

На правах рукописи



Алейникова Анастасия Юрьевна

**Неравномерность транскрипции генов в составе хлоропластных
оперонов ячменя**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2012

Работа выполнена в лаборатории экспрессии генома растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва.

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

Кузнецов Виктор Васильевич

Официальные оппоненты:

Клячко Нелла Леопольдовна,

доктор биологических наук, старший научный сотрудник,
лаборатория физиологических и молекулярных механизмов адаптации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва,
ведущий научный сотрудник,

Ламан Александр Георгиевич,

кандидат химических наук,
филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, г. Пущино,
научный сотрудник,

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, Москва.

Защита состоится 19 июня 2012 г. в 11 часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 002.210.01 по специальности 03.01.05 – “Физиология и биохимия растений” (Биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (495) 977 8018, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, и/ Москва.

Автореферат разослан « 16 » мая 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

В 60-е годы прошлого века было показано, что хлоропласты являются носителями генетической информации наряду с ядром и митохондриями (Ris, Plaut, 1962; Lyttleton 1962). В ходе эволюции цианобактериального предшественника в эукариотической клетке хозяина была утеряна большая часть его генов (Brennicke et al., 1993) и он превратился в полуавтономную клеточную органеллу-хлоропласт (Даниленко, Давыденко, 2003). В пользу наиболее признанной эндосимбиотической теории происхождения хлоропластов говорят данные о кодировании хлоропластным геномом РНК-полимеразы бактериального типа, осуществляющей транскрипцию генов пластома с бактериальных промоторов, а также большое сходство аппарата трансляция хлоропластов и бактерий. (Юрина, Одинцова, 1991). В процессе эволюции хлоропластные гены приобрели некоторые эукариотические черты, такие как наличие интронов и высокая стабильность мРНК (Mayfield et al., 1995). Кроме того, транскрипцию хлоропластных генов, наряду с полимеразой собственного кодирования, осуществляет РНК-полимераза, кодируемая ядром и транспортируемая в хлоропласт (Liere et al., 2011). Таким образом, контроль экспрессии хлоропластных генов включает в себя механизмы, характерные, как для прокариот, так и эукариот.

Большинство пластидных генов, по аналогии с генами прокариот, объединены в опероны и транскрибируются с единого промотора. В состав оперонов могут входить гены, кодирующие белки одного функционального комплекса, например, *rpo* оперон, кодирующий три субъединицы РНК-полимеразы бактериального типа – *rpoB/rpoC1/rpoC2* (Юрина, Одинцова, 1991). Однако чаще всего опероны содержат гены, кодирующие функционально различные белки, которые должны накапливаться в хлоропластах в не равном количестве. Примером может служить оперон, кодирующий RPS2 белок и четыре субъединицы АТФ-синтазного комплекса – *rps2/atpI/atpH/atpF/atpA*. Субъединица III CF0 комплекса (*atpH* ген) должна накапливаться в 6-12 раз больше, чем остальные субъединицы. Согласованность экспрессии хлоропластных генов достигается, вероятно, за счет регуляции процесса транскрипции (Lerbs-Mache S., 2010).

Однако, несмотря на большой прогресс в последние годы в изучении хлоропластной транскрипции, механизмы регуляции транскрипции индивидуальных

генов в составе хлоропластных оперонов у высших растений практически не изучены, хотя это исключительно важно для понимания регуляции биогенеза хлоропластов.

Цель и задачи исследования. Цель диссертационной работы состояла в изучении интенсивности транскрипции генов пластидных оперонов, а также в изучении регуляции их транскрипции под действием различных факторов.

Для ее достижения были поставлены следующие задачи:

1. Выбрать для анализа гены, входящие в состав основных оперонов пластома ячменя, провести клонирование фрагментов этих генов, оптимизировать основные этапы run-on транскрипции.
2. Исследовать эффект возраста растений на регуляцию транскрипции отдельных генов в составе хлоропластных оперонов с целью выявления участков оперонов наиболее подверженных влиянию изучаемых факторов.
3. Провести детальное изучение интенсивности транскрипции этих участков на зеленых растениях в зависимости от возраста листа, действия АБК и МеЖа, от места локализации хлоропластов на листе, от продолжительности синтеза РНК *in vitro*, а также исследовать интенсивность транскрипции изучаемых генов на бесхлорофилльном мутанте ячменя *albostrians*.
4. Выявить возможные причины изменения интенсивности транскрипции генов в пластидных оперонах растений.

Научная новизна и практическая ценность работы. Показано, что гены основной транскрипционной единицы хлоропластных геномов высших растений – оперона – могут дифференциально регулироваться на уровне транскрипции. Изучена регуляция транскрипции 7 пластидных оперонов в зеленых растениях ячменя и в белых растениях мутанта ячменя *albostrians* разными факторами, как эндогенной, так и экзогенной природы. Впервые экспериментально показана терминация транскрипции хлоропластного оперона при помощи гена транспортной РНК, расположенного на комплементарной нити ДНК. Получены новые данные о процессинге хлоропластных оперонов. Полученные результаты вносят существенный вклад в понимание механизмов регуляции транскрипции в пластидах высших растений и могут быть использованы для разработки теоретических основ управления продуктивностью растений.

Апробация результатов работы. Основные результаты работы были представлены на 60 и 61 студенческих научных конференциях РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева (Москва, 2007-2008), на XV, XVI и XIX Международных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2008, 2009, 2012), на Международной конференции «Фитогормоны: молекулярные механизмы действия» (Москва, 2009), на Межинститутском научном молодежном семинаре ИФР РАН «Актуальные проблемы физиологии, молекулярной биологии и биотехнологии растений» (Москва, 2010), на VII Съезде Общества физиологов растений России «Физиология растений–фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Нижний Новгород, 2011).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из которых 3 в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, списка сокращений и списка использованной литературы. Диссертационная работа изложена на 212 страницах, содержит 10 таблиц и 63 рисунков. Список цитируемой литературы составляет 253 наименования, из которых 241 на иностранных языках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Объектом исследования служили первые настоящие листья растений ячменя (далее – первые листья) сорта Луч (*Hordeum vulgare* L.) разного возраста и 5-дневные белые растения мутанта ячменя *albostrians* (*Hordeum vulgare* cv 'Haisa', Hess et al., 1993). Ячмень выращивали в почве в камерах фитотрона при 20-23°C, 16-ти часовом световом периоде (270 мкмоль квантов м⁻²с⁻¹). Возраст растений определяли с момента прорастания семян.

Синтез проб ДНК. Фрагменты пластидной ДНК, используемые в качестве ДНК проб при ДНК-РНК гибридизации, подобраны с применением программы Vector NTI, используя последовательность хлоропластного генома ячменя (*Hordeum vulgare* L., NCBI http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_008590). Пробы выровнены по размеру и ГЦ-составу (табл. 1). Фрагменты ДНК очищены с помощью QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) и нанесены на нейлоновую мембрану (Hybond-N, GE

Healthcare, США) с помощью прибора для дот-гибридизации (Slot-blot apparatus, BioRad, США).

Выделение хлоропластов и проведение run-on транскрипции. Выделяли хлоропласты и проводили run-on транскрипцию по методу, описанному в статье Зубо и Кузнецова (2008). Инкубацию листьев на воде, растворах абсцизовой кислоты (АБК, 7.6×10^{-5} М) или метилжасмоната (МеЖа, 10^{-4} М) вели в течение 24 часов при постоянном освещении (270 мкмоль квантов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$). Клеточные органеллы разделяли на ступенчатом градиенте перкола (40%, 70% – для зеленых и 10%, 20%, 70% – для белых растений). Гибридизацию ^{32}P -меченых РНК, полученных в ходе реакции транскрипции, с фрагментами ДНК, нанесенными на нейлоновую мембрану, проводили в течение ночи при температуре $+58^\circ\text{C}$. В работе использовали фосфоимиджер (Molecular Imager FX, BioRad, США). Обработку данных run-on экспериментов проводили с помощью программ Quantity One и Excel. Эксперименты повторяли не менее 3 раз.

Синтез одноцепочечных проб РНК. Синтез одноцепочечных проб для экспериментов по изучению антисмысловой гибридизации, синтез меченых антисмысловых одноцепочечных РНК, а также меченых одноцепочечных зондов для защиты от РНКаз осуществлялся с помощью набора реактивов MAXIscript® In Vitro Transcription Kit (Applied Biosystems). Матрицей служили фрагменты, полученные ПЦР. Концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). После синтеза меченые ^{32}P -РНК элюировали из геля.

Метод защиты от РНК-аз. Выделение РНК проводили из пластид ячменя, используя TRIzol (Invitrogen) реагент, следуя рекомендациям фирмы. Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Реакцию проводили с помощью набора реагентов MAXIscript® Kit (Applied Biosystems), следуя инструкции. Равные количества пластидной РНК и антисмыслового синтезированного фрагмента (^{32}P -УТФ) ко-прецепитировали спиртом. Осадок растворяли в гибридизационном буфере, денатурировали при 95°C и гибридизовали ночь при 42°C . На следующий день непрогибридизовавшуюся РНК гидролизировали смесью РНКаз, а неразрушенные нуклеиновые кислоты осаждали этанолом. Каждую пробу растворяли в буфере для нанесения (Gel Loading Buffer II), денатурировали при 95°C и наносили на полиакриламидный гель.

