

УДК 581.1

ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ ПЛАСТОМА ЯЧМЕНЯ В УСЛОВИЯХ ТЕПЛОВОГО ШОКА

© 2008 г. Я. О. Зубо*, Е. А. Лысенко*, А. Ю. Алейникова*,
В. В. Кузнецов*, Н. Л. Пшибытко**

* Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева, Российская академия наук, Москва

** Институт биофизики и клеточной инженерии, Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь

Поступила в редакцию 21.08.2007 г.

Для адаптации фотосинтетического аппарата к повышенной температуре растения используют широкий спектр молекулярных реакций. Для того, чтобы понять, какую роль в этом процессе играют гены пластома у 7-дневных проростков ячменя (*Hordeum vulgare* L.), мы изучили транскрипцию генов фотосинтеза и генов “домашнего хозяйства” пластид и обнаружили, что в адаптации к тепловому шоку принимают участие гены из обеих групп. Транскрипция генов, кодирующих апопротеины реакционных центров ФС I и ФС II, усиливалась через 1.5 ч с момента начала воздействия повышенной температуры и уменьшалась к 3 ч, а транскрипция некоторых генов НАД(Ф)-Н пластохинон-оксидоредуктазы, рибосомных белков и мультисубъединичной РНК-полимеразы активировалась после 3 ч воздействия повышенной температуры. Транскрипция пластомных генов *rpl23-rpl2* и *rps16* активировалась при тепловой обработке как целого растения, так и изолированных хлоропластов. Это позволяет предполагать, что изменения транскрипции генов пластома в условиях теплового шока происходят не только в результате изменения экспрессии ядерных генов, кодирующих пластидные факторы транскрипции, но и в результате изменения свойств транскрипционных факторов внутри хлоропластов.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare* – тепловой шок – адаптация – хлоропласты – пластом – транскрипция.

ВВЕДЕНИЕ

Повышенная температура является одним из наиболее распространенных неблагоприятных факторов, с которыми сталкиваются растения. Тепловой шок угнетает многие процессы [1], в том числе, приводит к повреждению фотосинтетического аппарата [2–5]. Молекулярные механизмы адаптации фотосинтетического аппарата к тепловому шоку вызывают большой интерес. Известно, что для сохранения функциональной активности фотосинтетического аппарата при гипертермии растения используют хлоропластные шапероны [6, 7], протеазы [5, 8] и НАД(Ф)-Н пластохинон-оксидоредуктазный комплекс [9]. Однако, несмотря на все защитные механизмы, белки фотосинтетического аппарата интенсивно повреждаются [5, 10], а значит, нуждаются в замене.

Сокращения: PEP – РНК-полимераза пластидного кодирования (от plastid encoded RNA polymerase); SSC – Na-цитратный буфер, состоящий из 0.15 М NaCl, 0.015 М цитрата Na, pH 7.0.

Адрес для корреспонденции: Лысенко Евгений Анатольевич. 127276 Москва, Ботаническая ул., 35. Институт физиологии растений РАН. Факс: 007 (495) 977-80-18; электронная почта: genlysenko@mail.ru

Многие белки фотосинтетического аппарата, в том числе апопротеины реакционных центров ФС I и ФС II, кодируются пластидной ДНК. Пластом высших растений состоит из двух больших групп генов: фотосинтетических генов и генов, кодирующих пластидный аппарат экспрессии генов [11]. Для поддержания активности фотосинтетического аппарата необходима экспрессия генов обеих групп, так как при нарушении работы пластидной “машины” экспрессии синтез компонентов электрон-транспортной цепи хлоропластов становится затрудненным или даже невозможным [12, 13]. Поэтому в поддержании активности фотосинтетического аппарата при тепловом шоке могут быть задействованы обе эти группы генов. Показано, что при повышенной температуре в хлоропластах растений увеличивается уровень мРНК основных белков фотосинтетического аппарата [14]. Известно также, что при гипертермии в хлоропластах увеличивается общая интенсивность транскрипции [15], однако нам не удалось обнаружить информацию о влиянии повышенной температуры на транскрипцию индивидуальных генов пластома растений. Поэтому была поставлена задача изучить, каким образом в условиях теплового шока изменяется транскрипция генов пласто-

ма, кодирующих фотосинтетический комплекс и пластидный аппарат экспрессии генов.

Ранее было показано, что 7-дневные проростки ячменя более устойчивы к воздействию повышенной температуры, чем проростки других возрастов [16, 17]. При температуре 40°C у таких проростков первые признаки нарушения фотосинтетической активности наблюдались только через 3 ч [18, 19]. Поэтому в данной работе была изучена транскрипция двух десятков пластидных генов именно у 7-дневных проростков ячменя через 3 ч с момента начала воздействия повышенной температуры. Поскольку стресс-индуцибельные изменения транскрипции пластидных генов могут происходить значительно раньше [20], дополнительно изучали транскрипцию тех же генов после 1.5 ч действия температуры 40°C. Проведенное исследование транскрипции генов фотосинтеза и генов “домашнего хозяйства” пластид позволяет предполагать, что в адаптации к гипертермии принимают участие гены из обеих групп.

МЕТОДИКА

Растительный материал. Объектом исследования служили проростки ячменя (*Hordeum vulgare* L., сорт Гонар). Перед посадкой семена замачивали 3 ч в слабом растворе KMnO_4 . Затем проростки выращивали на растворе, содержавшем (мг/л) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 8, KH_2PO_4 – 20, KNO_3 – 20, MgSO_4 – 2, KCl – 10, при 16-часовом фотопериоде, освещенности 200 мкмоль квантов/(м^2 с) и температуре 21°C.

