

На правах рукописи



Муртузова Александра Владимировна

**Роль киназных комплексов TOR и SnRK1 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.
в устойчивости к дефициту калия и солевому стрессу**

1.5.21 Физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва

2023

Работа выполнена в лаборатории молекулярной и экологической физиологии «Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук»

Научный руководитель:

Войцеховская Ольга Владимировна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией молекулярной и экологической физиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Шишова Мария Федоровна, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры физиологии и биохимии растений биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Брейгина Мария Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры физиологии растений биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет»

Защита диссертации состоится «23» января 2024 г. В 11.00 часов заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 24.1.138.01 по специальности 1.5.21. – “Физиология и биохимия растений” (Биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (499) 678 54 20, электронная почта: m-azarkovich@mail.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва и на сайте <https://ippras.ru/>.

Автореферат разослан « » _ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Высшие растения ведут прикрепленный образ жизни и потому сильно зависят от факторов внешней среды. Это способствовало развитию сети сигнальных систем, необходимых для быстрой реакции на стресс. Примечательно, что у растений активация механизмов ответа на стресс любого рода, как правило, сопровождается остановкой или замедлением роста. До недавнего времени считалось, что это связано с перераспределением ресурсов растения от растущих органов в русло энергообеспечения, детоксикации и других защитных процессов, активирующихся в ответ на стресс. Однако, исследования последних лет позволяют предполагать, что остановка роста и запуск механизмов борьбы со стрессом находятся под контролем двух различных генетических программ (Campos *et al.*, 2016, De Vleeschauwer *et al.*, 2018, Filipe *et al.*, 2018, Margalha *et al.*, 2019). Это значит, что можно добиться их независимой регуляции в условиях стресса и получить хорошо растущие даже в неблагоприятных условиях стрессоустойчивые растения. Однако, для этого важно выявить механизмы, обеспечивающие координированную регуляцию ростовых и защитных программ у растений в различных стрессовых условиях.

В настоящее время у растений обнаружено два центральных протеин-киназных комплекса, TOR (Target Of Rapamycin) и SnRK1 (Sucrose non-fermenting 1-Related protein Kinase 1), регулирующих переключение между анаболическими (в т.ч. связанными с ростом) и катаболическими (активирующимися в условиях стресса с целью энергообеспечения защитных программ) процессами. Киназа TOR активна при благоприятных условиях, способствуя пролиферации и росту клеток, и является важнейшим активатором анаболизма и репрессором катаболизма эукариот (Shi *et al.*, 2018). Киназа SnRK1 активируется в стрессовых условиях, связанных с низким уровнем сахаров/энергии в клетке, и способствует реализации стратегий энергосбережения и ремобилизации питательных веществ (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007). SnRK1 ингибирует TOR, способствуя таким образом активации тех катаболических программ, которые были подавлены TOR-киназой, в том числе автофагии (Baena-Gonzalez, Hanson, 2017). Автофагия представляет собой процесс, при котором поврежденные или ненужные компоненты клетки подвергаются деградации в литических компартментах (Marshall, Vierstra, 2018), позволяя восполнить недостаток питательных веществ и энергии. Пока что механизмы, обеспечивающие взаимодействие киназных комплексов TOR и SnRK1, остаются невыясненными. Наиболее изучены взаимодействия сигнальных каскадов, инициируемых TOR и SnRK1, в регуляции автофагии; последние данные также показывают участие автофагии в активации SnRK1 (Yang *et al.*, 2023).

Поскольку растения – автотрофные организмы, то энергия поступает в их организм в виде сахаров, образованных в процессе фотосинтеза, и превращается в используемую клеткой форму – АТФ – благодаря катаболизму сахаров, в первую очередь, в ходе митохондриального дыхания. Возможно, именно поэтому главными метаболическими регуляторами TOR и SnRK1 у растений выступают молекулы сахаров и сахарофосфатов, в отличие от ортологичных киназ дрожжей и животных, где в этой роли выступают аминокислоты и аденозинфосфаты (Ваена-Gonzalez *et al.*, 2007, Ваена-González, Sheen, 2008, Dobrenel *et al.*, 2016). Так, киназа TOR у растений регулируется глюкозой, что позволяет координировать процессы роста с доступностью образующихся в ходе фотосинтеза ресурсов (Dobrenel *et al.*, 2016). В свою очередь, сама TOR оказывает регуляторное действие на процесс фотосинтеза (Dong *et al.*, 2015, Shi *et al.*, 2018). Известно, что активность киназы SnRK1 растений ингибируется сахарофосфатами (Zhai *et al.*, 2018). Более того, многие белки фотосинтетического аппарата кодируются генами, активность которых регулируется транскрипционными факторами, представляющими собой потенциальные мишени для SnRK1 (Wurzinger *et al.*, 2018). Однако, в данный момент отсутствует информация о влиянии основного сенсора энергетического статуса растительной клетки - киназы SnRK1 - на регуляцию фотосинтетического метаболизма, как в оптимальных условиях, так и в условиях стресса.

В связи с увеличением площадей засоленных земель исследования, связанные с поиском механизмов солеустойчивости растений, крайне необходимы. Известно, что важнейшая роль в устойчивости растений к солевому стрессу принадлежит цитоплазматическому калию (Shabala, 2017). Калий в растениях является важным макроэлементом и осмотиком (Dreyer, 2021). Цитозольный гомеостаз K^+ необходим для поддержания активности ряда цитозольных ферментов, участвующих в реакциях анаболизма. Многие ферменты, которым для своей активности необходим K^+ , катализируют реакции с расходом АТФ (Yang *et al.*, 2016). У *Arabidopsis thaliana* дефицит калия приводит к ингибированию более 50 ферментов, в том числе ферментов гликолиза и путей усвоения азота. При солевом стрессе в ответ на вход в клетки ионов Na^+ происходит потеря K^+ из клеток корня через калиевые каналы GORK (guard cell outward rectifying K^+), что приводит к запуску запрограммированной клеточной гибели и автофагии (Demidchik, *et al.*, 2010, 2018). Ранее было высказано предположение, что уровень цитозольного K^+ может выступать «метаболическим переключателем» между анаболизмом и катаболизмом (Leigh, WynJones, 1984). Однако, до сих пор не изучался вопрос о том, могут ли уровни цитозольного K^+ влиять на передачу сигналов через TOR или SnRK1.

Таким образом, исследование роли обеих регуляторных киназ, TOR и SnRK1, в обеспечении роста, фотосинтетического метаболизма и стрессоустойчивости растений

представляет большой интерес для получения стрессоустойчивых, но при этом высокопродуктивных растений, а изучение ответов растений на солевой стресс и на дефицит калия позволит выявить новые аспекты взаимодействия этих регуляторов.

Цели и задачи исследования.

Цели данной работы - изучение влияния хронического дефицита калия в среде выращивания на активность киназы TOR, и характеристика роли киназы SnRK1 в регуляции фотосинтетического метаболизма в ходе ответа на солевой стресс, у растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Для достижения целей исследования были поставлены следующие задачи:

- 1) Отработать метод определения активности киназы TOR по уровню фосфорилирования одного из субстратов TOR – белка S6K – с помощью иммуноблоттинга;
- 2) Определить влияние дефицита калия в среде выращивания на рост и на уровень индукции автофагии у проростков *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.;
- 3) Определить влияние дефицита калия в среде выращивания на активность TOR-киназного комплекса;
- 4) Оценить уровень автофагического потока при дефиците калия в среде выращивания у растений *A. thaliana* с измененным уровнем экспрессии каталитической субъединицы SnRK1-киназы KIN10;
- 5) Определить влияние уровня экспрессии каталитической субъединицы SnRK1-киназы KIN10 на параметры фотосинтеза *A. thaliana* вне стрессовых условий и при солевом стрессе.

Научная новизна результатов.

На примере модельного растения *Arabidopsis thaliana* впервые обнаружено ингибирующее воздействие хронического дефицита калия в среде выращивания на активность основного регулятора анаболизма и роста – киназы TOR, и активирующее воздействие на активность регулятора стрессовых ответов растений – киназы SnRK1. Впервые изучена роль киназы SnRK1 в регуляции фотосинтеза, и выявлены изменения фотохимической активности хлоропластов, обусловленные сверхэкспрессией ее каталитической субъединицы KIN10.

Теоретическая и практическая значимость проведенных исследований.

Результаты работы могут быть использованы для решения задачи достижения высокой урожайности важных сельскохозяйственных культур в стрессовых условиях, связанных с дефицитом калия или засолением почв. Полученные результаты могут быть использованы при чтении курсов лекций по биофизике, биохимии и физиологии растений.

Методология и методы исследования.

Исследования были проведены на линиях *Arabidopsis thaliana*, выращенных в питательной среде и/или в почве. В экспериментах были использованы живые образцы, либо навески растительного материала, подвергшиеся быстрой заморозке в жидком азоте. Растения выращивали на среде Murashige-Skoog (MS) с модификациями, или в почвенной смеси. В работе были использованы методы исследования уровней экспрессии генов, детекции уровня АТФ, качественного и количественного определения белка, детекции и количественного анализа автофагосом, оценки флуоресценции хлорофилла и адсорбции P₇₀₀. Подробно методы исследования представлены в Главе 2.

Положения, выносимые на защиту.

1. Хронический недостаток калия в среде выращивания приводит к ингибированию активности протеинкиназы TOR в корнях проростков *Arabidopsis thaliana*.

2. Хронический недостаток калия в среде выращивания приводит к индукции автофагии в корнях проростков *Arabidopsis thaliana*, которая опосредована протеинкиназой SnRK1.

3. Повышение уровня протеинкиназы SnRK1 в растениях *Arabidopsis thaliana* приводит к снижению в хлоропластах амплитуды транстилакоидной протондвижущей силы pmf, а также индуцирует дополнительные механизмы защиты фотохимической активности хлоропластов от солевого стресса, что выражается в увеличении реальных квантовых выходов ФСII и ФСИ и снижении нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ).

Личный вклад соискателя.