Все стандартные молекулярно-биологические методы (ПЦР, клонирование фрагментов ДНК, электрофорез ДНК и РНК в агарозном и ПААГ, перенос РНК на нейлоновую мембрану, мечение фрагментов ДНК и др.) выполнены, как описано в Маниатис и др. (1984). Быструю амплификацию 3'-концов кДНК (3'RACE) проводили, как описано в статье Zhelyazkova et al. (2011).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дифференциальная транскрипция генов в оперонах. Для изучения транскрипции генов в оперонах хлоропластов ячменя, опираясь на данные по организации и экспрессии хлоропластного генома, были выбраны 30 генов, входящих в состав 7 оперонов, среди которых были как опероны с генами только функционально близких белков, так и опероны, гены которых кодируют белки, выполняющие совершенно различную функцию.

Поскольку в ходе развития растений происходит значительное изменение экспрессии пластидного генома (Emanuel et al., 2004), мы изучили, прежде всего, интенсивность транскрипции генов в хлоропластах 4 см фрагмента апикальной части первого листа ячменя 3-дневных проростков (молодой лист), 9-дневных растений (закончивший рост первый лист) и 18-дневных растений (старый первый лист). При столь различном состоянии фотосинтетического аппарата первого листа растений ячменя можно было ожидать изменения интенсивности транскрипции генов выбранных нами оперонов.

Результаты первого этапа работы показали, что гены, объединенные в опероны, могут транскрибироваться равномерно, как например у *rpoB-rpoC1-rpoC2* оперона, гены которого кодируют субъединицы РНК-полимеразы бактериального типа. Транскрипция генов оперонов может быть дифференциальной, даже для генов функционально однородных белков как у *atpI-H-F-A* оперона, кодирующих субъединицы АТФ-синтазы. Если же в одном опероне соседствуют гены, кодирующие компоненты различных функциональных групп, то «перепад» интенсивности транскрипции в опероне чаще приходится именно на такие участки. Для детального исследования транскрипции были выбраны 4 оперона: *rps2-atpI-atpH-atpF-atpA*, *atpB-atpE-trnV-intr-ndhC-ndhK-ndhJ*, *psaA-psaB-rps14* и *rrn16-trnI-trnA-rrn23-rrn4,5-5S*, где наблюдались «перепады» интенсивности транскрипции, и один оперон (*rpoB-rpoC1-rpoC2*), где транскрипция была равномерной.

В предварительных экспериментах установлено, что размер проб и содержание ГЦ пар влияет на интенсивность гибридизации с РНК, поэтому пробы для следующих опытов были выровнены по размеру и ГЦ составу (табл. 1).

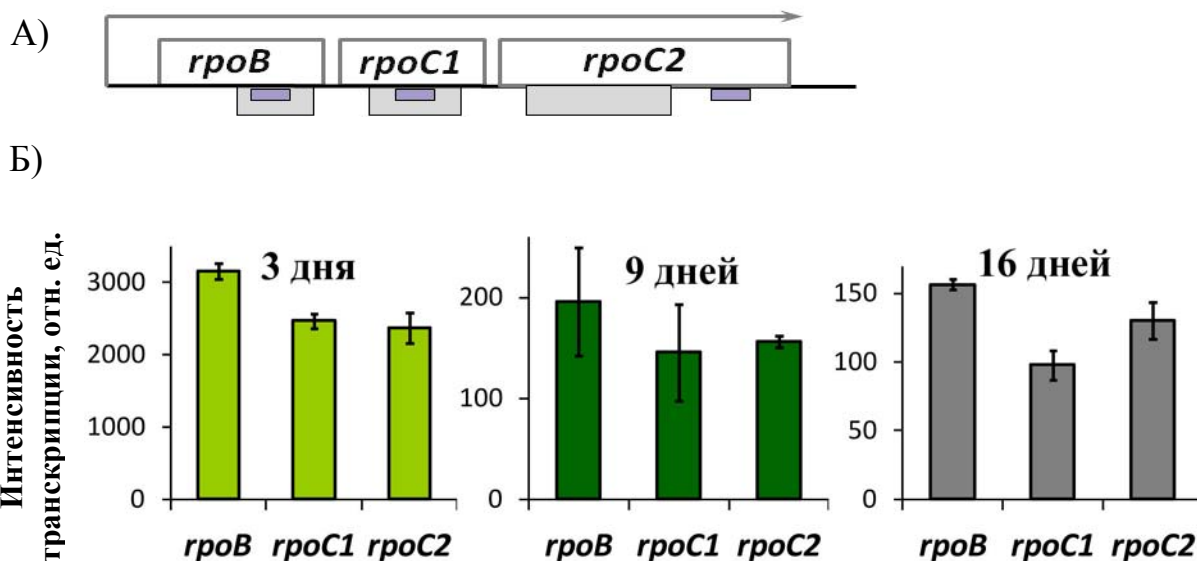
Табл. 1. Некоторые характеристики проб, используемых для гибридизации.

Название оперона	Характеристики гибридизационных проб	
	Размер, п.н.	Содержание ГЦ пар нуклеотидов, %
<i>rpoB</i>	200	38
<i>atpB</i>	100	34-38
<i>rps2</i>	100	28-38
<i>psaA</i>	200	43,0-43,5
<i>rrn16</i>	200-202	49,5-55,0

Для *rpoB-rpoC1-rpoC2* оперона было подобрано по одной паре праймеров на каждый ген (рис. 1А). Полученные пробы ДНК были секвенированы, количественно выровнены, нанесены на нейлоновую мембрану и гибридизованы с ³²-Р-РНК, которые были получены в ходе *in vitro* транскрипции в лизатах хлоропластов, выделенных из верхнего сегмента первого листа ячменя разного

возраста (см. материалы и методы). Как видно из результатов, приведенных на рис. 1, *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2* гены имели довольно равномерную интенсивность транскрипции, которая практически не зависела от возраста растений.

Рис. 1. Влияние возраста растений на интенсивность транскрипции генов *rpoB-rpoC1-rpoC2* оперона. А) Схема *rpoB* оперона. Гены изображены прямоугольниками. Серые прямоугольники - расположение проб в первой предварительной части экспериментов. Фиолетовыми прямоугольниками изображены 200-нуклеотидные пробы, используемые в *gun-on* анализе. Б) Гистограммы интенсивности транскрипции при использовании проб *rpoB-rpoC1-rpoC2* генов у 3-, 9- и 16-дневных растений ячменя. Внизу гистограмм - названия проб, вверху – возраст растений.



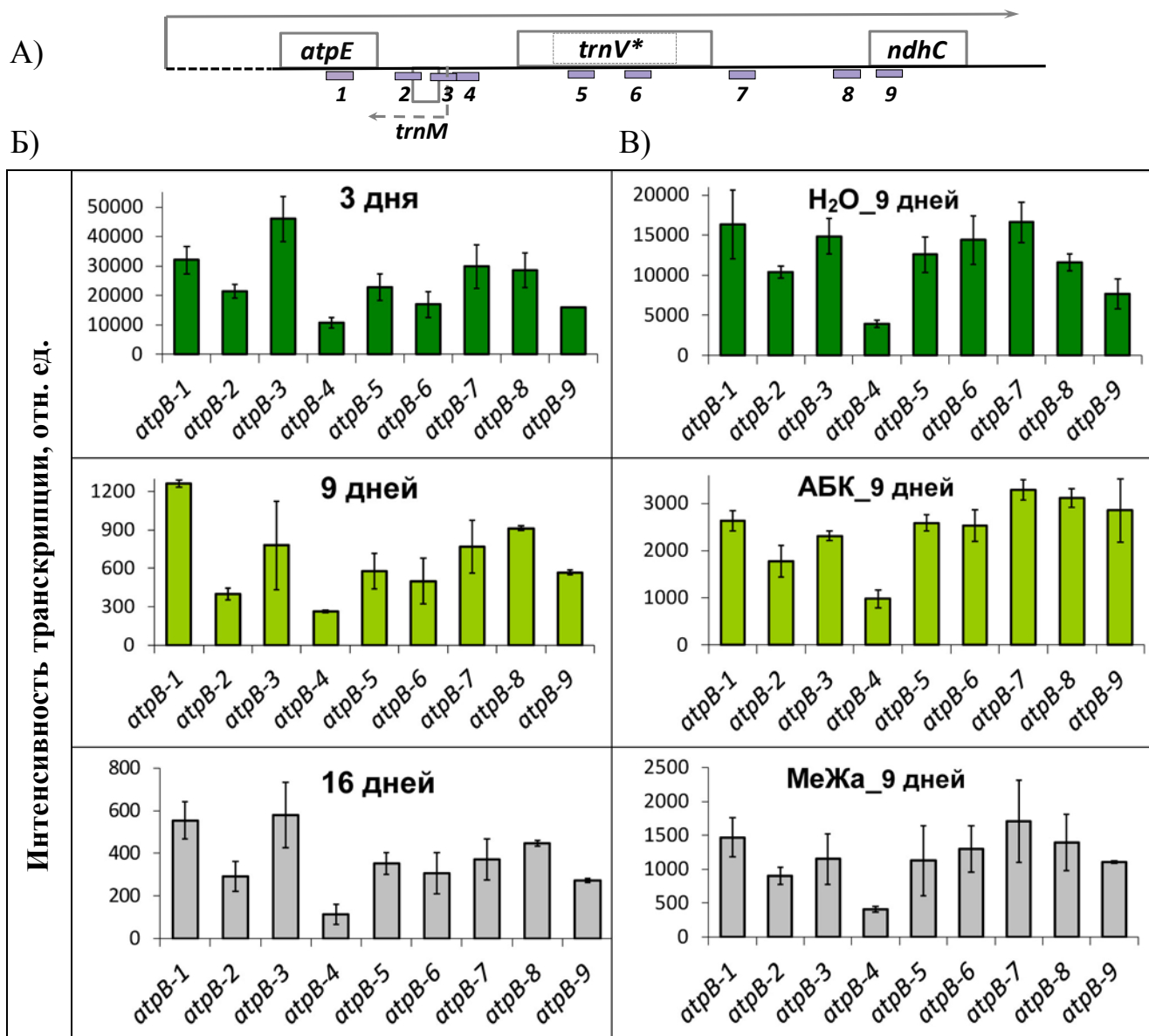
Равномерная транскрипция генов *rpoB* оперона была показана также в хлоропластах из апикальной и базальной частей листа из зеленых и белых растений

ячменя *albostrians*. Обработка апикальной части листа в течение 24 часов при постоянном освещении (270 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) растворами – АБК ($7.6 \times 10^{-5} \text{ М}$) или МеЖа (10^{-4} М) не изменяла характер транскрипции. Равномерный синтез РНК *in vitro* всех генов наблюдался также в ходе реакции транскрипции через 15, 30, 120 и 600 сек. Полученные данные говорят о высокой консервативности транскрипции генов *rpoB* оперона и, возможно, других оперонов, гены которых кодируют функционально близкие белки.

