

# ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

## НЕРАВНОМЕРНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ ГЕНОВ В ОПЕРОНАХ ПЛАСТОМА ЯЧМЕНЯ\*

А.Ю. Алейникова, В.В. Кузнецов,  
Я.О. Зубо

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН  
ул. Ботаническая, 35, Москва, Россия, 127276

Статья посвящена изучению транскрипции генов хлоропластных оперонов растений ячменя. Показано, что если опероны содержат гены, которые кодируют функционально сходные белки, то они транскрибируются равномерно при разных физиологических условиях. С другой стороны, опероны, включающие гены, продукты которых участвуют в разных метаболических путях или являются компонентами различных функциональных комплексов, могут иметь различную интенсивность транскрипции. Это говорит о возможности существования дополнительных путей посттранскрипционной регуляции экспрессии генов пластидных оперонов растений.

**Ключевые слова:** транскрипция, оперон, хлоропласты, ячмень *Hordeum vulgare*, мутант *albostrians*.

Большая часть хлоропластных генов высших растений организована в полицистронные кластеры — опероны, лишь немногие гены составляют исключение [1]. В состав оперонов входят гены, кодирующие субъединицы фотосинтетических комплексов, рибосомных белков, а так же гены тРНК и рРНК. При этом обычно разные субъединицы мультибелковых комплексов кодируются генами нескольких оперонов [2; 3]. Транскрипция таких оперонов происходит согласованно, что позволяет получить правильное стехиометрическое соотношение продуктов — белков или РНК. Согласованность экспрессии хлоропластных генов достигается за счет регуляции процесса транскрипции [4]. Интенсивность синтеза РНК с того или иного оперона (или моноцистронного гена) определяется силой промотора(ов). Активность промотора зависит от его нуклеотидной последовательности, а также, возможно, от топологии хлоропластной ДНК [1; 4]. Транскрипция хлоропластных генов осуществляется двумя разными РНК полимеразам: мультисубъединичной РНК-полимеразой бактериального типа пластидного кодирования и моносубъединичной РНК-полимеразой фагового типа ядерного кодирования [1; 5; 6]. На точность и активность транскрипции генов влияют белковые транс-факторы (включая

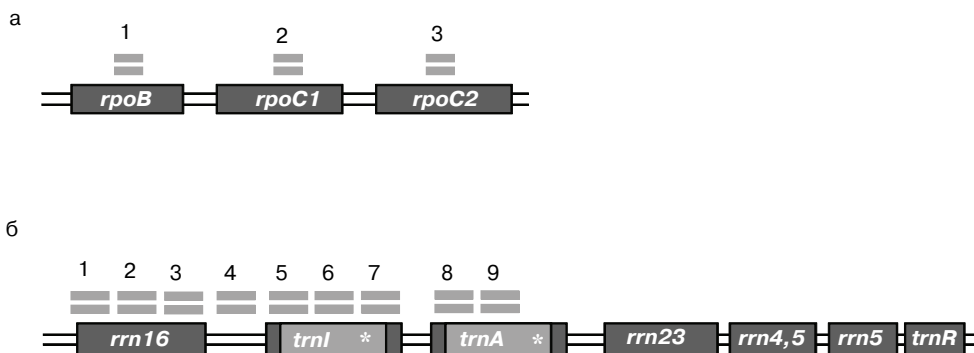
\* Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ, грант № 10-04-00594.

σ-факторы и другие белковые регуляторы транскрипции), также важное значение имеет их модификация, например, фосфорилирование [7—9].

Чаще всего опероны содержат гены, кодирующие функционально различные белки, которые должны накапливаться в хлоропластах в неодинаковом количестве. Примером может служить оперон, кодирующий RPS2 белок и четыре субъединицы АТФ-синтазного комплекса — *rps2/atpI/atpH/atpF/atpA*. Субъединица III CF0 комплекса (кодируется *atpH* геном) должна накапливаться в количестве в 6—12 раз больше, чем остальные субъединицы. Наличие внутреннего промотора перед *atpH* геном делает возможным дополнительное накопление РНК этого гена. Интересно, что транскрипция всего оперона и *atpH* гена зависит от разных σ-факторов (SIG3 узнает промотор перед *atpH* геном, SIG2 (возможно, и другие σ-факторы) определяет транскрипцию целого оперона [10]). Таким образом, за счет регуляции процесса транскрипции в хлоропластах происходит дифференциальное накопление РНК разных генов.