Автор лично участвовал в проведении экспериментальных исследований, обработке полученных результатов, анализе и обсуждении результатов, а также принимал участие в написании научных статей совместно с соавторами и апробации результатов исследований на научных конференциях.

Апробация результатов исследования.

Результаты работы были представлены на Международной научной конференции «Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability — 2019» (Санкт-Петербург, 2019), Всероссийском съезде «IX съезд общества физиологов растений России» (Казань, 2019), региональном конкурсе «Лучшие научные работы молодых ученых БИН РАН им. В.Л. Комарова» (Санкт-Петербург, 2021), Международной конференции «V (XIII) Международная ботаническая конференция молодых ученых» (Санкт-Петербург, 2022).

Связь работы с плановыми исследованиями и научными программами.

Исследования проводились в период с 2018 г. по 2023 г. в рамках плановых тем НИР лаборатории молекулярной и экологической физиологии БИН РАН, грантов РФФИ №18-16-00074, РФФИ № 20-34-90138.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 8 работ, из которых 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 145 стр. машинописного текста, содержит 4 таблицы, иллюстрирована 27 рисунками и состоит из введения, 4 глав, выводов и списка цитируемой литературы, который включает 292 источника, в том числе 289 ссылок на работы зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В Главе 1 «Обзор литературы» изложены современные представления о структуре и функциях киназных комплексов TOR и SnRK1 у растений и их ортологов у животных и дрожжей. При дефиците энергии активация SnRK1 инициирует сигнальные каскады, приводящие к подавлению энергозатратных анаболических процессов, усилению катаболизма и активации защитных программ. Напротив, при обилии доступной энергии активируется TOR, что способствует таким процессам как биогенез рибосом, синтез белка, формирование и рост меристем, усиление фотосинтеза и др. Важно отметить, что в стрессовых условиях ингибирование киназы TOR, как правило, опосредовано SnRK1 (в частности, при солевом стрессе), но в некоторых случаях происходит независимо от SnRK1. Особое внимание уделено метаболической регуляции растительных киназных комплексов сахарами и сахарофосфатами, что составляет их уникальную особенность и, очевидно, указывает на глобальную роль фотосинтеза в энергетическом метаболизме растений. Проанализированы накопленные в литературе данные, которые описывают участие киназы TOR в координации роста и анаболизма с уровнем фотосинтеза, а также в регуляции генов, кодирующих фотосинтетические белки, и малочисленные данные, которые косвенно могут указывать на участие SnRK1 в регуляции работы фотосинтетического метаболизма. Рассмотрены представления о регуляторном модуле TOR-SnRK1 как «реостате», направленном на поддержание баланса между ростом и развитием, с одной стороны, и стрессоустойчивостью с другой. Отдельно рассмотрено участие модуля TOR-SnRK1 в регуляции автофагии как катаболической программы, тесно связанной с метаболическим статусом клеток и активирующейся в условиях стресса. Особое внимание уделено роли обеспеченности

растений калием в их устойчивости к ряду стрессов, в первую очередь к засолению. На основе проведенного анализа высказывается предположение о том, что важная роль калия в устойчивости растений к целому ряду стрессов может быть связана с участием ионов калия в регуляции работы киназного модуля TOR-SnRK1.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В качестве объектов исследований использованы растения *Arabidopsis thaliana*: дикий тип экотипов Columbia (Col-0) и Landsberg erecta (Ler); полученная в экотипе Col-0 трансгенная линия 35S:S6K-FLAG со сверхэкспрессией основного субстрата фосфорилирования TOR - белка S6K1, меченого тегом FLAG; полученные в экотипе Ler трансгенные линии KIN10RNAi1, KIN10RNAi2 (линии со сниженным уровнем экспрессии *KIN10*) и KIN10OX1, KIN10OX2 (линии со сверхэкспрессией субъединицы *KIN10*). Семена 35S:S6K-FLAG были любезно предоставлены Dr. Jen Sheen (Гарвардская медицинская школа, Бостон, Массачусетс). Семена линий с измененной экспрессией *KIN10* были любезно предоставлены Dr. Filip Rolland (Католический университет, Левен, Бельгия).

Хронический дефицит калия. Эксперименты проводили на 9-14-дневных проростках. Проростки были выращены на питательных средах MS (среда Мурасиге-Скуга с 1 % (м/об) агара), с изменениями как описано ниже. В работе использовали среды, содержащие либо сахарозу (Suc) (30 mM, что соответствует 1 % (м/об)), либо глюкозу (Glc) (30 mM), которые содержали либо нормальную (K) (2 mM), либо низкую (lowK) (0,01 mM) концентрацию калия. Семена после поверхностной стерилизации высевались вертикально на чашки K/Suc, K/Glc, lowK/Suc и lowK/Glc, и проращивались в течение 9-14 дней на низком свете (70 мкмоль ФАР м⁻¹с⁻², 16ч/8ч свет/темнота).

Солевой стресс. Эксперименты проводили на листьях 8-недельных взрослых растений, выращенных в почвенной смеси (грунт:торф 1:1). Для создания солевого стресса экспериментальную группу растений через день, в течение 7 суток поливали 10% раствором Хогланда (Hoagland, Arnon, 1950) с добавлением NaCl в конечной концентрации 100 mM из расчета 30 мл на горшок (0,5 л) с 4 растениями. Контрольную группу растений поливали с такой же периодичностью и тем же количеством 10% раствора Хогланда без добавления NaCl.

Молекулярно – генетические методы. Тотальная РНК выделялась из проростков *Arabidopsis thaliana*, а также из листьев взрослых растений, с использованием тризольного реагента (TRIzol; Chomczynski *et al.*, 1987). Очистку РНК и синтез кДНК образцов осуществляли с помощью набора Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR with dsDNase. ПЦР проводили в автоматическом амплификаторе C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad). ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили с помощью системы Eco Real-

Time PCR system (Illumina). Использовали только те праймеры, которые приводили к получению единственного ампликона согласно анализу кривых плавления и показывали эффективность ПЦР $\geq 95\%$. В качестве референсного гена использовали *A. thaliana Actin2* (AT3G18780). ПЦР-РВ для каждого генотипа проводили в четырех биологических и трех аналитических повторностях. Результаты обрабатывали с использованием уравнения $2^{-\Delta Ct}$ (Schmittgen, Livak, 2008).

Детекция уровня АТФ. Измерение содержания АТФ проводили на корнях 14-дневных проростков с использованием набора для определения уровня АТФ - ATP Determination Kit (Molecular Probes), на основе реакции с люциферазой. Уровни АТФ определяли в максимуме эмиссии люминесценции 560 нм с помощью многомодального микропланшетного ридера Varioscan LUX (ThermoFisher) с программным обеспечением SkanIt RE 6.1.

Экстрагирование общего белка и вестерн-блоттинг. Для иммунодетекции целевых белков выполняли экстракцию общего белка *Arabidopsis thaliana* с помощью протокола для фосфорилированных белков (Choi H.-W. *et al.*, 2016) с модификациями. Выделенные белки подвергались электрофоретическому разделению, после чего переносились на PVDF мембрану (Bio-Rad). Блоты блокировали 5% обезжиренным молоком (Blotto, Santa-Cruz Biotechnology) или 5% BSA (ThermoFisherScientific) в TBS-T (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20). Белок S6K1/2 и его фосфорилированную по аминокислотному остатку T449 форму (phosphoS6K1/2) определяли с помощью полученных к данным белкам первичных кроличьих антител anti-S6K1/2 (AS12 1855; Agrisera) и anti-S6K1 (phospho T449) (ab207399; Abcam) в разведении 1:10000 и 1:1000, соответственно. В качестве референсных антител были использованы антитела к гистону H3 (AS10710; Agrisera) в разведении 1:5000. Детекцию проводили с использованием вторичных козлиных антикроличьих HRP-конъюгированных антител (AS09602, Agrisera), разбавленных 1:10000 для антител против S6K1/2 и против S6K1/2 (phosphoT449), и 1:50000 для антител против H3, соответственно. Использовали набор реактивов SuperSignal WestDura Extended Duration Substrate (Pierce) и систему для визуализации iBright FL1500 Imaging System (ThermoFisher). Количественная оценка интенсивности полос на иммуноблотах выполнялась с использованием программного обеспечения iBright Analysis Software.

Флуоресцентная микроскопия. Для детекции и количественного анализа образования автофагосом производили окрашивание корней проростков *Arabidopsis thaliana* монодансил-кадаверином (MDC; Sigma-Aldrich), которое наблюдали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Axio Imager.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием широкополосного фильтра для DAPI при возбуждении светом 365/12 нм и детекцией эмиссии 397 нм - ИК (Carl Zeiss, 488001-9901-000).

Импульсная флуориметрия. Измерения флуоресценции хлорофилла *a* проводили с помощью Dual-PAM 100 (Walz, Germany) на листьях 6-8 недельных растений. Световые кривые в двухканальном режиме для одновременной оценки состояний ФСІ и ФСІІ регистрировали через 1 час темновой адаптации растений. Программа включала определение F_0 , F_m в темноте, P_m после 5-секундного освещения дальним красным, и фотохимического квантового выхода ФСІ, $Y(I)$, фотохимического квантового выхода ФСІІ, $Y(II)$, квантового выхода светоиндуцированного нефотохимического тушения флуоресценции, соответствующего регулируемой диссипации энергии в ФСІІ $Y(NPQ)$, квантового выхода нерегулируемого нефотохимического тушения флуоресценции в ФСІІ, $Y(NO)$ на каждом из 11 этапов освещения актиничным красным светом (0, 25, 32, 41, 72, 114, 145, 235, 358, 550 и 844 мкЕ·м⁻² с⁻¹). Продолжительность каждого шага составляла 30 с. Общее время записи световой кривой составило 5 мин. В конце каждого этапа подавался насыщающий световой импульс 5000 мкЕ м⁻² с⁻¹ в течение 800 мс. С помощью модуля р515/535 изучали электрохимический градиент (ЭХГ) на тилакоидной мембране, определяли его компоненты – химический (ХГ) и электрический (ЭГ) градиент, и оценивали уровни синтеза АТФ по рассчитанной линейной и экспоненциальной скоростям диссипации ЭХГ (Sukhov et al., 2016).

