

На правах рукописи



ЗАРИПОВА Нелли Раилевна

**Действие избыточных концентраций тяжелых металлов
на экспрессию хлоропластных генов растений ячменя**

03.00.12 – Физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2008

Работа выполнена в лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации и в лаборатории экспрессии генома Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор,
чл.-корр. РАН
Кузнецов Владимир Васильевич

Официальные оппоненты: доктор биол. наук
Юрина Надежда Петровна;
канд. биол. наук, профессор
Семенов Олег Григорьевич

Ведущая организация: Институт биологии
Карельского Научного Центра РАН

Защита состоится «18» ноября 2008 г. в 13 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276 Москва, ул. Ботаническая, 35.
Факс: (495) 977-80-18, e-mail: ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан «09» октября 2008 г.

Ученый секретарь Совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций,
кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Проблема повышенного содержания тяжелых металлов (ТМ) в окружающей среде с каждым годом приобретает все большую актуальность. В настоящее время все возрастающие территории сельскохозяйственных угодий загрязняются тяжелыми металлами и становятся непригодными для выращивания традиционных культур. В связи с этим представляется крайне необходимым проведение исследований, направленных на изучение влияния высоких концентраций ТМ на растения и выяснение механизмов адаптации растений к экстремальным условиям.

Токсическому действию высоких концентраций тяжелых металлов подвержены многие физиологические и биохимические процессы, такие как минеральное питание, водный режим, фотосинтез, дыхание, рост, развитие и другие. Однако, многие вопросы распределения, токсического действия и механизмов ответа клеток на соли ТМ до сих пор остаются мало изученными.

Одним из основных механизмов токсического действия ТМ на растения является их способность замещать ионы других металлов и взаимодействовать с функциональными группами макромолекул. Негативное воздействие ТМ на живой организм также опосредовано повреждающим действием активных форм кислорода (АФК), генерация которых стимулируется ТМ. Действие ТМ носит плеiotропный характер и приводит к нарушению многих физиологических процессов в клетке. Известно, что тяжелые металлы негативно влияют также на функционирование хлоропластов. Токсическое действие на фотосинтетические процессы ТМ оказывают не только за счет нарушения водного статуса и газообмена, но и путем инактивации ключевых ферментов метаболических путей и белков тилакоидных мембран, снижения содержания пигментов.

В ответ на действие стрессора в клетке формируются защитные механизмы, которые могут быть неспецифическими (общими) или специализированными. Например, в ответ на действие ряда повреждающих абиотических факторов, в том числе ТМ, повышается синтез антиоксидантных ферментов и протекторных низкомолекулярных органических соединений. К специфическим механизмам адаптации к высоким концентрациям ТМ относятся синтез фитохелатинов и металлотионеинов, инактивирующих избыток ТМ.

Для понимания фундаментальных основ изменения метаболизма клетки, происходящего в условиях стресса, важный вклад вносит изучение экспрессии генов. Доказано, что в условиях стресса, вызванного избытком ионов ТМ, изменяется экспрессия генома растений, в частности, активируются гены, кодирующие синтез антиоксидантных ферментов, хелаторов. Исследование принципов регуляции и регуляторных факторов экспрессии крайне важно для создания высокопродуктивных стресс-толерантных сортов культурных растений методами генной инженерии.

Процесс транскрипции является важнейшим этапом экспрессии генов, интенсивность которого зачастую определяет уровень индивидуальных мРНК и кодируемых ими клеточных белков.

В последние годы достигнуты значительные успехи в понимании механизмов функционирования транскрипционного аппарата хлоропластов. В частности, установлено, что в пластидах функционируют две РНК-полимеразы – ядерного и пластидного кодирования. Кроме того, идентифицированы ядерные гены для шести сигма-факторов РНК-полимеразы пластидного кодирования. Разработаны биологические модели для изучения экспрессии хлоропластных генов, постепенно стали накапливаться данные о регуляции их транскрипции, например, гормонами и светом. Однако, несмотря на большие успехи в изучении механизмов регуляции транскрипции хлоропластного генома, до настоящего времени никем не была показана регуляция экспрессии пластидных генов тяжелыми металлами. На возможность существования такой регуляции указывали данные об активации транскрипции некоторых ядерных генов ионами кадмия, а также о влиянии этого металла на процесс созревания мРНК. Отсутствие данных по влиянию кадмия, меди и никеля на экспрессию индивидуальных хлоропластных генов и перспективность изучения данного вопроса для понимания механизмов регуляции биогенеза хлоропластов и определили цель нашей работы.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось проведение сравнительной оценки токсического действия ряда ТМ на растения ячменя и выяснение характера изменения экспрессии хлоропластных генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях в условиях действия избыточных концентраций солей кадмия, меди и никеля.

В связи с заявленной целью были поставлены следующие основные задачи:

1. Провести сравнительный анализ устойчивости ячменя к действию солей кадмия, меди и никеля.
2. Оценить эффект тяжелых металлов на рост и биомассу растений ячменя в связи с его особенностями поглощения тяжелых металлов.
3. Изучить воздействие кадмия, меди и никеля на содержание фотосинтетических пигментов у растений ячменя.
4. Исследовать изменение скорости транскрипции хлоропластных генов ячменя, входящие во все известные опероны пластидной ДНК и кодирующие функционально различные белки и РНК, в условиях действия избыточных концентраций солей тяжелых металлов.
5. Изучить влияние избытка солей тяжелых металлов на процессинг мРНК хлоропластных генов ячменя.

Научная новизна и практическая ценность. Исследована регуляция тяжелыми металлами экспрессии 28 функционально различных хлоропластных генов ячменя. Впервые показан факт регуляции тяжелыми металлами хлоропластных генов на уровне транскрипции. Впервые показано влияние кадмия на сплайсинг пре-мРНК пластидных генов. Это вносит существенный вклад в понимание механизмов регуляции биогенеза хлоропластов в условиях стресса, вызванного тяжелыми металлами. Полученные в работе данные имеют существенное значение для выяснения механизмов формирования адаптивных реакций у злаков, что существенно при разработке технологии создания трансгенных растений с повышенной устойчивостью и продуктивностью. Теоретические обобщения и совокупность полученных экспериментальных данных могут использоваться в курсах лекций для студентов биологических факультетов университетов и ВУЗов страны.

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на годовом собрании физиологов растений России и Международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем» (Сыктывкар, 18-24 июня 2007 г.)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 печатные работы.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследований, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Работа изложена на 144 страницах машинописного текста, включая 5 таблиц, 33 рисунка; библиография содержит 317 названий, в т.ч. 277 на иностранных языках.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили на молодых растениях ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Луч. Ячмень выращивали в камере фитотрона при 21°C, 16-часовом освещении (270 мкмоль квантов м⁻²с⁻¹) в водной (рулонной) культуре (7, 14 дней) или чашках Петри (4 дня). В работе использовали соли кадмия (CdCl₂), как чужеродного и высокотоксичного металла для большинства растений, меди (CuCl₂), как микроэлемента, и никеля (NiCl₂), который для ячменя необходим в ультрамалых дозах. Контрольные растения выращивали на дистиллированной воде.