Исключительно мало в пластоме оперонов, все гены которых кодируют белки, входящие в какой-либо один функциональный комплекс. К ним относится *rpo* оперон, кодирующий три субъединицы (β, β' и β'') РНК-полимеразы бактериального типа — *rpoB/rpoC1/rpoC2* (рис. 1а).

Другим опероном, гены которого кодируют функционально взаимосвязанные молекулы, является *rnr* оперон, который включает гены всех необходимых для хлоропластных рибосом РНК — 16S, 23S, 4,5S и 5S. Кроме того, он содержит также гены трех тРНК — *rnr16/tRNA<sup>Ile</sup>/tRNA<sup>Ala</sup>/rnr23/rnr4,5S/rnr5S/trn<sup>Arg</sup>* (рис. 1б) [2].



**Рис. 1.** Схема расположения генов в оперонах *rpo* (а) и *rnr* (б), транскрипция оперона происходит слева направо.

Локализация гибридизационных проб показана цифрами;  
\* — наличие в гене интрона. Более светлыми прямоугольниками  
показано местоположение интронов

У разных систематических групп наземных растений нуклеотидные последовательности генов рРНК чрезвычайно консервативны, что делает их особенно интересными для изучения. Цель нашей работы заключалась в детальном изучении интенсивности транскрипции генов *rnr* и *rpo* оперонов пластидного генома и ее зависимости от физиологического состояния растений.

## Материалы и методы

**Объект исследования.** Объектом исследования служили первые настоящие листья растений ячменя *Hordeum vulgare L.* (далее — первые листья) сорта Луч разного возраста (3-, 9- и 18-дневные растения) и 3-дневные белые растения мутанта ячменя *albostrians* [11]. Ячмень выращивали в почве в камерах фитотрона при 20—23 °С, 16-часовом световом периоде (270 мкмоль квантов м<sup>2</sup>с<sup>-1</sup>). Возраст растений определяли с момента прорастания семян.

**Выделение хлоропластов.** Выделение хлоропластов проводили по методу, описанному в [12]. Листья гомогенизировали в буфере, содержащем 0,33 М сорбита, 50 мМ трицина (рН 8,0), 2 мМ ЭДТА, 5 мМ β-меркаптоэтанола. Клеточные органеллы разделяли на ступенчатом градиенте перкола (70% и 40%). Интактные хлоропласты дважды промывали буфером для гомогенизации. Подсчет хлоропластов проводили с помощью счетной камеры Фукса—Розенталя под световым микроскопом. Для проведения одной run-on реакции брали 50 млн хлоропластов.

**Синтез проб ДНК.** Фрагменты пластидной ДНК, применявшиеся после амплификации в качестве ДНК проб при ДНК-РНК гибридизации, были подобраны с использованием программы Vector NTI и последовательности хлоропластного генома ячменя (*Hordeum vulgare L.*, NCBI [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore/NC\\_008590](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore/NC_008590)). Пробы были выравнены по размеру (200—202 н.п.) и GC%-составу (49,5—55,0%), часть проб была проверена на равномерность гибридизации с бессмысловой синтезированной меченой молекулой РНК. Фрагменты ДНК были нанесены на нейлоновую мембрану (Hybond-N, GE Healthcare, США) с помощью прибора для дот-гибридизации (slot-blot apparatus, BioRad, США).

**Метод run-on транскрипции.** Суспензию хлоропластов (50 млн шт.) центрифугировали (5000g, 4 мин.) и буфер для гомогенизации заменяли на 50 мкл буфера для ресуспендирования хлоропластов, содержащий 50 мМ ТрисНСI (рН 7,0), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ KCl, 4 мМ β-меркаптоэтанол. После этого добавляли 50 мкл буфера для транскрипции (50 мМ ТрисНСI, рН 8,0, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ АТФ, ЦТФ, ГТФ и 0,01 мМ УТФ, 10 мМ β-меркаптоэтанол), 1 мкл (40 ед. акт.) ингибитора РНКаз (RNase inhibitor, Fermentas).