Статистическая обработка данных. Использовали программу R version 4.1.2 (2021-11-01) – “Bird Hippie” Copyright (C) 2021 The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64. Достоверность различий в относительном уровне транскриптов генов интереса определяли с помощью t-критерия Стьюдента, уровень значимости $P \leq 0.05$. Достоверность различий между выборками по значениям других параметров оценивали методом множественного сравнения с применением дисперсионного анализа ANOVA и *post hoc* теста Тьюки (Tukey HSD test), уровень значимости $P \leq 0.05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование влияния дефицита калия на активность киназы TOR у проростков *Arabidopsis thaliana*

Влияние дефицита калия на морфометрические показатели проростков

Проведенные эксперименты на растениях экотипа Col-0 показали, что дефицит калия в среде выращивания приводил к достоверному ингибированию длины корней и площади побегов вне зависимости от типа сахара (глюкоза или сахароза) в среде (данные не показаны).

Недостаток калия и энергетический обмен в клетках корней проростков

Для анализа влияния K⁺-голодания на энергетический обмен в клетках корней Col-0 сравнивали уровни АТФ в корнях проростков. Замена сахарозы в составе среды на глюкозу на

фоне нормального уровня калия приводила к достоверному увеличению содержания АТФ в корнях проростков (рис. 1). Дефицит калия в среде выращивания не приводил к снижению продукции АТФ у проростков, выращенных на среде с сахарозой, однако, достоверно снижал содержание АТФ у проростков, выращенных на среде с глюкозой (рис. 1).

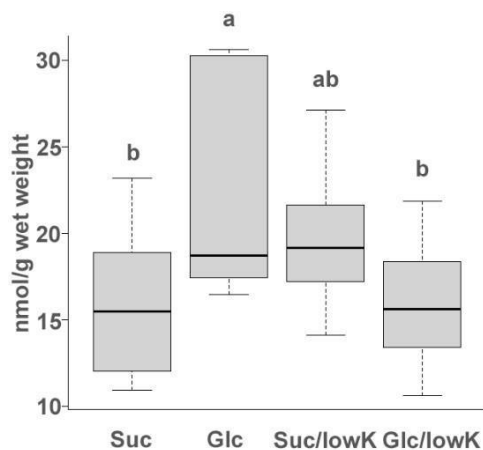


Рисунок 1. Уровни АТФ в корнях проростков арабидопсиса Col-0, возрастом 14 суток, на средах с нормальным содержанием калия и с дефицитом калия, а также с различным составом сахаров. Suc – нормальное содержание калия, сахароза; Glc – нормальное содержание калия, глюкоза; Suc/lowK – дефицит калия, сахароза; Glc/lowK – дефицит калия, глюкоза. На бокс-плотах представлены медианы и распределение значений 6 биологических и 3 аналитических повторностей на каждый вариант среды по квартилям. Усы обозначают минимальные и максимальные значения. Достоверность различий обозначена буквами и оценивалась методом множественного сравнения с применением дисперсионного анализа ANOVA и *post hoc* теста Тьюки при $p \leq 0,05$.

Изучение роли калия в регуляции генов, кодирующих ферменты, участвующие в гликолизе, митохондриальном дыхании и ассимиляции азота

Ранее было показано, что дефицит калия приводит к снижению активности ряда ферментов, в т.ч. гликолиза и ассимиляции азота (Armengaud et al., 2009). Уровни экспрессии генов, кодирующих несколько ферментов, участвующих в ассимиляции азота (*AT1G66200*, *AT1G37130*, *AT5G07440*, *AT3G17820*), гликолизе (*AT1G12000*) и метаболизме пирувата (*AT2G36580*), сравнивали в корнях проростков, выращенных на четырех различных средах, описанных выше. Дефицит калия не оказывал существенного влияния на экспрессию этих генов, что позволяет предположить, что основной причиной метаболических нарушений, вызванных недостатком K^+ , является прямое ингибирование активности пируваткиназы и других ферментов, участвующих в гликолизе и ассимиляции азота.

Исследование изменений уровня активности TOR киназы в условиях дефицита калия методом вестерн-блоттинга

Для изучения активности киназы была выбрана мутантная линия со сверхэкспрессией гена, кодирующего рибосомальный белок S6K1 – один из субстратов TOR. Активность киназы TOR оценивали путем количественного определения соотношения общего белка S6K1 к его

фосфорилированной форме (Xiong *et al.*, 2013). Анализ активности TOR в корнях проростков, выращенных на четырех различных средах, описанных выше, показал, что в присутствии глюкозы и достаточном содержании калия в среде выращивания уровни фосфорилирования S6K1 были в два раза выше, чем в присутствии сахарозы (рис. 2). В корнях проростков, выращенных на среде с сахарозой и низким калием, уровни активности TOR были снижены в два раза по сравнению с таковыми на среде с сахарозой и нормальным содержанием калия, и были аналогичны уровням, наблюдаемым у проростков, инкубированных с рапамицином и AZD8055 - ингибиторами TOR (рис. 2).

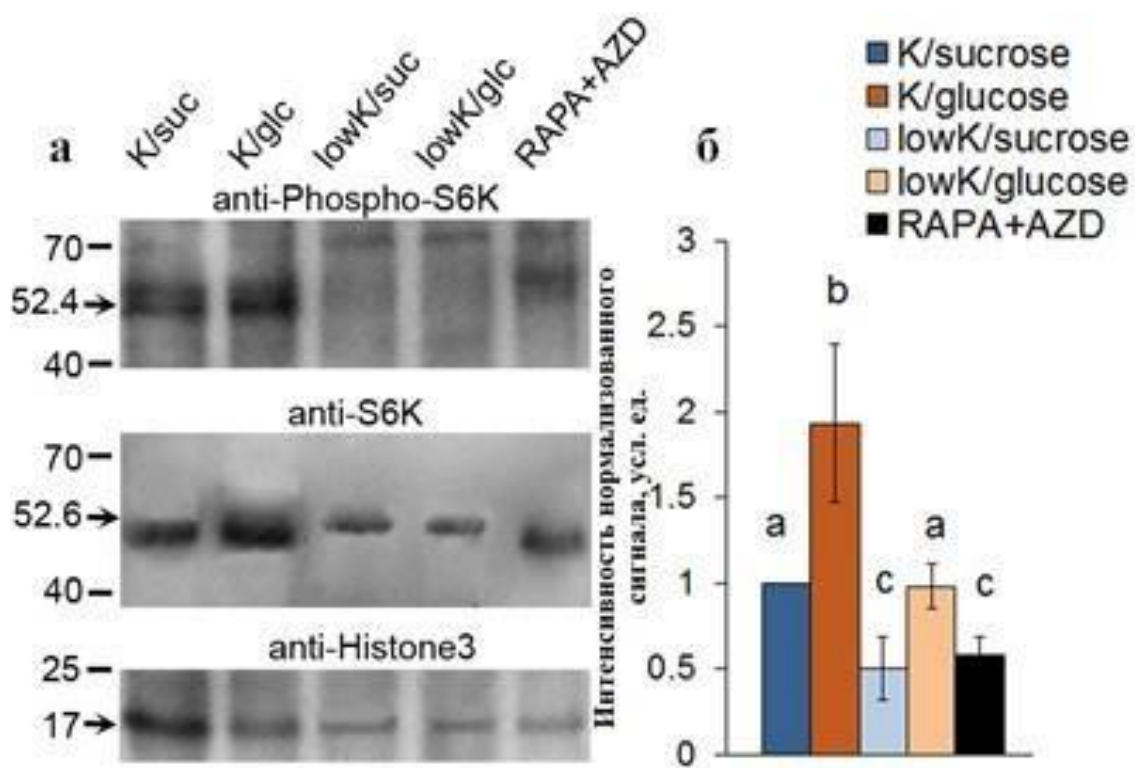


Рисунок 2. Анализ активности TOR-киназы в проростках трансгенной линии *Arabidopsis thaliana*, экспрессирующей конструкцию p35S:S6K1-FLAG, выращенных на четырех различных средах, как указано. **а**, анализ специфичности связывания антител с целевым белком методом иммуноблоттинга. В качестве положительного контроля ингибирования TOR использованы проростки из чашек K/Suc после 24 ч инкубации в смеси ингибиторов TOR AZD8055 (500 нМ) + рапамицин (1 мкМ) (RAPA+AZD). Стрелками указана масса соответствующих белковых полос (кДа). **б**, количественный анализ отношения интенсивностей сигнала pS6K по отношению к сигналу нефосфорилированного S6K с поправками на референсный сигнал гистона H3. Представлены средние арифметические значения трех биологических повторностей на вариант. Усы обозначают стандартное отклонение. Достоверность различий обозначена буквами и оценивалась методом множественного сравнения с применением дисперсионного анализа ANOVA и *post hoc* теста Тьюки при $p \leq 0,05$.

Полного ингибирования активности TOR достичь не удалось, что может быть связано с высокой активностью TOR в быстрорастущих тканях проростков. Активность TOR у проростков, выращенных на среде с глюкозой и низким содержанием калия, восстанавливалась до уровней, наблюдаемых для контрольной среды с сахарозой и нормальным уровнем содержания калия (имело место «суммирование» эффектов), что

позволяет предположить, что глюкоза и дефицит K^+ действуют независимо в сигнальном каскаде, регулирующем активность TOR.

Уровни экспрессии генов, кодирующих каталитические субъединицы SnRK1 *KIN10* и *KIN11*, у трансгенных линий *Arabidopsis*, экспрессирующих конструкции *p35S::KIN10* (*KIN10OX*) и *p35S::kin10(RNAi)* (*KIN10RNAi*)

При ингибировании общей активности SnRK1 путем подавления экспрессии гена, кодирующего *KIN10*, активность SnRK1 может частично восстанавливаться за счет другой каталитической субъединицы - *KIN11* (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007). Поэтому мы исследовали уровни экспрессии обоих генов, *KIN10* и *KIN11* (*AT3G01090* и *AT3G29160*), у используемых в работе трансгенных линий, экспрессирующих конструкции *p35S::KIN10* (*KIN10OX*) и *p35S::kin10(RNAi)* (*KIN10RNAi*) (рис. 3, 4).

