

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GAMTOS TYRIMŲ CENTRO BOTANIKOS INSTITUTAS

Rima Mockevičiūtė

INDOLIL-3-ACTO RŪGŠTIES-BALTYMŲ  
KOMPLEKSAI CHLOROPLASTUOSE IR  
MITOCHONDRIJOSE

Daktaro disertacija  
Biomedicinos mokslai, botanika (04 B)

Vilnius, 2010

Daktaro disertacija rengta 2000 – 2010 metais Botanikos institute  
Disertacija ginama eksternu

**Mokslinė konsultantė:**

Habil. dr. **Nijolė Anisimovienė** (Gamtos tyrimų centro Botanikos  
institutas, biomedicinos mokslai, botanika – 04 B)

## TURINYS

SANTRUMPOS.....	6
ĮVADAS.....	8
1. TYRIMŲ APŽVALGA.....	13
1.1. Chloroplastai ir mitochondrijos: kilmė, struktūra ir pagrindinės funkcijos .....	13
1.2. Chloroplastų ir mitochondrijų genetinis aparatas. Dalinis autonomiškumas ...	19
1.3. Organoidų baltymai: sintezė ir pernaša .....	26
1.4. Fitohormonai bakterijose .....	29
1.5. Fitohormonai chloroplastuose ir mitochondrijose .....	31
1.6. Fitohormonus prisijungiantys baltymai .....	40
2. TYRIMŲ METODOLOGIJA.....	53
2.1. Tyrimų objektas .....	53
2.2. Chloroplastų ir mitochondrijų subląstelinių frakcijų išskyrimo sąlygų parinkimas .....	54
2.2.1. Chloroplastų subląstelinės frakcijos išskyrimas.....	54
2.2.2. Mitochondrijų subląstelinės frakcijos išskyrimas .....	56
2.3. Organoidų subląstelinių frakcijų identifikavimas .....	58
2.3.1. Chloroplastų subląstelinės frakcijos .....	58
2.3.2. Mitochondrijų subląstelinės frakcijos.....	58
2.4. Intaktinių organoidų preparatų subfrakcionavimas.....	60
2.4.1. Chloroplastų ir mitochondrijų membranų vezikulių preparatų soliubilizacija .....	60
2.4.2. Stomos ir matrikso baltymų išsodinimas.....	61
2.5. Specifiškai sujungtų IAR-ASB kompleksų formavimosi galimybių tyrimai ir kompleksų charakteristikų įvertinimas .....	61
2.6. Chloroplastų ir mitochondrijų ASB charakterizavimas .....	62
2.7. Statistinė duomenų analizė .....	63
3. TYRIMŲ REZULTATAI.....	65
3.1. IAR-ASB kompleksų formavimosi galimybių tyrimai pupelių chloroplastų ir mitochondrijų subląstelinėse frakcijose.....	65
3.1.1. Optimalaus pH IAR-ASB kompleksų susidarymui nustatymas .....	65
3.1.2. Chloroplastų ir mitochondrijų organoidų intaktiškumo ir funkcionalumo užtikrinimo svarba tiriant IAR-ASB	

kompleksų formavimasi .....	68
3.1.2.1. Chloroplastų ir mitochondrijų subląstelinių frakcijų įvertinimas .....	69
3.1.2.2. Organoidų intaktiškumą ir funkcionalumą užtikrinančių terpių sudėties IAR-ASB kompleksų formavimuisi parinkimas .....	74
3.1.3. IAR-ASB kompleksų formavimasis intaktiniuose pupelių chloroplastų preparatuose.....	76
3.1.4. ASB kompleksų formavimasis intaktiniuose ir funkcionaliuose pupelių mitochondrijų preparatuose.....	78
3.2. IAR-ASB kompleksų charakteristikos .....	80
3.2.1. Intaktinių chloroplastų frakcijos preparatuose susiformuojančių IAR-ASB kompleksų charakteristikos.....	80
3.2.2. Intaktinių mitochondrijų frakcijos preparatuose susiformuojančių IAR-ASB kompleksų charakteristikos.....	85
3.3. Kitų ligandų gebėjimas konkuruoti dėl IAR prijungimo vietų intaktinių chloroplastų ir mitochondrijų preparatuose .....	87
3.3.1. Ligandų sugebėjimas konkuruoti dėl IAR prijungimo vietų chloroplastų preparatuose.....	88
3.3.2. Ligandų sugebėjimas konkuruoti dėl IAR prijungimo vietų mitochondrijų preparatuose .....	90
3.4. IAR transporto inhibitorių įtaka IAR-ASB kompleksų formavimuisi intaktinių mitochondrijų ir chloroplastų preparatuose .....	92
3.4.1. Tirtų augsino transporto inhibitorių gebėjimas konkuruoti dėl <sup>14</sup> C-IAR prijungimo vietų chloroplastuose.....	92
3.4.2. Tirtų augsino transporto inhibitorių gebėjimas konkuruoti dėl <sup>14</sup> C-IAR prijungimo vietų mitochondrijose.....	93
3.5. Auginamą atpažįstančių baltymų kompartmentacija organoiduose .....	95
3.5.1. IAR-ASB kompleksų formavimosi galimybės pupelių chloroplastų subkompartmentuose – membranose ir stromoje .....	96
3.5.2. IAR-ASB kompleksų susidarymo galimybių mitochondrijų subkompartmentuose membranose ir matrikse tyrimai....	97
3.6. Auginamą ir baltymų sąveikų chloroplastų ir mitochondrijų subkompartmentuose charakterizavimas.....	100
3.6.1. Chloroplastų subkompartmentuose susiformuojančių	

IAR-ASB kompleksų charakteristikos .....	100
3.6.2. Mitochondrijų membranose susiformuojančių IAR-ASB kompleksų charakteristikos .....	104
3.7. Organoiduose funkcionuojančių auksiną prisijungiančių baltymų (ASB) identifikavimas.....	107
3.7.1. ASB chloroplastuose .....	107
3.7.2. ASB mitochondrijose .....	110
4. APIBENDRINIMAS.....	113
IŠVADOS.....	125
DISERTACIJOS TEMA SKELBTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS.....	148
PADĖKA .....	151
PRIEDAI .....	152

## SANTRUMPOS

A	optinis tankis, esant tam tikram bangos ilgiui
2,4-D	2,4-dichlorofenoksiacto rūgštis
ABR	abscizo rūgštis
AFB	Auksiną sujungiantys F-dėžutės baltymai ( <i>angl.</i> AUXIN-BINDING F-BOX PROTEIN)
Arg	argininas
ASB	auksiną prisijungiantis baltymas
<i>Aux/IAR</i> genai	auksino/indolil-3-acto rūgšties indukuojami genai
BAP	benzilaminopurinas
BSA	jaučio serumo albuminas ( <i>angl.</i> Bovine serum albumin)
chlDNR	chloroplastų deoksiribonukleorūgštis
Cys	cisteinas
Cit c	citochromas c
CK	citokininai
CSB	citokininą prisijungiantis baltymas
DCh-MS	dujų chromatografija-masių spektrometrija ( <i>angl.</i> GC-MS - Gas Chromatography-Mass Spectrometry )
DES	dietilstilbestrolas
DSch	dujų skysčių chromatografija ( <i>angl.</i> GLC - Gas-Liquid Chromatography)
DSSCh	didelio slėgio skysčių chromatografija ( <i>angl.</i> HPLC - High Pressure Liquid Chromatography)
DTT	ditiotreitolas
EDTA	etilendiamin-tetraacto rūgštis
ET	etilenas
FAR	fenilacto rūgštis
FDH	nuo glutationo priklausoma formaldehid-dehidrogenazė
FISH	fluorescencinė <i>in situ</i> hibridizacija ( <i>angl.</i> Fluorescence <i>in situ</i> hybridization)
GID1	Giberelino receptorius ( <i>angl.</i> GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF)
Glu	glutamo rūgštis
GR	giberelinas (giberelo rūgštis)
GSB	giberiną prisijungiantis baltymas
GST	glutationo S-transferazė
His	histidinas
IAAld	indolil-3-acetaldehidas
IAN	indolil-3-acetonitrilas
IAOx	indolil-3-acetaldoksimas
IAR	indolil-3-acto rūgštis
IARm	indolilacetamidas
IE	indolil-3-etanolis
IKR	indolil-3-karboksirūgštis
IM	indolil-3-metanolis
IPR	indolil-3-propiono rūgštis
IPVR	indolil-3-piruvo rūgštis
ISH	<i>In situ</i> hibridizacija ( <i>angl.</i> <i>In situ</i> hybridization)

ISR	indolil-3-sviesto rūgštis
MES	4-morfolinetansulfonrūgštis
mtDNR	mitochondrijų deoksiribonukleorūgštis
MVR	mevaloninė rūgštis
NAR	naftilacto rūgštis
NFR	N-1-naftilftalamo rūgštis
NSB	naftilftalamo rūgštį prisijungiantis baltymas
PAAG elektroforezė	elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoridas
PVP	polivinilpirolidonas
RuBP karboksilazė	ribuliozės-1,5-bifosfatkarboksilazė
S	sedimentacijos konstanta, Svedbergais
SAUR	mažos auksino indukuojamos RNR ( <i>angl.</i> small auxin-up RNAs)
SCF <sup>TIR1</sup>	Skp1·cdc53/kulin·F-box <sup>TIR1</sup> – ubichitin-ligazės kompleksas
SCh-MS	skysčių chromatografija-masių spektrometrija ( <i>angl.</i> LC-MS - Liquid chromatography-Mass Spectrometry) -
Ser	serinas
TCR	trichloracto rūgštis
TIR1	reakcijos į auksino transporto inhibitorius 1 baltymas ( <i>angl.</i> AUXIN TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1)
TJBR	2,3,5-trijodobenzoinė rūgštis
TRIS	tris(hidroksimetil)aminometanas
Trp	triptofanas

## IVADAS

**Tiriamoji problema.** Augalų hormonas indolil-3-acto rūgštis (IAR arba auksinas) viena arba kartu su kitais fitohormonais reguliuoja daugelį fiziologinių procesų (1 priedas). Ląstelės lygmeniu jai priskiriama tūsimos, dalijimosi ir diferenciacijos procesų kontrolė (Меркис, 1982; Macdonald, 1997; Jones et al., 1998; Teale et al., 2006). Nors IAR yra pirmasis augaluose aptiktas ir identifikuotas hormonas, tačiau kaip ši cheminiu požiūriu nesudėtinga molekulė gali sąlygoti ar įtakoti tokį platų augalų augimo ir vystymosi procesų ratą galutinai nustatyti nepavyko iki šiol (Merkys et al., 2003; Theologis, 2004; Teale et al., 2006; Mockaitis, Estelle, 2008 ir kt.). Žinoma, kad IAR molekulinio veikimo mechanizmas prasideda sąveika su auksiną atpažįstančiais ir specifiskai sąveikaujančiais baltymais – ASB (Bonner, 1965; Merkys, 1966), o susidariusių kompleksų poveikis nukreiptas į genetinės informacijos modifikavimą branduolyje (Merkys et al., 1988; Darginavičienė et al., 1991; Abel, Theologys, 1996; Leyser, 2002 ir kt.). Todėl neabejotina, kad ASB yra esminiai IAR molekulinio veikimo komponentai, nulemiantys fiziologinį atsaką (Меркис, 1982; Badescu, Napier, 2006). Šiuo metu identifikuota keletas ankstyvųjų atsakomosios reakcijos į IAR genų šeimų, keletas galimų IAR signalo perdavimo į branduolį kelių, aptikti IAR pernešimo baltymai (PIN, AUX1, EIR, BIG, ABC), MAP kinazių kaskados, GH3 šeimos genų koduojami fermentai, inaktyvuojantys IAR konjugatų sintezę ir hidrolizę, citochromas P<sub>450</sub> ir kt. Gauta daugybė IAR atsako mutantų (Leyser, 1997; Woodward, Bartel, 2005).

Ilgą laiką, tiriant specifinę IAR-ASB sąveiką, dėmesys buvo sutelktas į lelijainių (vienaskilčių) bei magnolijainių (dviskilčių) augalų išorinę ląstelę gaubiančią membraną – plazmolemą (Venis, 1977 a; Ray et al., 1977 a; Hertel, 1979; Merkys et al., 1988; Даргинавичене, 1992; Anisimovienė et al., 2003; Jodinskienė, 2005). Šiuo metu galutinai identifikuotas IAR receptorių ASB1 – baltymas funkcionuojantis tūstančių kukurūzų koleoptilių ląstelių plazmolemoje ir nulemiantis greitą lelijainių augalų ląstelių atsaką į šį



fitohormoną tįstamuoju augimu (Venis et al., 1992; Woo et al., 2002; Napier, 2004), tačiau jo signalo perdavimo į branduolį kelias iki šiol nežinomas (Teale et al., 2006; Christian et al., 2006). Analogišką funkciją atliekantis baltymas aptiktas kviečių koleoptilių plazmolemoje (Merkys et al., 1988; Даргинавичене, 1992). Dėl ASB1 – kaip IAR receptoriaus funkcijų, magnolijainių augalų plazmolemoje ilgą laiką buvo abejojama ir diskutuojama (Venis, 1995; Hertel, 1995; Shimomura et al., 1999). Vėliau, nustatyta, kad pupelių tįstančių hipokotilių plazmolemoje funkcionuoja ASB1 homologas – ASB26, turintis tokią pat IAR prisijungimo vietą – /-His-Arg-His-Ser-Cys-Glu- / ir funkciją (Anisimovienė, Merkys, 2000). Pastaraisiais metais identifikuotas ir viduląstelinis auksino receptorius – tirpus branduolio baltymas TIR1, apsprendžiantis atsako į auksiną transkripcinius procesus, įtakojančius augalo vystymąsi (Dharmasiri et al., 2005 a; Kepinski, Leyser, 2005).

Augalinės ląstelės – plazmolemoje, citozolyje, tonoplaste charakterizuota ir daugiau ASB. Kai kurie jų turi fermentinį aktyvumą, kiti charakterizuojami kaip galimi auksino receptoriai ar pernešikliai (Ostrom et al., 1980; Zaina, 1989; Macdonald et al., 1991; Даргинавичене, 1992; Merkys, Darginavičienė, 1997 ir kt.), dar eilės kitų ASB funkcionuojančių šiuose ląstelės kompartmentuose funkcijos nėra žinomos.

**Darbo aktualumas.** Klausimai – kokiuose kituose ląstelės kompartmentuose gali būti lokalizuoti ASB ir koks galimas jų vaidmuo IAR fiziologinės funkcijos realizavime – mažai tirti arba netirti visai (Darginavičienė, Novickienė, 2002; Merkys et al., 2003; Woodward, Bartel, 2005; Anisimovienė et al., 2006). Mūsų manymu, labai aktualūs šiuo požiūriu yra ląstelės organoidai – chloroplastai ir mitochondrijos. Šiuose organoiduose kaip ir jų bakteriniuose pirmtakuose – lokalizuota/sintetinama IAR (Anisimovienė, 1974; Fregeau, Wightman, 1983; Ohmiya, Hayashi, 1992; Sandber et al., 1990; Sergeeva et al., 2002 ir kt.), tačiau jos fiziologinis vaidmuo organoido ir visos ląstelės atžvilgiu netirti. Be to, išanalizavus šiuo metu esamas publikacijas apie galimą šių organoidų vaidmenį fitohormonų funkcijos pasireiškimui per specifiskai sujungtų hormono-baltymo kompleksų

formavimąsi, paaiškėjo, jog tokio pobūdžio tyrimai auksino atžvilgiu neatliekami. Tuo tarpu CK-prisijungiantys baltymai išskiriami iš įvairių augalų chloroplastų (Romanko et al., 1986; Zhang et al., 1996; Селиванкина и др., 1997; Nogue et al., 2004) bei nustatyta, kad šie chloroplastų baltymai, esant CK, skatina chloroplastų genų transkripciją (Romanko et al., 1986; Kusnetsov et al., 1994; Кулаева, Кузнецов, 2002 ir kt.). Kitą fitohormoną – ABR prisijungiantis baltymas, išskirtas iš pupų lapų varstomųjų ląstelių protoplastų chloroplastų, charakterizuojamas kaip manomas ABR receptorių (Zhang et al., 2002). Duomenų apie fitohormonus specifiškai prisijungiančius baltymus mitochondrijose neradome. Taigi, plastidžių genų transkripcijos hormoninė reguliacija yra mažai išnagrinėta, o mitochondrijų netirta visai.

Čia išdėstyti teiginiai apie neišaiškintą ASB lokalizaciją ląstelėje, skirtingų IAR-ASB kompleksų galimą reikšmę IAR funkcijos pasireiškimui, chloroplastuose ir mitochondrijose lokalizuotos/sintetinės IAR fiziologinį vaidmenį organoide bei visos ląstelės atžvilgiu ir lėmė tyrimų kryptį – indolil-3-actio rūgšties-baltymų kompleksai chloroplastuose ir mitochondrijose. Be to, tokia tyrimų kryptis siejasi su BI Augalų fiziologijos laboratorijoje jau kelis dešimtmečius vykdomais tyrimais – specifiškai sujungtų IAR-ASB kompleksų, susiformuojančių citozolyje, plazmolemoje ir tonoplaste charakterizavimu bei jų funkcijos augimo procese išaiškinimu. Disertacijos tyrimų kryptis yra šių darbų tęsinys.

**Darbo tikslas:** išaiškinti ASB buvimo ir funkcionavimo pupelių ląstelių organoideose – chloroplastuose ir mitochondrijose galimybę.

**Darbo uždaviniai:**

- Išaiškinti IAR atpažįstančių ir specifiškai sąveikaujančių baltymų lokalizacijos ir funkcionavimo galimybę pupelių lapų ląstelių intaktiniuose chloroplastuose ir hipokotilių ląstelių zonos, atsakančios į IAR poveikį tįstamuoju augimu, intaktinėse mitochondrijose.
- Atskleisti IAR ir ASB sąveikos ypatybes chloroplastuose ir mitochondrijose. Charakterizuoti susiformuojančius kompleksus.

- Nustatyti, kuriame(-iuose) chloroplastų ir mitochondrijų subkompartimentuose gali būti lokalizuoti ASB.
- Charakterizuoti chloroplastų ir mitochondrijų subkompartimentuose susiformuojančius specifinius IAR-ASB kompleksus ir juos sudarančius ASB.
- Palyginti chloroplastuose ir mitochondrijose susiformuojančius IAR-ASB kompleksus su kituose ląstelių kompartimentuose susiformuojančiais IAR-ASB kompleksais.

### **Darbo mokslinis naujumas ir reikšmė**

Pirmą kartą organoidų, subkompartimentų ir baltymų lygmenyse parodyta, kad savitą genetinį aparatą turinčiuose ląstelės organoiduose – chloroplastuose ir mitochondrijose lokalizuoti ir funkcionuoja ASB.

Dviejų skirtingų specifiskų IAR-ASB kompleksų (optimalūs pH 5,5 ir 7,5) formavimas nustatytas intaktiniuose chloroplastuose ir vieno IAR-ASB komplekso formavimasis (pH 7,0) intaktinėse mitochondrijose. Vienas chloroplastų ASB (optimalus terpės pH 5,5; 50-53 kDa) yra lokalizuotas stromoje. Kitas ASB (optimalus pH 7,5; 38-42 kDa) lokalizuotas membranose. Mitochondrijų ASB (45-47 kDa) lokalizuotas membranose.

Nustatyta, kad IAR-ASB kompleksai, susiformuojantys pupelių lapų chloroplastuose ir tįstančių hipokotilių ląstelių mitochondrijose, skiriasi tarpusavyje, o taip pat skiriasi nuo kitų IAR-ASB kompleksų, susiformuojančių pupelių hipokotilių ar kviečių koleoptilių ląstelių, atsakančių į IAR poveikį tįstamuju augimu, citozolio ir plazmolemos kompartimentuose bei receptorinių IAR-ASB1 ir IAR-TIR1 kompleksų. Šių ASB IAR molekulės prisijungimo vietų struktūra ir susiformuojančių IAR-ASB kompleksų funkcija gali būti kitokia.

Remiantis šiuo metu turimais duomenimis, suformuluota prielaida apie galimą chloroplasto vaidmenį IAR hormoninės funkcijos realizavime.

### **Ginamieji disertacijos teiginiai:**

- Organoidų, subkompartmentų ir baltymų lygmenyse nustatyta, kad pupelių lapų chloroplastuose ir hipokotilių mitochondrijose yra lokalizuoti ir gali funkcionuoti auksiną prisijungiantys baltymai.
- Organoidų intaktiškumo ir funkcionalumo užtikrinimas turi reikšmės IAR-ASB sąveikos ypatybėms. Intaktinėse mitochondrijose susiformuoja vienas, o intaktiniuose chloroplastuose – du skirtingi specifiškai sujungti IAR-ASB kompleksai.
- Intaktiniuose chloroplastuose funkcionuoja du ASB: vienas (optimalus kompleksų formavimosi pH 5,5) lokalizuotas stromoje, antras (optimalus pH 7,5) – membranose. Mitochondrijų organoiduose ASB (optimalus pH 7,0) – lokalizuoti membranose.
- Chloroplastuose ir mitochondrijose susiformuojantys IAR-ASB kompleksai skiriasi tarpusavyje. Jie taip pat skiriasi nuo IAR-ASB kompleksų, susiformuojančių pupelių hipokotilių ar kviečių koleoptilių ląstelių, atsakančių į IAR poveikį tįstamuju augimu plazmolemoje bei nuo IAR kompleksų susiformuojančių su ASB1 ir TIR1.

### **Darbo rezultatų aprobavimas ir publikacijos**

Pagrindiniai šio darbo rezultatai buvo pristatyti 18 mokslinių konferencijų: 13 tarptautinių ir 5 konferencijose Lietuvoje. Disertacijos medžiaga paskelbta 9 moksliniuose straipsniuose bei 14 konferencijų tezių.

### **Darbo apimtis ir struktūra**

Disertaciją sudaro įvadas, tyrimų apžvalga, tyrimų metodologija, tyrimų rezultatai, apibendrinimas, išvados, darbe naudotos literatūros sąrašas (402 šaltiniai) bei mokslinių publikacijų sąrašas. Darbe 13 lentelių, 45 paveikslai, 10 priedų. Darbo apimtis 157 puslapiai. Disertacija parašyta lietuvių kalba, santrauka – anglų kalba.

## 1. TYRIMŲ APŽVALGA

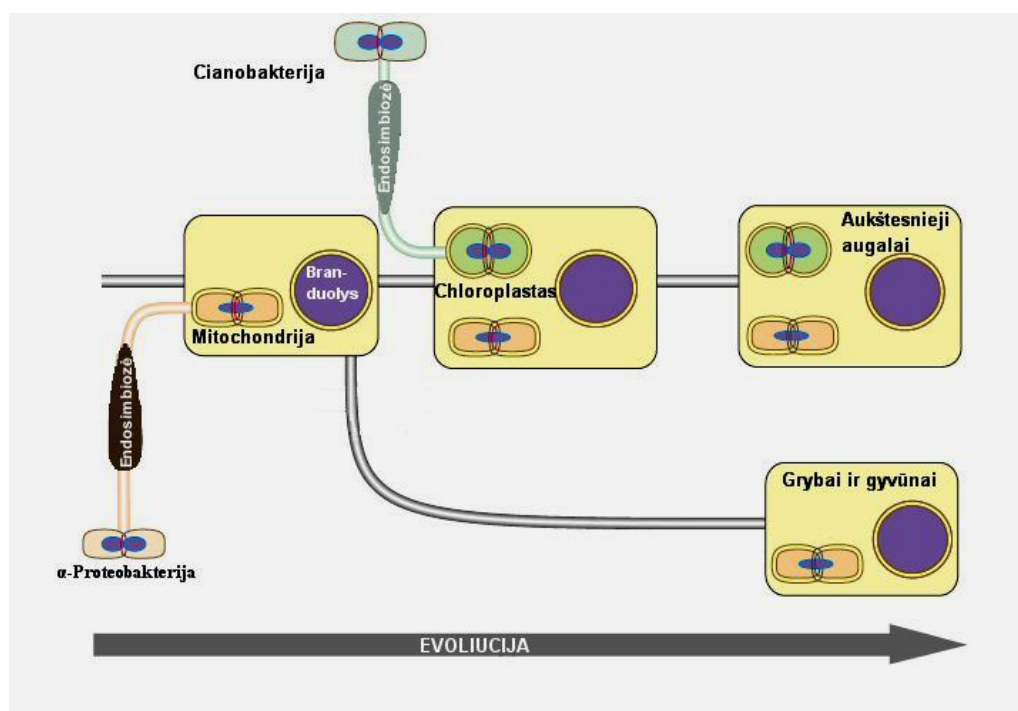
### 1.1. Chloroplastai ir mitochondrijos: kilmė, struktūra ir pagrindinės funkcijos

*Organoidų kilmė augalinėje ląstelėje.* DNR, RNR bei baltymų sintezės vyksmas keliuose augalinės ląstelės kompartmentuose kelia klausimą – kas galėjo sąlygoti skirtingų struktūrinių kompartmentų: branduolio, mitochondrijų ir chloroplastų – organoidų, turinčių savitą genetinę informaciją buvimą ir funkcionavimą jose? Tam paaiškinti siūlyta ir siūloma keletas hipotezių: autogeniškos kilmės hipotezė (Bogorad, 1975; Cavalier-Smith, 1975), monofiletinė nuosekliosios endosimbiozės teorija (Mereschkowski, 1905; Margulis, 1970 cit. pagal Gray et al., 1999 ir Martin et al., 2001), daugialypės kilmės (Gray et al., 1989; 1999) ir “vandenilio“ (Martin, Müller, 1998) hipotezės.

A.F.W. Schimper (1883) pirmasis parodė, kad chloroplastai ir mitochondrijos dauginasi dvigubu skilimu (cit. pagal Miyagishima, 2005). Tuo remdamasis K.Mereschkowski (1905) pirmą kartą aiškiai išdėstė teiginius, kad plastidės kilusios iš cianobakterijų endosimbiozės metu (cit. pagal Martin et al., 2001), o I.Wallin (1927) postulavo, kad mitochondrijos tap pat išsivystė iš laisvai gyvenusių bakterijų (cit. pagal Kutschera, Niklas, 2005). Pradžioje šie teiginiai susidūrė su mokslininkų, remiančių alternatyvią – autogenišką chloroplastų kilmės hipotezę, skepticizmu. L.Bogorad (1975) pristatė modelį, kuris rėmėsi kai kurių chloroplastų baltymų dvigubu kodavimu: iš dalies branduolio DNR ir iš dalies organoido DNR. Šis modelis aprašė pumpuravimosi tipo procesą – vieno genomo į tris. Kitą alternatyvų modelį išdėstė T.Cavalier-Smith (1975), pagal kurį branduolys, mitochondrijos ir chloroplastai kilę cianobakterijose vykusio tilakoidų persitvarkymo metu (Bogorad, 1975; Cavalier-Smith, 1975).

Vėliau K.Mereschkowski ir I.Wallin teiginiai bei pažiūros sudarė pagrindą šiuo metu plačiai pripažįstamai L.Margulis (1970; 1981) nuosekliosios endosimbiozės teorijai (cit. pagal Gray et al., 1999 ir Martin et al., 2001). Pagal

kurią chloroplastai ir mitochondrijos yra tiesioginiai bakterijų palikuonys – endosimbiontai, atsiradę ankstyvose vystymosi stadijose, branduolį turinčiose ląstelėse šeiminkėse, vykdydžiusiose bedeguoninių heterotrofinį metabolizmą (1 pav.). Nuosekliosios endosimbiotinės kilmės teorija patvirtinta elektroninės mikroskopijos, biocheminių ir molekulinės genetikos tyrimų duomenimis gautais naudojant nukleorūgščių hibridizacijos, ISH, FISH, mikroautoradiografijos ir kitus šiuolaikinius metodus (Suzuki et al., 1992; Mache, Lerbs-Mache, 2001; McFadden, 2001; Raven, Allen, 2003).



**1 pav.** Endosimbiotinė eukariotų evoliucija (Miyagishima et al., 2003).

Pirminės ir antrinės organoidų rRNR struktūros, mažojo ir didžiojo ribosomų subvienetų rRNR sekų palyginimas (Gray et al., 1989; 2001; McFadden, 2001) atskleidė, kad plastidės ir mitochondrijos turi savitas RNR (iRNR, rRNR, tRNR) ir ribosomas, turinčias daugiau panašumų su prokariotais negu su atitikmenimis eukariotų branduolyje. Mitochondrijų DNR (mtDNR) ir chloroplastų DNR (chlDNR) sekvenavimo duomenys parodė, kad plastidės ir mitochondrijos turi unikalius genomus ir, kad mtDNR bei chlDNR taip pat labiau panašūs į prokariotų nukleoidus nei branduolio genomą (Nakano et al., 1997; Burger et al., 1999; Sakai et al., 2004). Nors organoidų genų sekos rodo,

kad skirtingų organizmų mtDNR ir chlDNR turi savitumą, tačiau jos visos išlaiko bendrus bruožus, tai paremia išvadą apie monofiletinę kilmę (Игамбуердиев, 2000; McFadden, 2001 ir kt.) ir leidžia atsekti evoliucinį mitochondrijų ir chloroplastų pirmtaką iki vieno protėvio. Mitochondrijos kilusios iš  $\alpha$ -proteobakterijų subgrupės  $\alpha$ -purpurinių bakterijų arba riketsijų (Gray et al., 1999; Игамбуердиев, 2000; Martin et al., 2001 ir kt.), o chloroplastai – iš laisvai gyvenusių bei fotosintezę vykdyusių cianobakterijų (McFadden, 2001; Martin et al., 2001; Raven, Allen, 2003).

Organoidų DNR raiškos tyrimai patvirtino, kad jų replikacija, transkripcija ir translacija taip pat panaši į (eu)bakterijų. (Kurland, Anderson, 2000; McFadden, 2001; Raven, Allen, 2003). Baltymų sintezės pirmoji transkripto aminorūgštis, mitochondrijose ir chloroplastuose kaip ir bakterijose, yra formilmetioninas [fMet], o ne metioninas [Met], kuris yra pirmoji eukariotų branduolio koduojamų baltymų aminorūgštis (Leis, Keller, 1970; Li et al., 2000).

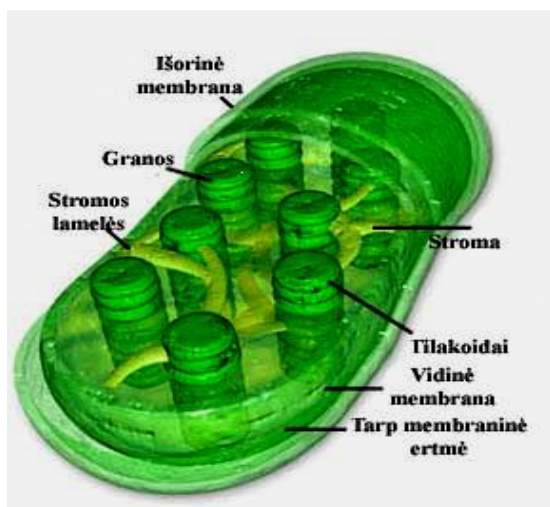
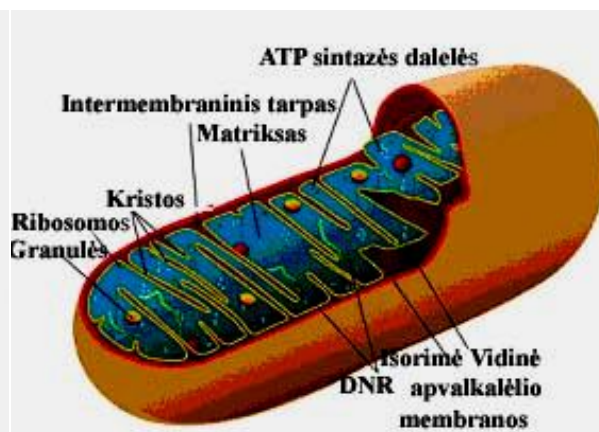
Nors monofiletinis chloroplastų ir mitochondrijų kilmės modelis su viena pagrindine endosimbioze, įtraukiančia vieną endosimbiontą ir vieną šeimininką plačiai pripažįstamas, tačiau neseniai atlikti vienaląsčių eukariotų tyrimai sukėlė abejonių dėl tradicinės endosimbiozės sampratos (Howe et al., 2003). Nėra aišku (Gray et al., 1999) ar ląstelė-šeimininkė buvo branduolį turintis eukariotas ar archėja (archėjos daugeliu ląstelės sandaros aspektų panašios į bakterijas, tačiau genų transkripcija ir translacija panašesnė į eukariotų). Todėl šiuo metu pasiūlyti keli modeliai, įrodinėjantys bakterijų ir archėjų susijungimą ir branduolio genomo susikūrimą (Clegg et al., 1994; Gray et al., 1999). Vienas jų – daugialypė mitochondrijų kilmės hipotezė. Pagal kurią eukariotinė ląstelė formavosi dviem pakopomis: pradžioje susiformavo amitochondrinis eukariotas susijungiant archeobakterijai ir proteobakterijai, po to endosimbiozėje su  $\alpha$ -proteobakterija į eukariotinę ląstelę pateko mitochondrijos. Autorių manymu, mitochondrijos atsirado bendrame visų išlikusių eukariotų protėvyje, šis organoidas atsirado iš esmės tuo pačiu metu kaip ir eukariotinės ląstelės branduolys, o ne kaip atskiri, vienas po kito

einantys įvykiai (Gray et al., 1999). Manoma, kad analogiškai atsirado ir chloroplastas (Gray et al., 1989; Clegg et al., 1994). Dar kita eukariotinės ląstelės kilmės hipotezė – “vandenilio hipotezė” remiasi metabolizmo simbioze, kaip varomąja jėga, tarp vandenilį gaminančios simbiotinės bakterijos –  $\alpha$ -proteobakterijos ir nuo vandenilio priklausančios šeiminikės – archėjos (Martin, Müller, 1998).

Visumoje, šie modeliai, neneigia endosimbiotinio organoidų atsiradimo kelio eukariotinėje ląstelėje (Clegg et al., 1994; Gray et al., 1999). Tai patvirtina ir vis nauji molekulinės genetikos, bioinformatikos, transkriptomikos bei proteomikos duomenys, leidžiantys identifikuoti organoidų baltymus, jų funkcijas bei šiuos baltymus koduojančius genus ir parodantys tiesioginę organoidų kilmę iš bakterinių protėvių (Gray et al., 2001; Leister, 2003).

***Chloroplastų ir mitochondrijų struktūra.*** Aukštesniųjų augalų ląstelėse būna apie 100-200 chloroplastų (Mache, Lerbs-Mache, 2001) ir 50-2000 mitochondrijų (Andersson, Kurland, 1998; Игамбуердиев, 2000). Organoidus nuo ląstelės citoplazmos skiria apvaskalėlis (2 pav.) susidedantis iš dviejų, turinčių skirtingas savybes ir funkcijas membranų: išorinės ir vidinės (Pinnaduwege, Bruce, 1996; Bowsher, Tobin, 2001; Frey et al., 2002; Malka et al., 2005). Per apvaskalėlį vyksta ryšys tarp organoidų ir juos supančio citozolio (Pinnaduwege, Bruce, 1996; Bowsher, Tobin, 2001). Tarp abiejų apvaskalėlio membranų yra tarpmembraninės ertmės (Wienhues, Neupert, 1992; Frey, Mannella, 2000; Leister, 2003). Vidinės apvaskalėlio membranos riboja vidines ertmes, užpildytas skysta faze – stroma (chloroplastuose) arba matriksu (mitochondrijose) ir yra išlankstytos į sudėtingas vidinių membranų sistemas (Bowsher, Tobin, 2001; Frey et al, 2002; Albertsson, Andreasson, 2004; Shimoni et al., 2005; Logan, 2006). Elektroninės mikroskopijos būdu išskiriamos keturios aukštesniųjų augalų chloroplastų vidinių membranų-tilakoidų sritys, turinčios skirtingą biocheminę struktūrą ir funkciją (Albertsson, Andreasson, 2004; Shimoni et al., 2005). Mitochondrijų vidinių membranų-kristų taip pat išskiriamos kelios sritys, kas rodo, kad vidinės membranos funkcija gali būti kompartmentuota (Frey, Frey, 1999).



**A****B**

**2 pav.** Chloroplasto (A) ir mitochondrijos (B) struktūrų schema (paimta iš <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/chloroplasts/images/chloroplastsfigure1.jpg> ir <http://scienceblogs.com/worldsfair/Mitochondria.jpg>, atitinkamai).

Taigi, chloroplastai ir mitochondrijos labai sudėtingos struktūros organoidai (2 pav.) sudaryti iš šešių kompartmentų – trijų membranų: dvigubos apvalkalėlio membranos ir tilakoidų/kristų membranų, kurios apsupa tris skirtingas skystas fazes: tarpmembraninę ertmę, stromą/matriksą ir tilakoidų/kristų vidinę erdvę (Leister, 2003; Logan, 2006). Tokia sudėtinga organoidų struktūra aiškinama jų bakterine kilme (Liberton et al., 2006). Chloroplastų protėviai – cianobakterijos, kaip ir mitochondrijų protėviai – gram-neigiamos bakterijos (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*) turi trijų sluoksnių ląstelės apvalkalėlį, sutampantį su plazmine membrana, peptidoglikano (mureino) sluoksnį ir išorinę membraną (Benz, 1985; Liberton et al., 2006). Mitochondrijų ir chloroplastų vidinės membranos yra homologai su energiją transdukuojančiomis bakterijų citoplazmos membranomis (Allen, 2003; Liberton et al., 2006), o mitochondrijų matriksas ir chloroplastų stroma yra bakterijų citoplazmos homologai (Allen, 2003).

**Pagrindinės organoidų funkcijos ląstelėje.** Pagrindinė chloroplastų funkcija augalų ląstelėse yra fotosintezė – gebėjimas aprūpinti ląsteles fiksuota anglimi ir energija. Tilakoidų membranose vyksta svarbiausios fotosintezės reakcijos, stromoje lokalizuoti fermentai, įtraukti į CO<sub>2</sub> fiksaciją (Spetea et al.,

2004). Be fotosintezės chloroplastai ląstelėje atlieka eilę kitų svarbių funkcijų. Jų stromoje funkcionuoja genetinis ir baltymų sintezės aparatai (Martin, Herrmann, 1998; Mache, Lerbs-Mache, 2001; Spemulli, 2003), vykdančys DNR ir RNR, aminorūgščių bei kai kurių specifinių baltymų sintezę (Марчюкайтис, 1966; Spemulli, 2003; Sakai et al., 2004). Chloroplastuose taip pat vyksta riebalų rūgščių, lipidų, fitohormonų (IAR, CK, ABR, GR), vitaminų ir kitų antrinių metabolitų sintezės (Pyke, 1999; Bowsher, Tobin, 2001; Leister, 2003; Spemulli, 2003; Lunn, 2007; López-Juez, 2007), proteolizės (Clarke et al., 2005; Forsberg et al., 2005), fosforilinimo ir defosforilinimo procesai (Foyer, 1985; Sokolov et al., 2006).

Mitochondrijos, be pagrindinio jų vaidmens – kvėpavimo ir aprūpinimo energija, vykdančios ATP sintezę (Mackenzie, McIntosh, 1999; Kruff et al., 2001; Logan, 2006), augalinėse ląstelėse taip pat atlieka daug kitų svarbių funkcijų, tokių kaip nukleotidų, aminorūgščių, keleto specifinių baltymų, lipidų ir vitaminų sintezės (Mackenzie, McIntosh, 1999; Kruff et al., 2001; Logan, 2006; Lunn, 2007). Jos dalyvauja fotokvėpavimo ir fosforilinimo procesuose (Vanlerberghe et al., 2002; Juszczuk et al., 2007), vykdo aktyvų baltymų ir metabolitų transportą iš/į citozolio(i) (Lunn, 2007), tarpininkauja eksportuojant organines rūgštis (Heazlewood, Millar, 2005), turi įtakos programinei ląstelių mirčiai (Heazlewood, Millar, 2005; Logan, 2006).

Nors šiuo metu neabejojama dėl daugelio šiuose organoiduose vykstančių biocheminių procesų, tačiau kaip rodo jų proteomų analizės (Janska, 2005; Lunn, 2007) mažiausiai 15 % plastidžių baltymų ir apie 20 % mitochondrijose identifikuotų baltymų funkcijos nežinomos, nežinoma ir jų lokalizacijos vieta organoiduose (Kleffmann et al., 2004; Lunn, 2007). Didelis skaičius iki šiol necharakterizuotų baltymų, leidžia manyti, kad abejuose organoiduose veikia daugybė metabolitinių kelių ir regulatorinių procesų, laukiančių savo atradimo (Lunn, 2007).

Be to, plastidžių ir mitochondrijų metabolizmas yra susipynęs su metabolizmu, vykstančiu citozolyje – vyksta tirpių medžiagų transportas per

organoidų apvalkalėlio membranas (Flügge, 2000; Bowsher, Tobin, 2001; Weber et al., 2004). Pripažinta, kad ir chloroplastų, ir mitochondrijų apvalkalėlių vidinės membranos yra pralaidumo barjeras tarp organoidų ir citozolio (Зайцева и др., 2000; Flügge, 2000; Bowsher, Tobin, 2001; Weber et al., 2004), per kurias metabolitai transportuojami ne per vieną, bet per tinklą skirtingų pernešėjų su dalinai sutampančiu substratų specifiskumu (Flügge, 2000; Bowsher, Tobin, 2001). Organoidų apvalkalėlių išorinės membranos turi porinus, struktūra ir funkcijomis panašius į bakterijų porinus, kurie veikia kaip paprastos difuzinės poros, nespecifiškai praleisdami (įleisdami ir išleisdami) iki 10 kDa molekules (Зайцева и др., 2000; Bowsher, Tobin, 2001; Flügge, 2000; Weber et al., 2004). Be to, pastaruoju metu chloroplastų išorinėje apvalkalėlio membranoje atrastos specifinės tirpių medžiagų poros (Bölter, Soll, 2001), galinčios veikti kaip selektyvus filtras (Зайцева и др., 2000; Flügge, 2000; Bowsher, Tobin, 2001). Nustatyta, kad trys žirnių chloroplastų išorinio apvalkalėlio baltymai – OEPs: OEP24, OEP21, OEP16 turi kanalų tipo aktyvumą (Flügge, 2000). Pavyzdžiui, OEP16 (16 kDa) selektyviai praleidžia tik aminorūgštis, bet nepraleidžia trifosfatų ar cukrų, kuriuos pagal molekulinę masę galėtų praleisti (Pohlmeyer et al., 1997).

## **1.2. Chloroplastų ir mitochondrijų genetinis aparatas. Dalinis autonomiškumas**

Kaip jau minėta anksčiau, augalinės ląstelės organoidai – chloroplastai ir mitochondrijos yra laikomi, anksčiau laisvai gyvenusių prokariotų, turėjusių savo pilną genomą, palikuonimis (Martin, Herrmann, 1998; Race et al., 1999; Berg, Kurland, 2000; Sato, 2002; Martin, et al., 2002; Sakai et al., 2004). Tačiau eukariotinėje ląstelėje abu šie organoidai nors ir turi savo baltymų sintezės aparatus, savo funkcijų negali vykdyti be branduolio koduojamų, citoplazmoje sintetinamų baltymų. Taigi, funkcijų realizavimui jie turi dvigubą kontrolę ir yra charakterizuojami kaip dalinai autonomiški (Brandt, 1990; Кулаева, 1997; Allen, 2003).

**Cianobakterijų ir chloroplastų genomų palyginimas.** Kiekviena plastidė turi dešimtis ar šimtus chlDNR – uždarytų žiedinių dvigrandžių molekulių (Maier et al., 1995; Mache, Lerbs-Mache, 2001) asocijavusių su specifiniais baltymais ir sudarančių kompaktiškos formos struktūras, panašias į randamas bakterijose. Šie kompaktiški DNR-baltymų kompleksai yra vadinami plastidžių nukleoidu (Suzuki et al., 1992; Nakano et al., 1997; Kobayashi et al., 2002; Sakai et al., 2004). Jame vyksta DNR replikacija ir transkripcija (Sakai et al., 2004).

ChlDNR dydžiai skiriasi ne tik tarp skirtingų augalų pokaralysčių, bet ir tarp atskirų tos pačios augalų klasės šeimų (1 lentelė). Nors skirtingi autoriai pateikia kiek kitokius chloroplastų genomų dydžius (1 lentelė), tačiau visų žinomų chloroplastų genomas yra aiškiai mažesnis už jų protėvių ir sudaro tik nuo 2 (Eckardt, 2006) iki 5-10 % (Martin et al., 2002).

**1 lentelė.** Chloroplastų ir cianobakterijų genomų dydžio palyginimas

Genomas	Sekos ilgis, kbp	Baltymus koduojančių genų skaičius	Literatūros šaltinis
<i>Prochlorococcus</i>	1700	1391	Sato, 2002; Martin et al., 2002
<i>Synechocystis</i> sp.	3573,470	3168	Kaneko et al., 1996
chl <i>Chlorella</i>	150,613	78	Wakasugi et al., 1997
chl <i>Porphyra</i>	181,028	200	Reith, Munholland, 1995
chl <i>Marchantia</i>	121,024	84	Ohyama et al., 1986
chl <i>Pinus</i>	119,707	69	Wakasugi et al., 1994
chl <i>Arabidopsis</i>	154,478	87	Sato et al., 1999
chl <i>Nicotiana</i>	155,844	76	Shinozaki et al., 1986
chl <i>Zea</i>	140,387	70-76	Maier et al., 1995; Martin, Herrmann, 1998
chl <i>Oryza</i>	134,525	76	Hiratsuka et al., 1989

Literatūros duomenimis (Sato, 2002 ir kt.) mažiausias šių dienų cianobakterijų genomas yra apie 1700 kbp. Toks genomo dydis galėtų būti ir chloroplaste, tačiau duomenys pateikti 1 lentelėje aiškiai rodo, kad įvairiuose augaluose aptinkamų chloroplastų genomas yra daugiau nei 10 kartų mažesnis už cianobakterijų.

**Proteobakterijų ir mitochondrijų genomų palyginimas.** Kaip minėta, augalinėje ląstelėje aptinkama nuo 50 iki 2000 mitochondrijų, kiekvienoje jų

nuo 1 iki 100 genomo kopijų (Игамбуердиев, 2000). Stuomeninių augalų mitochondrijų genomas turi dvi savybes: didelį genomą ir mažą genų skaičių (Nakazono, Hirai, 1993; Tian et al., 2006). Be to, mitochondrinio genomo dydis labai skiriasi ne tik tarp skirtingų augalų šeimų, bet net vienos šeimos viduje, kartais iki 5-10 kartų (Gray et al., 1999; Mackienze, McIntosh, 1999; Игамбуердиев, 2000). Pastaruoju metu sekvenuota daug pilnų mtDNR sekų (2 lentelė). Tame tarpe keletą magnolijūnų augalų, įskaitant keturis magnolijainius: vairenį (Unseld et al., 1997), cukrinį runkelį (Kubo et al., 2000), rapsą (Handa, 2003), tabaką (Sugiyama et al., 2005) bei du lelijainius: ryžius (Notsu et al., 2002) ir kukurūzus (Clifton et al., 2004). Vairenio mitochondrinio genomo seka (2 lentelė) yra trečdalis bakterinio genomo dydžio ir koduoja tik 4 % baltymų (32 palyginti su 834).

**2 lentelė.** Mitochondrijų ir  $\alpha$ -proteobakterijų genomų dydžio palyginimas

Genomas	Sekos ilgis, kbp	Baltymus koduojančių genų skaičius	Literatūros šaltinis
<i>Bartonella henselae</i>	<2000	1600	Berg, Kurland, 2000
<i>R. prowazekii</i>	1111,523	834	Andersson et al., 1998
<i>Reclinomonas</i>	69,034	63	Lang et al., 1997
mt <i>Marchantia</i>	186,608	41	Oda et al., 1992
mt <i>Nicotiana</i>	430,597	36	Sugiyama et al., 2005
mt <i>Arabidopsis</i>	366,924	31	Unseld et al., 1997
mt <i>Oryza</i>	490,520	35	Notsu et al., 2002
mt <i>Brassica</i>	221,853	34	Handa, 2003
mt <i>Beta</i>	368,799	29	Kubo et al., 2000
mt <i>Zea</i>	569,630	33	Clifton et al., 2004

Žinoma, kad kaip ir bakterijų genome, dauguma mtDNR yra žiedinės struktūros (Bock, 2006). Tačiau pastaraisiais metais literatūroje (Gray et al., 1999; Sugiyama et al., 2005) aptinkama nuorodų, kad šiame organoide egzistuoja ir linijinė mtDNR. Kaip ir chloroplastuose, visų eukariotų mitochondrijose mtDNR sudaro nukleoidus su specifiniais baltymais (Suzuki et al., 1992; Kuroiwa et al., 1994; Sakai et al., 2004). Apskritai, morfologinių, biocheminių ir genetinių tyrimų rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad organoidų nukleoidai nėra bakterijų rudimentas, o kompleksinė sistema,

nusistovėjusi per organoidų ir ląstelės branduolio genomų sąveiką evoliucijos eigoje (Sakai et al., 2004).

***Genomų transformacijos – genų migracija tarp organoidų augalinėje ląstelėje.*** Kaip rodo organoidų ir bakterijų genomų palyginamosios analizės duomenys, chloroplastų ir mitochondrijų genetinis aparatas yra redukuotas ir koduoja tik dalį genų, lyginant su bakterijų iš kurių jie kilę genomu: nuo 2 iki 10 % chloroplastuose ir <1 % mitochondrijose (Martin, Herrmann, 1998; Race et al., 1999; Berg, Kurland, 2000; Mache, Lerbs-Mache, 2001; Martin et al., 2002). Žinoma, jog evoliucijos eigoje bakterijų genomas keitėsi trimis keliais: 1 – kai kurie genai, kodavę baltymus, būtinus laisvai gyvenusių ląstelių egzistavimui buvo visam laikui prarasti, 2 – dauguma genų buvo perkelti į branduolio genomą, šių genų produktai tranzitinių peptidų pavidalu grįžta atgal į organoidus, 3 – tik maža dalis genų liko pačiuose organoiduose: 50-200 baltymus koduojančių genų plastidėse, 5-60 – mitochondrijose (Martin, Herrmann, 1998; Race et al., 1999; Berg, Kurland, 2000). Taigi, augalinėje ląstelėje chlDNR ir mtDNR atsirado paveldėtu ir įgytu būdu (Gray et al., 1999; Martin et al., 2002). Paveldėta genomo dalis – tai bakterinio protėvio palikimas. Įgyta genomo dalis apspręsta evoliucijos eigoje vykusio genų per(si)kėlimo tarp branduolio ir abiejų organoidų genomų tarpusavyje (Gray et al., 1999; Sato, 2002; Brown et al., 2001; Bock, 2006 ir kt).

Neseniai įvairių taksonominių grupių augalų branduoliuose aptiktos chlDNR ir mtDNR homologinės sekos: dviejų tipų plastidžių ir dviejų tipų mitochondrijų (Bock, 2006). Atlikta 25000 baltymus koduojančių vairo genų bioinformatinė analizė parodė, kad maždaug 4500 iš jų, t.y. daugiau kaip 18 % visų branduolio genų yra cianobakterijų kilmės (Martin et al., 2002). Nustatyta ir tai, kad ne visi perėjusių iš plastidžių į branduolį genų produktai grįžta atgal į plastidžių kompartmentą, bet gali funkcionuoti citozolyje ar mitochondrijose (Martin et al., 2002). Parodyta, kad masinis genetinės informacijos persikėlimas taip pat vyko ir mitochondrijų evoliucijos eigoje (Knoop, 2004; Bock, 2006). Atlikus DNR skaidulų FISH analizę, vairo chromosomose identifikuotas gigantiškas mitochondrinis intarpas iš 620 kbp

(Stupar et al., 2001). Šio intarpo dydis yra daug didesnis nei visas vairo mitochondrijos genomai, kurių sudaro 367 kbp (Unsold et al., 1997). Ryžių branduolyje aptikta apie 13,4 % mitochondrinio geno (Notsu et al., 2002). Taigi, pateikta medžiaga rodo, kad dalis organoidų DNR migravo iš endosimbionto geno į ląstelės šeimininkės branduolį.

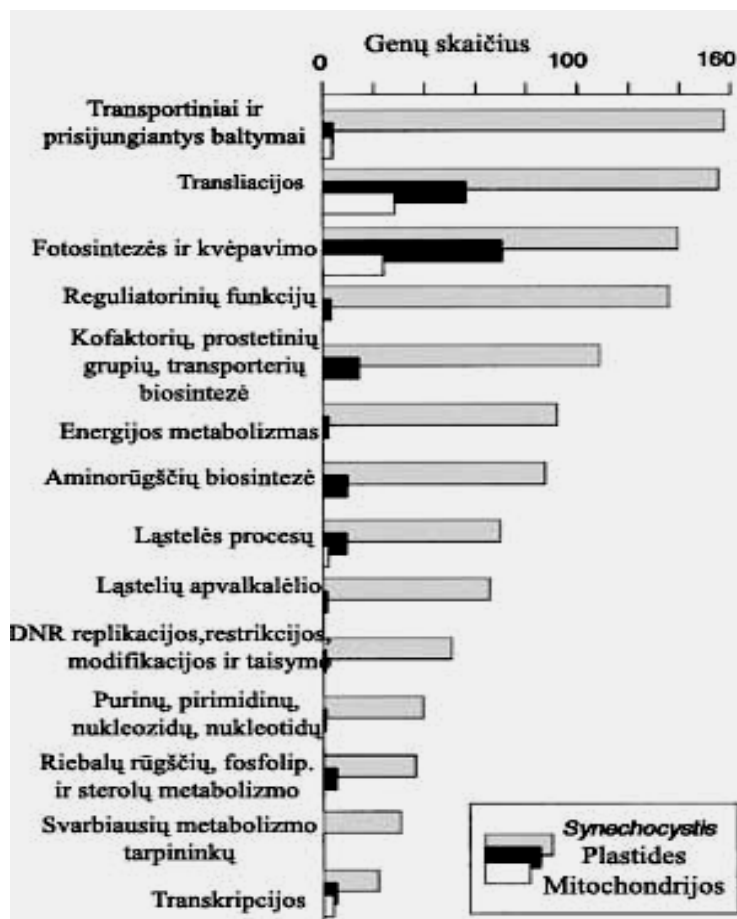
Tai, kad DNR galėjo migruoti ir tarp organoidų, labai akivaizdžiai parodo chloroplastų DNR sekų egzistavimas aukštesniųjų augalų mitochondrijose (Nakazono, Hirai, 1993; Gray et al., 1999). Atlikus hibridizacijos analizę, panaudojant ryžių chlDNR ir mitDNR klonų banką, ryžių mtDNR identifikuota 16 chloroplastinių fragmentų (Nakazono, Hirai, 1993). Taigi, apie 19 % ryžių chlDNR yra persikėlę į mtDNR ir sudaro apie 6 % ryžių mitochondrinio DNR sekų (Nakazono, Hirai, 1993; Notsu et al., 2002). Stumėninių augalų mitochondrijų genomai taip pat turi sekas, kilusias iš augalų branduolio geno (Marienfeld et al., 1999). Nustatyta, kad ryžių mitochondrijų genome daugiau kaip 13,4 % sekų yra branduolio kilmės (Notsu et al., 2002).