Подсчет проросших зерновок, измерение длины корней и coleoptила проводили на 4-е сутки, по окончании фазы прорастания у контрольных растений. В последующих опытах растения ячменя выращивали в водной (рулонной) культуре в течение 7 дней на

растворах ТМ, измеряли длину и биомассу корней и первого листа, проводили анализ содержания металлов. Содержание пигментов оценивали на 7-е и 14-е сутки экспозиции.

Измерение длины, свежей и сухой биомассы органов растений – первого листа и корней – проводили стандартными методами. Анализ содержания пигментов проводили по методу Шлыка (1977). Эндогенное содержание металлов определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии после озоления в смеси кислот навески воздушно-сухого растительного материала.

Для проведения молекулярно-генетических исследований были использованы биологические материалы, предоставленные Лабораторией экспрессии генома растений ИФР РАН (Москва) – последовательности фрагментов 28 хлоропластных генов ячменя, проклонированные в векторе pUC57A/T (Fermentas) и размноженные в *E. coli*. Хлоропласты выделяли, как описано Зубо и Кузнецов (2008), используя ступенчатый градиент перкола 40/70%. В реакцию *gun-on* брали интактные органеллы, располагающиеся на границе перкола 40/70%, в равных количествах для каждого варианта опыта.

Скорость транскрипции оценивали по результатам реакции *gun-on* (Mullet, Klein, 1987) с использованием радиоактивной метки - α - ^{32}P -УТФ. Температура реакции составляла 25°C, продолжительность 12 минут. После остановки реакции стоп-буфером проводили выделение нуклеиновых кислот, в том числе меченой, синтезированной *in vitro* РНК. После этого вновь синтезированную ^{32}P –РНК гибридизовали в течение 16 ч в специальном буфере при 58°C с фрагментами изучаемых хлоропластных генов, нанесенных на нейлоновую мембрану (Hybond N, Amersham, Англия). После гибридизации мембраны отмывали от неспецифично прогибридизовавшейся РНК, экспонировали с рентгеновской пленкой при -70°C, которую впоследствии сканировали с помощью программы 1 D-Scan. Результаты обсчитывали, используя программу Quantity One (Bio-Rad, США) и выражали в единицах относительной интенсивности транскрипции. Для нанесения на нейлоновую мембрану необходимое количество фрагментов ДНК исследуемых генов получали с помощью полимеразной цепной реакции, с использованием в качестве матриц плазмиды, содержавшие данные фрагменты, и специальные pUC/M13 прямой и обратный праймеры. Плазмидную ДНК выделяли из бактериальной культуры методом щелочного лизиса, описанного ранее Birnboim, Doly (1979).

Для проведения Нозерн-гибридизации выделяли тотальную РНК с помощью триозола. Электрофорез проводили в денатурирующем агарозном геле, взяв по 20 мкг РНК для каждого варианта. После электрофореза РНК переносили из геля на нейлоновые мембраны, которые затем гибридизовали с мечеными зондами (фрагменты генов *rbcL*, *atpB* и *rpl16*) в течение 16 ч при 55°C в специальном буфере. После

гибридизации мембраны экспонировали с рентгеновской пленкой (Amersham Hyperfilm™ MP, Англия) и сканировали и обрабатывали с помощью программ Quantity One software (Bio-Rad, США) и Microsoft Excel. Меченые зонды получали с помощью асимметричной ПЦР с добавлением α -³²P-ЦТФ. Все эксперименты проводили не менее трех раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние солей Cd, Cu и Ni на рост и развитие молодых растений ячменя

Воздействие ТМ на прорастание зерновок ячменя

Зерновки ячменя проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной растворами CdCl₂, CuCl₂ и NiCl₂. На 4-е сутки подсчитывали проросшие зерновки (по окончании фазы прорастания у контрольных растений)

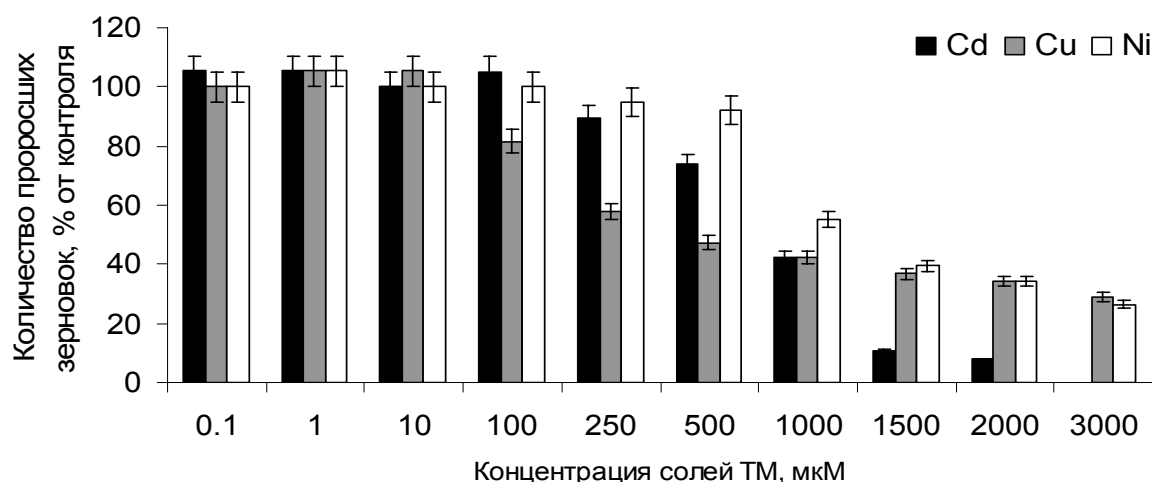


Рисунок 1. Влияние ТМ на прорастание зерновок ячменя.

В результате опытов мы выяснили, что ТМ в самых высоких концентрациях (1000-3000 мкМ) практически полностью подавляли рост корневой системы и в дальнейшем вызывали гибель проростков (рис. 1). В присутствии ионов металлов в концентрациях ниже 100 мкМ на 4-е сутки не было выявлено ни стимулирующего, ни существенного ингибирующего эффекта на развитие coleoptily и корневой системы ячменя. Хлориды Cd, Cu и Ni в концентрациях выше 100 мкМ оказывали ингибирующий эффект на прорастание зерновок, который усиливался с увеличением концентрации металла. Наибольшее токсическое действие на прорастание зерновок ячменя оказали ионы меди, наименьшее - ионы никеля.

