

Редукция белоксинтезирующего аппарата пластид — причина стабильной хлорофиллдефектности, индуцируемой у растений антибиотиками

М. К. Зубко

Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной Академии Украины
Ул. Академика Заболотного, 148, Киев, 03143, Украина

Изучена молекулярная основа стабильной хлорофиллдефектности, с высокой частотой индуцируемой антибиотиками спектиномицином и стрептомицином у крестоцветных растений. Показано, что наиболее вероятной причиной хлорофиллдефектности является прекращение биосинтеза пластидных белков, обусловленное редукцией белоксинтезирующего аппарата пластид, в частности, важнейшего его компонента — рибосомной РНК. Предлагается использовать данное явление как модель для изучения биосинтетических функций пластид.

Введение. Пластиды — важнейшие органеллы растительной клетки, выполняющие основные функции фотосинтеза. Они имеют собственный геном, называемый пластомом, и свой белоксинтезирующий аппарат, которые функционируют координированно с генетической системой ядра, однако обладают относительной автономией [1]. В последнее десятилетие молекулярная биология пластид развивается достаточно бурно, что связано с общим подъемом в развитии биологии растений. Особенно плодотворной оказалась стратегия, основанная на подавлении основных функций хлоропластов, в частности, биосинтеза белка. В настоящее время для этого наиболее широко используются три подхода: 1) применение антибиотиков, блокирующих работу пластидных 70S рибосом [2]; 2) использование мутантов, у которых стабильно нарушены различные звенья формирования или функционирования пластидных рибосом [3]; 3) ингибирование биосинтеза белка на пластидных рибосомах повышенными температурами [4]. Наряду с преимуществами каждый подход имеет определенные ограничения. Так, ингибирование с помощью антибиотиков и температуры часто оказывает действие на ряд других, непластидных функций, существенно

влияет на рост и носит временный характер. Мутанты с нарушенными функциями пластидного биосинтеза в подавляющем большинстве неидентифицированы с точки зрения генетических локусов и молекулярных механизмов.

Недавно было обнаружено, что метаболическое блокирование биосинтеза белка на пластидных рибосомах с помощью антибиотиков спектиномицина и стрептомицина является необратимым для ряда крестоцветных растений. Это приводит к конверсии зеленых тканей в хлорофиллдефектные. Размножение таких тканей *in vitro* обеспечивает продукцию стабильных растений-альбиносов с очень высокой частотой [5]. В настоящей работе показано, что у таких хлорофиллдефектных растений полностью подавлен пластидный биосинтез белка и редуцировано количество 70S-рибосомной РНК. Это открывает некоторые альтернативные возможности для изучения биосинтеза в пластидах и ядерно-цитоплазматических взаимодействий.

Материалы и методы. *Растительный материал.* Хлорофиллдефектные линии (растения *Brassica napus* и каллусы *Arabidopsis thaliana*) были получены в результате инкубирования семян и проростков со спектиномицином и дальнейшего культивирования без антибиотика [5]. Растения и

кallусы поддерживали на среде Мурасиге и Скуга [6].

Суммарные белки и Вестерн-блот-анализ. Экстракты суммарных белков были приготовлены в пробирках эппендорф из 300 мг замороженных тканей (зеленых и хлорофиллдефектных), гомогенизированных с помощью стеклянной палочки в 600 мкл буфера, содержащего 80 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 %-й глицерин, 10 %-й ДСН, 0,5 %-й меркаптоэтанол.