Chloroplastų genome aptinkamos ne tik branduolio, bet ir mitochondrijų genų kopijos (Игамбуердиев, 2000; Sato 2002). Parodyta, kad plastidžių genomų sekos turi 6,3 % mitochondrinio geno (Notsu et al., 2002).

***Organoidų genomuose „išlaikytų“ genų ryšys su funkcija.*** Kaip rodo ankstesniuose poskyriuose pateikti duomenys, endosimbiozės keliu įsitvirtinus cianobakterijoms ir  $\alpha$ -proteobakterijoms augalo ląstelėje, jų genomai lyginant su laisvai gyvenančiais protėviais, sumažėjo. Šių dienų induočių augalų chlDNR koduoja: keturių tipų rRNR (16, 23, 4,5 ir 5S), visų (30-33) tipų tRNR ir daugiau nei 72 baltymus: prokariotinę RNR polimerazę, transliacijos aparato baltymus – apie 20 ribosominių baltymų (Shinozaki et al., 1986; Mache, Lerbs-Mache, 2001). mtDNR taip pat yra užkoduota dalis organoido transliacijos sistemos: visada mažasis ir didysis rRNR subvienetai, dažnai pilnas arba dalinis tRNR komplektas, rečiau 5S rRNR (Gray et al., 1999; Игамбуердиев, 2000).

Palyginus (3 pav.) laisvai gyvenusių cianobakterijų,  $\alpha$ -proteobakterijų ir organoiduose esančius baltymus koduojančius genus buvo nustatyta, kad tiek

plastidės, tiek mitochondrijos neabejotinai išlaikė genus dviejų svarbiausių funkcinę kategorijų – fotosintezės ir kvėpavimo procesuose dalyvaujančių bioenergetinių membranų baltymų ir baltymų įtrauktų į jų genų ekspresiją (Kaneko et al., 1996; Race et al., 1999).



**3 pav.** Organoidų genų tipai ir jų funkcinės kategorijos (Martin, Herrmann, 1998).

Taigi, didžioji dalis chloroplastuose sintetinamų baltymų dalyvauja fotosintezės procesuose: apie 40 tilakoidų membranų baltymų, dalyvauja elektronų pernešimo grandinės komplekse (Pillen et al., 1996), o mtDNR koduojami baltymai įeina į kvėpavimo elektronų pernašos sistemas ir ATP sintazės kompleksą bei dalyvauja citochromo c sintezėje.

Daugumai chloroplastų ir mitochondrijų funkcijų atlikti reikalingi branduolio genome koduojami baltymai (Martin, Herrmann, 1998; Race et al., 1999; Gray et al., 1999).



*Skirtingų genomų sąveikos augimo procesuose.* Augalo augimo bei atsako į aplinkos signalus metu organoidų dalijimasis, vystymasis ir pilnas funkcionavimas ląstelėje priklauso nuo branduolio, chloroplasto ir mitochondrijos genų ekspresijos koordinavimo (Glick, Sears, 1994; Leon et al., 1998; Bowsher, Tobin, 2001; Brown et al., 2001; Surpin et al., 2002). Literatūroje nurodoma, kad genų ekspresijos koordinacija tarp branduolio ir organoidų yra svarbiausia organoidų formos ir funkcijų kontrolei, tuo tarpu organoidų diferenciacijai svarbus vaidmuo tenka transkripcijos reguliavimo procesams (Bowsher, Tobin, 2001).

Chloroplastų genų ekspresija visų pirma yra reguliuojama posttranskripciniame lygmenyje. Nors chloroplastuose aptinkamos kai kurios prokariotų genų ekspresijos ypatybės, dauguma jų RNR ir baltymų sintezės genetinių mechanizmų yra nauji, atsiradę evoliucijos eigoje (Stern et al., 1997).

Kadangi chloroplasto genomas stokoja aiškių regulatorinių genų, matomai, chloroplastų genų ekspresija yra moduluojama regulatorinių baltymų, koduojamų branduolyje (Fisk et al., 1999; Brown et al., 2001; Surpin et al., 2002).

Plastidės taip pat turi reikšmės branduolio genų ekspresijai, per iš chloroplasto einančius signalus, veikiančius branduolio koduojamų genų transkripcijos reguliaciją (Brown et al., 2001). Nors žinoma, kad dėl plastidžių poveikio ekspresuojamas nemažas skaičius branduolio genų, tačiau signalinės molekulės bei mechanizmai įtraukti į šiuos grįžtančius atgal signalus mažai išaiškinti (Brown et al., 2001; Nakano et al., 2001). Parodyta, kad per atgal grįžtančius signalus perduodamos funkcinės plastidžių būsenos, nuo kurių priklauso raiška visos eilės branduolio genų, koduojančių chloroplastuose lokalizuotus baltymus (Surpin et al., 2002).

Aiškinantis, kokie signalai ir molekuliniai mechanizmai galėtų įtakoti kombinuotą chloroplasto ir branduolio genomų ekspresiją, dėmesys kreipiamas ir į galimą kai kurių augalų hormonų (citokininų, brasinolidų) dalyvavimą (Nakano et al., 2001). Deja šiuo metu, plastidžių genų transkripcijos

hormoninė reguliacija dar mažai išnagrinėta. Remiantis citokininų dalyvavimo chloroplastų genų ekspresijoje rezultatais, manoma, kad ji yra sudėtingesnė nei branduolio genų ekspresija (Lyukevich et al., 2002). Tai susiję su daugelio plastidžių baltymų dviguba genetinė kontrole ir tuo, kad chloroplastai atskirti nuo citoplazmos dviguba membrana (Lyukevich et al., 2002).

Kaip jau minėta, induočių augalų mitochondrijos taip pat turi genetinę sistemą su savitu genomu, transkripcijos ir transliacijos procesais, tačiau koduoja dar mažesnę genetinės informacijos, reikalingos jų biogenezei ir funkcijoms dalį, nei chloroplasto genomas. Dauguma jų baltymų koduojama branduolio genome (Leon et al., 1998; Bowsher, Tobin, 2001; Brown et al., 2001). Kaip ir plastidėse, aplinkos signalai gali būti perduodami tiesiogiai į mitochondriją arba per branduolio siunčiamą signalą. Grįžtančiu atgal signalu iš mitochondrijos į branduolį gali būti inicijuojama raiška branduolio genų koduojančių mitochondrijoje lokalizuotų (funkcionuojančių) baltymų. Aktyvuoti branduolio genai grąžina į organoidus funkcionalius baltymus (Blanchard, Lynch, 2000).

Be to, plastidės gali paveikti mitochondrijų genų ekspresiją (Bowsher, Tobin, 2001) ir atvirkščiai (Mackenzie, McIntosh, 1999; Giegé, Brennicke, 2001). Taigi visumoje tiek chloroplastų, tiek mitochondrijų genomas turi integruotis su dviem kitais genomais, esančiais augalų ląstelėse (Mackenzie, McIntosh, 1999; Giegé, Brennicke, 2001; Sakai et al., 2004).

### **1.3. Organoidų baltymai: sintezė ir pernaša**

Žinoma, kad vairenio ląstelių mitochondrijose yra lokalizuoti – 36 %, plastidėse – 17 % visų ląstelės baltymų (Li et al., 2006). Tik dalis jų yra koduojami pačių organoidų genomuose (Martin et al., 2002; Tian et al., 2006). Kita dalis branduolio koduojamų ir citoplazmoje sintetinamų baltymų yra įnešama (Leon et al., 1998; Mackenzie, McIntosh, 1999; Bowsher, Tobin, 2001; Surpin et al., 2002), todėl trumpai aptarsime baltymų sintezės organoiduose ir jų įnešimo į organoidus ypatumus.

Baltymų sintezė augalinėje ląstelėje vyksta keliuose skirtinguose kompartmentuose: citoplazmoje, plastidėse ir mitochondrijose. Sintetinamų baltymų skaičius ir įvairovė šiuose trijuose kompartmentuose labai skiriasi. Apie 75 % ląstelės baltymų (daugiau kaip 20 000 skirtingų baltymų) sintetinama citoplazmoje, kur yra transliuojama nuo branduolio genomo transkribuota rRNR. Fotosintetiškai aktyviose ląstelėse apie 20 %, t.y. nuo 60-100 baltymų yra sintetinama chloroplastuose. Mažesnis kiekis baltymų ~2-5 % sintetinami mitochondrijose. Augalų mitochondrijose paprastai sintetinama tik tai keletas baltymų (Martin, Herrmann, 1998; Spermulli, 2003).

Magnolijainių augalų plastidžių genomas yra transkripuojamas trijų skirtingų RNR polimerazių: pačiame organoide koduojamos eubakterinio tipo RNR-polimerazės (PEP) ir 2 branduolyje koduojamų bakteriofago tipo RNR-polimerazių (NEP) (Giegé, Brennicke, 2001; Mache, Lerbs-Mache, 2001; Azevedo et al., 2008). Mitochondrijose transkripciją katalizuoja mažiausiai dvi branduolio koduojamos, bakteriofago tipo RNR-polimerazės (Giegé, Brennicke, 2001; Azevedo et al., 2008).

Taigi, augalų ląstelės turi tris skirtingus baltymų sintezės mechanizmus. Skirtinguose ląstelės kompartmentuose – citoplazmoje, chloroplastuose ir mitochondrijose funkcionuojantys transliacijos mechanizmai turi savitumų (Kozak, 1983; Sugiura et al., 1998). Nustatyta, kad augalų citoplazmos ribosomos yra didesnės, nei bakterinės (Leaver, Harmey, 1976; Kozak, 1983). Jų sedimentacijos konstanta – 80S, susideda iš didžiojo 60S ir mažojo 40S subvienetų. Daugelis šių ribosomų turi keturias RNR rūšis: 5S, 5,8S, 18S ir 25-28S. Chloroplastų ribosomos yra panašios į bakterijų savo dydžiu, topografija, RNR komponentais ir baltymų sudėtimi. Bakterijų ir chloroplastų ribosomų sedimentacijos konstanta – 70S, susideda iš didžiojo 50S ir mažojo 30S subvienetų. Bakterinės ribosomos turi tris pastovius RNR komponentus: 5S, 16S ir 23S. Chloroplastų ribosomų RNR komponentai taip pat yra panašūs į bakterijų – turi 5S, 16S ir 23S rRNR molekules (Bohnert, Gordon, 1980). Bakterijų ir plastidžių ribosomos skiriasi tuo, kad plastidėse egzistuoja papildoma mažoji 4,5S rRNR molekulė (Kozak, 1983).

Mitochondrijų ribosomų dydis yra nuo 77S iki 80S (Leaver, Harmey, 1976; Kozak, 1983). Literatūroje nurodoma, kad jų dydžiai tarp skirtingų augalų rūšių gali nežymiai svyruoti (Kozak, 1983). Kaip ir bakterijų bei chloroplastų, augalų mitochondrijų ribosomos, skirtingai nuo gyvūnų ir grybų mitochondrijų ribosomų, turi 5S rRNR (Leaver, Harmey, 1976; Kozak, 1983). Bakterijų, chloroplastų bei stuomeninių augalų mitochondrijų ribosomose nėra 5,8S rRNR ekvivalento, aptinkamo eukariotinėse citoplazmos ribosomose, tai paremia panašumą tarp mitochondrijų, chloroplastų ir prokariotų ribosomų struktūrų (Leaver, Harmey, 1976).

Kaip jau minėta, skiriasi citoplazmoje bei chloroplastuose ir mitochondrijose vykstantys baltymų transliacijos mechanizmai. Kaip ir bakterijose mitochondrijose ir chloroplastuose pirmoji baltymų sintezės transkripto aminorūgštis yra formilmetioninas [fMet], o ne metioninas [Met], kuris yra eukariotų branduolio koduojamų baltymų pirmoji aminorūgštis (Leaver, Harmey, 1976; Li et al., 2000).

Taigi, tik maža dalis baltymų yra sintetinama pačiuose organoiduose, didžioji dalis – koduojama branduolio genu, sintetinami citoplazmos ribosomose ir sudėtingomis, daugiakomponentinėmis sistemomis transportuojami į organoidus (Зайцева и др., 2000; Kuchler, Soll, 2001; Robinson et al., 2001; Zhang, Glaser, 2002 ir kt.). Vieni citoplazmoje sintetinami baltymai „įsistato“ į organoido apvalkalėlio membranas, kiti keliauja į stromą/matriksą, treči „įsistato“ į tilakoidų/kristų membranas arba, perėję per jas, atsiduria vidinėje membranų „maišo“ erdvėje (Caliebe, Soill, 1999; Зайцева и др., 2000; Bauer et al., 2001; Gutensohn, et al., 2006) ir gali atlikti savo funkcijas augalinėje ląstelėje.

Kaip jau minėta, be fotosintezės ir kvėpavimo šie organoidai atlieka ir kitas svarbias funkcijas, dalyvaujant savo pačių genomuose užkoduotiems ir iš citoplazmos atneštieiems branduolio koduojamiems baltymams. Kyla klausimas, ar juose gali būti lokalizuoti ir funkcionuoti fitohormonus atpažįstantys baltymai receptoriai, analogiškai funkcionuojantiems branduolyje bei susiję su fitohormonų veikla. Todėl prieš pereidami prie fitohormonų baltymų-

receptorių, pirmiausiai trumpai apžvelgsime literatūroje aptiktus duomenis apie pačių fitohormonų egzistavimą organoidų pirmtakuose ir chloroplastuose bei mitochondrijose.

#### 1.4. Fitohormonai bakterijose

Literatūroje nurodoma, kad panaudojant biologinius, biocheminius, šiuolaikinius fiziko-cheminius, genetinius metodus parodyta, kad įvairios bakterijų kultūros sintetina fitohormonus: auksinus, citokininus, giberelinus, abscizo rūgštį, etileną ir išskiria juos į supančią aplinką – kultūrinę terpę (Wichner, Libbert, 1968; Anisimovienė, 1974; Merkys et al., 1974; Costacurta, Vanderleyden, 1995; Markovački, Milić, 2001; Karadeniz et al., 2006; Tsavkelova et al., 2007 ir kt.). Pavyzdžiui, planktono bakterijos sintetina septynias citokinino tipo medžiagas (Donderski, Głuchkowska, 2000), *Azospirillum lipoferum* kultūrose identifikuotos trys giberelino aktyvumą turinčios medžiagos – GR<sub>3</sub>, GR<sub>1</sub> ir *izo*-GR<sub>3</sub> (Karadeniz et al., 2006). Kadangi mūsų darbo tikslas susietas su IAR veikimo tyrimais, detaliau aptarsime tik šio fitohormono ištyrimą bakterijose – chloroplastų ir mitochondrijų pirmtakuose.

Ši savybė būdinga laisvai gyvenančioms, epifitinėms, simbiotinėms ir patogeninėms augalų bakterijoms (Wichner, Libbert, 1968; Anisimovienė, 1974; Merkys et al., 1974; Costacurta, Vanderleyden, 1995; Markovački, Milić, 2001; Karadeniz, 2007; Tsavkelova et al., 2007 ir kt.). Mikroorganizmuose, kaip ir augaluose, Trp laikomas pagrindiniu IAR biosintezės pirmtaku (Wichner, Libbert, 1968; Costacurta, Vanderleyden, 1995; Halda-Alija, 2003), kurio pridėjimas į terpę padidina auksino produkciją (Asghar et al., 2002). Bakterijose aptinkami du skirtingi IAR biosintezės keliai iš triptofano (Costacurta, Vanderleyden, 1995; Patten, Glick, 1996). *Rhizobium phaseoli* kultūros laukinio tipo padermės išvalytų ekstraktų, analizė DCh-MS metodu, parodė ne tik IAR, bet ir IE, indolil-3-aldehido ir IM buvimą. Panaudojant žymėtus (<sup>3</sup>H-, <sup>14</sup>C-, <sup>2</sup>H-) bakterijų substratus parodytas virsmas Trp → IE, IAR ir IM; IE → IAR ir IM; IAR → IM (Ernsten et al., 1987). Ar vyksta IAR metabolizmo procesai bakterijų ląstelėse tiksliai nėra žinoma,

tačiau literatūroje aptikta nuoroda, kad kai kurios bakterijos, pvz.: *Pseudomonas* ir *Agrobacterium*, gali konjuguoti laisvą auksiną bei hidrolizuoti konjuguotas auksinų formas (Costacurta, Vanderleyden, 1995). Kiek daugiau duomenų aptikta auksino katabolizmo vyksmo bakterijose klausimais. Kai kurios bakterijų kultūros, kaip antai *Bacillus mesentericus* V-64, gali ardyti IAR, esant didelei jos koncentracijai terpėje (Anisimovienė, 1974). Išskirta keletas bakterijų, galinčių katabolizuoti IAR (Leveau, Lindow, 2005). *Bacillus mesentericus*, *Bacillus subtilis* 7 mikroorganizmų kultūrose rezervinių IAR formų – sujungtų su paprastaisiais ar sudėtingais baltymais, neaptikta (Anisimovienė, 1974; Merkys et al., 1974), tačiau Vande Broek ir kt. (1999) manymu, baltymai įtraukti į IAR signalo priėmimą ir perdavimą gali egzistuoti ne tik stuomeniniuose augaluose, bet ir bakterijose.

Šiuo metu nustatyta, kad chloroplastų pirmtakai cianobakterijos produkuoja IAR, GR, CK, ET ir jazminų rūgštį (Sergeeva et al., 2002; Bergman, Osborne, 2002; Rodriguez et al., 2006; Tsavkelova et al., 2007). Ištirus 34 cianobakterijų padermes, parodytas 38 % laisvai gyvenančių (*Nostoc* ir kitų) ir 83 % (*Nostoc*) simbiotinių cianobakterijų padermių gebėjimas sintetinti IAR, kaupiti ją ir iškirti į terpę (Sergeeva et al., 2002).

**3 lentelė.** Cianobakterijų, augintų Trp turinčioje ir neturinčioje terpėse, susintetinti endogeninės ir egzogeninės IAR kiekiai (Sergeeva et al., 2002)

Cianobakterijų štamai	Endogeninė IAR		Egzogeninė IAR	
	(pmol mg <sup>-1</sup> Chl <i>a</i> )		(pmol mg <sup>-1</sup> Chl <i>a</i> )	
	-Trp	+Trp	-Trp	+Trp
<b>Laisvai gyvenančios:</b>				
<i>Gleotheca</i>	3.5 ± 0.6	3.3 ± 0.3	1.2 ± 0.5	1.2 ± 0.6
<i>Plectonema</i>	12.8 ± 0.5	14.9 ± 0.2	12.6 ± 0.6	10.5 ± 0.5
<i>Nostoc</i> 268	10.1 ± 0.4	30.9 ± 0.8	5.2 ± 0.3	9.1 ± 0.4
<i>Nostoc</i> 7120	15.3 ± 0.8	21.1 ± 0.5	9.9 ± 0.6	12.6 ± 0.4
<i>Nostoc</i> 6720	6.0 ± 0.4	20.8 ± 1.1	11.3 ± 0.7	19.5 ± 0.3
<b>Simbiotinės:</b>				
<i>Nostoc</i> Pc	16.2 ± 0.5	26.8 ± 0.7	23.5 ± 0.9	25.7 ± 1.2
<i>Nostoc/Anabena</i>	12.5 ± 0.5	20.7 ± 1.4	10.1 ± 0.8	18.6 ± 1.1
<i>Nostoc</i> 73102	24.2 ± 1.1	42.2 ± 1.5	19.9 ± 0.7	34.0 ± 1.2
<i>Nostoc</i> Chr 894	7.2 ± 0.6	37.6 ± 1.6	15.2 ± 0.8	24.7 ± 0.9
<i>Nostoc</i> 9229	14.9 ± 0.6	28.5 ± 0.7	8.2 ± 0.3	23.1 ± 0.6

Analizuojant IAR kiekius ir būklę skirtingose cianobakterijų padermėse (3 lentelė) nustatyta, kad laisvai gyvenančios cianobakterijos turi mažesni endogeninės IAR kiekį ir jos išskiria mažiau, nei simbiotinės cianobakterijos. Simbiotinių cianobakterijų, kaip ir kitų su augalais sąveikaujančių prokariotų, naudingų ar patogeninių, gebėjimas sintetinti ir išskirti IAR, gali turėti įtakos augalo endogeniniam hormono lygiui, o tuo pačiu ir pačiam augalui (Glick et al., 1999).

Chloroplastų pirmtakas cianobakterijos, kaip ir kiti mikroorganizmai, geba egzogeninį Trp paversti į IAR. Įvedus triptofano į cianobakterijų kultūras beveik dvigubai padidėja endogeninės IAR kaupimasis, tuo tarpu, IAR išskyrimas į terpę padidėja ne taip smarkiai. Todėl IAR vaidmuo cianobakterijose dar nėra aiškus. Tyrimų rezultatai parodė, kad pagrindinis IAR sintezės kelias, bent jau kai kuriose cianobakterijose, galėtų būti indolil-3-piruvo rūgšties kelias, kadangi pagrindinis šio kelio fermentas (indolin-3-piruvo dekarboksilazė) yra koduojamas *ipdC* geno, o tyrimai parodė, kad *ipdC* genų homologai yra kai kuriose *Nostoc* rūšyse (Sergeeva et al., 2002; Woodward, Bartel, 2005).

### **1.5. Fitohormonai chloroplastuose ir mitochondrijose**

Seniai įrodyta, kad žiedinių augalų organuose ir ląstelėse funkcionuoja fitohormonai: IAR, CK, GR, ABR ir ET (Went, Thimann, 1937; Меркис, 1982; Kende, Zeevaart, 1997). Jie gali būti aptinkami laisvoje būklėje (atitinkamų hormonų molekulių pavidalu) bei įvairių metabolitų: įvairios cheminės sudėties ir struktūros kompleksinių junginių ir/ar ardymo produktų (katabolitų) pavidalu (Merkys et al., 1974; Merkys ir kt., 1977; Cohen, Bandurski, 1982; Anisimovienė, 1994; Benkova et al., 1999; Anisimovienė, Merkys, 2001; Olszewski et al., 2002 ir kt.). Šiuo metu, panaudojus šiuolaikinius fitohormonų analizės ir identifikavimo metodus, pakankamai gerai yra nustatytos fitohormonų koncentracijos bei jų būklė įvairiuose augalų organuose, pagrindinės sintezės vietos ir pirmtakai, metabolizmo keliai ir būdai (Merkys et al., 1974; Cohen Bandurski, 1982; Anisimovienė, 1994; Kende,

Zeevaart, 1997; Woodward, Bartel, 2005; Nováková et al., 2005). Tačiau skirtingų fitohormonų, o taip pat ir jų metabolitų subląstelinės kompartmentacijos klausimai iki šiol lieka tyrimo objektu. Nėra pakankami aišku, kokiuose ląstelės struktūriniuose kompartmentuose vyksta vieno ar kito fitohormono sintezė, taip pat neaiškios fitohormonų persiskirstymo tarp atskirų ląstelės kompartmentų galimybės. Kadangi mūsų tyrimų objektai – chloroplastai ir mitochondrijos, todėl nesigilindami į kitus ląstelės kompartmentus, detaliau apsistosime tik ties fitohormonais juose. Deja, duomenų apie galimą fitohormonų lokalizaciją mitochondrijose aptikome labai mažai (daugelio fitohormonų atveju neaptikome visai), nors kaip jau buvo paminėta, chloroplastų ir mitochondrijų pirmtakai turėjo savybę juos sintetinti, kaupti ir išskirti į supančią terpę (Anisimovienė, 1974; Merkys et al., 1974; Sergeeva et al., 2002; Tsavkelova et al., 2007 ir kt.).

***Citokininiai chloroplastuose.*** Dar 1977 m. S. Swaminathan, RM. Bock tyrimuose, palyginus šviesoje ir tamsoje augintų *Euglena gracilis* laukinių kultūrų ir mutantų padermes, gauti citokininų (izopenteniladenino, 2-metiltiozopentiniladenino, 2-metiltiozopentiniladenozino) lokalizacijos chloroplastų tRNR įrodymai. Vėliau CK buvimas parodytas įvairių rūšių augalų chloroplastų tRNR (Prinsen et al., 1997). Zeatino tipo CK buvimą izoliuotuose špinatų chloroplastuose popieriaus chromatografijos metodu bei sojų pupelių kaliaus tyrimuose parodė J.Davey ir J.Van Staden (1981), tačiau šiuose tyrimuose nebuvo pakankamai gerai įrodytas chloroplastų intaktiškumas bei gautų preparatų grynumas – neužterštumas kitais ląstelės kompartmentais. Dėl šių priežasčių rezultatais buvo abejojama. Galutinai CK buvimas chloroplastuose buvo patvirtintas – SCh-MS metodu (Benkova et al., 1999). Intaktiniuose chloroplastuose, išskirtuose iš subrendusių bei jaunų tabako ir kviečių lapų aptikti endogeniniai citokininiai, įskaitant laisvas bazines, ribozidus, ribotidus ir *N*-gliukozidus, kas rodo, kad chloroplastai turi pilną spektrą CK ir fermentus, būtinus jų metabolizmui (Benkova et al., 1999). Taip pat šiuose tyrimuose parodyta, kad jaunuose lapuose CK buvo daugiau, nei subrendusiuose (Benkova et al., 1999), todėl galima daryti išvadą, kad



fitohormono kiekis tam tikroje augalo zonoje priklauso nuo ląstelių augimo fazės.

Remiantis citokininų egzistavimu tRNR sekoje, buvo pasiūlytas citokininų veikimo baltymų sintezės reguliacijoje modelis (Romanov, 1990). Pagal jį citozolinis CSB gali izoliuoti šias tRNR susijungdamas su jų CK, kas inhibuoja baltymų translaciją. Sumažėjus laisvo citokinino koncentracijai ląstelėje atsiranda konkurencija tarp tRNR ir citokinino sąveikaujančio su CSB. Tokiomis sąlygomis tRNR gali būti išlaisvinama nuo CSB, kas inicijuoja baltymo sintezės inhibicijos sumažėjimą (Romanov, 1990). Be to, buvo pripažinta, kad *t*-zetino pirmtakas izoprenoido biosintezėje yra plastidžių kilmės (Kasahara et al., 2004). Taip pat parodyta, kad augalai turi du skirtingus izoprenoidų sintezės kelius skirtinguose ląstelės kompartmentuose (Nordström et al., 2004; Sakakibara et al., 2005): MEP (metileritritolfosfato) kelias plačiai aptinkamas bakterijų karalystėje ir augalų plastidėse ir MVA (mevalonato) kelias dažniausiai aptinkamas eukariotų citozolyje.

Parodyta, kad šių augalų hormonų subląstelinė kompartmentacija turi svarbų vaidmenį hormonų homeostazei, pvz.: CK-*O*-gliukozidai kaupiasi vakuolėse, tačiau *t*-Zeatin-*O*-gliukozidas laikinai gali būti akumuliuojamas chloroplastuose, kur jis gali atlikti specifines biologines funkcijas (Kiran et al., 2006). Manoma, kad chloroplastai CK metabolizmo reguliavimo atžvilgiu yra dalinai nepriklausomi organoidai. Citokininų metabolizmas chloroplastuose turi įtakos jo funkcijoms, tai lemia skirtinga individualių citokininų metabolitų kompartmentacija – CK-gliukozidai, kaip jau minėta, nedažnai kaupiami chloroplastuose, tuo tarpu aktyvios citokininų formos bazės ir ribozidai dažnai randami juose (Benkova et al., 1999; Polńska et al., 2007).

Nurodoma, kad nemažai atsakų į CK (endogeninį ir egzogeninį) lapų ląstelėse yra susiję su chloroplastais: jų biogeneze, fotomorfogeneze, transkripcijos procesais (Teyssandier de la Serve et al., 1985; Parthier, 1989; Jayabaskaran et al., 1990; Chory et al., 1994; Kusnetsov et al., 1994; Schmölling et al., 1997; Polńska et al., 2004; 2007; Kiran et al., 2006).

***Abscizo rūgštis chloroplastuose.*** ABR buvimu chloroplastuose neabejojama. Tai parodyta DCh-MS metodu (Railton et al., 1974) ir citochemiškai (Pastor et al., 1995). Nustatyta, kad nuo 75 iki 90 % lapų ląstelėse aptinkamos ABR lokalizuota chloroplastuose (Loveys, 1977; Heilmann et al. 1980). Be to, bandymų atliktų su izoliuotais chloroplastais duomenys parodė, kad ABR kaupimasis chloroplastuose priklauso nuo  $\Delta pH$  tarp citoplazmos ir chloroplastų stromos (Heilmann et al. 1980). Tuo tarpu ABR sintezės chloroplastuose klausimas ilgą laiką buvo diskutuotinas. 1974 m. buvo parodyta (Milborrow, 1974), kad ABR biosintezė gali vykti chloroplastuose ar leukoplastuose iš žymėtos mevaloninės rūgšties (MVR), be to lizuoti chloroplastų preparatai turi didesnę MVR įsijungimo į ABR greitį ir, tai priklauso nuo chloroplastų apvalkalėlio pralaidumo MVR. Tačiau W.Hartung ir kt. (1981) nuomone chloroplastų apvalkalėlis nėra pralaidus MVR; ir ABR sintezė iš MVR chloroplastuose negalima. Šią prielaidą parėmė ir K.Kreuz, H.Kleining (1981), kurie nustatė, kad chloroplastai stokoja fermentų (MVR kinazės, fosfo-MVR kinazės ir difosfo-MVR kinazės) pateikė hipotezę, kad terpenoidų sintezės tarpininkas yra izopentenilpirofosfatas, susiformuojantis citoplazmoje ir patenkantis į plastides prieš virsmą į aukštesnius terpenoidus.

Vėlesni BV.Milborrow bei HS.Lee (1998) darbų rezultatai parodė, kad keletas ABR biosintezės kelių (iš MVR, piruvato, izopentenilo difosfato) gali vykti chloroplastuose. Didelė dalis lapų ABR susidaro chloroplastuose triozijų-piruvato kelyje, o įsijungimas MVR įvyksta po aktyvavimosi citoplazmoje ir vėlesnio tarpininko įnešimo į plastides (Milborrow, Lee, 1998).

Galimas ABR poveikis chloroplastams ištirtas silpnai. Žinoma, jog egzogeninė ABR žymiai sumažina karščio žalą chloroplastų ultrastruktūrai (Ivanov et al., 1992) bei, kad dėl jos poveikio keičiasi daug svarbių kinetinių parametru  $O_2$  susidarymo reakcijose, vykstančiose chloroplastuose *in vivo* (Maslenkova et al., 1989). Taip pat manoma, kad ABR – vienas iš faktorių, suteikiantis apsauginį mechanizmą neaklimatizuotiems daigams, o taip pat

apsaugo mitochondrijų antioksidacinius fermentus nuo negrįžtamos oksidacinės žalos (Prasad et al., 1994).

***Giberelinai chloroplastuose.*** Chloroplastuose nustatytas ir giberelinų tipo aktyvumas (Stoddart, 1968, Frydman, Wareing, 1973), kuris skiriasi nuo bendro lapų ekstrakto aktyvumo. Giberelinai (daugiausiai GR<sub>9</sub> ir GR<sub>4</sub>) gali būti ekstrahuojami iš chloroplastų membranų preparatų (Browning, Saunders, 1977).

Neseniai buvo izoliuoti ir charakterizuoti daugelis genų, koduojančių fermentus dalyvaujančius GR biosintezėje bei nustatyti pradiniai katabolizmo etapai. Todėl GR biosintezė induočiuose augaluose gali būti padalinta į tris pagrindines dalis pagal fermentų tipą ir jų subląstelinę lokalizaciją: proplastidėse, endoplazminiame tinkle ir citoplazmoje (Hedden, Kamiya, 1997; Radi et al., 2006). Biocheminiai tyrimai parodė, kad ent-kaureno sintezė iš pirmtako geranylgeranyldifosfato (GGDP) vyksta proplastidėse, kadangi fermentai CPS – ent-kopalyldifosfatsintazė ir KS – ent-keuresintazė yra lokalizuoti ir aktyvūs kviečių daigų besivystančiuose chloroplastuose ir moliūgų endospermo leukoplastuose. Subrendusiuose chloroplastuose šių fermentų aktyvumas mažas (Sun, Kamiya, 1994; Aach et al., 1995).

Tiriant galimą GR poveikį chloroplastams parodyta, kad egzogeninis GR indukuoja *Marchantia polymorpha* chloroplastų ultrastruktūros pasikeitimus (Albertine et al., 1976).

***Etilenas chloroplastuose.*** Skirtingai, nei anksčiau aptartų fitohormonų aptinkamų chloroplastuose duomenų apie etileno buvimą, sintezę ar metabolizmo procesus neaptikome. Tačiau etileno poveikis chloroplastams ir mitochondrijoms buvo tiriamas. Elektroniniu mikroskopu buvo nustatyta (Shimokawa et al., 1978), kad etilenu paveiktuose mandarinų vaisiuose mažėja chloroplastų skaičius, greitai redukuojasi chloroplastų dydis, vidinė chloroplastų membranų sistema skyla anksčiau nei kitos ląstelės struktūros. Dvigubo sluoksnio lamelių ir granų membranų struktūra degraduoja ir membranų sluoksniai tampa atskiri. Dėl etileno poveikio didėja chloroplastų proteolizė bei redukcija chlorofilo esančio PSI ir PSII sistemose tiek tamsoje,

tiek šviesoje, o taip pat prarandamas fotosintetinis aktyvumas (Choe, Whang, 1986). Parodyta, kad bulvių gumbus paveikus etilenu padidėja kvėpavimo intensyvumas, tai siejama su įvairių mitochondrijų fermentų (citochromo c, DNR ir RNR polimerazių) aktyvumo suintensyvėjimu (Apelbaum et al., 1984).

**Auksinas chloroplastuose.** Literatūroje yra nedaug duomenų apie endogenio auksino pasiskirstymo vietą ląstelėje. Pirmą kartą biocheminiais metodais endogeninės IAR buvimas chloroplastuose parodytas iš saulėgražų lapų išskirtuose šių organoidų subląstelinės frakcijos preparatuose (Fregeau, Wightman, 1983). Vėliau, tiriant indolo junginių pasiskirstymą tarp chloroplastų ir citozolio tabako ir pušų ląstelėse (Sandber et al., 1990), nustatyta, kad 30-40 % IAR kiekio lokalizuota chloroplastuose, likusi laisvos IAR dalis yra citozolyje. Laisva IAR aptinkta ir iš laukinio bei transgeninio tipo tabako protoplastų išskirtuose chloroplastuose (Sitbon et al., 1993).

Imunocitocheminiu metodu, panaudojant imuno-aukso elektroninę mikroskopiją (Ohmiya, Hayashi, 1992), parodyta subląstelinė IAR lokalizacija įvairaus išsivystymo persikų lapų ląstelėse (4 lentelė; 2 priedas): L1 – mažai diferencijuotų lapų, L2 – visiškai diferencijuotų lapų, kada ląstelės turi kelis didelius chloroplastus, kuriuose nedaug krakmolo granulių, L3 – galutinio dydžio lapų. Koloidinio aukso grūdelių tankis kiekvienoje lapų vystymosi fazėje sutapo su duomenimis gautais DSSCh metodu (Ohmiya, Hayashi, 1992).

**4 lentelė.** Imuno-aukso žymės anti-IAR-N antikūnių ir IAR kiekio pasiskirstymo atskiruose ląstelės kompartmentuose priklausomybė nuo persikų lapų subrendimo (Ohmiya, Hayashi, 1992)

Kompartamentas	L1	L2	L3
Citozolis	4,4±0,5	4,0±0,5	1,1±0,1
Chloroplastai <sup>a</sup>	6,8±1,0 <sup>b</sup>	15,5±1,2	3,5±0,4
Branduolio plazma	5,0±0,5	3,7±0,8	2,2±0,6
Branduolėliai	9,9±1,8	11,3±2,9	1,7±0,8
Mitochondrijos	5,3±1,0	15,4±1,2	3,2±0,6
Ląstelės sienelė	6,8±0,4	5,1±0,6	1,4±0,2
Vakuolė	0,5±0,1	0,4±0,1	0,3±0,1

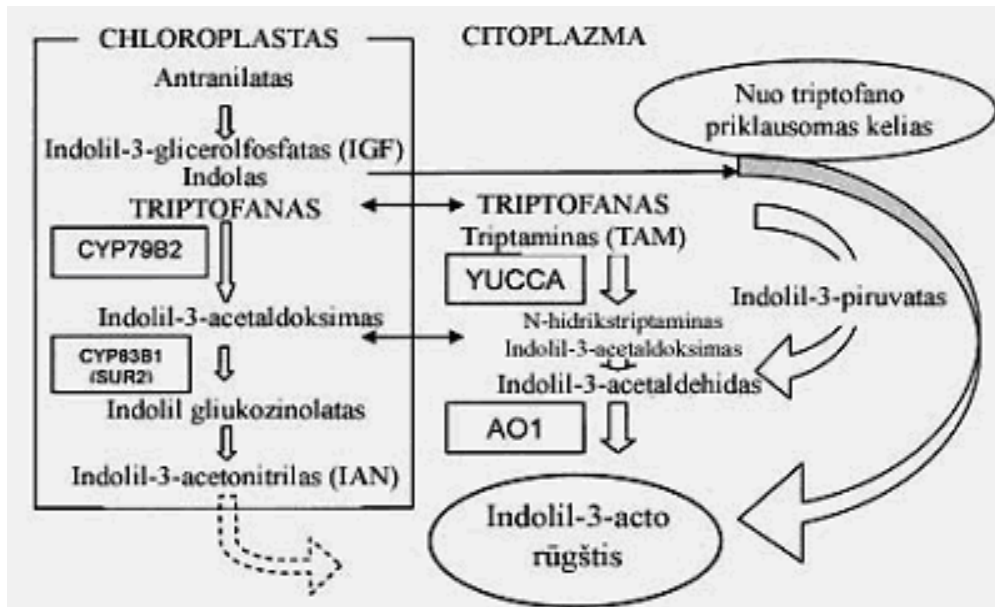
Reikšmės išreikštos aukso dalelių skaičiaus vidurkiu  $\mu\text{m}^{-2} \pm \text{SE}$ . a – krakmolo plotai buvo praleisti; b – duomenys gauti iš proplastidžių plotų.

Šie duomenys ne tik galutinai patvirtino IAR buvimą chloroplastuose, bet ir parodė sąsajas su lapų vystymosi procesais. Pažymėtina, kad endogeninės IAR kiekis visuose trijuose genetinį aparatą turinčiuose ląstelės organoiduose labai ryškiai keičiasi priklausomai nuo vystymosi fazės (4 lentelė). Daugiausiai IAR juose aptinkama L2 fazėje ir būtent tuo metu minėtuose organoiduose aptinkamas auksino kiekis, ypač skiriasi nuo kitų kompartmentų. Autorių manymu, nuo amžiaus priklausomi IAR pokyčiai chloroplastuose nėra tiesioginis atspindys IAR biosintezės aktyvumo pakitimo (Ohmiya, Hayashi, 1992), o yra IAR sintezės, metabolizmo ir transporto balansas organoide. Apie IAR mitochondrijose kalbėsime vėliau. Panaudojant SCh-MS ir 2D-DSSCh buvo parodyti endogeninės IAR kiekių pokyčiai tiek lapuose, tiek ir chloroplastuose tabako augalų, turinčių CK metabolizmo genetines modifikacijas (Polanská et al., 2007).

Tai, kad IAR iš triptofano gali būti sintetinama ne tik citoplazmoje, bet ir kituose ląstelės kompartmentuose parodyta įvairiais metodais (Sandberg, 1982, 1983; Fregeau, Wightman 1983; Woodward, Bartel, 2005). Nustatytas [<sup>3</sup>H]Trp virsmas į [<sup>3</sup>H]IAR miežių protoplastų chloroplastų preparatuose (Sandberg, 1982, 1983), DSCh metodu – saulėgražų lapų chloroplastų bei mitochondrijų preparatuose (Fregeau, Wightman 1983). Vėliau genetiniais metodais parodyta, kad dauguma nuo Trp priklausomos IAR biosintezės fermentų yra citoplazmoje, tačiau keletas fermentų dalyvaujančių IAR biosintezėje iš Trp (4 pav.), kelyje per IAOx arba citochromą P450 [Trp → IAOx → IAN arba IAAld → IAR] aptinkami plastidėse (Radwanski, Last, 1995; Woodward, Bartel, 2005), o CYP79B2 ir CYP79B3 turi į chloroplastą nukreiptus signalus (Hull et al., 2000). Šią savybę chloroplastai greičiausiai paveldėjo iš bakterinių pirmtakų, kurie iš į terpę įvesto Trp sintetina IAR (Wichner, Libbert, 1968).

Duomenų apie IAR metabolizmo procesus chloroplastuose – literatūroje labai mažai. Tiriant šviesos poveikį IAR metabolizmui izoliuotuose miežių lapų chloroplastų preparatuose (Sandberg et al., 1983) buvo konstatuotas IAR katabolizmo suintensyvėjimas. Kuris vėliau patvirtintas parodant (Brown et al.,

1986), kad chloroplastų preparatuose IAR patiria dekarboksilinę oksidaciją: IAR dekarboksilinimo greitis gerokai padidėja inkubuojant šviesoje – 2400 %.



4 pav. Galimi IAR biosintezės keliai vairyneje (Zažímalová, Napier, 2003).

DSSCh ir DCh-MS analizės parodė, kad pagrindinis IAR katabolitas yra IM (Brown et al., 1986). Bet šiuo teiginiu abejojama, nes tiriant IAR pasiskirstymą ląstelėje buvo padaryta išvada, kad chloroplastinis IAR pulas nėra reguliuojamas konjugacijos ar degradacijos procesu (Sandberg et al., 1990) ir manoma, jog dauguma procesu reguluojančių viduląstelinį IAR pulo dydį, bent jau tabako ir pušų protoplastuose yra lokalizuoti citozolyje (Sandberg et al., 1990).

Remiantis tyrimų, atliktų panaudojant transgeninių ir laukinio tipo tabako protoplastų chloroplastus, duomenimis (Sitbon et al., 1993) taip pat daroma prielaida, kad citozoliniai IAR kontrolės mechanizmai veikia ir chloroplastinės IAR pulo dydį per greitą IAR transportą tarp šių dviejų ląstelės kompartmentų.

**Auksinas mitochondrijose.** Daug mažiau žinoma apie galimą IAR lokalizaciją mitochondrijose bei jos biosintezę šiame organoide. Literatūroje aptikome nuorodą (Fregeau, Wightman, 1983), jog pirmieji duomenys parodantys, kad IAR sintezė vyksta iš pupų daigų išskirtuose citozolio ir mitochondrijų frakcijų preparatuose, buvo gauti 1968 m. F.Wightman, J.Cohen. Vėliau buvo parodytas, endogeninės IAR buvimas saulėgražų lapų

mitochondrijų frakcijoje, tačiau mažesniu kiekiu nei chloroplastuose. Bei sąlygomis *in vitro* parodytas L-triptofano bei L-fenilalanino virsmas į auksinus: IAR ir FAR (Fregeau, Wightman, 1983). Autoriai daro išvadą, kad šie organoidai kaip ir chloroplastai, turi fermentų sistemą reikalingą endogeninių auksinų (IAR ir FAR) biosintezei (Fregeau, Wightman, 1983), matyt paveldėtą iš bakterinių pirmtakų. Tačiau tiriant endogeninės IAR pasiskirstymą pušų spyglių, laukinio tipo ir įvairių tabako mutantų lapų protoplastuose, panaudojant žymėtą IAR, buvo prieita išvados (Sandberg et al., 1990), kad skirtingai nei chloroplastai, mitochondrijos neturi nei IAR, nei IE ar IARm. Japonų mokslininkų (Ohmiya, Hayashi, 1992) manymu, skirtingi rezultatai gali būti sąlygoti skirtingų ląstelių frakcionavimo metodų ar naudojamos augalinės medžiagos. Šių mokslininkų atlikti IAR lokalizacijos ląstelėje imunocitocheminiai tyrimai, persikų daigų lapų ląstelėse, patvirtino ne tik IAR buvimą citoplazmoje, branduolyje, chloroplastuose, bet ir mitochondrijose (4 lentelė, 2 priedas). Jų duomenys rodo, kad mitochondrijos turi reikšmingą IAR kiekį, nors nėra tiksliai žinoma ar IAR sintetinama *in situ*, ar transportuojama iš kitų ląstelės dalių (Ohmiya, Hayashi, 1992).

Kad šiame organoide gali būti lokalizuota IAR, leidžia manyti ir genetiniais metodais (LeClere et al., 2004; Woodward, Bartel, 2005) gauti rezultatai. Ieškant IAR-konjugatams atsparių mutantų, izoliuotas ir charakterizuotas *iar4* mutantas, kuris turi pažeidimą geno koduojančio homologą mitochondrinės pyruvatdehidrogenazės (PDH) E1 $\alpha$ -subvieneto. Jų manymu, kompleksas turintis IAR4 gali tiesiogiai funkcionuoti IAR biosintezėje. Katalizuojant indolil-3-pyruvo rūgšties dehidrogenazei duoda IAR-CoA – hipotetinį IAR ar IAR konjugatų pirmtaką (LeClere et al., 2004; Woodward, Bartel, 2005). IPVR yra tarpininkas IAR biosintezės kelyje iš Trp (Costacurta, Vanderleyden, 1995; Vande Broek et al., 1999; Segeeva et al., 2002) mikrorganizmuose.

Taigi, pateikti literatūros duomenys rodo, kad fitohormonai yra lokalizuoti ir sintetinami ne tik citoplazmoje, bet ir chloroplastuose, o IAR ir mitochondrijose. Šio fakto konstatavimas iškelia klausimą ar šiuose organoiduose yra lokalizuoti/funkcionuoja įvairius fitohormonus atpažįstantys

ir prisijungiantys baltymai vienaip ar kitaip susiję su jų funkcijos realizavimu – tai ir aptarsime sekančiame skyriuje.

### **1.6. Fitohormonus prisijungiantys baltymai**

Žinoma kad fitohormonų veikimas prasideda nuo jų sąveikos su kiekvienam fitohormonui specifiniais baltymais-receptoriais (Bonner, 1965; Merkys, 1966; 2000; Merkys et al., 1969; 2003; Theologis, 1988; Abel, Theologis, 1996 ir kt.). Susidarę fitohormono-receptoriaus kompleksai indukuoja eilę procesų, susijusių su genų ekspresijos pokyčiais, baltymų modifikacijomis branduolyje ir kitais, atvedančiais į vieną ar kitą specifinį atsaką. Todėl jau eilę metų intensyviai vyksta tyrimai ieškant atsakymų į klausimus – kurioje ląstelės vietoje „susitinka“ hormonas ir baltymas, kokiuose ląstelės kompartmentuose vyksta vieno ar kito hormono sąveika su jiems specifiniais baltymais?

***Citokininus prisijungiantys baltymai chloroplastuose.*** Šiuo metu citokininus prisijungiantys baltymai (CSB) aptikti keletoje lelijainių ir magnolijainių augalų ląstelių kompartmentų: plazmolemoje, citoplazmoje, branduolyje bei chloroplastuose (Zhang et al., 1996; Кулаева, Кузнецов, 2002; Lyukevich et al., 2002). Detaliau aptarsime tik CSB chloroplastuose.

Išanalizavus literatūroje pateikiamus duomenis, paaiškėjo, kad du CSB buvo išskirti iš avižų lapų chloroplastų dar 1986 m., kurie sąlygomis *in vitro*, modelinėje sistemoje esant CK – 6-benzilaminopurinui (6-BAP), skatino chloroplastų specifinę transkripciją (Romanko et al., 1986). Vėliau aukštą giminingumą BAP turintis CSB buvo išskirtas iš kviečių chloroplastų membranų (Zhang et al., 1991; 1996). Panaudojus fotožymintį reagentą 1-(2-azido-6-chloropyrid-4-yl)-3-fenilurėja 46 kDa CSB buvo identifikuotas žirnių chloroplastų tilakoidų membranose (Nogue et al., 2004). Zeatiną sujungiantis baltymas aptiktas ir 10 dienų amžiaus miežių daigų pirmo lapo chloroplastų frakcijoje (Селиванкина и др., 1997). Denatūruojančios PAAGE metodu parodyta, kad tai 64 kDa polipeptidas bei minoriniai 43 ir 57 kDa komponentai (Селиванкина и др., 1997). Nustatyta, kad šis baltymas komplekse su *trans-*



zeatinu aktyvuoja RNR sintezę 10 dienų miežių daigų pirmo lapo chloroplastų lizate. Didelį *trans*-zeatino ir CSB komplekso poveikio transkripcijai specifiškumą rodo tai, kad neturintis hormoninio aktyvumo *trans*-zeatino struktūrinis analogas – *cis*-zeatinas, neturi įtakos transkripciniam aktyvumui.

Be to, skirtingų ląstelės kompartmentų CSB pasižymi specifiškumu organoidų (chloroplastų ir branduolio) genomo atžvilgiu. Parodyta, kad chloroplastų CSB kartu su *trans*-zeatinu turi specifišką aktyvuojantį poveikį transkripcijos procesams pačiuose chloroplastuose, tačiau neturi įtakos branduolio genomo transkripcijai (Kusnetsov et al., 1994; Селиванкина и др., 1997; Lyukevich et al., 2002; Кулаева, Кузнецов, 2002). Tuo tarpu citozolio CSB neveikia RNR sintezės chloroplastų lizate (Селиванкина и др., 1997), bei chloroplastinis CSB neveikia chromatinio RNR-I ir II polimerazių aktyvumo, izoliuotuose miežių branduoliuose (Lyukevich et al., 2002; Кулаева, Кузнецов, 2002). Nustatytas ir rūšinio specifiškumo nebuvimas (Kusnetsov et al., 1994). Vienų augalų lapų chloroplastuose susiformuojantys *trans*-zeatino kompleksai su CSB ir aktyvuojantys RNR sintezę juose, gali aktyvuoti RNR sintezę kito augalo lapų chloroplastų lizate (Lyukevich et al., 2002). Manoma, kad chloroplastų genomo ekspresijos hormoninė reguliacija gali būti dar sudėtingesnė nei branduolio genų ekspresijos reguliacija, nes kai kurie baltymai turi dvigubą genetinę kontrolę (Benkova et al., 1999; Lyukevich et al., 2002).

Duomenų apie citokininus sujungiančius baltymus mitochondrijose – neradome.

***Abscizo rūgštį prisijungiantys baltymai.*** Literatūroje aptinkamais duomenimis ląstelėje funkcionuoja trys ABR receptoriai, kurie lokalizuoti: branduolyje (Razem et al., 2004; 2006 ir kt), plazmolemoje (Liu et al., 2007) ir plastidėse (Zhang et al., 2002; Wang, Zhang, 2007). Chloroplaste (plastidėse) funkcionuojantis ABR prisijungiantis baltymas buvo išskirtas iš pupų lapų varstomųjų ląstelių protoplastų afininės chromatografijos metodu (Zhang et al., 2002) ir identifikuotas kaip manomas ABR receptorių, pavadintas ABRR. Išskyrus iš pupų lapų cDNR fragmentą buvo nustatyta (Zgang et al., 2002; Hirayama, Shinozaki, 2007), kad jis koduoja 770 aminorūgščių dydžio Mg-

chelatazės H subvienetą (CHLH). Žinoma, kad CHLH yra įjungiamas į chlorofilo biosintezę (turi fermentinę funkciją) ir dalyvauja grįžtančio iš plastidžių į branduolį signalo perdavime (Shen et al., 2006). Todėl šis baltymas buvo charakterizuotas kaip ABR receptorius chloroplaste (Shen et al., 2006). Be to, parodyta (Shen et al., 2006), kad vairo ABRR/CHLH specifiskai su dideliu giminingumu prisijungia fiziologiškai aktyvią ABR formą. Kompleksų  $K_D$  yra  $32-35 \times 10^{-9}$  M ABR.

Manoma, kad ABR veikia tuo pačiu metu nepriklausomai daugelyje ląstelės vietų ir sukelia skirtingus atsakus kiekvienoje jų (Hirayama, Shinozaki, 2007).

***Giberelinus prisijungiantys baltymai.*** Ilgalaikės gibereliną prisijungiančių baltymų (GSB) paieškos iš įvairių augalų epikotilių, hipokotilių, lapų ir kitų organų išskirtose tirpių ląstelės baltymų frakcijose (Keith et al., 1982) bei membranų frakcijose (Beale et al., 1992; Gilroy, Jones, 1994;) leido padaryti prielaidą, kad augalai turi dviejų tipų GR receptorius – tirpius ir membraninius (Ueguchi-Tanaka et al., 2007). Panaudojant fotoafininį metodą, avižų aleurono ląstelių plazmolemoje identifikuoti 18 ir 68 kDa molekulinės masės GSB (Lovergrove et al., 1998). Taip pat avižų aleurono ląstelėse aptikti ir kiti du GSB: 60 kDa mikrosomų frakcijoje ir 50 kDa citozolyje (Hooley et al., 1992; 1993).

Neseniai biocheminiais ir genetiniais metodais nustatyta, kad ryžiuose *GIDI* genas koduoja nežinomą baltymą panašų į hormonui jautrią lipazę (HSL), kuri turi aukštą gimingumą biologiškai aktyviam GR (Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Nakajima et al., 2006). Šie gibereliną sujungiantys baltymai funkcionuoja citoplazmoje ir branduolyje (Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Hartweck, Olszewski, 2006). Be to, gibereliną (Nakajima et al., 2006) kaip ir auksiną (Dharmasiri et al., 2005 a; Kepinski, Layser, 2005) branduolyje gali prisijungti F-dėžutės baltymas TIR1. Parodyta, kad vieno ir kito fitohormono prijungimo vietos baltyme yra skirtingos ir daroma prielaida, kad jie veikia skirtingais mechanizmais.

Duomenų apie GR prisijungiančius baltymus chloroplastuose ir mitochondrijose nėra.

**Etileną prisijungiantys baltymai.** Šiuo metu žinomi ir identifikuoti 5 etileno receptoriai: ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 ir EIN4 (Chang et al., 1993; Hua et al., 1995; Hua, Meyerowitz, 1998; Sakai et al., 1998; Napier, 2004). Visi jie lokalizuoti ir funkcionuoja endoplazminiame tinkle. Jie homologiški bakterijų dviejų-komponentų histidino kinazėms (Wang et al., 2002).

Etileno receptoriai, kaip baltymų šeima, aptinkami ne tik stuomeniniuose augaluose, bet ir cianobakterijose *Synechocystis* ir *Anabaena* (Shoji et al., 2007) – šių dienų stuomeninių augalų chloroplastų protėviuose. Deja, duomenų apie etileno receptorių chloroplastuose neradome. Nėra duomenų ir apie etileno receptorių mitochondrijose.

