

ГЕНЫ БЕЛКОВ *ARABIDOPSIS THALIANA*, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПЛАСТИДНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗой БАКТЕРИАЛЬНОГО ТИПА: ЭКСПРЕССИЯ В УСЛОВИЯХ АБИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

А.А. Андреева^{1,2}, М.Н. Данилова¹, Н.В. Кудрякова¹, В.В. Кузнецов¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия, nkudryakova@rambler.ru

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия, alexaa27@mail.ru

Аннотация. Различные виды абиотического стресса вызывали избирательную экспрессию генов, кодирующих белки, ассоциированные с пластидной РНК-полимеразой бактериального типа (РАР-белки), сочетая корегуляцию и специфичность ответов.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, гены, абиотический стресс, гены РАР белков

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-84-88

Превращение этиопластов в хлоропласты сопровождается формированием транскрипционно-активной хромосомы (ТАС) - ДНК-РНК-полимеразного комплекса, в состав которого входят субъединицы РНК-полимеразы бактериального типа (РЕР), кодируемые пластомом, σ -факторы, необходимые РЕР для узнавания и связывания промоторных областей хлоропластных генов, а также 35 дополнительных полипептидов, включая 12 белков, ассоциированных с РЕР (РАР-белков). Инактивация любого из генов РАР-белков влечет за собой aberrантное развитие хлоропластов и нарушение транскрипции хлоропластных генов. В геноме *Arabidopsis* идентифицировано 12 различных генов РАР, которые демонстрируют высокую степень коэкспрессии [Pfannschmidt et al., 2015]. Вместе с тем анализ *in silico* потенциальных функций РАР белков, предсказанных на основе имеющихся в их последовательностях функциональных доменов, свидетельствует об их структурном и функциональном многообразии и участии, по крайней мере, в двух процессах: ДНК-РНК метаболизме (РАР 1, 2, 3, 5, 7, 12) и редокс-регуляции (РАР 4, 6, 9, 10). При этом функции РАР8 и РАР11 понятны еще менее. В этой связи анализ экспрессии генов РАР в условиях абиотического стресса представляет особый интерес для расшифровки механизмов функционирования транскрипционного комплекса хлоропластов.

В настоящей работе двухнедельные растения *Arabidopsis thaliana*, выращенные на половинной питательной среде Мурасиге и Скуга в климатической камере (MLR-352Н-РЕ Sanyo, Japan) при освещении $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{c}^{-1}$, температуре 23 °С и продолжительности светового периода 16 ч, подвергали действию стрессоров различной природы: температурному, солевому, осмотическому, окислительному и темновому. О повреждающем действии стрессов судили по содержанию МДА - продукта перекисного окисления липидов и изменению содержания пролина. Накопление МДА измеряли по методу Heath и Packer (1968). Содержание пролина определяли по методу Bates с соавт. (1973). Экспрессию генов РАР анализировали методом ПЦР-РВ на приборе LigthCylerR96 (Roche, Швейцария) согласно методике, описанной ранее [Данилова и др., 2014]. Уровень экспрессии целевых генов был нормализован к уровню экспрессии гена полиубиквитина *UBQ10*.

Как показали полученные результаты, содержание МДА достоверно возрастало в течение 24 ч действия таких стрессоров как метилвиологен (MV, 10 мкМ), повышенная

(37°C) и пониженная (4°C) температура и практически не изменялось при обработке NaCl (150 мМ) или при экспозиции в течение 48 ч в условиях темноты. При этом максимальный рост МДА был зафиксирован в присутствии маннитола (300 мМ) – от $1,67 \pm 0,16$ до $2,47 \pm 0,11$ мкмоль/г сырой массы. Параллельно возрастало содержание свободного пролина. Самое высокое накопление пролина – от $0,756 \pm 0,025$ до $3,67 \pm 0,89$ и $3,36 \pm 0,43$ мМ/г сырой массы, соответственно, было отмечено при действии NaCl и маннитола, тогда как в условиях темнового стресса наблюдалось снижение его содержания до $0,135 \pm 0,021$. Таким образом, полученные результаты свидетельствовали о дифференциальном изменении их осмоустойчивости и редокс-гомеостаза под действием различных стресс-факторов.

Хотя накопление избыточного количества АФК при стрессах имеет универсальный характер и сопровождается однонаправленными изменениями экспрессии пула стресс-регулируемых генов, реализация ответов на действие стрессоров различной природы может вызывать избирательную инициацию элементов регуляторных сетей и определять специфичный характер экспрессии конкретных генов [Killian et al., 2007]. Как правило, специфичная реакция развивается не сразу и становится видимой через 1-3 часа и позднее. Действительно, анализ экспрессии генов PAP белков показал, что в первый час воздействия стресс-факторов наблюдалось падение экспрессии всех исследованных генов. Эта реакция связана, возможно, с активацией транскрипционных регуляторов AZF2, ZAT10 и ZAT12, выступающих в качестве репрессоров углеводородного метаболизма и фотосинтеза, что необходимо для поддержания энергетического гомеостаза и успешной адаптации к стрессовым условиям. Дальнейшее изменение характера экспрессии различных PAP генов, очевидно, определялись их конкретной физиологической ролью и возможным участием в каскаде протекторных механизмов.

