

УДК 581.134:581.142+581.84

Л. Е. Козеко

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного Національної академії наук України, Київ

Влияние реальной и моделированной микрогравитации на генную экспрессию белков теплового шока

Надійшла до редакції 26.10.06

Розглядається можливість участі білків теплового шоку в адаптації живих систем до мікрогравітації. Аналізуються літературні дані про зміни генної експресії білків теплового шоку у клітинах під впливом реальної та модельованої мікрогравітації. Робиться висновок про необхідність системних досліджень.

ВВЕДЕНИЕ

Осуществление пилотируемых полетов требует создания контролируемых экологических систем жизнеобеспечения космонавтов, необходимым компонентом которых является автотрофное звено — зеленые растения. В условиях космического полета растения способны расти и развиваться, проходят полный жизненный цикл, давая потомство [20]. Вместе с тем имеются многочисленные данные о различных отклонениях от нормы: активации или торможении процессов роста и развития, изменении пространственной ориентации органов растений, ультраструктуре клеток, перестройках метаболизма [3, 5, 10, 19]. Показано, что одним из основных факторов космического полета, негативно действующих на живые объекты, является микрогравитация [1, 4]. Выявленные в космических экспериментах изменения ультраструктуры, генной экспрессии и активности различных метаболических путей, как специализированных к восприятию гравитационного сигнала клеток, так и неспециализированных, позволили сделать вывод о гравичувствительности растительной клетки [3]. Это фундаментальное открытие поставило перед биологами новую задачу поиска путей

адаптации клетки к невесомости. На это направлены биологические эксперименты в условиях космического полета, а также наземные эксперименты, позволяющие моделировать отдельные биологические эффекты микрогравитации (параболические полеты, свободное падение в шахтах, различного рода клиностатирование).

К изменениям внешних факторов растение адаптируется путем перестроек физиологических и биохимических процессов, необходимых для установления клеточного гомеостаза, совместимого с новыми условиями. Согласно унифицированной концепции стресса в ответ на внешние изменения в растении в первую очередь развивается быстрая неспецифическая стрессовая реакция, в то время как для полной адаптации требуется более продолжительное действие фактора [14]. Генетический контроль стресс-реакции достаточно сложный, начиная с восприятия и передачи внешнего сигнала до запуска генов, участвующих как в неспецифической, так и в специфической для данного фактора стрессовой реакции. Известно, что скорость адаптации к любым внешним воздействиям тем выше, чем выше уровень неспецифических защитных клеточных механизмов [13]. Неспецифическая стрессовая реакция включает в себя

активацию экспрессии групп генов, кодирующих белки и ферменты, которые играют непосредственную роль в защите клеточных и молекулярных структур. Это в первую очередь:

- белки теплового шока (БТШ), обеспечивающие защиту белков;
- антиоксидантные ферменты, участвующие в детоксикации активных форм кислорода;
- белки, участвующие в регуляции стабильности мембран через изменение их липидного состава;
- ферменты биосинтеза клеточных протекторов (таких как сахара, многоатомные спирты, бетаины, пролин и т. д.).

Протеомный анализ каллусных клеток *Arabidopsis*, подвергнутых клиноостатированию, показал статистически достоверные изменения содержания ряда белков, среди которых наряду с ключевыми ферментами энергетического, жирнокислотного, углеводного метаболизма, называются стрессовые белки [29]. В данной статье обсуждаются возможные пути участия БТШ в адаптации растений к изменению гравитационного воздействия как один из путей поиска стратегий повышения их продуктивности в условиях космического полета.