Гипертермия. Тепловую обработку интактных 7-дневных (с момента замачивания семян) проростков проводили при температуре 40°C и постоянном освещении в течение 1.5 и 3 ч. Тепловую обработку хлоропластов, выделенных из 7-дневных проростков, не подвергавшихся гипертермии, проводили при температуре 40°C (тепловой шок) в темноте в течение 1.5 ч. Контрольные хлоропласты выдерживали при температуре 21°C.

Выделение хлоропластов. Листья ячменя (10 г) гомогенизировали в 80 мл буфера А (0.33 М сорбит, 50 мМ трицин, рН 8.0, 2 мМ ЭДТА, 5 мМ β -меркаптоэтанол). Гомогенат фильтровали через один слой марли и два слоя Miracloth (“Calbiochem-Behring”, США) и центрифугировали при 2700 g в течение 6 мин. Осадок органелл ресуспендировали в 1.5 мл буфера А и фракционировали в 40/70%-ном ступенчатом градиенте перкола, центрифугируя при 4000 g 30 мин. Отбирали интактные хлоропласты, находившиеся на границе 40 и 70% перкола. Органеллы промывали буфером А и ресуспендировали в 1 мл того же буфера. Количество хлоропластов определяли с помощью камеры Розенталя–Фукса [21]. Рассчитан-

ное количество органелл (5×10^7) осаждали и ресуспендировали в 40 мкл буфера А. Все этапы выделения хлоропластов проводили при 4°C.

Run-on транскрипция. Для проведения реакции транскрипции к 40 мкл буфера А, содержащего 5×10^7 хлоропластов, добавляли 80 мкл буфера Д (50 мМ Трис- HCl , рН 7.0, 10 мМ MgCl_2 , 10 мМ KCl , 4 мМ β -меркаптоэтанол) и 80 мкл транскрипционного буфера (50 мМ Трис- HCl , рН 8.0, 10 мМ MgCl_2 , 0.2 мМ ЦТФ, ГТФ, АТФ, 0.01 мМ УТФ, 2 мМБ α - ^{32}P -УТФ (110 ТВК мМ, “Amersham”, Великобритания), 20 е.а. препарата RNase Inhib. (“Fermentas”, Латвия), 10 мМ β -меркаптоэтанол) и инкубировали при температуре 25°C в темноте. Длительность реакции составляла 10 мин для свежесделанных органелл (гипертермия *in vivo*) и 15 мин для органелл, инкубированных 1.5 ч в термостате (гипертермия *in vitro*). Останавливали реакцию добавлением равного объема стоп-буфера (50 мМ Трис- HCl , рН 8.0, 25 мМ ЭДТА, 5% саркозил). ^{32}P -РНК выделяли из реакционной смеси, как описано в [22].

Создание библиотеки гибридизационных зондов. Для амплификации ген-специфичных фрагментов были подобраны праймеры, последовательности которых приведены в табл. 1. На момент создания библиотеки гибридизационных зондов полная последовательность пластома ячменя еще не была опубликована, поэтому для ряда генов подбор праймеров осуществляли по гомологичным генам близкородственных растений (пшеницы и риса) при помощи программы Primer 3.

Хлоропластную ДНК выделяли из листьев ячменя по методу [23]. Для амплификации ген-специфичных фрагментов ДНК использовали подобранные праймеры, хпДНК ячменя и Taq ДНК-полимеразу (“Fermentas”). Полученные ампликоны встраивали в плазмиды pUC57 или pTZ57R/T (“Fermentas”), используя соответствующие наборы реактивов и следуя рекомендациям производителя. Характеристика клонированных ген-специфичных фрагментов, использовавшихся в качестве гибридизационных зондов, приведена в табл. 1. Для анализа генов *psbA*, *psbD*, *psaA* и *rrn16* использовали фрагменты генов шпината. При помощи стандартных праймеров M13 эти фрагменты также были амплифицированы и перенесены в плазмиду pUC57.

Приготовление мембран с ген-специфичными пробами, гибридизация мембран с ^{32}P -РНК. Используя плазмиды со встроенными фрагментами генов и стандартные праймеры M13, амплифицировали необходимое количество каждого фрагмента ДНК. Перед нанесением на мембраны фрагменты ДНК денатурировали кипячением в присутствии 0.5 N NaOH (10 мин). С помощью аппарата Bio-Dot (“Bio Rad”, США) ампликоны наносили на нейлоновую мембрану Hybond-N⁺

Таблица 1. Характеристика ДНК-зондов, синтезированных с хпДНК ячменя и использованных для гибридизации с ³²P-РНК, полученными в реакции run-on транскрипции

Название гена	Праймеры	Температура отжига праймеров, °С	Длина ампликона, п.н.
<i>psbH</i>	cacaaccgttgaagatag aattccatccagtaaatgg	54	190**
<i>psbK</i>	ttgagagtgcgaatacaagc gcaaaaatagggttaggtgg	60	587
<i>psaB</i>	ttccatcgaacgtactcacc tctcactttgggcaattagc	62	485
<i>ycf4</i>	ctaggattcttagcgggtgg tcatcagtagcagtcgaagg	60	380
<i>petL-petG*</i>	tcggtttctatggctgct attgcaaatcacgctcacg	59	331**
<i>ndhA</i>	agcgggcaagaataaaggat cacagtcccaccgctattt	60	763**
<i>ndhC</i>	tttgacatttctaataatgcaagcc ctttcgccatgcataaactaaac	61	315
<i>ndhF</i>	tggaccagaagcaagcaaga attccttggtgcagttgcga	60	551**
<i>rrn23</i>	taggttagccgaagatggttatagttt cgagacagtgcccagatcgttac	64	621
<i>rpl23-rpl2*</i>	gtcataagcgcctataaccgt cactgtccgactgttgcta	60	1079
<i>rpl16</i>	gtgtcattgctcttcgtcct gcttcgtattgtcgagatcc	60	1111
<i>rps16</i>	ccttctctcgagatcgaac atgctcttggtcgcacatag	60	793
<i>rps18</i>	acaacctttcgttaggcgtc tcgattggaattgacttttgcgtt	58	285
<i>rpoB</i>	aattcggattggctcttggtc caacaatgcacttctcggac	60	747
<i>clpP1</i>	tcagtatcgcagtgctgtc gtggctaattcaggaatgg	60	399**

