

ISBN 978-5-02-037182-8



9 785020 371828

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ им. К.А. ТИМИРЯЗЕВА

В. В. КУЗНЕЦОВ

ГОРМОНАЛЬНАЯ
РЕГУЛЯЦИЯ
БИОГЕНЕЗА
ХЛОРОПЛАСТОВ

*Доложено
на семьдесят втором ежегодном
Тимирязевском чтении*



МОСКВА
НАУКА
2018

УДК 581.1
ББК 28.53
К89

*Президиум Академии наук СССР
постановил проводить научные чтения, посвященные памяти
выдающегося русского биолога К.А. Тимирязева,
ежегодно 3 июня, в день рождения ученого*

Ответственный редактор
профессор *Д.А. Лось*

Рецензенты:
доктор биологических наук *А.П. Веселов*,
доктор биологических наук *Н.П. Юрина*

Кузнецов В.В.

Гормональная регуляция биогенеза хлоропластов / В.В. Кузнецов; [отв. ред. Д.А. Лось]; Ин-т физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. — М.: Наука, 2018. — 112 с. — (Тимирязевские чтения; 72). — ISBN 978-5-02-037182-8.

Наличие пластид является важнейшей особенностью растительной клетки. За последние 20 лет благодаря применению главным образом молекулярно-генетических подходов достигнуты крупные успехи в исследовании механизмов действия фитогормонов, а также в изучении структуры пластидного и ядерного геномов. Значительный прогресс достигнут в изучении обмена генетической информацией между ядерным, пластидным и митохондриальным геномами. Совокупность полученных данных позволяет по-новому взглянуть на проблему биогенеза пластид. Становится все более понятной сложная регуляция биогенеза хлоропластов экзогенными (в первую очередь светом) и эндогенными (прежде всего фитогормонами) факторами. Имеющиеся результаты позволяют говорить о ключевой роли гормональной регуляции в развитии хлоропластов. Сложный набор постоянно меняющихся и взаимодействующих между собой регуляторных сигналов, вероятно, и направляет пластиды по тому или иному пути развития в зависимости от органной и тканевой специфики и особенностей условий окружающей среды.

Для физиологов растений, биохимиков, ботаников и работников смежных областей.

ISBN 978-5-02-037182-8

© Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 2018
© Кузнецов В.В., 2018
© ФГУП Издательство «Наука», редакционно-издательское оформление, 2018

ПРЕДИСЛОВИЕ

Главной особенностью растительной клетки является наличие хлоропластов, осуществляющих процесс фотосинтеза, т.е. синтез органического вещества из углекислого газа и воды за счет энергии Солнца. Благодаря процессу фотосинтеза растение, по выражению К.А. Тимирязева, выполняет «космическую роль» и, таким образом, фактически обеспечивает сохранение жизни на нашей планете, поскольку при фотосинтезе из неорганических образуются органические вещества, увеличиваются запасы кислорода в атмосфере нашей планеты и снижается уровень углекислого газа, который постоянно возрастает за счет дыхания живых организмов и практической деятельности человека. Неудивительно, что столь важные органеллы, какими являются хлоропласты, стали объектом активного изучения. Кроме фотосинтеза, они играют большую роль в метаболизме растительной клетки и поэтому иногда их называют «метаболическими станциями клетки».

Хлоропласты имеют геном размером 120–160 тыс. пар нуклеотидов, который кодирует 100–120 генов. Хлоропласты генетически полуавтономны: не менее 95% белков, обнаруженных в хлоропластах, кодируются ядерным геномом. Между ядром и хлоропластами существуют сложные взаимодействия. Ядро кодирует подавляющее количество белков, участвующих в экспрессии пластидных генов, практически все регуляторные белки и благодаря этому играет главную роль в биогенезе хлоропластов. Хлоропласты при любых функциональных изменениях посылают ядру так называемый ретроградный сигнал, который может привести к изменению экспрессии ядерных генов хлоропластных белков. Количество копий ядерных и пластидных генов, кодирующих полипептиды одного белкового комплекса хлоропластов, может различаться в тысячи раз, что также усложняет понимание взаимодействия ядра и хлоропластов. На экспрессию пластидных генов влияет не только ядро, но и митохондрии. Таким образом, биогенез хлоропластов и ответ хлоропластов на эндогенные сигналы и экзогенные факторы определяется тремя ДНК-содержащими органеллами клетки.