Воздействие ТМ на рост и накопление биомассы проростков

Для исследования влияния солей металлов на ростовые процессы были поставлены 2 серии опытов, в которых на растворах хлоридов ТМ проростки выращивали в чашках Петри в течение 4 дней и в рулонной культуре в течение 7 дней.

Полученные данные показали, что все исследуемые ТМ оказывали токсическое действие на рост проростков ячменя, которое усиливалось с возрастанием концентрации металла в растворе. Ингибирование роста корневой системы 4-дневных проростков ячменя ионами кадмия и меди, как видно из данных на рисунке 2, в 1,5-2 раза более интенсивное, чем ионами никеля. Негативное воздействие ионов никеля на рост coleoptila при этом также слабее, чем ионов кадмия и меди, хотя менее выражено. В нелетальных концентрациях ионы никеля являются, вероятно, менее токсичными, чем кадмия и меди, для прорастания зерновок и роста проростков ячменя.

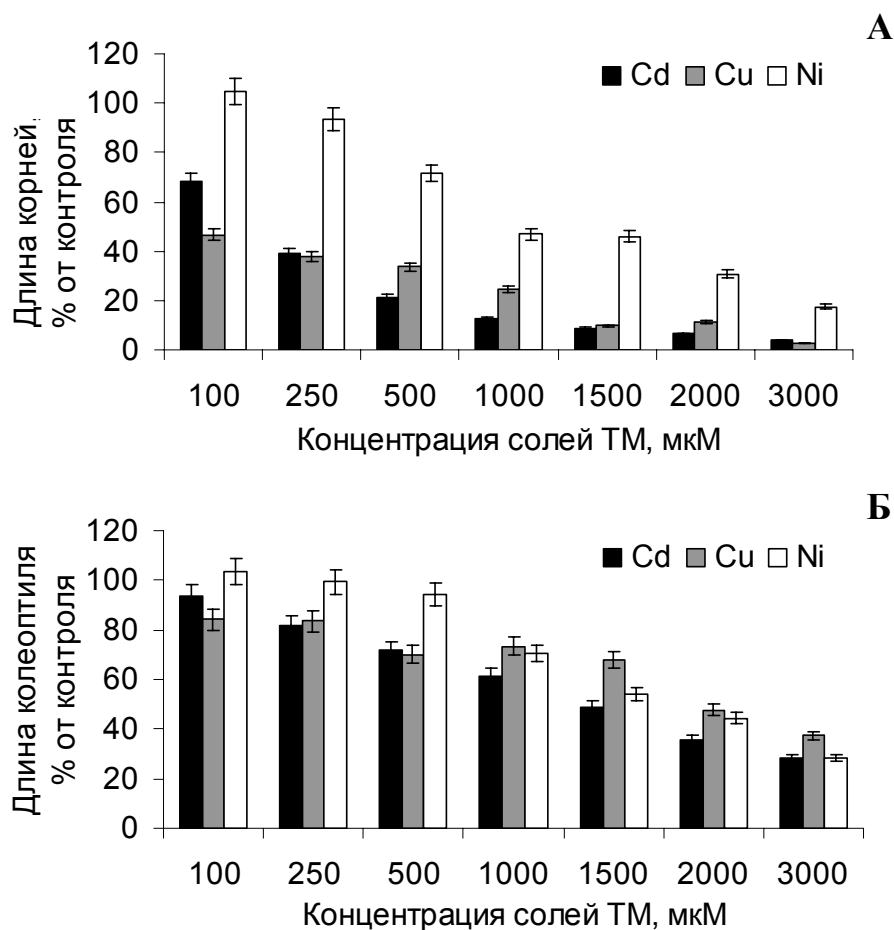


Рисунок 2. Влияние ТМ на рост корней (А) и coleoptila (Б) проростков ячменя, выращенных в чашках Петри, на 4-е сутки экспозиции.

В рулонной культуре зерновки ячменя проращивали на растворах ТМ с диапазоном концентраций 1-800 мкМ в течение 7 дней (рис.3). На 7-е сутки экспозиции наибольшее негативное влияние на рост корней проростков оказали ионы кадмия и меди, хотя степень воздействия ионов никеля заметно усилилась, по сравнению с растениями, выращенными при 4-дневной экспозиции на растворах металлов. Рост первого листа все три металла ингибировали примерно в равной степени.

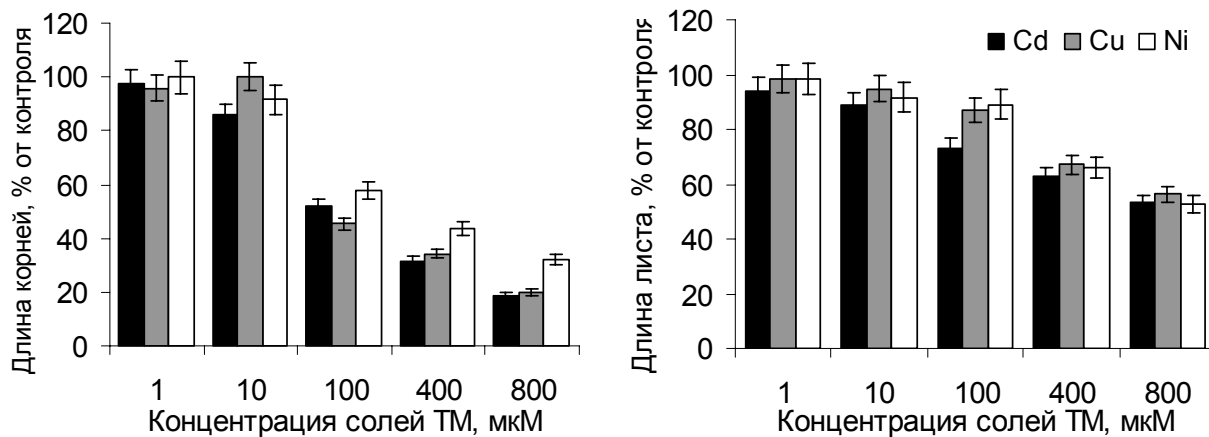


Рисунок 3. Влияние ТМ на рост корней (слева) и листа (справа) проростков ячменя, выращенных в рулонной культуре, на 7-е сутки экспозиции.

Торможение роста корней на 7-е сутки опыта в присутствии всех трех исследуемых ТМ проявилось сильнее, чем листа. Это явление представляется вполне закономерным, поскольку корневая система является первой мишенью для токсического действия ТМ, связывает ионы металла в клетках корней и задерживает их поступление в надземные органы.