Примечание. Для ряда генов подбор праймеров осуществляли по гомологичным генам пшеницы и риса, поэтому некоторые нуклеотиды в праймерах не комплиментарны соответствующей последовательности хпДНК ячменя. Некомплиментарные нуклеотиды выделены белым шрифтом на черном фоне.

* ДНК-зонд охватывает области двух генов и гибридизуется с транскриптами обоих генов.

** Встроенный в плазмиду ампликон проверен секвенированием и соответствует зоне хпДНК ячменя, ограниченной соответствующей парой праймеров.

(“Amersham Pharmacia Biothech”, Великобритания), по 1 мкг ДНК на точку, по две точки для каждого анализируемого гена. Гибридизацию с мечеными Р³² молекулами РНК, полученными в ходе транскрипции *in vitro*, проводили в буфере, содержащем 250 мМ Na₂HPO₄, 7% ДДС-Na и 2.5 мМ ЭДТА при 58°С. После гибридизации мембраны отмывали буфером 1 (0.5 × SSC, 0.1% ДДС-Na) при комнатной температуре и еще раз при температуре 58°С, и дважды – буфером 2 (0.2 × SSC, 0.1% ДДС) при 58°С (длительность каждой отмывки 10 мин). Отмытые мембраны экспонировали с рентгеновской пленкой (“Amersham”), после проявления пленку сканировали

при помощи HP ScanJet 5300С. Радиоавтографы анализировали при помощи программ Quantity One (“Bio Rad”, США) и Microsoft Excel.

В качестве порогового использовали двукратный критерий, т.е. значимыми считали отличия от контроля в два и более раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 2 приведены данные об изменении интенсивности транскрипции изученных генов в условиях теплового шока относительно активности этих генов у контрольных растений, не под-

Таблица 2. Изменение интенсивности транскрипции генов пластома у 7-дневных проростков ячменя в условиях повышенной температуры

Гены	Эксперимент 1		Эксперимент 2	
	1.5 ч	3 ч	1.5 ч	3 ч
<i>psbA</i>	2.20	1.57	2.94	1.66
<i>psbD</i>	2.70	1.09	2.66	1.01
<i>psbH</i>	1.61	1.74	1.70	1.59
<i>psbK</i>	1.10	0.97	1.18	0.98
<i>psaA</i>	2.47	1.31	2.73	1.41
<i>psaB</i>	2.07	1.52	2.84	1.54
<i>ycf4</i>	1.11	1.21	1.33	1.00
<i>petL-petG</i>	1.14	1.40	1.08	1.49
<i>ndhA</i>	1.14	3.33	1.43	2.90
<i>ndhC</i>	0.96	1.40	1.00	1.03
<i>ndhF</i>	0.96	3.21	1.72	1.99
<i>rrn16</i>	0.71	1.48	0.75	0.82
<i>rrn23</i>	0.62	1.52	0.99	0.74
<i>rpl16</i>	1.53	3.26	2.00	1.79
<i>rpl23-rpl2</i>	1.63	2.38	2.38	1.25
<i>rps16</i>	1.21	2.66	1.32	2.11
<i>rps18</i>	1.15	2.39	1.10	2.53
<i>rpoB</i>	1.03	3.12	1.58	1.97
<i>clpP</i>	1.09	1.61	1.50	1.80

Примечание. В таблице приведены отношения I_{40}/I_2 , где I_{40} – интенсивность транскрипции гена у растений, которые подвергали нагреванию при температуре 40°C (1.5 или 3 ч), а I_2 – интенсивность транскрипции этого же гена, у растений, которые не подвергали нагреванию, а выдерживали при температуре выращивания 21°C. В таблице приведены результаты двух независимых экспериментов. В качестве порогового избран общепринятый в подобных исследованиях двукратный критерий, т.е. значимыми считаются изменения транскрипции в два и более раз. В таблице значения 2 и более указывают на активацию транскрипции.

вергавшихся воздействию повышенной температуры. Для ряда генов, транскрипция которых изменяется (или не изменяется) наиболее показательно, приведены радиоавтографы, отражающие их относительную транскрипционную активность у контрольных и у опытных растений (рис. 1).

Среди фотосинтетических генов наиболее примечательной является скоординированная реакция генов, кодирующих апопротеины реакционных центров ФС I и ФС II (*psaA*, *psaB*, *psbA*, *psbD*): транскрипция этих генов значительно усиливалась через 1.5 ч после начала воздействия повышенной температуры, а еще через 1.5 ч уменьшалась, возвращаясь к контрольному уровню. Следует отметить, что гены *psaA* и *psaB* составляют один оперон и транскрибируются совместно, то-

гда как гены *psbA* и *psbD* транскрибируются независимо от них и друг от друга. Гены, кодирующие другие белки ФС II, не проявили подобной реакции: транскрипция гена *psbH* проявляла тенденцию к активации, но не достигала порогового уровня, транскрипция гена *psbK* практически не изменялась. Почти не изменялась интенсивность транскрипции гена *ycf4*, который участвует в сборке ФС I [24], а также транскрипция генов *petL* и *petG*, кодирующих малые субъединицы цитохром *b₆/f*-комплекса.