Уровень экспрессии *KIN10* во взрослых листьях растений дикого типа был значительно выше, чем в проростках (рис. 3). У растений *KIN10OX1* уровень экспрессии *KIN10* был в десятки раз выше, а у растений *KIN10RNAi* – ниже показателей дикого типа, причем как в проростках, так и в листьях (рис. 3). Уровни экспрессии *KIN11* не различались у линий Ler, *KIN10OX1* и *KIN10RNAi* – ни у проростков, ни у листьев (рис. 4). Таким образом, можно предполагать, что уровни экспрессии *KIN10* отражают уровень активности SnRK1 (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007).

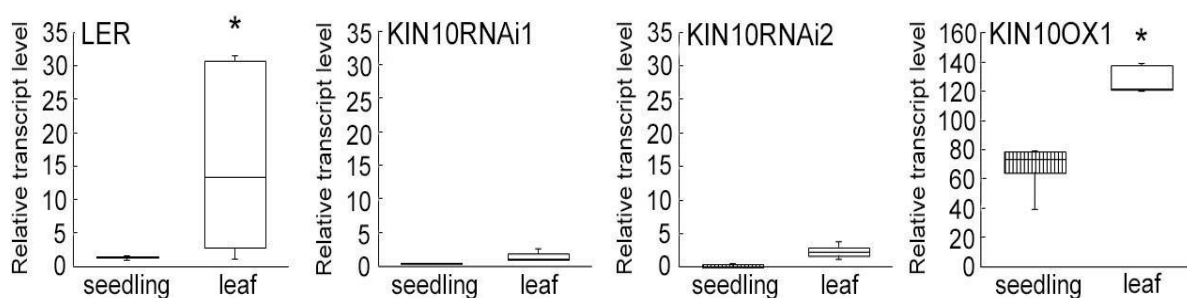


Рисунок 3. Изменение уровней экспрессии *KIN10* *Arabidopsis thaliana* у проростков без стрессового воздействия (seedling) и в листьях взрослых растений (leaf), подвергшихся стрессу засолением. LER, дикий тип (экотип Landsberg erecta); *KIN10RNAi1*, 2 - независимые нокаутные линии *KIN10*, *KIN10OX1* - линия-сверхэкспрессор *KIN10*. На бокс-плотах представлены медианы и распределение значений по квартилям. Усы обозначают минимальные и максимальные значения. * отражает статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) между проростками и листьями одной линии.

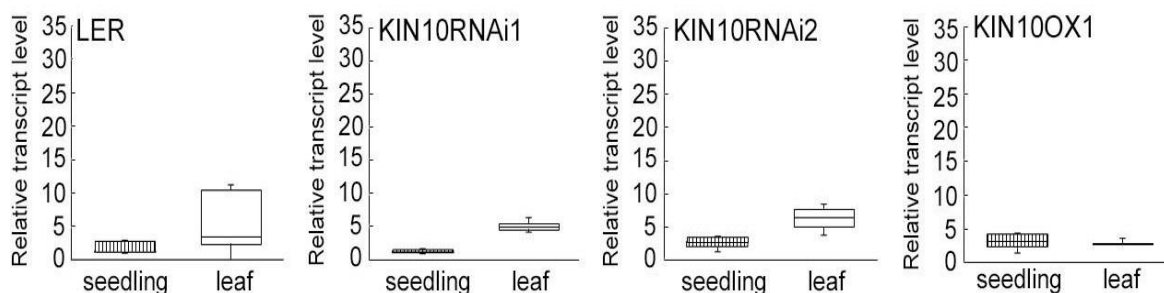


Рисунок 4. Изменение уровней экспрессии *KIN10* *Arabidopsis thaliana* у проростков без стрессового воздействия (seedling), и в листьях взрослых растений, подвергшихся стрессу засолением. LER, дикий тип (экотип Landsberg erecta); KIN10RNAi1, 2 - независимые нокаутные линии *KIN10*, KIN10OX1 - линия-сверхэкспрессор *KIN10*. На бокс-плотах представлены медианы и распределение значений по квартилям. Усы обозначают минимальные и максимальные значения.

Изучение роли SnRK1 в активации автофагического потока при дефиците калия

Дефицит K^+ приводил к инактивации TOR. Для того, чтобы определить, влияет ли недостаток калия на активность автофагии, и если да, то путем непосредственного ингибирования TOR или же ингибирования посредством киназы SnRK1, были проанализированы растения арабидопсиса со сверхэкспрессией гена, кодирующего каталитическую субъединицу SnRK1 – белок KIN10, а также линии RNAi с подавленной экспрессией этого гена.

У проростков растений дикого типа Ler, выращенных на среде с низким содержанием калия, число автофагосом значительно возросло по сравнению с проростками, выращенными на средах с нормальным содержанием калия (рис. 5 а, г). В то же время у проростков линий KIN10OX со сверхэкспрессией *KIN10*, выращенных на четырех видах сред, наблюдалось большое количество автофагосом, которое не менялось в зависимости от типа сахара или изменения концентрации калия в среде выращивания (рис. 5 б, д). Это указывает на увеличение автофагического потока по сравнению с диким типом, вызванное высокой конститутивной активностью SnRK1. У проростков линий KIN10RNAi количество автофагосом было сходно с таковым в растениях дикого типа, выращенных на среде с нормальным содержанием калия, и не менялось в ответ на добавление глюкозы или при дефиците K^+ в среде (рис. 5 в, е). Эти данные свидетельствуют о том, что индукция автофагии у проростков, лишенных K^+ , была опосредована SnRK1. Возможно, дефицит K^+ влиял на активность TOR также через SnRK1.

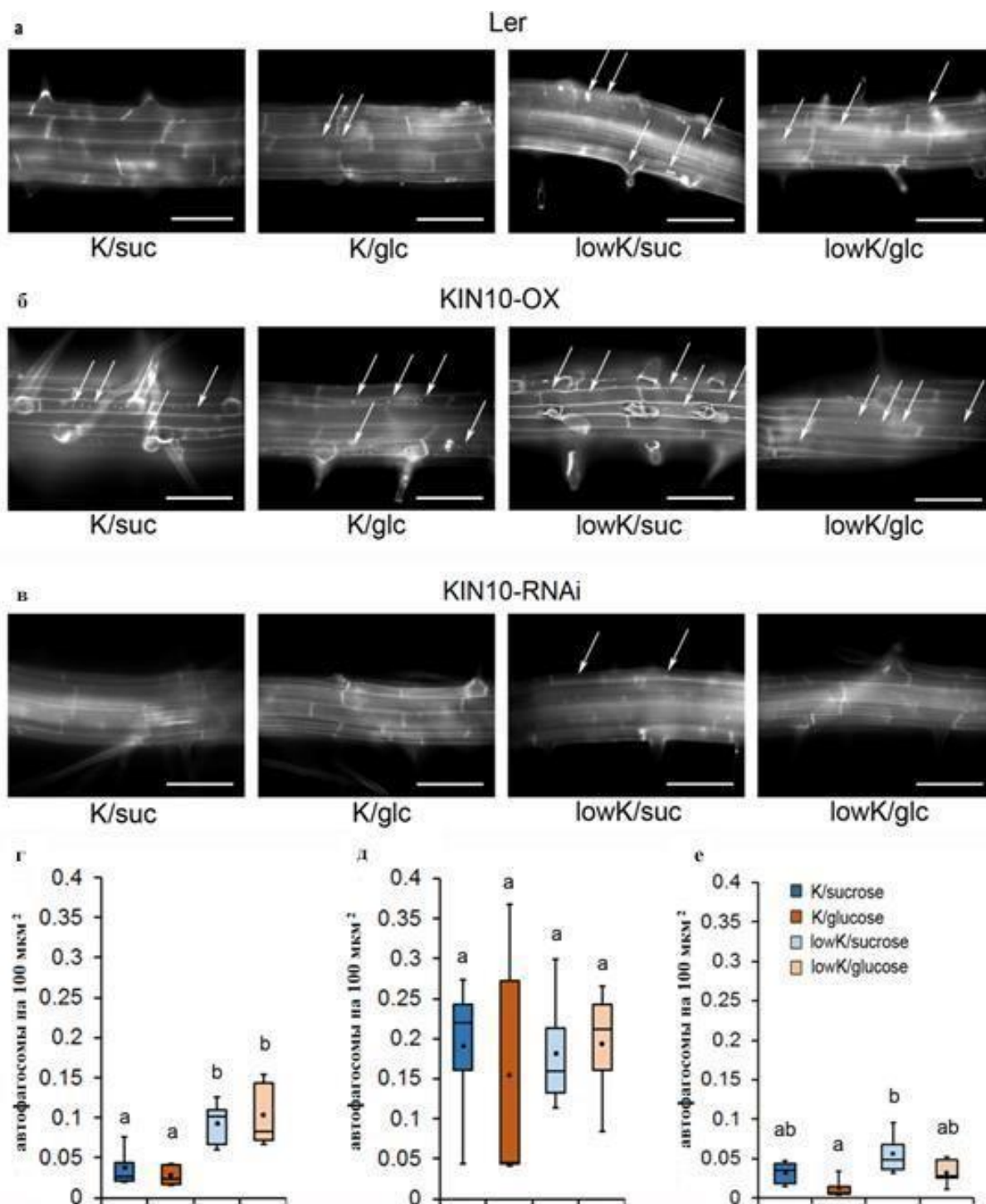


Рисунок 5. Автофагосомы (окраска монодансилкадаверином) в клетках корней проростков *Arabidopsis thaliana*, выращенных на четырех средах. **а** - Ler, дикий тип, **б** - проростки со сверхэкспрессией KIN10, **в** – проростки с ингибированной экспрессией KIN10. Стрелки указывают на автофагосомы. **г**, количество автофагосом, показанное на **а**. **д**, количество автофагосом, показанное на **б**. **е**, количество автофагосом, показанное на **в**. На бокс-плотах представлены медианы и распределение значений по квартилям. Усы обозначают минимальные и максимальные значения. Достоверность различий обозначена буквами и оценивалась методом множественного сравнения с применением дисперсионного анализа ANOVA и *post hoc* теста Тьюки при $p \leq 0,05$. Масштабные линейки: **а**, **б**, **в** 100 мкм

Участие SnRK1 в регуляции процессов фотосинтеза

Фенотипические изменения растений под действием солевого стресса

У растений *Arabidopsis* дикого типа (экотип Ler) на третьи сутки умеренного солевого стресса у отдельных листьев отмечались слабый хлороз и скручивание. Эти симптомы усиливались через пять суток эксперимента (рис. 6 а–в). Сходные фенотипические изменения развивались и у растений со сверхэкспрессией *KIN10* (*KIN10OX1*, *KIN10OX2*), но хлороз появлялся на третьи, а скручивание листьев только на пятые сутки солевого стресса (рис. 6 ж–и). В линиях с РНК-интерференцией *KIN10* (*KIN10RNAi1*, *KIN10RNAi2*) не было отмечено фенотипических изменений листьев, связанных со стрессовым воздействием (рис. 6 г–е).