Исследуемые металлы на 7-й день опыта оказали ингибирующее воздействие на накопление свежей биомассы проростков ячменя даже в самых низких концентрациях (рис. 4). Это может быть связано не только с нарушением синтеза сухого вещества под влиянием металла, но и со снижением оводненности тканей растения, поскольку при небольших концентрациях металла в растворе относительные показатели сухой биомассы были выше, чем свежей (рис 5). В целом наиболее сильное воздействие на накопление биомассы оказали ионы кадмия. Биомасса корней при действии изученных ТМ ингибируется сильнее, чем биомасса листа.

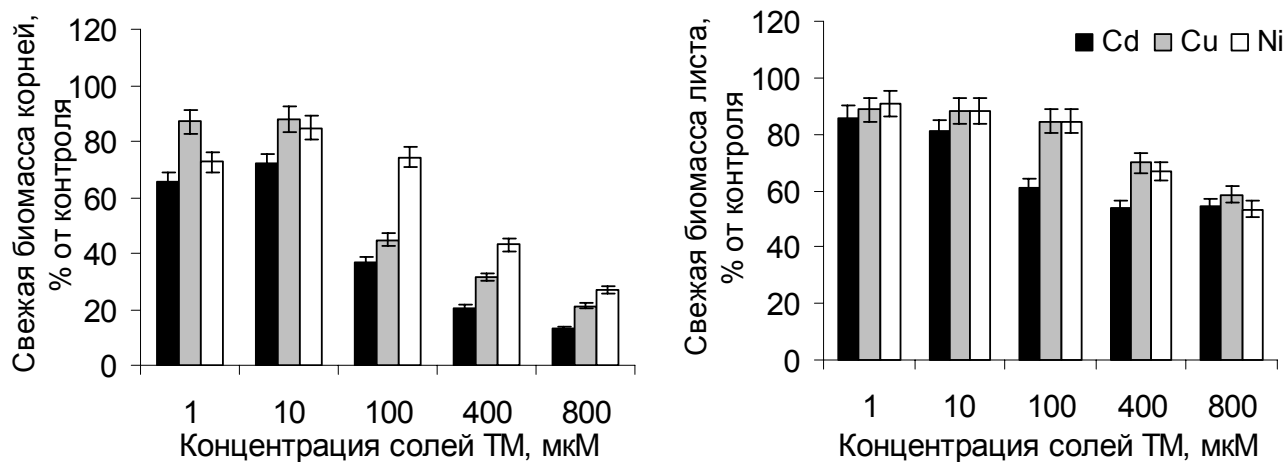


Рисунок 4. Влияние ТМ на накопление свежей биомассы корней (слева) и листа (справа).

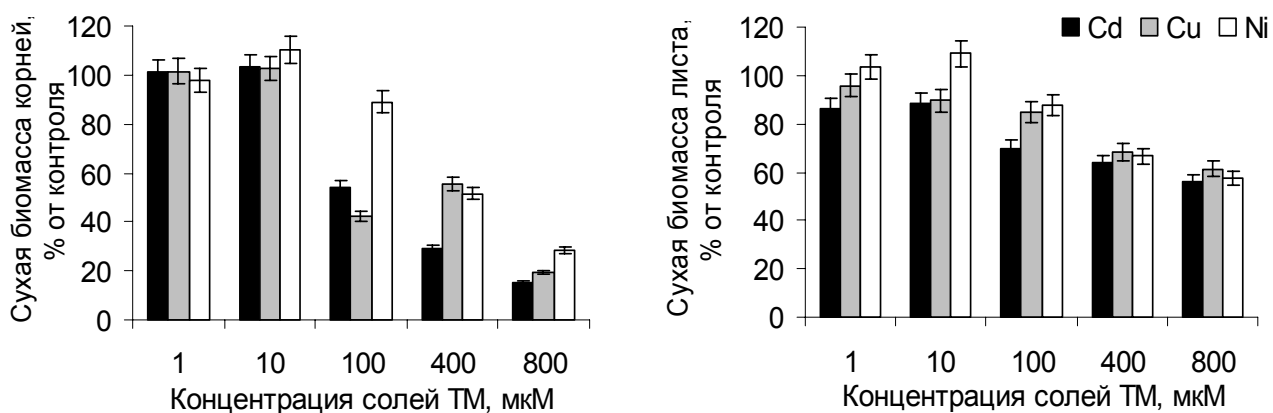


Рисунок 5. Влияние ТМ на накопление сухой биомассы корней (слева) и листа (справа).

Накопление и распределение кадмия, меди и никеля в растении ячменя

Негативное влияние ТМ на рост и развитие растений может напрямую зависеть не только от токсичных свойств металла, но и от общего уровня его содержания и распределения в растении. Для анализа использовали корни и первый лист растений ячменя, выращенных в течение 7 дней на растворах хлоридов металлов в рулонной культуре. Результаты приведены в таблице 1.

Как видно из результатов, представленных в табл. 1, в корнях металла накапливается в 3-7 раз больше, чем в листе. Это явление вполне объяснимо, поскольку ячмень относится к растениям-исключателям, у которых накопление металла происходит преимущественно в корнях, а транспорт ионов в побег задерживается.

В целом увеличение содержания ионов металлов в растениях ячменя повышается непропорционально увеличению концентрации соли металла в растворе.

Таблица 1. Содержание ТМ в корнях и первом листе ячменя на 7-е сутки опыта.

Конц-я соли ТМ, мкМ	Количество металла, мг/кг сухой массы					
	Cd		Cu		Ni	
	листья	корни	листья	корни	листья	корни
Контроль	0± 0,5	0± 0,5	18,8± 1,5	9,4± 2,0	12,1± 4,1	12,1± 4,1
10	19,2± 1,6	19,2± 1,6	20,9± 2,5	70,6± 0,5	112,5± 2,9	112,5± 2,9
100	53,1± 3,1	53,1± 3,1	26,3± 4,8	138,1± 6,7	303,5± 13,5	303,5± 13,5
400	72,4± 12,0	72,4± 12,0	30,1± 1,2	223,9± 30,2	620,9± 24,7	620,9± 24,7
800	130,0± 23,5	130,0± 23,5	45,7± 10,1	611,4± 32,4	790,0± 34,8	790,0± 34,8

Данные анализа, приведенные в табл.1, свидетельствуют о том, что ионы меди менее ионов других металлов проникают в растения ячменя; особенно сильно задерживается их транспорт в побег. Тем не менее, учитывая показатели ингибирования прорастания, роста и накопления биомассы растений ячменя, негативное воздействие меди было сопоставимо с воздействием кадмия. По-видимому, медь, как эссенциальный элемент, обладает очень высокой токсичностью для ячменя в концентрациях, превышающих необходимые.

Из трех исследованных ТМ наибольшую способность к проникновению в корни и далее в побег ячменя проявили ионы никеля. При этом ионы никеля оказывали наименьшее токсическое воздействие, по сравнению с кадмием и медью, на прорастание, рост и накопление биомассы растений. По-видимому, у ячменя нет специфических барьеров, препятствующих транспорту никеля из корневой системы в листья, либо у ячменя эффективно функционируют механизмы детоксикации.