После 3 ч воздействия повышенной температуры наблюдали активацию транскрипции генов *ndhA* и *ndhF*, кодирующих субъединицы НАД(Ф)-Н пластохинон-оксидоредуктазы, при этом транскрипция гена *ndhC* изменялась очень слабо. Кроме того, увеличивалась интенсивность транскрипции генов рибосомных белков. Транскрипция генов *rps16* и *rps18* увеличивалась после 3-часовой экспозиции, а транскрипция генов *rpl16* и *rpl23-rpl2* в первом эксперименте достоверно активировалась после 3 ч гипертермии, а во втором эксперименте – после 1.5 ч. После 3 ч воздействия 40°C усиливалась транскрипция генов мультисубъединичной РНК-полимеразы (PEP). В таблице приведены данные только для гена *rpoB*, но остальные пластомные гены *rpoA*, *rpoC1*, *rpoC2* ведут себя сходным образом (данные не приведены). Гены *rpoB*, *rpoC1* и *rpoC2* представляют единый оперон и транскрибируются совместно, ген *rpoA* транскрибируется независимо от них. После 3 ч прогревания наблюдалась тенденция к активации гена *clpP1* – единственного пластомного гена, кодирующего протеазу, но увеличение его экспрессии не достигало пороговой величины.

Полученные результаты показали, что в условиях повышенной температуры в растениях увеличивается экспрессия некоторых пластомных генов, по крайней мере, на уровне транскрипции. Возник вопрос: каким образом это происходит? Можно предположить два основных пути регуляции транскрипции в хлоропластах. Во-первых, все известные хлоропластные транскрипционные факторы кодируются в ядре [11]. Поэтому наблюдаемые изменения могут быть результатом того, что изменилась экспрессия ядерных генов, кодирующих хлоропластные факторы транскрипции. Именно таким путем обеспечивается активация транскрипции гена *psbD* при изменении освещения, а также под действием некоторых других стрессоров [20, 25–27]. Во-вторых, повышение температуры может вызывать какие-то изменения собственно в транскрипционном аппарате хлоропластов, например, изменить свойства транскрипционных факторов. Примеры такой регуляции пока не известны, однако в хлоропластах существуют механизмы, которые потенциально способны регулировать активность транскрипционных факторов [28].

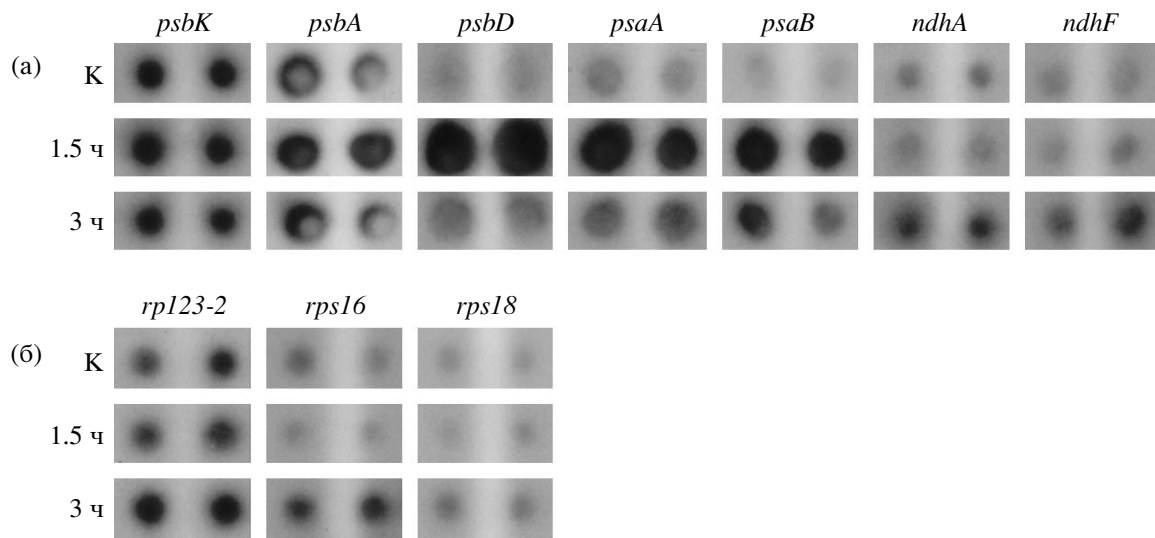


Рис. 1. Влияние повышенной температуры на интенсивность транскрипции генов пластома у 7-дневных проростков ячменя.

а – гены фотосинтетического аппарата, б – гены белков пластидных рибосом. К – контрольные растения, выращенные при температуре 21°C; 1.5 и 3 ч – растения, которые выдерживали при температуре 40°C 1.5 и 3 ч.