Среди многочисленных внешних факторов определяющее влияние на развитие всего растения, в том числе и хлоропластов,

оказывает свет. Без света невозможно формирование функционально активного фотосинтетического аппарата и невозможен процесс фотосинтеза. В регуляции биогенеза хлоропластов свет взаимодействует с фитогормонами, прежде всего с цитокининами, активирующими различные этапы развития хлоропластов, и абсцизовой кислотой, которая является антагонистом цитокининов, и подавляет этот процесс. Взаимодействие света и цитокининов в регуляции развития хлоропластов в настоящее время недостаточно изучено. В связи с новейшими достижениями в области изучения механизмов действия цитокининов их роль в регуляции биогенеза хлоропластов стала еще более очевидной. В пластидах обнаружены различные цитокинины (свободные основания, рибозиды, риботиды и N-глюкозиды) и четыре (1, 3, 5, 8) из семи изопентенилтрансферазы, катализирующие первую стадию синтеза транс-зеатина и изопентиладенина. Были выделены также транскрипционно-активные цитокинин-связывающие белки, однако пока нет практически никакой информации об их участии в передаче гормонального сигнала в хлоропласты.

Наибольший вклад в изучение гормональной регуляции биогенеза хлоропластов внес коллектив Лаборатории экспрессии генома растений ИФР РАН под руководством проф. О.Н. Кулаевой, а затем В.В. Кузнецова в сотрудничестве с проф. Оельмюллером (Йенский университет), проф. Херрманном (Мюнхенский университет) и проф. Бёрнером (Берлинский университет). Значительных успехов в изучении гормональной регуляции ферментов пути биосинтеза хлорофилла достиг коллектив белорусских ученых, руководимый проф. Н.Г. Авериной (Минск). В последнее время несколько крупных совместных работ выполнено учеными Германии и США (проф. Шмюлинг, Гринн и Шалер).

Тимирязевская лекция состоит из двух частей. В первой части кратко представлено молекулярно-биологическое обоснование биогенеза хлоропластов, а во второй – рассмотрена роль отдельных фитогормонов в регуляции экспрессии пластидного генома в ходе биогенеза хлоропластов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБК	абсцизовая кислота
АЛК	аминолевулиновая кислота
АПХ	аскорбатпероксидаза
АТ _{а-и}	антиидиотипические антитела
АФК	активные формы кислорода
БАП	6-бензиламинопурин
БС РБФК	большая субъединица рибулозобисфосфаткар- боксилазы
ГК	гиббереллин
ЗСБ	зеатин-связывающие белки
ИП	инвертированные повторы
ИПТ	изопентенилтрансфераза
ИУК	индолилуксусная кислота
МЖ	метилжасмонат
мтДНК	митохондриальная ДНК
НФ	гербицид норфлуразон
ПЛТ	проламеллярные тела
ПОР	NADPH-протохлорофиллидоксиоредуктаза
п.н.	пара нуклеотидов
ПНФ	полинуклеотидфосфорилаза
ПротоIX	протопорфирин IX
ПЦР	полимеразная цепная реакция
СИТ	сайт инициации транскрипции
ТАС	транскрипционно-активная хромосома
ТМ	тилакоидные мембраны
ТМХ	тилакоидные мембраны хлоропластов
т.п.н.	тысячи пар нуклеотидов
ТПР	транспластомные растения
ФСІ	фотосистема I

ФСII	фотосистема II
хлДНК	хлоропластная ДНК
ЦК	цитокинин
ЦСБ	цитокинин-связывающие белки
ЭБ	эпибрассинолид
ЭТЦ	электрон-транспортная цепь
CES контроль	контроль последовательным синтезом (control by epistasy of synthesis)
ДАPI	4',6-диамидино-2-фенилиндол
DBMIB	[(2,5-дибром-3-метил-6-изопропилбензохинон)]
DCMU	[3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина]
MgПротоIX	Mg-протопорфирин IX
NEP	хлоропластная РНК-полимераза ядерного кодирования фагового типа
PAP	белки, ассоциированные с хлоропластной РНК-полимеразой бактериального типа
PEP	хлоропластная мультисубъединичная РНК-полимераза бактериального типа
PPR	pentatricopeptide repeat protein
PQ	пластохинон

«С первым лучом света, упавшим на позеленевший лист, начинается самостоятельная жизнь, растение начинает вырабатывать новые органы уже не за счет других частей, а за счет окружающих неорганических соединений».