Влияние кадмия, меди и никеля на уровень фотосинтетических пигментов

В хлоропластах может накапливаться от 1 до 9% тяжелых металлов от общего их содержания в листьях (Maksymiec, 1997; Андреева и др., 2001, Patsikka et al., 2002). Однако механизмы повреждающего действия ТМ, которые приводят к снижению фотосинтетической активности, до сих пор окончательно не выяснены. В качестве важного показателя токсического действия ТМ на функционирование хлоропластов использовали уровень содержания хлорофилла а и b в первом листе растений ячменя, выращенных в присутствии хлоридов ТМ в течение 7 и 14 дней.

Полученные результаты показали, что на 7-е сутки экспозиции у растений ячменя не произошло существенного снижения содержания обеих форм хлорофилла в присутствии ионов никеля и меди (степень ингибирования составила не более 10%). Хлорид кадмия в концентрации 400 мкМ снижал содержание хлорофилла примерно на четверть от контроля.

Соотношение форм хлорофилла а к b осталось неизменным при действии всех изученных металлов. Это дает основание полагать, что данные металлы не воздействовали непосредственно на процессы биосинтеза или распада хлорофиллов, а их влияние проявлялось косвенно.

Таблица 2. Влияние ТМ на содержание хлорофиллов а и b (14-е сутки экспозиции).

Металл	Конц-я соли ТМ, мкМ	Хл. а, мкг/г свеж.массы	% от контроля	Хл. b, мкг/г свеж.массы	% от контроля	Соотноше-ние хл. a/b
Контроль	0	960,00	100	453,0	100	2,12
Cd	100	745,9	77,7	367,1	81,0	2,03
	400	420,0	43,7	332,3	73,3	1,26
Cu	100	871,7	90,8	427,1	94,3	2,04
	400	735,9	76,6	341,8	75,4	2,15
Ni	100	814,1	84,8	392,9	86,7	2,07
	400	427,0	44,5	196,5	43,4	2,17

При увеличении продолжительности экспозиции до 14 дней (табл. 2) стало очевидно, что в присутствии ионов меди содержание обеих форм хлорофилла снижалось не более чем на 25%. Возможно, одной из причин этого является ограниченный транспорт меди в побег из корней или затруднено проникновение в хлоропласты. Ионы кадмия и никеля оказали более сильное негативное воздействие. Также очевидно, что в присутствии избытка ионов кадмия снизилось соотношение форм хлорофилла а к b, что свидетельствует или о том, что переход хлорофилла из формы а в форму b ускорился под влиянием металла, или заметно усиливался процесс распада хлорофилла а.

В литературе имеются сведения, что медь (Patsikka et al., 2002), никель (Серегин, Кожевникова, 2006) и кадмий (Stobart et al., 1985) являются сильными ингибиторами биосинтеза хлорофилла. Однако другие исследователи, подобно нам, также не наблюдали существенного воздействия ТМ на пигментный состав листьев молодых растений ячменя (Vassilev et al., 1998).

Влияние кадмия, меди и никеля на транскрипцию и процессинг мРНК хлоропластных генов растений ячменя

Для анализа нами были выбраны гены, отвечающие следующим критериям: принадлежность к функционально различным группам генов пластома; принадлежность к наибольшему числу известных оперонов пластома ячменя; транскрипция генов различными РНК-полимеразами. На основании этих критериев были выбраны 28 генов (табл. 3).

Таблица 3. Некоторые характеристики изучаемых генов пластома.

Название гена	Название продукта гена	Расположение гена на пластомериса (ячменя), н. п.	Размер мРНК, тРНК, рРНК (нукл.)
<i>psaA</i>	P700-апобелок А1 ФСІ	38998-41250 (39628-41880)	2252
<i>psaB</i>	P700-апобелок А2 ФСІ	36768-38972 (37398-39602)	2204
<i>psbA</i>	D1-белок ФСІІ	82-1143 (619-1680)	1061
<i>psbB</i>	P680-апобелок ФСІІ	68799-70325 (69411-70937)	1526
<i>psbD</i>	D2-белок ФСІІ	8900-9961 (9159-10220)	1061
<i>psbE</i>	Цитохром b559	62083-62334 (62671-62922)	251
<i>psbH</i>	Фосфопротеин 10 кДа ФСІІ	70881-71102 (71492-71713)	221
<i>psbK</i>	Белок К ФСІІ	7033-7218 (7267-7452)	185
<i>atpA</i>	α субъединица АТФ-синтазы	34210-35733 (34836-36350)	1523
<i>atpB</i>	β субъединица АТФ-синтазы	51814-53310 (52660-54156)	1496
<i>atpF</i>	Субъединица I АТФ-синтазы	32741-34111 (33360-34744)	1370
<i>atpH</i>	Субъединица III АТФ-синтазы	32039-32284 (32659-32904)	245
<i>ndhA</i>	Субъединица 1 NADH-дегидрогеназного комплекса	110631-112706 (112330-114450)	2075
<i>ndhF</i>	Субъединица 5 NADH-дегидрогеназного комплекса	101433-103637 (102776-104995)	2204
<i>matK</i>	Матураза К	1668-3296 (2206-3741)	1628
<i>ORF185¹</i> (<i>ycf4</i>)	Функция продукта у риса неизвестна	57702-58259(58424-58981)	557
<i>petB</i>	Цитохром b6 b6/f комплекса	71232-72690 (71843-73243)	1458
<i>petD</i>	Субъединица IV цитохром b6/f комплекса	72883-74110 (73430-74661)	1227
<i>rpl16</i>	Белок 16 большой субчастицы рибосом	77729-79198 (78258-79734)	1469
<i>rpl23-rpl2^{2,3}</i>	Белки 23 и 2 малой субчастицы рибосом	81180-82964 (81725-83509), 132154-133938 (134625-136409)	1784
<i>rpoB</i>	β субъед. РНК-полимеразы бактериального типа	19214-22441 (20087-23317)	3227
<i>rps4</i>	Белок 4 малой субчастицы рибосом	44810-45415 (45545-46150)	605

<i>rps14</i>	Белок 14 малой субчастицы рибосом	36309-36620 (36940-37251)	311
<i>rps16</i>	Белок 16 малой субчастицы рибосом	4487-5553 (5027-6074)	1066
<i>rbcL</i>	Большая субъединица RUBISCO	54095-55528 (54939-56378)	1433
<i>rrn16</i> ²	16S рибосомная РНК	91299-92789 (92685-94176), 122329-123819 (123958-125449)	1490
<i>trnE-trnY</i> ³	Glu и Tug транспортные РНК	15650-15867 (15791-16006)	217
<i>3'rps12</i>	С – концевая часть белка 12 малой субчастицы рибосом	83139-83212 (89858-90658)	73

¹ - локус *ORF185* у ячменя соответствует гену *usf4*, кодирующему одну из субъединиц ФСІ.