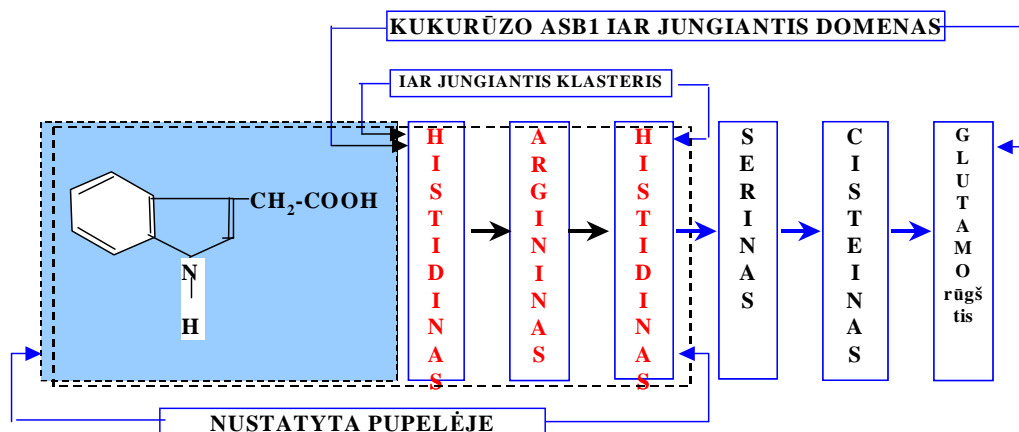
**ASB lokalizacija ląstelėje.** Skirtingų ląstelės kompartmentų (endoplazminio tinklo, tonoplasto, plazmos) frakcijose auksinų – sintetinio NAR ir endogeninio IAR specifinės sąveikos su baltymais sąlygomis *in vitro* (Hertel et al., 1972; Batt et al., 1976; Ray et al., 1977 a; b; Venis, 1977 a, b; Dorhmann et al., 1978) bei poveikis genetinei informacijai (Bonner, 1965; Merkys, 1966; Merkys et al., 1988 ir kt.) buvo pradėtas tyrinėti dar praėjusio amžiaus paskutiniaisiais dešimtmečiais.

Šiuo metu sukaupta daug eksperimentinių duomenų, rodančių, kad ląstelėje gali funkcionuoti (funkcionuoja) keletas skirtingų IAR prijungimo vietų, skirtingas charakteristikas turintys IAR-ASB kompleksai gali formotis skirtinguose ląstelės kompartmentuose, o jų funkcijos IAR hormoninės (reguliacinės) sistemos veikloje gali būti skirtingos (Venis, 1977 a; Меркис, 1982; Даргинавичене, 1992; Jones, 1994; Anisimovienė et al., 1998; 2006; Merkys, 2000; Darginavičienė, Novickienė, 2002; Zažímalová, Napier, 2003; Dharmasiri et al., 2005 a, b; Kepinski, Leyser, 2005; Teale et al., 2006 ir kt.), todėl trumpai aptarsime kiekviename ląstelės kompartmente funkcionuojančius auksiną prisijungiančius baltymus ir susiformuojančius kompleksus atskirai.

**ASB plazmolemoje.** IAR-ASB kompleksų formavimasis lelijainių augalų kukurūzų (Batt et al., 1976; Ray et al., 1977 a; b; Dorhmann et al., 1978; Venis et al., 1992) ir kviečių (Merkys et al., 1988; 2003; Darginavičienė et al., 1991; Даргинавичене, 1992) tįstančių koleoptilių ląstelių plazmolemoje buvo

įrodytas dar praėjusio amžiaus paskutiniaisiais dešimtmečiais. Šiuo metu plazmolemoje aptikta keletas ASB, tačiau daugumos autorių nuomone, tik vienam baltymui, vadinamajam kukurūzų ASB1, įrodytas auksino receptoriaus vaidmuo ir nustatytas jo poveikis ląstelių tįsimui (Löbler, Klämbt 1985 a, b; Venis et al., 1992; Jones, 1994; Jones et al., 1998; Chen et al., 2001; Napier, 2004). Šis (2×22 kDa) glikoproteidas buvo klonuotas, sekvenuotas – nustatyta jo karboksilo grupės prijungimo vietos (saito) aminorūgščių seka /-His-Arg-His-Ser-Cis-Glu-/ (Venis et al., 1992) ir pagrindinis IAR saito klasteris /-His-Arg-His-/ (Jones, 1994). ASB1 specifinių kompleksų su IAR formavimosi optimalus terpės pH – 5,5;  $K_D(\text{NAR}) – 3-6 \times 10^{-8} \text{ M}$ , o  $K_D(\text{IAR}) – 3,9 \times 10^{-6} \text{ M}$  (Löbler, Klämbt, 1985 a; Jones, 1994). Kviečių koleoptilių ląstelių plazmolemos preparatuose, kai terpės pH 5,5 formuojasi IAR-ASB kompleksas, kurio  $K_D \approx 1,1 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $n \approx 5,4 \times 10^{-10} \text{ nmol/mg}$  baltymo, molekulinė baltymo masė  $\approx 20 \text{ kDa}$ , atitiko hormono-baltymo kompleksą, identifikuotą MA.Venio ir kt. (1992) kukurūzų koleoptilių plazmolemoje (Даргинавичене, 1992; Darginavičienė, Novickienė, 2002).

IAR-ASB kompleksų formavimosi ir susiformuojančių kompleksų charakterizavimo tyrimai taip pat buvo atliekami ir magnolijainių augalų ląstelėse (Jacobs, Hertel, 1978; Hertel, 1979; Hertel et al., 1983), tačiau dėl ASB1 kaip receptoriaus vaidmens magnolijainių augalų ląstelių plazmolemoje ilgą laiką buvo diskutuojama (Hertel, 1995; Venis, 1995; Shimomura et al., 1999), jam priskiriant IAR-pernešiklio funkcijas. Vėliau, panaudojant chelatoafininės chromatografijos metodą: specifinis ligandas – iminodiacto rūgštis, chelatorius  $\text{Cu}^{2+}$  ar  $\text{Zn}^{2+}$ , konkuruojantis ligandas – imidazolas buvo nustatyta (Anisimovienė, Merkys, 2000), kad magnolijainių augalų (pupelių hipokotilių) membranoje funkcionuoja ASB (kompleksų formavimosi pH 5,5), turintis IAR prijungimo saitą – /-His-Arg-His-Cys-Ser-Glu-/ , karboksilo grupės prijungimo klasterį – /His-Arg-His-/ (5 pav.) tokį pat, kaip ASB1 funkcionuojančio lelijainių (kukurūzų) plazmolemoje (Venis et al, 1992). Šio baltymo molekulinė masė – 26 kDa, jis yra monomeras. ASB aktyviame centre lokalizuotas  $\text{Zn}^{2+}$ .



**5 pav.** IAR prisijungimo vieta (Anisimovienė, et al., 2003).

Susiformuojančių IAR-ASB kompleksų charakteristikos:  $K_D=1,65\pm 0,54\times 10^{-7}$  M,  $n=15,00\pm 1,80$  pmol/1g žalios masės, kompleksai pasiekia prisotinimą  $^{14}\text{C}$ -IAR koncentracijai esant  $7-8\times 10^{-7}$  M (Jodinskienė, 2005). Augalų ląstelėse, neatsakančiose į IAR pailgėjimu šis prijungimo saitas nefunkcionuoja ir kitokias charakteristikas turintys specifiskai sujungti IAR-ASB kompleksai nesiformuoja (Jodinskienė, 2005).

Be to, eksperimentiškai parodyta, kad plazmolemoje funkcionuoja ir antras saitas, esant neutralioms pH reikšmėms – optimalus pH IAR-baltymų kompleksams kviečių koleoptilėse – 7,2, pupelių hipokotiliuose – 7,5 (Меркис и др., 1989; Даргинавичене, 1992; Anisimovienė et al., 2000; Jodinskienė, 2000; 2005). Kviečių koleoptilių plazmolemoje susiformuojantys IAR kompleksai su baltymais (komplekso pH 7,2;  $K_D\sim 3\times 10^{-8}$  M;  $n\sim 2\times 10^{-11}$  nmol/mg baltymo, molekulinė baltymo masė  $\approx 80-90$  kDa, saito prisotinimo lygis  $\approx 5\times 10^{-7}$  M) gali aktyvuoti I ir II RNR-polimerazes modelinėse sistemose, įskaitant mRNR sintezės ląstelės branduolyje aktyvavimą (Merkys et al., 1988, 1998; Даргинавичене, 1992; Merkys, Darginavičienė, 1997). Taigi plazmolemoje, matyt, formuojasi IAR-baltymų kompleksas, kuris gali būti receptorinis ir eidamas į branduolį, iššaukti nuo IAR priklausantį efektą (Darginavičienė, Novickienė, 2002).

Tuo tarpu pupelių hipokotilių tūstančių ląstelių plazmolemos preparatuose identifikuoto ASB, kai terpės pH 7,5, charakteristikos skiriasi nuo kviečių

koleoptilių. IAR-ASB kompleksų:  $K_D=5,86\pm 0,68\times 10^{-7}$  M,  $n=40,00\pm 1,77$  pmol/1g žalios masės, prisotinimas pasiekiamas esant  $1,25-1,5\times 10^{-6}$  M IAR koncentracijai (Jodinskienė, 2005; Jodinskienė, Anisimovienė, 2006). ASB molekulinė masė 29-45 kDa, IAR karboksilo grupės prisijungimo vietoje nustatytas vienos aminorūgšties /-His-/ liekanos buvimas (Merkys et al., 2004 a, b; Jodinskienė, 2005; Jodinskienė, Anisimovienė, 2006) ir –SH- grupę turinti aminorūgštis (Jodinskienė, Anisimovienė, 2007). Šio saito aktyvumas gali būti susijęs su IAR transportu (Jodinskienė, Anisimovienė, 2007).

Be to, dvi skirtingos didelio ir mažo giminingumo auksiną prisijungiančios vietos taip pat buvo aptiktos ir lelijainio augalo – ryžių koleoptilių ląstelių plazmolemos frakcijoje, vienai iš jų buvo priskirtas receptoriaus vaidmuo ( $K_D - 4,5\times 10^{-7}$  M), o kitai, kurios  $K_D - 3,8\times 10^{-6}$  M, auksino pernešiklio vaidmuo (Zaina et al., 1989). Magnolijainių augalų cukinių ląstelių plazmolemoje, specifiškai IAR prisijungianti vieta taip pat buvo charakterizuota ne kaip receptorių, o kaip pernešiklis, nes kompleksų susiformavimo konstanta buvo mažesnė, nei turėtų būti baltymo-receptoriaus  $K_D \sim 10^{-6}$  M (Jacobs, Hertel, 1978; Hertel et al., 1983). Morkų ląstelių plazmolemoje susiformuojančio IAR-ASB komplekso charakteristikos –  $K_D < 2\times 10^{-5}$  M bei pernešikliui būdingas labai didelis prisijungimo saitų skaičius  $n > 300$  pmol/mg baltymo, parodė, kad identifikuotas ne receptorių, o pernešiklis (Zbell, 1996). Pernešiklių funkcija buvo priskiriama ir kitiems ląstelių plazmolemoje identifikuotiems ASB (Jacobs, Hertel, 1978; Hertel et al., 1983; Lomax et al., 1985).

**IAR sąveika su citozolio baltymais.** Citozolio frakcijoje identifikuota nemažai tirpių specifiškai prisijungiančių auksiną baltymų (Oostrom et al., 1980; Darginavičienė et al., 1991; Merkys, Darginavičienė 1997; Ohmiya et al.; 1993; Sugaya, Sakai, 1996 a, b; Kim et al., 1998; Mockevičiūtė, Anisimovienė, 1999). Šių baltymų molekulinės masės labai skiriasi, jos yra nuo 40 iki 300 kDa (Даргинавичене, 1992; Anisimovienė et al., 2000). Nustatyta, kad dalis šių tirpių baltymų taip pat gali būti auksino receptoriai ir auksino sąveika su receptoriumi realizuojasi per auksinu reguliuojamų genų ekspresiją (Oostrom et al., 1980; Даргинавичене, 1992). Kviečių koleoptilių

citozolyje susidarantis IAR-ASB kompleksas (optimalus komplekso formavimosi pH 8,0;  $K_D \sim 1,7 \times 10^{-6}$  M;  $n \sim 3,6 \times 10^{-10}$  nmol/mg baltymo, molekulinė baltymo masė 40 kDa), suaktyvina RNR II polimerazės aktyvumą, baltymų sintezę (Даргинавичене, 1992; Merkys, Darginavičienė, 1997). Iš ryžių daigų išskirtas tirpus monomerinis citozolio kilmės 57 kDa baltymas, pavadintas ASB<sub>57</sub> (Kim et al., 1998). Nustatyta, kad šis baltymas – auksino receptorių, kuris aktyvina plazmolemos H<sup>+</sup>-ATP-azę (Kim et al., 1998; Kim et al., 2001).

Pupelių hipokotilių citozolio preparatuose nustatytas dviejų skirtingų tipų IAR ir ASB kompleksų formavimasis, terpės pH esant 7,8. Citozolyje IAR sąveika vyksta su dviem 30 ir >67 kDa molekulinės masės ASB (Mockevičiūtė, Anisimovienė, 1999; Anisimovienė et al., 2000; Merkys et al., 2001). IAR kiekis, sąveikaujantis su 1 mg šių ASB skiriasi 8-10 kartų (Mockevičiūtė, Anisimovienė, 1999).

Nemažai citozolio ASB yra identifikuoti kaip turintys fermentinį aktyvumą: β-1,3-glukozidazė (Campos et al., 1992), β-1,3-glukanazė (Macdonald et al., 1991) ir glutation-S-transferazė (GST) (Bilang et al., 1993; Zettl et al., 1994). Nors nei šių fermentų vaidmuo auksino veikimui, nei auksino prisijungimo prie šių fermentų poveikis nėra išaiškintas, yra galimybė, kad auksino prisijungimas prie fermentų modifikuoja jų aktyvumą (Campos et al., 1992). 40 kDa ASB buvo izoliuotas iš geltonųjų pupelių hipokotilių (Sugaya, Sakai, 1996 a). Jo  $K_D(2,4-D) 1 \times 10^{-5}$  M. Dalis šio baltymo aminorūgščių sekos rodo aukštą homologiją nuo glutationo priklausomai formaldehid-dehidrogenazei (FDH), o išvalytas baltymas turi FDH aktyvumą (Sugaya, Sakai, 1996 a). Tų pačių autorių identifikuotas baltymas - ASB39 turi nuo NADH-priklausomą indolil-3-acetaldehido reduktazės aktyvumą (Sugaya, Sakai, 1996 b).

ASB19/20 buvo identifikuoti iš persikų daigų apeksa – kaip baltymai, specifiškai prisijungiantys auksinus (Ohmiya et al., 1993; Ohmiya, 2002). Šio baltymo ir 2,4-D sąveikos  $K_D - 4,1 \times 10^{-5}$  M (Ohmiya et al., 1993) ir ji yra gerokai didesnė nei daugelio plazmolemos ASB (Löbler, Klambt, 1985 a; Sakai 1985; Shimomura et al., 1986). ASB19/20 nustatyta aminorūgščių seka

turi labai mažą homologiją su bendra seka ASB1, išskirto iš kukurūzų koleoptilių, tačiau jis turi mažą regioną kuris 40 % homologiškas su ASB1 galimu ausrino prisijungimo saitu – BoxA. Šio baltymo ausrino molekulės karboksilo grupės prijungimo vietoje tarp 2-ju /-His-/ vietoje /-Arg-/ yra kitokia aminorūgštis (Ohmiya et al., 1998). Parodyta, kad ASB19/20 – germinų (gemalo) tipo baltymas turi superoksido dismutazės (SOD) aktyvumą (Ohmiya et al., 2002), tačiau jo fiziologinis vaidmuo nėra tiksliai nustatytas. Kito tirpaus persikų daigų apeksa 60 kDa baltymo, pavadinto Pp60, aminorūgščių sekos dalis yra homologiška disulfidizomerazei (Sugaya et al., 2000).

**IAR sąveika su tonoplasto ir endoplazminio tinklo baltymais.** Dar U.Dohrmann ir kt. (1978) bei R.Hertel (1979) atlikti sintetinio ausrino  $^{14}\text{C}$ -NAR atpažinimo ir sujungimo eksperimentai, panaudojus įvairias kukurūzų ir moliūgo koleoptilių homogenatų frakcijas, parodė 3 ausrino prijungimo vietų buvimo galimybę: I – aptikta ant šiurkštaus endoplazminio tinklo kukurūzų koleoptilėse, II – kukurūzo tonoplaste, III – kukurūzų ir moliūgo plazmolemoje. Vėliau kviečių ląstelių tonoplaste IAR prisijungimo saito buvimas patvirtintas autoradiografijos (Perbal, Driss-Ecole, 1988) bei biocheminiais (Merkys et al., 1998) metodais. Parodytas dviejų skirtingų IAR-baltymų kompleksų formavimasis kviečių ląstelių tonoplaste (Merkys et al., 1998). Nustatytos šių kompleksų charakteristikos: terpės pH esant 5,5 –  $K_D$   $1,2 \times 10^{-7}$  M,  $n$   $7,1 \times 10^{-12}$  mol/mg baltymo ir terpės pH esant 8,0 –  $K_D$   $1,8 \times 10^{-7}$  M,  $n$   $1,2 \times 10^{-11}$  mol/mg baltymo. Jos skiriasi nuo tų pačių augalų ląstelėse susiformuojančių kompleksų su plazmolemos bei citozolio baltymais. Žinoma jog kviečių tonoplaste kaip ir plazmolemoje funkcionuoja ne tik pasyviojo, bet ir aktyviojo, nuo ATP priklausomo, IAR transporto sistemos (Savičienė et al., 1997; 2000). Du 60 ir 75 kDa molekulinės masės IAR „atpažįstantys“ baltymai aptikti kviečių koleoptilių ląstelių tonoplaste (Anisimovienė et al., 1998).

Tuo tarpu dėl IAR-ASB kompleksų formavimosi endoplazminiame tinkle diskutuojama. Kaip jau minėta, biocheminiais metodais analizuojant mikrosomų frakcijas buvo konstatuotas IAR-baltymų kompleksų formavimasis endoplazminio tinklo frakcijoje, terpės pH esant 5,5 (Dohrmann et al., 1978;



Hertel, 1979), tačiau H.Tian ir kiti (1995) panaudoję fotožymintį reagentą 5-azidoindol-3-acto rūgštį, pateikia įrodymus, kad ABP1 neriša auksino endoplazminiame tinkle, nežiūrint to, jog žinoma, kad daugiau kaip 90 % ASB1 yra aptinkama jame (Jones, Venis, 1989; Shimomura et al., 1988; Napier et al., 1992). Šią hipotezę palaiko ir tai, kad ASB1 pusamžis yra priklausomas nuo pH (Shimomura et al., 1986). Prie pH 5,5 auksino jungimosi prie ASB1 pusamžis yra žymiai trumpesnis negu prie pH 7,0 (Shimomura, et al., 1986), o endoplazminio tinklo pH artimas neutraliam.

**IAR sąveika su branduolio baltymais.** Nors IAR-ASB kompleksų poveikis branduolio genetinei infomacijai – *SAURs*, *Aux/IAR* ir *GH3* šeimų ankstyvojo atsako į IAR poveikį genų ekspresijai (Hagen, Guilfoyle, 1985; Abel, Theologis, 1996; Leyser, 2002), RNR-polimerazių aktyvumui (Merkys et al., 1988; Даргинавичене, 1992; Merkys, Darginavičienė, 1997) buvo parodytas, tačiau tik pastaraisiais metais buvo identifikuotas auksino receptorius TIR1 – F-dėžutės tirpus branduolio baltymas (Dharmasiri et al., 2005 a; Kepinski, Leyser, 2005).

Šio receptoriaus nustatymą nulėmė, būtent, ankstesniais metais sukauptos žinios. Buvo parodyta, kad auksinas po kelių poveikio minučių ne tik keičia genų ekspresiją, ypač *Aux/IAR* (Abel, Theologis, 1996) bet ir, kad tam svarbi sąveika tarp *Aux/IAA* transkripciją represuojančių baltymų ir ubiquitin-ligazės komplekso SCF<sup>TIR1</sup>, turinčio savo sudėtyje – TIR1 (de Pozo, Estelle, 2000; Gray et al., 2001; Leyser, 2002). Be to, laisvų ląstelių sistemoje parodyta, kad auksinas padidina sąveiką tarp TIR1 ir *Aux/IAR* (Dharmasiri et al., 2003) bei, kad prieš šią sąveiką paveikus TIR1 auksinu pasikeičia jo ir *Aux/IAR* susijungimas (Gray et al., 2001; Kepinski, Leyser, 2004). Tačiau, kuris tiksliai SCF<sup>TIR</sup> komplekso komponentas ar komponentai yra auksino prisijungimo vieta nebuvo aišku. Tyrimų rezultatai rodė, kad II *Aux/IAR* baltymų sritis yra būtina sąveikai su SCF<sup>TIR1</sup> (Dharmasiri et al., 2003; Kepinski, Leyser, 2004), taip pat buvo nustatyta, kad, reaguodami į IAR, *Aux/IAR* baltymai degraduoja per SCF<sup>TIR1</sup> (Gray et al., 2001). Todėl buvo manoma, kad auksinas inicijuoja *Aux/IAA* fosforilinimą ar kitas modifikacijas, kurios prisideda prie šio baltymo

afiniškumo TIR1 (Patton et al., 1998; Winston et al., 1999). Tačiau kitų autorių (Ramos et al., 2001; Dharmasiri et al., 2003) gauti duomenys parodė, kad Aux/IAR II domenas neturi jokių konservatyviųjų fosforilinimo vietų ir sąveikaujant Aux/IAR ir SCF<sup>TIR1</sup>, baltymų fosforilinimas tiesiogiai nevyksta, Aux/IAR II domenas jokiame pajutimo kelyje, atsakant į auksiną, nėra kovalentiškai modifikuojamas (Kepinski, Leyser, 2004).

Dviejų mokslininkų grupių Europos (Kepinski, Leyser, 2005) ir JAV (Dharmasiri et al., 2005 a) pastarųjų metų darbai, panaudojant radioaktyvią IAR parodė, kad ji jungiasi tiesiogiai su išvalytu TIR1 kompleksu, bet ne su Aux/IAR baltymais. Susiformavęs TIR1-IAR kompleksas sąveikauja su Aux/IAR baltymais (Kepinski, Leyser, 2005; Dharmasiri et al., 2005a). Šio receptoriaus ir auksinų sąveikos tyrimai parodė vieno saito kinetiką. Sąveikos su IAR *in vivo*  $K_D$   $2,5 \times 10^{-8}$  M (Kepinski, Leyser, 2005) ir  $8,4 \times 10^{-8}$  M (Dharmasiri et al., 2005 a), su 1-NAR viena eile, o su 2,4-D dviem eilėmis mažesnė nei su IAR. Nurodoma, kad TIR1 saito 80 % užsotinimas pasiekiamas esant IAR koncentracijai  $5 \times 10^{-7}$  M (Badescu, Napier, 2006).

TIR1 charakteristikos lyginant su kukurūzų ASB1 charakteristikomis (5 lentelė) turi panašumų ir skirtumų (Teale et al., 2006; Badescu, Napier, 2006). ASB1 giminingumas 1-NAR nurodomas skirtingas tarp  $2,0-20 \times 10^{-8}$  M, o giminingumas IAR daug mažesnis  $5-10 \times 10^{-6}$  M. Taigi, šių dviejų baltymų selektyvumas skiriasi (5 lentelė), TIR1 labiau prisijungia natūralų IAR ligandą, tačiau giminingumas kiekvieno saito pasirenkamiausiajam ligandui yra panašus (Dharmasiri et al., 2005 a; Kepinski, Leyser, 2005).

**5 lentelė.** ASB1 ir TIR1 ypatybių trijų dažniausiai naudojamų auksinų atžvilgiu (palyginimas pagal Teale et al., 2006)

Ypatybės	Natūralus auksinas IAR	Sintetiniai auksinai	
		2,4-D	NAR
<b>Giminingumas receptoriui</b>			
TIR1 sąveikos $K_D$	Aukšta	Žema	Vidutinė
ASB1 sąveikos $K_D$	Vidutinė	Žema	Aukšta

Manoma, kad skirtingai nei ASB1 ar jo homologai, kurių atsakas į IAR siejamas su ląstelės didėjimu (Badescu, Napier, 2006), šis auksino receptorių tarpininkauja Aux/IAR degradacijai ir auksino reguliuojamai transkripcijai, sąlygojančiai augalo vystymąsi (Dharmasiri et al., 2005 b; Kepinski, Leyser, 2005). Nurodoma, kad TIR1 ir ASB1 aminorūgščių sekos nėra panašios (Teale et al., 2006; Badescu, Napier, 2006).

**ASB lokalizacija chloroplastuose ir mitochondrijose.** Turint omenyje, jog ląstelės organoidai – chloroplastai ir mitochondrijos yra bakteriniai endosimbiontai ir, kad šie eukariotinės ląstelės organoidai, kaip ir bakterijos gali sintetinti IAR, o taip pat ją išskirti į supančią aplinką (Wichner, Libbert, 1968; Merkys et al., 1974; Sergeeva et al., 2002) iškyla klausimas, ar juose gali funkcionuoti (funkcionuoja) ASB.

Jau pirmuosiuose darbuose, skirtuose IAR-ASB saitų kompartmentacijos ląstelėje (Dohrmann et al., 1978; Hertel, 1979) išaiškinimui, dėmesys kreiptas ne tik į plazmolemos, tonoplasto, endoplazminio tinklo, bet ir į mitochondrijų frakciją. Tačiau specifiskai sujungtų IAR-ASB kompleksų formavimosi mitochondrijose galimybė kai terpės pH 5,5, buvo atmesta.

Vėliau AM.Jones, E.Herman (1993) elektroniniu mikroskopu bei naudodami imunohistocheminę techniką su skirtingais monospecifiniais antikūniais ABP1-am ir jo homologams nustatė bendrą subląstelinę ABP1 lokalizaciją, kuri parodė, kad daugiausiai ABP randami endomembraninėje sistemoje, bet ne branduolyje, vakuolėje, plastidėse ar ant jų membranų, taip pat ir ne ant mitochondrijų.

Atlikus transgeninio tabako (su išreikštu jautrumu tiesiogiai rekombinantiniam ASB1 genui) lapų ekstrakto imunoblotingą buvo nustatyta (Shimomura et al., 1999), kad 60-70 % ASB1 susiję su membranų frakcijomis. Membranų fracionavimo sacharozės tankio gradientu rezultatai parodė, kad ASB1 pasiskirstymas sutampa su endoplazminio tinklo markeriu, tuo tarpu, chloroplastų tilakoidų ir mitochondrijų membranose jo neaptikta.

Taip pat buvo daroma prielaida (Wardrop, Polya, 1980 a, b), kad didelis periferinis tilakoidų baltymas ribuliozės-1,5-bifosfatkarboksilazė (RuBP

karboksilazė) galėtų sąveikauti su IAR, tačiau nei IAR kompleksų formavimosi galimybių su šiuo baltymu tyrimai, nei kitų indolo junginių, kitų auksinų, jų transporto inhibitorių galimybė konkuruoti dėl IAR prisijungimo vietos neleido padaryti išvados apie auksino susijungimą su RuBP karboksilaze.

Tokiu būdu atlikta literatūros šaltinių apžvalga ASB lokalizacijos ląstelėje klausimu rodo, kad šie baltymai lokalizuoti ir funkcionuoja plazmolemoje, branduolyje, citozolyje ir tonoplaste. Tyrimai dėl galimos ASB lokalizacijos chloroplastų ir mitochondrijų organoiduose detaliau nėra vykdyti. Tai ir nulėmė mūsų tyrimo pagrindinį tikslą.

## 2. TYRIMŲ METODOLOGIJA

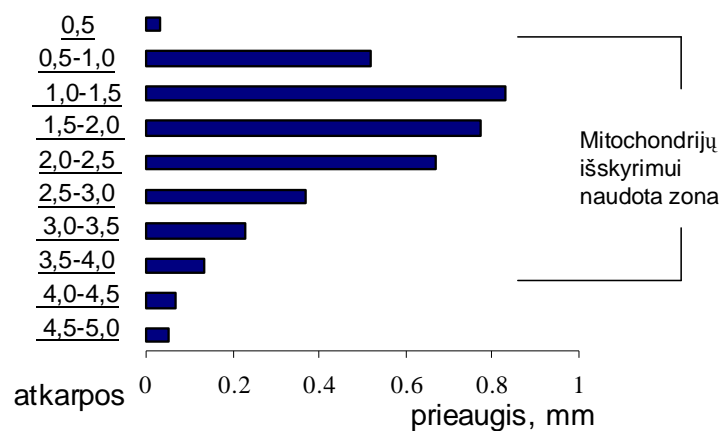
### 2.1. Tyrimų objektas

Tiriamaisiais objektais, augalų ląstelėse lokalizuotiems ASB išaiškinti buvo pasirinktos magnolijainio augalo – pupelės (*Phaseolus vulgaris* L. 'Baltija') organoidų – mitochondrijų ir chloroplastų subląstelinės frakcijos.

*Chloroplastų frakcijos išskyrimui* naudoti 10-12 parų lapai. Augalai 4 paras buvo auginami tamsoje, palaikant pastovią drėgmę ir  $+23\pm 2$  °C temperatūrą, vėliau 6-8 paras – kameroje, esant  $219\pm 2$   $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  augalo lapui dienos lempų apšvietimui 10-12 h.

*Mitochondrijų frakcijos išskyrimui* naudoti 4-5 parų etioliuoti hipokotiliai. Pupelės buvo auginamos tamsoje, palaikant pastovią drėgmę ir  $+23\pm 2$  °C temperatūrą.

Į IAR poveikį tūstamuojų augimu reaguojanti hipokotilio zona ir efektyviausiai tūstamąjį hipokotilių augimą skatinanti IAR koncentracija buvo nustatytos atlikus bandymus, panaudojant agarą blokų-donorų metodu. Binokuline lupa (did. 8×) buvo išmatuojamas pupelių hipokotilių pailgėjimas milimetrais. Rezultatai parodė, kad efektyviausiai augimą skatino  $10^{-5}$  M IAR koncentracija.



6 pav. Pupelių hipokotilių zona, intensyviausiai atsakanti į augsino poveikį.

Tyrimams buvo pasirinkta 4 cm hipokotilio atkarpa, intensyviausiai tįstamuoju augimu atsakanti į egzogeninę IAR, atmetus pirmus 0,5 cm nuo sėklaskilčių (6 pav.). Tokia pat hipokotilių zona, intensyviausiai reaguojanti tįstamuoju augimu į IAR poveikį buvo naudota ir plazmolemos bei citozolio IAR-ASB tyrimams (Меркис и др., 1999; Anisimovienė, Jodinskienė 1999; Mockevičiūtė, Anisimovienė 1999; Jodinskienė, 2000).

## **2.2. Chloroplastų ir mitochondrijų subląstelinių frakcijų išskyrimo sąlygų parinkimas**

Optimalios sąlygos chloroplastų ir mitochondrijų subląstelinėms frakcijoms išskirti: homogenizavimo ir perplovimo terpių sudėtys, jų pH, diferencinio centrifugavimo režimai, gryninimui naudojami gradientai buvo pasirinkti eksperimento keliu pritaikant kitų mokslininkų naudotas metodikas (Кулаева и др., 1979; Fregeau, Wightman, 1983; Дрейпер, 1991; Селиванкина и др., 1997; Benkova et al., 1999; Lyukevich et al., 2002).

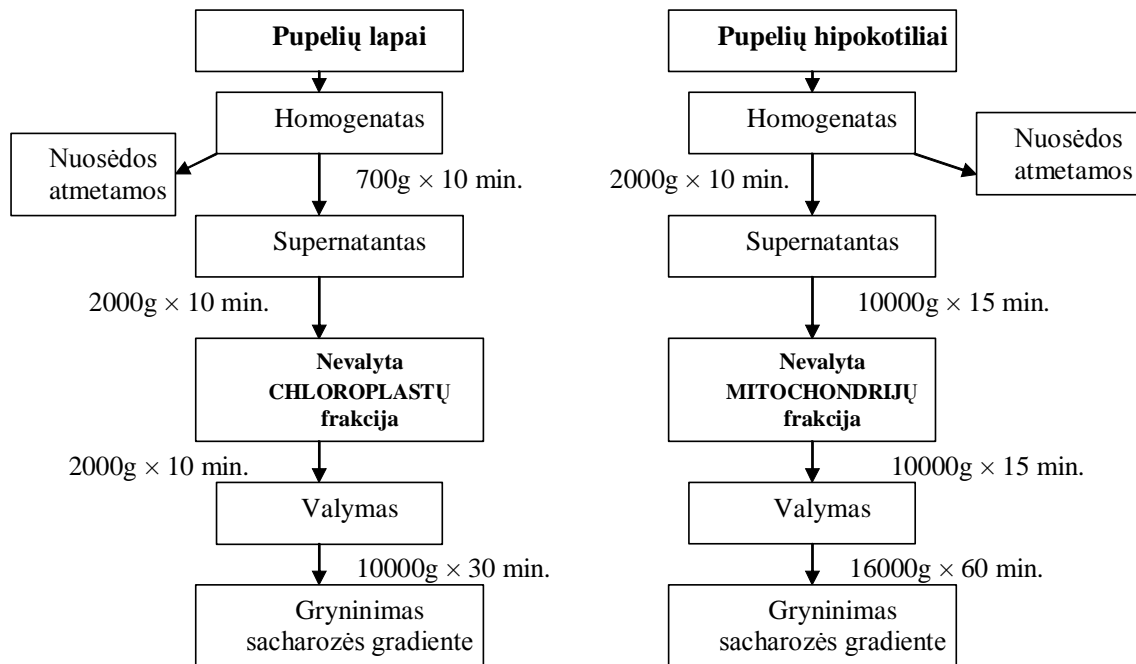
### **2.2.1. Chloroplastų subląstelinės frakcijos išskyrimas**

Pirmajame darbų etape, chloroplastų subląstelinei frakcijai išskirti, buvo pasirinkta schema (7 pav.) pritaikant metodikas naudotas Dž.Dreiper (1991) ir O.Kulajeva su bendraautoriais (1979) chloroplastų bei mitochondrijų DNR ir RNR analizei.

Organoidų išskyrimui naudota homogenizacijos ir perplovimo terpė, kurios sudėtis: 50 mM TRIS-HCl, pH 7,8, 100 mM sacharozės, 10 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM merkaptoetanolio. Frakcija buvo gryninta laiptiniame sacharozės gradientu: 52/30 %, paruoštame 50 mM TRIS-HCl, pH 8,0, buferyje su 20 mM EDTA priedu. Frakcija išskirta keturiais centrifugavimo etapais (7 pav.).

Vėlesniuose darbų etapuose chloroplastų frakcijos išskyrimo ir gryninimo schema (8 pav.) bei optimalios terpių sudėtys parinktos pagal organoidų intaktiškumo ir funkcionalumo įvertinimo bei preliminarius IAR-ASB kompleksų formavimosi tyrimų rezultatus, pritaikant metodikas, naudotas

fitohormonų tyrimams chloroplastuose atlikti (Fregeau, Wightman 1983; Benkova et al., 1999; Селиванкина и др., 1997; Lyukevich et al., 2002).

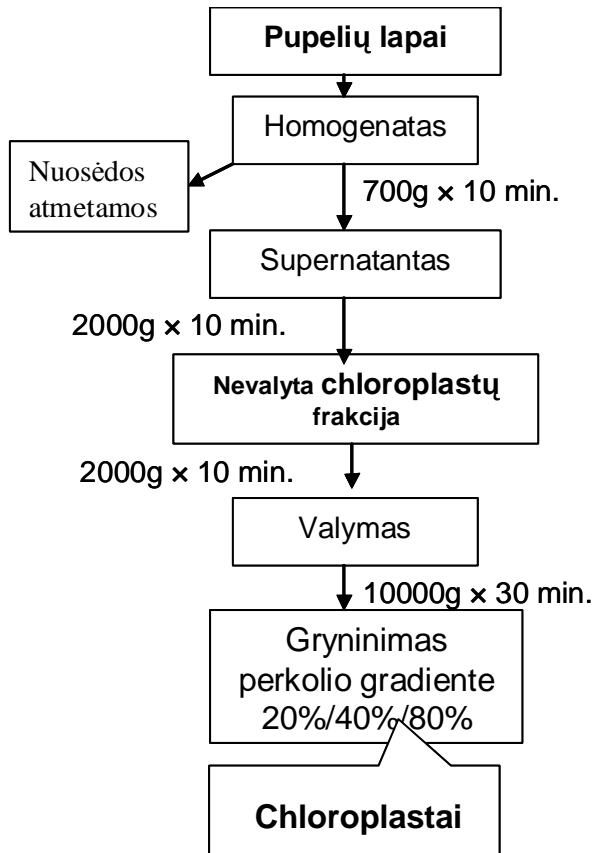


**7 pav.** Chloroplastų ir mitochodrijų išskyrimo schemas, osmotiku terpėse ir organoidų frakcijų gryninimui naudojant sacharozę.

Homogenizacijos terpės sudėtis: 330 mM sorbito, 50 mM TRIS-HCl, pH 7,6, 0,4 mM KCl, 2 mM EDTA, 1 % PVP, 5 mM izoaskorbininės rūgšties. Šioje terpėje lapai santykiu 1:4 (g:ml) buvo homogenizuojami audinių smulkintuve ir nufiltruojami per *Mirochlot* audeklą. Homogenatas centrifuguotas 15 min., kai 700 g, 0+4 °C temperatūroje. Nuosėdos atmetos, supernatantas centrifuguotas dar kartą 15 min., esant 2000 g (8 pav.). Gautos nuosėdos – nevalyta chloroplastų frakcija – homogenizuota perplovimo terpėje, kurios sudėtis: 330 mM sorbito, 50 mM TRIS-HCl, pH 7,6, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub> ir centrifuguota 15 min., kai 2000 g, 0+4 °C temperatūroje.

Perplauta nevalytų chloroplastų frakcija gryninta laiptiniame perkolio gradiente 20/40/80%. Centrifuguota 30 min., kai 10 000 g. Chloroplastų subląstelinė frakcija surinkta perkolio tankio sluoksnyje tarp 40/80% (8 pav).

Nuo perkolio liekanų gauta chloroplastų subląstelinė frakcija buvo perplauta du kartus.



**8 pav.** Intaktinių ir funkcionalių chloroplastų subląstelinės frakcijos išskyrimo schema.

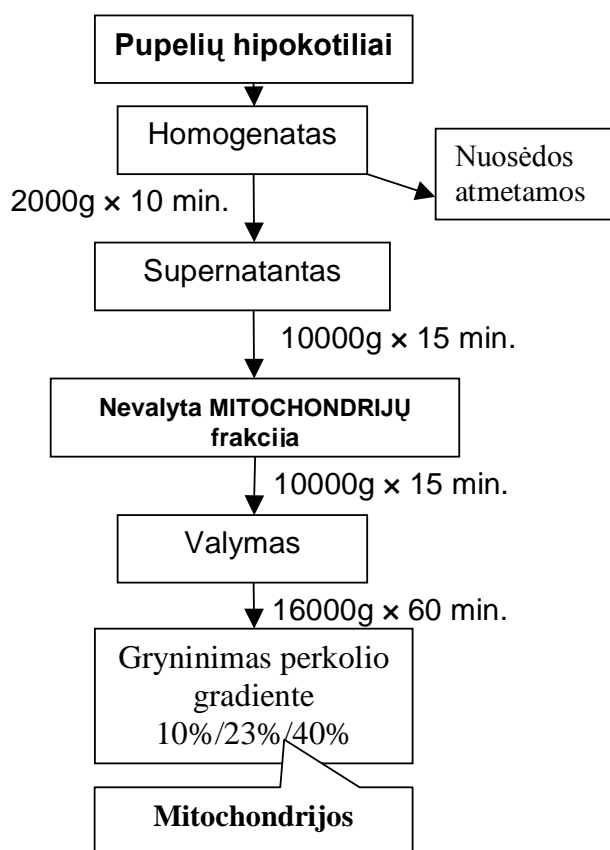
### 2.2.2. Mitochondrijų subląstelinės frakcijos išskyrimas

Mitochondrijų frakcijos išskyrimui pirmajame darbų etape buvo taikytos R. Hertel (1979) ir Dž. Dreiper (1991) naudotos metodikos (7 pav.). Tačiau ir šiuo atveju, osmotiku išskyrimo terpėse bei frakcijos gryninimui, naudojant sacharozę, nebuvo užtikrinamas mitochondrijų intaktiškumas ir funkcionalumas. Vėlesniuose darbuose frakcijos išskyrimui buvo taikyta metodika (9 pav.), naudota auksinų sintezės galimybei mitochondrijų frakcijoje tirti (Fregeu, Wightman, 1983).

Hipokotiliai santykiu 2:1 (g:ml) buvo homogenizuoti homogenizacijos terpėje: 330 mM manito, 50 mM TRIS-HCl, pH 7,3, 3 mM EDTA, 25 mM cisteino, 1 % PVP ir nufiltruoti per *Mirochlot* audeklą. Homogenatas centrifuguotas 10 min., kai 2000 g, nuosėdos atmetos. Supernatantas buvo centrifuguotas - 15 min., esant 10 000 g,



0+4 °C temperatūroje. Gautos nuosėdos (nevalyta mitochondrijų frakcija) homogenizuotos ir centrifuguotos 10 min., esant 10 000 g perplovimo terpėje, kurios sudėtis: 300 mM manito, 50 mM TRIS-HCl, pH 7,2, 1 mM EDTA. Perplauta mitochondrijų subląstelinė frakcija nuo kitų ląstelės kompartmentų membranų priemaišų, esančių nuosėdose, gryninta laiptiniame perkolio gradiente 10/23/40% (centrifuguota 60 min., esant 16 000 g). Mitochondrijos surinktos perkolio tankio sluoksnyje tarp 23/40% (9 pav.). Nuo perkolio liekanų 2 kartus plauta perplovimo terpėje.



**9 pav.** Intaktinių ir funkcionalių mitochondrijų subląstelinės frakcijos išskyrimo schema.

**Baltymų kiekio nustatymas.** Baltymo kiekis išskirtose organoidų subląstelinėse frakcijose ir visuose kituose tyrimų etapuose, buvo įvertinamas Bradford (1976) metodu arba modifikuotu (Hartree, 1972) Lowry (1951) metodu. Kaip standartas buvo naudotas jaučio serumo albuminas (BSA).

**Chlorofilo kiekio nustatymas.** Chlorofilo kiekis intaktinių chloroplastų ir jų membranų preparatuose buvo nustatytas ekstrahuojant 80 % acetonu ir

centrifuguojant 5 min. esant 500 g (Benkova et al., 1999). Supernatanto absorbcija matuojama, esant bangos ilgiui  $\lambda$  652 nm, (Arnon, 1949). Chlorofilo koncentracija (mikrogramais/mililitre) buvo skaičiuojama pagal Arnoną (1949).

### **2.3. Organoidų subląstelių frakcijų identifikavimas**

#### **2.3.1. Chloroplastų subląstelinės frakcijos**

*Fotosintetinio deguonies susidarymas* buvo įvertintas, nustatant deguonies koncentraciją Klarko tipo elektrodu, 25 °C temperatūroje. O<sub>2</sub> matavimai pradėti registruojant O<sub>2</sub> pokyčius tamsoje ir tęsti, esant 250 W/m<sup>2</sup> apšvietimui. Chloroplastų preparatai, turintys 0,1 mg chlorofilo (Fry, 1970) buvo įdėti į 10 ml terpės, kurios sudėtis (Mills, Joy, 1980): 330 mM sorbito, 50 mM TRIS-HCl pH 7,8, 10 mM KCl, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 2 mM ATP, 2 mM EDTA.

*Fericianido (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) fotoredukcija* buvo nustatyta terpėje: 20 mM TRIS-HCl, pH 7,8, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,3 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, pridedant chloroplastų suspensijos, turinčios 25-30 µg chlorofilo (Николаева, 2001) ir 330 mM sorbito (Reeves, Hall, 1980). Šviesinės ekspozicijos (200 W/m<sup>2</sup>) laikas 2 min., reakcija stabdyta pridedant lygų kiekį 10 % TCR. Optinis tankis matuotas esant bangos ilgiui  $\lambda$  – 420 nm. (Кулаева и др., 1979).

*Chloroplastų frakcijos užterštumas* branduoliais buvo įvertintas šviesiniu mikroskopu (did. 400×), nudažius toluidino mėliu 1 %. Mitochondrijomis – naudojant citochromą c (Cit c), kaip mitochondrijų žymenį, pagal 2.3.2. poskyryje aprašytą metodiką. Tyrimui buvo imta chloroplastų frakcija paveikta detergentu digitoninu (3 %), palyginimui naudota mitochondrijų frakcija be detergento poveikio. Kontrolė – buferis su detergentu.

#### **2.3.2. Mitochondrijų subląstelinės frakcijos**

*Citochromo c oksidacijos įvertinimui* Cit c buvo redukuotas 1mM DTT iki A550/A565 santykio, didesnio nei 6. Mitochondrijų frakcija homogenizuota 40 mM fosfatiniame buferyje, pH 7,4 ir inkubuota 60 s. Reakcija pradėta pridėjus

(4 mg/ml) Cit c, kurio oksidacija matuota bangos ilgiui esant 550 nm (Tolbert, 1974; Benkova et al., 1999). Cit c oksidacijos aktyvumui palyginti buvo naudojami mitochondrijų preparatai, paveikti detergentu tritonu X-100 (Tolbert, 1974; Bartoli et al., 2000).

*F-ATP-azės aktyvumui nustatyti* naudota terpė: 30 mM TRIS-MES, 3 mM ATP ir 3 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM KCl – dedant į reakcijos terpę tik MgSO<sub>4</sub> arba MgSO<sub>4</sub> bei KCl kartu (Gallagher, Leonard, 1982; Тихая, Максимов и др., 1984). Reakcija pradėta pridėjus ~50 μg baltymo, vyko +38<sup>0</sup>C temperatūroje 30 min., sustabdyta pavyzdžius greitai atšaldant ir pridėjus 1 % amonio molibdato. Mėginiai praskiesti iki 10 ml distiliuotu H<sub>2</sub>O ir pridėta 0,2 ml SnCl<sub>2</sub>. (Gallagher, Leonard, 1982). Spalvinė reakcija matuota, esant bangos ilgiui λ 720 nm. ATP-azinis aktyvumas nustatytas pagal susidariusio neorganinio fosforo (P<sub>n</sub>) kiekį (Жуков, Верещагин, 1970). KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> kalibracijos kreivė paruošta pagal A.Žukovo ir A.Vereščagino metodiką (Жуков, Верещагин, 1970). Mitochondrijų F-ATP-azės aktyvumas nustatytas naudojant specifinį inhibitorių – natrio azidą (NaN<sub>3</sub> – 50 mM).

*Mitochondrijų subląstelinės frakcijos funkcionalumas nustatytas matuojant deguonies sugėrimą* Klarko tipo elektrodu 25 <sup>0</sup>C temperatūroje (Bergman et al., 1980; Journet, Douce, 1983). Matavimui mitochondrijų frakcija (nuo 0,5 iki 1,0 mg baltymo) įdėta į 10 mM kalio fosfatinio buferio, pH 7,2 terpę su 300 M manito, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl priedais (Journet, Douce, 1983).

*Mitochondrijų frakcijos užterštumas įvertintas* naudojant plazmolemos frakcijos ATP-azės specifinį inhibitorių dietilstilbestrolą (50 mM), veikiantį, kai terpės pH 6,5 (Jodinskienė, 2005), bei tonoplasto frakcijos ATP-azės inhibitorių kalio nitrata (50 mM). Tonoplasto frakcijos inhibitoriaus poveikis analizuotas, kai terpės pH 7,0 ir 7,5 remiantis optimaliu tonoplasto frakcijos, išskirtos iš kviečių koleoptilių, ATP-azės aktyvumo pH (Merkys et al., 1995). Kontrolinis ATP-azės aktyvumas įvertintas, kai terpės pH buvo toks pat kaip ir inhibitorių, bei kas kartą prilygintas 100 %.

## **2.4. Intaktinių organoidų preparatų subfrakcionavimas**

Intaktiniams chloroplastų ir mitochondrijų preparatams subfrakcionuoti buvo taikytos osmotinio šoko (užšaldymo-atšildymo) procedūros (Musser, Theg, 2000; Anderson, 2001). Organoidų frakcijos homogenizuotos ir užšaldytos 10 mM TRIS-HCl, pH 8,0, buferyje, turinčiame 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Organoidų suspensijos ir terpės santykis – 1:7. Chloroplastų membranos nusodintos centrifuguojant 10 min. prie 10 000 g, mitochondrijų – 10 min. prie 16 000 g, esant 0-4 °C temperatūrai. Gauti membranų vezikulių preparatai nuo galimų organoidų skystų fazių likučių buvo perplaunami 10 mM TRIS-HCl, pH 8,0 buferiu ir nusodinami tuose pačiuose centrifugavimo režimuose.

Mitochondrijų membranų ir matrikso baltymų kompleksų atskyrimui buvo taikyta ir kita metodika (Hájek, et al., 2004) kada po šoko procedūros mitochondrijų membranų ir matrikso baltymų kompleksai buvo purtomi su rafinuotu saulėgražų aliejumi, po to centrifuguojami 10 min. prie 20 000 g (0-4 °C) ir atskiriamos trys fazės: 1 – laisva nuo baltymų aliejaus fazė, 2 – interfazė, turinti membranines struktūras su tvirtai sujungtais baltymais, 3 – vandeninė fazė, turinti mitochondrijų matrikso baltymus.

### **2.4.1. Chloroplastų ir mitochondrijų membranų vezikulių preparatų soliubilizacija**

Chloroplastų membranų bei pirmame darbų etape mitochondrijų membranų vezikulių preparatai buvo soliubilizuoti, t.y. veikiant nejoniniu detergentu tritonu X-100 pervesti į tirpią būseną (Jones, 1994). Buvo naudojama soliubilizacijos terpė, kurios sudėtis: 50 mM TRIS-HCl buferis, pH 7,8 su 1 mM EDTA, 1 mM PMSF bei tritono X-100 priedais (Anisimovienė et al., 1998; Jones, 1999). Atliekant bandymus buvo parinkta optimali tritono X-100 koncentracija ir baltymo su nejoniniu detergentu santykis (Anisimovienė, Merkys, 2000). Soliubilizacija vyko 4 °C temperatūroje 60 min. Soliubilizuoti baltymų preparatai buvo centrifuguojami 20 min. prie 24000 g.

Vėliau, mitochondrijų membranų vezikulės buvo soliubilizuojamos kitu nejoniniu detergentu – digitoninu terpėje, kurios sudėtis: 50 mM Tris-HCl, pH

7,0, 0,1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 10 % (tūris/tūriui) glicerolio, 1 mM PMSF. Nejoninio detergento digitonino ir baltymo santykis (1:5), galutinė digitonino koncentracija buvo 1 % (Niznik et al., 1986; Eubel et al., 2003).

Soliubilizuoti membranų baltymai nuo detergentų (tritonu X-100 ar digitonino) pertekliaus ir kitų mažamolekulinių junginių buvo valomi Amberlitu XAD-7 arba leidžiant per Sefadekso G-25 kolonėlę. Eliucijos buferis 50 mM TRIS-HCl, pH 7,5 arba 5,5 – chloroplastų membranoms ir pH 7,0 – mitochondrijų membranoms.

#### **2.4.2. Stromos ir matrikso baltymų išsodinimas**

Stromos ir matrikso – skystų organoidų fazių tirpūs baltymai buvo išsodinami amonio sulfatu iki 80 % prisotinimo. Baltymai buvo nusodinami centrifuguojant 30 min. prie 4500 g, pervedami į tirpią būseną 50 mM TRIS-HCl buferiu, pH 5,5 ar 7,5 – stromai arba pH 7,0 – matriksui. Nuo amonio sulfato bei kitų mažamolekulinių junginių priemaišų buvo valomi Sefadekso G-25 kolonėlėje. Eliucijos buferis – 50 mM TRIS-HCl, atitinkamo pH.

#### **2.5. Specifiškai sujungtų IAR-ASB kompleksų formavimosi galimybių tyrimai ir kompleksų charakteristikų įvertinimas**

Chloroplastų ir mitochondrijų organoidų bei jų subkompartmentų preparatai buvo naudojami IAR sąveikos su baltymais tyrimams. Tam taikytos įprastos kitų ląstelės kompartmentų IAR-ASB kompleksų formavimosi ir charakterizavimo tyrimams procedūros (Hertel, 1979; Merkys et al., 1988; Даргинавичене, 1992; Anisimovienė et al., 2000; Jodinskienė, 2005; Kepinski, Leyser, 2005; Dharmasiri et al., 2005 a; Carrier, 2008).

IAR ir ASB sąveika vyko terpėje, kurios sudėtis: 50 mM TRIS-HCl buferis, įvairių pH ir 1 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Intaktinių organoidų tyrimo atveju įvesta 300 mM atitinkamo osmotiko (sorbito arba manito). Žymėtos <sup>14</sup>C-IAR koncentracija –  $5 \times 10^{-7}$  M, nežymėtos <sup>12</sup>C-IAR –  $10^{-4}$  M. Kompleksų susidarymo inkubacija vyko 30 min., +25±2 °C temperatūroje. Prijungtos <sup>14</sup>C-IAR kiekis išreikštas impulsais per minutę baltymo vienetui. Tyrimams

naudota  $^{14}\text{C}$ -IAR, kurios specifinis aktyvumas 1,85-2,22 GBq-mmol (American Radiolabeled Chemicals, Inc.). Tokiu būdu 100  $^{14}\text{C}$ -IAR impulsų atitinka 10 nM.

IAR-baltymų kompleksų formavimasis buvo tiriamas kompleksų nusodinimo trichloracto rūgštimi (TCR) metodu (Hertel et al., 1972; Ray et al., 1977 b). 10-12 % TCR paveikti IAR-ASB kompleksai buvo nusodinami centrifuguojant (30 min., kai 4 000 g) arba filtruojant per membraninius filtrus (porų diametras 0,2  $\mu\text{m}$ ). Į kompleksus įsijungusios  $^{14}\text{C}$ -IAR impulsai (per 1 min. ir/ar per 5 min. ir/ar per 10 min.) buvo skaičiuojami Bray's sistemoje santykiu 1:10, radiospektrometru Beckman LS 1801 (JAV).

Artimos cheminės struktūros indolo junginiai, t.y. junginiai turintys analogišką žiedo struktūrą ir karboksilo grupę: IPR, ISR, IKR, IPVR bei auksino transporto inhibitoriai: NFR, TJBR tirti pagal jų gebėjimą konkuruoti su  $^{14}\text{C}$ -IAR dėl prisijungimo vietų IAR-ASB kompleksuose. Konkuruojančių ligandų bei inhibitorių koncentracija –  $10^{-4}$  M.

*Susiformavusių IAR-ASB kompleksų charakteristikų įvertinimas.*  $^{14}\text{C}$ -IAR ligando koncentracijos reikalingos ASB prisotinimui, pusiausvyros disociacijos konstantai ( $K_D$ ), prisijungimo vietų skaičiui (n) įvertinti buvo atlikti prisotinimo bandymai, naudojant skirtingas  $^{14}\text{C}$ -IAR koncentracijas nuo  $10^{-8}$  iki  $10^{-4}$  M, pridėdant didelį kiekį ( $10^{-4}$  M)  $^{12}\text{C}$ -IAR.

$^{14}\text{C}$ -IAR išstūmimas iš IAR-baltymų kompleksų buvo tiriamas didinant nežymėtos IAR koncentraciją nuo  $5 \times 10^{-7}$  iki  $10^{-4}$  M,  $^{14}\text{C}$ -IAR koncentracija buvo  $5 \times 10^{-7}$  M.  $EC_{50}$  (efektyvi koncentracija) įvertinta pagal nežymėtos IAR koncentraciją, 50 % sumažinančią specifiskai prisijungusios  $^{14}\text{C}$ -IAR kiekį (Ray et al., 1977 a). Rezultatai apskaičiuoti naudojant *GraphPad quickcalcs* skaičiuotuvą ir *GraphPad Prism 4* programą (Miller JR, GraphPad Software Inc., San Diego CA, 2003).