Для мечения транскриптов добавляли 50 микрокюри α-<sup>32</sup>P-УТФ (Amersham, Англия). Транскрипционную смесь перемешивали и инкубировали на водяной бане при +25 °С 10 мин. Реакцию транскрипции останавливали добавлением 100 мкл стоп-буфера (50 мМ ТрисНСI, рН 8,0, 25 мМ ЭДТА, рН 7,5, 5% Na саркозил). Для выделения нуклеиновых кислот проводили две депротеинизации фенол/хлороформом (1 : 1) и одну хлороформом. РНК осаждали, добавляя <sup>1</sup>/<sub>10</sub> объема 3М ацетата натрия, рН 6,0, и равный объем изопропанола. Осадок РНК промывали 75% этанолом, высушивали и растворяли в 50 мкл стерильной дистиллированной воды.

Гибридизацию <sup>32</sup>P-меченых молекул РНК, полученных в ходе реакции транскрипции, с ДНК фрагментами, нанесенными на нейлоновую мембрану, проводили в гибридизационном буфере, содержащем 250 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7% SDS и 2,5 мМ ЭДТА в течение ночи при температуре +56 °С. После гибридизации мембраны отмывали, чтобы удалить неспецифично связавшиеся радиоактивные молекулы

РНК, растворами 0,5X SSC, 0,1% ДДС и 0,2X SSC, 0,1% ДДС (два раза каждым раствором). Радиоавтограф получали с помощью прибора фосфоимиджер (Turboon Trio+, GE Healthcare, США). Обработку данных run-on экспериментов проводили с помощью программ Quantity One и Excel. ПЦР и электрофорез ДНК осуществляли по стандартным методикам [13]. Каждый эксперимент выполнен не менее чем в 3-кратной повторности.

**Результаты и обсуждение.** Изучение интенсивности транскрипции генов проводили для двух оперонов пластома ячменя: *rpo* и *rrn*. Оба эти оперона несут «гены домашнего хозяйства» и кодируют белки и РНК, необходимые для процессов транскрипции и трансляции, причем транскрибируются эти опероны разными РНК-полимеразами. В зеленых, фотосинтезирующих тканях *rrn* оперон транскрибируется преимущественно РНК-полимеразой бактериального типа, за исключением некоторых двудольных растений, таких, например, как шпинат [14; 15]. Транскрипция *rpo* оперона происходит исключительно РНК-полимеразой фагового типа [1]. Гены *rrn* оперона относятся к одним из наиболее активно транскрибируемых генов, в то время как гены *rpo* оперона фотосинтезирующих тканей транскрибируются исключительно слабо. Три гена *rpo* оперона (рис. 1а) кодируют три субъединицы РНК-полимеразы бактериального типа, которые входят в состав РНК-полимеразы в равных соотношениях. Все это говорит в пользу того, что для генов данного оперона дифференциальная транскрипция маловероятна. С другой стороны, в *rrn* оперон входят 4 гена рРНК и 3 гена тРНК, два из которых имеют интроны (рис. 1б). Несмотря на то что все РНК, кодируемые генами этого оперона, участвуют в процессе трансляции, они могут быть необходимы в разных количествах. В связи с этим вполне можно допустить неравномерность транскрипции генов *rrn* оперона. Для обоих оперонов пока неизвестно присутствие внутренних промоторов.

С целью изучения интенсивности транскрипции генов, входящих в состав этих двух оперонов, с помощью ПЦР были получены гибридизационные пробы, выровненные по размеру (200—202 п.н.) и по GC составу (49,5—55%), что позволило в одних и тех же условиях для всех проб проводить анализ интенсивности транскрипции.