БЕЛКИ ТЕПЛООВОГО ШОКА

К белкам теплового шока относится ряд высококонсервативных семейств белков: БТШ110, БТШ100, БТШ90, БТШ70, БТШ60, БТШ40, низкомолекулярные БТШ и убиквитин [13, 26]. Эти белки найдены в значительном количестве в клетках большинства видов ныне живущих организмов. БТШ делят на индуцибельные, генная экспрессия которых инициируется при стрессе, и конститутивные (гомологи БТШ), синтез которых присущ клеткам при нормальных физиологических условиях [26]. БТШ участвуют в регуляции белкового гомеостаза клетки в качестве молекулярных шаперонов и протеолитических факторов [18]. Молекулярные шапероны принимают участие в различных стадиях биогенеза белков, регуляции их структуры и функций, включая фолдинг белков, сборку и разборку олигомерных белков, транспорт белков через мембраны, регуляцию их функциональной активности. Предполагают также, что БТШ вза-

имодействуют со специфическими мембранными доменами, изменяя такие важные для клеточной адаптации физические свойства мембран, как текучесть, стабильность бислоя, проницаемость [13]. Результаты исследования низкомолекулярных БТШ и БТШ90 у животных позволили говорить об участии этих белков в стабилизации структур цитоскелета [24, 27]. В качестве протеолитического фактора функционирует убиквитин. Белки, связанные с убиквитином, подвергаются деградации с помощью протеасом (мультикаталитических протеазных комплексов).

При действии стрессовых факторов, таких как высокая температура, гипоксия, озон, этанол, радиация, тяжелые металлы и др., молекулярные шапероны связывают и стабилизируют белки с частично или полностью нарушенной конформационной структурой, предотвращая нежелательные внутри- и межмолекулярные взаимодействия, агрегацию белков и обеспечивая восстановление нативного состояния, если это возможно [13, 26]. Те белки, которые не подлежат восстановлению, подвергаются протеолизу. При этом работа шаперонов и убиквитин-протеасомной протеолитической системы тесно связана между собой и координируется общими путями генетической регуляции [18].

БЕЛКИ ТЕПЛООВОГО ШОКА В УСЛОВИЯХ РЕАЛЬНОЙ И МОДЕЛИРОВАННОЙ МИКРОГРАВИТАЦИИ

Эксперименты по изучению влияния микрогравитации на генную экспрессию БТШ в условиях космического полета до настоящего времени единичны. В большей мере этот вопрос изучался в наземных экспериментах и преимущественно на животных клетках. Поскольку функции БТШ у разных видов организмов схожи, то, очевидно, представляет интерес анализ данных по их генной экспрессии в условиях микрогравитации у всех типов клеток. Доступные нам данные представлены в таблице. Их анализ не дает однозначного ответа на поставленный вопрос. Так, в космических экспериментах в большинстве случаев показано снижение содержания БТШ в клетках, тогда как в наземных экспериментах наблюдали либо повышение содержания этих белков, либо отсутствие изменений. Харак-

Изменения генной экспрессии БТШ под влиянием микрогравитации в условиях космического полета и в наземных экспериментах