Рисунок 6. Фенотипические изменения растений *Arabidopsis thaliana* дикого типа Ler (а, б, в), линии с подавленной экспрессией *KIN10* *KIN10RNAi1* (г, д, е) и линии со сверхэкспрессией *KIN10* *KIN10OX1* (ж, з, и) при хроническом засолении, где а, г, ж – фотографии растений на первые сутки засоления; б, д, з – на третьи сутки засоления; в, е, и – на пятые сутки засоления. Масштабная линейка: 1 см.

Изучение показателей эффективности ФСИ и ФСИИ у растений с разным уровнем экспрессии KIN10 при солевом стрессе

В листьях растений дикого типа Ler происходило достоверное снижение реального квантового выхода ФСИИ $Y(II)$ при освещении средними интенсивностями актиничного света

(107, 138, 228, 351 $\mu\text{M} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) на третьи и пятые сутки солевого стресса (рис. 7 а). В листьях двух линий сверхэкспрессоров *KIN10* - *KIN10OX1* и *KIN10OX2* - обнаружено достоверное увеличение $\Upsilon(\Pi)$ на третьи сутки засоления, и снижение данного параметра на пятые сутки засоления до значений у растений в контрольных условиях (рис. 7 г, д).

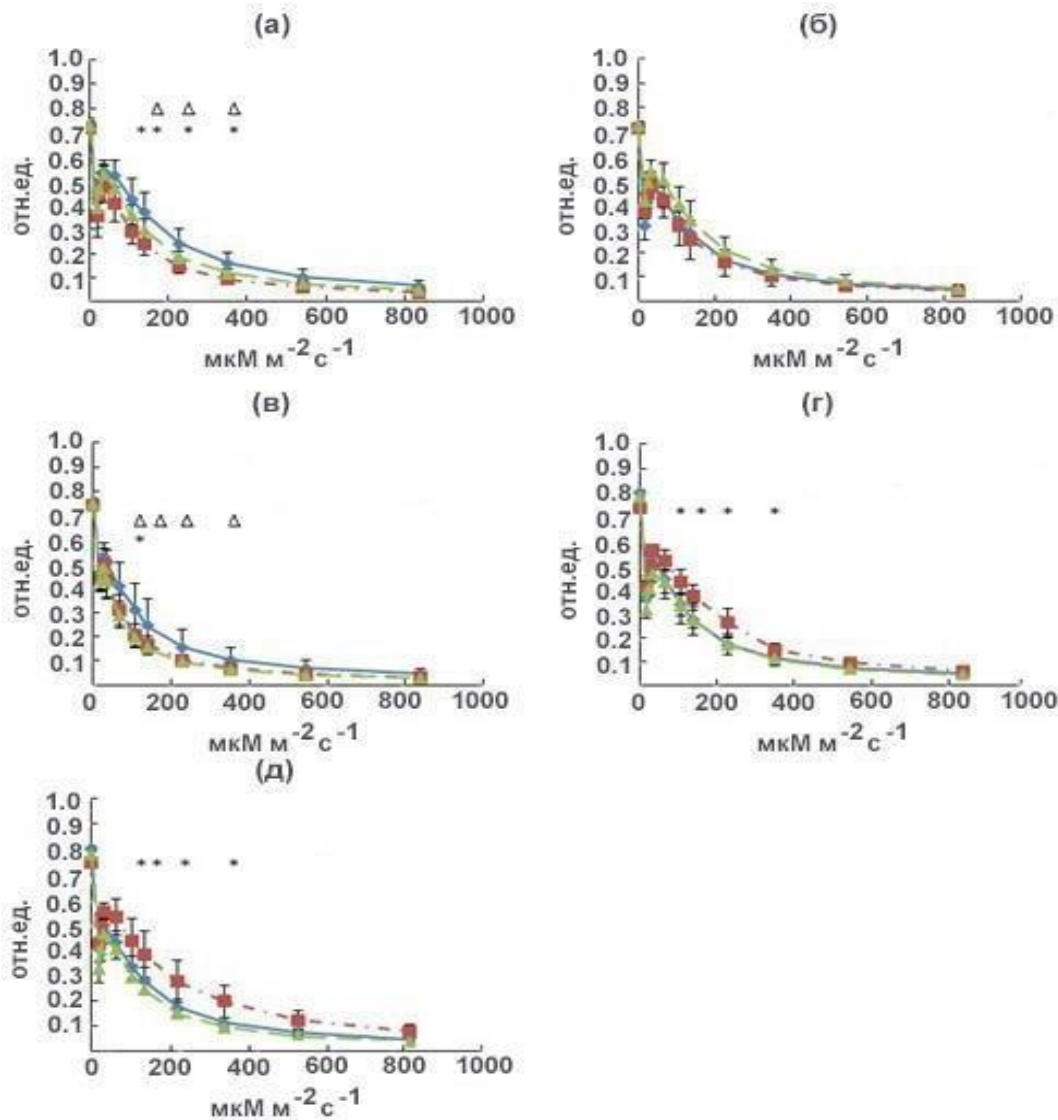


Рисунок 7. Зависимость квантового выхода ФСII ($\Upsilon(\Pi)$) от интенсивности света, измеренная в листьях *Arabidopsis thaliana* дикого типа Ler (а), линий с подавленной экспрессией *KIN10* *KIN10RNAi1* (б) и *KIN10RNAi2* (в), а также линий-сверхэкспрессоров *KIN10* *KIN10OX1* (г) и *KIN10OX2* (д), в контрольных условиях и при солевом стрессе. Синяя сплошная линия с маркерами-ромбами – значения, полученные на растениях в контрольных условиях; красная штрихпунктирная линия с маркерами-квадратами – значения, полученные на 3 сутки хронического засоления растений; зелёная пунктирная линия с маркерами-треугольниками – значения, полученные на 5 сутки хронического засоления растений; * и Δ – достоверные различия между измерениями в контроле и на 3 (*) либо на 5 (Δ) сутки солевого стресса, соответственно, согласно результатам дисперсионного анализа ANOVA и *post hoc* теста Тьюки при $p \leq 0,05$. Показаны средние арифметические значения 10 независимых измерений, выполненных на листьях 10 разных растений одного генотипа. Планки погрешности обозначают стандартное отклонение от среднего. По оси абсцисс отложены значения интенсивности освещения в μM фотонов $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$; по оси ординат – значения параметра $\Upsilon(\Pi)$ в относительных единицах.

Квантовый выход ФСИ $Y(I)$ достоверно уменьшался под действием солевого стресса в диком типе Ler (в диапазоне значений 138–837 мкМ фотонов) к третьим суткам стресса, и не возвращался к уровню в контроле к пятым суткам солевого стресса (рис. 8 а).

