

ВЛИЯНИЕ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ НА ПРОХИБИТИНЫ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Коротаева Н.Е., Бельков В.И., Тарасенко В.И., Боровский Г.Б.

Сибирский Институт Физиологии и Биохимии Растений СО РАН, Иркутск, ул. Лермонтова, 132, Россия, 664033, 7(3952)424659, факс 7(3952)510754, knev73@mail.ru

Прохибитины (Phb) - белки мембран, предположительно, исполняющие структурные, сигнальные, антистрессовые и антиапоптотические функции [1]. Phb клеток растений, животных и микроорганизмов присутствуют во внутренних мембранах митохондрий, ядерных мембранах и плазмалемме, у растений также во внутренней мембране хлоропластов и тонопласте, где организованы в крупный кольцевой мультимерный комплекс, состоящий из нескольких прохибитинов I и II типов [1]. Прохибитины арабидопсиса Phb3 (локус At5g40770) и Phb4 (локус At3g27280) относятся к I (т.н. малоинтронному) типу, считается, что они появились в результате дупликации и филогенетически наиболее тесно связаны между собой по сравнению с генами других прохибитинов [1]. Экспрессия многих генов, которые значительно активируются абиотическими стрессами, изменяется при мутации гена Phb3, что говорит в пользу его регуляторной роли при ответе на стресс [1]. Таким образом, изменение уровня экспрессии генов или содержания белков Phb3 и Phb4 может быть одним из факторов регуляции стрессового ответа. В настоящее время принято, что митохондрии играют важную роль в формировании устойчивости, с одной стороны, и в осуществлении программируемой гибели в условиях стресса, с другой. Изменение содержания прохибитинов, в частности белков Phb3 и Phb4, может модулировать состояние мембран митохондрий и быть одним из факторов развития стрессового ответа. Таким образом, прохибитины могут участвовать в системе митохондриально-ядерной (ретроградной) регуляции в ответ на стрессовые условия.

Целью данной работы было описание изменения содержания транскриптов и белков AtPhb3 и AtPhb4 в ответ на воздействие теплового шока (ТШ) и окислительного стресса (ОС), а также выявление значения этих белков для формирования стрессового ответа.