К.А. Тимирязев.
Жизнь растений, 1949 г., с. 87–88

ПРОИСХОЖДЕНИЕ ХЛОРОПЛАСТОВ

Наиболее доказанной и признанной в настоящее время является эндосимбиотическая теория происхождения клеточных органелл, согласно которой митохондрии и хлоропласты произошли от прокариотических организмов, которые проникли в эукариотическую клетку и стали в ней жить, как эндосимбионты. Данная теория постулирует, что митохондрии произошли от аэробных бактерий, возможно протеобактерий, а хлоропласты — от автотрофных прокариотов — цианобактерий. Эта гипотеза впервые была высказана в 1883 г. немецким ученым А. Шимпером (цит. по [1]), но в ее развитии большую роль сыграли российские ученые. В 1905 г. проф. Казанского университета К.С. Мережковский ввел термин «симбиогенез» и впервые детально сформулировал основные положения теории [2]. В 1907 г. А.С. Фаминцин также пришел к выводу, что хлоропласты являются симбионтами подобно грибам и водорослям в лишайниках. В 1920-е годы значительный вклад внес Б.М. Козо-Полянский, предположивший, что симбионтами являются и митохондрии. В 70–80-х годах прошлого века теория была значительно развита и обоснована в трудах Линн Маргулис (цит. по [1]).

По мнению ученых, в ходе эволюции 2.5–1.5 млрд лет назад образовалась первичная эукариотическая клетка, которая имела обособленное ядро, но она получала энергию за счет брожения и не была способна к дыханию (окислительному фосфорилированию) и к фотосинтезу. Предполагается, что у эукариотической клетки не было прочной клеточной стенки и в результате в нее попадали (были поглощены или проникли как паразиты) симбионтные аэробные бактерии. Цитоплазма клетки хозяйина стала для них стабильной средой обитания, симбионт поставлял клетке хозяйина энергию в виде АТФ, а от нее получал необходимые метаболиты. В ходе эволюции и значительного углубления метаболической взаимозависимости клеток эндосимбионт превратился в клеточную органеллу — митохондрию. Примерно 2 млрд лет назад эукариотическая клетка, содержащая предше-

ственник митохондрии, поглотила фотосинтезирующую цианобактерию, которая в ходе эволюции превратилась в хлоропласт. Цианобактерии, образовавшиеся 3–4 млрд лет назад, не только привели к накоплению кислорода в атмосфере нашей планеты, что вызвало расцвет аэробных эукариот, но и явились предшественниками хлоропластов, что привело к возникновению растений и определило дальнейшее развитие всего живого на планете.

Справедливость эндосимбиотической теории подтверждается многочисленными фактами, которые можно свести к двум главным положениям: 1) наблюдаются принципиальные различия в строении и организации клеток прокариот и эукариот; 2) обнаруживается значительное сходство между митохондриями и свободноживущими альфа-протеобактериями, а также между хлоропластами и цианобактериями.

Эукариоты обычно имеют размер клеток 5–80 мкм, а прокариоты в 5–10 раз меньше, объем же клеток различается на 3 порядка. В отличие от прокариот, эукариоты имеют развитую систему эндомембран, а также цитоскелет, состоящий из микротрубочек, микрофибрилл и микрофиламентов, который обуславливает цитоплазматическую подвижность. Геном эукариот представлен набором хромосом, в которых ДНК связана с гистонами (за очень редким исключением), а у прокариот обычно существует одна кольцевая хромосома, в которой отсутствуют гистоны.

Клеточные органеллы (митохондрии и хлоропласты) сходны с прокариотами размером и развитием эндомембран. ДНК органелл, как и у прокариот, обычно кольцевая, не имеет гистонов, более половины генов входят в состав оперонов. Система трансляции организована у органелл по прокариотическому типу. Многие компоненты генетической системы органелл (РНК-полимераза, регуляторные белки транскрипции, тРНК, рРНК, рибосомные белки) близки к прокариотическим. Однако длительное существование эндосимбионтов внутри эукариотической клетки привело к значительным изменениям в организации генетического аппарата митохондрий и хлоропластов. Прежде всего, в ряде генов эндосимбионтов появились интроны (в хлоропластных геномах 15–17 генов имеют интроны), которые почти не встречаются у прокариот. Таким образом, для клеточных органелл свойственны признаки как прокариот, так и эукариот.

Кроме того, митохондрии и хлоропласты являются полуавтономными органеллами, поскольку значительная часть жизненно важных генов, ранее находившихся в бактериальном геноме, перенесена в ядерный геном клетки-хозяина. Это привело к невозможности полноценного существования и деления хлоропластов и митохондрий вне клетки-хозяина, хотя есть сообщения, что

изолированные хлоропласты в специальных питательных средах могут жить и осуществлять фотосинтез до 3 месяцев.