Соотношение между навеской ткани и объемом буфера составляло 1:2. Экстракты, прокипяченные в течение 3 мин, центрифугировали (5 мин) при максимальной скорости настольной центрифуги, и супернатант использовали для фракционирования в 10 %-й ДСН-ПААГ геле. Для визуализации белков гели окрашивали раствором кумасси. Для иммуноблот-анализа белки с неокрашенных гелей переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-ECL («Amersham», Англия) и инкубировали с антителами к белкам D1, 33 кДа (фотосистема II) и светособирающего комплекса II. Связанные антитела детектировали люминесцентным методом по инструкции производителя (Amersham ECL Western blotting detection Kit). Антитела были любезно предоставлены профессором Р. Херрманном, д-рами Р.-Б. Клоsgеном и И. Адамской (Мюнхен). Хлорофиллдефектный пластомный мутант *A. thaliana* 180a индуцирован с помощью нитрозоэтилмочевины (неопубликованные данные).

РНК и Нозерн-блот-анализ. Суммарная РНК была выделена из асептических хлорофиллдефектных и зеленых тканей *B. napus* по общепринятой методике [7]. По 3 мкг РНК, фракционированных в 2 %-м агарозном геле (1×ТВЕ), визуализированных окрашиванием с помощью бромистого этидия и перенесенных на мембрану, гибридизовали пробой *pHvcP8*, содержащей хлоропластные гены рибосомной РНК [8]. В альтернативном варианте по 10 мкг РНК из нескольких зеленых, белых и желтых линий независимого происхождения фракционировали в денатурирующем 1 %-м геле с формальдегидом (6 %), переносили на мембрану Gene Screen и гибридизовали с пробами *pHvcP8* и *pBG35*, как и в предыдущем эксперименте. Плазмида *pBG35* содержит клонированный повтор ядерной рДНК льна размером 7 тыс. п. н.

Саузерн-блот-гибридизация. Суммарные ДНК, выделенные из зеленых и белых тканей, после переваривания рестриктазами *EcoRI* и *BamHI* переносили на мембрану Gene Screen и гибридизовали с фрагментами плазмид *pTB27* [9] и *pBG35* [10], содержащих соответственно последовательности хлоропластного генома и повтор ядерной

рДНК. Блоты отмывали в $0,1 \times \text{SSC}$ —0,1 %-й ДСН при температуре 50 °С.

Результаты и обсуждение. После обработки растений спектиномицином были индуцированы хлорофиллдефектные линии (кallусы *A. thaliana* и растения *B. napus*). Кроме полностью белых (бесхлорофильных) растений, у *B. napus* получены также желтые растения, у которых количество хлорофилла было снижено в 10—13 раз по сравнению с контрольными зелеными растениями [5]. Индукция стабильной хлорофиллдефектности с помощью антибиотиков (спектиномицина и стрептомицина) обсуждалась в связи с предполагаемым механизмом полного выключения биосинтеза белка на пластидных рибосомах, что обеспечивает репродукцию безрибосомных пластид и соответственно хлорофиллдефектность без мутирования хлоропластного или ядерного генома. Целью данной работы была проверка некоторых аспектов этого предположения. Отправная логика экспериментов состояла в следующем. Если механизм генерации хлорофиллдефектности антибиотиками действительно основан на необратимой потере хлоропластного биосинтеза белка, а не на мутагенном действии антибиотиков, как предполагалось в более ранних исследованиях [11, 12], это можно легко зарегистрировать, анализируя синтез белков, кодируемых хлоропластным геномом, и наличие рибосомных РНК в пластидах.

Большая субъединица (БС) рибулозо-бисфосфат-карбоксилазы и оксигеназы (Рубиско) — белок, синтезируемый на пластидных рибосомах в очень больших количествах [1, 2]. Как видно из рис. 1, полоса БС Рубиско очень хорошо детектируется при окрашивании суммарных белков из зеленых растений, имея несколько различную электрофоретическую подвижность у *B. napus* и *A. thaliana*. БС совсем не обнаруживается в экстрактах из белых кallусов *A. thaliana* и белых растений *B. napus* (рис. 1), а также у желтых растений *B. napus* (данные не приведены). Большинство других белков, кодируемых преимущественно ядром, обнаружено в приблизительно одинаковых количествах у зеленых и белых линий растений, что свидетельствует об адекватной загрузке белков при электрофорезе. Другой белок, D1 фотосистемы II, кодируемый пластидным геном *psbA*, был исследован с помощью Вестерн-блот-гибридизации (рис. 2). Четко детектируемый у зеленых растений *B. napus* и *A. thaliana*, белок D1 совсем не обнаруживался в экстрактах белых линий. Таким образом, синтез двух белков, кодируемых хлоропластным геномом, полностью подавлен у хлорофиллдефектных линий.