² - гены *rrn16* и *rpl23-rpl2* находятся в инвертированном повторе, поэтому представлены в пластоме двумя копиями.

³ - в вектор проклонированы последовательности, которые кодируют РНК обоих генов, вследствие их малого размера.

Как видно из данных, приведенных в таблице 3, нами были выбраны представители функционально различных групп генов пластома. Во-первых, это гены, продукты которых необходимы для фотосинтеза, а именно: для ФСІ – *psaA* и *psaB* гены, ФСП - *psb* гены, АТФ синтетазного комплекса - *atp* гены, НАДФН дегидрогеназного комплекса – *ndh* гены, цитохром b6/f комплекса - *pet* гены. Во-вторых, это гены “домашнего хозяйства”: так, например, *rps* и *rpl* гены, кодирующие белки малой и большой субчастиц рибосом, *rpoB* ген, который кодирует β субъединицу РНК-полимеразы бактериального типа, а также гены рибосомной РНК (нами взят ген *rrn16*) и гены транспортных РНК *trnE* и *trnY*. Анализируя принадлежность генов к оперонам, мы опирались на данные по пластому риса *Oryza sativa* (Japonica cultivar group) (NCBI, NC_001320), который полностью секвенирован и для которого организация оперонов известна (Kanno, Hirai, 1993). В итоге нами были выбраны гены, представляющие крупные опероны и ряд генов (*ndhF*, *rbcL*, *psbA*), организованных моноцистронно. Для *psbB-psbH-petB-petD* оперона были взяты все гены. РНК-полимеразой бактериального типа транскрибируются гены *rbcL*, *psaA-psaB*, РНК-полимеразой фагового типа – гены *rpoB*, *rpl23*, а обеими РНК-полимеразами транскрибируются гены *rrn16*, *atpB*, *psbD-psbC*.

Изменение экспрессии хлоропластных генов ячменя на уровне транскрипции в присутствии тяжелых металлов определяли с помощью метода run-on транскрипции. Данный метод позволяет оценить скорость транскрипции генов по количеству вновь

синтезированных РНК за период времени, когда исключается влияние процессов созревания и деградации матриц. Для анализа были выделены интактные хлоропласты из первого листа 7-дневных растений ячменя, выросших в рулонной культуре на растворах 100 мкМ хлоридов кадмия, меди и никеля (контроль – на дистиллированной воде). Изменение скорости транскрипции генов выражали в условных единицах и считали значимым, если ее значение отличалось от контрольного в 2 и более раза. Результаты представлены на рисунке 6.

Анализ данных показал, что все три исследованных металла вызывали дифференциальную регуляцию скорости транскрипции пластидных генов. Скорость транскрипции генов рибосомных белков *rpl16* и *rpl23-rpl2*, а также гена *ndhA* в молодых растениях ячменя возрастала в присутствии Cd, Cu, и Ni в 2,5-4,5 раза в сравнении с контролем.

Гены *rpl16* и *rpl23-rpl2* у риса входят в один оперон, ген *ndhA* транскрибируется в другом опероне. Обнаруженная активация транскрипции при воздействии ТМ, возможно, распространяется и на другие гены этих оперонов.

Особый интерес представляет повышенная интенсивность транскрипции *rpl16* и *rpl23-rpl2* генов, кодирующих рибосомные белки. В последние годы в литературе появляются данные, подтверждающие экстрарибосомную функцию ряда рибосомных белков (Wool, 1996). Эта функция касается основных клеточных процессов, таких как репликация, транскрипция, процессинг РНК и трансляция. Согласно данным, полученным на мутантах *Arabidopsis thaliana*, рибосомный белок S27 в обычных условиях участвует в трансляции, а после обработки растений ультрафиолетом, кроме того, обеспечивает гидролитическое расщепление поврежденных мРНК (Revenkova et al., 1999). Следует подчеркнуть, что скорость транскрипции генов рибосомных белков *rpl16* и *rpl23-rpl2* активировалась каждым из изученных нами ТМ, то есть стимуляция скорости транскрипции этих генов не является специфической для какого-либо одного ТМ. Более того, есть данные, что транскрипция генов *rps16* и *rpl23-rpl2* возрастала в ответ на повышение температуры (Зубо и др., 2008). Это позволяет предполагать, что рибосомные белки, кодируемые генами *rpl16* и *rpl23-rpl2*, выполняют неизвестную в настоящее время биологическую функцию в стрессорных условиях.

Третий ген, транскрипция которого активируется в ответ на обработку растений тяжелыми металлами (*ndhA*), кодирует субъединицу 1 пластидной NADH пластохиноноксидоредуктазы. Есть данные, что экспрессия этого гена возрастает в ответ на окислительный стресс. На этом основании было высказано предположение, что NADH пластохиноноксидоредуктаза участвует в защите хлоропластов от фотоокислительного стресса (Martin et al., 1996). Принимая во внимание тот факт, что

обработка растений ТМ также приводит к образованию активных форм кислорода (Pinto et al., 2003), можно допустить, что обнаруженная нами активация транскрипции *ndhA* гена в ответ на действие ТМ также обусловлена окислительным стрессом.