БТШ	Объект	Воздействие, продолжительность	Метод	Изменение экспрессии	Ссылки
БТШ70	Культура остеобластов крысы	1 сут, полет	RT-PCR	Снижение	[11]
БТШ70, БТШ47	Культура остеобластов крысы	4 и 5 сут, полет	RT-PCR	Подавление	[12]
БТШ и убиквитин	Куколка дрозофилы	3.5 сут, полет; 3.5 сут, 3D-клиностаг	Мускоarray	Снижение	[9]
БТШ70, БТШ27	Скелетные мышцы крысы: — передняя большеберцовая — икроножная	17 сут, полет + 1 сут после приземления	Мускоarray	Повышение в 2.2 и в 2 раза соответственно Снижение в 5 и в 4 раза	[25]
БТШ70	Культура лимфобластных Т-клеток (Jurkat) человека	4 ч, биореактор RWV (8 или 53 об/мин)	RT-PCR	Нет изменений	[15]
БТШ70	Культура клеток эндотелия пупочной вены человека	24 ч, биореактор RWV	Вестерн-блот	Повышение (обратимое)	[7]
БТШ70, БТШ40	Культура Т-клеток человека	24 ч, биореактор RWV	Мускоarray	Повышение	[21]
БТШ70	Культура лимфоцитов периферической крови человека	24 и 72 ч, биореактор RWV	Мускоarray	Повышение более чем в 2 раза	[24]
БТШ90				Снижение более чем в 2 раза	
БТШ70	Культура эндотелиальных клеток быка: — аорты — капилляров	96 ч, биореактор RWV	Вестерн-блот	Повышение Без изменений	[8]
БТШ70, БТШ60	Культуры клеток VSMC мыши и MCF-7 человека	3D-клиностаг	Вестерн-блот	Повышение	[6]
БТШ70 БТШ60	<i>Xenopus laevis</i>	3 и 6 сут, 3D-клиностаг	Вестерн-блот	Без изменений Повышение через 3 сут, через 6 сут — нет различий	[22]
БТШ70	Желудочек сердца мыши	28 сут, суспендирование	Нозерн- и Вестерн-блоты	Без изменений	[17]
GrpE, UspA	Бактерия <i>Cupriavidus metallidurans</i> CN43	ПОлет на ISS, биореактор RWV	Вестерн-блот	Повышение	[16]
БТШ70, БТШ90	Проростки <i>Pisum sativum</i>	1—3 сут, клиностагирование	Вестерн-блот, иммуно-ферментный анализ	Более высокий уровень	[2]
Убиквитин	<i>Vicia faba</i>	15 и 24 ч, клиностагирование	Вестерн-блот	Снижение содержания свободного убиквитина и повышение содержания убиквитиновых конъюгатов в хлоропластах	[28]
Убиквитин	Протопласты мезофилла <i>Vicia faba</i>	75—400 с, параболический полет; 2—60 мин, клиностагирование (60 об/мин)	Вестерн-блот	Резкие колебания в содержании свободного убиквитина, повышение содержания убиквитиновых конъюгатов	[23]

тер изменений уровня БТШ зависит от типа клеток [8, 25], от вида БТШ [22, 24] и, очевидно, отражает соответствующие изменения в интенсивности процессов, в которых эти белки участвуют. Так, считают, что БТШ70 является цитопротектором и играет важную роль в предотвращении индуцированного стрессом апоптоза [8, 11, 12, 24]. Эндотелиальные клетки, активно экспрессирующие БТШ70, способны к активной пролиферации, дифференциации и не подвержены апоптозу [8]. Высокий уровень содержания БТШ70 в лейкоцитах коррелирует с высокой активностью иммунной системы [24]. Поэтому ослабление генной экспрессии БТШ70 в клетках, наблюдаемое в космических экспериментах, может быть связано с повышением числа клеток, подверженных апоптозу [12] (вследствие действия других неблагоприятных факторов космического полета). БТШ90 взаимодействует с актиновыми филаментами, поэтому более низкий уровень его в условиях моделированной микрогравитации связывают со снижением подвижности лейкоцитов [24]. Следует учитывать, что экспрессия генов БТШ регулируется в процессе развития организма [26] и изменения вследствие действия внешнего фактора могут накладываться на генетически запрограммированные события [2].

К возможным причинам расхождения приведенных результатов можно отнести не только видо- и тканеспецифичность генной экспрессии БТШ, но и различия в условиях экспериментов, в том числе в продолжительности действия фактора. В большинстве работ оценивается эффект микрогравитации определенной длительности. Однако экспрессия генов БТШ, индуцированная стрессовым фактором, имеет, по-видимому, свою динамику. Наиболее быстрые изменения наблюдали при анализе убиквитинового пула в протопластах, где усиление убиквитинирования определенных белков наблюдалось немедленно после начала действия микрогравитации [23]. При этом резкие колебания в количестве свободного убиквитина указывают на активизацию убиквитиновой системы: связывание свободного убиквитина с субстратными белками и высвобождение его из убиквитиновых конъюгатов с помощью протеасомных комплексов.