Экспрессия некоторых ядерных генов, кодирующих белки пластид, существенно подавлена у

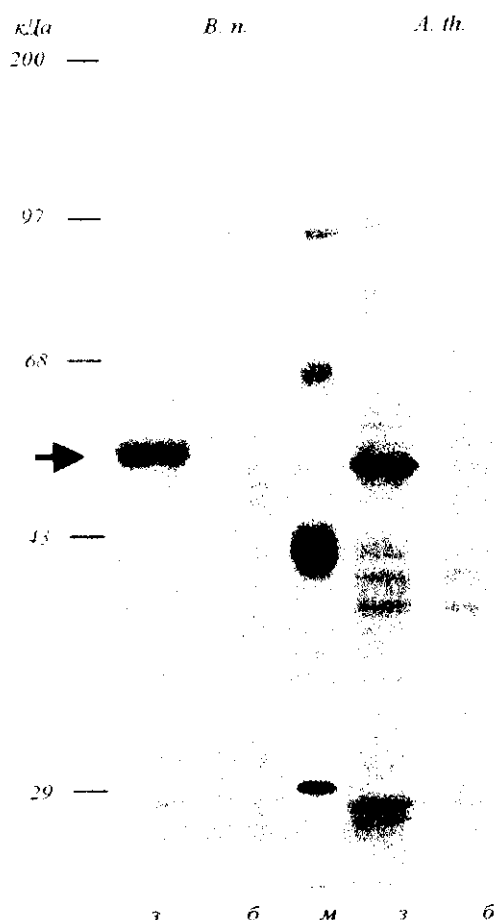


Рис. 1. Суммарные белки зеленых (з) и белых (б) тканей у *V. naris* (*V. n.*) и *A. thaliana* (*A. th.*). Стрелка указывает положение БС Рубиско; м — белковые маркеры молекулярной массы

ядерных мутантов ячменя *albostrians*, которые дефектны по рибосомам пластид [13]. К таким белкам относится, в частности, хлорофиллсвязывающий белок ЛНСII (фотосистема II). Вестерн-блот-анализ показал, что ЛНСII вовсе не обнаруживается у белых растений *V. naris*, но обнаруживается у желтых растений в количестве, в 25—30 раз меньшем, чем у зеленых растений (рис. 2). Аналогично, кодируемый ядром, но транспортируемый в хлоропласты 33 кДа белок также не обнаружен у белых линий *V. naris* и *A. thaliana* (рис. 2). Подавление биосинтеза пластидных бел-

ков, кодируемых ядром, вряд ли можно интерпретировать как простое следствие снижения уровня хлорофилла, поскольку 33 кДа белок синтезируется в нормальных количествах у двух бесхлорофильных пластомных мутантов — *Nicotiana tabacum* DSR A15 [14] и *A. thaliana* 180a (рис. 2).