## **2.6. Chloroplastų ir mitochondrijų ASB charakterizavimas**

Chloroplastų tirpūs stromos (skystų fazių) bei chloroplastų ir mitochondrijų membraniniai baltymai, išskirstyti nedematūriuojamosios (natyvios) PAAG

elektroforezės metodu (СафоноВ, СафоноВа, 1969; Laemmli, 1970). Koncentruojamasis gelis buvo 4,0 %, skirstomasis – 7,0 %. Sąveikaujančių su IAR baltymų natyvosios molekulinės masės, įvertintos, naudojant Sigma standartų rinkinį ( $\alpha$ -laktalbuminas – 14,2 kDa; karboninė anhidrazė – 29 kDa; ovalbuminas – 45 kDa; jaučio serumo albuminas – 66 kDa (monomeras); jaučio serumo albuminas – 132 kDa (dimeras); ureazė – 272 kDa (trimeras) ir ureazė – 545 kDa (heksameras)), tinkantį baltymų molekulių masių apskaičiavimui, nedenatūrojamomis sąlygomis, esant neutraliam pH (Gallagher, 1999).

Po elektroforezės, tam, kad būtų galima pamatyti praėjusių baltymų zonas, apskaičiuoti jų Rf, bei palyginti su žinomos molekulinės masės baltymais, viena ar dvi juostos buvo 30 min. fiksuojamos 12,5 % TCR ir dažomos kumasi brilliantine melsve (Kumasi Brilliant Blue R-250). Kitos baltymų juostos buvo naudotos IAR ir baltymų sąveikos tyrimams.

## 2.7. Statistinė duomenų analizė

Duomenys buvo išanalizuoti naudojant Microsoft Excel statistinės programos paketą – įvertintas rezultatų vidurkis (M), standartinė paklaida (SK), standartinis nuokrypis (SN):

$$SK = SN/\sqrt{N} ;$$

$$SN = \sqrt{\sum(y_i - y_{vid})^2 / N - 1}.$$

Rezultatų aritmetiniai vidurkiai skaičiuoti iš 3-5 bandymų. Aptariamais skirtumais reikšmingi, kai  $P \geq 0,95$ .

Susiformavusių IAR baltymų kompleksų charakteristikoms įvertinti rezultatai buvo skaičiuojami naudojant *GraphPad quickcalcs* skaičiuotuvą ir *GraphPad Prism* programą (Miller JR, GraphPad Software Inc., San Diego CA, 2003).

$$\text{Standartinė lygtis } Y = B_{\max} \cdot X / (X + K_d).$$

$$\text{Bendro prisijungimo kreivės lygtis } Y = B_{\max} \cdot X / (X + K_d) + NS \cdot X;$$

$$K_D = EC_{50} - Z.$$

Y – bendras radioligando prisijungimas (specifinis + nespecifinis); X – nežymėto ligando koncentracija; Z – žymėto ligando koncentracija;  $EC_{50}$  –

nežymėto ligando koncentracija, 50 % sumažinanti specifinį prisijungimą;  $B_{\max}$  – receptoriaus prisijungimo vietų maksimalus tankis (n);  $K_D$  – radioligando pusiausvyros disociacijos konstanta; NS – nespecifinis prisijungimas (Motulsky, Christopoulos, 2003).



### 3. TYRIMŲ REZULTATAI

#### 3.1. IAR-ASB kompleksų formavimosi galimybių tyrimai pupelių chloroplastų ir mitochondrijų subląstelinėse frakcijose

##### 3.1.1. Optimalaus pH IAR-ASB kompleksų susidarymui nustatymas

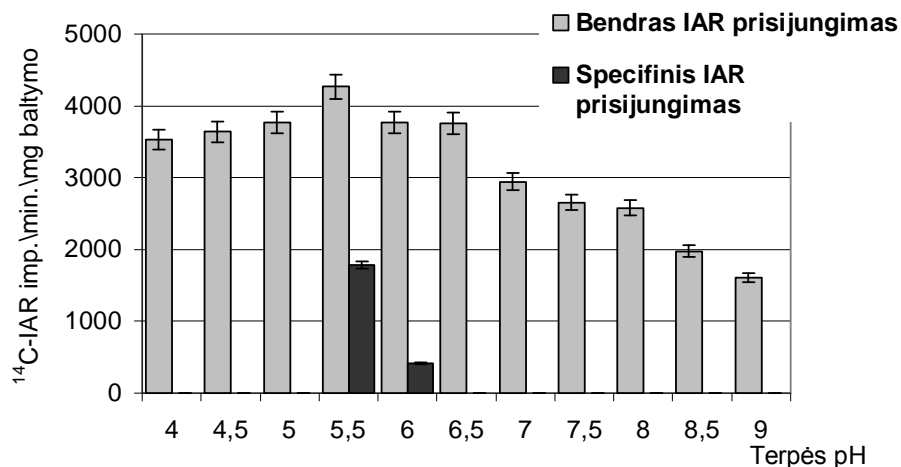
Ieškant atsakymo į klausimą ar pupelių lapų chloroplastuose ir hipokotilių tįstančių ląstelių mitochondrijose gali formuotis IAR-ASB kompleksai, kokios optimalios IAR-baltymų kompleksams susidarymo sąlygos ir kokie šių kompleksų ypatumai buvo tiriama IAR ir baltymo sąveikos priklausomybė nuo terpės pH, kuri yra svarbi charakteristika specifiniam IAR ir baltymo sąveikavimui (Ray et al., 1977 a; Löbler, Klämbt, 1985 a; Merkys et al., 1988; Даргинавичене 1992; Jones, 1994; Anisimovienė et al., 2000).

Tam, pirmajame darbų etape, tyrimai buvo atlikti chloroplastų ir mitochondrijų subląsteliniuose preparatuose, išskirtuose osmotiku terpėse naudojant sacharozę, remiantis metodikomis taikytomis chloroplastų ir mitochondrijų DNR ir RNR analizei (Кулаева и др., 1979; Дрейпер, 1991). Subląstelių frakcijų gryninimai atlikti laiptiniuose sacharozės gradientuose. Šis osmotikas paprastai yra naudojamas gryninimui įvairių ląstelės kompartmentų: plazmolemos, endoplazminio tinklo, tonoplasto preparatų, tiriant IAR-ASB kompleksų formavimosi galimybes (Ray, 1977 a; Hertel 1979; Merkys et al., 1988; Даргинавичене, 1992; Anisimovienė et al., 2000).

IAR sąveikos su chloroplastų ir mitochondrijų baltymais galimybė buvo analizuota prisijungimo terpės pH skalėje nuo 4,0 iki 9,0, kas pH 0,5. Dėmesys kreiptas į bendrą ir specifinį  $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimą bei susiformuojančių  $^{14}\text{C}$ -IAR-ASB kompleksų specifiškumą, taip pat kaip ir tiriant bei vertinant kituose ląstelių kompartmentuose vykstančią IAR-ASB sąveiką (Ray et al., 1977 b; Hertel, 1979, Löbler, Klämbt, 1985 a; Даргинавичене, 1992; Anisimovienė et al., 2000).

**Optimalaus pH IAR-ASB kompleksų susidarymui nustatymas chloroplastų preparatuose.** Bendras  $^{14}\text{C}$ -IAR įsijungimas į chloroplastų

preparatus buvo konstatuotas visuose pavyzdžiuose, į kuriuos buvo įvedama  $5 \times 10^{-7}$  M  $^{14}\text{C}$ -IAR koncentracija, terpės pH esant nuo 4,0 iki 9,0 (10 pav., 3 priedas). Šiuo atveju  $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungia prie visų didelio ir mažo giminingumo prisijungimo vietų baltyme (Ray et al., 1977 b).



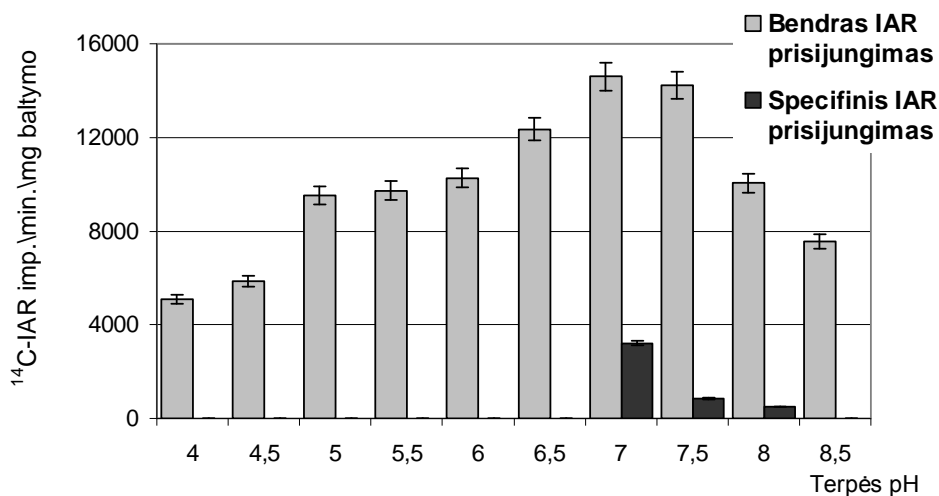
**10 pav.** IAR-ASB kompleksų formavimosi chloroplastų frakcijoje priklausomybė nuo terpės pH.

Kaip jau minėta, pagrindinis dėmesys buvo kreipiamas į specifinį prisijungimą, gaunamą iš bendro prisijungimo atėmus nespecifinį prisijungimą ir parodantį kiek yra specifiškai prijungtos  $^{14}\text{C}$ -IAR (Ray et al., 1977 b). Tam radioaktyvumas buvo matuojamas pavyzdžiuose, į kuriuos pridedama ne tik žymėto hormono, bet ir labai didelis nežymėto ligando perteklius, išstumiantis žymėtą hormoną iš tokių didelio giminingumo vietų, kurių  $K_D$  gerokai mažesnė, negu pridėta nežymėto hormono koncentracija. Taigi, nespecifinį sujungimą sudaro ne tik mažo giminingumo prisijungimas, bet ir likęs laisvas žymėtas hormonas (Ray et al., 1977 b).

Atliktas didelis skaičius bandymų prisijungimo terpės pH skalėje, leido daryti prielaidą apie galimą ASB funkcionavimą chloroplastuose – optimalus terpės pH 5,5, tačiau pastoviai atsikartojančių rezultatų gauti nepavykdavo. Pavyzdžiui, atlikus 7 bandymus tik 4 iš jų buvo konstatuotas specifiškai sujungtų kompleksų formavimasis terpės pH esant 5,5. Be to, prijungtos IAR kiekis baltymo vienetui bei kompleksų specifiškumas svyravo – skyrėsi kelis ar net keliasdešimt kartų. Keletoje bandymų nedidelis specifiškai prisijungusios

$^{14}\text{C}$ -IAR kiekis nustatytas ir terpės pH esant 6,0, tačiau prijungtos žymėtos IAR kiekis buvo paklaidos ribose. Paveiksle ir priede esančioje lentelėje pateikti IAR ir ASB sąveikos galimybę parodančių bandymų duomenų, osmotiku išskyrimo metu naudojant sacharozę ir frakcijų valymą atliekant laiptiniame sacharozės gradiente, atsikartojusių bandymų vidurkiai (10 pav., 3 priedas).

**Optimalaus pH IAR-ASB kompleksų susidarymui nustatymas mitochondrijų preparatuose.** IAR-ASB kompleksų formavimosi priklausomybės nuo terpės pH tyrimų rezultatai mitochondrijų frakcijoje, išgrynintoje laiptiniame sacharozės gradiente parodė, kad bendras  $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimas vyksta visuose terpės pH (11 pav., 3 priedas). Mitochondrijų frakcijoje bendras prisijungusios žymėtos IAR kiekis baltymo vienetui prie visų didelio ir mažo giminingumo prisijungimo vietų 3 kartus didesnis nei bendras prisijungusios  $^{14}\text{C}$ -IAR kiekis, tenkantis miligramui baltymo chloroplastų frakcijoje (3 priedas).



**11 pav.** IAR-ASB kompleksų formavimosi priklausomybė nuo prisijungimo terpės pH pupelių hipokotilių mitochondrijų frakcijoje.

Gautais duomenimis, specifinė IAR ir ASB sąveika mitochondrijų frakcijoje vyksta terpės pH esant 7,0-8,0 (11 pav., 3 priedas). Optimalus terpės pH specifinių IAR-ASB kompleksų formavimuisi – 7,0, tačiau mitochondrijų frakcijoje rezultatų neatsikartojimas buvo dar didesnis nei chloroplastų frakcijoje.

Esant optimaliam terpės pH 7,0, specifiskai prisijungtos  $^{14}\text{C}$ -IAR kiekis mitochondrijų baltymo vienetui buvo beveik du kartus didesnis nei chloroplastų baltymo vienetui, esant optimaliam kompleksų formavimuisi terpės pH 5,5, tačiau mitochondrijų preparatuose susiformuojančių IAR-ASB kompleksų specifiskumas mažesnis nei chloroplastų preparatuose susiformuojančių kompleksų specifiskumas (3 priedas).

Tokiu būdu, tyrimų, atliktų su organoidų subląsteliniais preparatais, kai išskyrimo metu osmotiku naudojama sacharozė, rezultatai parodė specifiskai sujungtų IAR-ASB kompleksų formavimosi galimybę abiejuose organoiduose bei  $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimo prie ASB priklausomybę nuo terpės pH. Tačiau rezultatų neatsikartojimas ir svyravimas kėlė abejonių, visų pirma, dėl galimo organoidų intaktiskumo ir funkcionalumo užtikrinimo, osmotiku išskyrimo metu naudojant sacharozę ir frakcijų gryninimą atliekant laiptiniame sacharozės gradiente. Šią mūsų prielaidą parėmė ir literatūroje aptikta nuomonė (Moppe и др., 1987), kad chloroplastai valomi sacharozės tankio gradiente gali beveik pilnai prarasti gebėjimą fiksuoti  $\text{CO}_2$ . Todėl buvo pradėta ieškoti naujų išskyrimo metodų ir IAR-ASB kompleksų formavimosi tyrimo sąlygų, įvertinant organoidų intaktiskumą ir funkcionalumą.

### **3.1.2. Chloroplastų ir mitochondrijų organoidų intaktiskumo ir funkcionalumo užtikrinimo svarba tiriant IAR-ASB kompleksų formavimąsi**

Eksperimento būdu, taikant metodikas naudotas: endogeninių auksinų buvimo ir jų sintezės galimybės chloroplastų ir mitochondrijų preparatuose tyrimui (Fregeau, Wightman 1983), citokininų kiekio ir būklės analizei (Benkova et al., 1999), specifiskai sujungtų citokininų-baltymų kompleksų formavimosi tyrimui (Lyukevich et al., 2002) bei įvertinant išskirtų chloroplastų ir mitochondrijų organoidų intaktiskumą ir funkcionalumą, buvo pasirinktos šių organoidų frakcijų išskyrimo ir gryninimo metodikos, nurodytos Metodologijos 2.2.1. ir 2.2.2. skyriuose.

### 3.1.2.1. Chloroplastų ir mitochondrijų subląstelinių frakcijų įvertinimas

Dažniausiai žymeniu chloroplastų identifikavimui naudojamas chlorofilo nustatymas (Arnon, 1949; Bergman et al., 1980), tačiau toks testas neleidžia atskirti ar matuojamas laisvų tilaikoidų, ar intaktnio organoido chlorofilas (Moppe, 1990). Todėl chloroplastų organoidų intaktiškumas ir fiziologinis aktyvumas buvo įvertintas kitais metodais, matuojant *deguonies susidarymą fotosintezės metu ir fericianido fotoredukciją chloroplastų subląstelinės frakcijos*: a) išskirtos osmotiku terpėse naudojant sacharozę ir frakcijos gryninimą atliekant laiptiniame sacharozės gradiente, b) osmotiku išskyrimo terpėse naudojant sorbitą ir frakcijos gryninimą atliekant laiptiniame perkolio gradiente, c) negrynintos.

Rezultatai gauti matuojant nuo CO<sub>2</sub> priklausomą O<sub>2</sub> susidarymą fotosintezės metu (Mills, Joy, 1980) ir fericianido fotoredukciją (Кулаева и др., 1979; Reeves, Hall, 1980; Николаева, 2001) parodė, kad negrynintų chloroplastų frakcija turi žymiai mažesnę intaktinių ir funkcionalių chloroplastų procentą (6 lentelė), nei abi skirtinguose gradientuose grynintos frakcijos. Negrynintų chloroplastų subląstelinėje frakcijoje organoidų intaktiškumas – 48,8±1,4 %. Chloroplastų frakcija, išskirta osmotiku homogenizavimo ir perplovimo terpėse naudojant sorbitą ir frakcijos gryninimą atliekant perkolio laiptiniame gradiente, turi net 19 % daugiau intaktiškų ir funkcionalių organoidų, nei frakcija, kurios išskirimui ir/ar gryninimui kaip osmotikas buvo naudojama sacharozė ir net 40 % daugiau nei negrynintų chloroplastų frakcija.

6 lentelėje pateikti rezultatai rodo, kad gerai išlaikančią intaktiškumą ir funkcionalumą chloroplastų subląstelinę frakciją iš pupelių lapų galima gauti tik išskyrimui osmotiku naudojant sorbitą, o frakcijos gryninimą atliekant perkolio gradiente. Šie duomenys koreliuoja su literatūros šaltiniuose aptiktais duomenimis (Mills, Joy, 1980), intaktiškus ir gerai išlaikančius fiziologinį aktyvumą chloroplastus iš žirnių lapų pavyksta gauti frakciją gryninant perkolio laiptiniame gradiente. Taip išvalytų chloroplastų intaktiškumas –

93 %, o jų fiziologinis aktyvumas 1,6-2,1 karto didesnis, nei nevalytų, kurių intaktiškumas tik 53 %.

**6 lentelė.** Chloroplastų subląstelinės frakcijos išskyrimo sąlygų įtakos organoidų intaktiškumui ir funkcionalumui palyginimas

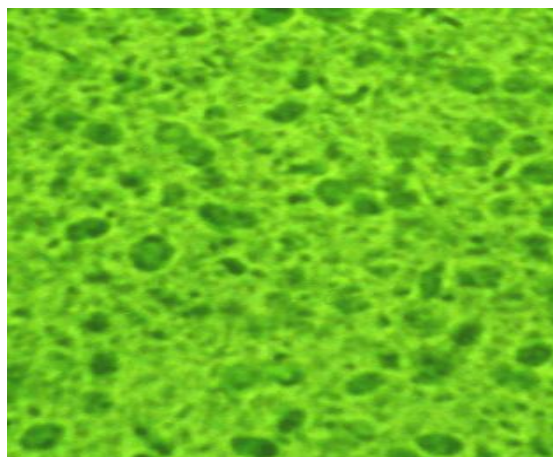
Charakteristikos	Negryninta chloroplastų frakcija	Chl. frakcija išgryninta sacharozės gradientu	Chl. frakcija išgryninta perkolio gradientu
Intaktiškumas, %*; M±SK	48,8±1,4	72,5±3,0	91,5±3,1
O <sub>2</sub> susidarymas μM/mg chlorofilo/val.; M±SK	54,9±2,7	78,8±3,1	113,0±6,1
Fotoredukuotas K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> mM/mg chlorofilo/val.; M±SK	369,8±13,8	590,2±20,5	720,3±24,1

\*- pagal abiejų matavimų vidurkį

Pagal O<sub>2</sub> susidarymo rezultatus chloroplastų preparatai vertinami kaip “blogi” jei O<sub>2</sub> išskiria mažiau nei 50 μmol/mg chlorofilo/val., išskiriantys 50-80 μmol/mg chlorofilo/val. – “priimtini”, 80-150 μmol/mg chlorofilo/val. – “geri” ir išskiriantys daugiau nei 150 μmol/mg chlorofilo/val. – “ypatingi” (Walker, 1980).

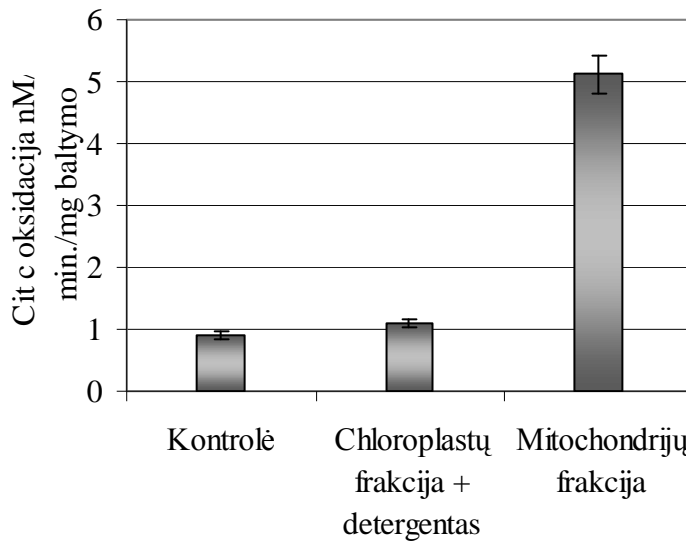
Pupelių lapų chloroplastų frakcija gaunama osmotiku išskyrimo metu naudojant sorbitą ir gryninimą atliekant laiptiniame perkolio gradientu išskiria 113,0±6,1 μmol O<sub>2</sub>/mg chlorofilo/val., todėl vertinama kaip „gerų“ chloroplastų frakcija ir yra tinkama naudoti funkcionavimo tyrimams.

**Įvertinus chloroplastų frakcijų preparatų užterštumą kai kuriais kitais**



**ląstelių kompartmentais** nustatyta, kad negrynintų chloroplastų frakcijos užterštumas branduoliais – 19 %, o išgrynintoje perkolio laiptiniame gradientu chloroplastų frakcijoje – branduolių premaišų neaptinkama (12 pav.)

**12 pav.** Išgryninta chloroplastų frakcija (did. 400×).



**13 pav.** Galimo chloroplastų frakcijos užterštumo mitochondrijomis įvertinimas.

Panaudojus Cit c kaip mitochondrijų žymenį nustatyta, kad perkolio laiptiniame gradiente išgryninti chloroplastų frakcijos preparatai yra tik 0,7-1,4 % užteršti mitochondrijų organoidais (13 pav.).

Gauti duomenys sutapo su literatūroje aptiktais duomenis, kad

perkolio gradiente išgryninta chloroplastų frakcija yra tinkama baltymų transporto, jų sintezės ir organoiduose lokalizuotų baltymų tyrimams (Journet, Douce, 1985; Gualberto et al., 1995).

*Mitochondrijų subląstelinės frakcijos intaktiškumas buvo įvertintas, panaudojant žymenį –citochromo c oksidazę.* Fermento oksidacija (7 lentelė) buvo matuojama išskirtų negrynintų ir išgrynintų perkolio gradientu mitochondrijų frakcijų preparatuose bei palyginta su Cit. c oksidazės aktyvumu mitochondrijų preparatuose, suardytuose, paveikus detergentu tritonu X-100 (Tolbert, 1974; Jackson et al., 1979; Bergman et al., 1980; Bartoli et al., 2000; Побежимова и др., 2001).

Iš 7 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad pupelių hipokotilių mitochondrijų subląstelinė frakcija, išgryninta laiptiniame perkolio gradientu turi 97,4±1,1 % intaktiškų organoidų, o negrynintų mitochondrijų subląstelinė frakcija 93,9±2,0 %.

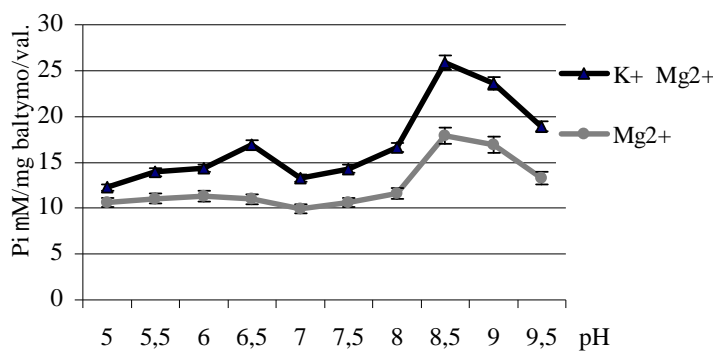
Literatūroje aptiktais duomenimis (Jackson et al., 1979) iš etioliuotų pupelių hipokotilių išskirtų negrynintų mitochondrijų frakcijos intaktiškumas – 94 %, išgrynintų perkolio gradientu – 98 %, o išskirtų iš špinatų lapų tik 83 % ir 84 %, atitinkamai.

**7 lentelė.** Mitochondrijų subląstelių frakcijų negrynintų bei išgrynintų perkolio gradiente intaktiškumo palyginimas

Charakteristikos	Negrynintų mitochondrijų frakcija	Grynintų perkolio gradiente mitochondrijų frakcija
Mitochondrijų frakcija Cit c oksidacija nM/min./mg baltymo; M±SK	13,5±1,4	5,1±0,5
Tritonu X-100 paveiktų mitochondrijų fr. Cit c oksidacija nM/min./mg baltymo; M±SK	192,1±2,0	198,8±3,8
Intaktiškumas, %; M±SK	92,9±1,2	97,4±1,1

Vertinant pagal fermentinį aktyvumą, perkolio gradiente išgrynintų mitochondrijų vidinės membranos intaktiškumas 95±3 %, išorinės – 93±4 % (Bergman et al., 1980). Nurodoma, kad tokį intaktiškumą turintys mitochondrijų subląstelių frakcijų preparatai tinkami naudoti biocheminiuose tyrimuose (Побежимова и др., 2001).

*Mitochondrijų preparatai taip pat buvo charakterizuoti pagal F-ATP-azinį aktyvumą, tam kad būtų galima patikrinti galimą frakcijos užterštumą tonoplasto ir plazmolemos membranomis.* Didžiausias F-ATP-azės aktyvumas pH skalėje nuo 5,0 iki 9,5, matuojant kas pH 0,5, nustatytas terpės pH esant 8,5 (14 pav.).

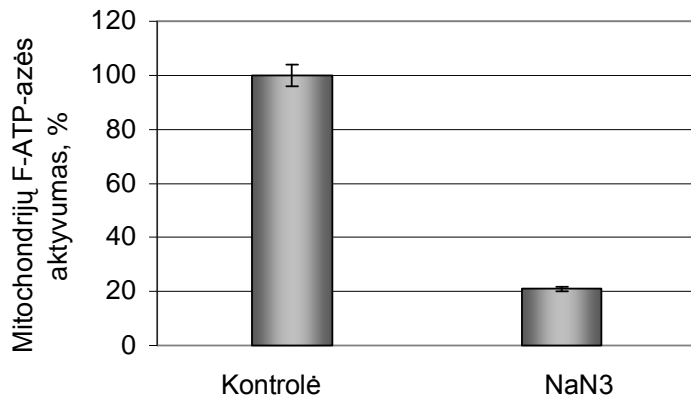


Nustatyta, kad specifinis mitochondrijų F-ATP-azės inhibitorius – natrio azidas (50 mM) mitochondrijų F-ATP-azės aktyvumą slopina 79 % (15 pav.).

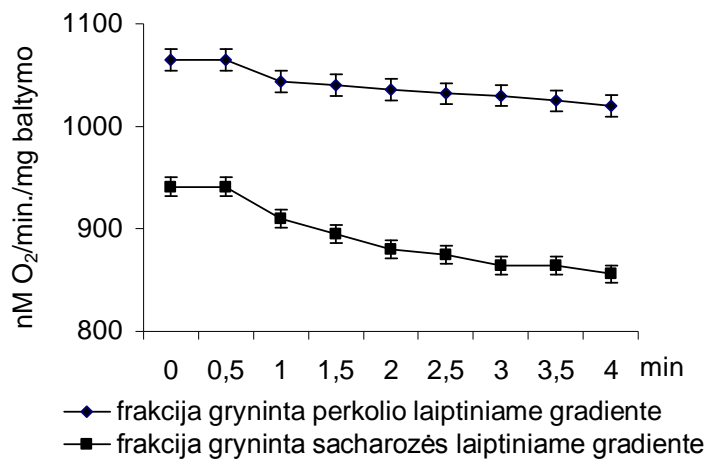
**14 pav.** Pupelių hipokotilių mitochondrijų ATP-azės aktyvumo priklausomybė nuo terpės pH bei K<sup>+</sup> ir Mg<sup>2+</sup> jonų.

Mitochondrijų, išskirtų iš kukurūzų šaknų ATP-azę šis inhibitorius slopina





**15 pav.** Pupelių hipokotilių mitochondrijų F-ATP-azės aktyvumas specifinio inhibitoriaus – NaN<sub>3</sub> poveikyje.



**16 pav.** Skirtingomis sąlygomis išskirtų ir išgrynintų mitochondrijų subląstelinių frakcijų deguonies sugėrimo palyginimas.

sugeria 16-17 % daugiau O<sub>2</sub> (1054±20 nM/min./mg baltymo), nei mitochondrijos, kurių išskyrimo metu terpėse kaip osmotikas buvo naudota sacharozė bei frakcijos gryninimas atliktas šio osmotiko gradiente (948±16 nM/min./mg baltymo).

Gauti rezultatai taip pat sutapo su literatūroje aptiktais duomenimis. Vertindami pagal Cit c oksidazės ir O<sub>2</sub> sugėrimo duomenis, intaktiškesnes mitochondrijas grynindami perkolio gradiente, nei sacharozės gavo ir Jackson ir kt. (1979). Kitos mokslininkų grupės (Bergman et al., 1980) nuomone, gryninimas perkolio tankio gradiente, leidžia gauti mitochondrijų preparatus,

75 % (Gallagher, Leonard, 1982) prie tokio pat pH.

*Mitochondrijų frakcijų, gautų taikant skirtingas išskyrimo terpes ir gryninimo gradientus, fiziologinis aktyvumas* įvertintas pagal deguonies sugėrimo duomenis (16 pav.), gautus matuojant Klarko tipo elektrodu (Bergman et al., 1980; Journet, Douce, 1983). Rezultatai parodė, kad mitochondrijų frakcija, kada išskyrimui kaip osmotikas naudojamas manitas, o gryninimas atliekamas perkolio tankio gradiente,

turinčius aukštą substrato oksidavimo greitį ir ADP : O<sub>2</sub> santykį artimą teorinei reikšmei.

***Mitochondrijų frakcijos užterštumo kai kuriais subląsteliniiais kompartmentais*** tyrimas parodė, kad mitochondrijų F-ATP-azės aktyvumą šiek tiek stabdė tonoplasto frakcijos inhibitorius – KNO<sub>3</sub>, kai terpės pH 7,0 ATP-azės aktyvumas buvo 93,6 %, o kai 8,5 – 95,7 %. Bei plazmolemos ATP-azės inhibitorius – dietilstilbestrolas kai terpės pH 6,5 – ATP-azės aktyvumas buvo 98,3 %, o terpės pH esant 8,5 – 99,3 %. Tai rodo, kad mitochondrijų frakcija buvo šiek tiek (~4-6 %) užteršta tonoplasto membranomis ir mažiau nei 2 % plazmolemos membranomis.

Taigi, mūsų abiejų organoidų subląstelinių frakcijų preparatų intaktiškumo ir funkcionavimo įvertinimo rezultatai parodė, kad: a) chloroplastų frakcijos, išskirtos osmotiku naudojant sorbitą ir frakcijos gryninimą atliekant perkolio gradiente ir b) mitochondrijų frakcijos, išskirtos osmotiku naudojant manitą ir frakcijos gryninimą atliekant perkolio gradiente organoidai yra intaktiški ir fiziologiškai aktyvūs, todėl tinkami IAR-ASB kompleksų formavimosi juose tyrimui.

### **3.1.2.2. Organoidų intaktiškumą ir funkcionalumą užtikrinančių terpių sudėties IAR-ASB kompleksų formavimuisi parinkimas**

Labai svarbus momentas IAR-ASB kompleksų formavimosi galimybių tyrimui chloroplastų ir mitochondrijų organoiduose buvo nustatyti ar išskirti intaktiški chloroplastai ir mitochondrijos išlieka fiziologiškai aktyvūs įprastinėje <sup>14</sup>C-IAR prisijungimo prie ASB terpėje bei ar organoidų intaktiškumas (funkcionavimas) išsilaiko ekspozicijai su <sup>14</sup>C-IAR reikiama laiką. Tam buvo palyginamos IAR-ASB kompleksų formavimosi ypatybės, intaktiškose chloroplastų ir mitochondrijų subląstelinėse frakcijose, <sup>14</sup>C-IAR prisijungimo terpėje – 50 mM TRIS-HCl buferis (įvairaus pH) su 1 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> priedais ir į tos pačios sudėties terpę pridedant 300 mM osmotiko – sorbito (chloroplastų frakcijai) arba manito (mitochondrijų frakcijai) tam, kad būtų užtikrinamas organoidų intaktiškumas ir funkcionavimas.

Išmatavus chloroplastų subląstelinės frakcijos fotoredukuoto kalio fericianido kiekį bei mitochondrijų frakcijos žymens Cit c oksidazės aktyvumą, nustatyta, kad  $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimo terpėje su osmotiku (sorbitu arba manitu, atitinkamai) intaktinai chloroplastai ir mitochondrijos geriau išlaiko funkcionalumą, todėl tokią terpių sudėtį ir naudojome tolimesniems tyrimams IAR-ASB kompleksų formavimuisi intaktiniuose organoiduose.

Šių tyrimų rezultatai taip pat parodė, kad išskirti chloroplastų ir mitochondrijų organoidai išlieka intaktiški ir funkcionuojantys ne tik ekspozicijai su  $^{14}\text{C}$ -IAR reikiama laiką (30 min.), bet ir ilgiau (120 min.) kada į IAR-ASB kompleksų formavimosi terpę įvedama osmotiko.

Išanalizavus IAR-ASB kompleksų formavimosi ypatybes prisijungimo terpėje pH 7,0 – mitochondrijoms ir pH 5,5 – chloroplastams su osmotiku ir be, nustatyta, kad sorbito ir manito priedas neturi neigiamos įtakos IAR-ASB sąveikai (8 lentelė). Terpės pH imti optimalūs IAR-ASB kompleksų formavimuisi tiriamuose organoiduose pagal ankstesnių eksperimentų rezultatus.

**8 lentelė.** IAR-ASB kompleksų formavimosi galimybės palyginimas  $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimo terpėje be osmotiko ir terpėje su osmotiku

Organoidas	Prisijungimo terpė	Bendras $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimas imp./min./mg baltymo; M±SK	Specifinis $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimas imp./min./mg baltymo; M±SK	IAR-ASB kompleksų specifiškumas, %; M±SK
Chloroplastai	be osmotiko	7500,4±1161,5	3487,5±205,8	46,5±3,4
	su sorbitu	10297,3±963,2	5254,2±299,2	51,0±2,9
Mitochondrijos	be osmotiko	14178,6±1381,5	4613,7±330,1	32,5±2,3
	su manitu	20080,3±1625,3	8035,5±557,6	40,0±2,8

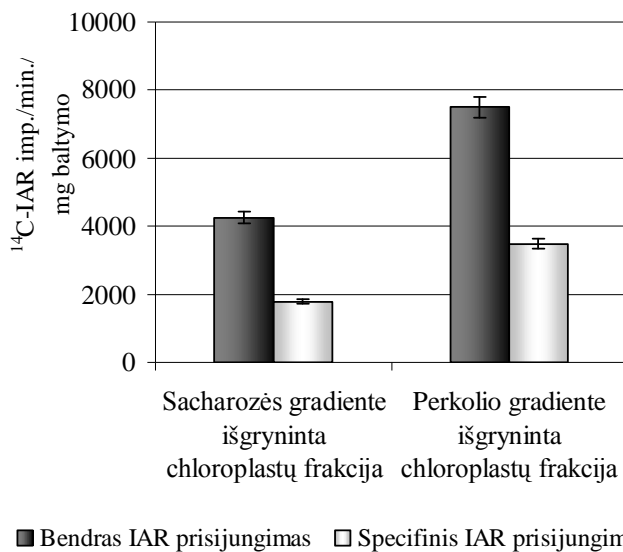
Gauti rezultatai patvirtino, kad tiriant IAR ir ASB sąveiką į terpę tikslinga dėti osmotiko, tam kad būtų užtikrinamas organoidų intaktiškumas ir funkcionavimas inkubacinio periodo metu. Abiejų organoidų atveju, įvedus į  $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimo terpes osmotiką, konstatuotas specifinio IAR prisijungimo suintensyvėjimas bei kompleksų specifiškumo padidėjimas. Chloroplastai, prisijungimo terpėje su sorbitu, specifiškai prisijungia 1,4 karto

daugiau  $^{14}\text{C}$ -IAR miligramui baltymo ( $5254,2 \pm 299,2$ ), o kompleksų specifiskumas padidėja iki  $51,0 \pm 2,9$  % (8 lentelė).

Mitochondrijų organoidus inkubuojant prisijungimo terpėje su manitu, kompleksų specifiskumas padidėja beveik 8 % iki  $40,0 \pm 2,8$  %, o specifiskai prisijungtos  $^{14}\text{C}$ -IAR kiekis miligramui baltymo – 1,7 karto ( $8035,5 \pm 557,6$ ). Abiem atvejais išauga ir bendras prisijungtos IAR kiekis (8 lentelė).

Taigi, atliktų palyginamųjų  $^{14}\text{C}$ -IAR-ASB kompleksų formavimosi tyrimų rezultatai parodė, kad specifinei IAR ir ASB sąveikai abiejų organoidų preparatuose labai svarbus yra jų intaktiškumo ir funkcionavimo užtikrinimas. Todėl tolimesniuose tyrimų etapuose organoidų išskyrimui, valymui ir gryninimui bei IAR-ASB sąveikų tyrimui buvo taikomos terpės ir procedūros, užtikrinančios šių subląstelinių struktūrų intaktiškumą ir funkcionavimą.

### 3.1.3. IAR-ASB kompleksų formavimasis intaktiniuose pupelių chloroplastų preparatuose



**17 pav.** IAR-ASB kompleksų formavimosi palyginimas chloroplastų frakcijoje.

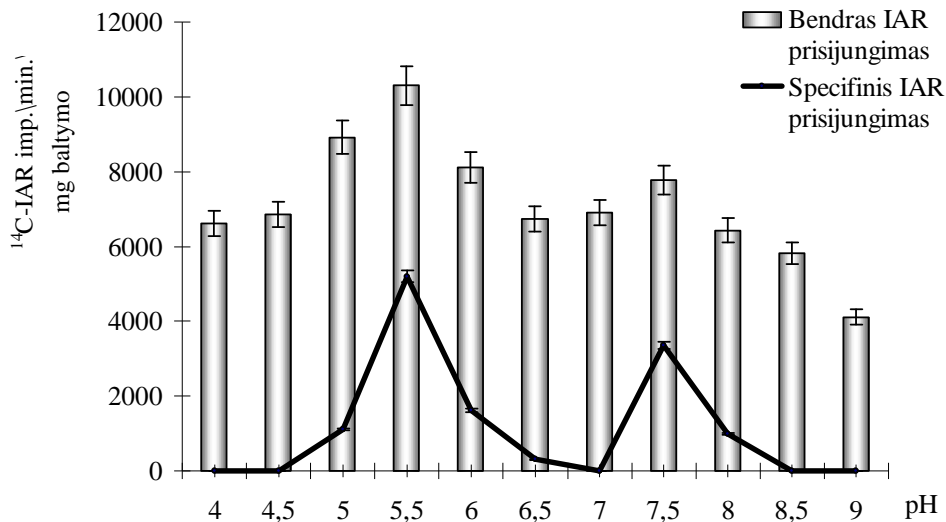
17,0, užtikrinus organoidų intaktiškumą.

Šie tyrimai parodė, kad specifinių IAR-ASB kompleksų formavimuisi optimalus pH yra 5,5. Palyginus su sacharozės gradiente išgrynintoje frakcijoje susiformuojančiais IAR-ASB kompleksais, specifiskai asociavusios su baltymo

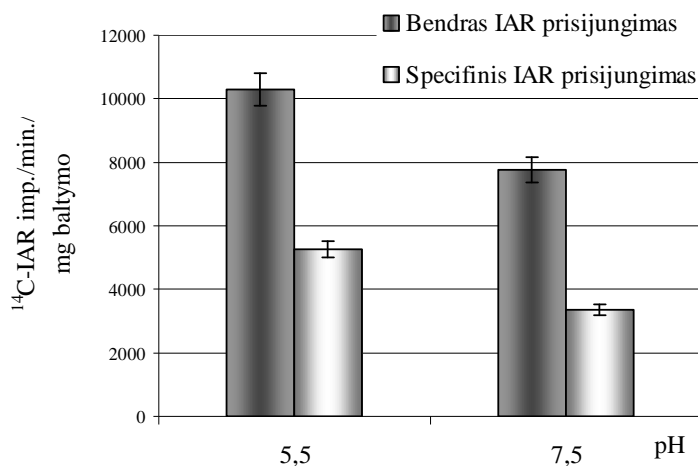
Kadangi organoidų intaktiškumo užtikrinimas (8 lentelė) turi įtakos IAR ir ASB sąveikai (esant anksčiau nustatytiems optimaliems terpės pH 5,5 ir 7,0, atitinkamai) tikslinga buvo dar kartą ištirti kompleksų formavimosi galimybes visoje prisijungimo terpės pH skalėje nuo 4,0 iki

vienetu  $^{14}\text{C}$ -IAR kiekis yra 2,9 karto, o kompleksų specifiškumas didesnis 10 % (17 pav., 3 ir 4 priedai).

Be to, kai chloroplastų frakcija buvo išskiriama užtikrinant jų intaktiškumą ir funkcionalumą aptiktas ir antras IAR prisijungimo saitas. Optimalus terpės pH IAR-ASB kompleksų formavimuisi – 7,5 (18 pav., 4 priedas).



**18 pav.** IAR prisijungimo ir IAR-ASB kompleksų formavimosi priklausomybė nuo terpės pH, intaktiškuose ir funkcionaliuose chloroplastuose.



**19 pav.** IAR prisijungimo ir IAR-ASB kompleksų formavimosi intaktiniuose ir funkcionaliuose chloroplastuose palyginimas.

Intaktiškų chloroplastų preparatuose terpės pH esant 7,5, ASB specifiškai prisijungia 1,56 karto mažiau  $^{14}\text{C}$ -IAR miligramui baltymo –  $3358,0 \pm 302,6$  imp./min., nei tada kai terpės pH 5,5 –  $5254,2 \pm 168,3$  impulsai 1 mg baltymo, mažesnis

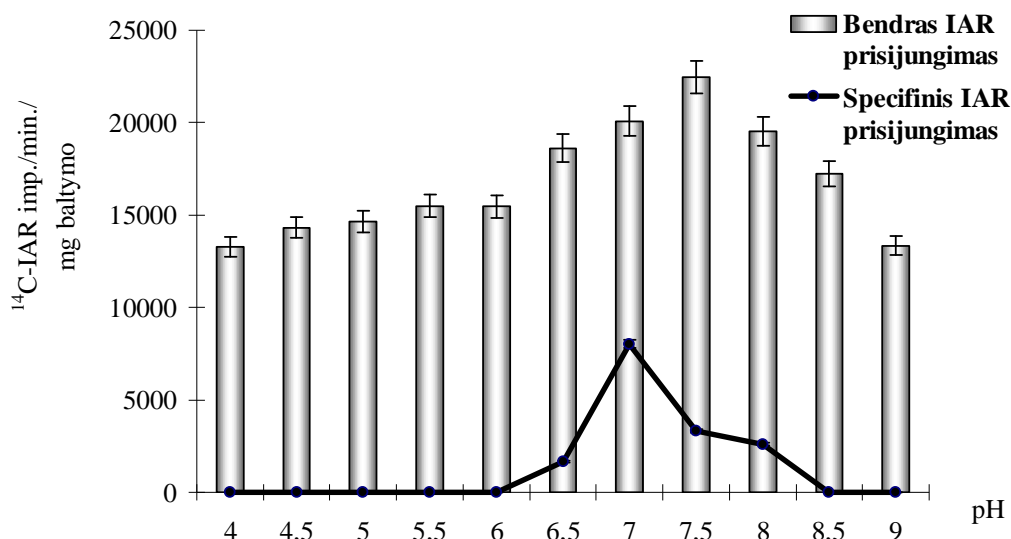
ir šių IAR-ASB kompleksų specifiškumas (18 ir 19 pav, 4 priedas):  $51,0 \pm 2,9$  % kai terpės pH – 5,5 ir  $43,2 \pm 3,9$  % kai terpės pH 7,5. Tačiau ir kai

prisijungimo terpės pH 5,5 ir kai pH 7,5 vyksta intensyvi specifinė IAR ir ASB sąveika, todėl visi vėlesni IAR-ASB kompleksų formavimosi chloroplastų subląstelinėje frakcijoje tyrimai buvo atliekami, esant abiemis pH reikšmėms. Taigi, intaktiškumo užtikrinimas turi teigiamos įtakos IAR ir ASB sąveikai chloroplastuose. Tik intaktiniuose organoiduose funkcionuoja antrasis IAR prisijungimo saitas – optimalus kompleksų formavimosi terpės pH 7,5.

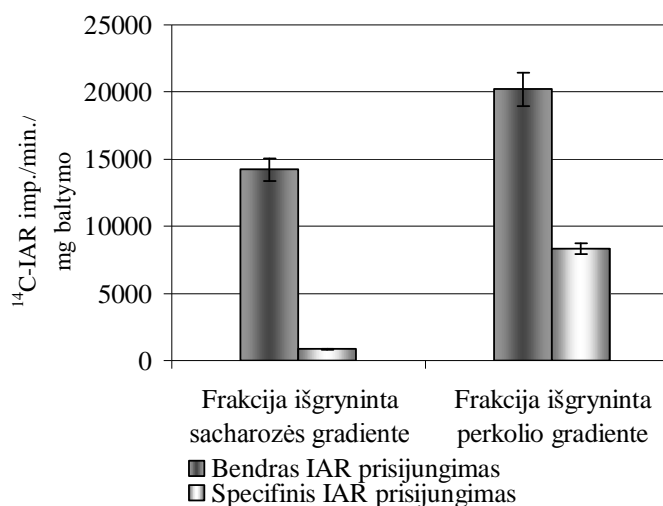
Literatūroje nurodoma, kad kituose ląstelės kompartmentuose taip pat gali funkcionuoti ne viena IAR prisijungimo vieta: kviečių koleoptilių plazmolemoje esant optimaliems terpės pH 5,5 ir 7,2 (Merkys et al., 1988; Даргинавичене, 1992), kukurūzų koleoptilių plazmolemoje pH 5,5 (Ray et al., 1977 b; Batt, Venis, 1976; Hertel, 1979; Nakamura, Ono, 1988; Kaur, Kapoor, 1989 ir kt.) ir pH 7,0 (Nave, Benveniste, 1984), pupelių hipokotilių plazmolemoje kai terpės pH 5,5 ir 7,5 (Anisimovienė, Jodinskienė, 1999; Jodinskienė, 2000; Anisimovienė et al., 2004, Jodinskienė, 2005), kviečių koleoptilių tonoplaste – pH 5,5 ir 8,0 (Merkys et al., 1988; Merkys et al., 1998; Darginavičienė, Novickienė, 2002).

#### **3.1.4. ASB kompleksų formavimasis intaktiniuose ir funkcionaliuose pupelių mitochondrijų preparatuose**

Mitochondrijų organoidų intaktiškumo ir funkcionalumo užtikrinimas, skirtingai nei chloroplastų, naujų IAR prisijungimo vietų neparodė. Specifinis IAR prijungimas konstatuotas prie tų pačių terpės pH – 6,5-8,0 (5 priedas, 20 pav.), kaip ir osmotiku frakcijos išskyrimui ir gryninimui naudojant sacharozę. Nors šiuo atveju didžiausias bendras  $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimo aktyvumas išryškėjo terpės pH esant 7,5 (20 pav.), tačiau specifiškai prijungtos  $^{14}\text{C}$ -IAR kiekis miligramui baltymo yra tik  $3324,7 \pm 262,1$  imp./min., o kompleksų specifiškumas –  $14,8 \pm 2,2$  %. Didžiausias specifiškai prijungtos IAR kiekis miligramui baltymo yra terpės pH esant 7,0 –  $8346,4 \pm 435,9$  imp./min. ir jis 2,5 karto didesnis nei kai terpės pH 7,5, o kompleksų specifiškumas padidėja net 27 % (20 pav., 5 priedas).



**20 pav.** IAR prisijungimo ir IAR-ASB kompleksų formavimosi priklausomybė nuo terpės pH, intaktiškose ir funkcionaliose mitochondrijose.



**21 pav.** Bendro ir specifinio IAR prisijungimo palyginimas mitochondrijų frakcijoje.

Kaip matome iš 3 ir 5 prieduose bei 21 paveiksle pateiktų duomenų, mitochondrijų intaktiškumo ir fiziologinio aktyvumo užtikrinimas, nors ir neturi įtakos kitų IAR prisijungimo saitų funkcionavimui ir optimaliam IAR-ASB kompleksų formavimosi pH, tačiau turi reikšmingą įtaką ASB ir IAR sąveikai –

bendrai ir specifiskai prijungtos  $^{14}\text{C}$ -IAR kiekiui baltymo vienetui bei susiformuojančių kompleksų specifiskumui. Šiuo atveju bendras prisijungusios IAR kiekis su 1 mg baltymo didėja 1,3 karto, specifinis IAR prisijungimas didėja – 2,5 karto, o kompleksų specifiskumas didėja 20 %, lyginant su tais atvejais, kai osmotiku išskyrimo ir gryninimo metu buvo naudojama sacharozė.

Taigi, šiame skyriuje pateikti tyrimų rezultatai rodo, kad organoiduose – chloroplastuose ir mitochondrijose gali formuotis specifiškai sujungti IAR-ASB kompleksai.

### **3.2. IAR-ASB kompleksų charakteristikos**

Susiformuojančių makromolekulės-baltymo ir ligando-fitohormono kompleksų charakterizavimui taikomi įvairūs testai, dažnai panaudojant radioligandus (Hertel, 1979; Löbler, Klämbt, 1985 a; Даргинавичене и др., 1992; Anisimovienė et al., 2000; Dharmasiri et al., 2005 a; Kepinski, Leyser, 2005; Carrier et al., 2008). Vienas pagrindinių kriterijų, vertinant makromolekulės sąveikos su ligandu principus, bei priskiriant baltymą prie auksiną sujungiančių baltymų yra baltymo-IAR komplekso pusiausvyros disociacijos konstanta –  $K_D$  (Reinard, Jacobsen, 1995), t.y. koncentracija ligando, kada esant pusiausvyrai, šis užima pusę receptoriaus (Motulsky, Christopoulos, 2003). Ši charakteristika leidžia spręsti apie makromolekulės (receptoriaus) giminingumą ligandui (Batt et al., 1976; Motulsky, Christopoulos, 2003). Susiformavusių IAR-ASB kompleksų charakterizavimui taip pat svarbūs: prisijungimo vietų skaičius –  $n$ , baltymo prisotinimo ligandu koncentracijos, IAR bei kitų ligandų sugebėjimo išstumti  $^{14}C$ -IAR iš prisijungimo vietų – įvertinimai (Löbler, Klämbt, 1985 a; Даргинавичене и др., 1992; Anisimovienė, Merkys, 2000). Todėl darbe buvo atlikti bandymai, siekiant įvertinti IAR-ASB kompleksų susiformuojančių chloroplastuose ir mitochondrijose charakteristikas, bei palyginti jas su kituose pupelių ir kitų augalų ląstelių kompartmentuose susiformuojančių IAR-ASB kompleksų charakteristikomis.

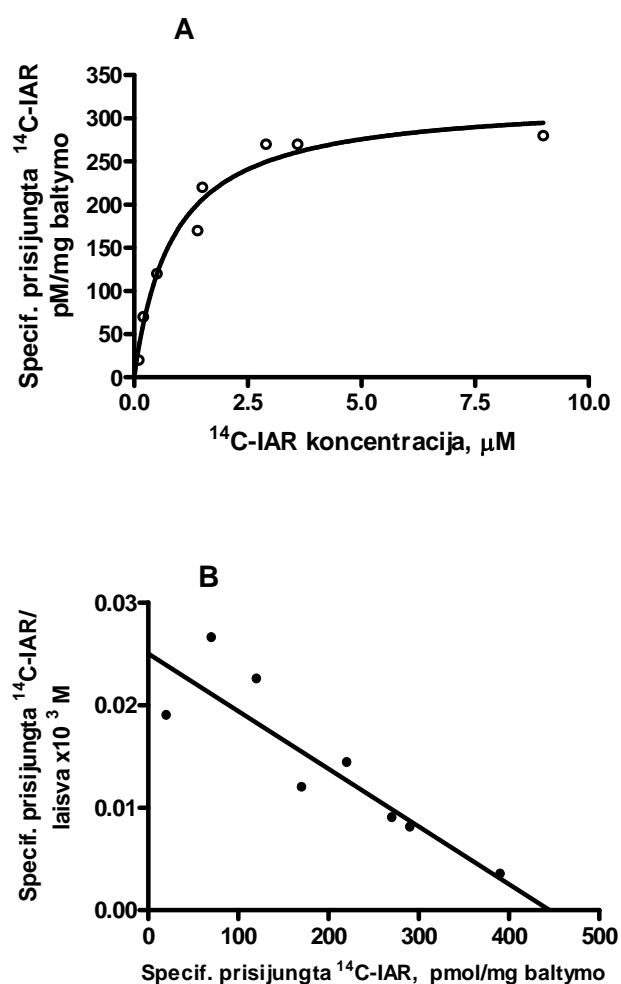
#### **3.2.1. Intaktinių chloroplastų frakcijos preparatuose susiformuojančių IAR-ASB kompleksų charakteristikos**

Norint nustatyti iš pupelių lapų išskirtų intaktinių chloroplastų subląstelinėje frakcijoje susiformuojančių IAR-ASB kompleksų charakteristikas buvo analizuojama specifinio prisijungimo priklausomybė nuo  $^{14}C$ -IAR koncentracijos prisijungimo terpėje (Löbler, Klämbt, 1985 a;



Даргинавичене и др., 1992; Anisimovienė et al., 2000; Jodinskienė, 2005; Carrier et al., 2008). Vertinimui buvo naudotas toks pat  $^{14}\text{C}$ -IAR koncentracijos intervalas ( $10^{-4}$ – $10^{-8}$  M), kaip ir analizuojant kompleksus susiformuojančius pupelių plazmoje (Anisimovienė et al., 2000; Jodinskienė, 2005) bei lelijainių augalų plazmoje (Löbler, Klämbt, 1985 a; Даргинавичене, 1992).

**IAR-ASB kompleksų susiformuojančių terpės pH esant 5,5 charakteristikos.** Sprendžiant pagal  $^{14}\text{C}$ -IAR prisotinimo kreivę (22 pav.), gautą terpės pH esant 5,5, pupelių lapų intaktinių chloroplastų ASB artėja prie prisotinimo  $^{14}\text{C}$ -IAR ligandu, šio koncentracijai siekiant  $8,5\text{--}9 \times 10^{-6}$  M.