Более сложное строение имеет *atpB* оперон (*atpB-atpE-trnV-intr-ndhC-ndhK-ndhJ*), для которого были подобраны праймеры для девяти проб, выровненных по размеру и ГЦ - составу (табл. 1 и рис. 2А). Эти пробы охватывали зону «перепада» транскрипции: первая проба приходилась на *atpE* ген, вторая, третья и четвертая - на межгенный спейсер *atpE-trnV* генов, пятая и шестая - на интрон *trnV* гена, седьмая и восьмая - на межгенный спейсер *trnV-ndhC* генов, а девятая - на *ndhC* ген (рис.2А).

Из результатов, которые были получены на хлоропластах, выделенных из верхнего сегмента первого листа ячменя разного возраста (рис. 2Б), можно заключить, что интенсивность транскрипции с возрастом значительно снижалась, однако не было значимых различий в профиле транскрипции генов этого оперона. В отличие от *rpoB* оперона, профиль транскрипции генов *atpB* оперона имеет «перепады». Интенсивность транскрипции при использовании проб, которые приходятся на межгенный спейсер (*atpB-2* и *atpB-4*), была ниже, чем транскрипция белок-кодирующей последовательности *atpE* гена (*atpB-1*), однако при применении *atpB-3* пробы интенсивность транскрипции имела более высокое значение. Для этого региона можно было ожидать увеличение интенсивности транскрипции за счет ее инициации перед *trnV* геном (Zhelyazkova et al., 2012), однако в этом случае изменение в профиле транскрипции могло бы происходить только начиная с четвертой пробы. Другая возможная причина может заключаться в инициации транскрипции *trnM* гена, который располагается между *atpE* и *trnV* генами, но на комплементарной нити ДНК (Kanno and Hirai, 1993). У зеленых растений транскрипция *trnM* гена активно иницируется с двух промоторов и идет в противоположном направлении по отношению к транскрипции *atpB* оперона: промотор *TtrnM-32* располагается в конце *atpB-3* пробы, *TtrnM-582* – между пробами *atpB-5* и *atpB-6* (Zhelyazkova et al., 2012).

Рис. 2. Влияние возраста растений и фитогормонов на интенсивность транскрипции генов *atpB* оперона. А) Схема *atpB* оперона. Гены изображены прямоугольниками. Серая штриховка внутри прямоугольника - расположение интрона. Фиолетовыми прямоугольниками изображены 100-нуклеотидные пробы, используемые в *gun-on* эксперименте. Пробы подписаны цифрами 1-9. Б) и В) Гистограммы интенсивности транскрипции для проб *atpE*, *trnV-intr*, *ndhC* генов. Внизу гистограмм - подписи проб, вверху – возраст используемых растений - Б или вариант обработки - В, где H₂O – контроль, АБК и МеЖа.



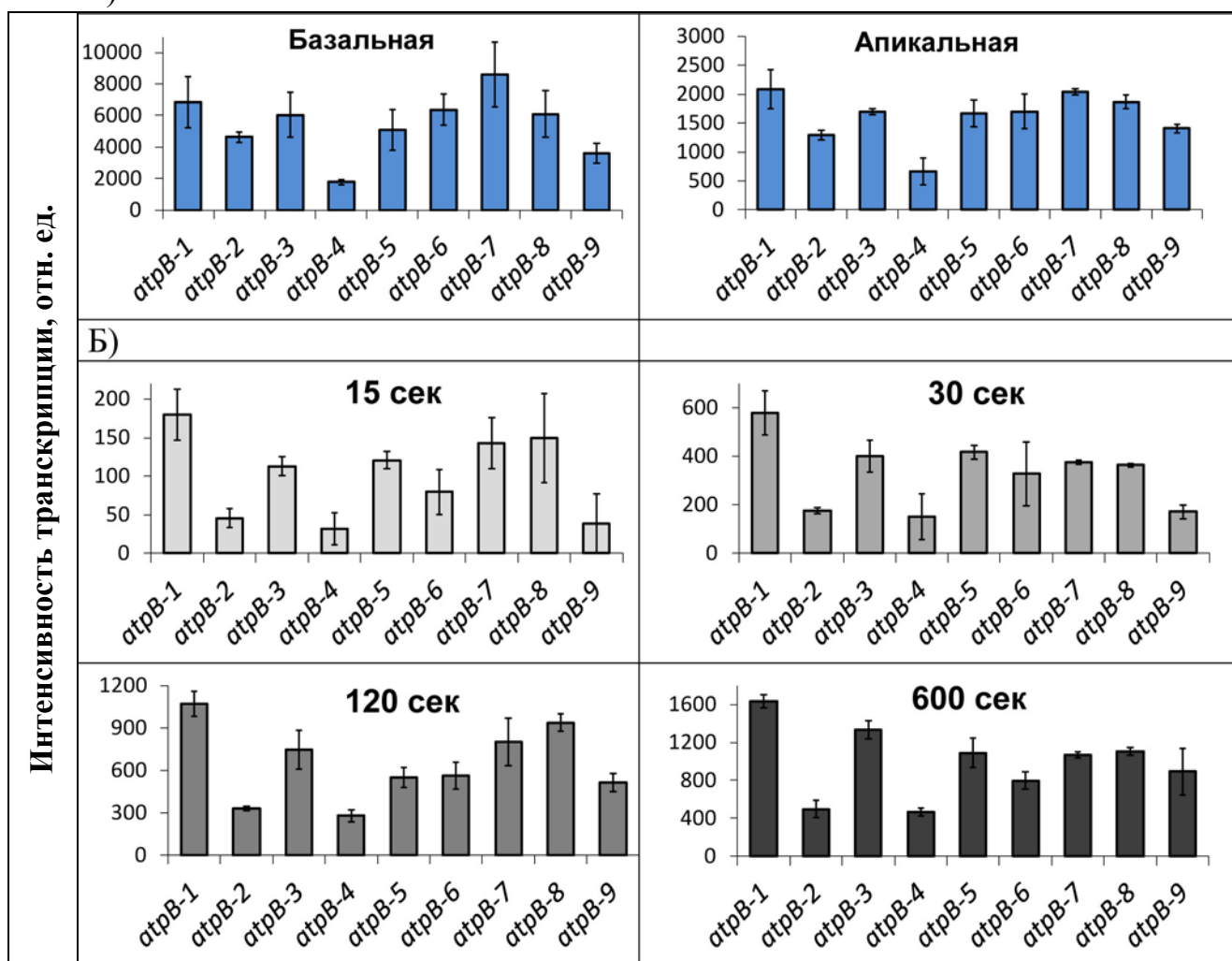
В ходе *gun-on* транскрипции мы детектируем уровень транскрипции, который складывается как из смысловой, так и из антисмысловой транскрипции, предполагая, что антисмысловая транскрипция не вносит существенного вклада. В этом случае, использование двухцепочечных фрагментов ДНК в качестве зондов для гибридизации с меченой в ходе *in vitro* транскрипции РНК, привело, вероятно, к тому, что инициация транскрипции с *TrnM-32* промотора стала причиной резкого увеличения

интенсивности транскрипции при использовании одной из проб, расположенных в межгенном спейсере *atpE-trnV* генов.

При инкубации листьев 9-дневного ячменя в течение 24 часов при постоянном освещении на растворах АБК (7.6×10^{-5} М) и МеЖа (10^{-4} М) интенсивность транскрипции генов *atpB* оперона снижалась (рис. 2Б), однако профиль интенсивности транскрипции генов оперона практически не менялся.