Приведенные характеристики белкового синтеза в целом характеризуют индуцированные с помощью антибиотиков хлорофиллдефектные линии как дефектные по биосинтезу белка на пластидных рибосомах. Для дальнейшей проверки белоксинтезирующего аппарата пластид у хлорофиллдефектных линий была исследована их способность к синтезу рибосомных РНК пластид. На рис. 3, А, видно, что суммарный препарат РНК из белых растений *V. naris* не содержит полос, соответствующих 23S и 16S рРНК пластид, которые четко проявляются в препарате РНК из зеленых растений. Нозерн-блот-анализ независимо показал полное отсутствие или значительное снижение уровня пластидных рРНК в препаратах суммарной РНК из белых и желтых растений *V. naris* независимого происхождения (рис. 3, А, А', Б). Корректность

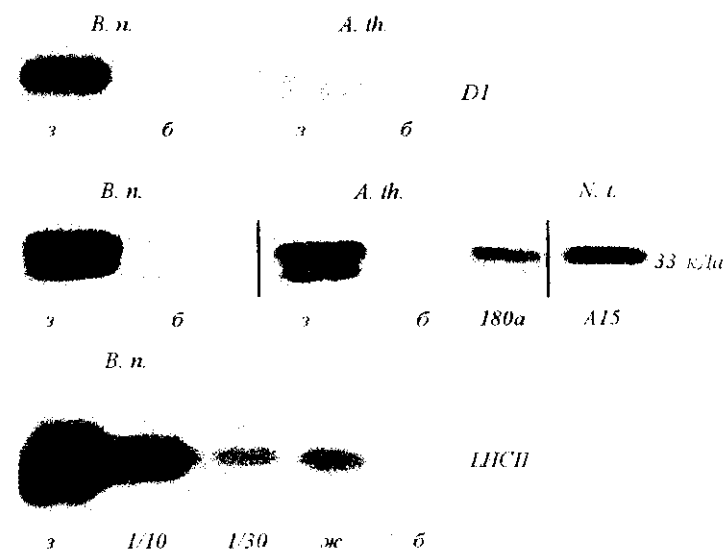


Рис. 2. Анализ пластидных белков у зеленых и хлорофиллдефектных линий с помощью иммуноблоттинга: з, б, ж — зеленые, белые и желтые линии соответственно; *V. n.* — *V. naris* (1/10, 1/30 — разведение экстрактов); *A. th.* — *A. thaliana* (180a — пластомный белый мутант, индуцированный с помощью химического мутагена); *N. t.* — *N. tabacum* (A15 — пластомный белый мутант)