Нами на проростках гороха было показано, что уже через 2 ч от начала клиностагирования

содержание БТШ70 и БТШ90 возрастало, достигало максимума через 4 и 6 ч соответственно, после чего постепенно снижалось до контрольного уровня к 24 ч. Пяти- и семисуточные проростки, росшие в условиях клиностагирования, по содержанию БТШ70 и БТШ90 не отличались от проростков, росших в стационарных условиях.

В большинстве работ, к сожалению, анализируются изменения только в содержании БТШ или их мРНК. В то же время при неизменном суммарном количестве БТШ может происходить экспрессия различных изоформ, изменение уровня их фосфорилирования, внутриклеточной локализации, перемена белков-субстратов. Выяснение особенностей генной экспрессии этих белков и их функциональной нагрузки в условиях микрогравитации будет способствовать развитию теоретических представлений о функционировании БТШ и познанию механизмов действия измененной гравитации на живые системы.

1. Газенко О. Г., Ильин Е. А., Парфенов Г. П. Космическая биология: (Некоторые итоги и перспективы) // Изв. АН СССР. Сер. биол.—1974.—4.—С. 461—475.
2. Козеко Л. Е. Изменения в спектре растворимых белков и в содержании стрессовых белков БТШ90 и БТШ70 в проростках гороха в ответ на клиностагирование // Біополімери і клітина.—2006.—22, № 2.—С. 136—142.
3. Кордюм Е. Л., Сытник К. М., Белявская Н. А. и др. Современные проблемы космической клеточной фитобиологии. — М.: Наука, 1994.—293 с.
4. Сытник К. М., Кордюм Е. Л., Недуха Е. М. и др. Растительная клетка при изменении геофизических факторов. — Киев: Наук. думка, 1984.—136 с.
5. Claassen D. E., Spooner B. S. The impact of alterations in gravity on aspects of cell biology // Intl. Rev. Cytol.—1994.—156.—P. 301—373.
6. Coinu R., Chiaviello A., Covelli B., et al. Modeled gravity alters the cell metabolism «rate» and not the cell metabolism // J. Gravit. Physiol.—2005.—12, N 1.—P. 255—256.
7. Cotrupi S., Maier J. The adaptive response of endothelial cells to gravitational unloading // Annu. Int. Gravit. Physiol. Meeting, 6—11 June, 2004, Moscow, Russia: Abstr. — Moscow, 2004.—P. 103.
8. Cotrupi S., Maier J. Is HSP70 upregulation crucial for cellular proliferative response in simulated microgravity? // J. Gravit. Physiol.—2004.—11, N 2.—P. 173—174.
9. Herranz R., Benguria A., Medina J., et al. Gene expression variations during *Drosophila* metamorphosis in space. The gene experiment in the Spanish Cervantes mission to the ISS // J. Gravit. Physiol.—2005.—12, N 1.—P. 253—254.
10. Kordyum E. Biology of plant cells in microgravity and under clinostating // Intl. Rev. Cytol.—1997.—171.—P. 1—78.