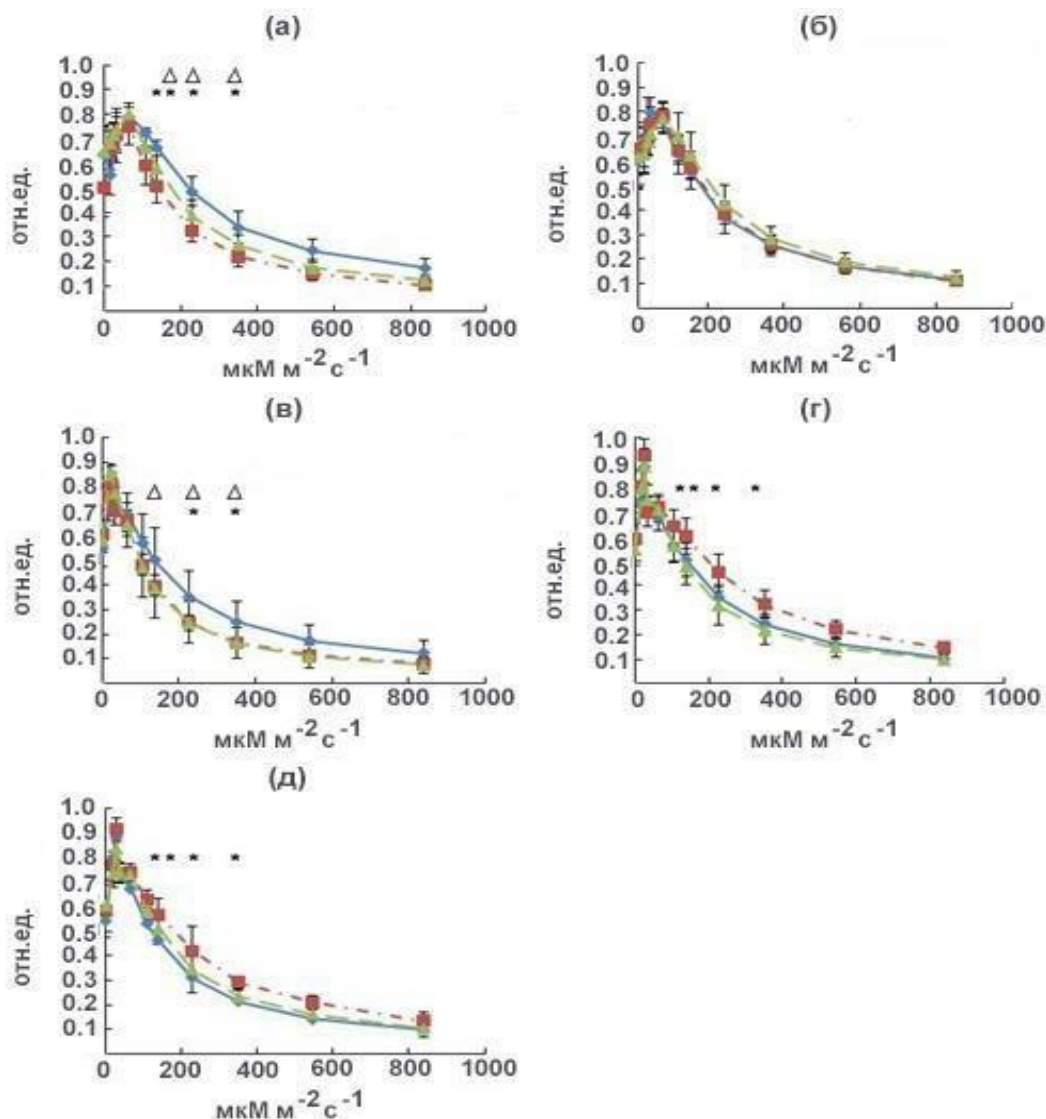


Рисунок 8. Зависимость квантового выхода ФСИ ($Y(I)$) от интенсивности света, измеренная в листьях *Arabidopsis thaliana* дикого типа Ler (а), линий с подавленной экспрессией *KIN10* KIN10RNAi1 (б) и KIN10RNAi2 (в), а также линий-сверхэкспрессоров *KIN10* KIN10OX1 (г) и KIN10OX2 (д), в контрольных условиях и при солевом стрессе. Синяя сплошная линия с маркерами-ромбами – значения, полученные на растениях в контрольных условиях; красная штрихпунктирная линия с маркерами-квадратами – значения, полученные на 3 сутки хронического засоления растений; зелёная пунктирная линия с маркерами-треугольниками – значения, полученные на 5 сутки хронического засоления растений; * и Δ – достоверные различия между измерениями в контроле и на 3 (*) либо на 5 (Δ) сутки солевого стресса, соответственно, согласно результатам дисперсионного анализа ANOVA и *post hoc* теста Тьюки при $p \leq 0,05$. Показаны средние арифметические значения 10 независимых измерений, выполненных на листьях 10 разных растений одного генотипа. Планки погрешности обозначают стандартное отклонение от среднего. По оси абсцисс отложены значения интенсивности освещения в мкМ фотонов м⁻² с⁻¹; по оси ординат – значения параметра $Y(I)$ в относительных единицах.

В листьях растений KIN10OX1 и KIN10OX2 происходило увеличение $Y(I)$ на третьи сутки солевого стресса, а затем наблюдалось снижение активности ФСИ до уровня,

наблюдаемого у растений в контрольных условиях, во всем диапазоне интенсивности освещения (рис. 8 г, д). У растений с подавленной экспрессией *KIN10* Y(I) при солевом стрессе не изменялся либо достоверно снижался (*KIN10RNAi1* и *KIN10RNAi2*, соответственно) (рис. 8 б, в).

Оценили также квантовый выход регулируемого нефотохимического тушения флуоресценции Y(NPQ) как одного из важнейших механизмов предотвращения разрушения ФСII избытком света (рис. 9).

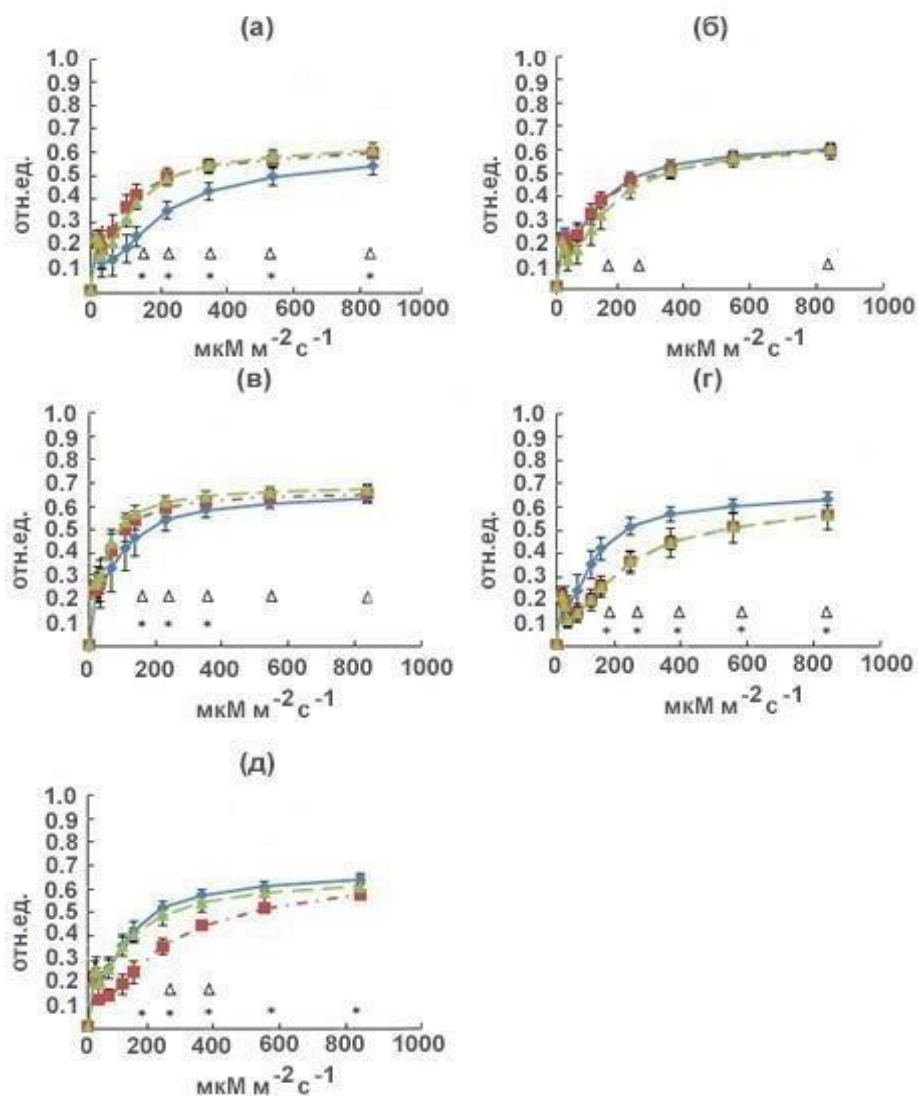


Рисунок 9. Зависимость квантового выхода NPQ (Y(NPQ)) от интенсивности света, измеренная в листьях *Arabidopsis thaliana* дикого типа Leg (а), линий с подавленной экспрессией *KIN10* *KIN10RNAi1* (б) и *KIN10RNAi2* (в), а также линий-сверхэкспрессоров *KIN10* *KIN10OX1* (г) и *KIN10OX2* (д), в контрольных условиях и при солевом стрессе; красная штрихпунктирная линия с маркерами-квадратами – значения, полученные на 3 сутки хронического засоления растений; зелёная пунктирная линия с маркерами-треугольниками – значения, полученные на 5 сутки хронического засоления растений; * и Δ – достоверные различия между измерениями в контроле и на 3 (*) либо на 5 (Δ) сутки солевого стресса, соответственно, согласно результатам дисперсионного анализа ANOVA и *post hoc* теста Тьюки при $p \leq 0,05$. Показаны средние арифметические значения 10 независимых измерений, выполненных на листьях 10 разных растений одного генотипа. Планки погрешности обозначают стандартное отклонение от среднего. По оси абсцисс отложены значения интенсивности освещения в μM фотонов $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$; по оси ординат – значения параметра Y(NPQ) в относительных единицах.

В листьях Ler к третьим суткам солевого стресса Y(NPQ) возрастал (рис. 9 а), а у обеих линий KIN10OX, наоборот, снижался (рис. 9 г, д). В линиях KIN10RNAi уровень Y(NPQ) либо не изменялся, либо повышался к пятым суткам засоления (KIN10RNAi1 и KIN10RNAi2, соответственно) (рис. 9 б, в).

Квантовый выход нерегулируемого тушения флуоресценции Y(NO) не изменялся ни в одной из исследуемых линий (данные не показаны), что указывает на отсутствие структурных нарушений пула ФСII.

Электрохимический градиент и скорость синтеза АТФ

Чтобы сравнить относительную энергизованность тилакоидных мембран и эффективность работы АТФ-синтазы в хлоропластах линий арабидопсиса с различным уровнем экспрессии *KIN10*, исследовали амплитуду светоиндуцированной протондвижущей силы ECS_{pmf} , а также относительные величины двух её компонентов: градиента трансмембранного электрического потенциала ($\Delta\Psi$) и градиента концентрации протонов (ΔpH) (рис.10 а–в). При освещении на тилакоидных мембранах хлоропластов линий-сверхэкспрессоров формируется протондвижущая сила, амплитуда которой значительно ниже, чем у дикого типа и у растений с подавленной экспрессией *KIN10* (рис. 10 а). Оказалось, что низкая амплитуда ECS_{pmf} детерминирована относительно низким градиентом электрического потенциала $\Delta\Psi$ и не связана с изменением компоненты ΔpH (рис. 10 б, в). Для линий-сверхэкспрессоров *KIN10* наблюдалась тенденция к снижению линейной скорости синтеза АТФ (рис. 10 г), при том, что экспоненциальная скорость, зависящая от уровня аденозинфосфатов и количества АТФ-синтазы, не отличалась от таковой в других линиях арабидопсиса (рис. 10 д).