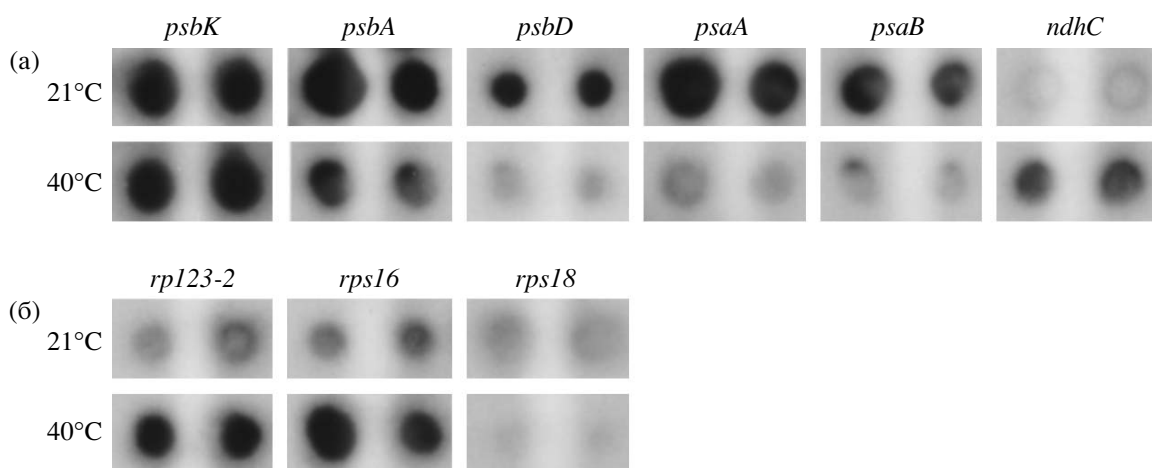


Рис. 2. Влияние повышенной температуры на интенсивность транскрипции генов пластома в изолированных хлоропластах ячменя.

а – гены фотосинтетического аппарата, б – гены белков пластидных рибосом. Хлоропласты выделяли из 7-дневных проростков ячменя и инкубировали 1.5 ч при температуре 21°C (температура выращивания) или 40°C.

Чтобы ответить на этот вопрос, было изучено, каким образом изменяется транскрипция, если выдерживать в условиях повышенной температуры изолированные хлоропласты, так как в этом случае становится невозможным поступление из цитоплазмы вновь синтезированных факторов транскрипции. Поскольку 3-часовая экспозиция при 40°C могла привести к полной деградации транскрипционного аппарата, мы выбрали для исследования только один временной интервал – 1.5 ч. Хлоропласты выделяли из растений, не подвергавшихся тепловому шоку, а затем инкубировали 1.5 ч при температуре 21°C (контроль) или 40°C (опыт). После этого проводили транскрип-

ционную реакцию в одинаковых условиях. Результаты эксперимента приведены в табл. 3 и на рис. 2.

Анализ данных из табл. 3 показывает, что в условиях гипертермии транскрипция в изолированных хлоропластах изменялась сильнее, чем в хлоропластах, подвергавшихся воздействию повышенной температуры в составе живых клеток листа. Если сравнить результаты, полученные при нагревании интактных растений (табл. 2) и изолированных хлоропластов (табл. 3), то увидим, что после 1.5-часовой обработки изолированных хлоропластов не наблюдается активации

Таблица 3. Изменение интенсивности транскрипции генов пластома в изолированных хлоропластах ячменя в условиях повышенной температуры

Гены	Эксперимент 1	Эксперимент 2
<i>psbA</i>	0.53	0.55
<i>psbD</i>	0.27	0.67
<i>psbH</i>	1.54	1.56
<i>psbK</i>	1.02	1.14
<i>psaA</i>	0.26	0.28
<i>psaB</i>	0.24	0.59
<i>ycf4</i>	0.33	0.86
<i>petL-petG</i>	0.40	0.45
<i>ndhA</i>	0.62	0.83
<i>ndhC</i>	2.93	2.05
<i>ndhF</i>	1.72	1.27
<i>rrn16</i>	3.29	0.78
<i>rrn23</i>	1.48	0.51
<i>rpl16</i>	1.56	1.03
<i>rpl23-rpl2</i>	2.15	2.69
<i>rps16</i>	2.61	2.66
<i>rps18</i>	0.30	0.48
<i>rpoB</i>	0.40	0.53
<i>clpP</i>	0.41	0.75

Примечание. Хлоропласты, выделенные из 7-дневных проростков ячменя, инкубировали 1.5 ч без доступа света при температуре 21°C (температура выращивания растений) или 40°C. В таблице приведены отношения I_{40}/I_{21} , где I – интенсивность транскрипции в хлоропластах, инкубированных при соответствующей температуре. Значения 2 и более указывают на активацию транскрипции, а 0.5 и менее – на подавление.

транскрипции генов апопротеинов реакционных центров фотосистем, как это происходит у интактных растений. Более того, наблюдается подавление транскрипции этих генов, а также генов цитохром b_6/f -комплекса (*petL-petG*). И, наоборот, в изолированных хлоропластах наблюдается активация транскрипции гена *ndhC*, не наблюдаемая у интактных растений. Однако можно заметить некоторое сходство последствий 1.5-часового прогревания изолированных хлоропластов и 3-часового прогревания интактных растений: в обоих случаях наблюдалась активация транскрипции генов *rpl23-rpl2* и *rps16*. Сходство это ограничено: другие гены, активируемые после 3-часовой обработки интактных растений (*rps18*, *rpoB*, другие гены *rpo*), демонстрируют падение транскрипционной активности при 1.5-часовой обработке изолированных хлоропластов. Отметим еще одно сходство: и в интактных растениях, и в изолированных хлоропластах при гипертермии наблюдается тенденция к активации тран-

скрипции гена *psbH*, а транскрипция гена *psbK* практически не изменяется (табл. 2, 3; рис. 1, 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе изучали, каким образом повышение температуры влияет на транскрипционную активность генов пластома у 7-дневных проростков ячменя и обнаружили, что при 40°C происходит активация транскрипции многих генов пластома. Среди всех изменений, индуцированных повышением температуры от 21 до 40°C, можно выделить две реакции. После 1.5 ч тепловой обработки растений в хлоропластах усиливается транскрипция генов, кодирующих апопротеины реакционных центров ФС I и ФС II (*psaA*, *psaB*, *psbA*, *psbD*), а после 3 ч действия повышенной температуры активация транскрипции этих генов либо не столь велика, либо даже отсутствует (табл. 2). Транскрипция гена *psbD* изменяется подобным образом и в ответ на изменение освещения: активация транскрипции наблюдается уже через 0.5 ч, достигает максимума через 1–2 ч, а затем снижается [20]. В результате этой активации в период от 1 до 2 ч с момента изменения освещенности происходит значительное увеличение количества мРНК *psbD*, синтезированной со светоактивируемого промотора: через 1 ч увеличение количества мРНК практически незаметно, а через 2 ч – значительно увеличивается и в дальнейшем почти не изменяется [20, 25]. При тепловом шоке уровень мРНК генов *psaA*, и *psbD* также увеличивается после 3 ч обработки [14].