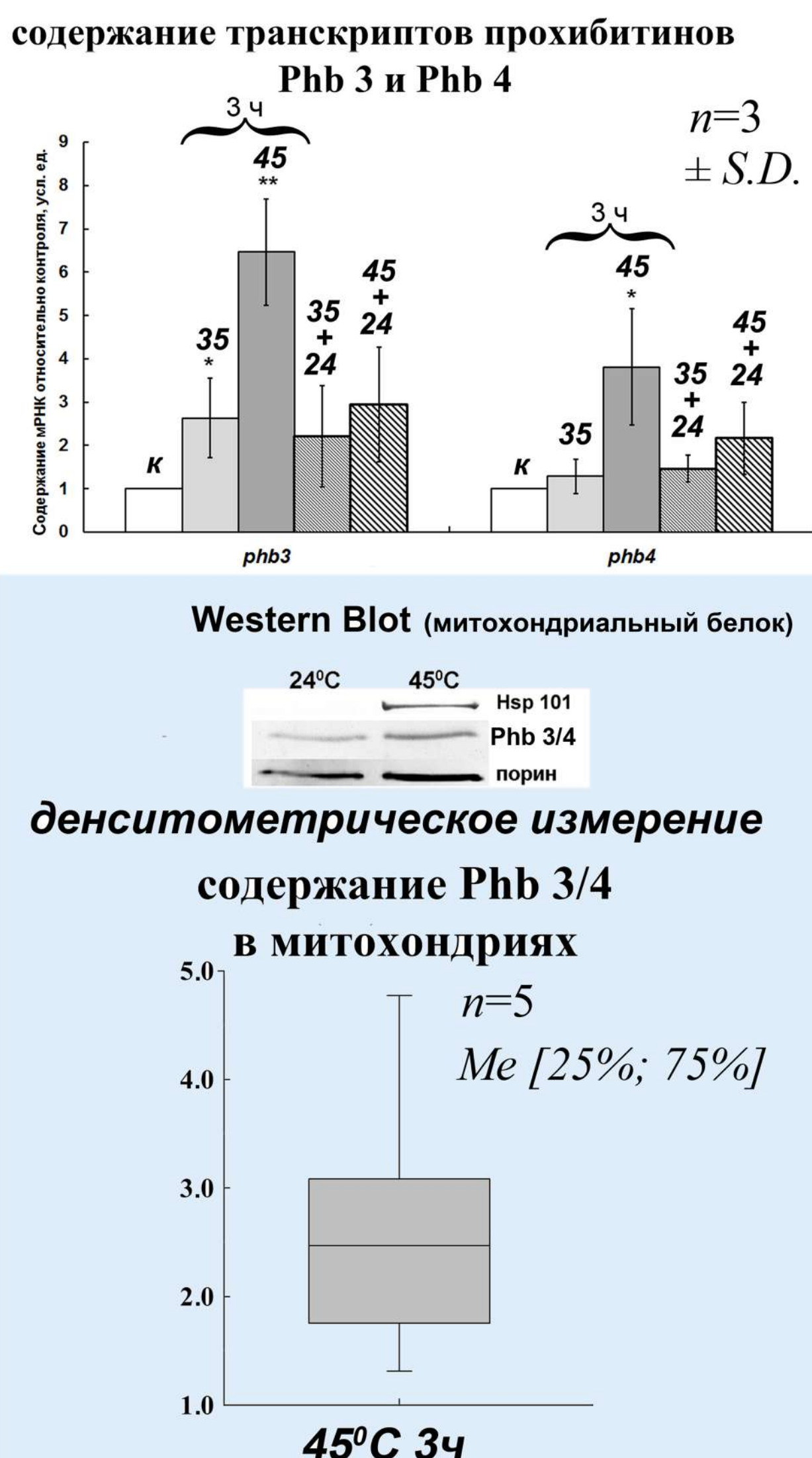


Рисунок 1. Влияние ТШ на содержание прохибитинов. к - растения не обрабатывали ТШ; 3 ч - время обработки; 35+24 - 3 ч при 35°C, затем 24 ч при 24°C; 45+24 - 3 ч при 45°C, затем 24 ч при 24°C. Уровень транскриптов исследуемых генов в контроле был принят за 1. Интенсивность окрашивания белкового пятна общего или митохондриального белка определяли с помощью программы Gel Analysis и выражали ее в условных единицах относительно интенсивности окрашивания в контроле, который принимали за 1. Me [25%; 75%] - представлена медиана и процентиля, бары показывают минимальное и максимальное значения. Western Blot - представлены типичные мембраны. a - различия между вариантами отсутствуют; b, c, d, e, f - различия достоверны при p<0,05 между вариантами 1 и 8; 2 и 8; 4 и 8; 2 и 9; 4 и 9, соответственно. Вывод. ТШ приводит к дозозависимому накоплению Phb 3/4.