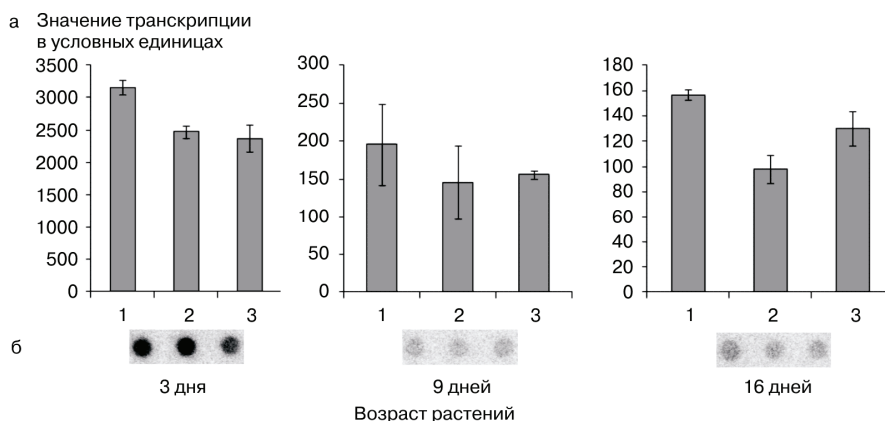
Из рис. 1а видно, что для каждого из генов *rpo* оперона было подготовлено по одной гибридизационной пробе, которые локализуются примерно в центральной части генов. Для генов *rrn* оперона приготовлено 9 зондов: 1—3 на *rrn16* ген, 4 — на межгенную область *rrn16/tRNA<sup>lle</sup>* генов, 5—7 — на *tRNA<sup>lle</sup>* ген и 8—9 — на *tRNA<sup>Ala</sup>* ген (рис. 1б).

С помощью зондов можно определить уровень меченой РНК, синтезированной в ходе реакции транскрипции *in vitro*, которая комплементарна используемым зондам.

Поскольку в ходе развития растений и биогенеза хлоропластов происходит значительное перепрограммирование экспрессии пластидного генома, мы изучили, прежде всего, интенсивность транскрипции генов *rpo* и *rrn* оперонов в хлоропластах 4-сантиметрового фрагмента апикальной части первого листа ячменя 3-дневных проростков (молодой лист), 9-дневных растений (закончивший рост первый лист) и 16-дневных растений (старый первый лист). При столь различном состоя-

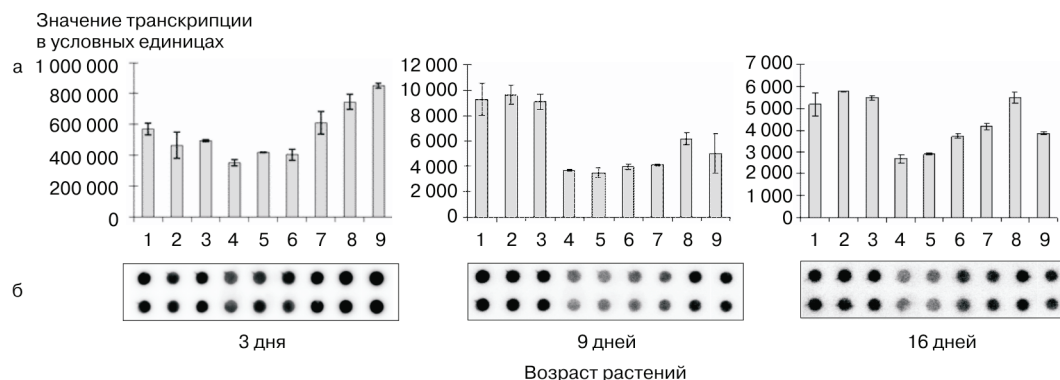
нии фотосинтетического аппарата первого листа растений ячменя разного возраста можно было ожидать изменения интенсивности транскрипции генов выбранных нами оперонов.

Как видно из результатов, приведенных на рис. 2, *groB*, *groC1*, *groC2* гены имели довольно равномерную интенсивность транскрипции, которая практически не зависела от возраста растений, что говорит о высокой консервативности характера транскрипции оперонов, гены которых кодируют белки, выполняющие сходную функцию.