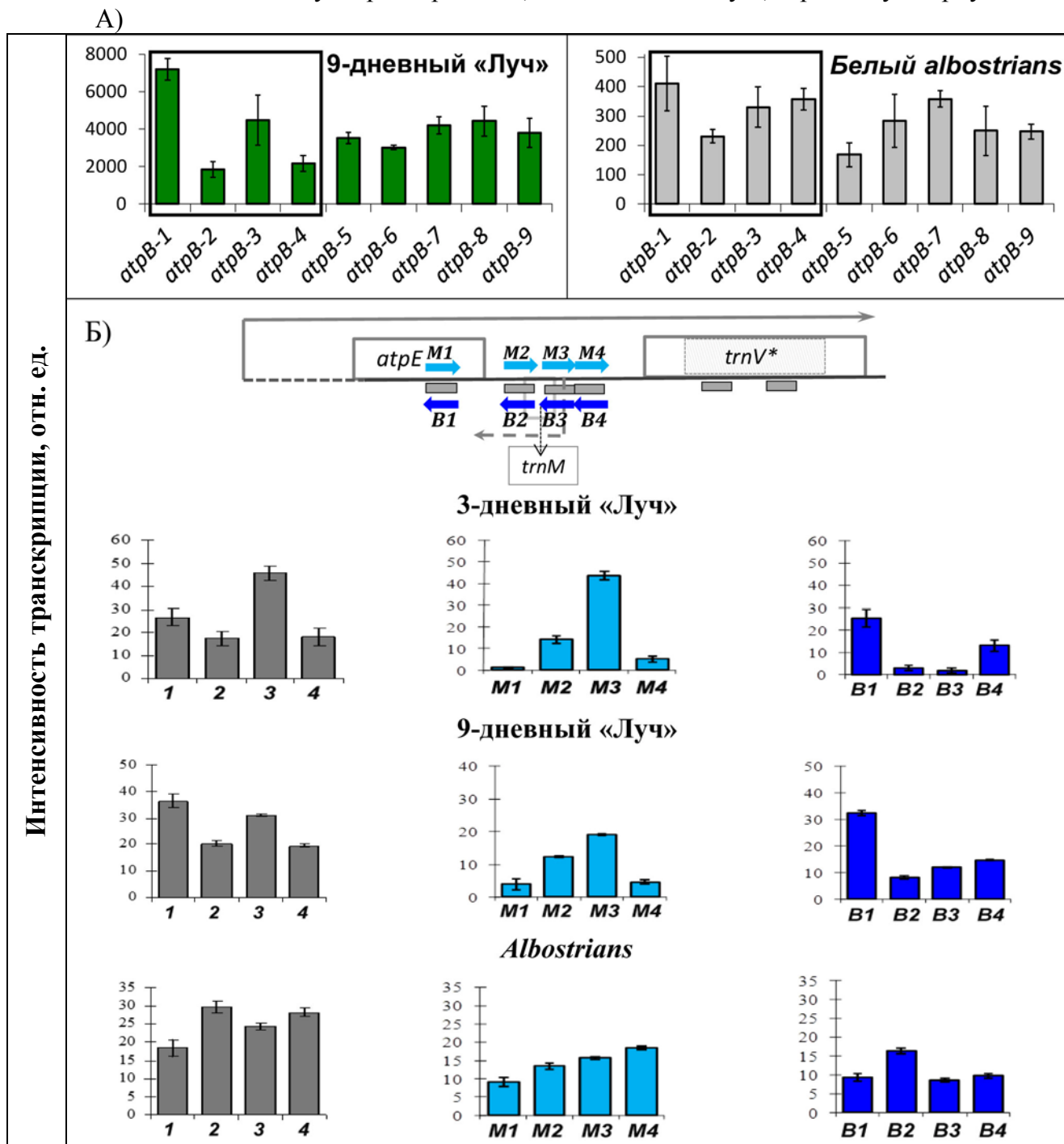
Рис. 3. Гистограммы значений интенсивности транскрипции генов *atpB* оперона в базальной и апикальной частях первого листа ячменя (вверху) и под влиянием разного времени синтеза РНК *in vitro* (внизу). Базальная часть – 2 см от основания листа, апикальная – 2 см от верхушки листа; 15, 30, 120, 600 секунд – время синтеза РНК. Расположение проб показано на рис. 2А.

А)



Сходные результаты получены при использовании в *gun-on* экспериментах апикальной и базальной частей листа ячменя – (рис. 3А). Из этих данных видно, что в базальной части листа интенсивность транскрипции генов этого оперона выше, чем в апикальной, однако профиль интенсивности транскрипции генов *atpB* оперона в разных частях листа практически не изменялся.

Рис. 4. А) Гистограммы значений интенсивности транскрипции генов *atpB* оперона у зеленых растений ячменя сорта «Луч» и белых растений мутанта ячменя *albostrians*. Подписи: «ЛУЧ» – листья зеленых 3- или 9-дневных растений ячменя сорта Луч; «Белый *albostrians*» – листья полностью белых 5- дневных растений *albostrians*. Схема расположения проб на мембране см. рис. 2А. Б) Антисмысловая транскрипция изучаемого участка *atpB* оперона. Вверху – схема *atpB* оперона и расположения на нем одноцепочечных гибридационных проб РНК. Гены изображены прямоугольниками. Серые прямоугольники - гибридационные пробы ДНК, используемые в run-on эксперименте. Голубыми стрелками показаны одноцепочечные пробы РНК комплементарные антисмысловым транскриптам, синими – РНК пробы комплементарные смысловым транскриптам. Внизу – гистограммы значений интенсивности транскрипции для одноцепочечных проб РНК: голубые гистограммы показывают антисмысловую транскрипцию, синие – смысловую, серые – суммарную.



В отличие от зеленых растений, в пластидах белых листьев мутанта ячменя *albostrians* профиль транскрипции изучаемого участка *atpB* оперона изменялся, а интенсивность транскрипции генов была ниже практически на порядок. Нужно отметить, что у белых растений, где транскрипцию ведет исключительно РНК-полимераза ядерного кодирования, происходит инициация транскрипции перед *atpB* геном (TatpB-593; Swiatecha-Hadenbruch et al., 2007; Zhelyazkova et al., 2012), а также перед другими генами этого оперона, с промоторов не характерных для зеленых растений (TtrnV-111; TndhC-249; TndhC-639; TndhC-329).

Единственным в этом опероне общим для белых и зеленых растений является промотор перед *ndhC* геном (TndhC-336). Однако интенсивность транскрипции с этих промоторов, как показали Zhelyazkova с соавторами (2012) и как можно заключить из наших данных, гораздо ниже, чем с промоторов тех же генов в зеленых растениях и, вероятно, несмотря на наличие NEP-зависимых промоторов (например, перед *ndhC* геном), РЕР – основной фермент, транскрибирующий этот оперон в зеленых растениях разных возрастов. Однако, как видно из наших данных, NEP транскрибирует этот оперон не только слабее, но и качественно иначе (рис. 4А). Профиль интенсивности транскрипции изучаемого участка *atpB* стал более равномерным, увеличение интенсивности транскрипции при использовании *atpB-3* пробы на межгенный спейсер, характерное для зеленых растений, «сгладилось» (рис. 4А), что согласуется с отсутствием инициации транскрипции *trnM* гена у белых растений в этом регионе.

На основании эксперимента (рис. 3Б) по изучению времени синтеза РНК на интенсивность транскрипции генов *atpB* оперона можно заключить, что типичный профиль интенсивности транскрипции его генов наблюдался уже после 15 секунд синтеза. Таким образом, сокращение времени синтеза не повлияло на профиль транскрипции *atpE-trnVintr-ndhC* генов.

Такая же серия экспериментов была проведена для *rps2* и *psaA* оперонов.

При изучении интенсивности транскрипции *rps2-atpI-atpH-atpF-atpA* оперона между *atpI-H-F-A* генами наблюдался «перепад» интенсивности транскрипции, который приходится на начало *atpF* гена. Возраст растений и время синтеза меченой РНК в реакции транскрипции *in vitro* не оказывали значимого влияния на профиль

транскрипции *atpI-H-F-A* генов, однако под действием экзогенных гормонов, а также у белых растений мутанта *albostrians* различия «сглаживались».

Другим очень важным опероном является *rrn* оперон, который включает гены всех рибосомных РНК – 16S, 23S, 4,5S и 5S. Кроме того, он содержит гены трех тРНК – *rrn16/tRNA^{Ile}/tRNA^{Ala}/rrn23/rrn4,5S/rrn5S/trn^{Arg}* (рис. 5А). У разных систематических групп наземных растений нуклеотидные последовательности генов рРНК чрезвычайно консервативны, что делает его особенно интересным для изучения.