Так, в условиях гипертермии после первоначального снижения накопление транскриптов большинства генов поддерживалось на уровне, близком к контрольным значениям в течение 3-6 часов, после чего снижалось. Достоверно увеличивалась экспрессия лишь двух PAP генов PAP6 и PAP8. Белок, кодируемый геном PAP6, относится к группе PAP белков, связанных с редокс-регуляцией и защитой PER комплекса от окислительного стресса. Показана его способность к образованию гетерокомплекса с тиоредоксином z (Trx z) *in vitro* в двугибридной дрожжевой системе, а также с тиоредоксиновым доменом белка PAP10/TrxZ *in vivo* [Pfannschmidt et al., 2015]. Функция белка PAP8 также могла быть связана с защитой PER комплекса от избыточных АФК. Однако присутствие в его последовательности сигнала ядерной локализации не исключает его участия в стресс-протекторных функциях, ассоциированных с ядром. Повышение экспрессии PAP6 и PAP8 в ответ на тепловой стресс имело транзитный характер и после 6 ч гипертермии наблюдалось снижение экспрессии обоих генов.

Напротив, при гипотермии (4°C) экспрессия всех PAP генов возрастала лишь после 6 ч и через 24 ч действия холодного стресса превышала контрольные значения как минимум в 2 раза. Высокая степень коэкспрессии всех PAP генов при низких температурах, возможно, обусловлена их корегуляцией циркадными ритмами, в частности геном *CCA1*, который, в свою очередь, регулирует на уровне транскрипции ключевую цепь ответа на холодный стресс, включающую *транс*-факторы CBF/DREB и их целевые гены *COR*.

Известно, что экспрессия генов PAP индуцируется в ответ на свет, причем сборка PAP белков вокруг растворимого РНК-полимеразного комплекса и формирование так называемой транскрипционно-активной хромосомы (ТАС) не происходит в темноте. Как показали наши эксперименты, в ответ на затемнение фотосинтезирующих растений

наблюдалось снижение накопления транскриптов всех 12 *PAP* генов, что, по-видимому, способствовало дестабилизации РЕР комплекса и сопутствующим нарушениям функции хлоропластов.