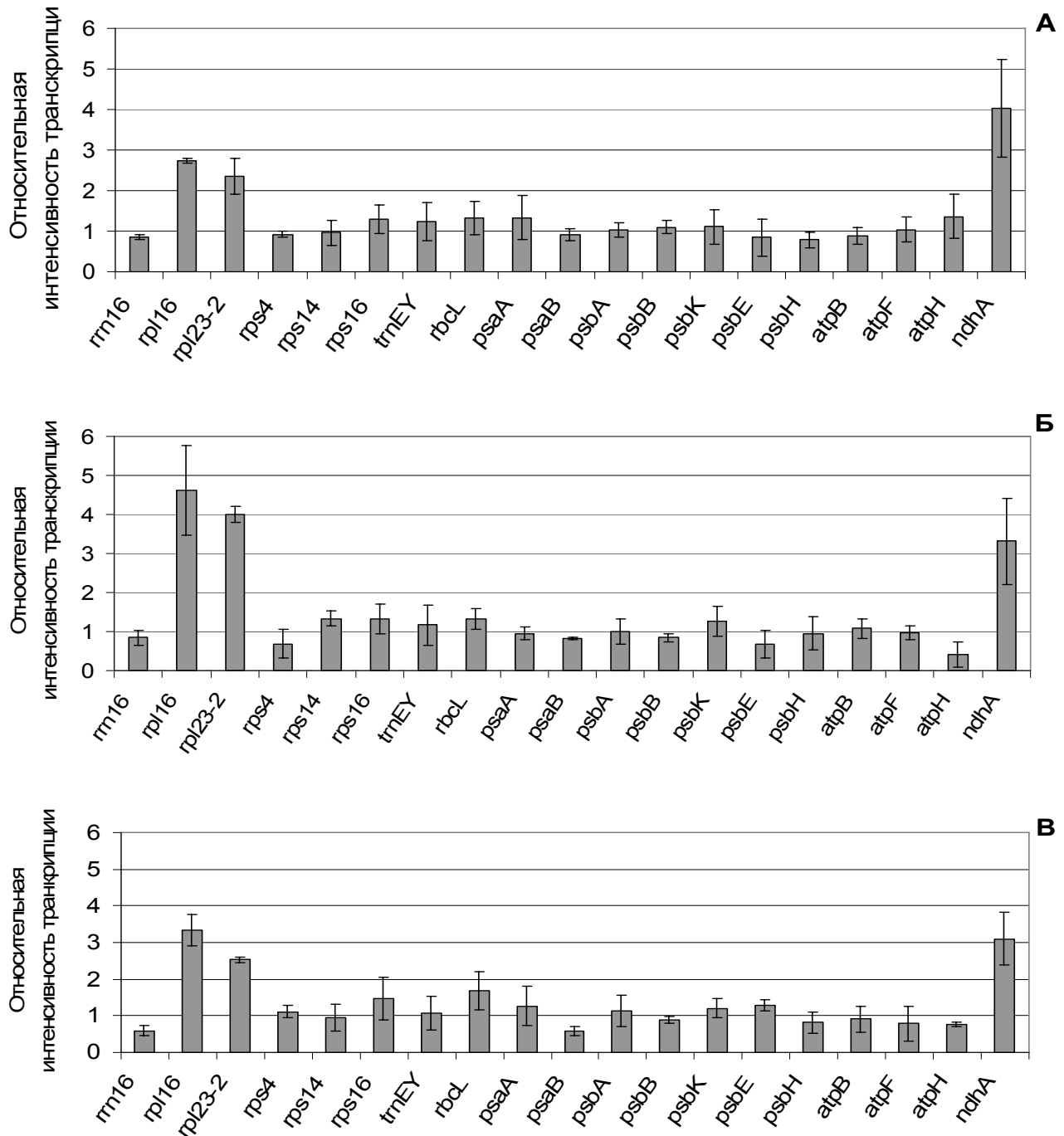


Рисунок 6. Эффект тяжелых металлов на скорость транскрипции хлоропластных генов в листе ячменя, выращенных в присутствии 100 мкМ хлоридов Cd (А), Cu (Б) и Ni (В).

ТМ не только активировали, но и подавляли интенсивность транскрипции отдельных пластидных генов. В присутствии ионов меди снижена транскрипция *atpH* гена (рис. 6Б). В то же самое время, скорость транскрипции 15 других изученных пластидных генов не изменялась в присутствии солей ТМ.

В настоящее время известно, что влияние ТМ на скорость транскрипции не всегда сопровождается изменением содержания транскриптов индивидуальных хлоропластных генов. Тотальное содержание РНК зависит как от интенсивности синтеза, так и от скорости деградации/стабилизации транскриптов. В связи с этим представляло интерес изучение с помощью Нозерн-анализа влияния ТМ на уровень транскриптов ряда хлоропластных генов. Для анализа была использована РНК из первого листа 7-дневных растений ячменя, выращенных в рулонной культуре в присутствии 100 мкМ хлоридов кадмия, меди и никеля.

РНК перенесли на нейлоновую мембрану, прогибридизовали с радиоактивно мечеными фрагментами генов *rbcL*, *atpB* и *rpl16*, а затем экспонировали с рентгеновской пленкой (рис. 7). Очевидно, ионы Cd, Cu и Ni не влияли на содержание транскриптов как моноцистронного *rbcL* гена, кодирующего большую субъединицу RUBISCO, так и *atpB* гена, который входит в состав *atpB*-оперона и кодирует β -субъединицу АТФ-синтазного комплекса тилакоидных мембран хлоропластов.

Совершенно иная картина наблюдалась с регуляцией *rpl16* гена (NCBI, NC_008590.1; 78258- 79734 п.н.), который кодирует белок 16 большой субчастицы рибосом и содержит два экзона (8 и 404 п.н.) и интрон размером 1064 п.н. ТМ не влияли на содержание зрелой мРНК, имеющей размер 412 нуклеотидов, но ионы Cd подавляли созревание мРНК, о чем говорит наличие транскрипта размером 1476 нуклеотидов.

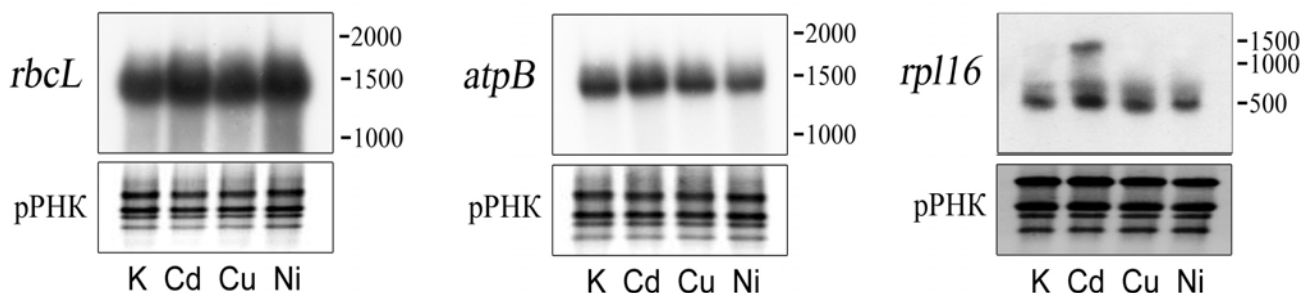


Рисунок 7. Эффект тяжелых металлов на тотальное содержание транскриптов индивидуальных хлоропластных генов растений ячменя. К - контроль, справа на рисунке даны примерные размеры фрагментов (п.н.).

Известно, что непротранскрибированные транскрипты транслируются значительно менее эффективно, чем зрелые мРНК, и подавление процесса созревания мРНК может привести к снижению содержания кодируемых этими РНК белков. Это означает, что нами впервые показано блокирование ионами кадмия процесса посттранскрипционной регуляции экспрессии генов - сплайсинга пластидных мРНК.

Ранее было показано, что ионы кадмия индуцировали в петунии транскрипцию двух ядерных генов, входящих в семейство генов БТШ70, и подавляли сплайсинг транскрипта одного из них (Winter et al., 1988). Причем белки теплового шока, образовавшиеся при предварительной обработке растений повышенной температурой, не предотвращали ингибирующий эффект кадмия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе исследовали влияние солей трех тяжелых металлов – кадмия, меди и никеля – на молодые растения ячменя. Медь и никель, эссенциальные элементы, в концентрациях, превышающих необходимые, также как и кадмий, оказывают токсическое действие на рост и развитие растения ячменя.