**22 pav.** Intaktinių chloroplastų: **A** – ASB ir IAR specifinės sąveikos priklausomybė nuo  $^{14}\text{C}$ -IAR koncentracijos, terpės pH esant 5,5; **B** – Scatchard grafikas.

Kadangi duomenų apie šiuose ląstelės organoiduose susiformuojančius kompleksus bei jų charakteristikas literatūroje nėra, juos buvo galima palyginti tik su kituose ląstelės kompartmentuose susiformuojančių IAR-ASB kompleksų charakteristikomis. To pačio tiriamojo augalo – pupelių tįstančių hipokotilių plazmos preparatuose, kai prijungimo terpės pH 5,5, specifškai susiformavę IAR-ASB kompleksai artėja prie prisotinimo,  $^{14}\text{C}$ -IAR koncentracijai esant  $7\text{--}8 \times 10^{-7}$  M (Jodinskienė, 2005).

Kukurūzų plazmoje  $^{14}\text{C}$ -NAR prisijungimo prisotinimas

pasiekiamas, kai ligando koncentracija yra  $5-7 \times 10^{-7}$  M (Löbler, Klämbt, 1985 a). Kviečių koleoptilių ląstelių plazmolemos preparatuose, terpės pH esant 5,5 susiformuojančio kompleksų galimas dviejų lygių prisotinimas: pirmas  $\sim 1-4 \times 10^{-7}$  M ir antras  $1 \times 10^{-6}$  M  $^{14}\text{C}$ -IAR koncentracijoms (Даргинавичене, 1992).

Tokiu būdu buvo parodyta, kad intaktiniuose chloroplastuose funkcionuojančio ASB (optimalus kompleksų formavimosi pH 5,5) prisotinimas skiriasi nuo pupelių hipokotilių, kukurūzų koleoptilių plazmolemos ASB ir kviečių koleoptilių plazmolemos ASB pirmo prisotinimo.

$^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimo analizė G.Scatchard koordinačių sistemoje (Scatchard, 1949) intaktinių chloroplastų preparatuose terpės pH esant 5,5 (22 pav.) parodė, kad susiformuojančių IAR-ASB kompleksų disociacijos konstanta  $K_D=1,14 \pm 0,54 \times 10^{-5}$  M (6 priedas).

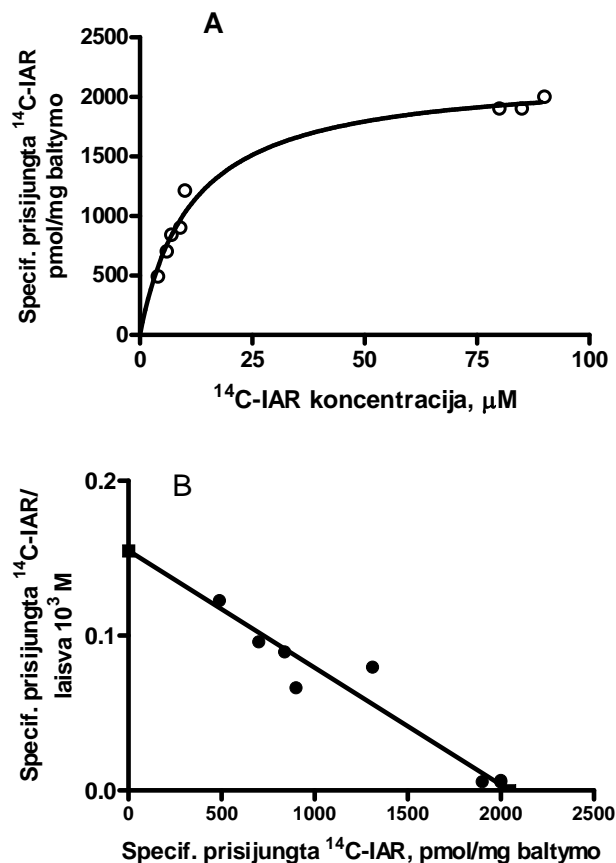
Ši kompleksą suformuojančio ASB giminingumas IAR ligandui yra mažesnis nei pupelių hipokotilių plazmolemoje, prie tokio pat pH, funkcionuojančio baltymo, kada susiformuojančių IAR-ASB kompleksų  $K_D=1,65 \pm 0,51 \times 10^{-7}$  M (Jodinskienė, 2005; Jodinskienė, Anisimovienė, 2006). Giminingumas taip pat skiriasi nuo IAR-baltymų kompleksų ( $K_D 2,5 \times 10^{-6}$  M) ir NAR-baltymų kompleksų ( $K_D 5-7 \times 10^{-7}$  M) susiformuojančių kukurūzų plazmolemoje (Ray et al., 1977 b) bei nuo IAR kompleksų su baltymais susiformuojančių kviečių koleoptilių ląstelių plazmolemoje ( $K_D 1,1 \times 10^{-8}$  M), kai terpės pH 5,5 (Даргинавичене, 1992; Даргинавичене и др., 1992; Darginavičienė, Novickienė, 2002).

Nuo kituose ląstelės kompartmentuose lokalizuotų ASB (terpės pH esant 5,5) pupelių intaktinių chloroplastų ASB taip pat skiriasi IAR prisijungimo prie baltymo vietų skaičiumi – n. Intaktinių chloroplastų preparatuose  $n=2,00 \pm 0,63$  nmol/mg baltymo arba atitinkamai  $16,30 \pm 1,59$  nmol/1g žalios masės. Pupelių plazmolemos vezikulių preparatuose (Jodinskienė, 2005; Jodinskienė, Anisimovienė, 2006), susiformuojančių IAR-ASB kompleksų  $n=15,00 \pm 1,80$  pmol/1g žalios masės. Kitų magnolijainių augalų IAR (NAR) prisijungimo vietų skaičius plazmolemoje yra tokios pat eilės (Jacobs, Hertel, 1978; Kaur,

Kapoor, 1989; Shimomura et al., 1999) kaip ir pupelių plazmolemos vezikulėse.

***IAR-ASB kompleksų susiformuojančių terpės pH esant 7,5 charakteristikos.***

Tyrimų rezultatai parodė, kad antrojo intaktinių chloroplastų ASB, kai terpės pH 7,5, prisotinimas  $^{14}\text{C}$ -IAR beveik pasiekiamas esant ligando koncentracijai  $8\text{-}9 \times 10^{-5}$  M (23 pav.).



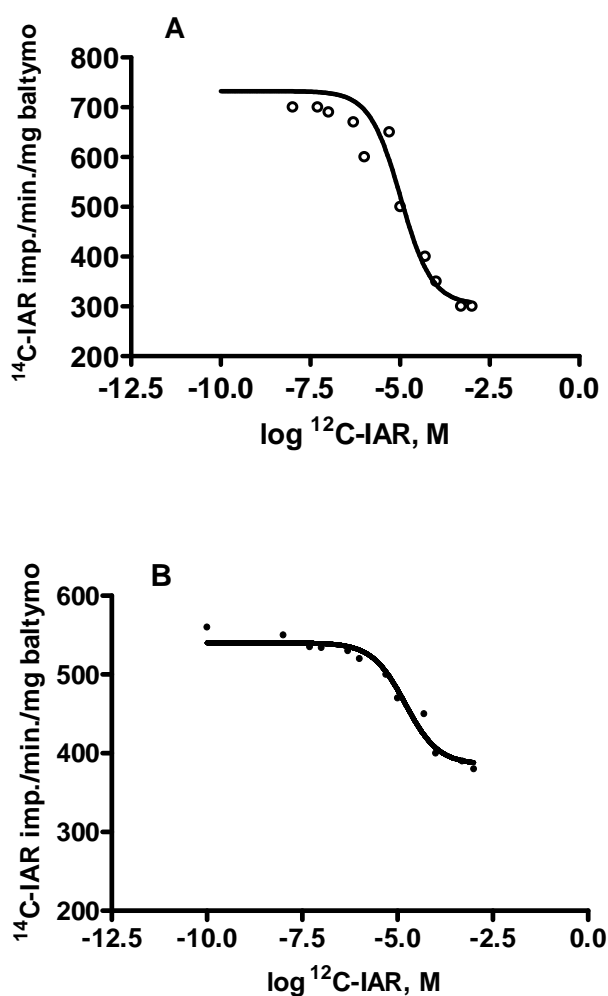
**23 pav.** Intaktinių chloroplastų: **A** – ASB ir IAR specifinės sąveikos priklausomybė nuo  $^{14}\text{C}$ -IAR koncentracijos, terpės pH esant 7,5; **B** – Scatchard grafikas.

(Motulsky, Christopoulos, 2003). Taigi, kad šiame terpės pH chloroplastuose funkcionuojančio ASB prisotinimas artėtų prie pilno reikalinga visa eile didesnė  $^{14}\text{C}$ -IAR koncentracija, nei chloroplastų ASB, formuojančiam specifinius IAR-ASB kompleksus terpės pH esant 5,5. Tačiau baltymo giminingumas ligandui nėra didesnis, šiomis sąlygomis susiformuojančių IAR-ASB kompleksų,

Padidinus koncentraciją iki  $10^{-4}$  M padidėjimas labai nedidelis. Tai paaiškinama tuo, jog didinant ligando koncentraciją prisijungimo terpėje, artėjimas prie makromolekulės prisotinimo yra lėtas. Kai ligando koncentracija terpėje tampa keturis kartus didesnė nei  $K_D$ , esant pusiausvyrai būna užimta tik 80 % receptoriaus ir pakyla iki 90 %, kai ligando koncentracija yra 9 kartus didesnė nei  $K_D$ , o 99 % prisotinimo pasiekia kai ligando koncentracija yra 99 kartus didesnė nei  $K_D$  (Motulsky, Christopoulos,

disociacijos konstanta  $K_D=1,72\pm 0,59\times 10^{-5}$  M, saitų skaičius  $n=0,44\pm 0,02$  nmol/mg baltymo arba  $3,47\pm 0,02$  nmol/ 1 g žalios masės (23 pav., 6 priedas).

Duomenų apie IAR ir baltymų sąveikas neutraliuose ir silpnai šarminiuose pH membraninėse struktūrose – nedaug. Esant tam pačiam terpės pH, pupelių hipokotilių ląstelių plazmolemos vezikulių preparatuose funkcionuojančių ASB prisotinimas pasiekiamas esant mažesnei  $^{14}\text{C}$ -IAR koncentracijai –  $1,25\text{--}1,5\times 10^{-6}$  M. Šių kompleksų  $K_D=5,86\pm 0,68\times 10^{-7}$  M,  $n=40,00\pm 1,77$  pmol/1g žalios masės (Jodinskienė, 2005; Jodinskienė, Anisimovienė, 2006). Kviečių etioliuotų koleoptilių ląstelių plazmolemoje kai terpės pH artimas neutraliam (7,2) –  $K_D=3\times 10^{-8}$  M,  $n=2\times 10^{-11}$  mol/ $\mu\text{g}$  baltymo (Даргинавичене, 1992).



**24 pav.** Pupelių chloroplastų ASB ir  $^{14}\text{C}$ -IAR sąveikos priklausomybė nuo  $^{12}\text{C}$ -IAR koncentracijos: **A** – prisijungimo terpės pH 5,5; **B**– prisijungimo terpės pH 7,5.

Specifinis sintetinio auksino – NAR prisijungimas, kai terpės pH 7,0, buvo aptiktas ir kukurūzų membranose, manoma, kad tai fermentinis kompleksas (Nave, Benveniste, 1984), kurio NAR prisijungimo charakteristikos:  $K_D$  –  $1,0\times 10^{-6}$  M,  $n$  – 13,8 pmol/g žalios masės.

$^{14}\text{C}$ -IAR išstūmimo iš IAR-baltymų kompleksų tyrimai leido nustatyti  $^{12}\text{C}$ -IAR koncentraciją, 50 % sumažinančią specifiškai sujungtą  $^{14}\text{C}$ -IAR arba efektyvią koncentraciją –  $EC_{50}$  (Ray

et al., 1977 a), taip pat parodančią IAR giminingumą saitui (Jacobs, Hertel, 1978).

EC<sub>50</sub> vertę apsprendžia receptoriaus giminingumas ligandui, radioligando koncentracija ir radioligando giminingumas receptoriui (Motulsky, Christopoulos, 2003). Terpės pH esant 5,5 EC<sub>50</sub> – 1,04±0,13×10<sup>-5</sup> M, terpės pH esant 7,5 – 1,62±0,15×10<sup>-5</sup> M (24 pav.).

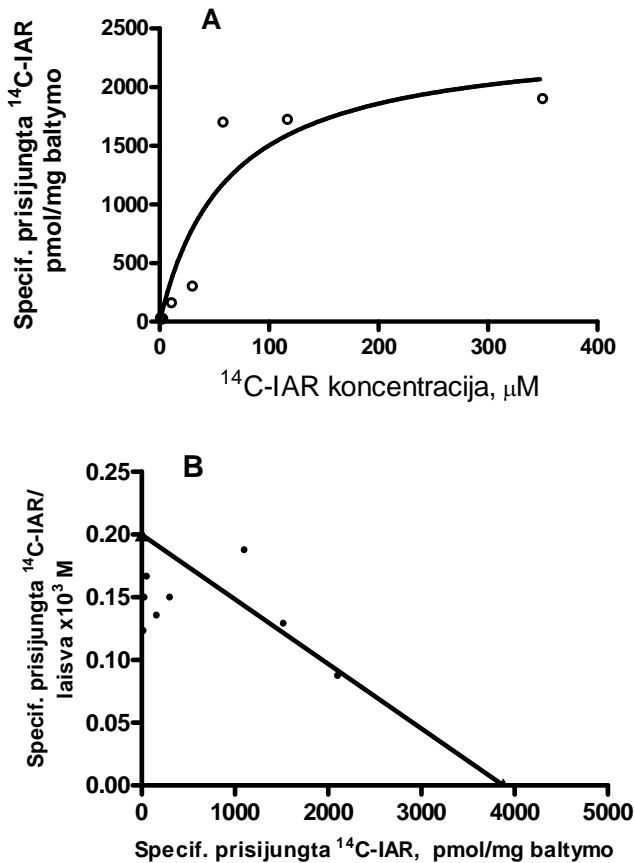
<sup>12</sup>C-IAR koncentracijas, norint sumažinti specifiškai prisijungusios <sup>14</sup>C-IAR kiekį nuo 90 % iki 10 %, prie abiejų pH reikėjo padidinti apie 100 kartų, kas rodo, kad abiem atvejais egzistuoja tik vienos rūšies charakteristikas atitinkančios IAR ligando prisijungimo vietos (Ray et al., 1977 b).

Kaip ir buvo tikėtasi, pupelių intaktinių chloroplastų <sup>12</sup>C-IAR EC<sub>50</sub> skiriasi nuo pupelių hipokotilių plazmolemos vezikulėse nustatytų EC<sub>50</sub> reikšmių: 6×10<sup>-7</sup> M, kai pH 5,5 ir 1×10<sup>-6</sup> M, kai pH 7,5 (Jodinskienė, 2005).

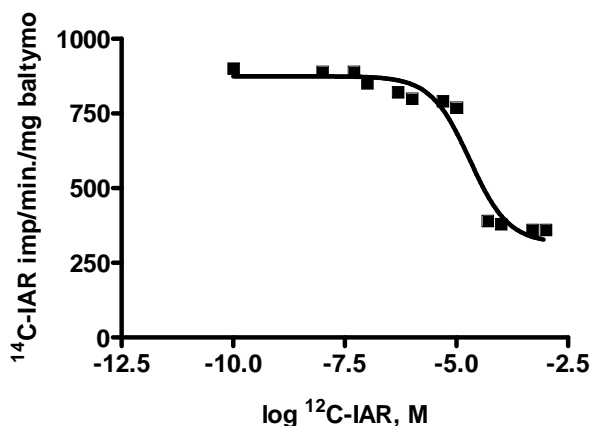
### **3.2.2. Intaktinių mitochondrijų frakcijos preparatuose susiformuojančių IAR-ASB kompleksų charakteristikos**

Kaip jau minėta anksčiau, iš pupelių hipokotilių išskirtuose intaktinių mitochondrijų preparatuose specifiškai sujungtų IAR-ASB kompleksų formavimuisi optimalus terpės pH 7,0. IAR atpažįstančio ir sąveikoje su IAR dalyvaujančio baltymo saito prisotinimo analizė buvo atlikta panaudojant skirtingas <sup>14</sup>C-IAR koncentracijas – tokias pat, kaip ir atliekant analogiškus tyrimus chloroplastų bei plazmolemos preparatuose (Anisimovienė, Merkys, 2000; Jodinskienė, 2005).

Bandymų rezultatai parodė, kad didinant <sup>14</sup>C-IAR koncentraciją, mitochondrijose susiformuojančių IAR-ASB kompleksų (pH 7,0) prisotinimas gali būti pasiekiamas tik esant labai didelėms ligando koncentracijoms – ne mažesnėms kaip 4-5×10<sup>-4</sup> M (25 pav.), t.y. intaktinių mitochondrijų organoide funkcionuojančio ASB prisijungimo vietų prisotinimui IAR ligandu reikalingos 10 ar net 100 kartų didesnės <sup>14</sup>C-IAR koncentracijos, nei intaktinių chloroplastų ASB.



**25 pav.** Intaktinių mitochondrijų: A - ASB ir IAR specifinės sąveikos priklausomybė nuo <sup>14</sup>C-IAR koncentracijos, terpės pH esant 7,5; B – Scatchard grafikas.



**26 pav.** Pupelių mitochondrijų ASB ir <sup>14</sup>C-IAR sąveikos priklausomybė nuo <sup>12</sup>C-IAR koncentracijos, terpės pH 7,0.

Išanalizavus <sup>14</sup>C-IAR prisijungimo rezultatus G. Scatchard koordinačių sistemoje nustatyta, kad intaktinėse mitochondrijose, terpės pH esant 7,0, susiformuojančių IAR-ASB kompleksų  $K_D$  yra  $1,90 \pm 0,51 \times 10^{-5}$  M, prijungimo saitų skaičius  $n=3,85 \pm 0,34$  nmol/mg baltymo arba  $11,48 \pm 1,01$  nmol/1 g žalios masės, atitinkamai (25 pav, 6 priedas). <sup>14</sup>C-IAR išstūmimo iš IAR-baltymų kompleksų bandymai parodė, kad <sup>12</sup>C-IAR  $EC_{50}$  mitochondrijose, terpės pH esant 7,0 yra apie  $1,98 \pm 0,19 \times 10^{-5}$  M (26 pav.).

Šiuo atveju sumažinti specifiskai sujungtos <sup>14</sup>C-IAR kiekį nuo 90 iki 10 % taip pat reikalinga 100 kartų didesnė <sup>12</sup>C-IAR koncentracija, kas rodo, kad egzistuoja tik vienos rūšies charakteristikas atitinkančios IAR prisijungimo vietos (Ray et al., 1977 b).

Taigi, abiejų tirtų organoidų, tiek iš pupelių lapų išskirtų intaktinių chloroplastų (optimalūs pH

5,5 ir 7,5), tiek iš jų hipokotilių išskirtų intaktinių mitochondrijų (optimalus pH 7,0) preparatuose susiformuojančių IAR-ASB kompleksų charakteristikos (6 priedas) ženkliai skiriasi nuo kompleksų, susiformuojančių pupelių hipokotilių plazmolemoje charakteristikų (Anisimovienė et al., 2000; Merkys et al., 2004 a; Jodinskienė, 2005; Jodinskienė, Anisimovienė, 2006) bei nuo IAR-ASB1 (Löbler, Klambt, 1985 a; Jones, 1994) ir IAR-TIR1 (Dharmasiri et al, 2005 a; Kepinski, Leyser, 2005) charakteristikų. Jos artimos charakteristikoms kompleksų, susiformuojančių su tirpiu 20 kDa ASB išskirtu iš persikų daigų apekso:  $K_D(2,4-D) = 4,1 \times 10^{-5}$  M ir specifinis sujungimas užsotinimo koncentracijoje 42 nmol/mg baltymo (Ohmiya et al., 1993). Aukštą  $K_D(2,4-D) = 3,5 \times 10^{-5}$  M taip pat turi ir kitas tirpus persikų daigų apekso 60 kDa baltymas, pavadintas Pp60 (Sugaya et al., 2000).

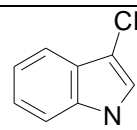
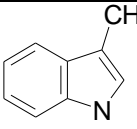
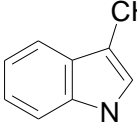
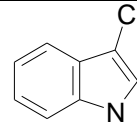
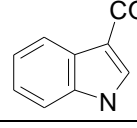
### **3.3. Kitų ligandų gebėjimas konkuruoti dėl IAR prijungimo vietų intaktinių chloroplastų ir mitochondrijų preparatuose**

Kita ligando ir makromolekulės sąveikos charakterizavimui svarbi charakteristika – makromolekulės sąveikavimas su skirtingais panašios struktūros junginiais (Cross, Briggs, 1978; Stoddart, Venis, 1980). Jei sistema receptorinė prisijungimo specifiškumas turi maždaug atitikti santykinį biologinį junginio aktyvumą, kuo didesnis analogų sukeliamas fiziologinis atsakas, tuo didesnis giminingumas (Cross, Briggs, 1978; Stoddart, Venis, 1980; Алехина и др., 2005). Todėl tik aktyvūs auksinai, anti-auksinai ir auksino transporto inhibitoriai galėtų gebėti konkuruoti dėl IAR prisijungiančio baltymo (receptoriaus) sujungimo vietų (Hertel et al., 1972; Stoddart, Venis, 1980).

Šiam tikslui buvo naudoti pagal cheminę struktūrą IAR molekulei artimi indolo junginiai (9 lentelė), t.y. junginiai turintys indolo žiedą ir karboksilo grupę /-COOH/ trečioje padėtyje (Anisimovienė, 1994; Barkawi et al., 2008). Kaip ir sąveikos su IAR specifiškumo nustatymui buvo naudotos  $5 \times 10^{-7}$  M žymėtos IAR ir  $10^{-4}$  M konkuruojančio ligando koncentracijos, esant atitinkamam optimaliam IAR ir ASB sąveikai terpės pH. Šių junginių

gebėjimas išstumti IAR iš kompleksų, susiformuojančių pupelių lapų intaktiniuose chloroplastų preparatuose ir pupelių hipokotilių intaktinių mitochondrijų preparatuose, vertintas lyginant su nežymėtos IAR kompleksų specifiškumu.

**9 lentelė.** Indolo junginiai, turintys analogišką IAR molekulei struktūrą, naudoti konkuravimo dėl IAR prisijungimo vietų tyrimams

<b>JUNGINYS</b>		<b>Fiziologinės junginių charakteristikos</b>
<b>Pavadinimas</b>	<b>Formulė</b>	
Indolil-3-acto rūgštis <b>IAR</b>		Fitohormonas auksinas
Indolil-3-propioninė rūgštis <b>IPR</b>		Augaluose neaptinkamas junginys
Indolil-3-sviesto rūgštis <b>ISR</b>		Endogeninis fiziologiškai atyvus junginys
Indolil-3-piruvo rūgštis <b>IPVR</b>		IAR sintezės tarpininkas
Indolil-3-karboksirūgštis <b>IKR</b>		Fiziologiškai neaktyvus IAR ardymo produktas

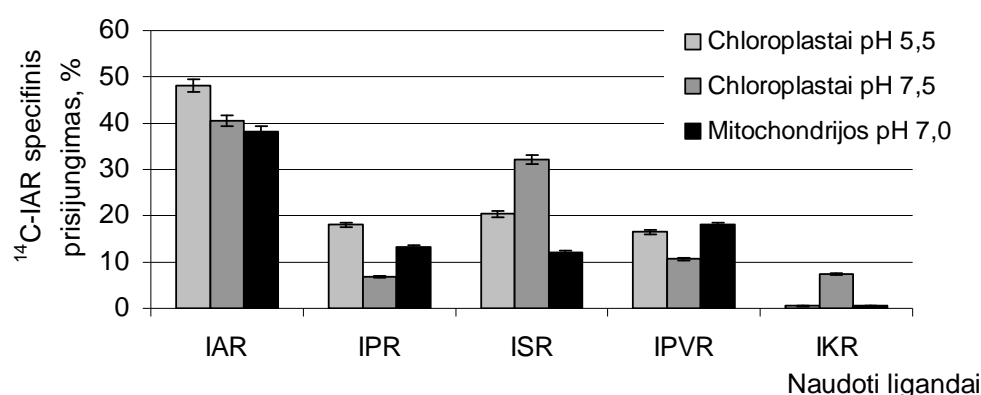
### 3.3.1. Ligandų sugebėjimas konkuruoti dėl IAR prijungimo vietų chloroplastų preparatuose

Atliktų tyrimų rezultatų duomenys, pateikti 7 priede ir 27 pav. rodo, kad intaktinių chloroplastų frakcijoje, tiek esant terpės pH 5,5, tiek ir pH 7,5, dėl <sup>14</sup>C-IAR prisijungimo prie ASB molekulės vietų geriausiai konkuravo <sup>12</sup>C-IAR – 48,1±4,6 % ir 40,5±3,9 %, atitinkamai.

Ilgesnę šoninę grandinę nei IAR turintys auksinai dėl <sup>14</sup>C-IAR prisijungimo prie ASB vietų konkuravo nevienodai. Indolil-3-propiono rūgštis – IAR homologas (9 lentelė), turintis tik viena metileno (-CH<sub>2</sub>) grupę šoninėje grandinėje daugiau, tačiau endogeninėje būklėje augaluose neaptinkama (Campanell et al., 2004; Barkawi et al., 2008), dėl <sup>14</sup>C-IAR prisijungimo vietų



prie intaktiniuose chloroplastuose lokalizuotų ASB, terpės pH esant 5,5 konkuravo beveik 3 kartus silpniau, nei pati IAR (27 pav., 7 priedas), o terpės pH esant 7,5  $^{14}\text{C}$ -IAR išstūmimas buvo visai silpnas, tik paklaidos ribose. Tuo tarpu dviem metileno grupėmis daugiau šoninėje grandinėje turintis, aktyvus IAR fiziologinis analogas, endogeninis augalų junginys – ISR (Ludwig-Müller et al., 1994; Campanell et al., 2004; Barkawi et al., 2008) intensyviai konkuravo dėl  $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimo vietų. Šis ligandas aktyviau stūmė IAR artimoje neutraliai (pH 7,5) –  $32,2 \pm 3,4$  %, nei rūgštinėje aplinkoje (pH esant 5,5) –  $20,4 \pm 2,3$  % (27 pav.).



**27 pav.** Indolo junginių konkuravimo dėl  $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimo prie baltymo vietų palyginimas.

IAR sintezės iš triptofano tarpininkas – IPVR aktyviau konkuravo dėl  $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimo vietų IAR-ASB kompleksuose, susiformuojančiuose intaktinių chloroplastų frakcijoje, prisijungimo terpės pH esant 5,5. Šioje aplinkoje  $^{12}\text{C}$ -IPVR išstūmė  $^{14}\text{C}$ -IAR  $16,5 \pm 1,8$  %. Terpės pH esant 7,5,  $^{14}\text{C}$ -IAR išstūmimas buvo 1,5 karto silpnesnis, o specifinis prisijungimas  $^{14}\text{C}$ -IAR impulsais tenkantis 1 miligramui baltymo per minutę buvo 2 kartus mažesnis (27 pav., 7 priedas).

Fiziologiškai neaktyvus IAR ardymo produktas – IKR konkuravo silpnai arba visai nekonkuravo dėl IAR prisijungimo vietų intaktinių chloroplastų IAR-ASB kompleksuose.

### 3.3.2. Ligandų sugebėjimas konkuruoti dėl IAR prijungimo vietų mitochondrijų preparatuose

Rezultatai parodė, kad kaip ir chloroplastų, intaktinių mitochondrijų preparatuose terpės pH esant 7,0, geriausiai  $^{14}\text{C}$ -IAR iš prisijungimo prie ASB vietų išstumia  $^{12}\text{C}$ -IAR, kompleksų specifiškumas –  $38,3\pm 4,2\%$ . Iš kitų tirtų panašios į IAR struktūros indolo junginių (9 lentelė), aktyviausiai šiuo atveju konkuruoja IAR sintezės tarpininkas – IPVR, tačiau ji išstumė  $^{14}\text{C}$ -IAR iš prisijungimo prie ASB vietų –  $18,1\pm 1,6\%$ , tai yra 2 kartus silpniau nei  $^{12}\text{C}$ -IAR (27 pav., 8 priedas).

Intaktinių mitochondrijų frakcijoje ilgesnę šoninę grandinę turintys auksinai: IPR ir ISR konkuravo labai panašiai –  $13,2\pm 1,2\%$  ir  $12,0\pm 0,7\%$ , atitinkamai. Skirtumas tarp  $^{14}\text{C}$ -IAR impulsų kiekio tenkančio baltymo vienetui taip pat nedidelis (8 priedas). IPR  $^{14}\text{C}$ -IAR išstūmimas iš intaktinėse mitochondrijose susiformuojančių IAR-ASB 2 kartus aktyvesnis, nei iš intaktiniuose chloroplastuose susiformuojančių IAR-ASB prisijungimo terpės pH artimame neutraliam. Tuo tarpu ISR atvirkščiai – 2,6 karto intensyviau konkuravo dėl  $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimo intaktinių chloroplastų nei intaktinių mitochondrijų preparatuose, terpės pH esant 7,5. IKR –  $^{14}\text{C}$ -IAR iš IAR-ASB kompleksų susiformuojančių intaktinėse mitochondrijose nestūmė visai (27 pav., 8 priedas).

Gauti rezultatai sutapo su kitų tyrėjų gautais duomenimis, analizuojant ligandų konkuravimą dėl IAR prijungimo vietų kituose ląstelės kompartmentuose. Kukurūzų koleoptilių membranose prie NAR prisijungimo vietų su aukštu giminingumu prisijungia keletas žiedą turinčių junginių su trumpa (2-4 anglies atomų ilgio) rūgštine šonine grandine: acto rūgšties šoninę grandinę turintis junginys yra efektyviausias, o propioninę ir sviestinę šonines grandines turintys junginiai – šiek tiek mažiau efektyvūs. Mažiausiai efektyvus yra karboksilinę grupę šoninėje grandinėje turintis junginys (Ray et al., 1977 b). A.Wardrop ir G.Polya (1980), tyrę skirtingų klasių junginių galimą giminingumą pupelių ASB parodė, kad iš visų tirtų indolo darinių efektyviausias indolo ligandas yra IAR, parodyta taip pat, kad jos prisijungimo

EC<sub>50</sub> dviem eilėm didesnis, nei ISR ar IPR. Šių mokslininkų atliktuose tyrimuose IAR prisijungimą prie pupelių ASB labiausiai inhibavo rūgštiniai indolilo dariniai, tokie kaip IKR. Esant terpės pH 5,5 IKR, kuri neveikia koleoptilių augimo, nekonkuravo dėl IAR sujungimo vietų ir kviečių koleoptilių plazmolemoje (Даргинавичене, 1992).

Tokie rezultatai gali būti paaiškinami tuo, kad įvairių indolinių rūgščių fiziologinis aktyvumas priklauso nuo jų virsmo augalų audiniuose (Меркис, 1982). ISR aktyvumas – virsmu į IAR (Меркис, 1982; Zolman et al., 2000), dėka indolinių ir kitų junginių su poriniu anglies atomų skaičiumi šoninėje grandinėje, esančioje 3-čioje padėtyje, β-oksidacijos (Меркис, 1982; Bartel et al., 2001). Be to, pastaraisiais metais pasirodė duomenys, kad endogeninė ISR yra sintetinama iš IAR (Ludwig-Müller, Epstein, 1994) bei gali būti IAR pirmtakas ir funkcionuoti kaip bioaktyvus IAR konjugatas IAR homeostazėje (Bartel et al., 2001). Natūraliai aptiktos laisvos ISR koncentracija yra artima laisvos IAR koncentracijai (Ludwig-Müller et al., 1994; Campanell et al., 2004; Barkawi et al., 2008). Tuo tarpu tarpu endogeninė IPR ar jos konjugatai augaluose neaptikti (Campanell et al., 2004; Barkawi et al., 2008), tačiau žinoma, jog kai kurios bakterijos gali produkuoti IPR (Elsden et al., 1976; Mohammed et al., 2003). IPVR – taip pat endogeninis junginys, jos gebėjimas išstumti <sup>14</sup>C-IAR iš prisijungimo prie ASB vietų mitochondrijose ir chloroplastuose, esant terpės pH 5,5, galbūt galimas dėl to, kad šiuose organoiduose gali būti likęs bakterinių pirmtakų turėtas fermentas, verčiantis IPVR į IAR (Sergeeva, 2002; Woodward, Bartel, 2005).

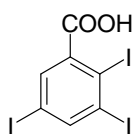
IKR nekonkuravimas mitochondrijų preparatuose (pH 7,0) bei chloroplastų preparatuose (pH 5,5) ir tik labai silpnas <sup>14</sup>C-IAR išstūmimas iš prisijungimo vietų intaktinių chloroplastų preparatuose terpės pH esant 7,5 gali būti siejamas su šio junginio fiziologiniu neaktyvumu. Be to, tiriant galimą IKR-3-C<sup>14</sup> sujungimą su pupelių hipokotilių nukleoproteidais (RNP, DNP frakcijose) parodyta, kad jis skiriasi nuo <sup>14</sup>C-IAR sujungimo. Nustatyta, kad tik 20 % aptinkamo radioaktyvumo priklauso IKR, o 80 % – IAR ir kitiems

neidentifikuotiems indolo dariniams, atsiradusiems IKR kitimo ląstelėje procesų metu (Merkys ir kt., 1977).

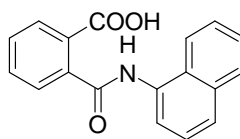
Taigi, fiziologiškai aktyvių junginių aktyvus konkuravimas ir fiziologiškai neaktyvaus IAR ardymo produkto – IKR nekonkuravimas dėl  $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimo vietų leidžia manyti, kad tarp šiuose organoiduose lokalizuotų ASB ir IAR vykstanti sąveika gali turėti biologinę prasmę.

### 3.4. IAR transporto inhibitorių įtaka IAR-ASB kompleksų formavimuisi intaktinių mitochondrijų ir chloroplastų preparatuose

Charakterizuojant auksino-baltymų kompleksus, buvo tirtas ir kitos grupės junginių priklausančių fitotropinų klasei bei specifiskai inhibuojančių auksino išėjimą iš ląstelės – NFR ir TJBR (28 pav.), gebėjimas konkuruoti dėl IAR prisijungimo vietų (Hertel et al., 1983; Zettl et al., 1992; Lomax et al., 1995; Darginavičienė, Maksimov, 2001).



2,3,5-trijodobenzenkarboksirūgštis  
(TJBR)



1-N-naftilftalamo rūgštis  
(NFR)

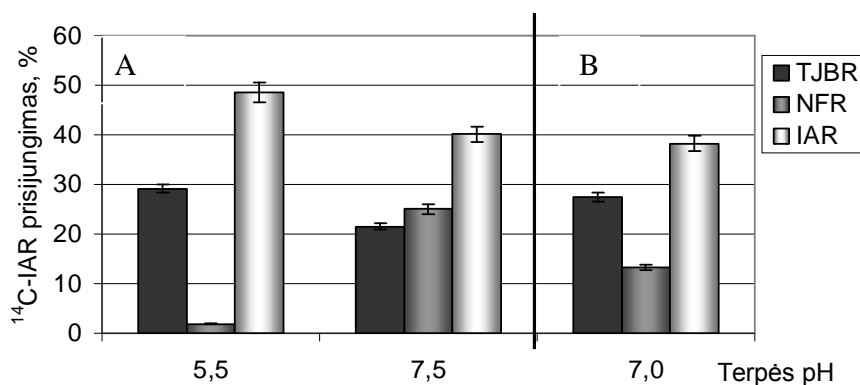
**28 pav.** Tyrimams naudoti auksino transporto inhibitoriai.

#### 3.4.1. Tirtų auksino transporto inhibitorių gebėjimas konkuruoti dėl $^{14}\text{C}$ -IAR prijungimo vietų chloroplastuose

Intaktinių ir funkcionalių chloroplastų frakcijoje, antiauksinas (Depta, Rubery, 1984) ir auksino išnešimo iš ląstelės inhibitorius (Lomax et al., 1995) TJBR aktyviai konkuravo dėl IAR prisijungimo prie ASB vietų. Šis ligandas terpės pH esant 5,5 išstūmė  $^{14}\text{C}$ -IAR iš prisijungimo vietų –  $29,1 \pm 2,5$  %. Tik šiek tiek silpnesnis, tačiau taip pat aktyvus stūmimas vyko ir kai prisijungimo terpės pH 7,5 –  $21,5 \pm 1,8$  % (29 pav., 9 priedas).

Kitas fitotrofinas bei transporto inhibitorius – NFR dėl  $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimo vietų prie intaktinių chloroplastų ASB, suformuojančių

kompleksus kai terpės pH 5,5 ir kai 7,5 konkuravo skirtingai. Aktyviai – 25,0±2,3 % <sup>12</sup>C-NFR stūmė <sup>14</sup>C-IAR iš prisijungimo prie ASB vietų, artimoje neutraliai terpės pH, tuo tarpu, dėl <sup>14</sup>C-IAR prisijungimo vietų rūgštinėje terpėje susiformuojančiuose IAR-ASB kompleksuose šis transporto inhibitorius praktiškai nekonkuravo (29 pav., 9 priedas).



**29 pav.** IAR transporto inhibitorių specifiskumas konkuruojant su <sup>14</sup>C-IAR dėl prisijungimo vietų **A** – intaktinių chloroplastų frakcijoje kai terpės pH 5,5 ir 7,5; **B** – intaktinių mitochondrijų frakcijoje, terpės pH 7,0.

### 3.4.2. Tirtų augsino transporto inhibitorių gebėjimas konkuruoti dėl <sup>14</sup>C-IAR prijungimo vietų mitochondrijose

Rezultatai, gautieji tiriant augsino transporto inhibitorių poveikį IAR-ASB kompleksų formavimuisi intaktinių mitochondrijų frakcijoje, terpės pH esant 7,0 (10 priedas, 29 pav.), parodė, kad ir dėl šiame kompartmente funkcionuojančio ASB sąveikos su IAR vietų aktyviai konkuravo TJBR. Specifiškai išstūmė net 27,4±3,7 % <sup>14</sup>C-IAR. NFR <sup>14</sup>C-IAR iš jos prisijungimo prie mitochondrijų ASB vietų stūmė 2 kartus silpniau – 13,2±1,6 %.

Taigi, pažymėtina, kad TJBR dėl <sup>14</sup>C-IAR prisijungimo vietų abiejuose tirtuose organoiduose konkuravo panašiai, nepriklausomai nuo terpės pH (29 pav.). Panašus NFR aktyvumas pastebėtas tik intaktiniuose chloroplastuose, kai terpės pH 7,5, tuo tarpu esant artimai pH reikšmei (7,0) mitochondrijų kompartmente konstatuotas dvigubai mažesnis aktyvumas (29 pav.), o intaktinių chloroplastų frakcijoje terpės pH esant 5,5 šis ligandas nekonkuravo visai.

Lyginant TJBR sugebėjimą konkuruoti dėl IAR-ASB kompleksų, susiformuojančių pupelių hipokotilių plazmolemoje terpės pH esant 5,5 ir 7,5 (Jodinskienė, 2005) konstatuotas analogiškas aktyvumas – 25,8 % ir 27,2 %, atitinkamai. Tai, kad TJBR intensyviai konkuravo ir dėl augsinio NAR prisijungimo vietų, esant terpės pH 5,5 pastebėta ir kitų autorių (Batt et al., 1976; Wardrop, Polya, 1980 b; Murphy, 1980; Löbler, Klämbt, 1985 a).

Plazmolemos vezikulėse, išskirtose iš kviečių koleoptilių ląstelių, IAR transporto inhibitoriai TJBR ir NFR tiek *in vivo*, tiek *in vitro*, terpės pH esant 7,2 slopina IAR specifinio surišimo su baltymais procesus (Darginavičienė, Maksimov, 2001). TJBR poveikyje plazmolemos-baltymų kompleksų fiziologinis aktyvumas RNR-polimerazės II atžvilgiu izoliuotoje branduolių sistemoje yra pilnai inhibuojamas (Darginavičienė, Maksimov, 2001; Darginavičienė, Novickienė, 2002).

Tuo tarpu, dėl kito augsinio transporto inhibitoriaus, tipiško fitotrofino – NFR sugebėjimo konkuruoti dėl IAR prisijungimo vietų literatūroje aptikti prieštaringi rezultatai. Vieni mokslininkų (Hertel et al., 1972; Ray et al., 1977 b) duomenys rodė, kad NFR nestumia, o kitų (Batt et al., 1976; Wardrop, Polya, 1980), kad  $^{12}\text{C}$ -NFR stumia IAR/NAR iš prisijungimo prie ASB vietų. Endogeninis auginas nekonkuruoja su NFR dėl šių surišimo vietų (Lomax et al., 1995). To paties tiriamojo augalo pupelių hipokotilių plazmolemoje dėl  $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimo vietų prie ASB  $^{12}\text{C}$ -NFR konkuravo silpnai – 5,8 %, kai pH 7,5 ir 2,8 %, kai pH 5,5.

Manoma (Sussman, Goldsmith, 1981), kad TJBR stūmimas gali būti susijęs su tuo, kad šis junginys yra poliariai transportuojamas bei, kad TJBR pati yra silpnas auginas, skirtingai nei NFR, ir gali konkuruoti su IAR, 2,4-D ir NAR dėl prijungimo vietų (Depta, Rubery, 1984). Tačiau Petrášek ir kitų (2003) manymu, TJBR nėra geras specifinio augsinio transporto inhibitorius ir nepriklauso fitotrofinų grupei, nes neatitinka tipiško fitotropinų struktūros reikalavimų ir veikia kaip silpnas augsinio antagonistas (Katekar, Geissler, 1980) bei manoma, kad TJBR ir fitotropinai turi skirtingas veikimo vietas (Petrášek et al., 2003).

Aiškinantis NFR poveikio IAR transportui mechanizmą, buvo parodyta, kad NFR yra sujungiamas su skirtingu nei IAR sujungimo saitū (Bernasconi et al., 1996, Dixon et al., 1996). NFR receptorių lokalizacija plazmolemoje nustatyta eilės tyrėjų (Dohrmann et al., 1978; Jacobs, Hertel, 1978; Sussman, Goldsmith, 1981; Hertel et al., 1983; Lomax et al., 1995). Parodyta, kad cukinių hipokotilių ląstelėse NSB yra periferinis membranos baltymas, lokalizuotas citoplazminėje plazmolemos pusėje ir yra asocijuotas su citoskeletu (Cox, Muday, 1994; Dixon et al., 1996; Butler et al., 1998). Kinetinė NFR surišimų analizė parodė dviejų skirtingų NFR saitų, turinčių skirtingus giminingumus, buvimą (Michake et al., 1992; Nam, Kang, 1995) ir skirtingą aktyvumą IAR kaupimosi vezikulėse atžvilgiu. Biocheminiai tyrimai parodė, kad NFR inhibuoja augsino išnešimą iš ląstelės per anijono kanalą, prisijungdama su atskiru reguliatoriniu saitū, kitokiu nei paties augsino kanalo poros (Muday, 2001). Žinoma, kad NFR gali įtakoti IAR surišimo su baltymais procesus per signalo perdavimo sistemas, pvz.: keisdama tiroksinazės ir serino/trioninokinazių aktyvumus (Bernasconi, 1996; DeLong et al., 2002).

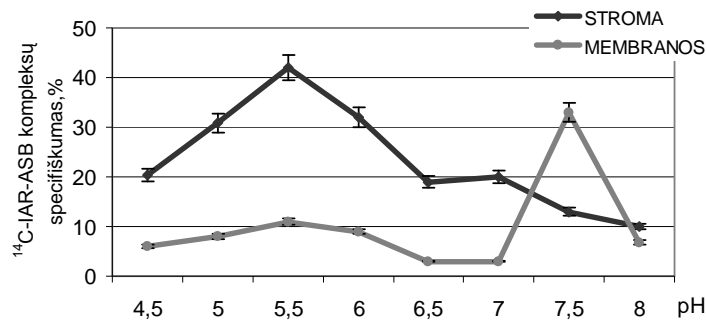
### **3.5. Auginą atpažįstančių baltymų kompartmentacija organoiduose**

Ankstesniuose skyriuose pateikti eksperimentiniai duomenys pirmą kartą parodė, kad keli skirtingi ASB gali funkcionuoti augalų ląstelių organoiduose – chloroplastuose ir mitochondrijose. Konkuruoti dėl IAR prijungimo vietų kompleksuose sugebėjo biologiškai aktyvūs junginiai, turintys panašią cheminę struktūrą – žiedą ir karboksilo grupę: sintezės tarpininkas IPVR ir β-oksidacijos keliu susiformuojanti bei IAR aktyvumą išsauganti – ISR (Меркис, 1982; Bartel et al., 2001; Woodward, Bartel, 2005), o fiziologiškai neaktyvus IAR metabolitas – IKR nekonkuravo. Tai leido manyti, kad tarp šiuose organoiduose lokalizuotų ASB ir IAR vykstanti sąveika gali turėti biologinę prasmę, tačiau, mūsų manymu, tyrimai atlikti organoido lygmenyje negali būti vertinami kaip galutinis įrodymas. Todėl siekiant patvirtinti ar atmesti šią galimybę reikėjo detalesnių tyrimų, visų pirma – kokiam organoidų subkompartimente lokalizuoti šie IAR „atpažįstantys“ baltymai,

formuojantys su IAR specifinius kompleksus. Tam chloroplastai ir mitochondrijos buvo suardomi osmotinio šoko metu ir tiriama IAR-ASB kompleksų formavimosi galimybė bendroje visų organoido membranų frakcijoje ir organoido skystų fazių (stomos ar matrikso) frakcijose.

### 3.5.1. IAR-ASB kompleksų formavimosi galimybės pupelių chloroplastų subkompartimentuose – membranose ir stromoje

Kaip ir intaktiniame organoide, IAR-ASB kompleksų formavimosi galimybės chloroplastų subkompartimentuose – membranų vezikulių ir skystos fazės (stomos) frakcijose, buvo tiriamos prisijungimo terpės pH skalėje nuo 4,0 iki 8,0. Kreivės gautos atlikus specifinio  $^{14}\text{C}$ -IAR ir ASB susijungimo bei susidariusių kompleksų specifiškumo analizę parodė, kad abu tirtieji chloroplastų subkompartimentai turi po vieną skirtingą specifinio IAR prisijungimo prie ASB piką (30 pav.).



**30 pav.** IAR-ASB kompleksų formavimosi skirtinguose chloroplasto subkompartimentuose priklausomybė nuo prisijungimo terpės pH.

Stomos preparatuose specifiskai prisijungusių IAR-ASB kompleksų formavimasis vyksta prisijungimo terpės pH esant 5,5 (30 pav.). Susiformuojančių kompleksų specifiškumas –  $42,3 \pm 2,0$  %, specifiskai prisijungusios  $^{14}\text{C}$ -IAR impulsų kiekis miligramui baltymo –  $3936,3 \pm 189,0$ . Kitame terpės pH, kuriame intaktiniuose chloroplastuose vyksta specifinė IAR ir ASB sąveika – 7,5, specifiskai sujungtų IAR-ASB kompleksų formavimosi galimybė stromoje – nežymi (30 pav.), specifiskai prisijungtos  $^{14}\text{C}$ -IAR kiekis tik  $284,7 \pm 7,6$  imp./min./mg baltymo.



Analizuojant kompleksų formavimosi ypatybes chloroplasto membranų vezikulių preparatuose pH skalėje nuo 4,0 iki 9,0 paaiškėjo, kad antrasis IAR prisijungimo saitas chloroplastų organoiduose (optimalus IAR-ASB kompleksų formavimosi terpės pH 7,5) funkcionuoja šiame subkompartimente (30 pav.). Terpės pH esant 7,5, susiformuojančių kompleksų specifiškumas –  $32,9 \pm 1,0$  %. Tuo tarpu, chloroplastų membranų vezikulių preparatuose, rūgštiniame prisijungimo terpės pH – 5,5 specifiškai sujungtų IAR-ASB kompleksų formavimosi galimybė abejotina (30 pav.), aptinkamas prisijungusios žymėtos IAR kiekis tik 165,3 imp./min./mg baltymo ir gali būti tik kaip priemaiša.

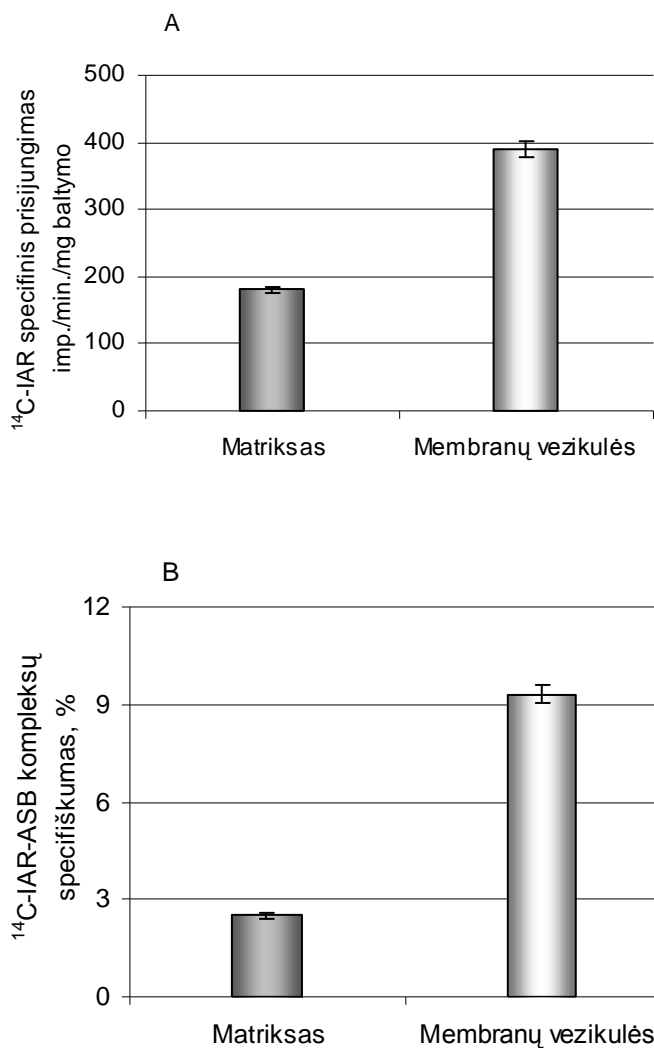
Taigi, organoido subkompartimentų lygmenyje atliktų specifinių IAR-ASB kompleksų formavimosi tyrimų rezultatai dar kartą patvirtino, kad chloroplastuose lokalizuoti du ASB. Chloroplastų IAR prisijungimo saitas, kurio optimalus kompleksų formavimosi pH 7,5, lokalizuotas ir gali funkcionuoti membranose. Kitas intaktiniuose organoiduose aptiktas saitas, kurio optimalus pH 5,5 – stromoje (30 pav.).

### **3.5.2. IAR-ASB kompleksų susidarymo galimybių mitochondrijų subkompartimentuose membranose ir matrikse tyrimai**

Kaip jau minėta, intaktinių mitochondrijų organoide aptiktas vienas IAR prisijungimo saitas. IAR ir ASB specifinė sąveika vyksta terpės pH esant 7,0. Todėl siekiant dar kartą patvirtinti arba atmesti ASB funkcionavimo galimybę šiame organoide ir nustatyti, kuriame mitochondrijų subkompartimente – membranų ar matrikso gali būti lokalizuoti šie IAR prisijungiantys baltymai, pirmoje eilėje buvo atlikti auksino ir baltymų sąveikos tyrimai abiejuose mitochondrijų subkompartimentuose prisijungimo terpės pH esant 7,0.

Rezultatai parodė, jog šiomis sąlygomis mitochondrijų matrikso frakcijoje lyginant su intaktinėmis ir funkcionaliomis mitochondrijomis, pastebimas labai nedidelis bendras prisijungusios IAR kiekis, tenkantis baltymo vienetui, tik ~ 5 %. Labai mažas ir specifinis IAR prisijungimas –

180,2±53,5 <sup>14</sup>C-IAR impulsai 1 mg baltymo, o kompleksų specifškumas tik ~2-3 % (31 pav.). Todėl ši sąveika negali būti vertinami kaip specifška.



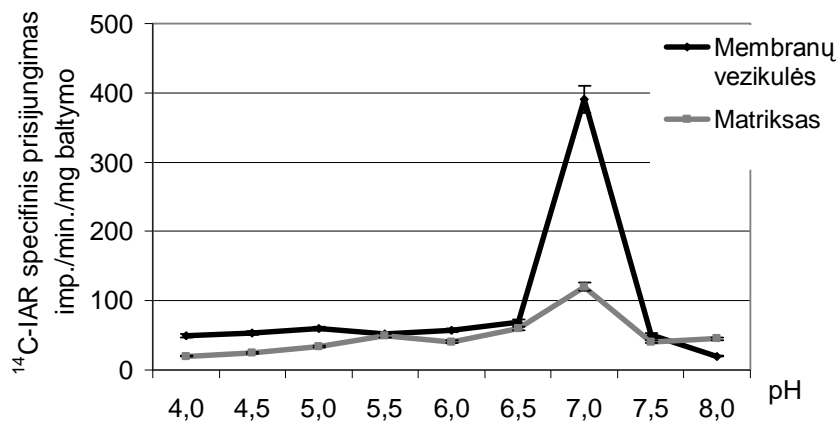
Mitochondrijų membranų vezikulių preparatuose IAR ir ASB sąveika, palyginus su intaktiniu organoidu taip pat yra silpnesnė, tačiau bendras prisijungtos <sup>14</sup>C-IAR kiekis miligramui baltymo 2-3 kartus didesnis nei matrikso frakcijoje – 4162,0±220,0 (31 pav.). Du kartus didesnis ir specifšiai prisijungtos <sup>14</sup>C-IAR kiekis, tenkantis miligramui baltymo.

Mitochondrijų membranų vezikulėse susiformuojančių IAR-ASB kompleksų specifškumas – 9,3±1,7 % (31 pav.).

**31 pav.** Mitochondrijų subkompartimentuose susiformuojančių IAR-ASB kompleksų palyginimas: **A** – specifinis IAR prisijungimas; **B** – IAR-ASB kompleksų specifškumas.

Kadangi, mitochondrijų tiek matrikse, tiek membranose palyginus su intaktiniu organoidu, buvo

konstatuota silpnesnė IAR ir ASB sąveika, todėl siekiant įsitikinti, ar mitochondrijų organoido suardymas neturi įtakos IAR ir ASB sąveikos optimaliai pH reikšmei, vėl buvo analizuota IAR-ASB kompleksų formavimosi galimybė mitochondrijų subkompartimentuose visoje pH skalėje nuo 4,0 iki 8,0, kas pH 0,5 (32 pav.).



**32 pav.** IAR-ASB kompleksų formavimosi skirtinguose mitochondrijų subkompartimentuose priklausomybė nuo prisijungimo terpės pH.