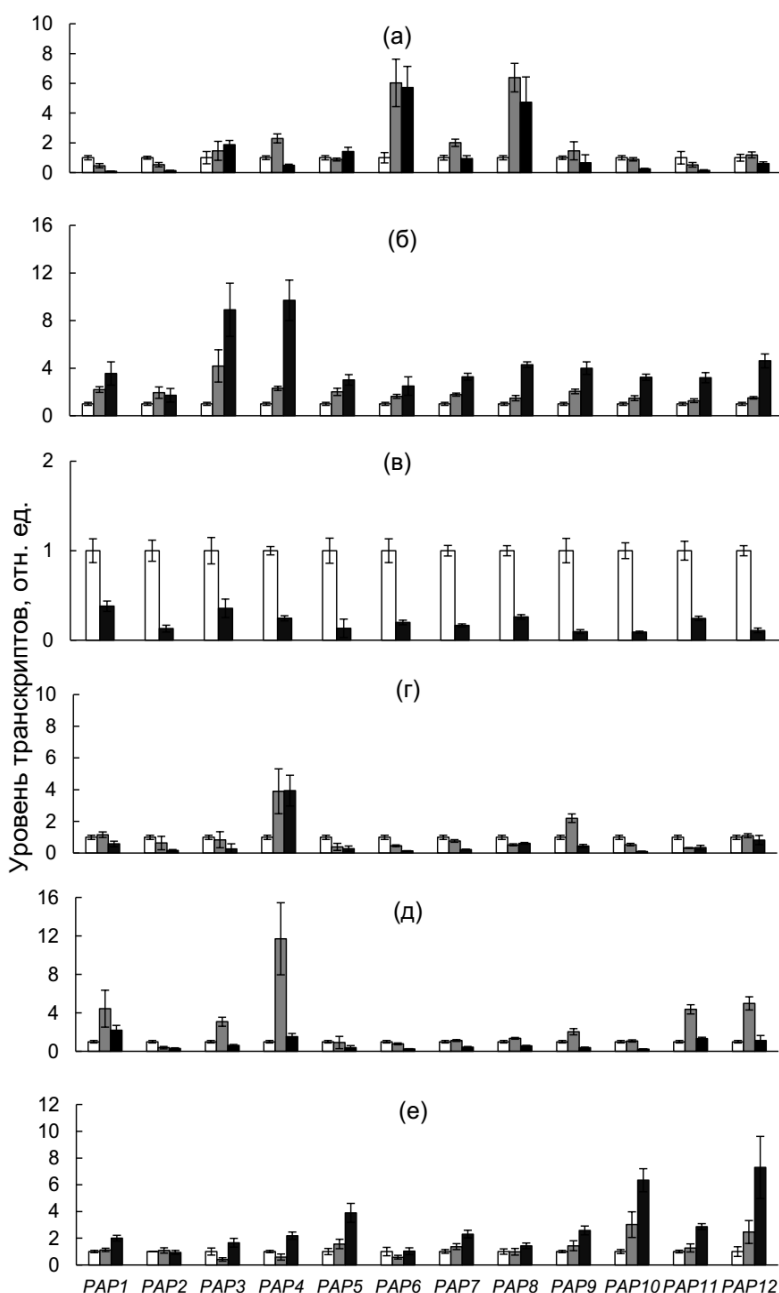


Рисунок. Влияние абиотических стрессов на уровень транскриптов генов *PAP*. (а) тепловой стресс, 37 °С (б) холодной, 4 °С, (в) темновой, 48 ч, (г) осмотический, 300 мМ маннитол, (д) окислительный, метилвиologen 10 мкМ, (е) солевой, 150 мМ NaCl. Белый цвет – контроль, серый 6 ч, черный 24 ч.

Осмотический стресс также резко ингибировал накопление матриц всех *PAP* генов к исходу 24 часов стресса. Исключение составил ген *PAP4*, который в присутствии 300 мМ маннитола демонстрировал активацию. Этот ген кодирует белок с доменом железосодержащей супероксиддисмутазы (FeSOD), относимый к группе антиоксидантных ферментов. Его непосредственная функция связана с защитой клеток от накопления супероксидных радикалов O_2^- . Поэтому поддержание экспрессии этого

гена в условиях стресса неудивительно и позволяет предполагать действие в тилакоидных мембранах высокоспецифичного O_2^- -зависимого сенсорного механизма.

Интересно, что, согласно базам данных транскриптомного анализа, большая часть АФК-регулируемых генов, отвечающих на O_2^- и H_2O_2 , репрессируется при абиотических стрессах, тогда как в ответ на синглетный кислород 1O_2 – индуцируются [Gadjev et al., 2006]. Тем не менее, при обработке метилвиологеном, гербицидом, генерирующим образование супероксидного радикала, экспрессия генов *PAP*, как правило, возрастала в полтора-два раза через 6 ч инкубации и возвращалась к исходному уровню через 24 ч. Рост содержания транскриптов *PAP* генов был отмечен также при засолении для всех генов кроме *PAP2,6* и *8* однако максимальные уровни транскриптов наблюдались через 24 часа действия NaCl. Все это свидетельствует об избирательной кинетике накопления транскриптов *PAP*, специфичной для действия различных стресс-факторов.

Таким образом, реакция *PAP* генов на различные виды абиотического стресса варьировала, сочетая корегуляцию экспрессии и специфичность ответов. Селективное изменение уровня экспрессии *PAP* генов – несомненное свидетельство их различной функциональной роли при защите PEP комплекса от повреждения АФК в хлоропластах. Вместе с тем наличие в последовательности ряда *PAP* сигнала ядерной локализации позволяет предполагать их одновременное участие в стресс-протекторных механизмах ядра.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-14-00584).

Литература

Данилова М.Н., Кудрякова Н.В., Воронин П.Ю., Оельмюллер Р., Кузнецов В.В., Кулаева О.Н. Мембранные рецепторы цитокинина и их регуляторная роль в реакции растений *Arabidopsis thaliana* на фотоокислительный стресс в условиях водного дефицита // Физиология растений. – 2014, – Т. 61. – С. 466–475.

Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant Soil. – 1973. – V. 39. – P. 205–207.

Gadjev I., Vanderauwera S., Gechev T.S., Laloi C., Minkov I.N., Shulaev V., Apel K., Inzé D., Ron Mittler R., Van Breusegem F. Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis* // Plant Physiology. – 2006. – V. 141. – P. 436–445.

Heath L.R., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Arch. Biochem. Biophys. – 1968. – V. 125. – P. 189–198.

Kilian J., Whitehead D., Horak J., Wanke D., Weinl S., Batistic O., D'Angelo C., Bornberg-Bauer E., Kudla J., Harter K. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses // Plant J. – 2007. – V. 50. – P. 347–363.

Pfannschmidt T., Blanvillain R., Merendino L., Courtois F., Chevalier F., Liebers M., Grübler B., Hommel E., Lerbs-Mache S. Plastid RNA polymerases: orchestration of enzymes with different evolutionary origins controls chloroplast biogenesis during the plant life cycle // J. Exp. Bot. – 2015. – V. 66. – P. 6957–6973.

**GENES OF *ARABIDOPSIS THALIANA* PROTEINS ASSOCIATED
WITH PLASTID RNA POLYMERASE OF BACTERIAL TYPE: EXPRESSION
UNDER CONDITIONS OF ABIOTIC STRESS**

A.A. Andreeva^{1,2}, M.N. Danilova¹, N.V. Kudryakova¹, V.V. Kusnetsov¹

¹K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia,
nkudryakova@rambler.ru

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, *alexaa27@mail.ru*

Abstract. Various types of abiotic stresses caused differential regulation of the genes for proteins associated with plastid RNA polymerase of bacterial type (PAP), combining coregulation and specificity of responses.

Keywords *Arabidopsis thaliana*, abiotic stresses, PAP genes