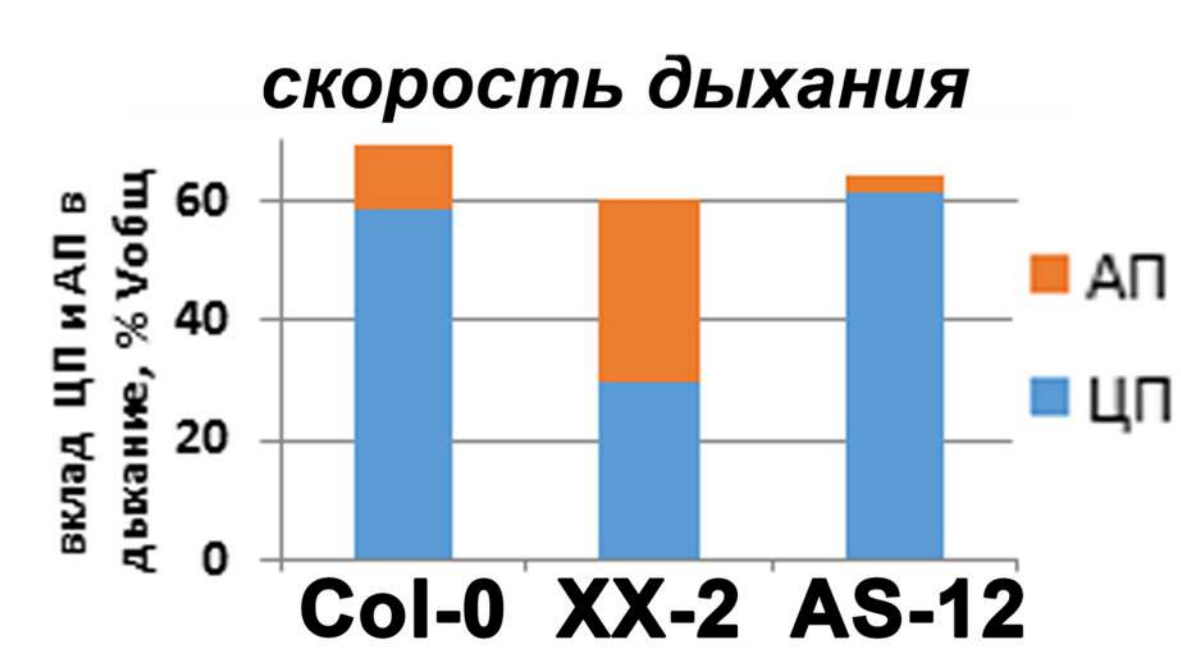


Рисунок 3. Влияние уровня экспрессии гена AOX1a на содержание Phb 3/4 после ТШ. ЦП - вклад цитохромного пути дыхания; АП - вклад альтернативного пути дыхания. При оценке скорости дыхания использовали исеченные инфильтрованные листья контрольных растений. ТШ - 45°C, 3 ч. Интенсивность окрашивания белкового пятна определяли с помощью программы Gel Analysis и выражали ее в условных единицах относительно интенсивности окрашивания в контроле у растений Col-0, которое принимали за 1. Western Blot - представлены типичные мембраны. Вывод. При действии ТШ содержание Phb 3/4 зависит от уровня экспрессии гена AOX1a.

Выводы. Судя по полученным результатам, прохибитины являются перспективным объектом для дальнейшего изучения возможностей с помощью изменения экспрессии кодирующих их генов воздействовать на стрессоустойчивость растения, поскольку ТШ оказывает влияние на содержание транскриптов и белков Phb 3/4, изменение экспрессии генов AtPhb3 и AtPhb4 оказывает действие на накопление стрессовых белков, являющихся важным фактором стрессоустойчивости. Также, полученные результаты говорят в пользу связи между содержанием Phb3/4 и развитием ОС в листьях арабидопсиса. Однако, условия ОС действуют на прохибитины противоречиво. Накопление молекул "окислительного взрыва" (H₂O₂ и супероксидного аниона) не влияет, либо способствует снижению содержания Phb3/4, а изменение уровня экспрессии гена, кодирующего альтернативную оксидазу, которая в митохондриях является регулятором образования АФК, приводит к накоплению Phb 3/4 при действии ТШ.