Наблюдаемая активация транскрипции распространяется не на все гены электрон-транспортной цепи фотосинтетических мембран. Гены, кодирующие периферийные белки ФС II, не проявили подобной реакции: транскрипция гена *psbH* проявляет небольшую тенденцию к активации, транскрипция гена *psbK* практически не изменяется. Почти не изменяется транскрипция генов *petL* и *petG*, кодирующих малые субъединицы цитохром b_6/f -комплекса, и гена *ycf4*, кодирующего фактор сборки ФС I.

Белки реакционных центров фотосистем, по видимому, наиболее интенсивно повреждаются при стрессе [29]. Во всяком случае, при сильном освещении белки D1 и D2 реакционного центра ФС II деградируют быстрее, чем CP43-белок ФС II, большая субъединица РБФК/О и субъединица В АТФ-синтазы [30]. В условиях теплового шока белки реакционных центров фотосистем также очень уязвимы [5, 10]. Вероятно, активация транскрипции генов апопротеинов реакционных центров фотосистем является одной из самых первых реакций растений, направленных на поддержание активности фотосинтетического аппарата при гипертермии. Полученные нами данные позволяют предполагать, что активация транскрипции за-

трагирует только гены белков реакционных центров фотосистем и, возможно, небольшое число других генов, продукты которых сильно повреждаются при тепловом шоке.

В связи с полученными нами данными, можно вспомнить эксперимент, проведенный на протопластах *Arabidopsis thaliana*: в стабильных условиях в темноте усиленная экспрессия сигма-фактора 5 (Sig5) приводила к активации транскрипции генов *psaA*, *psbA*, *psbB* и *psbD*, а усиленная экспрессия сигма-фактора 2 активировала транскрипцию генов *psbA* и *trnEYD* [27]. Отметим, что у ячменя при гипертермии транскрипция оперона *trnEYD* изменялась независимо от *psbA* и других генов реакционных центров фотосистем (данные не приведены). Сигма-субъединицы являются базальными факторами транскрипции, регулирующими функционирование мультисубъединичной РНК-полимеразы пластид (PEP) [28]. Гены сигма-факторов 1, 2 и 5 сформировались, по-видимому, еще до разделения наземных растений на мхи и сосудистые растения [31], поэтому вполне вероятно, что они сходным образом регулируют транскрипцию в пластидах ячменя и *A. thaliana*. У *A. thaliana* Sig5 является стресс-регулируемым транскрипционным фактором, который активируется различными стрессорами, с использованием различных путей: светозависимого и светонезависимого [26]. Возможно, при гипертермии у проростков ячменя Sig5 участвует в активации транскрипции генов апопротеинов реакционных центров фотосистем.

Вторая обнаруженная нами реакция растений на увеличение температуры – это увеличение транскрипции генов НАД(Ф)-Н-пластохинон-оксидоредуктазы, белков рибосом и PEP после 3-часовой экспозиции при 40°C (табл. 2). На этой стадии у 7-дневных проростков ячменя уже наблюдаются некоторые нарушения активности фотосинтетического аппарата [18, 19], поэтому в данном случае можно говорить о реакции растений на тепловой шок. Вероятно, это защитная реакция “второго эшелона”, реакция не только на увеличение температуры, но и реакция на нарушения биологических процессов. НАД(Ф)-Н-пластохинон-оксидоредуктаза участвует в защите фотосинтетического аппарата при гипертермии, уменьшая возникновение активных форм кислорода [9]. Как и в первой реакции, активируются не все гены этого комплекса: транскрипция генов *ndhA* и *ndhF* увеличивается, транскрипция гена *ndhC* не изменяется относительно контроля (табл. 2). Ген *ndhF* кодирует самую большую субъединицу этого комплекса, а ген *ndhC* – одну из самых малых. Возможно, субъединицы, кодируемые генами *ndhA* и *ndhF*, повреждаются быстрее, поэтому их синтез увеличивается. Активация транскрипции генов белков рибосом и РНК-полимеразы, очевидно, вызвана тем, что с нарастани-

ем теплового шока становится необходимым поддерживать не только синтез компонентов электрон-транспортной цепи, но и самой “машины”, осуществляющей этот синтез.

Обобщая вышесказанное, можно описать наблюдаемые изменения следующим образом. При повышении температуры, вероятно, еще до наступления теплового шока, происходит активация транскрипции генов наиболее повреждаемых белков – апопротеинов реакционных центров ФС I и ФС II. К началу ослабления функции фотосинтетического аппарата активация этих генов прекращается, но активируются гены, кодирующие белки, защищающие фотосинтетический аппарат (*ndh*, а также тенденция к активации гена *clpP1*) и обеспечивающие синтез его компонентов (белки рибосом и РНК-полимеразы). Вполне вероятно, что эти защитные реакции не только разделены во времени, но и активируются посредством разных регуляторных путей.