Rezultatai gauti atlikus  $^{14}\text{C}$ -IAR ir mitochondrijų membranų vezikulėse lokalizuotų ASB sąveikos galimybių tyrimus visoje prisijungimo terpės pH skalėje parodė, kad specifiskai susijungiantys IAR-ASB kompleksai formuojasi mitochondrijų membranose, terpės pH esant 7,0, t.y. tokia pat kaip ir intaktiniame organoide. Galimybė formuotis IAR-ASB kompleksams esant kitam terpės pH nei viename, nei kitame mitochondrijų subkompartimente – neaptikta (32 pav).

Šie bandymai parodė, kad IAR-ASB kompleksų formavimosi galimybė matrikso subkompartimente atmestina, nes visoje tirtoje pH skalėje aptiktas IAR kiekis susijungęs su 1 mg matrikso baltymo yra nereikšmingas. Specifiskai susiformuojančių IAR-ASB kompleksų formavimosi galimybė taip pat buvo atmesta, IAR prisijungimo eksperimentus atlikus su išsodintais amonio sulfatu iki 80 % koncentracijos ir apvalytais gel-filtracinėje kolonėje Sephadex G-25 mitochondrijų matrikso baltymais.

Kadangi, kaip jau minėta anksčiau, klausimai apie fitohormonus „atpažįstančius“ ir specifiskai su jais sąveikaujančius baltymus mitochondrijose visiškai nenagrinėti, todėl įsitikinimui, kad šio organoide membranose funkcionuoja ASB, buvo taikyta kitokia mitochondrijų membranų išskyrimo metodika, užtikrinanti membraninių struktūrų vientisumą (Hájek, et al., 2004). Rezultatai parodė, kad tokiu būdu gautų membranų struktūrų

baltymai aktyviau specifiskai sąveikauja su IAR: 1 mg baltymo tenka  $5716,0 \pm 390,0$   $^{14}\text{C}$ -IAR impulsų per minutę, susiformuojančių kompleksų specifiskumas –  $12,5 \pm 0,6$  %.

Taigi, šio eksperimentinio darbo rezultatai patvirtino ASB buvimą mitochondrijų organoide ir parodė jog, šie ASB gali būti lokalizuoti ir funkcionuoti mitochondrijų membranų subkompartmente.

### **3.6. Auksino ir baltymų sąveikų chloroplastų ir mitochondrijų subkompartmentuose charakterizavimas**

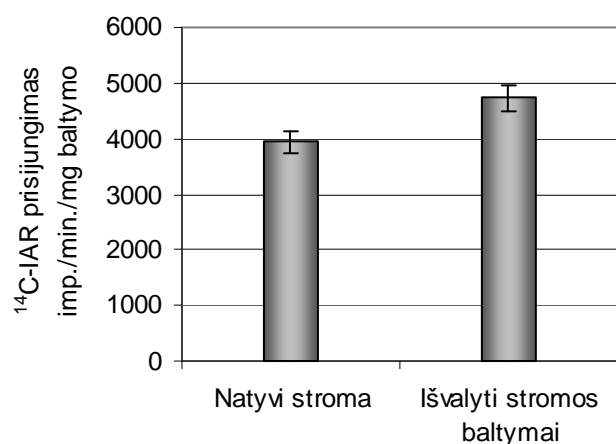
Nustačius, kad chloroplasto abiejuose subkompartmentuose ir mitochondrijų membranų vezikulių preparatuose formuojasi specifiskai sujungti IAR-ASB kompleksai, detalesniam organoideuose susiformuojančių kompleksų charakterizavimui buvo atlikti kompleksų charakteristikų patikslinimai ir jos palygintos su kitų ląstelės membranų struktūrų bei citozolio preparatuose susiformuojančių kompleksų charakteristikomis (Oostrom et al., 1980; Merkys et al., 1988; Jones, 1994; Merkys, Darginavičienė, 1997; Anisimovienė et al., 1998; 2000; Ohmiya et al., 1998 ir kt.).

#### **3.6.1. Chloroplastų subkompartmentuose susiformuojančių IAR-ASB kompleksų charakteristikos**

*IAR-ASB kompleksų formavimasis chloroplastų stromoje.* IAR-ASB sąveikos ypatybių chloroplastų stromoje (prisijungimo terpės pH esant 5,5), nustatymui buvo naudoti išskirti stromos subkompartmento preparatai (gauti po osmotinio šoko atskyrus membranas) ir stromos baltymų preparatai, išsodinti amonio sulfatu bei apvalyti gel-filtracinės chromatografijos metodu – Sephadex G-25 kolonėlėje.

Atlikti palyginamieji IAR-ASB kompleksų, susiformuojančių stromos subkompartmento frakcijoje ir stromos baltymų preparatuose tyrimai, įvertinant pagal specifiskai prisijungtos  $^{14}\text{C}$ -IAR kiekį baltymo vienetui ir IAR-ASB kompleksų specifikumą (%) parodė, kad stromos baltymų išsodinimas ir valymas nepakenkia baltymo sugebėjimui specifiskai sąveikauti su IAR. Be to,

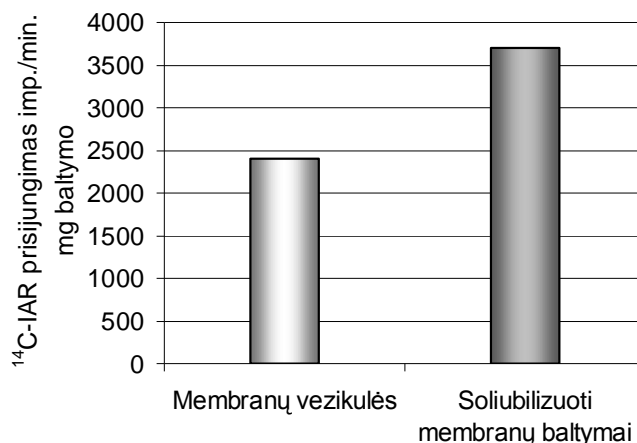
išvalyti stromos baltymų preparatai specifiskai prisijungia 20 % daugiau žymėtos IAR –  $4732,9 \pm 265,9$  imp./min./mg baltymo (33 pav.).



**33 pav.** Chloroplastų stromos ir išvalytų stromos baltymų gebėjimo specifiskai sąveikauti su IAR palyginimas.

IAR kompleksų su išsodintais stromos baltymais specifiskumas net 15 % didesnis nei IAR ir natyvos stromos baltymų. Jis yra  $49,2 \pm 3,1$  % ir atitinka specifiskumui ( $51,0 \pm 2,9$  %) kompleksų, susiformuojančių intaktiniuose chloroplastuose prie to paties pH

***IAR-ASB kompleksų formavimasis chloroplastų membranose.***



**34 pav.** Chloroplastų membranų vezikulių ir soliubilizuotų membranų baltymų gebėjimo specifiskai sąveikauti su IAR palyginimas.

Chloroplastų membranų vezikulių preparatai buvo soliubilizuojami, t.y. baltymai pervedami į tirpią būseną nejoniniu detergentu tritonu X-100 (Morrissey et al., 1986; Nakamura, Ono, 1988; Jones, 1994; Jones, 1999), nes būtent nejoniniu detergentu soliubilizuoti baltymai – pakeičiant fosfolipidus detergento

molekulėmis, išlaiko baltymams būdingą membraninę struktūrą (Jones, 1999; Anisimovienė, Merkys, 2000) ir savybes (Сафоно́в, Сафоно́ва, 1969). Nuo tritono X-100 pertekliaus baltymų-detergentų micelės apvalytos Amberlitu XAD-4. Įvertinus specifinę IAR ir ASB sąveiką buvo nustatyta, kad

soliubilizuoti chloroplastų membranų baltymai ne tik nepraranda sugebėjimo atpažinti ir specifiskai sąveikauti su IAR, bet ir specifiskai prisijungusios <sup>14</sup>C-IAR impulsų kiekis miligramui soliubilizuotų membranų baltymų 1,5 karto didesnis nei membranų vezikulių preparatuose – 3727,5±257,9 ir 2485,9±167,8, atitinkamai, susiformuojančių kompleksų specifiskumas padidėja iki 36,4±2,1 % (34 pav.).

Todėl chloroplastų stromos bei membranų ASB ir fitohormono sąveikos patikslinimui bei palyginimui su kituose augalinės ląstelės kompartmentuose funkcionuojančių ASB ir fitohormono sąveikos ypatumais, dar kartą buvo nustatytos pagrindinės kompleksų charakteristikos ( $K_D$ , n, ligandų bei transporto inhibitorių gebėjimas konkuruoti dėl IAR prijungimo vietų), naudojant būtent soliubilizuotus membranų baltymų ir išsodintus stromos baltymų preparatus.

**10 lentelė.** Chloroplastų subkompartmentuose lokalizuotų ASB ir IAR kompleksų charakteristikų palyginimas

Chloroplastų kompartmentas	IAR-ASB charakteristikos			
	pH	Kompleksų specifiskumas, %	$K_D$ , M	n, mol/mg baltymo
Stroma	5,5	49,2±3,1	4,62±0,42×10 <sup>-6</sup>	1,30±0,28×10 <sup>-10</sup>
Membranos	7,5	36,4±2,0	1,14±0,39×10 <sup>-6</sup>	3,08±0,40×10 <sup>-11</sup>

Kaip rodo 10 lentelėje pateikti rezultatai, tiek stromos baltymų, tiek soliubilizuotų membranų baltymų giminingumas ligandui yra didesnis, nei intaktinių chloroplastų baltymų prie tokių pat pH reikšmių (6 priedas), t.y. tam, kad esant pusiausvyrai būtų užimta pusė receptoriaus, reikalinga 10 kartų mažesnė IAR ligando koncentracija (Motulsky, Christopoulos, 2003). Ši savybė sutapo su augsino receptoriaus ASB1 gautomis charakteristikomis, tiriant sąveiką augsino NAR ir šio baltymo plazmolemos membranų preparatuose (Löbler, Klämbt, 1985 a) ir soliubilizuoto bei išgryninto ASB1

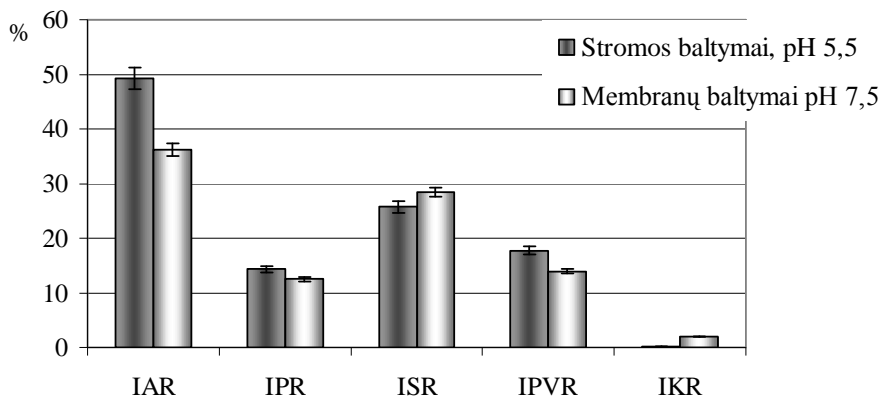
(Cross, Briggs, 1978; Löbner, Klämbt, 1985 a; Jones, 1994). Stomos ASB giminingumas IAR išryškėjo labiau nei membranų ASB.

IAR prisijungimo vietų skaičius prie abiejų chloroplastų subkompartmentų ASB, lyginant su intaktiniu organoidu mažėja viena eile (6 priedas ir 10 lentelė). Be to, soliubilizuotų chloroplastų membranų baltymų jis yra viena eile mažesnis už IAR prisijungimo vietų skaičių prie stomos ASB.

Kadangi IAR ir ASB sąveikos savybės išlieka ir po organoido subfrakcionavimo, stomos baltymų nusodinimo bei membranų baltymų soliubilizacijos, tokiu būdu rezultatai nenuginčijamai rodo, kad chloroplastų organoiduose funkcionuoja du IAR prijungimo saitai – skirtinguose chloroplasto subkompartimentuose, suformuojantys skirtingas charakteristikas turinčius IAR-ASB kompleksus.

Įvertinus artimos cheminės struktūros indolo junginių (tokių pat kaip ir intaktiniuose organoiduose) gebėjimą išstumti  $^{14}\text{C}$ -IAR iš kompleksų, susiformuojančių su nusodintais stomos baltymais ir soliubilizuotais membranų baltymais (35 pav.) pastebėta, kad nors atskirų ligandų aktyvumas šiek tiek skyrėsi, eiliškumas (tendencija) atitiko intaktinių bei funkcionalių chloroplastų atvejus, esant atitinkamiems terpės pH. Ir vienu, ir kitų baltymų preparatuose aktyviausiai  $^{14}\text{C}$ -IAR iš prisijungimo prie baltymo vietų, kaip ir intaktinių chloroplastų atveju, stūmė  $^{12}\text{C}$ -IAR. ISR  $^{14}\text{C}$ -IAR iš prisijungimo prie išvalytų stomos baltymų vietų stūmė aktyviau, nei iš kompleksų susiformuojančių su intaktiniais chloroplastų baltymais, prie to paties pH, IPR šiuo atveju konkuravo silpniau, o IPVR stūmimas abiem atvejais buvo panašus.

Tuo tarpu soliubilizuotuose membranų baltymų preparatuose pastebėta, kad  $^{12}\text{C}$ -IAR ir  $^{12}\text{C}$ -ISR dėl  $^{14}\text{C}$ -IAR prijungimo vietų konkuravo šiek tiek silpniau, nei intaktiniuose organoiduose, o IPVR – 1,3 karto ir IPR – 2 kartus stipriau. Fiziologiškai neaktyvus junginys IKR, kaip ir intaktiniuose chloroplastuose, dėl IAR prijungimo vietų nei prie stomos, nei prie membranų ASB nekonkuravo.



**35 pav.** Panašios struktūros indolo junginių konkuravimo dėl  $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimo prie išsodintų chloroplastų stromos baltymų ir soliubilizuotų membranų baltymų vietų palyginimas.

Įvertinus IAR transporto inhibitorių gebėjimą išstumti  $^{14}\text{C}$ -IAR iš IAR-ASB kompleksų, pastebėta, kad abu junginiai konkuravo dėl IAR prijungimo vietų. Soliubilizuotų chloroplastų membranų baltymų preparatuose, palyginus su intaktiniu organoidu, aktyviau konkuravo TJBR –  $18,3 \pm 1,6$  %.

### 3.6.2. Mitochondrijų membranose susiformuojančių IAR-ASB kompleksų charakteristikos

Anksčiau pateikti tyrimų rezultatai leido daryti prielaidą, kad IAR-ASB kompleksų formavimasis mitochondrijų organoide gali būti susijęs su membranose lokalizuotais baltymais, todėl buvo pradėti mitochondrijų membranų vezikulių baltymų soliubilizavimo tyrimai.

Visų pirma mitochondrijų membranų baltymų soliubilizavimui buvo naudotas integralinių plazmolemos ir chloroplastų membranų struktūrų baltymų soliubilizavimui tinkantis nejoninis detergentas tritonas X-100 (Сафоно́в, Сафоно́ва, 1969; Serano et al., 1994; Jones, 1999 ir kt.). Geriausios sąlygos, mitochondrijų membranų vezikulių baltymų soliubilizacijai šiuo detergentu buvo nustatytos eksperimentiškai, parenkant detergento koncentraciją (nuo 0,5 iki 2 %) bei tinkamiausią baltymo santykį su nejoniniu detergentu tritonu X-100 (nuo 1:1 iki 1:5). Rezultatai parodė, kad geriausias tritono X-100 ir baltymo santykis specifinių IAR-ASB kompleksų formavimuisi yra 1:3, o detergento tritono X-100 koncentracija – 1,75 %, o



terpės pH esant 7,0. Esant šiom sąlygom 1 miligramas soliubilizuotų tritonu X-100 mitochondrijų membranų baltymų specifiskai prisijungia  $^{14}\text{C}$ -IAR  $6254,2\pm 361,1$  imp./min. 1 mg baltymo, o susidariusių kompleksų specifiskumas  $14,8\pm 0,8$  % (11 lentelė).

**11 lentelė.** Mitochondrijose susiformuojančių IAR-ASB kompleksų palyginimas

Tyrimo objektas	Specifinis $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimas imp./min./mg baltymo	IAR-ASB kompleksų specifiskumas, %
Intaktinės mitochondrijos	$8346,4\pm 43,9$	$41,3\pm 3,6$
Mitochondrijų membranų vezikulės	$5716,0\pm 390,0$	$12,5\pm 0,6$
Mitochondrijų membranų baltymai soliubilizuoti Tritonu X-100*	$6254,2\pm 361,1$	$14,8\pm 0,8$
Mitochondrijų membranų baltymai soliubilizuoti Digitoninu**	$7499,3\pm 482,5$	$34,2\pm 2,4$

\*Tritono X-100 koncentracija 1,75 %, detergento baltymo santykis 1:3

\*\*Digitonino koncentracija 1,0 % detergento baltymo santykis 1:5

Gauti duomenys parodė, kad nors soliubilizuoti tritonu X-100 mitochondrijų membranų baltymai specifiskai  $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungė šiek tiek daugiau nei mitochondrijų membranų vezikulės, tačiau skirtumas buvo labai nedidelis, tai leido manyti, kad šiuo detergentu nepilnai soliubilizuojasi mitochondrijų membranų struktūrų baltymai arba tas baltymas, kuris mitochondrijų membranose „atpažįsta“ ir sąveikauja su IAR. Todėl detergentas tritonas X-100 buvo pakeistas kitu nejoniniu detergentu – digitoninu, naudojamu, būtent, mitochondrijų lipoproteinų kompleksams ardyti (Niznik et al., 1986; Eubel et al., 2003). Šiuo detergentu soliubilizuotų mitochondrijų membranų baltymų sąveika su IAR vyksta intensyviau – miligramui baltymo tenka  $7499,3\pm 482,5$  specifiskai prisijungtos  $^{14}\text{C}$ -IAR impulsų per minutę, ypač ženkliai padidėja susiformavusių kompleksų specifiskumas  $34,2\pm 2,4$  % (11 lentelė).

Šie rezultatai parodė, kad tiek specifinis prisijungimas, tiek susiformuojančių kompleksų specifiskumas artimi intaktiniuose mitochondrijų organoiduose vykstančiai ASB ir IAR sąveikai. Todėl gautieji rezultatai

patvirtino prielaidą, kad mitochondrijose auksiną „atpažįstantys“ baltymai lokalizuoti membranose. Bei, kad mitochondrijų membranų vezikulių soliubilizacija, nejoniniu detergentu digitoninu yra tinkama procedūra paruošimui baltymų sąveikos su IAR tyrimui. Todėl tolimesniuose tyrimuose buvo naudoti šiuo detergentu soliubilizuoti mitochondrijų membranų baltymai.

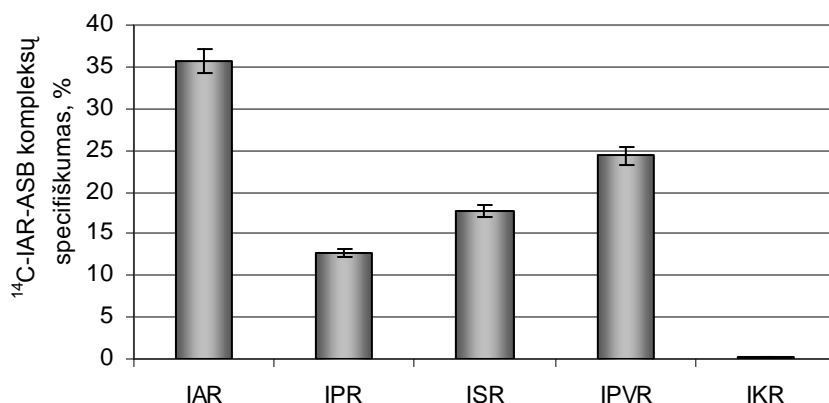
Įvertinus IAR sąveikavimo su digitoninu soliubilizuotais mitochondrijų membranų baltymais charakteristikas kai terpės pH 7,0, buvo nustatyta, kad baltymų giminingumas ligandui, kaip ir chloroplastų stromos bei membranų atvejais, padidėja lyginant su intaktinių organoidų ASB giminingumu ligandui prie to paties pH (6 priedas), tačiau ne taip ženkliai. Jis išlieka tos pačios eilės –  $8,5 \pm 0,5 \times 10^{-5}$  M.  $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimo prie baltymo vietų skaičius ( $5,3 \pm 0,7 \times 10^{-9}$  mol/mg baltymo) lyginant su intaktiniu ( $3,8 \pm 0,3 \times 10^{-9}$  mol/mg baltymo) taip pat mažėja ne taip ženkliai kaip chloroplastų atveju. Jis yra viena eile didesnis už IAR prisijungimo vietų skaičių prie stromos ASB ir net dviem eilėm didesnis už IAR prisijungimo vietų skaičių prie chloroplasto membranose lokalizuotų ASB. Taigi, šie duomenys rodo, kad soliubilizuotų mitochondrijų membranų baltymų giminingumas IAR yra mažesnis nei chloroplastų stromos ir membranų ASB.

Kaip ir intaktiniuose mitochondrijų organoiduose aktyviausiai dėl  $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimo vietų soliubilizuotų mitochondrijų baltymų preparatuose konkuravo pati  $^{12}\text{C}$ -IAR (36 pav.).

Kitų ligandų aktyvumas išsidėstė taip: IAR < IPVR < ISR < IPR. Pastebėta, kad intaktiniame organoide dėl  $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimo vietų IPR konkuravo aktyviau nei ISR.

Neaktyvus IAR katabolitas – IKR kaip ir intaktiniuose mitochondrijų organoiduose dėl IAR prijungimo vietų nekonkuravo.

Įvertinus IAR transporto inhibitorių gebėjimą išstumti  $^{14}\text{C}$ -IAR iš IAR-ASB kompleksų su soliubilizuotais mitochondrijų membranų baltymais, nustatyta, kad abu ligandai šiuo atveju  $^{14}\text{C}$ -IAR iš prisijungimo vietų stumia labai panašiai kaip ir intaktiniuose mitochondrijų organoiduose: NFR –  $13,9 \pm 1,7$  % ir  $13,2 \pm 0,9$  %, o TJBR –  $33,5 \pm 2,0$  % ir  $27,4 \pm 3,7$  %, atitinkamai.



**36 pav.** Panašios struktūros indolo junginių konkuravimo dėl <sup>14</sup>C-IAR prisijungimo vietų prie mitochondrijų membranų soliubilizuotuose baltymuose, palyginimas.

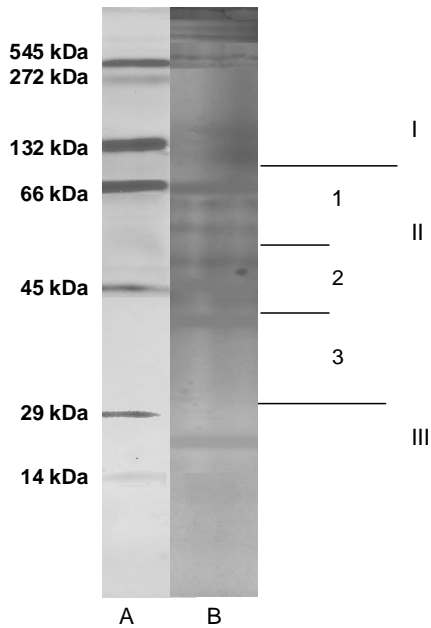
Taigi, ASB tyrimai, atlikti intaktinių mitochondrijų ir chloroplastų organoidų bei jų subkompartmentų lygmenyse rodo, kad šiuose organoiduose funkcionuoja trys saitai: du membranose (chloroplastų ir mitochondrijų) ir vienas chloroplastų stromoje.

### 3.7. Organoiduose funkcionuojančių auksiną prisijungiančių baltymų (ASB) identifikavimas

Chloroplastų stromoje ir membranose bei mitochondrijų membranose funkcionuojančių ASB identifikavimui buvo taikytas natyvių baltymų tyrimams dažnai naudojamas nedematūruojamosios (natyvios) PAAG elektroforezės metodas (Сафонов, Сафонова, 1969; Laemmli, 1970; Kügler et al., 1997; Eubel et al., 2003). Sąveikaujančių su IAR baltymų natyvios molekulinės masės, įvertintos, naudojant Sigma standartų rinkinį, tinkantį baltymų molekulinę masių apskaičiavimui, nedematūruojamomis sąlygomis, esant neutraliam pH (Gallagher, 1999).

#### 3.7.1. ASB chloroplastuose

*Specifiškai sujungti IAR-ASB kompleksai, susiformuojantys chloroplastų stromoje.* Išvalytų chloroplastų stromos baltymų preparatuose nedematūruojamosios PAAG elektroforezės metodu aptinkta 14 skirtingo elektroforetinio paslankumo baltymų (37 pav.).

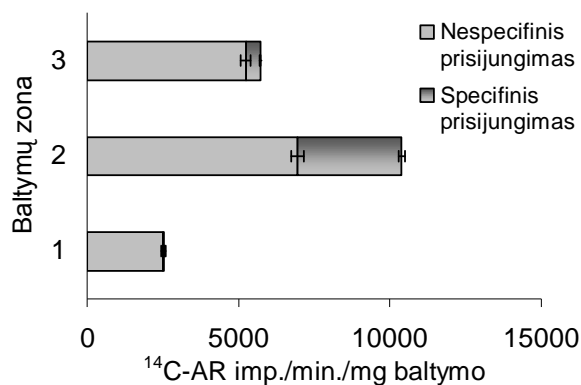


**37 pav.** **A** – baltymų molekulinės masės žymenys; **B** – išsodinti chloroplastų stromos baltymai išskirstyti nendenatūruojamosios PAAG elektroforezės metodu.

Siekiant nustatyti baltymų sugebėjimą specifiškai prisijungti  $^{14}\text{C}$ -IAR, nedažyti geliai buvo pjaustomi į 3 zonas, atsižvelgiant į jų santykinę elektroforetinę paslankumą (SEP): mažo nuo 0 iki 0,33, vidutinio – 0,33-0,66 ir didelio – 0,66-1,0. Šiuo atveju mažo SEP zonoje buvo aptinkami – 7, vidutinio – 5, didelio – 2 baltymų komponentai (37 pav.)

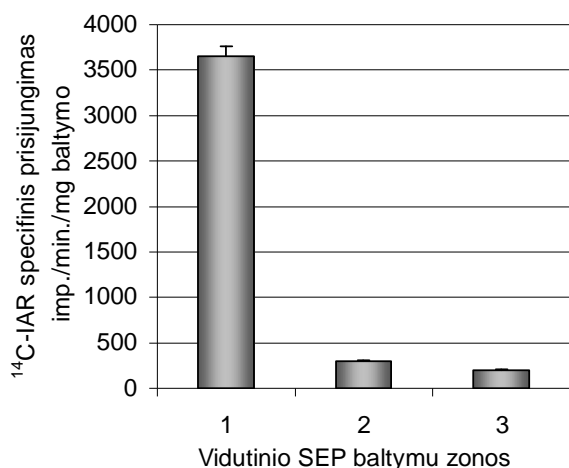
Iš visų trijų SEP zonų gelyje 50 mM TRIS-HCl buferiu pH 5,5 išekstrahuotų baltymų preparatuose reikšmingas specifinis IAR prisijungimas aptiktas tik vidutinio SEP zonoje (38 pav.). Prie 1 mg baltymo specifiškai prisijungė  $3428,2 \pm 301,2$   $^{14}\text{C}$ -IAR imp./min., susiformavusių kompleksų specifiškumas  $33,0 \pm 2,5$  %. Šioje zonoje buvo lokalizuoti 5 vidutinio elektroforetinio paslankumo baltymai 32,2-66 kDa molekulinės masės ribose.

Iš visų trijų SEP zonų gelyje 50 mM TRIS-HCl buferiu pH 5,5 išekstrahuotų baltymų preparatuose reikšmingas specifinis IAR prisijungimas aptiktas tik vidutinio SEP zonoje (38 pav.). Prie 1 mg



**38 pav.** Chloroplastų stromos skirtingo elektroforetinio paslankumo zonų baltymų ir  $^{14}\text{C}$ -IAR sąveika.

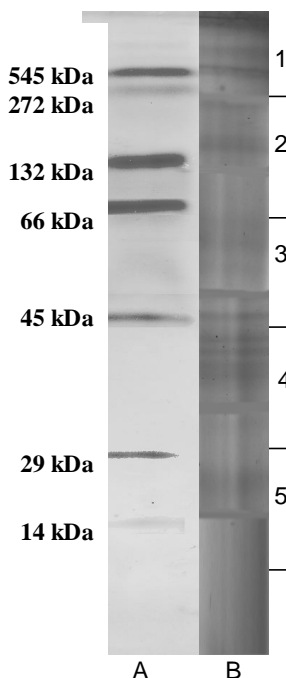
Norint išaiškinti, kuris/kurie iš šių penkių baltymų specifiškai sąveikauja su IAR, kituose etapuose vidurinė zona buvo supjaustoma į tris dalis (kaip parodyta 37 paveiksle), pagal baltymų lokalizacijos vietą, nustatytą nudažius keletą to paties gelio takelių.



**39 pav.** Chloroplastų stromos vidutinio elektroforetinio paslankumo zonos baltymų ir <sup>14</sup>C-IAR specifinė sąveika.

37,6±2,9 %. Tai leidžia daryti išvadą, kad su IAR sąveikaujančių baltymų lokalizuotų stromoje natyvi molekulinė masė gali būti apie 50-53 kDa (37 pav.).

***Specifiškai sujungti IAR-ASB kompleksai, susiformuojantys chloroplastų***

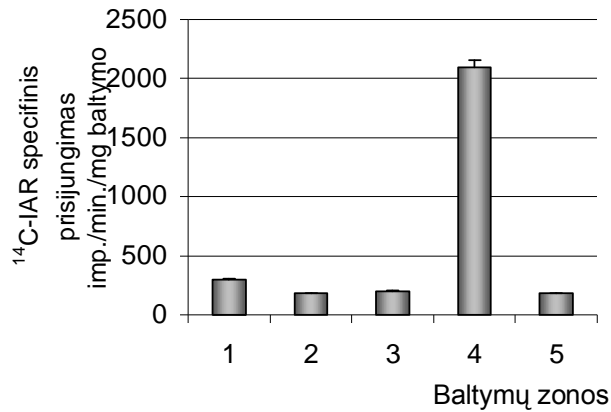


***membranose.*** Soliubilizuotus chloroplastų membranų baltymų preparatus išskirsčius nendenatūruojamosios PAAG elektroforezės metodu, aptikta 11 skirtingo elektroforetinio paslankumo baltymų: mažo SEP zonoje buvo 4 baltymų komponentai, vidutinio – 6, didelio – 2 (40 pav).

Tam, kad nustatyti kurioje zonoje lokalizuoti su IAR sąveikaujantys baltymai, iš nedažytų gelių buvo išpjautos 5 juostelės pagal nudažytuose geliuose matomas baltymų Rf, kaip parodyta paveiksle.

**40 pav.** **A** – baltymų molekulinės masės žymenys. **B** – soliubilizuoti chloroplastų membranų baltymai išskirstyti nendenatūruojamosios PAAG metodu.

Iš šių juostelių išekstrahuotų baltymų sugebėjimo sąveikauti su <sup>14</sup>C-IAR tyrimo rezultatai (39 pav.) parodė, kad specifiniu IAR sujungimu pasižymėjo pirmoji juosta, į kurią pateko 2 baltymai. Miligramui baltymo teko 3654,8±375,6 imp./min. specifiskai prisijungtos <sup>14</sup>C-IAR, o susiformavusių kompleksų specifiskumas –



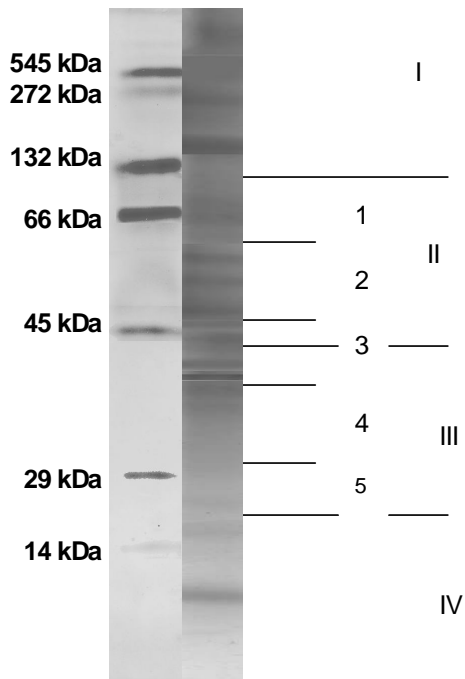
**41 pav.** Chloroplastų membranų baltymų ir <sup>14</sup>C-IAR sąveika.

Iš jų visų baltymai ekstrahuoti 50 mM TRIS-HCl, pH 7,5 buferiu. Specifinis <sup>14</sup>C-IAR prisijungimas buvo konstatuotas tik 4-oje juostelėje – 2095,6±206,2 impulsai 1 mg baltymo, susiformavusių kompleksų specifiškumas 34,2±2,2 % (41 pav.).

pačiuose geliuose (43 pav), galima daryti išvadą, kad chloroplastų membranose su IAR sąveikaujančių baltymų natyvi molekulinė masė yra 38-42 kDa.

### 3.7.2. ASB mitochondrijose

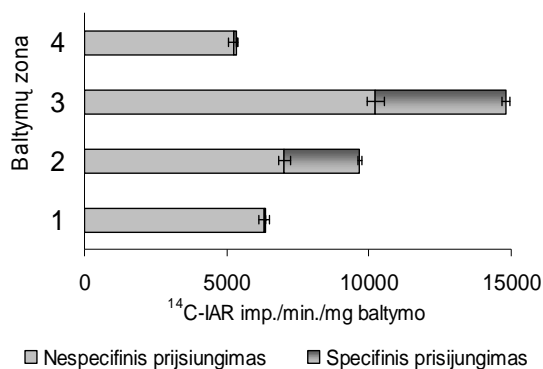
Mitochondrijų membranų baltymų elektroforetiniuose geliuose aptikta 16 baltymų juostų (42 pav.). Geliai buvo pjaustomi į keturias zonas (42 pav.) ir iš



kiekvienos jų 50mM TRIS-HCl buferiu pH 7,0 ekstrahuojami baltymai.

Šiuo atveju į pirmą zoną pateko 4, į antrą 5-6, į trečią 4-5 ir į ketvirtą 2 baltymų juostos. Iš ekstrahuotų baltymų preparatuose reikšmingas specifinis IAR prisijungimas buvo konstatuotas antroje ir trečioje zonoje (43 pav.).

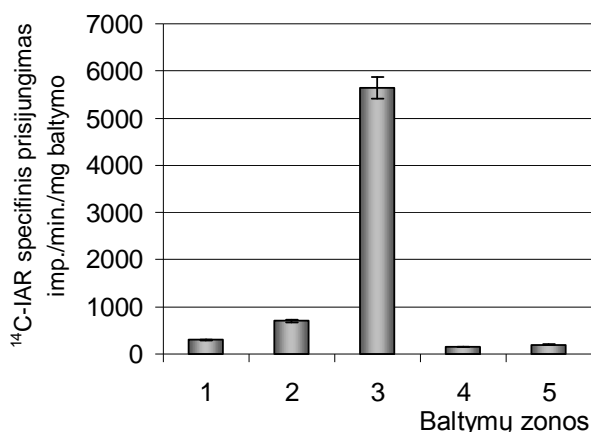
**42 pav. A** – baltymų molekulinės masės žymenys. **B** – soliubilizuoti mitochondrijų membranų baltymai išskirstyti natyvios PAAG elektroforezės metodu.



**43 pav.** Mitochondrijų membranų baltymų ir  $^{14}\text{C}$ -IAR sąveika.

specifiškumas –  $31,4 \pm 2,9$  % (43 pav.).

Kadangi šiose gelio zonose buvo lokalizuota net 10 baltymų 25-132 kDa, molekulinės masės ribose, vėlesniuose tyrimuose antra-trečia zonos buvo padalijamos į penkias dalis (42 pav.) siekiant išaiškinti, kuris/kurie iš šių baltymų gali specifiskai sąveikauti su  $^{14}\text{C}$ -IAR.



**44 pav.** Mitochondrijų membranų baltymų ir  $^{14}\text{C}$ -IAR specifinė sąveika.

baltymų lokalizuotų mitochondrijų membranose natyvi molekulinė masė yra 45-47 kDa (42 pav.).

Taigi, visų trijų tirtuose organoiduose lokalizuotų natyvių ASB molekulinės masės yra nedidelės. Pupelių hipokotilių plazmolemoje aptikto ASB funkcionuojančio terpės pH esant 5,5, susijusio su tįstamuoju pupelių hipokotilių augimu ir turinčiu IAR karboksilo grupės prisijungimo vietą būdingą IAR receptoriui – molekulinė masė 26 kDa, o ASB formuojančių

Prie 1 mg iš antros zonos išekstrahuotų baltymų specifiskai prisijungė  $2650,1 \pm 209,6$   $^{14}\text{C}$ -IAR imp./min., susiformavusių kompleksų specifiskumas –  $18,5 \pm 1,2$  %, o su 1 mg iš trečios zonos išekstrahuotų baltymų specifiskai sąveikavo  $4596,0 \pm 501,4$   $^{14}\text{C}$ -IAR imp./min., susiformavusių IAR-ASB kompleksų

Rezultatai parodė (44 pav.), kad specifinis  $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimas vyko trečioje juostoje, į kurią pateko 2 baltymai. Miligramui baltymo teko  $5641,6 \pm 553,6$   $^{14}\text{C}$ -IAR imp./min., susiformavusių IAR-ASB kompleksų specifiskumas  $40,9 \pm 3,5$  %.

Su IAR sąveikaujančių

specifiškai sujuntus IAR-ASB kompleksus, kai terpės pH 7,5, molekulinė masė yra tarp 29-45 kDa (Anisimovienė et al., 2000; Merkys et al., 2001; Jodinskienė, 2005; Jodinskienė, Anisimovienė, 2006).

Trimis lygmenimis (organoidų, subkompartmentų ir baltymų) atliktų tyrimų rezultatai leidžia daryti pagrįstą išvadą, kad chloroplastuose ir mitochondrijose yra lokalizuoti ir funkcionuoja ASB. Šių ASB tiek molekulinės masės, tiek sąveikos su IAR charakteristikos (kompleksų specifiškumas, prijungtos IAR kiekis baltymo vienetui,  $K_D$ , n, ASB prisotinimas IAR ir kt.) yra skirtingos tapusavyje, skiriasi ir nuo nustatytų charakteristikų kompleksų susiformuojančių su to paties augalo hipokotilių plazmolemoje ir citozolyje lokalizuotais ASB. Taip pat nuo IAR-baltymų kompleksų charakteristikų nustatytų kviečių koleoptilių ląstelėse, atsakančiose į IAR poveikį tįstamuju augimu (Даргинавичене, 1992) ir nuo pripažintų receptorių – plazmolemos ASB1 (Löbler, Klämbt, 1985 a; Jones, 1994) ir branduolio TIR1 (Dharmasiri et al., 2005 a; Kepinski, Leyser, 2005). Tai leidžia manyti, kad šiuose organoiduose susiformuojančių IAR-ASB reikšmė gali būti kitokia, tačiau apie jų funkciją IAR hormoninės funkcijos realizavime ląstelėje spręsti sunku, nes tyrimai iki šiol nebuvo vykdomi. Tai gali atskleisti tolimesni IAR-ASB kompleksų, susiformuojančių chloroplastuose ir mitochondrijose funkcijos tyrimai, tai ir yra tolimesnių tyrimų tikslas.



#### 4. APIBENDRINIMAS

Dvidešimto amžiaus pradžioje, įrodžius IAR fiziologinį veikimą, išsamūs tyrimai pradėti daugeliu auksino biologijos aspektų – nuo biosintezės ir metabolizmo iki molekulinį komponentų dalyvaujančių, signalinalo perdavimo eigoje išaiškinimo (Merkys et al., 1974; Меркис, Савичене, 1991; Merkys, Darginavičienė, 1997; Anisimovienė, Merkys, 2000; Delker et al., 2008). IAR poveikiui paaiškinti daugiau nei prieš 40 metų, atskirai vienoje nuo kitos, BI Augalų fiziologijos laboratorijoje (Merkys, 1966) ir JAV (Bonner, 1965) atliktų eksperimentų pagrindu buvo paskelbta idėja, kad IAR savo fiziologinę funkciją realizuoja sąveikaudama su specifiniais auksiną prisijungiančiais baltymais-receptoriais, o susidariusių kompleksų poveikis nukreiptas į genetinės informacijos modifikavimą branduolyje.

Šią hipotezę patvirtino vėlesni tyrimai, atlikti genetiniais ir biocheminiais metodais BI Augalų fiziologijos ir kitų šalių analogiško profilio laboratorijose (Merkys et al., 1969; 1988; Даргинавичене, 1992; Leyser, 2002 ir kt.). Šiuo metu tai visuotinai pripažinta teorija. Identifikuoti ankstyvojo atsako į IAR genai (Abel, Theologys, 1996; Guilfoyle, Hagen, 2001, 2007), parodytas RNR-polimerazės II aktyvumo padidėjimas izoliuotų branduolių sistemoje (Merkys et al., 1988; Даргинавичене, 1992), baltymų sudėties modifikacijos branduolyje (Abel, Theologys, 1996). Gauti įvairūs atsako į IAR mutantai (Leyser, 2002; Woodward, Bartel, 2005). Šiuo metu taip pat neabejojama, kad auksino molekulinio veikimo mechanizmas signalo perdavimo eigoje – kompleksiškas ir sudėtingas procesas, apimantis keletą lygmenų (Merkys et al., 2003; Lau et al., 2008; Delker et al., 2008). Auksiną atpažįstantys ir specifiskai sąveikaujantys baltymai-receptoriai – ASB, jame yra laikomi pirmaisiais ir svarbiausiais komponentais (Merkys, 1966; 2000; Venis et al., 1992; Merkys et al., 2004; Napier, 2004; Badescu, Napier, 2006). Nustatytos dvi auksino receptorių funkcionavimo vietos ląstelėje (Badescu, Napier, 2006). Ląstelės išorėje funkcionuojančio receptoriaus ASB1 ir jo homologų, apsprendžiančio(-ių) greitą ląstelės atsaką į auksiną tįstamuojau augimu – plazmolemoje (Venis et

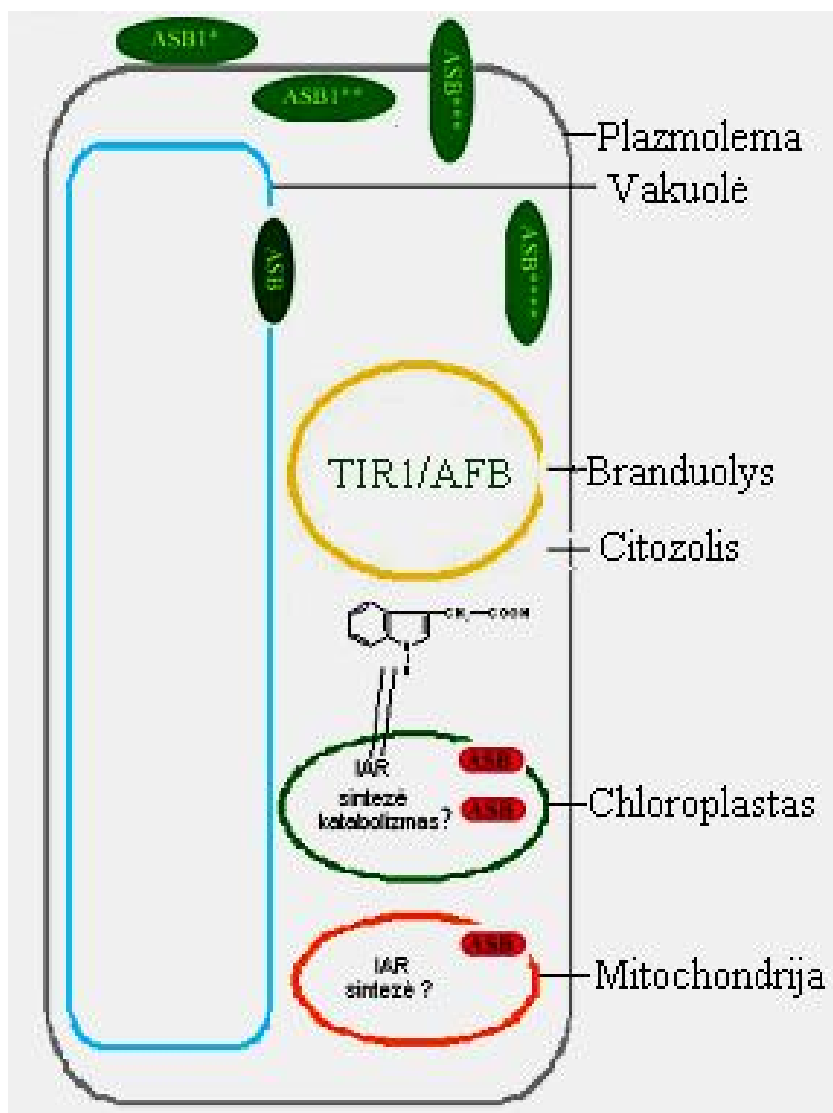
al., 1992; Даргинавичене, 1992; Merkys, Darginavičienė, 1997; Jones et al., 1998; Anisimovienė, Merkys, 2000; Jodinskienė, 2005 ir kt.) ir viduląstelinio tirpaus baltymo TIR1 ir jo homologų AFB baltymų, apsprendžiančio(-ių) transkripcinius atsako į auksiną procesus, įtakojančius augalo vystymąsi – branduolyje (Dharmasiri et al., 2005 a, b; Kepinski, Leyser, 2005). Keletas ASB aptikta lelijainių bei magnolijainių augalų ląstelių citozolyje (Oostrom et al., 1980; Даргинавичене и др., 1992; Merkys, Darginavičienė, 1997; Ohmiya et al.; 1993; Kim et al., 1998; Mockevičiūtė, Anisimovienė, 1999 ir kt.). Kai kuriems jų priskiriama IAR-receptorių funkcija (Oostrom et al., 1980; Даргинавичене, 1992; Merkys, Darginavičienė, 1997). Be receptorinių-IAR kompleksų ląstelėje funkcionuoja daugiau ASB, galinčių suformuoti su auksinu IAR-transportinius bei IAR-fermentinius kompleksus (Venis et al., 1992; Zažímalová, Napier, 2003; Merkys et al., 2003; Friml, 2003). Tačiau, subląstelinė ASB kompartmentacija iki šiol nėra gerai ištirta (Darginavičienė, Novickienė, 2002; Merkys et al., 2003; Woodward, Bartel, 2005; Anisimovienė et al., 2006). Mūsų manymu, svarbus dėmesys sprendžiant šiuos klausimus turėtų būti skiriamas chloroplastams ir mitochondrijoms, turint omenyje, kad šiuose bakterinės kilmės ląstelės organoiduose, kaip ir jų pirmtakuose (Sergeeva et al., 2002) parodytas IAR buvimas (Fregeau, Wightman, 1983; Sandber et al., 1990; Sitbon et al., 1993) ir sintezės galimybė (Sandberg et al., 1982; Fregeau, Wightman, 1983; Sandberg et al., 1983). Tai ir lėmė tyrimų krypties pasirinkimą.

IAR prijungimo saitų lokalizacijai ir IAR-ASB kompleksų formavimosi galimybių tyrimams buvo naudojamos >90 % švarumo ir ~97 % intaktiškumo pupelių hipokotilių mitochondrijų ir >90 % švarumo ir ~91,5 % intaktiškumo pupelių lapų chloroplastų subląstelinės frakcijos. Atlikus IAR ir ASB sąveikavimo galimybių tyrimus, pirmą kartą parodyta (45 pav.), kad intaktiniuose chloroplastuose funkcionuoja dvi IAR prisijungimo vietos – specifinė sąveika vyksta terpės pH esant 5,5 ir 7,5 (Anisimovienė et al., 2004; Merkys et al., 2004 a; Mockevičiūtė et al., 2006). IAR-ASB kompleksai kai terpės pH 7,5 formuojasi (antroji IAR prisijungimo vieta funkcionuoja) tik

intaktiniuose ir funkcionaliuose chloroplastuose. Mitochondrijų intaktiniuose ir funkcionaliuose organoiduose aptikta viena IAR prisijungimo vieta, optimalus pH specifiskai sujungtų IAR-ASB kompleksų formavimuisi – 7,0 (Anisimovienė et al., 2003; Merkys et al., 2004 b). Nors mitochondrijų organoidų intaktiškumo ir funkcionalumo užtikrinimas neturi įtakos kitų IAR prisijungimo vietų funkcionavimui ir optimaliam IAR-ASB kompleksų formavimosi pH, tačiau turi įtakos ASB ir IAR sąveikai – bendrai ir specifiskai prijungtos <sup>14</sup>C-IAR kiekiui baltymo vienetai ir susiformuojančių kompleksų specifiskumui.

Susiformuojančių specifiskai sujungtų IAR-ASB kompleksų charakteristikų (ASB prisotinimo IAR ligandu, EC<sub>50</sub>, K<sub>D</sub>, n, ligandinio specifiskumo) analizė, atlikta tokiais pat metodais, kaip ir tiriant kituose ląstelių kompartmentuose lokalizuotų ASB ir auksino sąveikas (Löbler, Klämbt, 1985 a; Даргинавичене, 1992; Anisimovienė, Merkys, 2000) parodė, kad organoiduose susiformuojantys IAR-ASB kompleksai (6 priedas) yra nevienodi. Visi organoiduose lokalizuoti ASB pasižymi dideliu specifiniu auksino prisijungimo aktyvumu. Kompleksų specifiskumas yra 51,0±2,9 % chloroplastuose, kai optimalus terpės pH 5,5 ir 43,2±3,9 %, esant optimaliam terpės pH 7,5 bei mitochondrijų organoiduose – 41,3±3,6 % (optimalus pH 7,0). Šių ASB giminingumas IAR ligandui yra mažesnis nei daugelio žinomų ASB, kuriems priskiriama receptoriaus funkcija (13 lentelė). Organoiduose lokalizuoti ASB turi didelį IAR prisijungimo vietų skaičių, o jų prisotinimas IAR ligandu, artėja prie pilno tik esant aukštoms <sup>14</sup>C-IAR koncentracijoms.

Dėl IAR prisijungimo vietų analogišką struktūrą turintys indolo junginiai konkuravo nevienoda tvarka (7, 8 priedai): intaktinių chloroplastų preparatuose kai terpės pH 5,5: IAR>ISR>IPR>IPVR, o kai pH 7,5: IAR>ISR>IPVR>IPR. Intaktinių mitochondrijų preparatuose, esant terpės pH 7,0: IAR>IPVR>IPR>ISR. Kadangi dėl <sup>14</sup>C-IAR prijungimo vietų šiuose organoiduose konkuravo fiziologiškai aktyvūs junginiai, o neaktyvus IAR metabolitas IKR nekonkuravo, tai rodo, kad ši sąveika turi biologinę reikšmę.



**45 pav.** ASB subląstelinė kompartmentacija: žaliai pažymėti iki šio darbo identifikuoti ASB; raudonai pažymėti – šiame darbe nustatyti ASB.

\* **ASB<sub>1</sub>** (Venis et al., 1992; Jones, 1994; Merkys et al., 1988) **ir homologai** – **ASB<sub>20</sub>** (Merkys et al., 1988; Даргинавичене, 1992; Merkys, Darginavičienė, 1997), **ASB<sub>26</sub>** (Jodinskienė, 2000; Anisimovienė, Merkys, 2000; Merkys, et al., 2004 a) **ir kt.**

\*\* **ASB<sub>80-90</sub>** (Merkys et al., 1988; Даргинавичене, 1992; Merkys, Darginavičienė, 1997), **ASB<sub>29-45</sub>** (Jodinskienė, 2000; Anisimovienė, Merkys, 2000; Merkys, et al., 2004 a) **ir kt.**

\*\*\* **ASB<sub>23</sub>** (Zettl et al., 1992) **ir kt.**

\*\*\*\* **ASB<sub>57</sub>** (Kim et al., 2001) **ir kt.**

Antiauksinas ir auksino išnešimo iš ląstelės inhibitorius TJBR dėl  $^{14}\text{C}$ -IAR prisijungimo vietų tiek abiejuose intaktinių chloroplastų ASB, tiek intaktiniame mitochondrijų organoide funkcionuojančio ASB, konkuravo panašiai (9, 10 priedai). Kitas IAR transporto inhibitorius – NFR  $^{14}\text{C}$ -IAR iš

prisijungimo prie ASB vietų aktyviai stūmė tik intaktinių chloroplastų frakcijoje, kai terpės pH 7,5. Intaktinių mitochondrijų organoiduose (pH 7,0) NFR konkuravo dvigubai silpniau, o chloroplastuose terpės pH esant 5,5 nekonkuravo visai (29 pav.). Taigi, kaip jau minėta, abiejų organoidų, tiek iš pupelių hipokotilių išskirtų intaktinių mitochondrijų (optimalus pH 7,0), tiek iš jų lapų išskirtų intaktinių chloroplastų (optimalūs pH 5,5 ir 7,5) preparatuose susiformuojančių IAR-ASB kompleksų charakteristikos skiriasi tarpusavyje. Šių kompleksų charakteristikos labai skiriasi nuo charakteristikų IAR-receptorinių kompleksų, susiformuojančių tiek to paties augalo pupelių hipokotilių plazmolemoje (Anisimovienė, Merkys, 2000; Jodinskienė 2005; Jodinskienė, Anisimovienė, 2006), tiek ir kukurūzų (Löbler, Klambt, 1985; a; Jones, 1994) bei kviečių (Даргинавичене, 1992) koleoptilių plazmolemoje, o taip pat nuo IAR ir TIR1 sąveikos (Dharmasiri et al., 2005 a; Kepinski, Leyser, 2005) vykstančios branduolyje charakteristikų. Šių ASB giminingumas IAR yra ženkliai didesnis, o IAR ligando prisijungimo prie baltymo vietų skaičius mažesnis. Mažesnėse <sup>14</sup>C-IAR koncentracijose vyksta ir ASB prisotinimas ligandu.

Osmotinio šoko ir diferencinio centrifugavimo būdu atskyrus organoidų membranų struktūras ir skystų fazių (stromos bei matrikso) subkompartmentus nustatyta, kad IAR prisijungimo vieta chloroplastuose (optimalus kompleksų formavimuisi terpės pH 7,5) lokalizuota membranose, susiformuojančių kompleksų specifiškumas 32,9±1,0 %. ASB, suformuojantys specifinius kompleksus su IAR, kai terpės pH 5,5 lokalizuoti stromoje, šių kompleksų specifiškumas – 42,3±2,0 %. Specifinių IAR atpažįstančių baltymų buvimo ir funkcionavimo galimybė mitochondrijų matrikse buvo atmesta, specifinė sąveika nevyko. Šiame organoide IAR-ASB kompleksų formavimasis, esant terpės pH 7,0, vyksta mitochondrijų membranų vezikulių preparatuose.

Išsodinti amonio sulfatu chloroplastų stromos baltymai bei soliubilizuoti, t.y. pervesti į tirpią būseną, naudojant nejoninį detergentą tritoną X-100, chloroplastų membranų struktūrų baltymai išlaikė gebėjimą specifiškai prisijungti IAR. IAR-ASB kompleksų su tirpiaisiais baltymais specifiškumas

49,2±3,1 %, o su soliubilizuotais membranų baltymais – 36,4±2,1 % yra artimi intaktiniuose organoiduose susiformuojančių IAR-ASB kompleksų specifiškumui.

