



УДК 577.181.5:57.016.4

Л. Е. Козеко

Влияние гелданамицина на синтез белков теплового шока Hsp70 и Hsp90 в проростках *Arabidopsis thaliana*

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Е. Л. Кордюм)

Изучено влияние гелданамицина (ГДА) на синтез белков теплового шока Hsp70 и Hsp90 в Arabidopsis thaliana. ГДА является специфичным ингибитором АТФ-зависимых шаперонных функций Hsp90. Показано, что обработка антибиотиком проростков вызывает индукцию синтеза стрессовых белков Hsp70 и Hsp90 в отсутствие стресса. Обработка антибиотиком семян приводит к повышению конститутивного уровня этих белков в проростках, а также к усилению индукции их синтеза при тепловом стрессе. Таким образом, полученные данные подтверждают существование механизма авторегуляции синтеза белков теплового шока белками Hsp90.

Неотъемлемым компонентом реакции клетки на действие различных неблагоприятных факторов является индукция синтеза белков теплового шока (heat shock protein (Hsp)). Выполняя шаперонные функции, эти белки в условиях стресса обеспечивают дезагрегацию денатурированных белков, их поддержание в ненативном состоянии, рефолдинг или деградацию [1]. Установлено, что инициация транскрипции генов *hsp* происходит при взаимодействии транскрипционных факторов — факторов теплового шока (ФТШ) — с регуляторными элементами в промотерной последовательности этих генов, получившими название элементов теплового шока [2–4]. На животных клетках показано, что возможным механизмом подавления активности ФТШ может быть его связывание в мономерной форме с белками семейства Hsp90 [5]. В последние годы появились доказательства того, что подобный механизм существует и в растительных клетках [6]. Эффективным подходом в этих исследованиях является использование ингибиторов функционирования Hsp90, которые с высокой аффинностью взаимодействуют с АТФ-связывающим сайтом N-терминального домена молекулы Hsp90, тем самым блокируя АТФазный цикл шаперона [7].

Целью настоящего исследования была проверка гипотезы об авторегуляции экспрессии белков теплового шока белками Hsp90 у растений с использованием ингибитора Hsp90 гелданамицина (ГДА) в разных концентрациях.

© Л. Е. Козеко, 2013

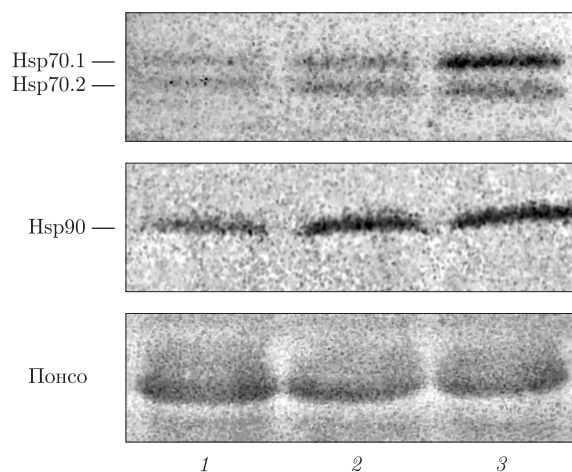


Рис. 1. Иммуноблоты Hsp70 и Hsp90 контрольных проростков (1) и проростков, подвергнутых тепловому стрессу — 45 °С 1 ч (2) и 37 °С 2 ч + 24 °С 2 ч + 45 °С 1 ч (3). Окрашивание мембраны Понсо служит контролем загрузки белка

Материалы и методы исследования. Работу проводили с *Arabidopsis thaliana* (L.) Неунн экотипа Columbia (Col). Стерилизованные с поверхности семена выдерживали при 4 °С в течение 48 ч, после чего в первом эксперименте высаживали на среду, содержащую 0,5 комплекса минеральных солей Мурасиге–Скуга, 1% сахарозы, 0,8% агара, и далее содержали при (24 ± 1) °С и 16-часовом фотопериоде. 12-суточные проростки инкубировали с раствором ГДА в течение 6 ч при 24 °С. Во всех экспериментах ГДА (“Sigma”, США) применяли в концентрациях 1, 10 и 100 мкмоль/л. Обработку им растительного материала проводили при комнатной температуре в темноте (для предотвращения инактивации нестойкого на свету антибиотика). В контроле растительный материал инкубировали в стерильной дистиллированной воде при тех же условиях.