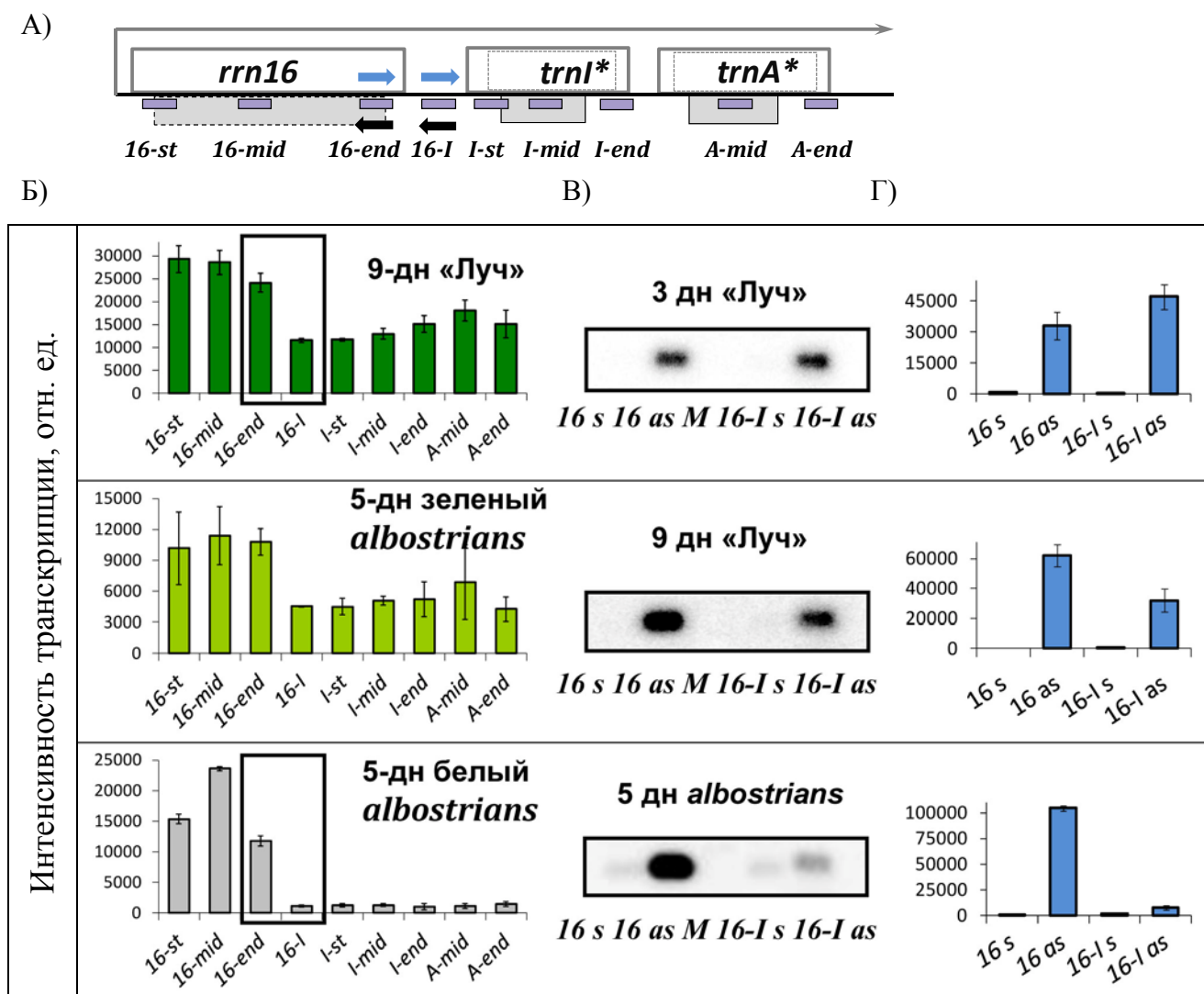
При изучении интенсивности транскрипции генов *rrn* оперона было показано, что скорость транскрипции генов различается для растений разного возраста (данные не приведены, поскольку профиль транскрипции генов сходен). На рис. 5Б представлены результаты для 9-дневных растений. Важно отметить, что интенсивность транскрипции *rrn16* гена, определенная с помощью трех независимых гибридизационных проб к разным участкам гена, дала близкие результаты, что говорит о корректности применяемого метода анализа. 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^{Ile}* генов.

Для того чтобы понять возможную причину изменения скорости транскрипции генов внутри *rrn* оперона, была изучена интенсивность транскрипции генов этого оперона у мутантных растений ячменя *albostrians*, что позволяет судить о влиянии на транскрипцию генов пластидных оперонов отсутствие пластидной мультисубъединичной РНК-полимеразы.

Как показывают результаты рис. 5Б, отсутствие РНК-полимеразы бактериального типа оказало существенное влияние на скорость транскрипции генов *rrn* оперона. Наблюдаемое падение скорости транскрипции после *rrn16* гена у 9-и 16-дневных зеленых растений, еще более сильно было выражено для 5-дневных растений *albostrians*. Нужно отметить, что в белых растениях мутанта, как предполагают на основе дифференциального секвенирования РНК (Zhelyazkova et al., 2012), транскрипция этого оперона инициируется с промотора, расположенного перед *rrn16* геном (*Trrn16-13*), однако инициация транскрипции с этого промотора более,

чем в три раза ниже, чем с РЕР-зависимого промотора в зеленых растениях (*Trn16-116*).

Рис. 5. Интенсивность транскрипции генов *rrn16* оперона у зеленых растений ячменя сорта «Луч», зеленых и белых растений мутанта ячменя *albostrians* и антисмысловая транскрипция участка этого оперона. Подписи как на рис. 4. А) Схема *rrn16* оперона. Обозначения как на рис. 2. Голубыми стрелками показаны одноцепочечные РНК пробы комплементарные смысловым транскриптам (*16_as* и *16-I_as*), черными – РНК пробы комплементарные антисмысловым транскриптам (*16_s* и *16-I_s*). Б) Гистограммы значений транскрипции генов *rrn16* оперона у зеленых растений ячменя сорта «Луч», зеленых и белых растений мутанта *albostrians*. В) Радиоавтограф результатов одного из серии экспериментов и Г) Гистограммы значений интенсивности транскрипции при использовании одноцепочечных проб РНК. Внизу гистограмм и радиоавтографов - подписи проб, вверху – вариант пластидной РНК используемой для гибридизации.



Так как транскрипция *in vitro* этого не показывает, то можно предположить, что кроме инициации, на результаты, полученные в ходе реакции run-on транскрипции, оказывает влияние стабильность *rrn16* транскрипта. Предполагается, что в отличие от *trn* генов, гены рРНК стабилизируются за счет взаимодействия с белками в ходе

формирования рибосом (Hess et al., 1993). Для мутанта *albostrians*, пластиды которого не имеют рибосом (Siemenroth et al., 1981; Hess et al., 1992), было показано отсутствие накопления *rrn16* транскрипта (Hess et al., 1992). Однако в работе Siemenroth с соавторами (1981) было показано накопление рРНК, и предполагалось на основании этого, что причиной белого фенотипа мутанта растений *albostrians* было отсутствие рибосомных белков и нарушение процессинга. У белых растений ячменя наблюдается довольно высокая интенсивность транскрипции *rrn16* гена (Hess et al., 1993).

Мы предполагаем, что стабильность *rrn16* транскрипта обеспечивается не только за счет взаимодействия с рибосомными белками, но, возможно также, за счет вторичной структуры, которую образует последовательность *rrn16* гена, как было показано для кукурузы и табака (Zwieb et al., 1981; Strittmatter et al., 1985).

Увеличение в белых растениях «перепада», который наблюдается после *rrn16* гена, можно объяснить отсутствием в его кодирующей области инициации транскрипции с промотора нижерасположенного *trnI* гена (*TtrnI*-608) (Zhelyazkova et al., 2012). Такое предположение, однако, не дает ответа на вопрос, почему транскрипция после *rrn16* гена терминируется, а транскрипция с *TtrnI*-608 промотора продолжается.

Таким образом, несмотря на стабильную структуру этого оперона, в профиле его интенсивности транскрипции наблюдались «перепады»: интенсивность транскрипции при применении проб на кодирующую область *rrn16* гена была выше, чем у ниже расположенных проб, что было показано для листьев ячменя разного возраста, для разных частей листа и для разного времени синтеза РНК в реакции run-on транскрипции. Причем, этот перепад усиливался в отсутствие полимеразы хлоропластного кодирования, некоторых ядерных рибосомных белков и, возможно, из-за нарушения процессинга у белого мутанта *albostrians*.

Изучение роли антисмысловой транскрипции. Чтобы выяснить влияние антисмысловой транскрипции на интенсивность транскрипции в межгенном смейсере *atpE-trnV* генов, которое детектируется двухцепочечными пробами ДНК в ходе run-on транскрипции, при помощи РНК-полимеразы фага T7 были синтезированы и фракционированы в условиях денатурирующего электрофореза новые одноцепочечные пробы. После электрофореза пробы были перенесены на нейлоновую мембрану и гибридизованы с продуктами run-on реакций, проведенными

в лизате хлоропластов листьев 3- и 9-дневных зеленых растений и в лизате пластид белых растений *albostrians* (рис. 4Б). На основании полученных данных можно заключить, что увеличение интенсивности транскрипции у зеленых растений для третьей пробы (*atpB-3*), складывалось из смысловой (одноцепочечная проба *B3*) и из антисмысловой (одноцепочечная проба *M3*) транскрипции, причем, вклад антисмысловой транскрипции был более значительным. Этот результат согласуется с инициацией транскрипции на комплементарной нити *trnM* гена, с промотора, который располагается на участке комплементарном третьей пробе. Однако, профиль интенсивности транскрипции этого участка, полученный с помощью одноцепочечных проб у зеленых растений разного возраста, не был равномерным.

Таким образом, анализируя полученные данные, можно заключить, что те участки, где в зеленых растениях активно идет антисмысловая транскрипция, имеют более низкую смысловую транскрипцию. Это позволяет предположить, что антисмысловая транскрипция может регулировать транскрипцию смысловых транскриптов. Такое предположение уже высказывалось ранее (Nishimura et al., 2004; Hegeman et al., 2005; Hotto et al., 2010; Georg et al., 2010; Zghidi-Abouzid et al., 2011), однако до настоящего времени показать участие тРНК, локализованной на антисмысловой нити, в такой регуляции экспериментально не удалось.

У пластид из белых листьев мутанта *albostrians*, где инициация *trnM* транскрипции, как предполагается (Zhelyazkova et al., 2012), приходится на другой участок - комплементарный *ndhC* гену (*TtrnM-1754*), как смысловая, так и антисмысловая транскрипция имеют низкие показатели транскрипции, однако интенсивность транскрипции используемых проб достаточно равномерна. Это согласуется, как с данными run-on экспериментов, так и с отсутствием на комплементарной нити изучаемого участка сайтов инициации транскрипции.

Для *rrn16* оперона на основании дифференциального секвенирования РНК было также предположено существование антисмысловой транскрипции за счет инициации транскрипции расположенного на комплементарной нити *rps12* гена в зеленых растениях - с *Trps12-4898*, что соответствует началу интрона *trnA* гена, в белых растениях - с *Trps12-2002*, что соответствует межгенной области *trnV-rrn16* генов в 12 н.п. от старта инициации транскрипции *rrn16* гена (*Trrn16-13*). Чтобы оценить, какой вклад антисмысловая транскрипция вносит в изменение профиля транскрипции *rrn16*

оперона, были синтезированы новые одноцепочечные РНК пробы, которые в точности соответствовали положению двухцепочечных проб (рис. 5А). Пробы после электрофоретического разделения были перенесены на нейлоновую мембрану и гибридизованы, как и ранее, с продуктами *gun-on* реакций (рис. 5В, Г.).