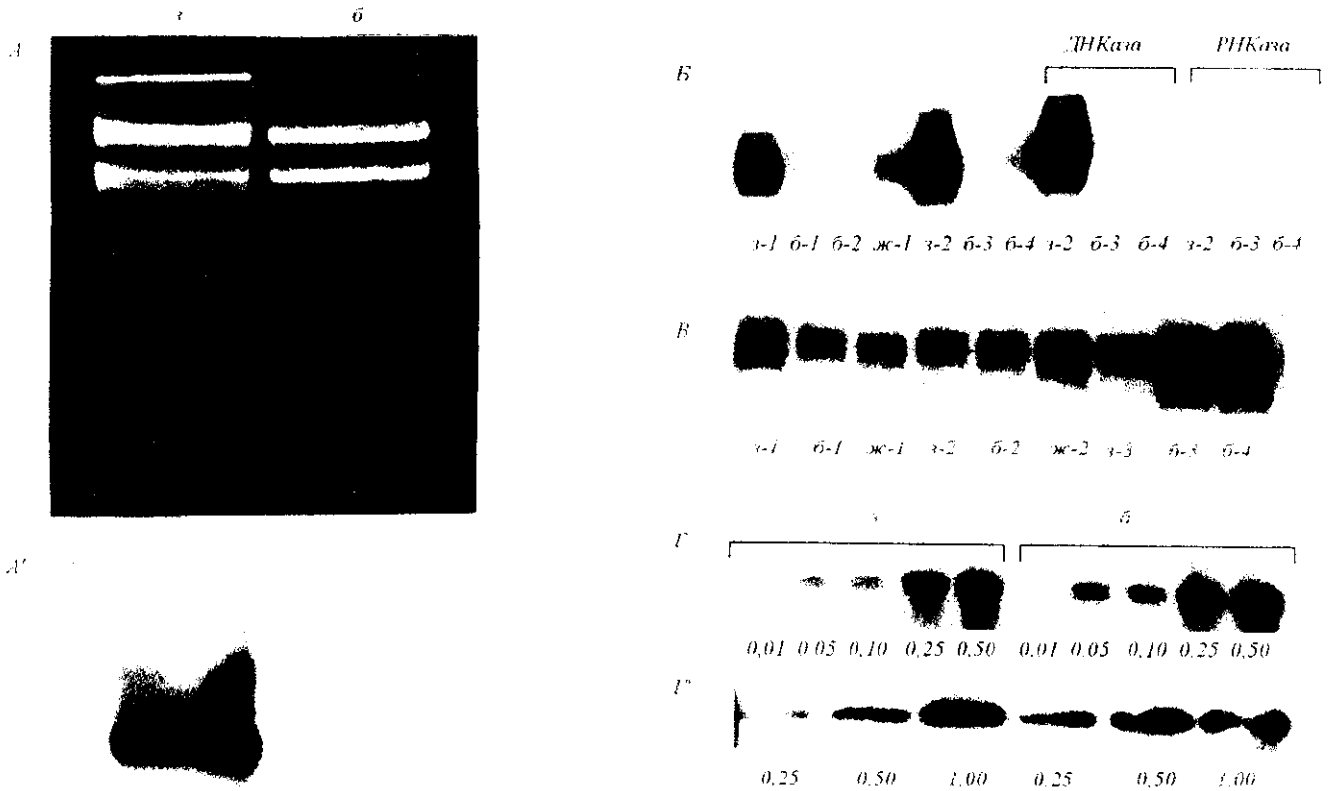


Рис. 3. Анализ рибосомной РНК у хлорофиллдефектных линий *B. napus*: *A* — суммарный препарат РНК зеленого и белого растений и *A'* — ее Нозерн-блот после гибридизации с пробой *pNucPS8*, содержащей хлоропластную геномную рРНК; *B* — Нозерн-блот РНК из различных зеленых и хлорофиллдефектных линий независимого происхождения после гибридизации с пробой *pNucPS8* (показаны варианты с обработкой препаратов РНК ДНКазой и РНКазой); *B'* — Нозерн-блот РНК из различных линий после гибридизации с пробой *pBG35* (ядерный повтор рДНК); *C* — Саузерн-блот суммарных препаратов ДНК после переваривания *EcoRI* (*C'*) и *BamHI* и последующей гибридизации с хлоропластной пробой *pTB27* (*C'*) и ядерной пробой *pBG35* (*C''*). Цифры показывают количество нанесенной ДНК в мг. Остальные обозначения — те же, что на рис. 1, 2

данного вывода полностью согласуется с данными опытов по обработке препаратов РНК ДНКазой и РНКазой (рис. 3, *B*), а также контрольной гибридизацией на общее количество РНК, перенесенной на фильтр (рис. 3, *B'*). Результаты опытов также не могут быть объяснены вариациями в количестве хлоропластной и ядерной ДНК у зеленых и белых растений соизмеримо в пределах опытов, что под-

тверждено Саузерн-блот-гибридизацией с применением проб на пластидную и ядерную ДНК (рис. 3, *C*).

В целом приведенные здесь результаты свидетельствуют о том, что стабильная хлорофиллдефектность, индуцированная у крестоцветных растений с помощью антибиотиков, во всех исследованных случаях связана с редукцией количества пластидной рРНК и продуктов трансляции в пла-

стидах. Это позволяет рассматривать данную систему в качестве эффективной модели для изучения различных сторон биосинтеза белка в пластидах и роль этого процесса в экспрессии целого ряда ядерных генов, вовлеченных в ядерно-цитоплазматические взаимодействия.

Данная работа выполнена на базе Биологической Школы Манчестерского Университета. Автор глубоко признателен д-ру А. Дюю за помощь в выполнении работы и участие в обсуждении результатов.