Выше упоминалось о том, что наблюдаемые изменения транскрипционной активности могут происходить в результате изменения экспрессии ядерных генов, кодирующих пластидные транскрипционные факторы (например, Sig5) [20, 25–27], и/или изменения свойств транскрипционных факторов внутри хлоропластов в [28]. Чтобы ответить на этот вопрос, было изучено, каким образом изменяется транскрипция при нагревании изолированных хлоропластов, в которые невозможен приток синтезированных *de novo* транскрипционных факторов (пластом практически не содержит генов факторов, регулирующих транскрипцию, все они кодируются ядерными генами [11]). Оказалось, что после 1.5 ч нагревания хлоропластов в биологических тканях и изолированных хлоропластов изменения транскрипции практически не совпадают (табл. 2 и 3). Предположительно можно назвать, по меньшей мере, три причины: 1) изолированные хлоропласты более уязвимы к воздействию стрессоров, чем хлоропласты, находящиеся внутри живой клетки; 2) в изолированные хлоропласты невозможен приток транскрипционных факторов; 3) интактные растения подвергались тепловому шоку при освещении, изолированные хлоропласты – без доступа света (в обоих случаях контрольные и опытные образцы выдерживали в одинаковых условиях освещения). Поэтому пока нельзя объяснить наблюдаемые различия действием одного определенного фактора.

Однако при гипертермии *in vivo* и *in vitro* происходит активация генов *rpl23-rpl2* и *rps16* по сравнению с интенсивностью транскрипции этих генов у контрольных растений. При обработке интактных растений мы наблюдали этот эффект после 3 ч тепловой обработки (табл. 2, рис. 1), к моменту, когда регистрируются первые наруше-

ния в работе фотосинтетического аппарата [18, 19]. Активация генов *rpl23-rpl2* во втором эксперименте наблюдалась уже через 1.5 ч (табл. 2). При прогревании изолированных хлоропластов транскрипция генов *rpl23-rpl2* и *rps16* активировалась через 1.5 ч в обоих экспериментах (табл. 3, рис. 2). Ранее мы предположили, что изменения в транскрипции, наблюдаемые после 3-часового прогревания, могут быть следствием уже непосредственного нарушения биологических процессов. Вполне вероятно, что в изолированных хлоропластах тепловой шок развивается значительно быстрее. Поэтому через 1.5 ч в изолированных хлоропластах наблюдалось то, что в интактных растениях происходило через 3 ч (а может быть, и позже). Если это так, то едва ли можно утверждать, что в изолированных хлоропластах не происходит активации транскрипции генов апопротеиновых реакционных центров фотосистем: возможно, в изолированных хлоропластах это тоже происходит раньше.

Тем не менее, активация транскрипции генов *rpl23-rpl2* и *rps16*, наблюдаемая нами в интактных растениях и в изолированных хлоропластах, позволяет предполагать, что в условиях теплового шока изменяются свойства транскрипционных факторов внутри хлоропластов, а значит, можно предполагать и наличие внутри хлоропластов механизма регуляции активности транскрипционного аппарата и/или транскрипционных факторов.

Авторы благодарят проф. R.G. Herrmann (Мюнхенский университет, Германия) за любезно предоставленные плазмиды, содержащие хлоропластные гены *psbA*, *psbD*, *psaA* и *rrn16*.

Работа выполнена при финансовой поддержке совместного проекта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 06-04-81024) и Белорусского фонда фундаментальных исследований (№ Б06Р-183), а также гранта Президента Российской Федерации для ведущих научных школ (НШ-3692.2006.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stress of Life: From Molecules to Man / Ed. Csermely P. / Ann. N. Y. Acad. Sci. 1998. V. 851. 547 p.
2. Takeuchi T.S., Thornber J.P. Heat-Induced Alterations in Thylakoid Membrane Protein Composition in Barley // Aust. J. Plant Physiol. 1994. V. 21. P. 759–770.
3. Bukhov N.G., Wiese C., Neimanis S., Heber U. Heat Sensitivity of Chloroplasts and Leaves: Leakage of Protons from Thylakoids and Reversible Activation of Cyclic Electron Transport // Photosynth. Res. 1999. V. 59. P. 81–93.
4. Crafts-Brandner S.J., Salvucci M.E. Sensitivity of Photosynthesis in a C4 Plant, Maize, to Heat Stress // Plant Physiol. 2002. V. 129. P. 1773–1780.
5. Yoshioka M., Uchida S., Mori H., Komayama K., Ohira S., Morita N., Nakanishi T., Yamamoto Y. Quality Control of Photosystem II. Cleavage of Reaction Center D1 Protein in Spinach Thylakoids by FtsH Protease under Moderate Heat Stress // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 21660–21669.
6. Heckathorn S.A., Downs C.A., Sharkey T.D., Coleman J.S. The Small, Methionine-Rich Chloroplast Heat-Shock Protein Protects Photosystem II Electron Transport during Heat Stress // Plant Physiol. 1998. V. 116. P. 439–444.
7. Bhadula S.K., Elthon T.E., Habben J.E., Helentjaris T.G., Jiao S., Ristic Z. Heat-Stress Induced Synthesis of Chloroplast Protein Synthesis Elongation Factor (EF-Tu) in a Heat-Tolerant Maize Line // Planta. 2001. V. 212. P. 359–366.
8. Sinvany-Villalobo G., Davydov O., Ben-Ari G., Zaltsman A., Raskind A., Adam Z. Expression in Multigene Families. Analysis of Chloroplast and Mitochondrial Proteases // Plant Physiol. 2004. V. 135. P. 1336–1345.
9. Wang P., Duan W., Takabayashi A., Endo T., Shikanai T., Ye J.Y., Mi H. Chloroplastic NAD(P)H Dehydrogenase in Tobacco Leaves Functions in Alleviation of Oxidative Damage Caused by Temperature Stress // Plant Physiol. 2006. V. 141. P. 465–474.
10. Komayama K., Khatoon M., Takenaka D., Horie J., Yamashita A., Yoshioka M., Nakayama Y., Yoshida M., Ohira S., Morita N., Velitchkova M., Enami I., Yamamoto Y. Quality Control of Photosystem II: Cleavage and Aggregation of Heat-Damaged D1 Protein in Spinach Thylakoids // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1767. P. 838–846.
11. Даниленко Н.Г., Давыденко О.Г. Миры геномов органелл. Минск: Тэхналогія, 2003. 494 с.
12. Allison L.A., Simon L.D., Maliga P. Deletion of *rpoB* Reveals a Second Distinct Transcription System in Plastids of Higher Plants // EMBO J. 1996. V. 15. P. 2802–2809.
13. Zubko M.K., Day A. Stable Albinism Induced without Mutagenesis: A Model for Ribosome-Free Plastid Inheritance // Plant J. 1998. V. 15. P. 265–271.
14. Kusnetsov V.V., Mikulovich T.P., Kukina I.M., Cherepneva G.N., Herrmann R.G., Kulaeva O.N. Changes in the Level of Chloroplast Transcripts in Pumpkin Cotyledons during Heat Shock // FEBS Lett. 1993. V. 321. P. 189–193.
15. Nakajima Y., Mulligan R.M. Heat Stress Results in Incomplete C-to-U Editing of Maize Chloroplast mRNAs and Correlates with Changes in Chloroplast Transcription Rate // Curr. Genet. 2001. V. 40. P. 209–213.
16. Пишбытко Н.Л., Калитуха Л.Н., Кабашиникова Л.Ф. Влияние высокой температуры и водного дефицита на состояние фотосистемы II в листьях *Hordeum vulgare* разного возраста // Физиология растений. 2003. Т. 50. С. 51–58.
17. Пишбытко Н.Л., Калитуха Л.Н., Жаворонкова Н.Б., Кабашиникова Л.Ф. Влияние теплового шока и водного дефицита на состояние фотосинтетических мембран хлоропластов в листьях *Hordeum vulgare* L. разного возраста // Биол. мембраны. 2003. Т. 20. С. 121–127.

