

УДК 577:122:58.036.2

О. С. Талалаєв

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного Національної академії наук України, Київ
e-mail: atalalaev@yahoo.com

Вплив умов повільного клиностатування на експресію низькомолекулярних білків теплового шоку *Pisum sativum* L.

Надійшла до редакції 26.10.06

Представлено результати вивчення експресії генів білків теплового шоку *Pisum sativum* за умов повільного клиностатування та температурного шоку. Досліджували двох представників класу цитозольних низькомолекулярних білків теплового шоку (small heat shock proteins, sHsp) sHsp 17.7 та sHsp 18.1. Обидва протеїни здатні підвищувати рефолдінг хімічно денатурованих білків за АТФ-незалежною схемою, тобто функціонувати як молекулярні шаперони. Для визначення змін експресії sHsp етильованих проростків гороху ми використовували методи імуноблотінгу. Використовуючи RT-PCR, ми визначали наявність мРНК відповідних генів. Експериментальні дані впливу температурного стресу на зміни зазначених параметрів використовували як контрольні. Експресія одного з так званих «генів домашнього господарства», актину 2, досліджувалася за тією ж схемою та використовувалась як контроль. Зроблено припущення, що клиностатування як засіб моделювання умов мікрогравітації, не змінює експресії sHsp.

ВСТУП

Велика кількість біотичних та абіотичних стресових факторів впливає на рослинний організм протягом його онтогенезу та викликають специфічні фізіологічні зміни. Основним значенням цих змін у більшості випадках є підвищення толерантності до несприятливих впливів через запобігання та/або відновлення пошкоджень викликаних стресором. Відповідь на стрес є загальною для всіх організмів та характеризується синтезом певних білків, що зветься білками теплового шоку, що також беруть участь у важливих ростових процесах та функціонують як молекулярні шаперони — зв'язують частково денатуровані субстрати, таким чином запобігаючи їхній незворотній агрегації або сприяють їхньому коректному фолдінгу.

На клітинному рівні космічний політ асоційований з пошкодженнями самоорганізації мікро-

трубочок [4] певних метаболічних процесів [2, 4] та змінами у розподілі іонів кальцію [4, 5]. На рівні організму рослини відповідають на космічний політ різноманітними змінами базових фізіологічних процесів, таких як інтенсивність транспорту електронів, фотосинтетична активність [9], синтез певних стресових метаболітів, характерних для гіпоксидного стресу [7]. Беручи до уваги ці зміни, ми припустили, що всі вони є наслідком впливу умов мікрогравітації, що як стресор здатна змінювати експресію генів цитозольних білків теплового шоку. З метою перевірки цього припущення ми використали клиностатний експеримент.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В основі експерименту було пророщування паростків гороху за умов повільного горизонталь-