Soliubilizuojant mitochondrijų membranų baltymus nejoniniu detergentu tritonu X-100 paaiškėjo, kad šiuo detergentu nepilnai soliubilizuojasi baltymai arba tas baltymas, kuris mitochondrijų membranose „atpažįsta“ ir sąveikauja su IAR. Todėl šių baltymų soliubilizacijai buvo panaudotas kitas nejoninis detergentas digitoninas, naudojamas būtent, mitochondrijų lipoproteinų kompleksams ardyti (Niznik et al., 1986; Eubel et al., 2003). Šiuo detergentu soliubilizuotų mitochondrijų membranų baltymų sąveikos su IAR tyrimai parodė, kad tiek specifinis prisijungimas miligramui baltymo (7499,3±482,5 <sup>14</sup>C-IAR imp./min.), tiek susiformuojamčių kompleksų specifiškumas (34,2±2,4 %) artimi intaktiniuose mitochondrijų organoiduose vykstančiai ASB ir IAR sąveikai.

Įvertinus tirpių chloroplastų stromos baltymų bei soliubilizuotų chloroplastų ir mitochondrijų membraninių struktūrų baltymų sąveikos su IAR charakteristikas (12 lentelė) nustatyta, kad visų šiuo atveju tirtų baltymų giminingumas IAR ligandui yra didesnis, nei giminingumas nustatytas intaktinių organoidų baltymų prie tokių pat pH reikšmių, o <sup>14</sup>C-IAR prisijungimo prie baltymo vietų skaičius mažesnis. Šie rezultatai koreliuoja su gautomis charakteristikomis tiriant NAR ir auksino receptoriaus ASB1 sąveiką plazmolemos membranų preparatuose (Löbler, Klämbt, 1985 a) ir soliubilizuoto bei išgryninto ASB1 (Cross, Briggs, 1978; Löbler, Klämbt, 1985 a; Jones, 1994).

Tiek išsodintų chloroplastų stromos, tiek soliubilizuotų chloroplastų membranų baltymų sąveikos su IAR  $K_D$  yra viena eile mažesnės, nei sąveikos su soliubilizuotais mitochondrijų membranų baltymais (12 lentelė). Tai rodo, jog abiejų chloroplastų baltymų giminingumas IAR ligandui yra didesnis nei soliubilizuotų mitochondrijų membranų ASB. Labai ženkliai skiriasi <sup>14</sup>C-IAR prisijungimo prie vietų skaičius prie šių trijų ASB (12 lentelė). Soliubilizuotų mitochondrijų ASB atveju, jis yra viena eile didesnis už IAR prisijungimo

viėtų skaičių prie išsodintų stromos ASB ir net dviem eilėm didesnis už IAR prisijungimo vietų skaičių prie chloroplasto membranose lokalizuotų ASB.

**12 lentelė.** Pupelių ląstelių kompartmentuose aptiktų IAR-ASB kompleksų charakteristikų palyginimas

Ląstelių kompartmentas	IAR-ASB charakteristikos				
	pH	Kompleksų specifiškumas, %	$K_D$ , M	Prisijungimo vietų skaičius mol/mg baltymo	ASB molekul. masė
Chloroplastų stroma	5,5	49,2±3,1	4,62±0,42×10 <sup>-6</sup>	1,3±0,28×10 <sup>-10</sup>	50-53
Chloroplastų membranos	7,5	36,4±2,1	1,14±0,39×10 <sup>-6</sup>	3,08±0,40×10 <sup>-11</sup>	38-42
Mitochondrijų membranos	7,0	34,2±2,4	8,49±0,51×10 <sup>-5</sup>	5,29±0,72×10 <sup>-9</sup>	45-47
Plazmolema	5,5	43,6±1,7	1,65±0,54×10 <sup>-7</sup>	2,07±1,24×10 <sup>-10</sup>	26
	7,5	31,2±0,8	5,86±0,68×10 <sup>-7</sup>	5,52±1,59×10 <sup>-10</sup>	29-45
Citozolis	7,8	18	–	–	67
	7,8	28	–	–	30

Artimos cheminės struktūros junginių (tokių pat kaip ir intaktiniuose organoiduose) gebėjimo išstumti <sup>14</sup>C-IAR iš kompleksų tiek su išsodintais chloroplastų stromos, tiek su soliubilizuotais membranų baltymais tyrimai parodė, kad abiem atvejais ligandų aktyvumas ir eiliškumas (35 pav.) atitiko intaktinių bei funkcionalių chloroplastų atvejus, prie tokių pat terpės pH, gaunamą stūmimo aktyvumą ir eiliškumą. IAR iš kompleksų, susiformuojančių su soliubilizuotais mitochondrijų membranų baltymais, skirtingai nei intaktiniame organoide, ISR išstūmė aktyviau, nei IPR.

Lyginant augsino transporto inhibitorių gebėjimą išstumti <sup>14</sup>C-IAR iš IAR-ASB kompleksų su soliubilizuotais chloroplastų ir mitochondrijų membranų baltymais, parodyta, kad NFR išstūmimas abiem atvejais yra panašus (14,3±1,5 % ir 13,9±1,7 %, atitinkamai), tuo tarpu TJBR konkuravimas dėl IAR prijungimo vietų esančių mitochondrijų membranų ASB yra beveik du kartus didesnis nei dėl chloroplastų membranų.

Baltymus išskirsčius ir išvalius natyvos PAAGE metodu nustatyta, kad su IAR sąveikaujančių baltymų lokalizuotų chloroplastų stromoje natyvi molekulinė masė yra 50-53 kDa ribose, chloroplastų membranose funkcionuojančių ASB – nuo 38 iki 42 kDa. Mitochondrijų membranose aptiktų specifiskai IAR atpažįstančių baltymų natyvi molekulinė masė – 45-47 kDa.

Taigi, darbe specifinių ASB lokalizacija ir funkcionavimas parodytas trimis lygmenimis: intaktinių organoidų, jų subkompartmentų bei baltymų (nusodintų stromos bei soliubilizuotų membranų). Tokiu būdu gauti rezultatai rodo, kad mitochondrijų organoiduose funkcionuoja vienas, o chloroplastų organoiduose du IAR prijungimo saitai. Nors abu chloroplastų (tirpus ir membraninis) ir vienas mitochondrijų (membraninis) ASB natyvioje būklėje yra mažos molekulinės masės baltymai, tačiau jų sąveikos su IAR charakteristikos (kompleksų specifiskumas, prijungtos IAR kiekis baltymo vienetui,  $K_D$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ , ASB prisotinimas IAR ir kt.) ženkliai skiriasi tarpusavyje. Šiuose organoiduose funkcionuojančių ASB charakteristikos ženkliai skiriasi ir nuo kitų pupelių tįstančių hipokotilių ląstelėse aptiktų ASB – dviejų plazmolemoje (Anisimovienė et al., 2000; Merkys et al., 2004 a, b; Jodinskienė, 2005; Jodinskienė, Anisimovienė, 2006) ir dviejų citozolyje (Меркис и др., 1999; Mockevičiūtė, Anisimovienė, 1999; Anisimovienė et al., 2000) charakteristikų (12 lentelė).

Skiriasi ir nuo visuotinai pripažintų auksino receptorių sąveikos su auksinu charakteristikų (13 lentelė) – plazmolemoje funkcionuojančio ASB1 (Löbner, Klambt, 1985 a; Jones, 1994) ir tirpaus branduolio baltymo – TIR1 (Dharmasiri et al., 2005 a; Kepinski, Leyser, 2005) bei nuo kviečių koleoptilių ląstelių, atsakančių į IAR poveikį tįstamuojų augimu kompartmentuose – plazmolemoje, citozolyje, tonoplaste – susiformuojančių IAR-baltymų kompleksų (Merkys et al., 1988; Даргинавичене, 1992; Anisimovienė et al., 1998; Darginavičienė, Novickienė, 2002). Šie duomenys (12, 13 lentelės) leidžia daryti prielaidą, kad šiuose organoiduose susiformuojančių IAR-ASB



funkcijos gali būti kitokios nei IAR-receptorinių kompleksų plazmolemoje ar branduolyje.

**13 lentelė.** Įvairių augalų ląstelių kompartmentuose aptiktų IAR-ASB kompleksų charakteristikų palyginimas

Ląstelių kompartmentas	Charakteristikos			Žinoma arba numanoma funkcija	Autoriai, metai
	pH	K <sub>D</sub> , M	ASB molek. masė		
ASB1 kukurūzų plazmolema	5,5	IAR $3,9 \times 10^{-6}$ NAR $3-6 \times 10^{-8}$	40 (2×22)	Receptorius	Löbler et al., 1985 a; Jones, 1994
TIR1 vairo branduolys	7,5 7,2	$2,5 \times 10^{-8}$ $8,4 \times 10^{-8}$	?	Receptorius	Kepinski, Leyser, 2005 Dharmasiri et al., 2005a
ASB kviečių plazmolema	5,5 7,2	$1,1 \times 10^{-8}$ $3,0 \times 10^{-8}$	20 80-90	Receptorius ?	Даргинавичен е, 1992
ASB kviečių citozolis	8,0	$1,7 \times 10^{-6}$	40	Receptorius	Даргинавичен е, 1992
ASB kviečių tonoplastas	5,5 8,0	$1,2 \times 10^{-7}$ $1,8 \times 10^{-7}$	? ?	? ?	Merkys et al., 1988
ASB morkų plazmolema	5,5	$2 \times 10^{-5}$		Transporteris	Zbell, 1996
AUX1	5,0-6,0	$2,6 \times 10^{-6}$	?	Transporteris	Carrier et al., 2008
ASB ryžių plazmolema	5,5 5,5	$4,5 \times 10^{-7}$ $3,8 \times 10^{-6}$	? ?	Receptorius Transporteris	Zaina et al., 1989
Tirpūs ASB-geltonosios pupelės	7,0-7,6 5,0-6,0	$9,3 \times 10^{-6}$ $9,5 \times 10^{-6}$	48 47, 15	Fermentinis	Sakai, 1985
ASB kukurūzų membranos	7,0	$1,0 \times 10^{-6}$	?	Fermentinis	Nave, Benveniste, 1984
Tirpus ASB 19/20 persiko	7,0	$4,1 \times 10^{-5}$	19/20	Fermentinis?	Ohmiya et al., 1993
Tirpus Pp60 persiko	7,0	$3,5 \times 10^{-5}$	60	Fermentinis	Sugaya et al., 2000

Chloroplastų ir mitochondrijų organoiduose susiformuojančių specifiskai sujungtų IAR-ASB kompleksų charakteristikos yra labiau panašios į kompleksų susiformuojančių su tirpiaisi baltymais, kaip manoma, turinčiais fermentinius aktyvumus (13 lentelė) persikų daigų apeksu ASB19/20 (Ohmiya et al., 1993) ir Pp60 (Sugaya et al., 2000), geltonųjų pupelių ASB (Sakai, 1985). O taip pat morkų (Zbell, 1996), ryžių (Zaina et al., 1989), cukinijų (Jacobs, Hertel, 1978; Hertel et al., 1983) plazmolemoje identifikuotiems ASB (13 lentelė), kurie buvo charakterizuoti kaip pernešikliai.

Tačiau apie šiuose organoiduose funkcionuojančių ASB reikšmę remiantis vien kompleksų charakteristikomis ar panašumu su vienais ar kitais identifikuotais ASB, kurių funkcija žinoma ar numanoma, spręsti sunku. Kaip žinia, receptorinė sistema turi atitikti tam tikrus reikalavimus, kaip antai, susijungimas turi būti aukšto giminingumo, receptoriaus prisotinimo hormonu lygis turi atitikti fiziologiškai aktyvią hormono koncentraciją (Stoddart, Venis, 1980). Tačiau Ohmiya ir kt. (1993) remdamiesi tuo, kad augalo audiniai atsako į labai dideles auksino koncentracijas: pavyzdžiui, pupelių hipokotiliuose auksino reguliuojamų genų (*ARG1*, *ARG2*) transkripcijos tempas didėja didinant auksino koncentraciją ir pasiekia plato (stabilizuojasi) esant  $10^{-4}$  M IAR (Yamamoto et al., 1992); atsakas sojos pupelių *SAUR* į 2,4-D neužsisotina esant  $10^{-2}$  M (McClure, Guilfoyle, 1987), mano, kad augaliniuose audiniuose gali egzistuoti auksino receptoriai su žemu giminingumu auksinui. Be to, kaip jau minėta, panašias charakteristikas kaip ir tirtuose organoiduose turi ir tirpūs ASB su fermentiniu aktyvumu: ASB40 (Sugaya et al., 1996), ASB19/20 (Ohmiya et al., 2002), Pp60 (Sugaya et al., 2000), bei plazmolemoje funkcionuojantys ASB – IAR-pernešikliai (Zbell, 1996; Zaina et al., 1989; Jacobs, Hertel, 1978; Hertel et al., 1983).

Manoma, kad pernešikliams būdingas ne tik mažas giminingumas, bet ir labai didelis prisijungimo vietų skaičius (pvz.:  $>300$  pmol/mg baltymo). Tačiau, neseniai nustatyta (Carrier et al., 2008), kad AUX1 ir jo transporto substrato IAR sąveikos disociacijos konstanta  $K_D = 2,6 \times 10^{-6}$  M (t.y. baltymas

mažo giminingumo IAR ligandui), bet IAR prisijungimo vietų skaičius labai mažas –  $11,800 \pm (675)$  fmol IAR/mg baltymo.

Tai tik patvirtina prielaidą, kad ne ASB molekulinė masė lemia susiformuojančių kompleksų charakteristikas, o aminorūgščių seka IAR prisijungimo prie ASB vietoje (Venis et al., 1992; Anisimovienė, Merkys, 2000; Christian et al., 2006). Parodyta, kad prisijungimo saitas – /-His-Arg-His-Ser-Cys-Glu-/ yra būdingas IAR receptoriui tarpininkaujančiame ląstelės atsake į IAR padidėjimu (tįsimu) (Venis et al., 1992; Jones, 1994; Anisimovienė, Merkys, 2000; Woo, 2001; Napier, 2004). Kai IAR karboksilo grupės prisijungimo klasteryje tarp dviejų aminorūgščių /-His-/ vietoje /-Arg-/ yra kitokia aminorūgštis, susiformuojančių IAR-ASB kompleksų charakteristikos yra kitokios (Ohmiya et al., 1998). Kitokios charakteristikos, ypač prisijungimo saitų selektyvumas, yra būdingas ir daug /-Leu-/ aminorūgščių sekoje turinčiame TIR1 receptoriuje, apsprendžiančiame transkripcinius atsako į auksiną procesus, įtakojančius augalo vystymąsi (Dharmasiri et al., 2005 b).

Šiuo metu turimais rezultatais, IAR-ASB kompleksų, susiformuojančių savitą genetinę informaciją turinčiuose ląstelės organoiduose – chloroplastuose ir mitochondrijose, galimą reikšmę sunku vertinti. Tačiau turint omenyje tai, kad jų pirmtakuose (bakterijose) gali būti sintetinama ir išskiriama į aplinką IAR, bei vykti IAR metabolizmo (katabolizmo) procesai (Merkys et al., 1974; Sergeeva et al., 2002 ir kt.), o taip pat tai, kad šie organoidai išlaikė savybę sintetinti (Fregeu, Wightman, 1983), o chloroplastas katabolizuoti ir transportuoti IAR (Sandberg et al., 1982, 1983; 1990; Brown et al., 1986; Sitbon et al., 1993; Anisimovienė et al., 2007), mūsų manymu, galima daryti prielaidą, kad chloroplasto vaidmuo IAR hormoninės funkcijos realizavimui gali būti sietinas su fiziologiškai aktyvios IAR formos palaikymu ląstelėje. Daryti kokias nors prielaidas apie galimą mitochondrijos vaidmenį IAR hormoninės sistemos veikloje kol kas negalime, nes kaip jau minėta fitohormonų tyrimuose šiam organoidui iki šiol buvo skiriama per mažai dėmesio, todėl dar laukia ilgas tyrimų kelias.

Tam, kad būtų atskleista IAR-ASB kompleksų susiformuojančių chloroplastuose ir mitochondrijose, reiksmė ir galimos funkcijos – organoido ir/ar ląstelės atžvilgiu reikalingi tolimesni tyrimai.

## IŠVADOS

1. Pirmą kartą organoidų, subkompartimentų ir baltymų lygmenimis parodyta, kad pupelių lapų chloroplastuose ir hipokotilių ląstelių mitochondrijose yra lokalizuoti ir gali funkcionuoti auksiną prisijungiantys baltymai.
2. Organoidų intaktiškumo ir funkcionalumo užtikrinimas turi reikšmės IAR-ASB sąveikos ypatybėms: skirtingų ASB funkcionavimui, IAR-ASB kompleksų formavimuisi.
3. Du skirtingi specifiskai sujungti IAR-ASB kompleksai – optimalūs terpės pH 5,5 ir 7,5, formuojasi intaktiniuose chloroplastuose ir vienas – optimalus terpės pH 7,0 intaktinėse mitochondrijose.
4. Šiuose organoiduose lokalizuoti ASB pasižymi dideliu auksino prisijungimo aktyvumu, nors yra gana mažo giminingumo IAR ligandui ir turintys didelį prisijungimo vietų skaičių. Šių ASB prisotinimas ligandu artėja prie pilno esant aukštomis  $^{14}\text{C}$ -IAR koncentracijoms.
5. Chloroplastuose ir mitochondrijose vykstanti IAR ir ASB sąveika turi biologinę reikšmę: dėl  $^{14}\text{C}$ -IAR prijungimo vietų prie šių ASB konkuruoja fiziologiškai aktyvūs junginiai, o neaktyvus IAR metabolitas IKR – nekonkuruoja.
6. Intaktiniame chloroplaste funkcionuoja du skirtingi ASB. Vienas jų (molekulinė masė 50-53 kDa, kompleksų formavimosi optimalus pH 5,5) lokalizuotas stromoje. Kitas (molekulinė masė 38-42 kDa, kompleksų formavimosi optimalus pH 7,5) – lokalizuotas membranose.
7. Mitochondrijose funkcionuojantis 45-47 kDa molekulinės masės auksiną prisijungiantis baltymas lokalizuotas membranose.
8. Chloroplastuose ir mitochondrijose susiformuojantys IAR-ASB kompleksai pagal pagrindines charakteristikas (prijungtos IAR kiekį baltymo vienetui, kompleksų specifiskumą,  $K_D$ ,  $EC_{50}$ , n, ASB prisotinimą IAR, ligandinį specifiskumą) skiriasi tarpusavyje. Jie taip pat skiriasi nuo IAR-ASB kompleksų, susiformuojančių pupelių hipokotilių ar kviečių koleoptilių ląstelių, atsakančių į IAR poveikį tįstamoju augimu plazmolemoje bei IAR kompleksų susiformuojančių su ASB1 ir TIR1.

## NAUDOTOS LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Aach H, Böse G, Graebe JE. *ent*-kaurene biosynthesis in the cell-free system from wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings and the localization of *ent*-kaurene synthetase in plastids of three species. – *Planta* 1995; 197: 333-342.
- Abel S, Theologis A. Early genes and auxin action. – *Plant Physiol* 1996; 111: 9-17.
- Albertine K, Maravolo N, Kaustinen H. Effects of gibberellin and several growth retardants on plastid ultrastructure in the hepatic *Marchantia polymorpha*. – *The Bryologist* 1976; 79: 22-34.
- Albertsson P, Andreasson E. The constant proportion of grana and stroma lamellae in plant chloroplasts. – *Physiologia Plantarum* 2004; 121: 334-342.
- Allen JF. The function of genomes in bioenergetic organelles. – *Phil Trans R Soc Lond B* 2003; 358: 19-38.
- Andersson MX, Kjellberg JM, Sandelius AS. Chloroplast biogenesis. Regulation of lipid transport to the thylakoid in chloroplast isolated from expanding and full expanded leaves of pea. – *Plant Physiology* 2001; 127: 184-193.
- Andersson SGE, Kurland CG. Reductive evolution of resident genomes. – *Trends in Microbiology* 1998; 6: 263-268.
- Andersson SGE, Zomorodipour A, Andersson JO, et al., The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. – *Nature* 1998; 396: 133-14.
- Anisimovienė NO.  $\beta$ -indolilacto rūgšties palyginamasis tyrimas sistematiškai tolimuose augaluose. – Biologijos mokslų kandidato laipsnio disertacija. Vilnius, 1974.
- Anisimovienė NO. Fiziologinės-biocheminės indolil-3-acto rūgšties apykaitos ypatybės dygstančiose sėklose: rezervai, sintezė, panaudojimas. – Gamtos mokslų habilitacinis darbas. Vilnius, 1994.
- Anisimovienė N, Jodinskienė M, Merkys A. Search for the proteins interacting with IAA in the tonoplast. – *Biologija* 1998; 3: 39.
- Anisimovienė N, Jodinskienė M. Hormonų funkcijos ypatybės augalų ir gyvūnų ląstelėse. – Konferencijos “Aktualūs medžiagų apykaitos klausimai” medžiaga 1999: 15-16.
- Anisimovienė N, Merkys A. Approaches for identification of auxin-binding proteins in the plasmalemma of dicotyledonous plants. – *Biologija* 2000; 2: 279-282.
- Anisimovienė N, Merkys A, Jodinskienė M, Mockevičiūtė R. IAA-protein complexes in different compartments of dicotyledonous plant cells. – *Sodininkystė ir daržininkystė* 2000; 19(3): 86-97.
- Anisimovienė N, Merkys A. Pathways of indole-3-acetic acid (IAA) level regulation in bean seedlings. – *Sodininkystė ir daržininkystė* 2001; 20: 86-97.
- Anisimovienė N, Mockevičiūtė R, Jodinskienė M, Akelionienė V. Characterization of IAA-ABPs complexes in different compartments of dicotyledonous plant cells. – *Biologija* 2003; 3: 49-52.
- Anisimovienė N, Mockevičiūtė R, Merkys A. Investigations of IAA binding in chloroplast and mitochondria. – *Sodininkystė ir daržininkystė* 2004; 23(2): 12-22.
- Anisimovienė N, Merkys A, Darginavičienė J, Novickienė L. Action of phytohormones in processes of plant growth and morphogenesis. – International scientific conference designed to 100<sup>TH</sup> anniversary of prof. Jonas Dągys “Genetic and physiological fundamentals of plant growth and productivity” 2006: 7-9.

- Anisimovienė N, Mockevičiūtė R, Jodinskienė M. Indole-3-acetic acid in chloroplasts: the possibilities of phytohormone fund formation. – *Botanica Lituanica* 2007; 13: 85-91.
- Apelbaum A, Vinkler Ch, Sfakiotakis E, Dilley DR. Increased mitochondrial DNA and RNA polymerase activity in ethylene-treated potato tubers. – *Plant Physiol* 1984; 76: 461-464.
- Arnon DI. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. – *Plant Physiol* 1949; 24: 1-15.
- Asghar H, Zahir Z, Arshad M, Khaliq A. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. – *Biology and Fertility of Soils* 2002; 35(4): 231-237.
- Azevedo J, Courtois F, Hakimi M-A, Demarshy E, Lagrange T, Alcaraz J-P, Jaiswai P, Marechal-Drouard L, Lerbs-Mache S. Intraplastidial trafficking of a phage-type RNA polymerase is mediated by a thylakoid RING-H2 protein. – *PNAS* 2008; 105: 9123-9128.
- Badescu GO, Napier RM. Receptors for auxin: will it all end in TIRs? – *Trends in Plant Science* 2006; 11: 217-223.
- Barkawi LS, Tam Y-Y, Tillman JA, Pederson B, Calio J, Al-Amier H, Emerick M, Normanly J, Cohen JD. A high-throughput method for the quantitative analysis of indole-3-acetic acid and other auxins from plant tissues. – *Analytical Biochemistry* 2008; 372: 177-188.
- Bartel B, LeClere S, Magidin M, Zolman BK. Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid  $\beta$ -oxidation. – *J Plant Growth Regul* 2001; 20: 198-216.
- Bartoli CG, Pastori GM, Foyer CH. Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. – *Plant Physiology* 2000; 123: 335-343.
- Batt S, Venis MA. Separation of localisation of two classes of auxin binding sites in corn coleoptile membranes. – *Planta* 1976; 130: 15-21.
- Batt S, Wilkins MB, Venis MA. Auxin binding to corn coleoptile membranes: kinetics and specificity. – *Planta* 1976; 130: 7-13.
- Bauer J, Hiltbrunner A, Kessler F. Molecular biology of chloroplast biogenesis: gene expression, protein import and intraorganellar sorting. – *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 420-433.
- Beale MII, Ward JL, Smith SJ, Hooley R. A new approach to gibberellin perception in aleurone: novel, hydrophylic, membrane-impermeant, GA-sulphonic acid derivatives induce  $\alpha$ -amylase formation. – *Physiol Plant* 1992; 85: A136.
- Benková E, Witters E, Van Dongen W, Kolář, Motyka V, Brzobohatý B, Van Onckelen HA, Macháčkova I. Cytokinins in Tobacco and Wheat chloroplasts. Occurrence and changes due to light/dark treatment. – *Plant Physiol* 1999; 121: 245-251.
- Benz R. Porin from bacterial and mitochondrial outer membranes. – *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 1985; 19: 145-190.
- Berg OG, Kurland CG. Why mitochondrial genes are most often found in nuclei? – *Mol Biol Evol* 2000; 17: 951-961.
- Bergman A, Gardesström P, Ericson I. Method to obtain a chlorophyll-free preparation of intact mitochondria from spinach leaves. – *Plant Physiol* 1980; 66: 442-445.
- Bergman B, Osborne B. The *GUNNERA-NOCTOC* symbiosis. – *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy* 2002; 102B: 35-39.

- Bernasconi P. Effect of synthetic and natural protein kinase inhibitors on auxin efflux in zucchini (*Cucurbita pepo*) hypocotyls. – *Physiol Plant* 1996; 96: 205-210.
- Bilang J, Macdonald H, King PJ, Sturm A. A soluble auxin-binding protein from *Hyoscyamus muticus* is a glutathione S-transferase. – *Plant Physiol* 1993; 102(1): 29-34.
- Blanchard JL, Lynch M. Organellar genes: why do they end up in the nucleus? – *Trends Genet* 2000; 16: 315-320.
- Bock R. Extranuclear inheritance: gene transfer out of plastids. – *Progress in Botany* 2006; 67: 75-100.
- Bogorad L. Evolution of organelles and eukaryotic genomes. – *Science* 1975; 188: 891-898.
- Bohnert HJ, Gordon HJ. Homologies among ribosomal RNA and messenger RNA genes in chloroplasts, mitochondria and *E. coli*. – *Molecular and General Genetics* 1980; 179: 539-545.
- Bölter B, Soll J. Ion channels in the outer membranes of chloroplasts and mitochondria: open doors or regulated gates? – *EMBO Journal* 2001; 20: 935-940.
- Bonner J. *The molecular Biology of Development*. – Oxford: Clarendon Press, 1965.
- Bowsher CG, Tobin AK. Compartmentation of metabolism within mitochondria and plastids. – *Journal of Experimental Botany* 2001; 52: 513-527.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. – *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- Brandt P. Chloroplast and mitochondria: not only semi-autonomous, but also self-regulating? – *Endocytobiosis & Cell Res* 1990; 7: 283-288.
- Brown BH, Crozier A, Sandberg G. Catabolism of indole-3-acetic acid in chloroplast fraction from light-grown *Pisum sativum* L. seedlings. – *Plant, Cell and Environment* 1986; 9: 527-534.
- Brown EC, Somanchi A, Mayfield SP. Interorganellar crosstalk: new perspectives on signaling from the chloroplast to the nucleus. – *Genome Biology* 2001; 2: 1021.1-1021.4.
- Browning G, Saunders PF. Membrane localized gibberellins A<sub>9</sub> and A<sub>4</sub> in wheat chloroplasts. – *Nature* 1977; 265: 375-377.
- Burger G, Saint-Louis D, Gray MW, Lang BF. Complete sequence of the mitochondrial DNA of the red alga *Porphyra purpurea*: cyanobacterial introns and shared ancestry of red and green algae. – *The Plant Cell* 1999; 11: 1675-1694.
- Butler JH, Hu S, Brady SR, Dixon MW, Muday GK. *In vitro* and *in vivo* evidence for actin association of the naphthylphthalamic acid-binding protein from zucchini hypocotyls. – *Plant J* 1998; 13: 291-301.
- Caliebe A, Soill J. News in chloroplast protein import. – *Plant Molecular Biology* 1999; 39: 641-645.
- Campanella JJ, Olajide AF, Magnus V, Ludwig-Müller J. A novel auxin conjugate hydrolase from wheat with substrate specificity for longer side-chain auxin amide conjugates. – *Plant Physiology* 2004; 135: 2230-2240.
- Campos N, Bako L, Feldwisch J, Schell J, Palme K. A protein from maize labeled with azide-IAA has novel  $\beta$ -glucosidase activity. – *Plant J* 1992; 2: 675-684.
- Carrier DJ, Bakar NTA, Swarup R, Callaghan R, Napier RM, Bennett MJ, Kerr ID. The binding of auxin to the *Arabidopsis* auxin Influx transporter AUX1<sup>[10A]</sup>. – *Plant Physiology* 2008; 148: 529-535.



- Cavalier-Smith T. The origin of nuclei and of eucaryotic cells. – *Nature* 1975; 256: 463-468.
- Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM. Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: Similarity of product to two-component regulators. – *Science* 1993; 262: 539-544.
- Chen J-G, Ullah H, Young JC, Sussman MR, Jones AM. ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. – *Genes Dev* 2001; 15: 902-911.
- Christian M, Schenck D, Böttger M, Steffens B, Lüthen H. New insight into auxin perception, signal transduction and transport. – *Progress in Botany* 2006; 67: 219-247.
- Choe HT, Whang M. Effects of ethephon on aging and photosynthetic activity in isolated chloroplasts. – *Plant Physiol* 1986; 80: 305-309.
- Chory J, Reinecke D, Sim S, Washburn T, Brenner M. A role for cytokinins in De-etiolation in *Arabidopsis*. – *Plant Physiol* 1994; 104: 339-347.
- Clarke AK, MacDonald TM, Sjögren LLE. The ATP-dependent Clp protease in chloroplasts of higher plants. – *Physiologia Plantarum* 2005; 123: 406-412.
- Clegg MT, Gaut BS, Learn GH, Morton BR. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. – *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6795-6801.
- Clifton SW, Minx P, Fauron M-R, Gibson M, et al. Sequence and comparative analysis of the maize NB mitochondrial genome. – *Plant Physiology* 2004; 136: 3486-3503.
- Cohen JD, Bandurski RS. Chemistry and physiology of the bound auxins. – *Annual Review of Plant Physiology* 1982; 33: 403-430.
- Costacurta A, Vanderleyden J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. – *Crit Rev Microbiol* 1995; 21: 1-18.
- Cox D, Muday GK. NPA binding activity is peripheral to the plasma membrane and is associated with the actin cytoskeleton. – *Plant Cell* 1994; 6: 1941-1953.
- Cross JW, Briggs WR. Properties of a solubilized microsomal auxin binding protein from coleoptiles and primary leaves of *Zea mays*. – *Plant Physiol* 1978; 62: 152-157.
- Darginavičienė J, Merkys A, Krupovnickienė A, Žemėnas J, Jurkonienė S, Aušriūnienė G. IAA-dependent regulation of growth processes in the phase of gravitropic curvature realization. – *Eksperimentinė biologija* 1991; 4: 20-34.
- Darginavičienė J, Maksimov G. The role of basipetal IAA transport in the regulation of plant cell growth. – *Biologija* 2001; 2: 11-13.
- Darginavičienė J, Novickienė L. Augimo problemos šiuolaikinėje augalų fiziologijoje. Vilnius, 2002.
- Davey JE, Van Staden J. Cytokinins in spinach chloroplasts. – *Ann Bot* 1981; 48: 243-246.
- del Pozo JC, Estelle M. F-box proteins and protein degradation: an emerging theme in cellular regulation. – *Plant Mol Biol* 2000; 44: 123-128.
- Delker C, Raschke A, Quint M. Auxin dynamics: the dazzling complexity of a small molecule's message. – *Planta* 2008; 227: 929-941.
- DeLong A, Mockaitis K, Christensen S. Protein phosphorylation in the delivery of and response to auxin signals. – *Plant Mol Biol* 2002; 49: 285-303.
- Depta H, Rubery PH. A comparative study of carrier participation in the transport of 2,3,5-triiodobenzoic acid, indole-3-acetic acid, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by *Cucurbita pepo* L. Hypocotyl segments. – *J Plant Physiol* 1984; 115: 371-387.

- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Jones AM, Estelle M. Auxin action in a cell-free system. – *Curr Biol* 2003; 13: 1418-1422.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. – *Nature* 2005 a; 435: 441-445.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jürgens G, Estelle M. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. – *Dev Cell* 2005 b; 9: 109-119.
- Dixon MW, Jacobson JA, Cady CT, Muday GK. Cytoplasmic orientation of the naphthylphthalamic acid-binding protein in zucchini plasma membrane vesicles. – *Plant Physiol* 1996; 112(1): 421-432.
- Dohrmann U, Hertel R, Kowalik H. Properties of auxin binding sites in different subcellular fractions from maize coleoptiles. – *Planta* 1978; 140: 97-106.
- Donderski W, Głuchkowska M. Production of Cytokinin-like Substances by Planktonic Bacteria isolated from Lake Jeziorak. – *Polish Journal of Environmental Studies* 2000; 9: 369-376.
- Eckardt NA. Genomic hopscotch: gene transfer from plastid to nucleus. – *The Plant Cell* 2006; 18: 2865-2867.
- Elsden SR, Hilton MG, Waller JM. The end products of the metabolism of aromatic amino acids by clostridia. – *Arch Microbiol* 1976; 107: 283-288.
- Ernsten A, Sandberg G, Crozier A, Wheeler CT. Endogenous indoles and the biosynthesis and metabolism of indole-3-acetic acid in cultures of *Rhizobium phaseoli*. – *Planta* 1987; 171: 422-428.
- Eubel H, Jänsch L, Braun H-P. New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. – *Plant Physiology* 2003; 133: 274-286.
- Fisk DG, Walker MB, Barkan A. Molecular cloning of the maize gene *crp1* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression. – *EMBO* 1999; 18: 2621-2630.
- Flügge U-I. Transport in and out of plastids: does the outer envelope membrane control the flow? – *Trends in Plant Science* 2000; 5: 135-137.
- Foyer CH. Stromal protein phosphorylation in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. – *Biochem J* 1985; 231: 97-103.
- Forsberg J, Ström J, Kieselbach T, Larsson H, Alexciev K, Engström Å, Åkerlund H-E. Protease activities in the chloroplast capable of cleaving an LHCII N-Terminal peptide. – *Physiologia Plantarum* 2005; 123: 21-29.
- Fregeau JA, Wightman F. Natural occurrence and biosynthesis of auxins in chloroplast and mitochondrial fractions from sunflower leaves. – *Plant Science Letters* 1983; 32: 23-34.
- Frey PA, Frey TG. Synthesis of undecagold labeling compounds and their applications in electron microscopic analysis of multiprotein complexes. – *J Struct Biol* 1999; 127: 94-100.
- Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. – *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 319-324.
- Frey TG, Renken CW, Perkins GA. Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. – *Biochimica et Biophysica acta. Bioenergetics* 2002; 1555: 196-203.
- Fry KE. Some factors affecting the Hill reaction activity in cotton chloroplasts. – *Plant Physiol* 1970; 45: 465-469.

- Frydman VM, Wareing PF. Phase change in *Hedera helix* L. I. Gibberellin-like substances in the two growth phases. – *Journal of Experimental Botany* 1973; 24: 1131-1138.
- Friml J. Auxin transport – shaping the plant. – *Current Opinion in Plant Biology* 2003; 6: 7-12.
- Gallagher SR. One-dimensional electrophoresis using nondenaturing conditions. – *Current Protocols in Molecular Biology* 1999; Supplement 47: 10.2B.1-10.2B.11.
- Gallagher SR, Leonard RT. Effect of vanadate, molybdate, and azide on membrane-associated ATPase and soluble phosphatase activities of corn roots. – *Plant Physiol* 1982; 70: 1335-1340.
- Giegé P, Brennicke A. From gene to protein in higher plant mitochondria. – *Life Sciences* 2001; 324: 209-217.
- Gilroy S, Jones RL. Perception of Gibberellin and Abscisic acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone protoplasts. – *Plant Physiol* 1994; 104: 1185-1192.
- Glick BR, Patten CL, Holguim G, Penrose DM. Biochemical and genetic mechanism used by plant growth promoting bacteria. ICP, Convent Garden, London, 1999.
- Glick RE, Sears BB. Genetically programmed chloroplast dedifferentiation as a consequence of plastome-genome incompatibility in *Oenothera*. – *Plant Physiol* 1994; 106: 367-373.
- Gray MW, Cedergren R, Abel Y, Sankoff D. On the evolutionary origin of the plant mitochondrion and its genome. – *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2267-2271.
- Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial evolution. – *Science* 1999; 283: 1476-1481.
- Gray MW, Burger G, Lang BF. The origin and early evolution of mitochondria. – *Genome Biology* 2001; 2(reviews): 1018.1-1018.5.
- Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M. Auxin regulates SCF<sup>TIR1</sup>-dependent degradation of AUX/IAA proteins. – *Nature* 2001; 414: 271-276.
- Gualberto JM, Handa H, Grienenberg JM. Isolation and fractionation of plant mitochondria and chloroplasts: specific examples. – In *Methods in Cell Biology*. Galbraith DW, Bourque DP, Bohnert HJ. (Ed.), London, 1995; 161-171.
- Guilfoyle TJ, Hagen G. Auxin response factors. – *J Plant Growth Regul* 2001; 20: 281-291.
- Guilfoyle TJ, Hagen G. Auxin response factors. – *Current Opinion in Plant Biology* 2007; 10: 453-460.
- Gutensohn M, Fan E, Frielingsdorf S, Hanner P, Hou B, Hust B, Klösigen RB. Toc, Tic, Tat et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. – *Journal of Plant Physiology* 2006; 163: 333-347.
- Hagen G, Guilfoyle TJ. Rapid induction of selective transcription by auxin. – *Mol Cell Biol* 1985; 5: 1197-1203.
- Hájek T, Honys D, Čaplová V. New method of plant mitochondria isolation and sub-fractionation for proteomic analyses. – *Plant Science* 2004; 167: 389-395.
- Halda-Alija L. Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus* L. – *Can J Microbiol* 2003; 49: 781-787.
- Handa H. The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus* L.): comparative analysis of

- the mitochondrial genomes of rapeseed and *Arabidopsis thaliana*. – Nucleic Acid Research 2003; 31: 5907-5916.
- Hartree EF. Determination of proteins: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. – Anal Biochem 1972; 48: 422-427.
- Hartrung W, Heilmann B, Gimmler H. Do chloroplasts play a role in abscisic acid synthesis? – Plant Science Letters 1981; 22: 235-242.
- Hartweck LM, Olszewski NE. Rice GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 is a gibberellin receptor that illuminates and raises questions about GA signaling. – The Plant Cell 2006; 18: 278-282.
- Heazlewood JL, Millar AH. AMPDB: the *Arabidopsis* mitochondrial protein database. – Nucleic Acid Research 2005; 33: D605-D610.
- Hedden P, Kamiya Y. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. – Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 1997; 48: 431-460.
- Heilmann B, Hartrung W, Gimmler H. The distribution of abscisic acid between chloroplasts and cytoplasm and the permeability of the chloroplast envelope for abscisic acid. – Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 1980; 97: 67-78.
- Hertel R, Thomson K, Russo VEA. *In vitro* auxin binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles. – Planta (Berl.) 1972; 325-340.
- Hertel R. Auxin binding sites: subcellular fractionation and specific binding assays. – Plant Organelles 1979; 173-183.
- Hertel R, Lomax TL, Briggs WR. Auxin transport in membrane vesicles from *Cucurbita pepo* L. – Planta 1983; 157: 193-201.
- Hertel R. Auxin binding protein 1 is a red herring. – J Exp Bot 1995; 46: 461-462.
- Hirayama T, Shinozaki K. Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. – TRENDS in Plant Science 2007; 12: 343-351.
- Hiratsuka JH, Shimada R, Whittier T, Ishibashi M, Sakamoto M, Mori C, et al. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: Intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. – Mol Gen Genet 1989; 217: 185-194.
- Hooley R, Beale MH, Smith SJ, Walker RP, Rushton PJ, et al. Gibberellin perception at the *Avena fatua* aleurone: do our molecular keys fit the correct locks? – Biochem Soc Trans 1992; 20: 85-89.
- Hooley R, Beale MH, Smith SJ, Walker RP. *In vivo* photoaffinity labelling of gibberellin-binding proteins in *Avena fatua* aleurone. – Aust J Plant Physiol 1993; 20: 573-584.
- Howe CJ, Barbrook AC, Koumandou VL, Nisbet RER, Symington HA, Wightman TF. Evolution of the chloroplast genome. – Phil Trans R Soc Lond 2003; 358: 99-107.
- Hua J, Chang C, Sun Q, Meyerowitz EM. Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis* ERS gene. – Science 1995; 269: 1712-1714.
- Hua J, Meyerowitz EM. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. – Cell 1998; 94: 261-271.
- Hull AK, Rekha V, Celenza JL. *Arabidopsis* cytochrome P450 that catalyse the first step of the tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. – Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 2379-2384.
- Yamamoto KT, Mori H, Imaseki H. Novel mRNA sequences induced by indole-3-acetic acid in section of elongation hypocotyls of mung bean (*Vigna radiata*). – Plant Cell Physiol 1992; 33: 13-20.

- Ivanov AG, Kitcheva MI, Christov AM, Popova LP. Effects of abscisic acid treatment on the thermostability of the photosynthetic apparatus in *Barley* chloroplasts. – *Plant Physiol* 1992; 98: 1228-1232.
- Jackson C, Dench JE, Hall DO, Moore AL. Separation of mitochondria from contaminating subcellular structures utilizing silica sol gradient centrifugation. – *Plant Physiol* 1979; 64: 150-153.
- Jacobs M, Hertel R. Auxin Binding to Subcellular Fractions from *Cucurbita* Hypocotyls: In Vitro Evidence for an Auxin Transport Carrier. – *Planta* 1978; 142: 1-10.
- Jayabaskaran C, Kuntz M, Guillemant P, Weil JH. Variations in the levels of chloroplast tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases in senescing leaves of *Phaseolus vulgaris*. – *Plant Physiol* 1990; 92: 136-140.
- Janska H. ATP-dependent proteases in plant mitochondria: Why do we know about them today? – *Physiologia Plantarum* 2005; 123: 399-405.
- Jodinskienė M. IAA receptors in kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cell plasmalemma. – *Biologija* 2000; 2: 290-292.
- Jodinskienė M. Indolil-3-acto rūgšties sąveikos su plazmolemos baltymais ypatybės tyjimojo augimo metu. – *Daktaro disertacija*. Vilnius, 2005.
- Jodinskienė M, Anisimovienė N. Peculiarities of two different IAA binding sites functioning in plasmalemma of hypocotyls cells of kidney bean. – International scientific conference designed to 100<sup>th</sup> anniversary of prof. Jonas Dagys “Genetic and physiological fundamentals of plant growth and productivity” 2006: 42-43.
- Jodinskienė M, Anisimovienė A. Peculiarities of two different IAA binding sites functioning in kidney bean hypocotyls cell plasmalemma. – *Biologija* 2007; 53: 44-47.
- Jones AM, Venis MA. Photoaffinity labelling of indole-3-acid binding proteins in maize. – *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6153-6156.
- Jones AM, Herman E. KDEL-containing auxin-binding protein is secreted to the plasma membrane and cell wall. – *Plant Physiol* 1993; 101: 595-606.
- Jones AM. Auxin-binding proteins. – *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1994; 45: 393-420.
- Jones AM, Im K-H, Savka MA, Wu M-J, DeWitt G, Shillito R, Binns AN. Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed Auxin-Binding Protein 1. – *Science* 1998; 282: 1114-1117.
- Jones MN. Surfactants in membrane solubilisation. – *International Journal of Pharmaceutics* 1999; 177: 137-159.
- Journet E-P, Douce R. Mechanism of citrate oxidation by percoll-purified mitochondria from potato tuber. – *Plant Physiol* 1983; 72: 802-808.
- Juszczuk IM, Bykova NV, Møller IM. Protein phosphorylation in plant mitochondria. – *Physiologia Plantarum* 2007; 129: 90-103.
- Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A et al. Sequence analysis of the genome of the unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Stain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. – *DNA Research* 1996; 3: 109-136.
- Karadeniz A, Topcuoglu SF, Inan S. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. – *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2006; 22: 1061-1064.

- Kasahara H, Takei K, Ueda N, Hishiyama S, Yamada T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Sakakibara H. Distinct isoprenoid origins of cis- and trans-zeatin biosynthesis in *Arabidopsis*. – Journal of Biological Chemistry 2004; 279: 14049-14054.
- Katekar GF, Geissler AE. Auxin transport inhibitors. IV. Evidence of a common mode of action for a proposed class of auxin transport inhibitors: the phytotropins. – Plant Physiol 1980; 66: 1190-1195.
- Kaur S, Kapoor HC. A membrane-associated auxin-binding site from chickpea (*Cicer arietinum* L.) epicotyls. – Plant Sci 1989; 65: 135-141.
- Keith B, Brown S, Srivastava LM. *In vitro* binding of gibberellin A<sub>4</sub> to extracts of cucumber measured by using DEAE-cellulose filters. – Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79: 1515-1519.
- Kende H, Zeevaart JAD. The five “Classical” plant hormones. – The Plant Cell 1997; 9: 1197-1210.
- Kepinski S, Leyser O. Auxin induced SCF<sup>TIR1</sup>-Aux/IAA interaction involves stable modification of the SCF<sup>TIR1</sup> complex. – Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 12381-12386.
- Kepinski S, Leyser O. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. – Nature 2005; 435: 446-451.
- Kim Y-S, Kim D, Jin J. Isolation of a novel auxin receptor from soluble fractions of rice (*Oryza sativa* L.) shoots. – FEBS Letters 1998; 438: 241-244.
- Kim Y-S, Min J-K, Kim D, Jung J. A soluble auxin-binding protein, ABP<sub>57</sub>. – J Biol Chem 2001; 276(14): 10730-10736.
- Kiran NS, Polanská L, Fohlerova R, Mazura P, Válková M, Šmeral M, Zouhar J, Malbeck J, Dobrev PI, Macháčková I, Brzobohatý B. Ectopic over-expression of the maize  $\beta$ -glucosidase Zm-p60.1 perturbs cytokinin homeostasis in transgenic tobacco. – Journal of Experimental Botany 2006; 57: 985-996.
- Kleffmann T, Russenberger D, von Zychlinski A, Christopher W, Sjölander K, Gruissem W, Baginski S. The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. – Cur Biol 2004; 14: 354-362.
- Knoop V. The mitochondrial DNA of land plants: peculiarities in phylogenetic perspective. – Current genetics 2004; 46: 123-139.
- Kobayashi T, Takahara M, Miyagashima S, Kuroiwa H, Sasaki N, Ohta N, Matsuzaki M, Kuroiwa T. Detection and localization of a chloroplast-encoded HU-like protein that organizes chloroplast nucleoids. – The Plant Cell 2002; 14: 1579-1589.
- Kozak M. Comparison of initiation of protein synthesis in prokaryotes, eukaryotes, and organelles. – Microbiological Reviews 1983; 47: 1-45.
- Kreuz K, Kleining H. On the compartmentation of isopentenyl pyrophosphate synthesis and utilisation in plant cells. – Planta 1981; 153: 578-581.
- Kruft V, Eubel H, Jansch L, Werhahn W, Braun H-P. Proteomic Approach to identify novel mitochondrial proteins in *Arabidopsis*. – Plant Physiology 2001; 127: 1694-1710.
- Kubo T, Nishizawa S, Sugawara A, Itchoda N, Estiati A, Mikami T. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA<sup>Cys</sup>(GCA). – Nuclein Acid Research 2000; 28: 2571-2576.
- Küchler M, Soll J. From nuclear genes to chloroplast localized proteins. – Plant Science 2001; 161: 379-389.

- Kügler M, Jänsch L, Kruff V, Schmitz UK, Braun H-P. Analysis of the chloroplast protein complexes by blue-native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE). – *Photosynthesis Research* 1997; 53: 35-44.
- Kurland CG, Anderson SGE. Origin and evolution of the mitochondrial proteome. – *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2000; 64: 786-820.
- Kuroiwa T, Ohta T, Kuroiwa H, Shigeyuki K. Molecular and cellular mechanisms of mitochondrial nuclear division and mitochondriokinesis. – *Microsc Res Tech* 1994; 27: 220-232.
- Kusnetsov VV, Oelmüller R, Sarwat MI, Porfirova SA, Cherepneva GA, Herrmann RG, Kulaeva ON. Cytokinins, Abscisic acid and light affect accumulation of chloroplast proteins in *Lupinus Luteus* cotyledons without notable effect on steady-state mRNA levels. – *Planta* 1994; 194: 318-327.
- Kutschera U, Niklas KJ. Endosymbiosis, cell evolution, and speciation. – *Theory in Biosciences* 2005; 124: 1-24.
- Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. – *Nature* 1970; 227: 680-685.
- Lang BF, Burger G, O'Kelly CJ, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M, Gray M. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. – *Nature* 1997; 387: 493-497
- Lau S, Jürgens G, Smet ID. The evolving complexity of the auxin pathway. – *The Plant cell* 2008; 20: 1738-1746.
- Leaver CJ, Harme MA. Higher-Plant mitochondrial ribosomes contain a 5S ribosomal ribonucleic acid component. – *Biochem J* 1976; 157: 275-277.
- LeClere S, Rampey RA, Bartel B. IAR4, a gene required for auxin conjugate sensitivity in *Arabidopsis*, encodes a Pyruvate Dehydrogenase E1 $\alpha$  homolog. – *Plant Physiol* 2004; 135: 989-999.
- Leis JP, Keller EB. Protein chain-initiating methionine tRNAs in chloroplasts and cytoplasm of wheat leaves. – *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1970; 67: 1593-1599.
- Leyser O. Auxin: Lessons from a mutant weed. – *Physiol Plant* 1997; 100: 407-414.
- Leyser O. Molecular genetics of auxin signaling. – *Annu Rev Plant Biol* 2002; 53: 377-398.
- Leister D. Chloroplast research in the genomic age. – *TRENDS in Genetics* 2003; 19: 47-56.
- Leon P, Arroyo A, Mackenzie S. Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plant. – *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 1998; 49: 453-480.
- Leveau JH, Lindow SE. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *pseudomonas putida* Strain 1290. – *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71: 2365-2371.
- Li Y, Holmes WB, Appling DR, RajBhandary UL. Initiation of Protein Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria without Formylation of the Initiator tRNA. – *Journal of Bacteriology* 2000; 182: 2886-2892.
- Li S, Ehrhardt DW, Rhee SY. Systematic analysis of *Arabidopsis* organelles and a protein localization database for facilitating fluorescent tagging of full-length *Arabidopsis* proteins. – *Bioinformatics* 2006; 141: 527-539.
- Liberton M, Howard BR, Heuser J, Roth R, Pakrasi HB. Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis sp.* Strain PCC 6803. – *Protoplasma* 2006; 227: 129-138.

- Liu X, Yue Y, Li B, Nic Y, Li W, Wu WH, et al. A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. – *Science* 2007; 315: 1712-1716.
- Lyukevich TV, Kusnetsov VV, Karavaiko NN, Kulaeva ON, Selivankina SYu. The involvement of the chloroplast Zeatin-binding protein in hormone-dependent transcriptional control of the chloroplast genome. – *Russian Journal of Plant Physiology* 2002; 49: 105-112.
- Löbner M, Klämbt D. Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.). I. Purification by immunological methods and characterization. – *J Biol Chem* 1985 a; 260(17): 9848-9853.
- Löbner M, Klämbt D. Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.). II. Localization of a putative auxin receptor. – *J Biol Chem* 1985 b; 260(17): 9854-9859.
- Logan DC. The mitochondrial compartment. – *Journal of Experimental Botany* 2006; 57: 1225-1243.
- Lomax TL, Mehlhorn RJ, Briggs WR. Active auxin uptake by zucchini membrane vesicles: quantification using ESR volume and  $\Delta$ pH determinations. – *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 6541-6545.
- Lomax TL, Muday GK, Rubery P. Auxin transport. – In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology*. Davies PJ (Eds.), Dordrecht, The Netherlands, 1995; 509-530.
- López-Juez E. Plastid biogenesis, between light and shadows. – *Journal of Experimental Botany* 2007; 58:11-26.
- Loveys BR. The intracellular location of ABA in stressed and non-stressed leaf tissue. – *Physiologia Plantarum* 1977; 40: 6-10.
- Lovergrove A, Barratt DH, Beale MH, Hooley R. Gibberellin-photoaffinity labeling of two polypeptides in plant plasma membranes. – *Plant J* 1998; 15: 311-320.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. – *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- Ludwig-Müller J, Epstein E. Indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana*. III. *In vivo* biosynthesis. – *Plant Growth Regulation* 1994; 14: 7-14.
- Ludwig-Müller J, Sasx S, Sutter EG, Wodner M, Epstein E. Indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana*. I. Identification and quantification. – *Plant Growth Regulation* 1994; 13: 179-187.
- Lunn JE. Compartmentation in plant metabolism. – *Journal of Experimental Botany* 2007; 58: 34-47.
- Macdonald H, Jones A, King P. Photoaffinity labeling of soluble auxin-binding proteins. – *J Biol Chem* 1991; 266: 7393-7399.
- Macdonald H. Auxin perception and signal transduction. – *Physiol Plant* 1997; 100: 423-430.
- Mache R, Lerbs-Mache S. Chloroplast genetic system of higher plants: chromosome replication, chloroplast division and elements of the transcriptional apparatus. – *Current Science* 2001; 80: 217-224.
- Mackenzie S, McIntosh L. Higher plant mitochondria. – *The Plant Cell* 1999; 11: 571-585.
- Maier RM, Neckermann K, Igloi GL, Kössel H. Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspot of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. – *J of Molecular Biology* 1995; 251: 614-628.