Для изучения эволюции органелл исключительно важно найти эукариотов, в которых эндосимбионты (будущие митохондрии и хлоропласты) находились бы на более раннем этапе эволюции, когда они еще не полностью интегрированы с клеткой-хозяином. В этом плане большой интерес представляет амеба *Paulinella chromatophora*, относящаяся к типу *Cercozoa*, которая является одноклеточным эукариотом и осуществляет фотосинтез в хроматофорах, полученных от цианобактерий и, таким образом, является примером организма ранних стадий органеллогенеза. Показано, что хроматофор является фотосинтетической органеллой [3]. Секвенирование геномов двух штаммов *Paulinella* показало, что их размер почти 1 млн п.н., и они кодируют примерно по 850 белков, что значительно меньше, чем у свободноживущей цианобактерии *Synechococum* WH5701, которая содержит 3352 гена, кодирующих белки, но значительно больше, чем у хлоропласта, у которого около 70 генов кодируют белки. Большая часть генов фотосинтетических белков хлоропластов находится в ядре, в то время как у *Paulinella* — в геноме хроматофора [4]. Сравнение степени уменьшения генома и малочисленности перенесенных генов в ядерный геном *Paulinella* в сравнении с организмами, имеющими классические пластиды, позволяет рассматривать современное состояние хроматофора как раннюю стадию эволюции органелл [5].

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	3
Происхождение хлоропластов	7
Перенос оргanelьных генов в ядро	10
Ядерно-пластидные взаимодействия	15
Антероградный сигнал	16
Ретроградный сигнал	17
Взаимодействие пластидного сигнала и света в регуляции экспрессии ядерных генов, кодирующих пластидные белки	21
Взаимное влияние хлоропластов и митохондрий	22
Типы пластид и их дифференцировка	24
Регуляция дифференцировки пластид	26
Организация пластидного генома	28
Общая характеристика хлоропластной ДНК	28
Нуклеотидная организация пластидной ДНК	30
Структура хлоропластного генома	32
Транскрипция пластидного генома. Основные компоненты пластидной транскрипции	36
Пластидная РНК-полимераза бактериального типа	36
Сигма-факторы	36
Белки, связанные с коровыми субъединицами РЕР	38
Хлоропластные РНК-полимеразы ядерного кодирования	39
Посттранскрипционная регуляция. Теоретическое введение	41
Процессинг хлоропластных РНК	41
Созревание 5'-концов РНК	42
Созревание 3'-концов РНК	43
Редактирование РНК	43
Сплайсинг пластидных транскриптов	45
Регуляция экспрессии пластидного генома. Свет и фитогормоны – важные факторы регуляции экспрессии пластидных генов	47
Влияние цитокинина и АБК на содержание фотосинтетических пигментов	49
Гормональная регуляция биосинтеза хлорофилла	51
Влияние ЦК и АБК на ультраструктуру хлоропластов	55
Гормональная регуляция функциональной активности хлоропластов	55
Регуляция цитокининами и АБК уровня пластидных белков	57

Влияние фитогормонов на уровень транскриптов пластидных и ядерных генов хлоропластных белков	60
Посттранскрипционная регуляция экспрессии генов пластидных белков фитогормонами. Возможные механизмы	62
Влияние цитокинина и АБК на сборку полисом	62
Стабильность транскриптов пластидных генов	64
Регуляция экспрессии пластидных генов на уровне процессинга	66
CES-контроль	67
Фитогормоны и транскрипция пластидного генома	69
Цитокинины регулируют транскрипцию пластидных генов	69
Взаимодействие между ЦК и светом в регуляции хлоропластной транскрипции	73
АБК и ЦК оказывают противоположный эффект на хлоропластную транскрипцию	75
Участие других фитогормонов в регуляции пластидной транскрипции	76
Белки, участвующие в регуляции пластидной транскрипции	80
Транскрипционно-активные хлоропластные цитокинин-связывающие белки.....	82
Цитокинин и свет регулируют транскрипцию <i>ATPC</i> гена, действуя через одни и те же <i>цис</i> -элементы и, возможно, <i>транс</i> -факторы	84
Возможные пути передачи цитокининового сигнала в хлоропласты	89
Литература	95

Научное издание

Кузнецов Виктор Васильевич

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ БИОГЕНЕЗА ХЛОРОПЛАСТОВ

72-е Тимирязевское чтение

Утверждено к печати Ученым советом

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Институтом физиологии растений

им. К.А. Тимирязева Российской академии наук

Редактор *Л.В. Филиппова*

Художественный редактор *В.Ю. Яковлев*

Корректоры *А.Б. Васильев, Т.И. Шеповалова*

Подписано к печати 26.06.2018

Формат 60×90 1/16. Гарнитура Таймс. Печать офсетная

Усл.печ.л. 7,0. Уч.-изд.л. 8,0

Тираж 300 экз. Тип. зак.

ФГУП Издательство «Наука»
117997, Москва, Профсоюзная ул., 90

E-mail: secret@naukaran.com
www.naukaran.com

ФГУП Издательство «Наука»
(Типография «Наука»)
121099, Москва, Шубинский пер., 6