11. Kumei Y., Morita S., Nakamura H., et al. Does microgravity induce apoptotic signal in rat osteoblasts via cJun-N-terminal kinase? // *J. Gravit. Physiol.*—2002.—9, N 1.—P. 263—264.
12. Kumei Y., Shimokawa H., Morita S., et al. Apoptotic and anti-apoptotic signals of rat osteoblasts during spaceflight // *ELGRA news.*—2005.—24.—P. 265.
13. Leone A., Perrotta C., Maresca B. Plant tolerance to heat stress: current strategies and new emergent insights // *Abiotic stresses in plants* / Eds L. Sanita di Toppi, B. Pawlik-Skowronska. — Kluwer, 2003.—P. 1—22.
14. Leshem Y. Y., Kuiper P. J. C., Erdei L., et al. Do Selye's mammalian GAS concept and «co-stress» response exist in plants? // *Stress of life from molecules to man* / Ed. by P. Csermely. — Annals of the New York Academy of Sciences, 1998.—P. 199—208.
15. Lewis M., Hughis-Fulford M. Regulation of heat shock protein message in Jurkat cells cultured under serum-starved and gravity-altered conditions // *J. Cellular Biochem.*—2000.—77.—P. 127—134.
16. Leys N., Wattiez R., Rosier C., et al. Response of the bacterium *Cupriavidus metallidurans* CH34 to space flight conditions // 36th COSPAR Scientific Assembly, 16-23 July 2006, Beijing, China. — Beijing, 2006.—Abstr. A-01347.
17. Liu C., Yu Z.-B., Zhang L.-F., Ni H.-Y. Heat shock protein 70 expression in myocardium is blunted with simulated weightlessness // *J. Gravit. Physiol.*—2000.—7, N 2.—P. 149—150.
18. Mathew A., Morimoto R. A. Role of the heat-shock response in the life and death of proteins // *Stress of life from molecules to man* / Ed. P. Csermely. — Annals of the New York Academy of Sciences, 1998.—P. 99—111.
19. Merkys A. J. Plant growth under microgravity conditions: Experiments and problems // *Proc. of the 4th European Symposium on Life Sciences Research in Space*, Trieste, Italy, 28 May-1 June. — Noordwijk, The Netherlands, 1990.—P. 509—515.
20. Musgrave M. E., Kuang A., Xiao Y., et al. Gravity-independence of seed-to-seed cycling // *Planta.*—2000.—210.—P. 400—406.
21. Risin D., Ward N. E., Risin S. A., Pellis N. R. Gene expression in activated human T-cells induced by modeled microgravity // *ELGRA news.*—2005.—24.—P. 289.
22. Rizzo A. M., Rossi F., Guerra A., et al. Effects of microgravity and hypergravity on early developmental stages of *Xenopus laevis* // *J. Gravit. Physiol.*—2002.—9, N 1.—P. 207—208.
23. Schnabl H., Hunte C., Schulz M., et al. Effects of fast clinostat treatment and microgravity of *Vicia faba* L. mesophyll cell protoplast ubiquitin pools and actin isoforms // *Microgravity Sci. Technol.*—1996.—9/4.—P. 275—280.
24. Sundaresan A., Pellis N. R. Human adaptation genetic response suites: toward new interventions and countermeasures for spaceflight // *J. Gravit. Physiol.*—2005.—12, N 1.—P. 229—231.
25. Taylor W. E., Bhasin Sh., Lalani R., et al. Alteration of gene expression profiles in skeletal muscle of rats exposed to microgravity during a spaceflight // *J. Gravit. Physiol.*—2002.—9, N 2.—P. 61—70.
26. Vierling E. The roles of heat shock proteins in plants // *Annu. Rev. Plant Physiol.*—1991.—42.—P. 579—620.
27. Welsh M. J., Gaestel M. Small heat-shock protein family: Function in health and disease // *Stress of life from molecules to man* / Ed. P. Csermely. — Annals of the New York Academy of Sciences, 1998.—P. 28—35.
28. Wolf D., Schulz M., Schnabl H. Influence of horizontal clinostat rotation on plant proteins: 1. Effects on ubiquitinated polypeptides in the stroma and thylakoid membranes of *Vicia faba* L. chloroplasts // *J. Plant Physiol.*—1993.—141.—P. 304—308.
29. Zheng H., Wang H. Proteomic alterations in root tips of *Arabidopsis thaliana* seedling under altered gravity conditions // 36th COSPAR Scientific Assembly, 16-23 July 2006, Beijing, China. — Beijing, 2006.—Abstr. A-00514.

INFLUENCE OF THE REAL AND SIMULATED MICROGRAVITY ON GENE EXPRESSION OF HEAT-SHOCK PROTEINS

L. Ye. Kozeko

The possibility of heat-shock proteins' (HSP) participation in adaptation of living systems to microgravity is considered. The published information on HSP gene expression in cells under real and simulated microgravity is analysed. We suppose the necessity of detailed investigation on this problem.