В следующих экспериментах антибиотиком обрабатывали непосредственно семена. Для этого семена после выдерживания при 4 °С инкубировали с ГДА в течение 24 ч, после чего высаживали на среду и проращивали как описано выше. Анализировали 12-суточные проростки.

Для создания теплового стресса 12-суточные проростки подвергали тепловому стрессу в следующих режимах: 1) 45 °С, 1 ч; 2) 37 °С, 2 ч; 3) 37 °С, 2 ч + 24 °С, 2 ч + 45 °С, 1 ч.

Выделение белка, электрофоретическое разделение суммарных растворимых белков в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях и иммуноблоттинг проводили как описано ранее [8]. Для иммунодетекции использовали первичные мышинные антитела, специфичные к консервативным участкам цитозольных Hsp70 и Hsp90 (“Sigma”). В качестве вторичных антител использовали антимышинные IgG, конъюгированные с биотином, которые визуализировали с помощью экстравидин-пероксидазной системы (“Sigma”). В качестве внутреннего контроля загрузки белка использовали белковые треки на нитроцеллюлозной мембране, окрашенные Понсо С.

Результаты исследования и их обсуждение. Анализ белков Hsp70 проростков *A. thaliana* выявил две иммунореактивные зоны, обозначенные нами как Hsp70.1 и Hsp70.2 соответственно (рис. 1). Зона Hsp70.1 соответствует цитоплазматическим изоформам AtHsp70-1 и AtHsp70-2 с молекулярной массой 71,4 кДа, зона Hsp70.2 — цитоплазматическим изоформам AtHsp70-3 и AtHsp70-4 (71,1 кДа) и AtHsp70-5 (70,9 кДа) [9]. На иммуно-

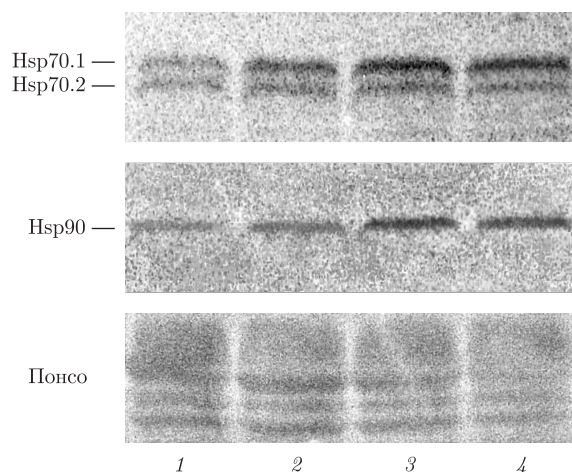


Рис. 2. Иммуноблоты Hsp70 и Hsp90 контрольных проростков (1) и проростков, инкубированных с ГДА в концентрациях 1 мкмоль/л (2), 10 мкмоль/л (3) и 100 мкмоль/л (4)

блотах Hsp90 выявлена одна зона белка, которая может содержать цитоплазматические изоформы AtHsp90-1, AtHsp90-2, AtHsp90-3 и AtHsp90-4 с близкой молекулярной массой [10].

Индукция генов *hsp* является универсальной реакцией клеток различных организмов на действие высокой температуры, однако степень индукции для разных генов различна [6, 9]. В подтверждение этому нами показана индукция синтеза белков Hsp70 и Hsp90 в ответ на действие высокой температуры (см. рис. 1). При этом максимальная индукция выявлена для Hsp70.1 у проростков, прошедших перед жестким тепловым воздействием (45 °С) предварительную акклимацию при 37 °С, что указывает на наличие индуцибельных изоформ, играющих существенную роль в стрессовой реакции и адаптации клетки. Количество Hsp70.2 изменялось незначительно. Показана также небольшая активация синтеза Hsp90, что характерно для белков этого семейства: они в достаточном количестве содержатся в клетке при нормальных условиях (house keeping function proteins) и только в некоторой степени активизируют свой синтез в стрессовых условиях [11].

6-часовая обработка проростков ГДА при 24 °С вызывала индукцию синтеза как Hsp70, так и Hsp90 (рис. 2). Степень индукции увеличивалась с повышением концентрации антибиотика. Изменения, как и при действии высокой температуры, были максимально выражены для Hsp70.1, в меньшей мере — для Hsp70.2, тогда как активация синтеза Hsp90 наблюдалась при более высоких концентрациях антибиотика. Таким образом, ГДА вызывал в клетках проростков индукцию синтеза Hsp в отсутствие стресса.