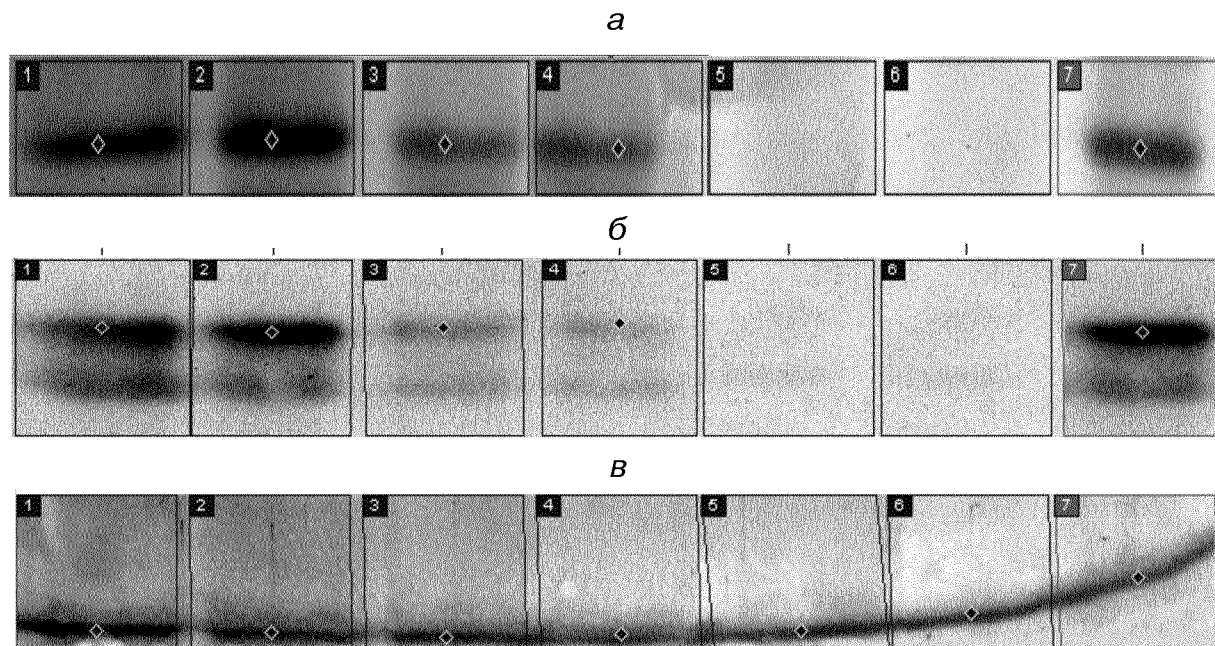


Рис. 1. Накопичення sHsp 17.7 (а), детектоване за допомогою специфічних поліклональних антитіл. Блоти 40 мкг сумарного білка, виділеного з контрольних (Con.), експериментальних (Clin.) проростків (22 °С) та температурного експерименту (HS). 1 — 24-та година, контроль; 2 — 24-та година клиноста; 3 — 48-ма година, контроль; 4 — 48-ма година, клиноста; 5 — 72-та година, контроль; 6 — 72-та година, клиноста; 7 — тепловий шок; б — те ж для sHsp 18.1; в — те ж для актину 2

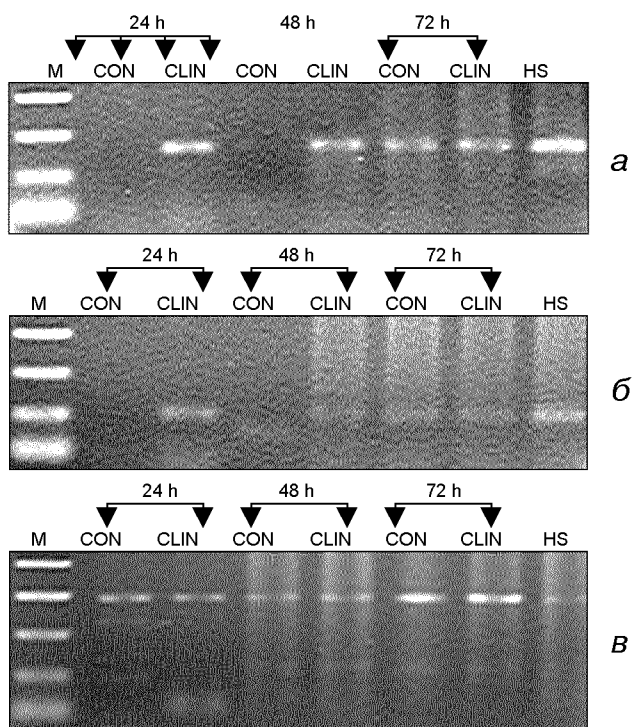


Рис. 2. Експресія мРНК sHsp 17.7 (а), sHsp 18.1 (б) та актину 2 (в). Агарозний гел-електрофорез продуктів реакції зворотної транскрипції та ПЦР. Ампліфікони розміром 144 бп. М-50 бп ПЦР-маркер бенди від 200 до 50 бп

ного клиноштатування (2 об/хв) протягом трьох діб у темряві. Як контроль стресового впливу трьохдобові паростки піддавали впливу температурному стресу (42 °C) протягом чотирьох годин згідно із методом [1], підвищуючи температуру до максимуму поступово (4 °C/г). Виділення сумарних білків та денатуруючий гель-електрофорез проводили за методикою [3].