**Рис. 2.** Относительная интенсивность транскрипции генов *gro* оперона растений ячменя разного возраста (а), радиоавтографы данного эксперимента (б); гибридизационные пробы на *groB* (1), *groC1* (2) и *groC2* (3) гены

Совсем другие результаты получены для *rrn* оперона, у которого скорость транскрипции генов различается для растений разного возраста (рис. 3). Важно при этом отметить, что интенсивность транскрипции *rrn16* гена, определенная с помощью трех независимых гибридизационных проб к разным участкам гена, дала близкие результаты, что говорит о корректности применяемого метода анализа. Характер изменения скорости транскрипции изученных генов данного оперона отличался у 3-дневных растений, но был практически одинаков у 9- и 16-дневных растений (рис. 3).



**Рис. 3.** Относительная интенсивность транскрипции генов *rrn* оперона растений ячменя разного возраста (а), радиоавтографы данного эксперимента (б).

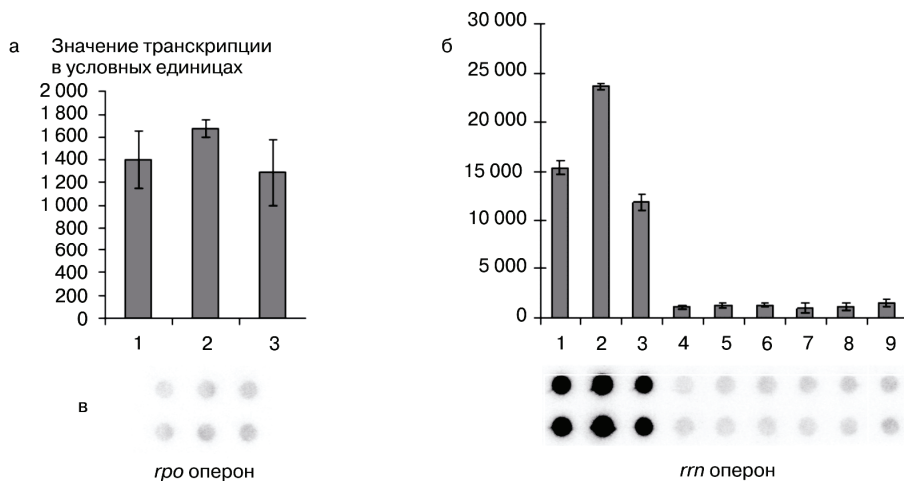
Локализация гибридизационных проб, обозначенных цифрами (1—9), показана на рис. 16.

Несмотря на то что для этого оперона должен синтезироваться единый первичный транскрипт, у 9- и 16-дневных растений наблюдается высокая интенсивность транскрипции для *rrn16* гена, за которым идет 2—3-кратное падение интенсивности транскрипции для последующих изученных нами генов данного оперона, и этот перепад приходится на межгенный спейсер *rrn16/tRNA<sup>II</sup>* генов.

Для того чтобы понять возможную причину изменения скорости транскрипции генов внутри *rrn* оперона, мы изучили интенсивность транскрипции генов этих двух оперонов у мутантных растений ячменя *albostrians*, в которых отсутствуют пластидные рибосомы, а значит, отсутствуют все белки пластидного кодирования, и по этой причине транскрипцию генов пластид осуществляет только пластидная РНК-полимераза ядерного кодирования [16]. В этих мутантах наиболее активно транскрибируются «гены домашнего хозяйства», к которым и относятся гены обоих изучаемых оперонов. Оперон *rpo*, транскрипция которого очень слабо обнаруживается в зеленых растениях у ячменя и ржи [11], оказывается одним из самых активно транскрибируемых оперонов в мутантных растениях, у которых отсутствует или по какой-либо причине неактивна пластидная РНК-полимераза бактериального типа.

Таким образом, использование *albostrians* мутантов позволяет судить о том, как влияет на транскрипцию генов пластидных оперонов отсутствие пластидной мультисубъединичной РНК-полимеразы. Поскольку мутантные растения сохраняют жизнеспособность не более 7 дней, для этих экспериментов был взят первый лист 3-дневных *albostrians* растений.