На основании приведенных данных можно заключить, что антисмысловая транскрипция не вносит существенного вклада в интенсивность транскрипции проб, которые приходились на конец *rrn16* гена и межгенный спейсер *rrn16-trnI*. Кроме того, результаты экспериментов с одноцепочечными пробами РНК согласуются с данными, которые были получены с помощью двухцепочечных проб ДНК: у растений *albostrians* интенсивность транскрипции пробы на ген *rrn16* было значительно выше, чем у пробы на межгенный спейсер. У зеленых растений также наблюдалось падение интенсивности транскрипции, но только у 9-дневных растений. У трехдневных зеленых растений не было «перепада» между смысловыми транскриптами по результатам гибридизации с одноцепочечными пробами, в то время как при гибридизации с ДНК пробами наблюдалось небольшое падение интенсивности транскрипции между концом *rrn* гена и межгенной областью.

Применение метода «защиты от РНКаз» для выяснения роли антисмысловой транскрипции и изучения процесса созревания транскриптов генов хлоропластных оперонов. Для изучения влияния антисмысловой транскрипции *trnM* гена на транскрипцию *atpE* гена, расположенного на комплементарной нити ДНК, были синтезированы *as* (antisense - антисмысловые) меченые зонды, комплементарные 3'-концу *atpE* гена (как показано на рис. 6А) и гибридизованы с пластидной РНК 3- и 9-дневных зеленых растений и 5-дневных белых растений *albostrians*. После гибридизации некомплементарные участки были подвержены нуклеазной деградации, а комплементарные нанесены на денатурирующий электрофорез, радиоавтограф которого приведен на рис. 6Б.

Результаты показывают, что первая и вторая пробы, которые были комплементарны концу кодирующей области *atpE* гена, по нашим предположениям, должны были содержать фрагменты 204 и 100 н.п., соответственно. Эти фрагменты соответствовали бы зрелому 3' концу транскрипта *atpE* гена. Ни в зеленых, ни в белых растениях не было фрагментов такого размера, однако для второй пробы был обнаружен фрагмент размеров около 210 н.п., который соответствовал 3'-концу кодирующей области *trnM*

гена, расположенного на комплементарной нити. У белых растений, как полных защит (т.е. когда вся меченая проба РНК была защищена в ходе гибридизации хлоропластными транскриптами и не была разрушена при нуклеазной обработке), которые были, вероятно, результатом гибридизации с оперонным транскриптом, так и более коротких форм было гораздо меньше, что согласуется с меньшей интенсивностью транскрипции, которая была обнаружена в ходе гуп-оп экспериментов. Кроме того, первая проба содержала более короткую (на 15-20 н.п.) форму, которая, вероятно, соответствовала 3' нетранслируемой области *atpE*-мРНК. Эта форма была характерна только для мутанта *albostrians*, который, как уже говорилось, имеет дефекты процессинга, и, как отмечалось ранее (Hess et al., 1993), может накапливать промежуточные продукты процессинга в довольно большом количестве.

Для того чтобы выяснить, с чем связано падение интенсивности транскрипции после *rrn16* гена, которое было показано как с помощью двухцепочечных проб ДНК, так и с помощью одноцепочечных проб РНК, был использован также метод защиты от рибонуклеаз.

На основании полученного радиоавтографа и схемы предполагаемого созревания транскриптов изучаемого участка оперона можно заключить, что в белых растениях ячменя нет зрелых *rrn16* транскриптов, так как первая, вторая и третья меченые ³²P-РНК (на рис. 7 обозначены 1, 2, 3) не дают никаких дополнительных полос, кроме полной защиты.

Четвертая антисмысловая РНК, комплементарная смысловому транскрипту, который приходится на начало *trnI* гена и захватывает восемь нуклеотидов от его интрона, имеет у белых растений кроме полной защиты еще и дополнительные полосы, которые соответствуют началу *trnI* гена (194 н.п.) и первому экзону вместе с интроном (49 н.п.). Как было показано ранее (Vogel et al., 1999), интрон *trnI* гена не подвергается сплайсингу в белых растениях мутанта ячменя *albostrians*, однако нарушен именно этап вырезания интрона, в то время как транскрипт *trnI* гена вырезается из преРНК (Vogel and Hess., 2001). Если сравнивать интенсивность гибридизации, то можно заметить, что эти фрагменты представлены в белых пластидах в разном количестве, что, вероятно, связано с нарушением стабильности не сплайсированной тРНК.

Рис. 6. Изучение транскрипции участка *atpB* оперона с помощью метода защита от РНК-аз. А) Схема *atpB* оперона и расположения меченых одноцепочечных гибридизационных РНК проб. Обозначения как на рис. 2. Темно-фиолетовым показан участок, где 3- и 4- пробы пересекаются на 16 н.п. Черными стрелками показаны одноцепочечные РНК пробы комплементарные смысловым транскриптам, ниже показан размер проб. Цифры рядом со стрелками обозначают пробы, где 1 - *atpB-prot-1*, 2 - *atpB-prot-2*, 3 - *atpB-prot-3*. Тонкие вертикальные штрихи показывают места, где ожидается наличие зрелых концов РНК, толстые линии – где были обнаружены концы. Вертикальная стрелка указывает на вероятное место терминации транскрипции. Обращаем внимание, что *trnM* ген изображен для удобства объяснения и не может детектироваться данными пробами. Б) Радиоавтограф фракционирования устойчивых к РНК-азе фрагментов с применением вертикального электрофореза в полиакриламидном геле. Пробы, как и в части А рис., обозначены цифрами, над дорожками - вариант пластидной РНК используемой для гибридизации. М – маркер 100-500 н.п.