Після електрофорезу білки перенесли на нітроцелюлозну мембрану для використання у реакціях імунодетекції. Мембрани блокували протягом 30 хв у розчині фосфатного буферу (5.8 мМ Na₂HPO₄, рН 7.4, 145 мМ NaCl, 0.1 % [v/v] Tween 20), доповненого 5 % знежиреного сухого молока, інкубували протягом 2 год у тому ж розчині, що містив антитіла до відповідних sHsp (отримані від лабораторії проф. Vierling Університету Аризони, Тусон, США) у розведенні 1 : 500. Після потрібного відмивання фосфатним буфером мембрани інкубували протягом 3 год у фосфатному буфері з розведеними у співвідношенні 1 : 1000 пероксидаза-кон'югованими вторинними антитілами вівці. Відмивали тричі у фосфатному буфері та візуалізували у розчині 3,3'-діамінобензидину тетрагідрохлориду дигідрату (Fluka) та 9 мМ H₂O₂.

Сумарну РНК виділяли з етильованих проростків гороху з використанням TRI REAGENTT (Sigma) за відповідним виробничим протоколом. Реакцію зворотної транскрипції проводили за допомогою oligo-dT¹⁸ праймерів (Sigma). Полімеразну ланцюгову реакцію проводили використовуючи праймери, специфічні до відповідних послідовностей генів sHsp та актину 2 (Gene Bank). Відбір праймерів проводили за допомогою Vector NTI Oligo DesignTM. Використовували для *PsHsp* 17.7 sense, 5'-ATC AAA ACG TGC GAC AAA CA, anti-sense, 5'-GCA TGT CCA CCA TAA ACA CG, *PsHsp* sense, 5'-GAC GTC TGG GAT CCT TTG AA, anti-sense, 5'-TTT CAG CCC AGG AAG ATC AG; *PsActin* 2 sense, 5'-GCT GAG GCT GAT GAT ATT CAA CCA A, anti-sense, 5'-ATA CCG GTA CCA TTG CAC ACG A. Продукти RT-PCR розділяли у 2 %-му агарозному гелі, візуалізували в ультрафіолетовому світлі та фотографували за допомогою системи візуалізації гелів (Bio-Vision). Для оцінки кількості продуктів використовували програмне забезпечення Image Mater Total LabTM.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Результати імунологічних досліджень експресії низькомолекулярних білків теплового шоку клиноштатованих паростків гороху при різних ростових періодах (2—4 доби) були подібні до контрольних. На рис. 1 та в таблиці відображено результати імунодетекції sHsp 17.7, sHsp 18.1 та актину 2 на першу, другу та третю добу росту. Максимальну кількість накопичення *PsHsp* 17.7 та sHsp 18.1 спостерігали у температурному експерименті.

Кількість білку приблизно однакова при різних варіантах експериментів.

Наявність відповідних інформаційних РНК була визначена для двох генів цитозольних низькомолекулярних білків теплового шоку, представників різних класів цитозольних білків теплового шоку гороху. Максимальний рівень сигналу стресових генів спостерігали у варіантах впливу високої температури, що підтверджує роль sHsp як стресових білків. Результати для обох досліджуваних генів на 24-ту годину експерименту характеризувалися відсутністю сигналу в контролі та наявністю сигналу у експериментах з клиноштатування. На 48 год експерименту отримали подібні результати — відсутність сигналу у контролі та наявність сигналу у клиноштатних зразках. На третю добу росту (72 год) фіксували сигнал у контролі та експерименті (рис. 2, а, б).

Також аналізували експресію гену актину 2 — наявність сигналу фіксували у всіх варіантах (рис. 2, в).

