., Taylor N.L., Lurin C., Millar A.H., Small I.D. (2007) The pentatricopeptide repeat gene OTP43 is required for trans-splicing of the mitochondrial nad1 intron 1 in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, **19**, 3256-3265.
- Lysenko E.A., Kuznetsov V.V. (2005) Plastid RNA polymerases. *Mol Biol.*, **39**, 661-674.
- Meyer E.H., Tomaz T., Carroll A.J., Estavillo G., Delannoy E., Tanz S.K., Small I.D., Pogson B.J., Millar A.H. (2009) Remodeled respiration in ndufs4 with low phosphorylation efficiency suppresses Arabidopsis germination and growth and alters control of metabolism at night. *Plant Physiol.*, **151**, 603-619.
- Rosso M.G., Li Y., Strizhov N., Reiss B., Dekker K., Weisshaar B. (2003) An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol. Biol.*, **53**, 247-259.
- Sabar M., Balk J., Leaver C.J. (2005) Histochemical staining and quantification of plant mitochondrial respiratory chain complexes using blue-native polyacrylamide gel electrophoresis. *The Plant Journal*, **44**, 893-901.
- Sweetlove L.J., Taylor N.L., Leaver C.J. (2007) Isolation of intact, functional mitochondria from the model plant Arabidopsis thaliana. *Methods Mol Biol.*, **372**, 125-136.
- Tarasenko V.I., Garnik E.Y., Shmakov V.N., Konstantinov Y.M. (2012) Modified alternative oxidase expression results in different reactive oxygen species contents in Arabidopsis cell culture but not in whole plants. *Biologia Plantarum*, **56**, 635-640.
- Tarasenko V.I., Garnik E.Y., Konstantinov Y.M. (2010) Characterization of Arabidopsis mutant with inactivated gene coding for Fe-S subunit of mitochondrial respiratory chain complex I. *Russ. J. Plant Physiol.*, **57**, 392-400.
- Tarasenko V.I., Garnik E.Y., Shmakov V.N., Konstantinov Y.M. (2009) Induction of Arabidopsis gdh2 gene expression during changes in redox state of the mitochondrial respiratory chain. *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 47-53.
- Wicke S., Schneeweiss G.M., de Pamphilis C.W., Müller K.F., Quandt D. (2011) The evolution of the plastid chromosome in land plants: gene content, gene order, gene function. *Plant Mol. Biol.*, **76**, 273-297.
- Тарасенко В.И., Гарник Е.Ю., Кулинченко М.В., Потапова Т.В., Константинов Ю.М. (2014) Характеристика растений арабидопсиса, мутантных по различным компонентам дыхательной цепи митохондрий. Механизмы регуляции функций растительных органелл: материалы Всероссийской научной конференции. Иркутск: Издательство РИО НЦРБХ СО ПАМН. С. 88-91.