Ингибирование ионами Cd, Cu и Ni прорастания зерновок, роста и накопления биомассы органов у проростков ячменя носит неспецифический характер и вызывает изменения, свойственные многим тяжелым металлам, а также некоторым другим абиотическим стрессорам.

Ионы Ni менее токсичны для ячменя, чем ионы Cd и Cu, но растения ячменя способны поглощать их в больших количествах и, вероятно, лишены эффективных механизмов детоксикации. Кадмий и медь проявили сходство по степени воздействия на ростовые показатели проростков ячменя. Однако, у ячменя, как и у многих других видов растений, функционируют не только механизмы детоксикации ионов Cu, но и барьеры, препятствующие транспорту большого их количества в надземные органы.

Токсическое действие никеля и меди на уровень содержания хлорофилла носило, очевидно, косвенный характер, однако длительная обработка растений хлоридом кадмия в высокой концентрации приводит к более существенным нарушениям функций хлоропластов: не только снижается уровень содержания зеленых пигментов, но и нарушается соотношение хлорофилла а к b.

В данной диссертационной работе показано существование регуляции экспрессии индивидуальных хлоропластных генов ячменя тяжелыми металлами (на уровне транскрипции и сплайсинга). Ионы всех трех изученных ТМ активировали скорость транскрипции генов *rpl16*, *rpl23-rpl2* и *ndhA*, но ионы меди несколько ингибировали транскрипцию *atpH* гена. Обнаруженная активация скорости транскрипции может

происходить вследствие прямого взаимодействия ионов ТМ с факторами транскрипции, либо также свидетельствовать об участии продуктов этих генов в защите хлоропластов в условиях воздействия стрессорных факторов. Ранее было показано, что транскрипция генов рибосомных белков активировалась при температурном стрессе, а скорость транскрипции гена *ndhA*, кодирующего субъединицу 1 пластидной NADH пластохиноноксидоредуктазы, возрастала в ответ на окислительный стресс. Однако сам механизм защитного воздействия этих белков пока остается неизвестным.

Тяжелые металлы способны вызвать не только изменение скорости транскрипции отдельных хлоропластных генов, но и участвовать в регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне, в частности, подавляя сплайсинг их транскриптов. Нами было показано, что ионы кадмия подавляли созревание пре-мРНК гена *rpl16*, ингибируя процесс удаления интрона. Это может привести к затруднению трансляции и снижению содержания соответствующего рибосомного белка. Аналогичное воздействие ионов кадмия на ядерные гены ранее было обнаружено у растений петунии.

ВЫВОДЫ

1. Изученные ТМ (Cd, Ni и Cu) в избыточных концентрациях (от 100 мкМ и выше) оказывают токсическое действие на прорастание семян, рост и накопление биомассы молодых растений ячменя. ТМ сильнее ингибируют рост корней, чем рост надземной части. Накопление свежей биомассы ингибируется ТМ сильнее, чем сухой. Наиболее сильное ингибирование накопления биомассы вызывает обработка хлоридом кадмия, в то время как ионы никеля менее токсичны для роста и развития растений.
2. В корнях растений ячменя накапливается значительно большее количество ТМ, чем в надземной части. Ионы никеля, по сравнению с кадмием и медью, легче поглощаются растениями ячменя и легче транспортируются из корней в надземные органы. Негативный эффект ионов меди на рост и развитие побега ячменя, вероятно, вызывается нарушением физиологических процессов в корнях, поскольку даже при самых высоких концентрациях меди в среде ее содержание в листе повышается незначительно.
3. Все изученные ТМ несут существенно снижают содержание хлорофилла у молодых растений ячменя при 7 суточной экспозиции. При более длительной обработке высокие концентрации ионов кадмия и никеля существенно снижали уровень хлорофиллов а и b, причем, кадмий сильнее подавляет содержание хлорофилла а, чем хлорофилла b.

4. Тяжелые металлы вызывали дифференциальное изменение транскрипции индивидуальных хлоропластных генов ячменя. В присутствии кадмия, меди и никеля активировалась транскрипция следующих хлоропластных генов: *rpl16*, *rpl23-rpl2* и *ndhA*, тогда как скорость транскрипции *atpH* гена снижается. Транскрипция других 15 изученных пластидных генов ячменя не регулируется тяжелыми металлами.
5. Активация транскрипции генов *rpl16* и *rpl23-rpl2* в присутствии ТМ, возможно, связана с тем, что кодируемые этими генами рибосомные белки, выполняют нетипичную для них неизвестную в настоящее время биологическую функцию в условиях адаптации растений к стрессу. Транскрипция пластидного *ndhA* гена ячменя, кодирующего субъединицу NADH пластохиноноксидоредуктазы, в ответ на действие ТМ активируется, возможно, для защиты хлоропластов от фотоокислительного стресса, возникающего при действии ТМ.
6. Ионы кадмия, в отличие от ионов меди и никеля, нарушают сплайсинг мРНК пластидного гена *rpl16*. Это показывает, что ТМ способны участвовать в регуляции экспрессии хлоропластных генов не только на транскрипционном, но и на посттранскрипционном уровне, в частности, на уровне созревания пре-мРНК, ингибируя вырезание интронов, что может привести к снижению содержания в хлоропластах рибосомного белка и к подавлению процесса трансляции.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. Зарипова Н.Р., Стефанович К.Ю. Сравнение влияния ионов кадмия, меди и никеля на растения ячменя на ранних этапах развития // Вестник Тверского государственного университета. Серия «Биология и экология». 2008. Вып. 1. С. 116-122.
2. Зарипова Н.Р. Влияние кадмия, меди и никеля на молодые растения ячменя (*Hordeum vulgare* L.) // Современная физиология растений: от молекул до экосистем: Материалы докладов международной конференции (в трех частях). Часть 2. (Сыктывкар, 18-24 июня 2007 г.). Сыктывкар. 2007. С. 144-145.
3. Зарипова Н.Р., Зубо Я.О., Кравцов А.К., Холодова В.П., Кузнецов В.В., Кузнецов Вл.В. Тяжелые металлы вызывают дифференциальную регуляцию транскрипции пластидных генов и блокирование сплайсинга мРНК // Доклады Академии Наук. 2008. Т. 423. № 1.

4. Зарипова Н.Р., Зубо Я.О., Кравцов А.К., Холодова В.П., Кузнецов В.В., Кузнецов Вл.В. Влияние кадмия, меди и никеля на транскрипцию пластидных генов ячменя и блокирование сплайсинга мРНК // Материалы Международной конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений» (Екатеринбург, 06-11 октября 2008 г.), Екатеринбург. 2008 .