Материалы и методы. Для исследования использовали 25-дневные растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh дикого типа (экотип Колумбия, Col-0), растения с инактивированной экспрессией генов AtPhb3 и AtPhb4 (Vlaams Instituut voor Biotechnologie, Gent, Belgium), трансгенные линии с инактивированной (AS12) и повышенной (XX2) экспрессией гена AOX1a (альтернативной оксидазы митохондрий), мутантная линия fro (с инактивированным геном, кодирующим FeS-содержащую субъединицу комплекса I), выращенные на грунте в климатических камерах MKT-240 ("Binder", Германия) с режимом день-ночь (24°C, 16 и 8 ч., освещенность 140 или 55 мкмоль м⁻² с⁻¹). Для воздействия ТШ растения прогревали в различных режимах в ростовой камере Binder M-154 (Германия). Для воздействия ОС срезанные розетки погружали в раствор пероксида водорода различных концентраций и инкубировали без освещения в ростовой камере при 22°C. Содержание супероксидного аниона или H₂O₂ в листьях определяли окрашиванием с раствором, соответственно, нитросинего тетразолия (NBT) или 3,3-диаминобензидина (ДАВ). Для денситометрической оценки степени окрашивания листьев с применением ДАВ использовали программу ImageJ. Для выделения мРНК с последующим синтезом кДНК и количественной ПЦР с праймерами к Phb3 и Phb4 использовали зеленые листья. Из листьев также выделяли общий белок или очищенные митохондрии; Phb3/4, порин, альтернативную оксидазу и стрессовые белки идентифицировали иммунохимически с помощью первичных антител против белков Phb3 и Phb4 (Phb3/4, антитела любезно предоставлены док. Hillel Fromm, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel [2]), против стрессовых белков Hsp 101, Hsp 70, Hsp 17,7 (II) и AOX1a (Agrisera); против порина (любезно предоставлены Prof. T. Elthon, University of Nebraska, США). Содержание белков нормализовали по окраске геля Кумасси. Для построения диаграмм и оценки достоверности различий использовали программы Excel, SigmaPlot и Statistica. Достоверность различий определяли по критерию Краскела-Уоллиса.

Литература

1. Van Aken O., Whelan J., Van Breusegem F. Prohibitins: mitochondrial partners in development and stress response // Trends Plant Sci. 2010. Vol. 15. P. 275-282.
2. Snedden W.A., Fromm H. Characterization of the plant homologue of prohibitin, a gene associated with antiproliferative activity in mammalian cells // Plant Mol Biol. 1997. № 33. P. 753-756.
3. Myoung F., Hosoda C., Umezawa T. et al. A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in Arabidopsis // Plant Cell 2008. Vol. 20. P. 48-62.

Авторы выражают благодарность О.И.Грабелных за проведение оценки скорости дыхания.