Вариации значений $\Delta\Psi$ у растений других генотипов в контрольных условиях (за исключением линии KIN10RNAi1), а также у растений всех пяти изученных линий при засолении, оказались незначительными и статистически недостоверными (рис. 10 б). Важно отметить, что градиент концентрации протонов ΔpH не отличался у всех изученных генотипов в контрольных условиях и не изменялся при солевом стрессе (рис. 10 в).

Уровень продукции АТФ в проростках Arabidopsis

Сравнили содержание АТФ в проростках арабидопсиса дикого типа (Ler) и линий с измененным уровнем экспрессии *KIN10* в контрольных условиях и под действием солевого стресса (рис. 11). Для оценки вклада митохондриального дыхания в продукцию АТФ, использовали ингибитор АТФ-синтазы олигомицин (20мМ).

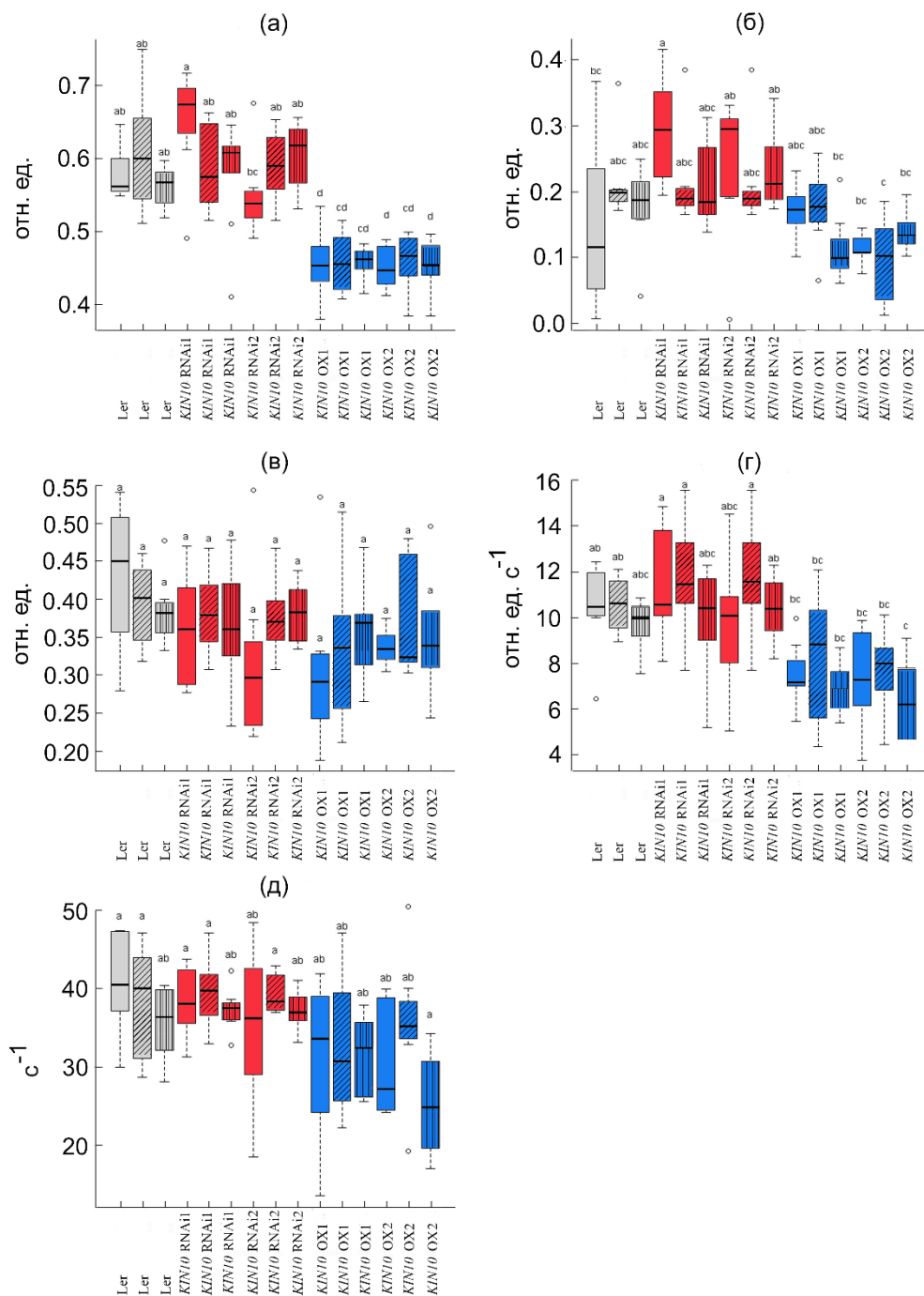


Рисунок 10. Относительные уровни электрохимического градиента ECS_{pmf} (а), градиента электрического потенциала $ECS_{\Delta\psi}$ (б), градиента концентрации протонов $ECS_{\Delta pH}$ (в), линейной (г) и экспоненциальной (д) скорости синтеза АТФ в листьях растений дикого типа Ler (серый цвет), линий с подавленной экспрессией *KIN10* *KIN10RNAi1* и *KIN10RNAi2* (красный цвет), а также линий-сверхэкспрессоров *KIN10* *KIN10OX1* и *KIN10OX2* (синий цвет) в оптимальных условиях (контроль, без штриховки) и при солевом стрессе (косая штриховка – на третьи сутки солевого стресса, вертикальная штриховка – на пятые сутки солевого стресса). На бокс-плотах представлены медианы и распределение значений по квартилям. Усы обозначают минимальные и максимальные значения. Достоверность различий оценивалась методом множественного сравнения с применением дисперсионного анализа ANOVA и *post hoc* теста Тьюки при $p \leq 0,05$.

У проростков линий *KIN10OX*, несмотря на высокий уровень экспрессии и, очевидно, каталитической активности SnRK1, продукция АТФ не отличалась от значений показателя у

Ler, а у линий KIN10RNAi наблюдалась четкая тенденция к снижению содержания АТФ. Примерно половина суммарного содержания АТФ в проростках Ler генерировалась в результате окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи митохондрий (рис.11).

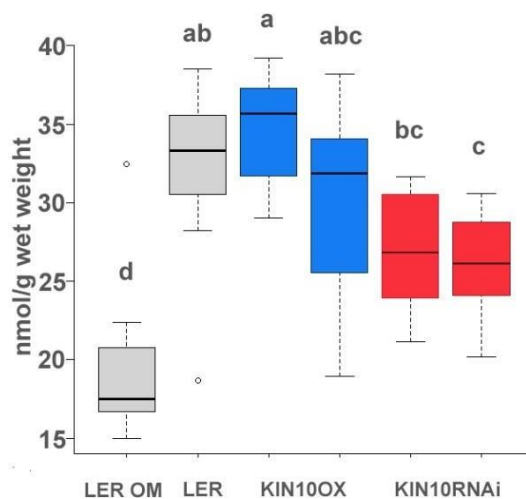


Рисунок 11. Уровни АТФ в проростках *Arabidopsis* дикого типа (Ler), линий-сверхэкспрессоров *KIN10* (KIN10OX1 и KIN10OX2) и линий с подавленной экспрессией *KIN10* (KIN10RNAi1 и KIN10RNAi2) после 16 ч солевого стресса. На бокс-плотах представлены медианы и распределение значений по квартилям. Эксперименты выполнены в пяти биологических и трех технических повторностях. OM – растения, обработанные олигомицином. Усы обозначают минимальные и максимальные значения. Достоверность различий обозначена буквами и оценивалась методом множественного сравнения с применением дисперсионного анализа ANOVA и *post hoc* теста Тьюки при $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Катионы калия играют важную роль в поддержании мембранного потенциала и энергетического метаболизма растений. Кроме того, уровни цитозольного K^+ , возможно, играют роль «переключателя» между анаболизмом и катаболизмом. Для активности ряда ферментов необходим K^+ , который функционально не может быть заменен на Na^+ . Показано, что стресс-индуцированная потеря K^+ в корнях *Arabidopsis thaliana* приводит к активации автофагии и развитию программированной клеточной гибели (Demidchik *et al.*, 2010, 2018). Но возможные механизмы активации автофагии, связанные с уровнем клеточного калия, до данной работы не изучались. Нами показано, что дефицит калия приводит к ингибированию активности киназы TOR и активации автофагии (рис. 2 и 5). Данное ингибирование может быть ослаблено добавлением в среду выращивания активатора TOR - глюкозы (рис. 2), что говорит об отсутствии потребности в катионах калия для ферментативной активности TOR.

Киназа SnRK1 регулирует стресс-индуцированную автофагию как посредством ингибирования активности киназы TOR, так и независимо от нее (Wang *et al.*, 2021). SnRK1 растений является клеточным сенсором энергии и активируется в ответ на снижение

содержания фосфатов сахаров, а также, возможно, уровня АТФ (Wurzinger et al., 2018). Дефицит калия ингибирует гликолиз (Armengaud et al., 2009), что приводит к снижению уровня клеточного АТФ, особенно в не способных к фотосинтезу клетках корней. Однако, существенных изменений в уровне АТФ нами не было отмечено (рис. 1). В то же время сверхэкспрессия гена, кодирующего основную каталитическую субъединицу SnRK1 - KIN10, вызывала усиление автофагии даже в отсутствие стрессового воздействия (рис. 3 б, д). У таких растений дефицит калия не приводил к дополнительной индукции автофагии. Возможно, это связано с тем, что активность SnRK1 в линиях-сверхэкспрессорах *KIN10* уже была максимальна. В линиях с РНК - интерференцией *KIN10*, напротив, дефицит калия не приводил к увеличению числа автофагосом выше значений, полученных при исследовании растений со сред с достаточным содержанием калия (рис. 3 в, е), в то время как у растений дикого типа активация автофагии происходила на средах с дефицитом калия (рис. 3 а, г). Полученные данные позволяют предположить, что при стрессе, связанном с дефицитом калия, запуск автофагии обусловлен ингибированием TOR через SnRK1.