Известно, что экспрессия генов *hsp* быстро активируется при резких изменениях внешних факторов, достигая максимума в первые часы, и затем постепенно снижается до первоначального уровня [12]. Кроме того, показано, что ГДА быстро теряет свою активность на свету [13]. Для того чтобы выяснить, сохраняется ли эффект ГДА длительное время, с антибиотиком инкубировали семена, а для анализа использовали 12-дневные проростки. Обработка семян ГДА во всех исследованных концентрациях не снижала их жизнеспособности и не влияла на состав суммарных растворимых белков проростков. Вместе с тем были зарегистрированы количественные изменения изучаемых белков теплового шока (рис. 3). Уровень Hsp70 возрастал с повышением концентрации ГДА, в большей степени — у Hsp70.1. В то же время повышенное содержание Hsp90 регистрировалось только при максимальной

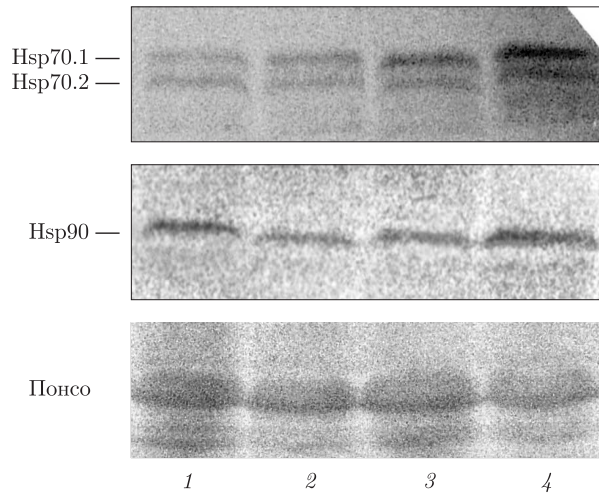


Рис. 3. Иммуноблоты Hsp70 и Hsp90 контрольных проростков (1) и проростков, выращенных из семян, инкубированных с ГДА в концентрациях 1 мкмоль/л (2), 10 мкмоль/л (3) и 100 мкмоль/л (4)

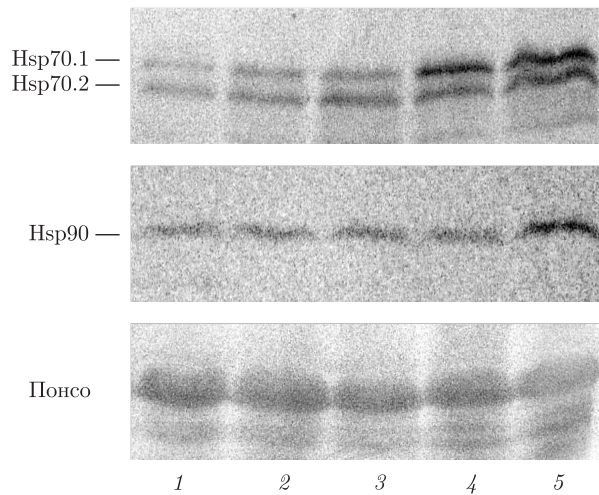


Рис. 4. Иммуноблоты Hsp70 и Hsp90 контрольных проростков (24 °С) (1) и проростков, подвергнутых тепловому стрессу (37 °С, 2 ч): без обработки ГДА (2); после обработки семян ГДА в концентрациях 1 мкмоль/л (3), 10 мкмоль/л (4) и 100 мкмоль/л (5)

концентрации антибиотика. Возможными причинами таких изменений могут быть либо длительное сохранение активности молекул ГДА в клетках, либо изменение конститутивного уровня этих белков, вызванное действием антибиотика в период прорастания семени и начала роста проростка (в том случае, если он быстро теряет свою активность в клетках под действием света).

Далее было показано, что проростки, выращенные из семян, обработанных антибиотиком, отличались от контрольных усилением индукции Hsp70 и Hsp90 в ответ на действие повышенной температуры (37 °С, 2 ч) (рис. 4). Показана значительная активация синтеза Hsp70 при концентрациях антибиотика 10 и 100 мкмоль/л, и Hsp90 — при максимальной концентрации.