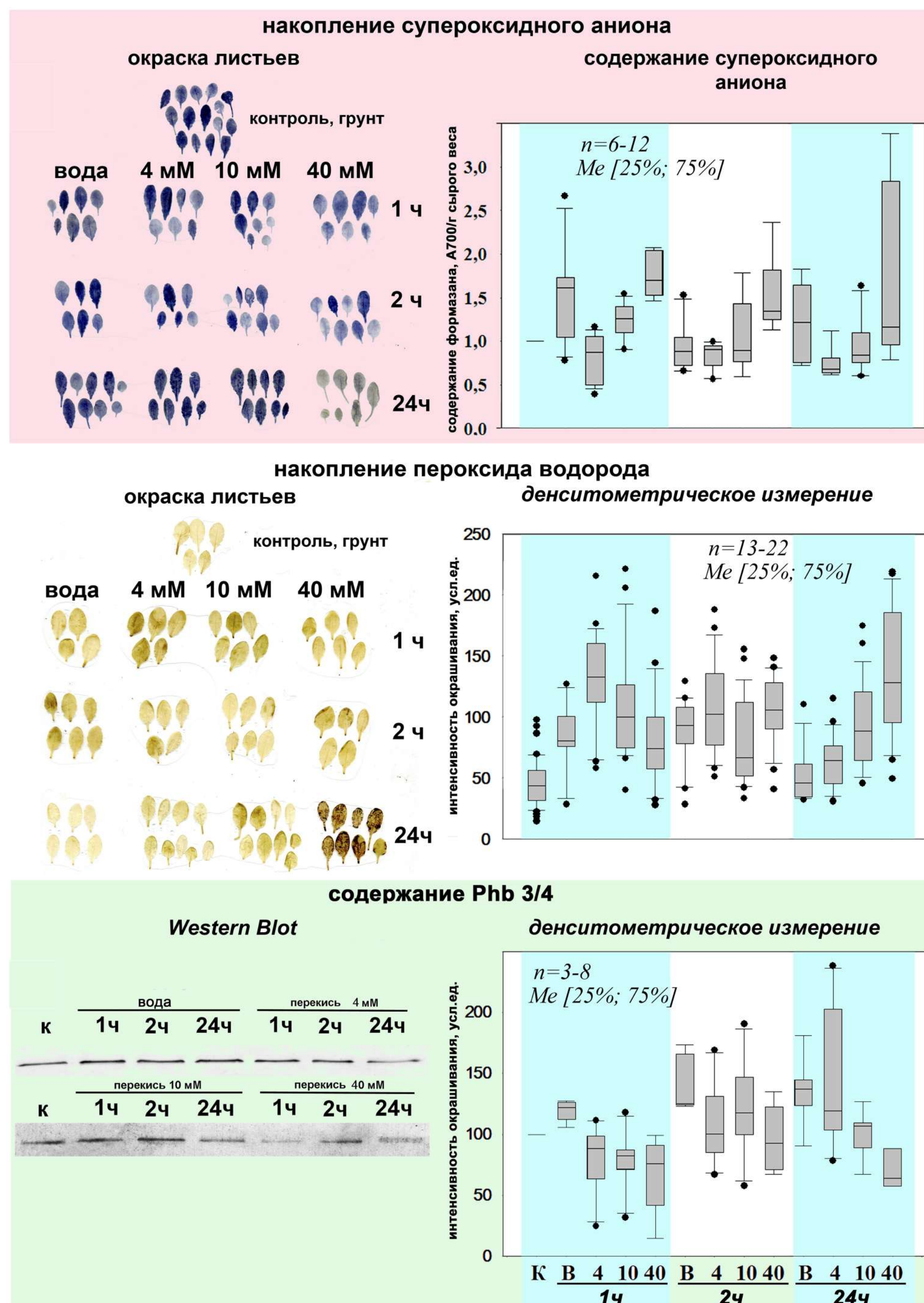


Рисунок 2. Влияние ОС на содержание прохибитинов. Для оценки количества супероксида из окрашенных листьев выделяли образовавшийся формазан, содержание которого измеряли при 700 нм [3]. Полученное значение пересчитывали относительно контроля (к, грунт - растения без обработки H₂O₂), принятого за 1. Оценка содержания пероксида водорода см. - **Материалы и методы.** Интенсивность окрашивания белкового пятна после Western Blot определяли денситометрически с помощью программы Gel Analysis и выражали ее в условных единицах относительно интенсивности окрашивания в контроле, который принимали за 1. Me [25%; 75%] - представлена медиана и процентиля, бары и точки показывают минимальное и максимальное значения. Western Blot - представлена типичная мембрана. Количество контрольного образца для Western Blot было идентичным на каждой мембране. Вывод. ОС приводит к снижению содержания Phb 3/4.