Солевой стресс оказывает комплексный негативный эффект на метаболизм растений (Pan et al., 2021). Одной из мишеней солевого стресса является фотосинтетическая функция хлоропластов (Awlia et al., 2016). Для поддержания фотосинтеза как важнейшего энерго-продуцирующего процесса у растений имеется набор защитных механизмов, реализующихся в стрессовых условиях на уровне тилакоидных мембран хлоропластов. Пути регуляции фотосинтеза со стороны энергетического сенсора растений – SnRK1-киназы – остаются неизвестными. В данной работе для выявления взаимосвязи между уровнем активности SnRK1-киназы и эффективностью функционирования фотосистем использовался солевой стресс. Различная активность SnRK1 была генетически детерминирована уровнем транскрипции гена ее каталитической субъединицы KIN10 в разных линиях арабидопсиса, так как уровень транскрипционной активности KIN10 коррелирует с активностью SnRK1 (Ваена-Gonzalez et al., 2007). Оценка фотосинтетической активности листьев исследуемых генотипов на фоне солевого стресса привела к выводам о развитии адаптивных изменений в линиях с повышенным содержанием SnRK1-киназы (KIN10OX) и отсутствием таких изменений у растений со сниженным содержанием SnRK1 (KIN10RNAi). Так, за первые трое суток солевого стресса у растений KIN10OX увеличивались реальные квантовые выходы ФСII и ФСI, и снижалось нефотохимическое тушение флуоресценции, связанное с регулируемым формированием центров диссипации энергии (рис. 7, 8, 9).

Изменение уровня активности SnRK1-киназы не приводило ни к изменениям содержания АТФ в проростках, ни к существенному изменению работы АТФ-синтазы ни в благоприятных, ни в стрессовых условиях (рис. 10, 11). В то же время нами впервые

обнаружена функциональная особенность работы электронтранспортной цепи хлоропластов растений-сверхэкспрессоров *KIN10* - относительно низкая амплитуда формирующейся на свету транстилакоидной протондвижущей силы pmf, которая наблюдалась как при адаптации к солевому стрессу, так и при благоприятных условиях роста (рис. 10). Снижение амплитуды pmf у линий-сверхэкспрессоров *KIN10* было обусловлено низким градиентом электрического потенциала $\Delta\Psi$, а ΔpH не изменялся, что коррелировало с сохранением их способности к развитию нефотохимического тушения флуоресценции NPQ (рис. 9, 10). Известно, что поддержание сниженного $\Delta\Psi$ в условиях флуктуирующего света является защитным механизмом, препятствующим фотоповреждениям ФСII (Davis *et al.*, 2016). Можно полагать, что в линиях со сверхэкспрессией SnRK1 индуцирован неизученный пока механизм, изменяющий потоки ионов через тилакоидные мембраны на свету, что противодействует накоплению в хлоропластах ионов Na^+ и Cl^- и обеспечивает поддержание активности фотосистем при солевом стрессе. Кроме того, увеличение активности SnRK1-киназы в линиях *KIN10OX* приводит к усилению процессов репарации хлоропластов с участием автофагии (Chen *et al.*, 2017, Soto-Burgos *et al.*, 2017), что также может увеличивать устойчивость фотосинтеза к солевому стрессу. Напротив, подавление функции SnRK1-киназы методом РНК-интерференции приводило к отсутствию выраженного ответа на солевой стресс на уровне фотохимической активности хлоропластов (рис. 7-10). Конкретные молекулярные мишени SnRK1-зависимой сигнальной сети, которые участвуют в регуляции функций хлоропластов, пока неизвестны.

Обнаруженные в данной работе закономерности иллюстрируют схемы на рис. 12 (а, б).

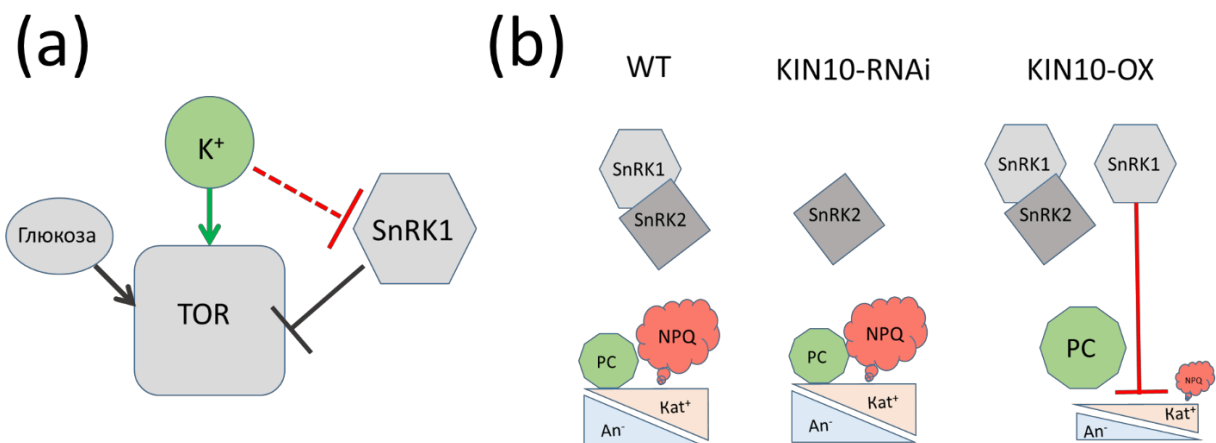


Рисунок 12. Выявленные в данной работе особенности (а) регуляции киназы TOR уровнем клеточного калия и (б) роли киназы SnRK1 в регуляции распределения энергии света между фотохимическими процессами (PC, photochemistry) и диссипацией (NPQ, non-photochemical quenching). Серым и черным цветами показаны известные ранее закономерности. Стрелки с заостренными концами обозначают активацию, стрелки с тупыми концами – ингибирование. Градиенты анионов (An^-) и катионов (Kat^+) обозначают размер градиента электрического потенциала $\Delta\Psi$ на тилакоидных мембранах хлоропластов.

ВЫВОДЫ

1. Хронический дефицит калия в среде выращивания проростков *Arabidopsis thaliana* вызывает следующие эффекты:

1а) снижение таких ростовых показателей, как длина корня и площадь листовой поверхности;

1б) значительное снижение ферментативной активности киназы TOR в корнях проростков, вероятно, по глюкозо-независимому пути;

1в) индукцию автофагии и увеличение количества автофагосом в клетках корней проростков; при этом уровень индуцированного дефицитом калия автофагического потока коррелирует с уровнем экспрессии каталитической субъединицы киназы SnRK1 –KIN10.

2. Повышение экспрессии каталитической субъединицы киназы SnRK1 – KIN10 в растениях *Arabidopsis thaliana* вызывает следующие эффекты:

2а) устойчивое снижение амплитуды формирующейся в хлоропластах на свету транстилакоидной протондвижущей силы, которое проявляется у растений как в оптимальных условиях выращивания, так и при солевом стрессе;

2б) рост реальных квантовых выходов ФСII и ФСI и снижение нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ) при солевом стрессе, в то время как у растений дикого типа и растений со сниженным уровнем экспрессии *KIN10* солевой стресс, напротив, приводит к снижению квантовых выходов ФСII и ФСI и росту NPQ.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. **Voitsekhovskaja O.V., Apollonov V.I., Murtuzova A.V., Rabadanova C.K., Charnysh M.A., Drozdova I.V., Belyaeva A.I., Kovaleva O.N., Loskutov I.G., Pawlowski K., Demidchik V.V., Tyutereva E.V.** (2020) Photosynthetic activity as assessed via chlorophyll a fluorescence suggests a role of potassium channels in root to shoot signaling. *Photosynthetica*, **58(SI)**, 608-621.
2. **Тютерева Е.В., Муртузова А.В., Войцеховская О.В.** (2022) Автофагия и энергетический статус растительной клетки. *Физиология растений*, **69(2)**, 115-131.
3. **Муртузова А.В., Тютерева Е.В., Войцеховская О.В.** (2023) Роль киназы SnRK1 в ответе фотосинтетического аппарата на солевой стресс *Физиология растений*, **70(3)**, 279-292.

Тезисы конференций:

1. **Муртузова А.В., Тютерева Е.В., Войцеховская О.В.** "Влияние уровня активности SnRK1-киназы на фотосинтез и дыхание *Arabidopsis thaliana* при солевом стрессе". V(XIII) Международная ботаническая конференция молодых ученых в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 25-29 апреля 2022 г.)
2. **Муртузова А.В., Рабаданова К.К., Добрякова К.С., Тютерева Е.В., Войцеховская О.В.** "Роль калия в регуляции конститутивной и стресс-индуцированной автофагии у растений". X Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего» (Казань, 18–24 сентября 2019 г.): тезисы докладов. – Казань: Издательство Казанского университета, 2019. – с. 299. ISBN 978-5-00130-204-9.
3. **Муртузова А.В., Тютерева Е.В., Рабаданова К.К., Добрякова К.С., Войцеховская О.В.** "Регуляция автофагического потока в условиях солевого стресса". X Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего» (Казань, 18–24 сентября 2019 г.): тезисы докладов. – Казань: Издательство Казанского университета, 2019. – с. 444. ISBN 978-5-00130-204-9.
4. **Муртузова А.В., Рабаданова К.К., Добрякова К.С., Аполлонов В.И., Костылевский П.С., Войцеховская О.В., Тютерева Е.В.** "TOR kinase and GORK channels in sensing of cellular potassium levels during induction of autophagy in *Arabidopsis* and barley". 10th International Conference "Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability-2019" in honor of Kimiyuki Satoh, Tingyun Kuang, Cesare Marchetti, and Anthony Larkum" Eds. Suleyman Allakhverdiev, Ilya Naydov. Saint Petersburg, Russia, 2019, p. 164. ISBN 978-5-4386-1743-3.
5. **Муртузова А.В., Тютерева Е.В., Рабаданова К.К., Добрякова К.С., Войцеховская О.В.** "Potassium and glucose as putative signals regulating processes in shoots and roots". 10th International Conference "Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability-2019" in honor of Kimiyuki Satoh, Tingyun Kuang, Cesare Marchetti, and Anthony Larkum" Eds. Suleyman Allakhverdiev, Ilya Naydov. Saint Petersburg, Russia, 2019, p. 161. ISBN 978-5-4386-1743-3.