Описаний експеримент був проведений для визначення можливого впливу частково змо-

Накопичення sHsp 17.7, sHsp 18.1 та актину 2. Результати у відсотках від кількості температурного експерименту, які брали за 100 % та використовували як контроль

Експеримент	sHsp 17.7	sHsp 18.1	актин 2	
24 год	Con.	97.2	83.1	99.5
	Clin.	85	98.2	99.7
48 год	Con.	29.7	70.6	97.4
	Clin.	22.1	65.9	98.2
72 год	Con.	0	0	98.7
	Clin.	0	0	99
	HS	100	100	100

дульованих умов мікрогравітації на експресію низькомолекулярних білків теплового шоку. Термін експерименту (3 доби) обрали виходячи з літературних даних, що свідчили про поступове зменшення кількості стресових білків, накопичених під час висихання насінин, у різних видів рослин на перших етапах проростання [8]. Передбачали можливість порівняння темпів гідролізу досліджуваних білків при різних гравітаційних впливах та рівень експресії відповідних мРНК. Дані, отримані за результатами імуноблотінгу, дозволяють зробити припущення, що кліностатування як стресова умова не спричиняє відчутного впливу на експресію низькомолекулярних стресових білків. Проте збільшення термінів експерименту, наприклад до 5 діб, та використання чутливіших методів детекції (ELC-методика) може відкрити більш детальну картину та дати можливість зробити точніші висновки.

Подібні висновки можна зробити і щодо дослідження експресії мРНК. Хоча кліностаатні експерименти продемонстрували певний вплив на рівень експресії відповідних генів, чітких висновків без використання чутливіших методів (ПЦР у реальному часі) та накопичення статистичних даних зробити не можна. Проте порівняння експресії на рівні білків та їхніх мРНК дозволяє зробити припущення про відмінність регуляції експресії sHsp-генів при нормальних умовах та при умовах альтернативної гравітації (кліностаування).

1. Chen Q., Lauzon L. M., DeRocher A. E., Vierling E. Accumulation, stability and localization of a major chloroplast heat shock protein // *J. Cell. Biol.*—1990.—**110**.—P. 1873—1883.
2. Hampp R., Hoffmann E., Schonherr K., et al. Fusion and metabolism of plant cells as affected by microgravity // *Planta*.—1997.—P. 42—53.

3. Hernandez L. D., Vierling E. Expression of low molecular weight heat-proteins under field conditions // *Plant Physiol.*—1993.—**101**.—P. 1209—1216.
4. Kordyum E. L. Biology of plant cell in microgravity and under clinorotation // *Int. Rev. Cytology.*—1997.—**171**.—P. 1—78.
5. Merkys A., Darginaviciene J. Plant gravitropic response // *Adv Space Biol. Med.*—1997.—**6**.—P. 213—230.
6. Papaseit C., Pochon N., Tabony J. Microtubule self-organization is gravity-dependent // *Proc Natl Acad Sci USA*; 97:8364-8368, 2000.
7. Porterfield D. M., Matthews S. W., Daugherty C. J., Musgrave M. E. Spaceflight exposure effects on transcription, activity, and localization of alcohol dehydrogenase in the roots of *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol.*—1997.—**113**.—P. 685—693.
8. Sun W., Van Montagu M., Verbruggen N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants // *Biochem. Biophys. Acta.*—2002.—**1577**.—P. 1—9.
9. Tripathy B. C., Brown C. S., Levine H. G., Krikorian A. D. Growth and photosynthetic responses of wheat plants grown in space // *Plant Physiol.*—1996.—**110**.—P. 801—806.

THE INFLUENCE OF SLOW CLINOROTATION ON THE EXPRESSION OF SMALL HEAT SHOCK PROTEINS IN *PISUM SATIVUM L.*

O. S. Talalaiev

The stress gene expression in *Pisum sativum L.* seedlings exposed to altered gravity and temperature elevation is evaluated. We investigate message for two inducible forms of cytosolic small heat shock proteins (sHsp), sHsp 17.7 and sHsp 18.1. Both proteins are able to enhance the refolding of chemically denatured proteins in ATP-independent manner, i.e., they can function as molecular chaperones. The sHsp expression in pea seedling cells is studied by Western blotting. Applying the RT-PCR, we explore sHsp mRNA. Temperature elevation, as the positive control, significantly increased the PsHsp 17.7 and PsHsp 18.1 expression. The expression of the housekeeping protein, actin, was constant and comparable to unstressed controls for all of the treatments. We can conclude that gravitational perturbations incurred by clinorotation do not change the sHsp gene expression.