Как показывают результаты, представленные на рис. 4а, отсутствие РНК-полимеразы бактериального типа практически никак не влияло на характер транскрипции генов *rpo* оперона (см. также рис. 2). Наблюдается равномерная транскрипция всех трех генов. И это не вызывает особого удивления, поскольку *rpo* оперон в зеленых растениях, как и в мутантах, транскрибируется исключительно РНК-полимеразой фагового типа [1].



**Рис. 4.** Относительная интенсивность транскрипции генов *rpo* (а) и *rrn* (б) оперонов в 3-дневных мутантах ячменя *albostrians*, радиоавтографы данных экспериментов (в).

Локализация гибридационных проб, обозначенных цифрами, показана на рис. 1а для *rpo* оперона и на рис. 1б для *rrn* оперона

Отсутствие РНК-полимеразы бактериального типа оказало существенное влияние на скорость транскрипции генов *gtp* оперона (рис. 4б, см. также рис. 3). Наблюдаемое падение скорости транскрипции у 9- и 16-дневных зеленых растений после *rrn16* гена еще более сильно было выражено для 3-дневных растений ячменя *albostrians*. Наблюдалось 8—10-кратное падение скорости транскрипции всех генов, транскрибируемых в этом опероне после *rrn16* гена у мутантных растений, что может говорить о нарушении обычного для зеленых растений процесса синтеза РНК и/или стабильности вновь синтезированных транскриптов.

По нашим данным (результаты не приведены) и данным Hess, Börner [11], в *albostrians* растениях не происходит образование зрелых транскриптов, а накапливаются в основном непротранскрибированные РНК. Такой сильный перепад в интенсивности транскрипции может зависеть от полного отсутствия пластидного синтеза белка, поскольку вполне возможно, что для оптимальной функциональной активности белкам ядерного кодирования, поступающим в пластиды, могут быть необходимы какие-то белки пластидного кодирования. Кроме того, в *albostrians* мутантах может быть нарушен также и транспорт пептидов, поступающих в пластиды из цитоплазмы. Большая стабильность транскрипции 16S рРНК может хотя бы частично объясняться наличием в пластидных мутантных растений РНК-связывающих белков ядерного кодирования, в том числе и рибосомных белков, которые защищают транскрипты рРНК от возможного разрушения нуклеазами.

Аналогичные перепады интенсивности транскрипции показаны для нескольких оперонов митохондрий дрожжей, гены которых кодируют функционально различные продукты [17]. Такой перепад в скорости транскрипции генов внутри органелльных оперонов может объясняться двумя основными причинами:

— возможным наличием, особенно в межгенных зонах, последовательностей ДНК, ослабляющих транскрипцию, что, в конечном счете, может привести к отсоединению РНК-полимеразы от ДНК;

— наличием специфичных РНК-связывающих белков, обладающих высокой РНК-азной активностью, которые могут вызывать сильную деградацию определенных участков транскрипта.

Полученные нами данные подтверждают гипотезу о том, что опероны, состоящие из генов, кодирующих функционально различные белки или РНК, требуют дополнительной внутриоперонной регуляции транскрипции, но не всегда эту регуляцию можно объяснить наличием внутриоперонных промоторов.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Liere K., Börner T.* Transcription of plastid genes / Regulation of Transcription in Plants. — Grasser K.D. (ed.). — Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 2006. — P. 184—224.
- [2] *Юрина Н.П., Одинцова М.С.* Экспрессия генома хлоропластов и ее регуляция // Генетика. — 1991. — Т. 27. — С. 1125—1134.
- [3] *Юрина Н.П., Одинцова М.С.* Сравнительная характеристика структурной организации генома хлоропластов и митохондрий растений // Генетика. — 1998. — Т. 34. — С. 5—22.
- [4] *Lerbs-Mache S.* Function of plastid sigma factors in higher plants: regulation of gene expression or just preservation of constitutive transcription? // Plant Mol. Biol. — 2010. — Nov. 25. — E-pub ahead of print.
- [5] *Hajdukiewicz P.T.J., Allison L.A., Maliga P.* The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids // The EMBO Journal. — 1997. — Vol. 16 — № 13. — P. 4041—4048.