Таким образом, установлено, что ингибирование функциональной активности Hsp90 путем связывания с ГДА приводит к дозозависимой индукции синтеза Hsp70 и Hsp90. При этом характер изменений у отдельных белков был сходным с таковым при повышении температуры. Полученные данные полностью согласуются с предполагаемым механизмом регуляции активности ФТП с помощью Hsp90 и, в целом, подтверждают существование механизма авторегуляции синтеза белков теплового шока по принципу обратной связи. Показано, что обработка семян ГДА приводит к существенному повышению конститутивного уровня белков Hsp70 и Hsp90 в проростках и готовности клеток к активации синтеза белков теплового шока при стрессе. С учетом того, что высокий уровень белков теплового шока в клетках является необходимым компонентом повышенной устойчивости растений к неблагоприятным изменениям среды, можно ожидать, что обработка антибиотиком будет способствовать повышению их стойкости.

1. Mathew A., Morimoto R. I. Role of the heat-shock response in the life and death of proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1998. – **851**. – P. 99–111.
2. Pelham H. R. B. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp70 heat-shock gene // Cell. – 1982. – **30**. – P. 517–528.
3. Wu C. Activating protein factor binds *in vitro* to upstream control sequences in heat shock gene chromatin // Nature. – 1984. – **311**. – P. 81–84.
4. Morimoto R. I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators // Genes Dev. – 1998. – **12**. – P. 3788–3796.
5. Ali A., Bharadwaj S., O'Carroll R., Ovsenek N. Hsp90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in *Xenopus* oocytes // Mol. Cell. Biol. – 1998. – **18**. – P. 4949–4960.
6. Yamada K., Fukao Y., Hayashi M. et al. Cytosolic HSP90 regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in *Arabidopsis thaliana* // J. Biol. Chem. – 2007. – **282**, No 52. – P. 37794–37804.
7. Prodromou C., Roe S. M., O'Brien R. et al. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone // Cell. – 1997. – **90**. – P. 65–75.
8. Козеко Л. Е. Количественные изменения белков теплового шока Hsp70 и Hsp90 в реакции проростков гороха на кратковременное действие гипергравитации // Доп. НАН України. – 2009. – № 1. – С. 140–143.
9. Lin B.-L., Wang J.-Sh., Liu H.-Ch. et al. Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana* // Cell Stress & Chaperones. – 2001. – **6**, No 3. – P. 201–208.
10. Krishna P., Gloor G. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana* // Ibid. – 2001. – **6**, No. 3. – P. 238–246.
11. Picard D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation // Cell. Mol. Life Sci. – 2002. – **59**. – P. 1640–1648.
12. Клюева Н. Ю., Самохвалов И. М. Синтез белков теплового шока в листьях *Arabidopsis thaliana* // Физиол. растений. – 1990. – **37**, № 4. – С. 739–747.
13. Queitsch C., Sangster T. A., Lindquist S. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation // Nature. – 2002. – **417**. – P. 618–624.

Л. Є. Козеко

Вплив гелданаміцину на синтез білків теплового шоку Hsp70 і Hsp90 в проростках *Arabidopsis thaliana*

Вивчено вплив гелданаміцину (ГДА) на синтез білків теплового шоку Hsp70 і Hsp90 в Arabidopsis thaliana. ГДА є специфічним інгібітором АТФ-залежних шаперонних функцій Hsp90. Показано, що обробка антибіотиком проростків викликає індукцію синтезу стресових білків Hsp70 і Hsp90 за відсутності стресу. Обробка антибіотиком насіння призводить до підвищення конститутивного рівня цих білків у проростках, а також до посилення індукції їх синтезу під впливом теплового стресу. Отже, отримані дані підтверджують існування механізму авторегуляції синтезу білків теплового шоку білками Hsp90.

L. Ye. Kozeko

The influence of geldanamycin (GDA) on the synthesis of heat shock proteins 70 and 90 in *Arabidopsis thaliana* seedlings

The influence of geldanamycin (GDA) on the synthesis of heat shock proteins 70 and 90 (Hsp70 and Hsp90) in Arabidopsis thaliana is studied. GDA is a specific inhibitor of the ATP-dependent chaperone functions of Hsp90. It is shown that the treatment of seedlings with the antibiotic induces the synthesis of Hsp70 and Hsp90 in the absence of stress. Treatment of seeds results in an increase in the constitutive Hsp70 and Hsp90 level in seedlings, as well as increasing the induction of their synthesis under heat stress. Thus, the obtained data confirm the existence of autoregulation of the Hsp's synthesis by Hsp90s.