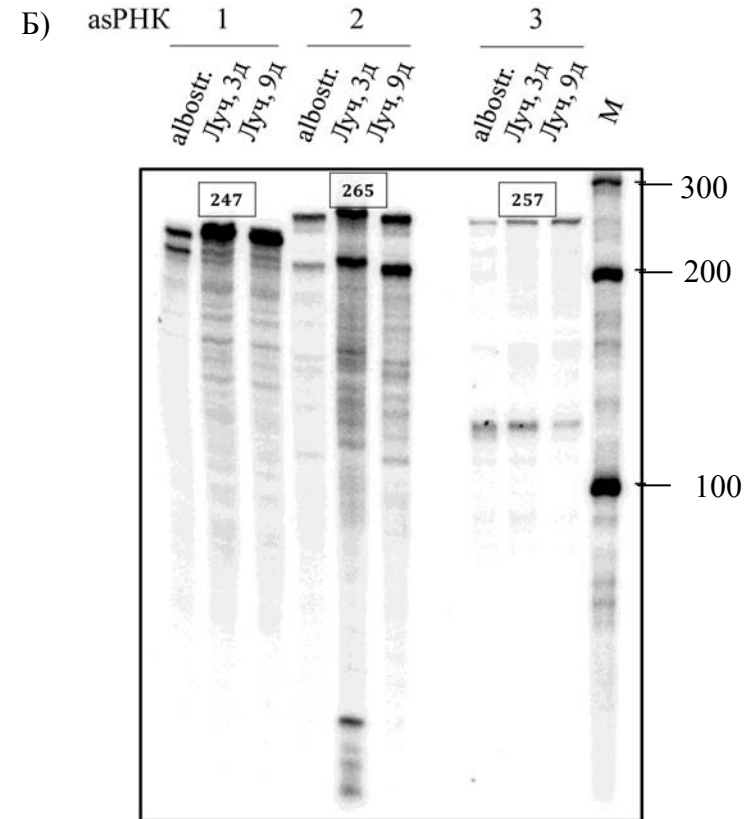
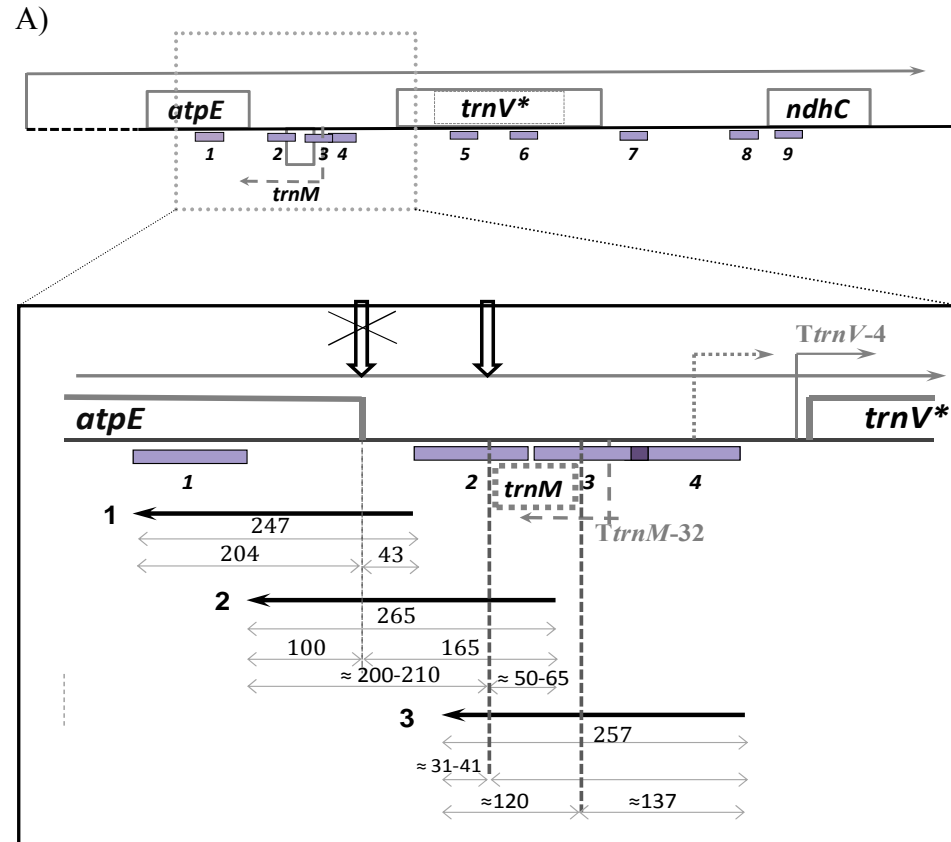
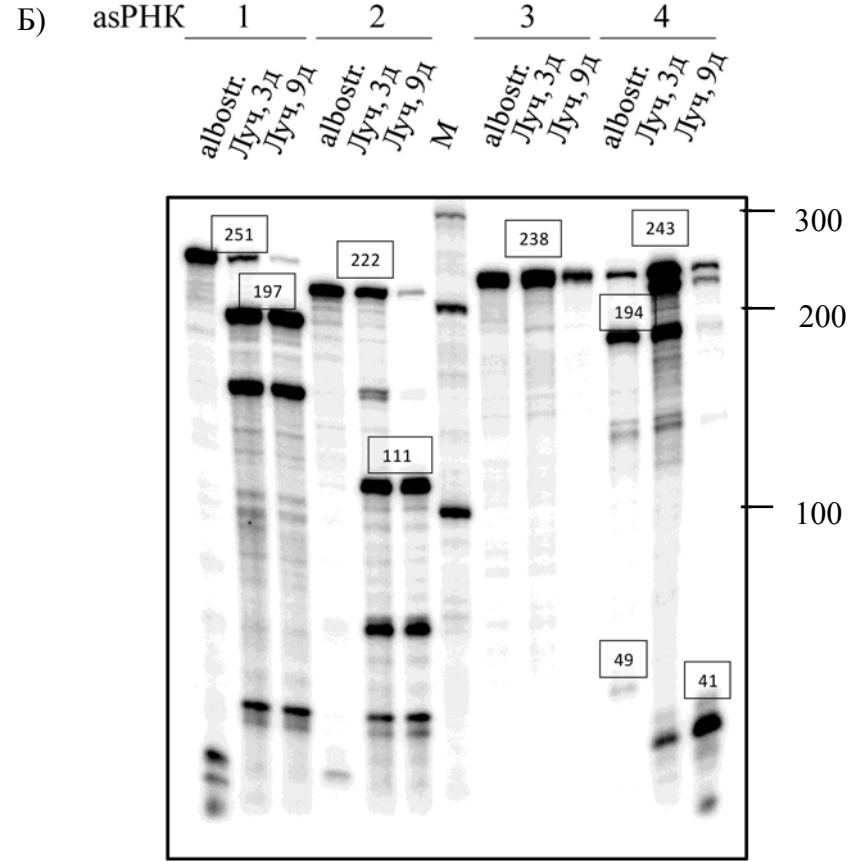
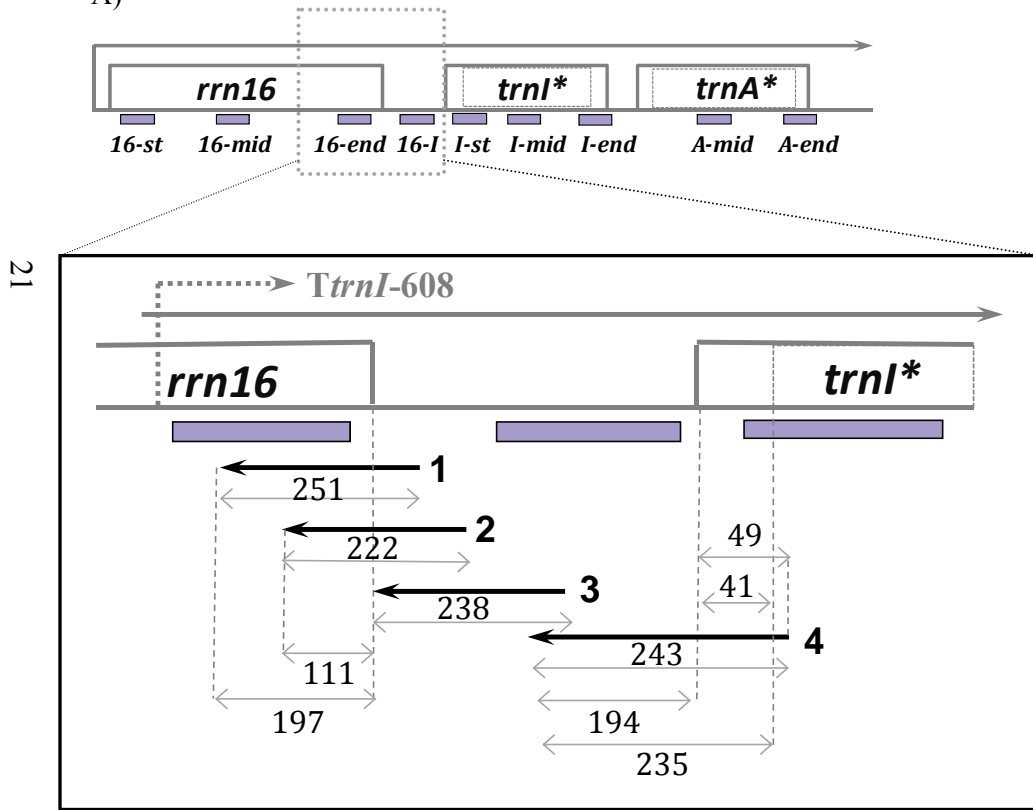


Рис. 7. Изучение транскрипции участка *rrn16* оперона с помощью метода защита от РНК-аз.

А) Схема *rrn16* оперона и расположения меченых одноцепочечных гибридизационных проб РНК. Обозначения как на рис. 2. Черными стрелками показаны одноцепочечные РНК пробы комплементарные смысловым транскриптам, ниже показан размер проб. Цифры рядом со стрелками – обозначают пробы, где 1 – *rrn16-end-1*, 2 – *rrn16-end-2*, 3 – *rrn16-end-3*, 4 – *rrn16-end-4*. Тонкие вертикальные штрихи показывают места, где ожидается наличие зрелых концов РНК. Б) Радиоавтограф фракционирования устойчивых к РНК-азе фрагментов с применением вертикального электрофореза в полиакриламидном геле. Пробы, как и в части А рис., обозначены цифрами, над дорожками - вариант пластидной РНК используемой для гибридизации. М – маркер 100-500 н.п.



Таким образом, на уровне накопления РНК, показано присутствие *rrn16* пре-РНК, которая, однако, не подвергается экзонуклеазной деградации в направлении 3'-5' и не имеет у белых растений зрелых форм, что позволяет говорить о нарушении этапа созревания на уровне деградации 3'-конца синтезируемой пре-РНК.

У 3- и 9- дневных зеленых растений сорта «Луч» картина накопления транскриптов была другой. Первая и вторая пробы, которые защищают конец *rrn16* гена, кроме ожидаемых полос в 197 и 111 н.п., соответственно, которые представляет собой продукт защиты зрелого 3' конца *rrn16* транскрипта, имели еще и дополнительные полосы, которые были примерно на 50 н.п. короче основных. Третий меченый антисмысловый фрагмент РНК давал только полную защиту, также как и в белых растениях, что согласуется с отсутствием каких-либо концов РНК в этом регионе. Четвертая меченая РНК, которая комплементарна началу *trnI* гена и захватывает восемь нуклеотидов его интрона, защищала процессированные (235, 194, 41 н.п.) и полные пре-РНК (243 н.п.). В отличие от белых растений, появлялось два новых фрагмента, которые представляют собой полную защиту, но уже без интрона *trnI* гена (235 н.п.), а также фрагмент *trnI* гена без интрона (41 н.п.). По интенсивности гибридизации можно заключить, что у 3-дневных растений больше молекул пре-РНК (полосы 235 и 194 н.п.), в то время как у 9-дневных растений больше зрелых транскриптов (полоса размером 41 н.п.).

Кроме этого, на уровне накопления РНК у 3- и 9-дневных растений наметилось постепенное снижение количества транскриптов, соответствующих первой, второй и третьей пробам, в то время как накопление транскриптов, комплементарных четвертой пробе для 3-дневных растений было больше, чем у первой пробы (на конец *rrn16* гена), а для 9-дневных растений немного возросло по сравнению с интенсивностью гибридизации третьей пробы, что в целом согласуется с данными полученными в ходе run-on транскрипции с одноцепочечными и двуцепочечными зондами. Не было обнаружено «перепада» накопления транскриптов после *rrn16* гена у белых растений, как это было установлено на уровне интенсивности транскрипции.

Заключение

Долгое время считалось, что регуляция экспрессии индивидуальных генов в хлоропластах осуществляется точно также как в прокариотических

предшественниках, однако со временем стали накапливаться факты, которые не укладывались в такое представление. Вероятно, в процессе ко-эволюции в пластидах растений были сформированы механизмы регуляции экспрессии не свойственные для оперонной системы прокариот – регуляции транскрипции индивидуальных генов в составе пластидных оперонов.