- Malka F, Guillery O, Cifuentes-Diaz C, Guillou E, Belenguer P, Lombès A, Rojo M. Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. – *EMBO Reports* 2005; 6: 853-859.
- Marienfeld J, Unseld M, Brennicke A. The mitochondrial genome of *Arabidopsis* is composed of both native and immigrant information. – *Trends in Plant Science* 1999; 4: 459-502.
- Markovački N., Milić V. Use of *Azotobacter chroococcum* as potentially useful in agricultural application. – *Annals of Microbiology* 2001; 51: 145-158.
- Martin W, Herrmann R. Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? – *Plant Physiol* 1998; 118: 9-17.
- Martin W, Müller M. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. – *Nature* 1998; 392: 37-41.
- Martin W, Hoffmeister M, Rotte C, Henze K. An overview of endosymbiotic models for the origins of eukaryotes, their ATP-producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes), and their heterotrophic lifestyle. – *Biol Chem* 2001; 382: 1521-1539.
- Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Carnelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M, Penny D. Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. – *PNAS* 2002; 99: 12246-12251.
- Maslenkova LT, Zanev Y, Popova LP. Effect of abscisic acid on the photosynthetic oxygen evolution in barley chloroplast. – *Photosynth Res* 1989; 21: 45–50.
- McClure BA, Guilfoyle T. Characterization of a class of small auxin-inducible soybean polyadenylated RNAs. – *Plant Mol Biol* 1987; 9: 611-623.
- McFadden GI. Chloroplast origin and integration. – *Plant Physiol* 2001; 125: 50-53.
- Merkys A. The role of  $\beta$ -indoleacetic acid in geotropical reaction and its connection with the energetic and protein cell metabolism. – *Symp on Plant Stimulation Sophia*, 1966; 191.
- Merkys A, Putrimas A, Marčiukaitis A. Binding of  $\beta$ -indoleacetic acid with proteins of plants and possible physiological significance of this process. – *Flora* 1969; 160: 516-532.
- Merkys A, Anisimovienė N, Putrimas A. Comparatyve study of the IAA content in systematically different plants. – *Biochem Physiol Pflanzen* 1974; 165: 67-81.
- Merkys A, Novickienė L, Marčiukaitis A, Anisimovienė N, Putrimas A, Darginavičienė J, Rupainienė O. Laisvos ir sujungtos  $\beta$ -indolilacto rūgštis poveikis augalų augimui ir morfogenezės procesams. – *Botanikos Mokslo Pasiekimai Tarybų Lietuvoje* 1977; 30-50.
- Merkys A, Darginavičienė J, Žemėnas J. IAA complexes in plasmalemma and their supposed function. – *Physiology and Biochemistry of Auxins in Plants*, ed. M.Kutáček. Praha, 1988; 175-179.
- Merkys A, Maksimov G, Savičienė E, Darginavičienė J, Kazlauskas A. Comparable characteristics of dephosphorylating activity of wheat coleoptile cell tonoplast and plasmalemma. – *Biologija* 1995; 1-2: 155-160.
- Merkys A, Darginavičienė J. Plant gravitropic response. – *Advances in Space Biology and Medicine* 1997; 6: 213-230.
- Merkys A, Darginavičienė J, Maksimov G, Žemėnas J, Jurkonienė S, Kazlauskas A, Bareikienė N. Formation and activity dynamics of indole-3-acetic acid protein complexes during gravitropic reaction. – *Biologija* 1998; 3: 22-25.
- Merkys A. Phytohormones in plant growth physiology and the problems of its study. – *Sodininkystė ir daržininkystė* 2000; 19(3)-1: 15-24.

- Merkys A, Anisimovienė N, Jodinskienė M, Mockevičiūtė R. Distribution of IAA “recognising” proteins in dicotyledonous plant cells. – 17th international conference on plant growth substances. Brno, 2001; abstr: 152.
- Merkys A, Anisimovienė N, Darginavičienė J, Maksimov G. Principles of IAA action in plants. – *Biologija* 2003; 4: 28-31.
- Merkys A, Anisimovienė N, Jodinskienė M, Mockevičiūtė R. Peculiarities of IAA-binding sites in different compartments of *Phaseolus vulgaris* L. cells. – *Biologija* 2004 a; 2(1): 109-112.
- Merkys A, Anisimovienė N, Jodinskienė M, Mockevičiūtė R, Jankauskienė J. Subcellular localization of auxin-binding proteins in dicotyledonous plant cells. – *Acta Physiol Plant* 2004 b; 26(3) suppl: 157-158.
- Michake W, Katekar GF, Geissler AE. Phytotropin-binding sites and auxin transport in *Cucurbita pepo*: evidence for two recognition sites. – *Planta* 1992; 187: 254-260.
- Miyagishima S. Origin and evolution of the chloroplast division machinery. – *J Plant Res* 2005; 118: 295-306.
- Milborrow BW. Biosynthesis of abscisic acid by a cell-free system. – *Phytochemistry* 1974; 13: 131-136.
- Milborrow BW, Lee HS. Endogenous biosynthetic precursors of (+)-abscisic acid. VI – Carotenoids and ABA are formed by the ‘non-mevalonate’ thriose-pyruvate pathway in chloroplasts. – *Australian Journal of Plant Physiology* 1998; 25: 507-512.
- Mills WR, Joy KW. A rapid method for isolation of purified, physiologically active chloroplasts, used to study the intracellular distribution of amino acids in pea leaves. – *Planta* 1980; 148: 75-83.
- Mockaitis K, Estelle M. Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. – *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008; 24: 55-80.
- Mockevičiūtė R, Anisimovienė N. Indole-3-acetic acid receptors in the cytosol. – *Biologija* 1999; 4: 90-93.
- Mockevičiūtė R, Anisimovienė N, Merkys A. Comparison of different IAA-ABP complexes formed in kidney bean cell chloroplast and mitochondria. – *Biologija* 2006; 3: 102-105.
- Mohammed N, Onadera R, Or-Rashid MM. Degradation of tryptophan and related indolic compounds by ruminal bacteria, protozoa and their mixture *in vitro*. – *Amino Acids* 2003; 24: 73-80.
- Morrissey PJ, McCauley SW, Melis A. Differential detergent-solubilization of integral thylakoid membrane complexes in spinach chloroplasts Localization of photosystem 11, cytochrome b6-f-complex and photosystem I. – *Eur J Biochem* 1986; 160: 389 – 393.
- Motulsky H, Christopoulos A. Fitting Models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. GraphPad Software Inc, San Diego CA, USA 2003; 351.
- Muday GK, DeLong A. Polar auxin transport: controlling where and how much. – *Trends in Plant Science* 2001; 6(11): 535-542.
- Murphy GJP. A reassessment of the binding of naphthaleneacetic acid by membrane preparations from maize. – *Planta* 1980; 149: 417-426.
- Musser SM., Theg SM. Characterization of the early steps of OE17 precursor transport by the thylakoid ΔpH/Tat machinery. – *Eur J Biochem* 2000; 267: 2588-2598.

- Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim Y-C, Park S-H, et al. Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. – *Plant J* 2006; 46: 880-889.
- Nakamura C, Ono H. Solubilization and characterization of a membrane-bound auxin-binding protein from cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. – *Plant Physiol* 1988; 88: 685-689.
- Nakano T, Murakami S, Shoji T, Yoshida S, Yamada Y, Sato F. A novel protein with DNA binding activity from tobacco chloroplast nucleids. – *The Plant Cell* 1997; 9: 1673-1682.
- Nakano T, Kiaura T, Kaneko I, Nagata N, Matsuyama T, Asami T, Yoshida S. Molecular mechanism of chloroplast development regulated by plant hormones. – *RIKEN Review* 2001; 41: 86-87.
- Nakazono M, Hirai A. Identification of the entire set of transferred chloroplast DNA sequences in the mitochondrial genome of rice. – *Mol Gen Genetic* 1993; 236: 341-346.
- Nam MH, Kang BG. Modulation of phytochrome receptors by fluoride and ATP. – *J Biochem Mol Biol* 1995; 28: 552-555.
- Napier RM, Fowke LC, Hawes C, Lewis M, Pelham HRB. Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. – *J Cell Sci* 1992; 102: 261-271.
- Napier RM. Plant hormone binding sites. – *Annals of Botany* 2004; 93: 227-233.
- Nave J-F, Benveniste P. Inactivation by phenylgloxal of the specific binding of 1-naphthylacetic acid with membrane-bound auxin binding sites from maize coleoptiles. – *Plant Physiol* 1984; 74: 1035-1040.
- Niznik HB, Grigoriadis DE, Otsuka NY, Dumbrille-Ross A, Seeman P. The Dopamine D1 Receptor: Partial Purification of a Digitonin-solubilized Receptor-guanine Nucleotide Binding Complex. – *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 2974-2977.
- Nogue F, Mornet R, Laloue M. Specific photoaffinity labeling of a thylakoid membrane protein with an azido-cytokinin agonist. – *Plant Growth Regulation* 2004; 18: 51-58.
- Nordström A, Tarkowski P, Tarkowska D, Morbaek R, Astot C, Dolezal K, Sandberg G. Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. – *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 8039-8044.
- Notsu Y, Masood S, Nishikawa T, Kubo N, Akiduki G, Nakazono M, Hirai A, Kadowaki K. The complete sequence of the rice (*Oriza sativa* L.) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. – *Mol Genet Genomics* 2002; 268: 434-445.
- Nováková M, Motyka V, Dobrev PI, Malbeck J, Gaudinová A, Vanková R. Diurnal variation of cytokinin, auxin and abscisic acid levels in tobacco leaves. – *Journal of Experimental Botany* 2005; 56: 2877-2883.
- Oda K, Yamato K, Ohta E, Nakamura Y, Takemura M, Nozaton N, et al. Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA: a primitive form of plant mitochondrial genome. – *J Mol Biol* 1992; 223: 1-7.
- Ohyama K, Fukuzawa H, Kohchi T, Shirai H, Sano T, Sano S et al. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. – *Nature* 1986; 322: 572 - 574.

- Ohmiya A, Hayashi T. Immuno-gold localization of IAA in leaf cells of *Prunus persica* at different stages of development. – *Physiologia Plantarum* 1992; 85: 439-445.
- Ohmiya A, Kikuchi M, Sakai, Hayashi T. Purification and properties of an auxin-binding protein from the shoot apex of peach tree. – *Plant Cell Physiol* 1993; 34(2): 177-183.
- Ohmiya A, Tanaka Y, Kadowaki K, Hayashi T. Cloning of genes encoding auxin-binding proteins (ABP 19/20) from peach: significant peptide sequence similarity with germin-like proteins. – *Plant and Cell Physiol* 1998; 39(5): 492-499.
- Ohmiya A. Characterization of ABP 19/20, sequence homologues of germin-like protein in *Prunus persica* L. – *Plant Science* 2002; 163: 683-689.
- Olszewski N, Sun T, Gubler F. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism and response pathways. – *The Plant Cell* 2002; Supplement: S61-S80.
- Oostrom H, Kulescha Z, van Vliet ThB, Libbenga KR. Characterization of a cytoplasmic auxin receptor from tobacco-pith callus. – *Planta* 1980; 149: 44-47.
- Parthier B. Hormone-induced alterations in plant gene expression. – *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 1989; 185: 289-314.
- Pastor A, Cortadellas N, Alegre L. Immunolocalization of abscisic acid by monoclonal antibodies in *Lavandula stoechas* L. – *Plant Growth Regulation* 1995; 16: 287-292.
- Patten CL, Glick BR. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. – *Can Journal Microbiol* 1996; 42: 207-220.
- Patton EE et al. Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skip the F-box hypothesis. – *Trends Genet* 1998; 14: 236-243.
- Perbal G, Driss-Ecole D. *In vivo* binding of auxin to the plasmalemma and tonoplast of parenchymal cells in the wheat coleoptile. – *Biology of the Cell* 1988; 62: 275-280.
- Petrášek J, Černá A, Schwarzerová K, Elčknér M, Morris DA, Zažímalová E. Do phytohormones inhibit auxin efflux by impairing vesicle traffic? – *Plant Physiology* 2003; 131: 254-263.
- Pyke KA. Plastid division and development. – *The Plant Cell* 1999; 11: 549-556.
- Pillen K, Schondelmaier J, Jung C, Herrmann RG. Genotyping mapping of genes for twelve nuclear-encoded polypeptides associated with the thylakoid membranes in *Beta vulgaris* L. – *FEBS Letters* 1996; 395: 58-92.
- Pinnaduwege P, Bruce BD. *In vitro* interaction between a chloroplast transit peptide and chloroplast outer envelope lipids is sequences-specific and lipid class-dependent. – *The Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 32907-32915.
- Pohlmeyer K, Soll J, Steinkamp T, Hinnah S, Wagner R. Isolation and characterization of an amino acid-selective channel protein present in the chloroplastic outer envelope membrane. – *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 9504-9509.
- Polànska L, Vičánková A, Dobrev PI, Machávková I, Vaňkova R. Viability, ultrastructure and cytokinin metabolism of free and immobilized tobacco chloroplasts. – *Biotechnology Letters* 2004; 26: 1549-1555.
- Polanská L, Vičánková A, Nováková M, Malbeck J, Dobrev PI, Brzobohatý B, Vaňková R, Macháčková I. Altered cytokinin metabolism affects cytokinin, auxin, and abscisic acid contents in leaves and chloroplasts, and chloroplast ultrastructure in transgenic tobacco. – *J Exp Botany* 2007; 58: 637-649.

- Prasad TK, Anderson MD, Stewart CR. Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. – *Plant Physiol* 1994; 105: 619-627.
- Prinsen E, Kaminek M, Van Onckelen HA. Cytokinin biosynthesis: a black box. – *Plant Growth Regulation* 1997; 23: 3-15.
- Race HL, Herrmann RG, Martin W. Why have organelles retain genomes? – *Trends in Genetics* 1999; 15: 364-70.
- Radi A, Lange T, Niki T, Koshioka M, Lange MJP. Ectopic expression of pumpkin gibberellin oxidases alters gibberellin biosynthesis and development of transgenic *Arabidopsis* plants. – *Plant Physiology* 2006; 140: 528-536.
- Radwanski ER, Last RL. Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. – *The Plant Cell* 1995; 7: 921-934.
- Ray PM, Dohrmann U, Hertel R. Specificity of Auxin-binding sites on maize coleoptile membranes as possible receptor sites for auxin action. – *Plant Physiol* 1977 a; 60: 585-591.
- Ray PM, Dohrmann U, Hertel R. Characterization of Naphthaleneacetic acid binding to receptor sites on cellular membranes of maize coleoptile tissue. – *Plant Physiol* 1977 b; 59: 357-364.
- Railton ID, Reid DM, Gaskin P, MacMillan J. Characterisation of abscisic acid in chloroplasts of *Pisum sativum* L. Cv. Alaska by combined gas chromatography-mass spectrometry. – *Planta* 1974; 117: 179-182.
- Ramos JA, Zenser N, Leyser O, Callis J. Rapid degradation of auxin/indoleacetic acid proteins required conserved amino acid of domain II and is proteasome dependent. – *Plant Cell* 2001; 13: 2349-2360.
- Raven JA, Allen JF. Genomics and chloroplast evolution: what did cyanobacteria do for plants? – *Genome Biology* 2003; 4: 209.
- Razem FA, Luo M, Liu JH, Abrams SR, Hill RD. Purification and characterization of a barley aleurone abscisic acid-binding protein. – *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 9922-9929.
- Razem FA, El-Kereamy A, Abrams SR, Hill RD. The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. – *Nature* 2006; 439: 290-294.
- Reeves SG, Hall DO. Higher plant chloroplasts and grana: general preparative procedures (excluding high carbon dioxide fixation ability chloroplasts). *Methods in Enzymology*. 1980; Ed. A. San Pietro. New York, London, Toronto, Sidney, San Francisco; 69.
- Reinard T, Jacobsen H. A soluble high affinity auxin-binding protein from pea apex. – *Plant Physiol* 1995; 147: 132-138.
- Reith M, Munholland J. Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome. – *Plant Molecular Biology Reporter* 1995; 13: 333-335.
- Robinson C, Thompson SJ, Woolhead C. Multiple pathways used for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts. – *Traffic* 2001; 2: 245-251.
- Rodriguez AA, Stella AM, Storni MM, Zulpa G, Zaccaro. Effects of cyanobacterial extracellular products and gibberellic acid on salinity tolerance in *Oryza sativa* L. – *Saline Systems* 2006; 2: 7.
- Romanko EG, Selivankina SY, Moshkov JE, Novikova GV. Effect of cytokinin-binding proteins isolated from chloroplasts on transcription. – *Fiziol Rast* 1986; 33: 1078-1083.
- Romanov GA. Cytokinins and tRNAs: a hypothesis on their competitive interaction via specific receptor proteins. – *Plant Cell Environ* 1990; 13: 751-754.

- Sakai A, Takano H, Kuroiwa T. Organelle nuclei in higher plants: structure, composition, function, and evolution. – *Int Rev Cytol* 2004; 238: 59-118.
- Sakai H, Hua J, Chen QG, Chang C, Medrano LJ, Bleecker AB, Meyerowitz EM. ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signalling in *Arabidopsis*. – *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5812-5817.
- Sakai S. Auxin-binding protein in etiolated mungbean seedling: purification and properties of auxin-binding protein-II. – *Plant Cell Physiol* 1985; 26(1): 185-192
- Sakakibara H, Kasahara H, Ueda N, Kojima M, Takei K, Hishiyama S, Asami T, Okada K, Kamiya Y, Yamada T, Yamaguchi S. *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastid by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. – *PNAS* 2005; 102: 9972-9977.
- Sandberg G, Jensen E, Crozier A. biosynthesis of indole-3-acetic acid in protoplasts, chloroplasts, and a cytoplasmic fraction from barley (*Hordeum vulgare* L.). – *Planta* 1982; 156:541-554.
- Sandberg G, Jensen E, Crozier A. Effect of light on the catabolism of [2-<sup>14</sup>C]-3-indoleacetic acid in protoplasts, a chloroplast-rich fraction, and crude cytoplasmic preparation from barley (*Hordeum vulgare* L.). – *Plant Cell Environ* 1983; 6: 111-115.
- Sandber G, Gardeström P, Sitbon F, Olsson O. Presence of indole-3-acetic acid in chloroplasts of *Nicotiana tabacum* and *Pinus sylvestris*. – *Planta* 1990; 180: 562-568.
- Sato N. Comparatyve analysis of the genomes of cyanobacteria and plants. – *Genome Informatics* 2002; 13: 173-82.
- Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Asamizu E, Tabata S. Complete Structure of the Chloroplast Genome of *Arabidopsis thaliana*. – *DNA Research* 1999; 6: 283-290.
- Savičienė E, Darginavičienė J, Maksimov G. Basipetal transport of indole-3-acetic acid: translocation through plasmalemma and tonoplast. – *Biologija* 1997; 3: 25-33.
- Savičienė E, Maksimov G, Šveikauskas V, Bareikienė N. Indole-3-acetic acid compartmentation in the cell: a possible role of the vacuole. – *Sodininkystė ir daržininkystė* 2000; 19(3): 144-153.
- Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. – *Annals of the New York Academy of Science* 1949; 51: 660-672.
- Schmülling T, Schäfer S, Romanov G. Cytokinins as regularors of gene expresion. – *Physiologia Plantarum* 1997; 100: 505-519.
- Sergeeva E, Liaimer A, Bergman B. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. – *Planta* 2002; 215: 229-238.
- Serrano A, Cordoba F, Gonzales-Reyes JA, Navas P, Villalba J-M. Purification and characterization of two distinct NAD(P)H dehydrogenases from onion (*Allium cepa* L.) root plasma membranes. – *Plant Physiol* 1994; 106: 87-96.
- Shen YY, Wang XF, Wu FQ, Du SY, Cao Z, Shang Y, et al. The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. – *Nature* 2006; 443: 823-826.
- Shimokawa K, Sakanoshita A, Horiba K. Ethylene-induced changes of chloroplast structure in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc). – *Plant Cell Physiol* 1978; 19: 229-236.
- Shimomura S, Sotobayashi T, Futai M, Fukui T. Purification and properties of an auxin-binding protein from maize shoot membranes. – *J Biochem* 1986; 99: 1513-1524.

- Shimomura S, Sotobayashi T, Fukui T, Futai M. Different properties of two different types of auxin-binding sites in membranes from maize coleoptiles. – *Planta* 1988; 175: 558-566.
- Shimomura S, Watanabe S, Ichikawa H. Characterization of auxin-binding protein 1 from tobacco: content, localization and auxin-binding activity. – *Planta* 1999; 209: 118-125.
- Shimoni E, Rav-Hon O, Ohad I, Brumfeld V, Reich Z. Three-dimensional organization of higher-plant chloroplast thylakoid membranes revealed by electron tomography. – *The Plant Cell* 2005; 17: 2580-2586.
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N et al. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. – *The EMBO Journal* 1986; 5: 2043-2049.
- Shoji T, Owino WO, Yuhashi KI, Nonaka S, Ezura H. Characterization of ethylene receptor subfamilies by intron position. – *Advances in plant Ethylene Research. Proceedings of the 7th International Symposium on the Plant Hormone Ethylene.* Springer Netherlands, 2007: 57-58.
- Sitbon F, Edlund A, Gardeström P, Olsson O, Sandberg G. Compartmentation of indole-3-acetic acid metabolism in protoplasts isolated from leaves of wild-type and IAA-overproducing transgenic tobacco plants. – *Planta* 1993; 191: 274-279.
- Sokolov LN, Dominguez-Solis JR, Allary A-L, Buchanan BB, Luan S. A redox-regulated chloroplast protein phosphatase binds to starch diurnally and functions in its accumulation. – *PNAS* 2006; 103: 9732-9737.
- Spermulli L. Protein synthesis, assembly and degradation. – *American Society of Plant Biologists – Publications – Biochemistry & Molecular Biology of Plants* 2003.
- Spetea C, Hundal T, Lundil B, Heddad M, Adamska I, Andersson B. Multiple evidence for nucleotide metabolism in the chloroplast thylakoid lumen. – *PNAS* 2004; 101: 1409-1414.
- Stern DB, Higgs DC, Jianjun Y. Transcription and translation in chloroplasts. – *Science* 1997; 2: 308-315.
- Stoddart JL, Venis MA. Molecular and subcellular aspects of hormone action. – In: *Hormonal Regulation of Development. I-Molecular Aspects of Plant Hormones.* Encycl Plant Physiol, ed. J MacMillan. Springer-Verlag, 1980: 445-510.
- Stoddart JL. The association of gibberellin-like activity with the chloroplast fraction of leaf homogenates. – *Planta* 1968; 81: 106-112.
- Stupar RM, Lilly JW, Town CD, Cheng Z, Kaul S, Buell CR, Jiang J. Complex mtDNA constitutes an approximate 620-kb insertion on *Arabidopsis thaliana* chromosome 2: implication of potential sequencing errors caused by large-unit repeats. – *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 5099-5103.
- Sugaya S, Ohmiya A, Kikuchi M, Hayashi T. Isolation and characterization of a 60 kDa 2,4-D-binding protein from the shoot apices of peach trees (*Prunus persica* L.); it is a homologue of protein disulfide isomerase. – *Plant and Cell Physiol* 2000; 41(4): 503-508.
- Sugaya S, Sakai S. A soluble auxin-binding protein from mung bean hypocotyls has indole-3-acetaldehyde/reductase activity. – *Physiologia Plantarum* 1996 a; 97: 433-439.
- Sugaya S, Sakai S. Identification of a soluble auxin-binding protein as a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. – *Plant Sci* 1996 b; 114: 1-9.
- Sugiyama Y, Watase Y, Nagase M, Makita N, Yagura S, Hirai A, Sugiura M. The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the tobacco

- mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants. – *Mol Gen Genomics* 2005; 272: 603-615.
- Sugiura M, Hirose T, Sugita M. Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. – *Annu Rev Genet* 1998; 32: 437-459.
- Sun TP, Kamiya T. The *Arabidopsis* *GAI* locus encodes the cyclase *ent*-kaurene synthetase a of gibberellin biosynthesis. – *Plant Cell* 1994; 6: 1509-1518.
- Surpin M, Larkin RM, Chory J. Signal transduction between the chloroplast and the nucleus. – *The Plant Cell* 2002; Supplement: S327-S338.
- Sussman MR, Goldsmith MHM. The action of specific inhibitors of auxin transport on uptake of auxin and binding of N-1-naphthylphthalamic acid to a membrane site in maize coleoptiles. – *Planta* 1981; 152: 13-18.
- Suzuki T, Kawano S, Sakai A, Fujie M, Kuroiwa H, Nakamura H, Kuroiwa T. Preferential mitochondrial and plastid DNA synthesis before multiple cell division in *Nicotiana tabacum*. – *J of Cell Science* 1992; 103: 831-837.
- Swaminathan S, Bock RM. Subcellular localization of cytokinins in transfer ribonucleic acid. – *Plant Physiol* 1977; 59: 558-563.
- Teale WD, Paponov IA, Palme K. Auxin in action: signaling, transport and the control of plant growth and development. – *Molecular Cell Biology* 2006; 7: 847-859.
- Teyssandier de la Serve B, Axelos M, Peaud-Lenoel C. Cytokinins modulate the expression of genes encoding the protein of the light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. – *Plant Mol Biol* 1985; 5: 155-163.
- Theologis A. Molecular cloning of early IAA regulated mRNAs in pea. – *Physiology and biochemistry of auxins in plants*, ed. M.Kutáček. Praha, 1988.
- Theologis A. Auxin 2004. Orthodox Academy of Crete; Greece, 2004.
- Tian H, Klämbt D, Jones AM. Auxin-binding protein 1 does not bind auxin within the endoplasmic reticulum despite this being the predominant sub-cellular location for this hormone receptor. – *J Biol Chem* 1995; 270(45): 26962-26968.
- Tian X, Zheng J, Hu S, Yu J. The rice mitochondrial genomes and their variations. – *Plant Physiol* 2006; 140: 401-410.
- Tolbert NE. Isolation of subcellular organelles of metabolism on isopycnic sucrose gradients. – *Methods Enzymol* 1974; 31A: 734-746.
- Tsavkelova EA, Cherdynseva TA, Botina SG, Netrusov AI. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. – *Microbiological Research* 2007; 162: 69-76.
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, et al. GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. – *Nature* 2005; 437: 693-698.
- Ueguchi-Tanaka M, Nakajima M, Matoyuki A, Matsuoka M. Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. – *Annu Rev Plant Biol* 2007; 58: 183-198.
- Unsold M, Marienfeld JR, Brandt P, Brennicke A. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. – *Nature Genetics* 1997; 15: 57-61.
- Vande Broek A, Lambrecht M, Eggermont K, Vanderleyden J. Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. – *Journal of Bacteriology* 1999; 181: 1338-1342.
- Vanlerberghe GC, Robson CA, Yip JYH. Induction of mitochondrial alternative oxidase in response to a cell signal pathway down-regulating the cytochrome prevents programmed cell death. – *Plant Physiol* 2002; 129: 1829-1842.



- Venis MA. Affinity labels for auxin binding sites in corn coleoptile membranes. – *Planta* 1977 a; 134: 145-149.
- Venis MA. Solubilization and partial purification of auxin-binding sites of corn membranes. – *Nature* 1977 b; 266: 268-269.
- Venis MA, Napier RM, Barbier-Brygoo H, Maurel Ch, Perrot-Rechenmann C, Guern J. Antibodies to a peptide from the maize auxin-binding protein have auxin agonist activity. – *Proc Natl Acad USA* 1992; 89: 7208-7212.
- Venis MA. Auxin binding protein 1 is a red herring? Oh no it isn't! – *J Exp Bot* 1995; 46(286): 463-465.
- Wakasugi T, Tsudzuki J, Ito S, Nakashima K, Tsudzuki T, Sugiura M. Loss of all genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*. – *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:9794–9798.
- Wakasugi T, Nagai T, Kapoor M, Sugita M et al. Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: the existence of genes possibly involved in chloroplast division. – *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5967-5972.
- Walker DA. Preparation of Higher Plant Chloroplasts. – *Methods in Enzymology. Photosynthesis and Nitrogen Fixation* 1980; 69(C): 94-103.
- Wang KL-C, Li H, Ecker JR. Ethylene biosynthesis and signaling networks. – *The Plant Cell* 2002; Supplement: S131-S151.
- Wang X-F, Zhang D-P. Abscisic acid receptors: multiple signal-perception sites. – *Annals of Botany* 2007; 1-7. Priega per internetu <http://aob.oxfordjournals.org/cgi/reprint/mcm284v2> Žiūrēta 2009 02 03.
- Wardrop AJ, Polya GM. Co-purification of Pea and Bean leaf soluble auxin-binding proteins with Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase. – *Plant Physiol* 1980 a; 66: 105-111.
- Wardrop AJ, Polya GM. Ligand specificity of Bean leaf soluble auxin-binding protein. – *Plant Physiol* 1980 b; 66: 112-118.
- Weber APM, Schneidereit J, Voll LM. Using mutants to probe the in vivo function of plastid envelope membrane metabolite transporters. – *Journal of Experimental Botany* 2004; 55: 1231-1244.
- Went FW, Thimann KV. *Phytohormones*. – New York 1937: 294.
- Wichner S, Libbert E. Interactions between plants and Epiphytic bacteria regarding their auxin metabolism. II. Influence of IAA producing Epiphytic bacteria on short term IAA production from tryptophan in plant homogenates. – *Physiol Plant* 1968; 21: 500-509.
- Wienhues U, Neupert W. Protein translocation across mitochondrial membranes. – *BioEssays* 1992; 14: 17-23.
- Winston JT et al. The SCF $\beta$ -TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in I $\kappa$ B $\alpha$  and  $\beta$ -catenin and stimulates I $\kappa$ B $\alpha$  ubiquitination in vitro. – *Genes Dev* 1999; 13: 270-283.
- Woo JM, Marshall J, Bauly J, Chen J-G, Venis M, Napier R, Pickersgill RW. Crystal structure of auxin-binding protein 1 in complex with auxin. – *EMBO* 2002; 21: 2877-2885.
- Woodward AW, Bartel B. Auxin: regulation, action and interaction. – *Annals of Botany* 2005; 95: 707-735.
- Zaina S, Bertani A, Lombardi L, Mapelli S, Torti G. Membrane-associated binding sites for indoleacetic acid in the rice coleoptile. – *Planta* 1989; 179: 222-227.
- Zažímalová E, Napier RM. Points of regulation for auxin action. – *Plant Cell Rep* 2003; 21: 625-634.

- Zbell B. The IAA-influx carrier at the plasmalemma: Properties, regulation and function in auxin transduction. – 1996: 49-55.
- Zettl R, Feldwisch J, Boland W, Schell J, Palme K. 5'-Azido-[3,6-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]-1-naphthylphthalamic acid, a photoactivatable probe for naphthylphthalamic acid receptor proteins from higher plants: Identification of a 23-kDa protein from maize coleoptile plasma membranes. – Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 480-484.
- Zettl R, Schell J, Palme K. Photoaffinity labeling of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane vesicles by 5'-Azido-[7-<sup>3</sup>H]indole-3-acetic acid: Identification of a glutathione-S-transferase. – Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 689-693.
- Zhang DP, Wu ZY, Li XY, Zhao ZX. Purification and identification of a 42-kilodalton abscisic acid-specific-binding protein from epidermis of broad bean leaves. – Plant Physiology 2002; 128: 714-725.
- Zhang HM, Huang H, Liu Y. Isolation and purification of cytokinin-binding protein from wheat chloroplasts. – Acta Bot Sinica 1991; 33: 744-749.
- Zhang HM, Liu Y, Shen YG. Properties of cytokinin-binding protein from wheat chloroplasts. – Acta Phytophysiol Sinica 1996; 22: 27-32.
- Zhang X-P, Glaser E. Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. – TRENDS in Plant Science 2002; 7: 14-21.
- Zolman BK, Yoder A, Bartel B. Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes. – Genetics 2000; 156: 1323-1337.
- Алехина НД, Балнокин ЮВ, Гавриленко ВФ, Жигалова ТВ, Мейчик НР, Носов АМ, Полеская ОГ, Харитонашвили ЕВ, Чуб ВВ. Физиология растений. – Ермакова ИП. (ред.). Москва, 2005.
- Даргинавичене ЮВ. Роль процессов транспорта и рецепции индолилуксусной кислоты в регуляции латеральнополяризованного роста при гравитропизме. – Дисс на соиск уч ст д-ра биол наук. Москва, 1992.
- Даргинавичене ЮВ, Меркис АИ, Улявичене РР, Жяменас ЙА, Максимов ГБ. ИУК связывающие свойства плазмалеммы колеоптилей пшеницы. – Физиология Растений 1992; 39(2): 249-257.
- Дрейпер Дж, Скотта Р, Армиджда Ф, Уолдена Р. (ред). Генная инженерия растений. Лабораторное руководство. Москва, 1991; 258-262.
- Жуков АВ, Верещагин АГ. О количественном определении фосфора в липидах семян сои. – Физиология и биохимия культурных растений 1970; 2(1): 93-98.
- Зайцева ЛГ, Овчинникова ТВ, Гринкевич ВА. Импорт белков в митохондрии. – Биоорганическая химия 2000; 26: 643-661.
- Игамбуердиев АУ. Уникальная генетическая система митохондрий. – Биология 2000; 6: 32-36.
- Кулаева ОН, Кузнецов ВВ. Новейшие достижения и перспективы в области изучения цитокининов. – Физиология растений 2002; 49: 626-640.
- Кулаева ОН, Селиванкина СЮ, Романко ЕГ, Николаева МК, Ничипорович АА. Активация цитокинином РНК-полимеразной активности в изолированных ядрах и хлоропластах. – Физиология Растений 1979; 26: 1016-1027.
- Кулаева ОН. Хлоропласт и его полуавтономность в клетке. – Соросовский Образовательный Журнал 1997; 7: 2-9.
- Марчюкайтис АС. Включение аминокислот в липиды и белки изолированных хлоропластов. – Дисс на соиск уч ст д-ра биол наук. Вильнюс, 1966.

- Меркис АИ, Даргинавичене ЮВ, Жяменас ЙА, Рупайнене ОЮ. Физиологическая значимость комплексов ИУК, формируемых в плазмалемме растительной клетки. – Докл АН СССР 1989; 304: 1512-1514.
- Меркис АИ, Савичене Э. Синтез, транспорт и метаболизм ИУК у фасоли и роль листа в процессе обеспечения ею целостного растения. – *Eksperimentinė biologija* 1991; 4: 57-70.
- Меркис АИ, Анисимовене НА, Йодинскене М, Моцкевичюте Р. Белки, “распознающие” ИУК в клетках двудольных растений. – IV съезд общества физиологов растений России 1999; 633:634.
- Меркис АИ. Ауксин и рост растений. Вильнюс, 1982.
- Морре ДД, О’Брайтман Э, Санделиус АС. Мембранные фракции растительных клеток. – Биологические мембраны. Методы, Финдлей Дж, Эванз У. (ред.). Москва; 1990; 62-103.
- Николаева МК. Активация ферредоксин-надф оксиредуктазы в листьях бобов, индуцированная кратковременным повышением интенсивности света. – Физиология растений 2001; 48: 698-704.
- Побежимова ТП, Грабельных ОИ, Колесниченко АВ, Сумина ОН, Войников ВК. Локализация белков, иммунохимически родственных субъединицам стрессового белка 310 кД, в митохондриях озимой пшеницы. – Физиология Растений 2001; 48: 238-244.
- Сафонов ВИ, Сафонова МП. Выделение препаратов растворимых белков из вегетативных органов растений для электрофоретического исследования. – Физиология Растений 1969; 16: 161-166.
- Селиванкина СЮ, Каравайко НН, Черепнева ГН, Прищепова АЕ, Кузнецов ВВ, Кулаева ОН. Биологически активный зеатин-связывающий белок из хлоропластов листьев ячменя. – Докл Акад Наук 1997; 356: 830-832.
- Тихая НН, Максимов ГБ, Мишустина ЕБ и др. Катионзависимая АТФазная активность мембран, изолированных из корней кукурузы. – Физиология Растений 1984; 31(2): 221-227.

## DISERTACIJOS TEMA SKELBTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. **Mockevičiūtė R**, Anisimovienė N. Indole-3-acetic acid receptors in the cytosol. – *Biologija* 1999; 4: 90-93.
2. Anisimovienė N, Merkys A, Jodinskienė M, **Mockevičiūtė R**. IAA-protein complexes in different compartments of dicotyledonous plant cells. – *Sodininkystė ir Daržininkystė* 2000; 19(3)-1: 86-97.
3. Anisimovienė N, **Mockevičiūtė R**, Jodinskienė M, Akelionienė V. Characterization of IAA-ABPs complexes in different compartments of dicotyledonous plant cells. – *Biologija* 2003; 3: 49-52.
4. Merkys A, Anisimovienė N, Jodinskienė M, **Mockevičiūtė R**. Peculiarities of IAA-binding sites in different compartments of *Phaseolus vulgaris* L. cells. – *Biologija* 2004; 2(1 priedas): 109-112.
5. Merkys A, Anisimovienė N, Jodinskienė M, **Mockevičiūtė R**, Jankauskienė J. Subcellular localization of auxin-binding proteins in dicotyledonous plant cells. – *Acta Physiologiae Plantarum* 2004; 26(3): 157-158. Krokva. PL ISSN 0137-5881
6. Anisimovienė N, **Mockevičiūtė R**, Merkys A. Investigations of IAA binding in chloroplast and mitochondria. – *Sodininkystė ir Daržininkystė* 2004; 23(2): 12-22.
7. **Mockevičiūtė R**, Anisimovienė N, Merkys A. Comparison of different IAA-ABP complexes formed in kidney bean cell chloroplast and mitochondria. *Biologija* 2006; 3: 102-105.
8. Anisimovienė N, **Mockevičiūtė R**, Jodinskienė M. Indole-3-acetic acid in chloroplasts: the possibilities of phytohormone fund formation. – *Botanica Lituanica* 2007; 13(2): 85-91.
9. **Mockevičiūtė R**, Anisimovienė N. Elucidation of auxin binding proteins compartmentation in kidney bean cell mitochondria. – *Sodininkystė ir Daržininkystė* 2009; 28(4): 151-161.

### **Spausdinti mokslinių konferencijų pranešimai:**

1. **Mockevičiūtė R**, Anisimovienė N. Indole-3-acetic acid receptors in the cytosol. – *Biologija* 1998; priedas 1: 124.
2. Меркис А, Анисимовене Н, Йодинскене М, **Моцкевичюте Р**. Белки, распознающие ИУК в клетках двудольных растений. – Тезисы докладов IV съезда общества физиологов растений России. 1999; 633-634.
3. Меркис А, Анисимовене Н, Йодинскене М, **Моцкевичюте Р**. Исследования взаимодействия ИУК с белками в разных компартментах клеток двудольных растений. – 5-ая международная конференция. Регуляторы роста и развития растений. 1999; Москва, 53-54.
4. **Mockevičiūtė R**, Anisimovienė N. Pupelių hipokotilių citozolio baltymai “atpažįstantys” IAR. – Lietuvos jaunujų botanikų darbai. Antrosios mokslinės konferencijos pranešimų tezės. 1999; Vilnius, 80-82.
5. **Mockevičiūtė R**. Auksiną atpažįstančių baltymų pasiskirstymas dviskilčių augalų ląstelėse. – Lietuvos jaunujų botanikų darbai. Trečiosios mokslinės konferencijos pranešimų tezės. 2000; Vilnius, 65-66.
6. Merkys A, Anisimovienė N, Jodinskienė M, **Mockevičiūtė R**. Distribution of IAA “recognising: proteins in dicotyledonous plant cells. – 17th international conference on plant growth substances. 2001; Brno, 152.
7. Anisimovienė N, Jodinskienė M, **Mockevičiūtė R**, Merkys A. Peculiarities of indole-3-acetic acid (IAA) binding sites in dicotyledonous plants. – International Symposium “Signalling systems of plant Cells”. 2001; Moscow, 78.
8. Анисимовене Н, Йодинскене М, **Моцкевичюте Р**. Особенности связывания ИУК в клетках двудольных растений: локализация АСБ, сайты связывания. – Регуляция Роста, Развития и Продуктивности Растений. 2003; Минск, 5-6.
9. Anisimovienė N, **Mockevičiūtė R**, Merkys A. Investigations of IAA

- binding in chloroplast and mitochondria. – Growth and Developments. Theoretical and Practical Problems. Abstracts of International Scientific Conference. 2004; Babtai, 6.
10. Merkys A, Anisimovienė N, Jodinskienė M, **Mockevičiūtė R**. IAR saitų ypatybės skirtinguose dviskilčių augalų ląstelių kompartmentuose. – VIII suvažiavimo-konferencijos “Biochemija mokslų sandūroje” pranešimų santraukos. 2004; Tolieja, 51.
  11. **Mockevičiūtė R**, Anisimovienė N. Search of IAA-ABP complexes formation in cell organelles – chloroplasts and mitochondria. – International scientific conference designed to 100<sup>TH</sup> anniversary of prof. Jonas Dagys “Genetic and Physiological Fundamentals of Plant Growth and Productivity” 2006; Vilnius, 44-46.
  12. **Mockevičiūtė R**, Anisimovienė N, Merkys A. Skirtingų IAR-ASB kompleksų, susiformuojančių pupelių ląstelių chloroplaste ir mitochondrijoje, palyginimas. – Biochemija: mokslas ir žinių visuomenė. IX-asis suvažiavimas-konferencija. 2006; Tolieja, 55.
  13. **Mockevičiūtė R**, Jodinskienė M, Anisimovienė N. Peculiarities of indole-3-acetic acid and protein interaction: IAA-ABP complexes in the cell. – Proceedings of the I (IX) Conference of Young Botanists in Saint-Petersburg. 2006; 174-175.
  14. **Mockevičiūtė R**, Anisimovienė N. Elucidation of auxin binding proteins compartmentation in kidney bean cell mitochondria. – Abstract of International Scientific Conference. Actualities in Plant Physiology. 2008; Babtai, 12-13.
  15. Anisimoviene N., **Mockeviciute R**, Jodinskiene M. Research of phytohormone indole-3-acetic acid binding proteins functioning in chloroplast. - Joint meeting: Groupe de Contact FNRS Protéomique & COST action: Plant proteomics in Europe “System biology and Omic approaches”. 2010; Namur.

## PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju ilgamečiam Augalų fiziologijos laboratorijos vadovui, mano buvusio doktorantūros komiteto vadovui akademikui prof. Alfonsui Merkiui už vertingas idėjas ir konsultacijas. Ypač dėkoju Augalų fiziologijos laboratorijos vadovei ir disertacijos mokslinei konsultantei habil. dr. Nijolei Anisimovienei už pagalbą atliekant eksperimentus, neįkainuojamus patarimus, kritines pastabas ir diskusijas rašant straipsnius ir disertaciją, nuolatinį padaršinimą, begalinę kantrybę ir dėmesingumą.

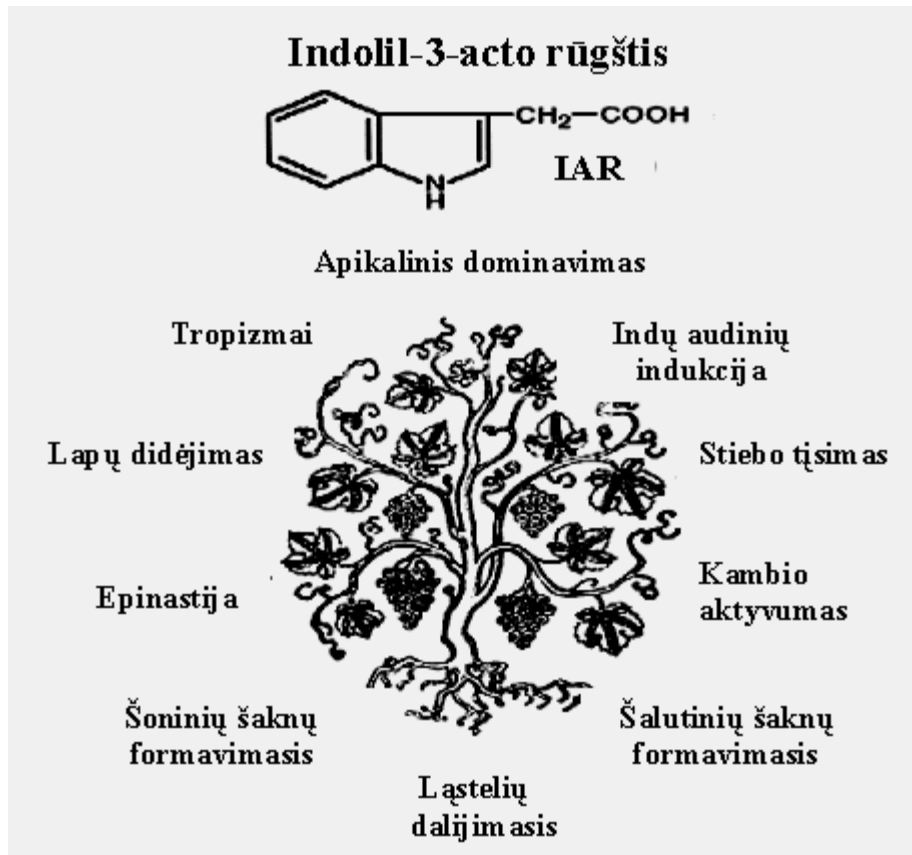
Dėkoju visam Augalų fiziologijos laboratorijos ir Gravitacinės fiziologijos sektoriaus kolektyvui už geranorišką pagalbą ir patarimus, o taip pat Genetikos ir Ląstelių inžinerijos laboratorijoms už rankraščio peržiūrą ir pastabas. Esu dėkinga ekspertėms habil. dr. J. Darginavičienei ir dr. S. Dapkūnienei už kritines pastabas ir patarimus.

Esu ypatingai dėkinga savo nuostabiai šeimai ir artimiausiems draugams už meilę, kantrybę, supratimą, palaikymą, visokeriopą pagalbą ir galimybę parengti šį darbą.

Dėkoju Valstybiniam mokslo ir studijų fondui už finansinę paramą.

## PRIEDAI

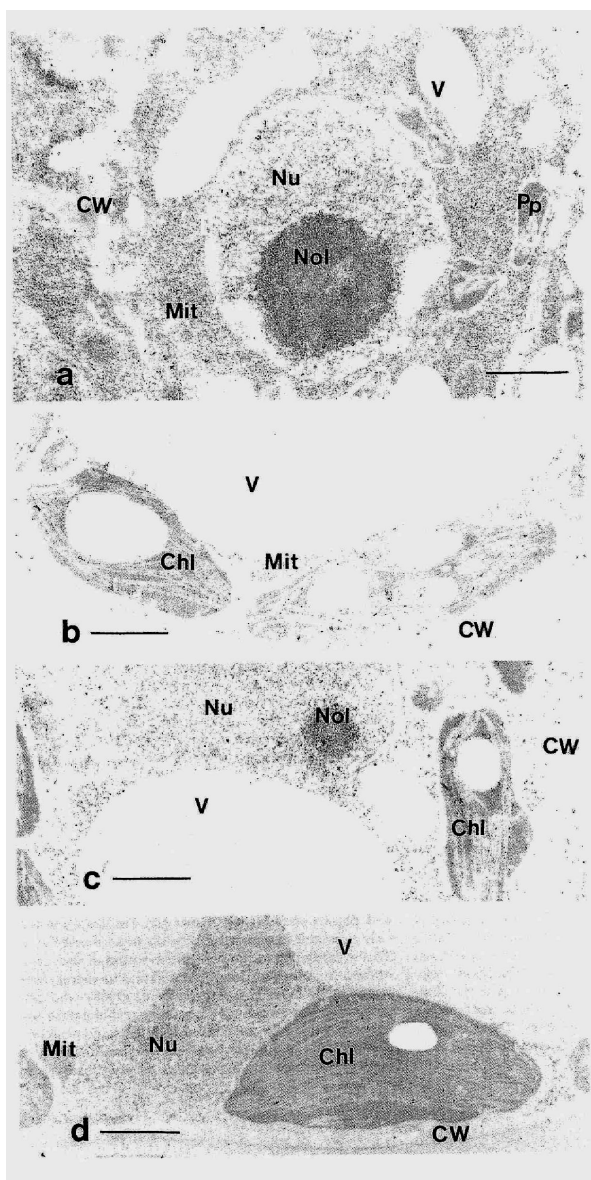
### 1 priedas



Indolil-3-acto rūgšties reguliuojami fiziologiniai procesai (iš „Auxin 2004“ konferencijų medžiagos).



## 2 priedas



Pjūviai įvairaus vystymosi stadijų persikų lapų, paveikti anti-IAR-N-antikūniais: a) L1 lapų parenchimos ląstelėse aukso dalelės pasiskirsčiusios tarp citoplazmos, branduolio ir ląstelės sienelės; b) ir c) L2 lapų parenchimos ląstelėse reikšmingas kiekis aukso dalelių pastebimas chloroplastuose; d) L3 lapų ląstelėse aukso dalelių kiekis chloroplastuose yra mažesnis, nei L2 stadijoje, tačiau jis didesnis nei citoplazmoje (Ohmiya, Hayashi, 1992).

**3 priedas.** Optimalaus pH IAR-ASB kompleksų formavimuisi nustatymas chloroplastų ir mitochondrijų subląstelinėse frakcijose

Organoidas	Terpės pH	Bendras <sup>14</sup> C-IAR prisijungimas imp./min./mg baltymo; M±SK	Specifinis <sup>14</sup> C-IAR prisijungimas imp./min./mg baltymo; M±SK	IAR-ASB kompleksų specifiškumas, %; M±SK
Chloroplastai	5,0	3772,5±124,6	0	0
	<b>5,5</b>	<b>4247,3±115,2</b>	<b>1783,3±78,2</b>	<b>41,9±1,8</b>
	6,0	3763,5±34,8	419,3±45,3	11,1±0,1
	6,5	3759,1±115,1	0	0
Mitochondrijos	6,5	12352,76±599,4	0	0
	<b>7,0</b>	<b>14763,3±796,3</b>	<b>3212,7±196,4</b>	<b>21,8±1,3</b>
	7,5	14221,3±729,3	853,3±98,7	5,9±2,2
	8,0	10060,89±642,4	507,0±46,4	5,0±0,1
	8,5	7546,7±165,5	0	0

**4 priedas.** Optimalaus pH IAR-ASB kompleksų formavimuisi nustatymas pupelių lapų intaktiškuose ir funkcionaliuose chloroplastuose

Prijungimo terpės pH	Bendras <sup>14</sup> C-IAR prisijungimas, imp./min./mg baltymo; M±SK	Specifinis <sup>14</sup> C-IAR prisijungimas imp./min./mg baltymo; M±SK	IAR-ASB kompleksų specifiškumas, %; M±SK
4,0	6620,4±152,3	0	0
4,5	6850,2±137,2	0	0
5,0	8920,3±254,3	1112,3±92,4	12,5±1,0
<b>5,5</b>	<b>10297,3±315,2</b>	<b>5254,2±168,3</b>	<b>51,0±2,9</b>
6,0	8106,4±234,5	1612,7±109,3	19,9±1,3
6,5	6746,6±201,4	304,3±121,7	4,5±1,8
7,0	6909,7±198,3	0	0
<b>7,5</b>	<b>7766,2±238,3</b>	<b>3358,0±302,6</b>	<b>43,2±3,9</b>
8,0	6429,9±148,6	989,5±120,2	15,4±1,9
8,5	5815,7±123,8	0	0
9,0	4112,9±103,5	0	0

**5 priedas.** Optimalaus pH IAR-ASB kompleksų formavimuisi nustatymas pupelių hipokotilių ląstelių intaktiškose ir funkcionaliųse mitochondrijose

Prijungimo terpės pH	Bendras <sup>14</sup> C-IAR prisijungimas, imp./min./mg baltymo; M±SK	Specifinis <sup>14</sup> C-IAR prisijungimas imp./min./mg baltymo; M±SK	IAR-ASB kompleksų specifiškumas, %; M±SK
4,0	13292,7±769,3	0	0
4,5	14321,3±832,5	0	0
5,0	14660,9±869,5	0	0
5,5	15500,3±866,4	0	0
6,0	15460,6±902,1	0	0
6,5	18620,7±1150,7	1660,4±105,4	8,9±5,2
<b>7,0</b>	<b>20196,6±1956,3</b>	<b>8346,4±435,9</b>	<b>41,3±3,6</b>
7,5	22460,5±2051,9	3324,7±262,1	14,8±2,2
8,0	19540,4±1596,9	2658,7±166,5	13,6±0,1
8,5	19541,9±1421,7	0	0
9,0	17242,5±969,4	0	0

**6 priedas.** Intaktinių chloroplastų ir mitochondrijų organoiduose susiformuojančių IAR-ASB kompleksų charakteristikų palyginimas

Organoidas	IAR-ASB charakteristikos			ASB prisotinimas, M
	K <sub>D</sub> , M	Prisijungimo vietų skaičius – n,		
		mol/g žalios masės	mol/mg baltymo	
Chloroplastai pH 5,5	1,14±0,51×10 <sup>-5</sup>	16,30±1,59×10 <sup>-9</sup>	2,00±0,63×10 <sup>-9</sup>	8,5-9×10 <sup>-6</sup>
pH 7,5	1,72±0,59×10 <sup>-5</sup>	3,47±0,02×10 <sup>-9</sup>	4,40±0,20×10 <sup>-10</sup>	8-9×10 <sup>-5</sup>
Mitochondrijos pH7,0	1,90±0,51×10 <sup>-5</sup>	11,48±1,01×10 <sup>-9</sup>	3,85±0,34×10 <sup>-9</sup>	4-5×10 <sup>-4</sup>

**7 priedas.** Artimų cheminės struktūros indolo junginių sugebėjimas išstumti IAR iš prisijungimo prie baltymo vietų intaktinių chloroplastų frakcijoje

Ligandai	Terpės pH	Specifinis <sup>14</sup> C-IAR prisijungimas imp./min./mg baltymo; M±SK	Specifinis <sup>14</sup> C-IAR prisijungimas, % M±SK
IAR	5,5	4762,7±296,1	48,1±4,6
	7,5	3052,9±226,3	40,5±3,9
IPR	5,5	1783,5±121,4	18,0±2,6
	7,5	510,7±41,9	6,8±1,4
ISR	5,5	2017,1±182,7	20,4±2,3
	7,5	2424,7±167,4	32,2±3,4
IPVR	5,5	1790,4±57,1	16,5±1,8
	7,5	869,6±15,3	10,6±0,6
IKR	5,5	0	0
	7,5	561,9±46,3	7,5±2,1

**8 priedas.** Artimų cheminės struktūros indolo junginių sugebėjimas išstumti <sup>14</sup>C-IAR iš prisijungimo prie baltymo vietų intaktinių mitochondrijų frakcijoje

Ligandai	Specifinis <sup>14</sup> C-IAR prisijungimas imp./min./mg baltymo M±SK	Specifinis <sup>14</sup> C-IAR prisijungimas, % M±SK
IAR	7626,2±352,0	38,3±4,2
IPVR	3587,9±262,5	18,1±1,6
IPR	1437,1±102,9	13,2±1,2
ISR	1229,6±73,4	12,0±0,7
IKR	0	0

**9 priedas.** IAR transporto inhibitorių poveikio įvertinimas intaktinių chloroplastų frakcijoje

IAR transporto inhibitorius	Terpės pH	Specifinis <sup>14</sup> C-IAR prisijungimas imp./min./mg baltymo; M±SK	Specifinis <sup>14</sup> C-IAR prisijungimas, %; M±SK
IAR kontrolė	5,5	4762,7±296,1	48,1±4,6
	7,5	3052,9±226,3	40,5±3,9
TJBR	5,5	2883,2±243,1	29,1±2,5
	7,5	1621,8±133,7	21,5±1,8
NFR	5,5	173,0±12,7	1,8±0,1
	7,5	1884,6±171,2	25,0±2,3

**10 priedas.** IAR transporto inhibitorių poveikio įvertinimas intaktinių mitochondrijų frakcijoje (terpės pH 7,0)

IAR transporto inhibitorius	Specifinis <sup>14</sup> C-IAR prisijungimas imp./min./mg baltymo M±SK	Specifinis <sup>14</sup> C-IAR prisijungimas, %; M±SK
IAR kontrolė	7626,2±352,0	38,3±4,2
TJBR	4277,5±389,7	27,4±3,7
NFR	2631,1±194,1	13,2±1,6