М. К. Зубко

Редукція білоксинтезуючого апарату пластид — причина стабільної хлорофілдефектності, індукованої у рослин антибіотиками

Резюме

Вивчено молекулярну основу стабільної хлорофілдефектності, що з високою частотою індукується антибіотиками спектиномицином та стрептомицином у хрестоцвітних рослин. Показано, що найвірогіднішою причиною хлорофілдефектності є припинення біосинтезу пластидних білків, обумовлене редукцією білоксинтезуючого апарату пластид, зокрема, одного з найважливіших його компонентів—рибосомної РНК. Пропонується використовувати це явище як модель для вивчення біосинтетичних функцій пластид.

М. К. Zubko

Reduction of plastid protein synthesis apparatus is a base of stable chlorophyll deficiency induced by antibiotics in plants

Summary

A molecular base for the stable chlorophyll deficiency induced with high frequency by antibiotics spectinomycin and streptomycin in cruciferous plants has been studied. It has been shown that the most probable cause of chlorophyll deficiency is knocking out plastid protein biosynthesis due to the reduction of plastid protein synthesis apparatus, in particular, ribosomal RNA as the most important component. This phenomenon is proposed as a model for studying biosynthetic functions of plastids.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kirk J. T. O., Tilney-Bassett R. A. E. The Plastids.—Amsterdam: Elsevier, 1978.
2. Ellis R. J. Inhibitors for studying chloroplast transcription and translation *in vivo* // Methods in Chloroplast Molecular Biology / Eds Edelman et al.—Amsterdam: Elsevier, 1982.—P. 559—564.
3. Borner T., Sears B. B. Plastome mutants // Plant Mol. Biol. Rep.—1986.—4.—P. 69—92.
4. Feierabend J., Berberich T. Heat-induced ribosome-deficiency of plastids — mechanisms and applications // The Translational Apparatus of Photosynthetic Organelles / Eds R. Mache.—Berlin, Heidelberg: Springer, 1991.—P. 215—227.
5. Зубко М. К. Стабільна хлорофілдефектність, індукована у крестоцвітних рослин з допомогою антибіотиків // Физиология и биохимия культурн. растений.—1999.—№ 6.—С. 467—477.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant.—1962.—15.—P. 473—497.
7. Poulson R. Isolation, purification and fractionation of RNA // The Ribonucleic Acids / Eds Stewart P., Latham D.—Berlin: Springer, 1973.—P. 243—261.
8. Day A., Ellis T. H. N. Deleted forms of plastid DNA in albino plants from cereal another culture // Curr. Genet.—1985.—9.—P. 671—678.
9. Sugiura M., Shinozaki K., Zaita N., Kusuda M., Kumano M. Clone bank of the tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplast genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments — mapping of 11 ribosomal protein genes // Plant Sci.—1986.—44.—P. 211—217.
10. Goldsbrough P. B., Cullis C. A. Characterization of the genes for ribosomal RNA in flax // Nucl. Acids Res.—1981.—9.—P. 1301—1309.
11. Sager R. Streptomycin as a mutagen for nonchromosomal genes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1962.—48.—P. 2018—2026.
12. Sarma N. P., Patnaik A. Streptomycin induced nuclear-cytoplasmic mutations in rice // Ind. J. Exp. Biol.—1982.—20, N 2.—P. 177—178.
13. Hess W. R., Muller A., Nagy F., Burner T. Ribosome-deficient plastids affect transcription of light-induced nuclear genes: genetic evidence for a plastid-derived signal // Mol. and Gen. Genet.—242.—P. 305—312.
14. Svab Z., Maliga P. *Nicotiana tabacum* mutants with chloroplast encoded streptomycin resistance and pigment deficiency // Theor. and Appl. Genet.—1986.—72.—P. 637—643.

УДК 575.224

Поступила в редакцию 20.07.98