Основным результатом диссертационной работы является установление факта дифференциальной регуляции транскрипции индивидуальных генов в составе оперонов под действием разных факторов.

Такой вывод сделан на основании изучения интенсивности транскрипции генов пластидных оперонов листьев растений разного возраста, базальной и апикальной частей листа, отличающихся различным состоянием хлоропластов, на основании изучения влияния на лист фитогормонов – АБК и МеЖа, а также листьев бесхлорофилльного мутанта ячменя *albostrians*. Построены временные кривые синтеза ^{32}P -РНК в условиях *in vitro*. В работе изучена интенсивность транскрипции генов, входящих в состав 7 оперонов у 4-, 9- и 18-дневных растений ячменя, и было показано, что гены в составе оперонов могут дифференциально транскрибироваться. Проведен детальный анализ интенсивности транскрипции генов 5 оперонов, на основании которого опероны можно условно разделить на две группы (табл. 2).

Табл. 2. Изменение профиля транскрипции генов изучаемых оперонов под действием экзогенных и эндогенных факторов.

Названия оперонов	Изменение профиля интенсивности транскрипции				
	Возраст растений	Апикальная и базальная части листа	Обработка АБК	Время синтеза РНК <i>in vitro</i>	<i>albostrians</i> мутант
<i>rpoB</i>	–	–	–	–	–
<i>psaA</i>	–	–	+	+/-	–
<i>rps2</i>	–	–	+	–	+
<i>atpB</i>	–	–	–	–	+
<i>rrn16</i>	+	–	–	–	+

К первой группе можно отнести *rpoB* оперон, все гены которого кодируют субъединицы РНК-полимеразы бактериального типа, и имеют довольно равномерную интенсивность транскрипции, которая практически не зависит от всех вышеперечисленных факторов. Вторая группа оперонов более разнообразна, как по составу генов, так и по их регуляции. В нее вошли опероны, профиль интенсивности

транскрипции генов которых менялся под действием какого-то одного фактора (например, в листьях бесхлорофилльного мутанта ячменя, *atpB* оперон), или же под действием нескольких факторов (например, в листьях *albostrians* мутанта и под действием – АБК или изменение с возрастом в зеленых растениях (*rps2* и *rrn16* опероны, соответственно).

В литературе есть данные о регуляции транскрипции индивидуальных генов оперонов за счет внутренних промоторов, как например, свет-регулируемого промотора *psbD* гена (*psbK* оперон) (Hoffer and Christopher, 1997). Для нескольких оперонов митохондрий дрожжей показана возможность дифференциальной регуляции генов на уровне транскрипции (Krause and Dieckmann, 2004). На основании дифференциального секвенирования РНК (Zhelyazkova et al., 2012) было показано наличие большого количества как РЕР-, так и NЕР-зависимых промоторов внутри хлоропластных оперонов, которые ранее не были идентифицированы. Многие из них, вероятно, принимают участие в регуляции транскрипции, однако по нашим данным интенсивность транскрипции генов в составе оперонов может не только увеличиваться, но и уменьшаться.

Другой важный результат нашей работы заключается в установлении факта терминации транскрипции *atpB* оперона на участке 3'-нетранслируемой области *atpE* гена, комплементарном кодирующей и промоторной областям *trnM* гена. В литературе обсуждается такая возможность. В хлоропластном геноме тРНК часто располагаются одиночно на комплементарной нити ДНК и транскрибируются в противоположном направлении относительно оперонных транскриптов, например, *trnW* ген относительно *petLG* оперона, *trnS-GGA* относительно *trnT-rps4-ycf3* генов, *trnS-GCU* – *psbK* оперона, *trnH* – *trnI-rpl23-rps11-rpoA*, *trnN* – *rrn16* оперона.

Относительно недавно было высказано предположение, согласно которому инициация транскрипции генов, расположенных на комплементарной нити, может регулировать смысловую транскрипцию генов (Zhelyazkova et al., 2012).

Кроме того, показано, что в белых растениях идет транскрипция и накопление пре-рРНК *rrn16* гена даже в отсутствие рибосом. Однако не происходит созревание этого транскрипта.

Таким образом, детальный анализ интенсивности транскрипции генов в оперонах показывает, что опероны, которые состоят из генов, кодирующих

функционально различные белки или РНК, требуют дополнительной внутри оперонной регуляции транскрипции. Такая регуляция может заключаться, как в увеличении интенсивности транскрипции одного из генов за счет наличия собственного внутри оперонного промотора, так и в уменьшении транскрипции за счет ее терминации. Вероятно, не меньший вклад в регуляцию транскрипции хлоропластных генов в составе оперонов вносит стабилизация их транскриптов. Полученные данные важны для понимания фундаментальных основ регуляции экспрессии пластома. Дальнейшие исследования должны быть направлены на точную локализацию и экспериментальное доказательство наличия внутри пластидных оперонов и регуляторных элементов, участвующих, как в активации, так и в подавлении транскрипции индивидуальных генов, а так же на изучение белковых факторов, отвечающих за регуляцию этих цис-элементов.

ВЫВОДЫ

1. На основании анализа транскрипции 30 генов, входящих в состав 7 пластидных оперонов, установлена дифференциальная регуляция их транскрипции. Показано, что гены *rpoB* оперона, кодирующие субъединицы одного белкового комплекса, транскрибируются равномерно, в то время как гены *rrn16*, *rps2*, *psaA* и *atpB* оперонов, кодирующие функционально не связанные белки или РНК, транскрибируются неравномерно.
2. Возраст растений в большинстве случаев не оказывает существенного влияния на профиль интенсивности транскрипции генов изучаемых оперонов.
3. АБК и МеЖа ингибировали интенсивность транскрипции большинства генов исследованных хлоропластных оперонов. Причем, АБК оказывала дифференциальное влияние на активность РНК-полимераз пластидного и ядерного кодирования, а МеЖа подавлял интенсивность транскрипции генов всех изученных оперонов и не влиял на профиль их интенсивности транскрипции.
4. Получены новые факты участия антисмысловой транскрипции в регуляции транскрипции генов, локализованных на смысловой нити ДНК. Показана точная локализация терминации транскрипции *atpE* гена *atpB* оперона.
5. Совокупность наших результатов подтверждает гипотезу о том, что пластидные опероны, состоящие из генов, кодирующих функционально различные белки или

РНК, требуют дополнительной внутриоперонной регуляции транскрипции, которая может осуществляться с участием внутриоперонных промоторов, последовательностей ДНК, ослабляющих транскрипцию, а так же с вовлечением специфических РНК-связывающих белков, обладающих высокой РНК-азной активностью.

Список работ по материалам диссертации

1. **Алейникова А.Ю.**, Зубо Я.О., Кузнецов В.В. (2007) Дифференциальная транскрипция генов хлоропластных оперонов ячменя. *Тезисы VI Съезда Общества физиологии растений*, Сыктывкар, с. 173-175
2. **Алейникова А.Ю.**, Зубо Я.О., Кузнецов В.В. (2008) Дифференциальная регуляция уровня транскрипции отдельных генов оперонов растений ячменя разного возраста. *Тезисы докладов международной научной конференции "Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений"*, Екатеринбург, с. 43-44.
3. **Алейникова А.Ю.**, Зубо Я.О., Кузнецов В.В. (2008). Особенности регуляции транскрипции генов в хлоропластных оперонах. *Тезисы докладов «Ломоносов – 2008»*, Москва, с. 1.
4. Зубо Я.О., Лысенко Е.А., **Алейникова А.Ю.**, Кузнецов В.В., Пшибытко Н.Л. (2008) Изменение транскрипционной активности генов пластома ячменя в условиях теплового шока. *Физиология растений*, **55**, с. 323-331.
5. **Алейникова А.Ю.**, Зубо Я.О. (2009) Особенности транскрипции генов в составе оперонов в хлоропластах растений ячменя разных сортов. *Тезисы докладов «Ломоносов – 2009»*, Москва, с. 181-182.
6. Фрадкина А.А., **Алейникова А.Ю.**, Зубо Я.О., Кузнецов В.В. (2009) Детальное изучение интенсивности транскрипции *rrn16* и *psaA* оперонов в хлоропластах ячменя. *Тезисы докладов 62 студенческой научной конференции РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева*, Москва, с. 69-71.
7. **Алейникова А.Ю.**, Зубо Я.О., Кулаева О.Н., Кузнецов В.В. (2009) Изменение уровня транскрипции генов в оперонах хлоропластов растений ячменя. *Тезисы докладов «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях крайнего севера»*, Апатиты, с. 24-26.
8. **Алейникова А.Ю.**, Зубо Я.О., Кузнецов В.В. (2011) Экспрессия генов, входящих в состав оперонов пластома ячменя. *VII съезд Общества физиологов растений России "Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий"*, Нижний Новгород, с. 36-37.
9. **Алейникова А.Ю.**, Зубо Я.О., Кузнецов В.В. (2011) Интенсивность транскрипции генов *atpB* оперона хлоропластов листьев ячменя в зависимости от действия разных факторов. *Вестник Томского государственного университета. Биология*, 3 (15), с. 139-142.
10. **Алейникова А.Ю.**, Кузнецов В.В., Зубо Я.О. (2012) Неравномерная транскрипция генов в оперонах пластома ячменя. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия-агрономия и животноводство*. 1, с. 12-19.
11. **Алейникова А.Ю.**, Зубо Я.О., Кузнецов В.В. Профиль интенсивности транскрипции хлоропластных оперонов в растениях ячменя при воздействии различных факторов. *Тезисы докладов «Ломоносов – 2012»*, Москва, с. 183-184.