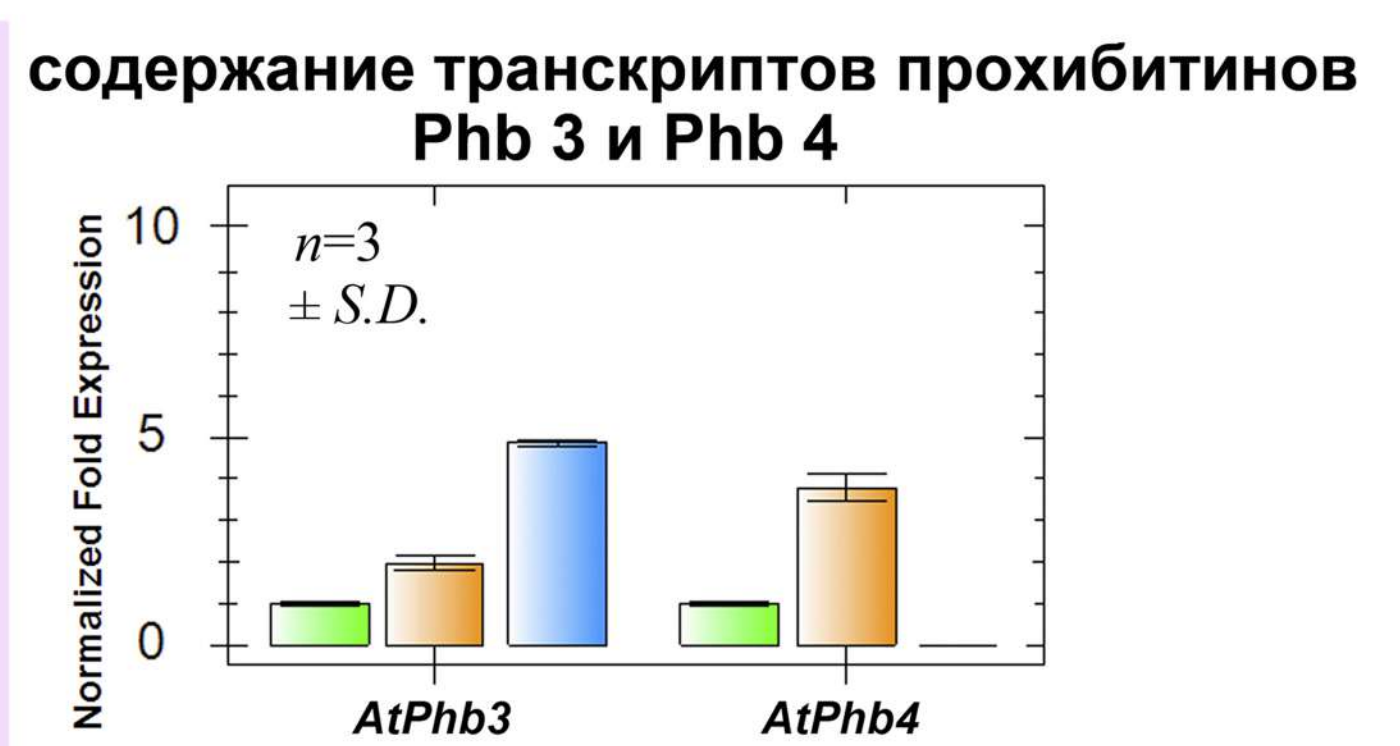
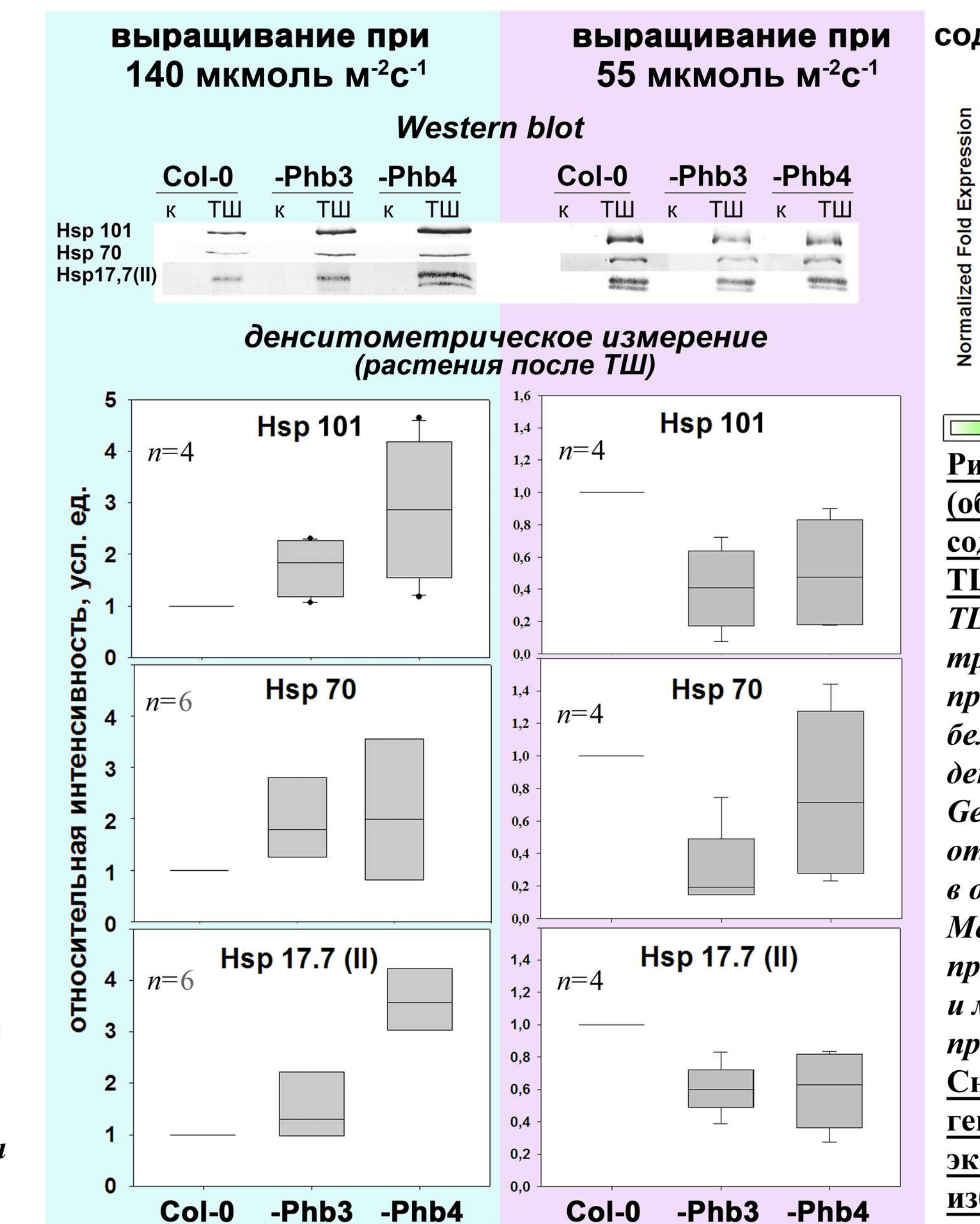


Рисунок 4. Влияние инактивации генов AtPhb3 (образец -Phb3) и AtPhb4 (образец -Phb4) на содержание стрессовых белков при действии ТШ и различного уровня освещенности. ТШ - 42°C, 2 ч. Уровень содержания транскриптов исследуемых генов у Col-0 принят за 1. Интенсивность окрашивания белкового пятна после Western Blot определяли денситометрически с помощью программы GelDoc и выражали ее в условных единицах относительно интенсивности окрашивания в образце Col-0 ТШ, который принимали за 1. Me [25%; 75%] - представлена медиана и процентиля, бары показывают минимальное и максимальное значения. Western Blot - представлена типичная мембрана. Вывод. Снижение экспрессии одного из исследованных генов приводит к компенсаторному росту экспрессии другого гена. Рост в условиях избыточного освещения и повышенная экспрессия AtPhb3 приводят к усиленному накоплению стрессовых белков под действием ТШ.