18. *Pshybytko N.L., Kalituhu L.N., Kabashnikova L.F.* The Various Mechanisms of Photosynthesis Limitation in Heated Barley Seedlings of Different Ages // *Bulg. J. Plant Physiol.* 2003. Spec. Is. P. 304–313.
19. *Maiseyenkava Y.A., Pshybytko N.L., Kabashnikova L.F.* Barley Seedlings under High Temperature // *Gen. Appl. Plant Physiol.* 2005. V. 31. P. 3–14.
20. *Satoh J., Baba K., Nakahira Y., Shiina T., Toyoshima Y.* Characterization of Dynamics of the *psbD* Light-Induced Transcription in Mature Wheat Chloroplasts // *Plant Mol. Biol.* 1997. V. 33. P. 267–278.
21. *Brown R., Rickless P.* A New Method for Study of Cell Division and Cell Extension with Some Preliminary Effect of Temperature and Nutrient // *Proc. Roy. Soc. B: Biol. Sci.* 1949. V. 136. P. 110–125.
22. *Gaudino R.J., Pikaard C.S.* Cytokinin Induction of RNA Polymerase I Transcription in *Arabidopsis thaliana* // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 6799–6804.
23. *Bookjanns G., Stummann B.M., Henningsen K.W.* Preparation of Chloroplast DNA from Pea Plastids Isolated in a Medium of High Ionic Strength // *Anal. Biochem.* 1984. V. 141. P. 244–247.
24. *Rochaix J.D., Perron K., Dauvillee D., Laroche F., Takahashi Y., Goldschmidt-Clermont M.* Post-Transcriptional Steps Involved in the Assembly of Photosystem I in *Chlamydomonas* // *Biochem. Soc. Trans.* 2004. V. 32. P. 567–570.
25. *Gamble P.E., Mullet J.E.* Blue Light Regulates the Accumulation of Two *psbD-psbC* Transcripts in Barley Chloroplasts // *EMBO J.* 1989. V. 8. P. 2785–2794.
26. *Nagashima A., Hanaoka M., Shikanai T., Fujiwara M., Kanamaru K., Takahashi H., Tanaka K.* The Multiple-Stress Responsive Plastid Sigma Factor, SIG5, Directs Activation of the *psbD* Blue Light-Responsive Promoter (LRP) in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Physiol.* 2004. V. 45. P. 357–368.
27. *Tsunoyama Y., Ishizaki Y., Morikawa K., Kobori M., Nakahira Y., Takeba G., Toyoshima Y., Shiina T.* Blue Light-Induced Transcription of Plastid-Encoded *psbD* Gene Is Mediated by a Nuclear-Encoded Transcription Initiation Factor, AtSig5 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 3304–3309.
28. *Lysenko E.A.* Plant Sigma Factors and Their Role in Plastid Transcription // *Plant Cell Rep.* 2007. V. 26. P. 845–859.
29. *Yamamoto Y.* Quality Control of Photosystem II // *Plant Cell Physiol.* 2001. V. 42. P. 121–128.
30. *Christopher D.A., Mullet J.E.* Separate Photosensory Pathways Co-Regulate Blue Light/Ultraviolet-A-Activated *psbD-psbC* Transcription and Light-Induced D2 and CP43 Degradation in Barley (*Hordeum vulgare*) Chloroplasts // *Plant Physiol.* 1994. V. 104. P. 1119–1129.
31. *Лысенко Е.А.* Анализ эволюции семейства генов *Sig*, кодирующих сигма-факторы растений // *Физиология растений.* 2006. Т. 53. С. 684–694.