- [6] Hedtke B., Börner T., Weihe A. Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in Arabidopsis // Science. — 1997. — Vol. 277. — P. 809—811.
- [7] Pfälz J., Liere K., Kandlbinder A., Dietz K.-J., Oelmüller R. pTAC2, -6 and -12 are components of the transcriptionally active plastid chromosome that are required for plastid gene expression // The Plant Cell. — 2006. — Vol. 18. — P. 176—197.
- [8] Schweer J., Türkeri H., Kolpack A., Link G. Role and regulation of plastid sigma factors and their functional interactors during chloroplast transcription — recent lessons from Arabidopsis thaliana // Eur. J. Cell Biol. — 2010. — Vol. 89 (12). — P. 940—946.
- [9] Schweer J., Türkeri H., Link B., Link G. AtSIG6, a plastid sigma factor from Arabidopsis, reveals functional impact of cpCK2 phosphorylation // Plant J. — 2010. — Vol. 62 (2). — P. 192—202.
- [10] Zghidi W., Merendino L., Cottet A., Mache R., Lerbs-Mache S. Nucleus-encoded plastid sigma factor SIG3 transcribes specifically the *psbN* gene in plastids // Nucleic Acids Res. — 2007. — Vol. 35 (2). — P. 455—464.
- [11] Hess W.R., Prombona A., Fieder B., Subramanian A.R., Börner T. Chloroplast *rps15* and the *rpoB/C1/C2* gene cluster are strongly transcribed in ribosome-deficient plastids: evidence for a functioning non-chloroplast-encoded RNA polymerase // The EMBO Journal. — 1993. — Vol. 12. — P. 563—571.
- [12] Зубо Я.О., Кузнецов В.В. Применение метода run-on транскрипции для изучения регуляции экспрессии пластидного генома // Физиология растений. — 2008. — Т. 55. — № 1. — С. 114—122.
- [13] Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984.
- [14] Courtois F., Merendino L., Demarsy E., Mache R., Lerbs-Mache S. Phage-type RNA polymerase RPOTmp transcribes the *rrn* operon from the PC promoter at early developmental stages in Arabidopsis // Plant Physiol. — 2007. — Vol. 145 (3). — P. 712—721.
- [15] Bligny M., Courtois F., Thamin S., Chang C.C., Lagrange T., Baruah-Wolff J., Stern D., Lerbs-Mache S. Regulation of plastid rDNA transcription by interaction of CDF2 with two different RNA polymerases // EMBO J. — 2000. — Vol. 19 (8). — P. 1851—1860.
- [16] Hübschmann T., Börner T. Characterization of transcript initiation sites in ribosome-deficient barley plastids // Plant Molecular Biology. — 1998. — Vol. 36. — P. 493—496.
- [17] Krause K., Dieckmann C.L. Analysis of transcription asymmetries along the tRNAE-COB operon: evidence for transcription attenuation and rapid RNA degradation between coding sequences // Nucleic Acids Res. — 2004. — Vol. 32 (21). — P. 6276—6283.

## ASYMMETRIC GENE TRANSCRIPTION OF BARLEY PLASTOME OPERONS

A.Yu. Aleynikova, V.V. Kusnetsov, Y.O. Zubo

Timirjazev Institute of Plant Physiology  
Russian Academy of Science

Botanicheskaya str., 35, Moscow, Russia, 127276

The paper is devoted to elucidation of gene transcription of chloroplast operons in barley plants. Operons which include genes encoding functionally similar proteins, were shown to be transcribed evenly under various physiological conditions. On the contrary, if operons contain genes the products of which participate in differing metabolic pathways or if these products represent components of different functional complexes, they may have differing rates of transcription intensity. This may be explained as the result of the existence of additional pathways regulating posttranscriptional expression of plant plastid operon genes.

**Key words:** transcription, operon, chloroplast, barley *Hordeum vulgare*, mutant *albostrians*.