

Л. Е. Козеко

Количественные изменения белков теплового шока Hsp70 и Hsp90 в реакции проростков гороха на кратковременное действие гипергравитации

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

Кількісні зміни білків теплового шоку Hsp70 та Hsp90 у реакції проростків гороху на короткочасну дію гіпергравітації (3, 7, 10 і 14g) вивчали з використанням Вестерн-блот-аналізу. Виявлено значні зміни у рівні цих білків як під час дії гравітаційних сил, так і в ході реадaptaції. Встановлено підвищений вміст Hsp70 після 15-хвилинної дії гіпергравітації і Hsp90 — після 1-годинної. Ступінь і тривалість змін у кількості цих білків залежали від дози гравітаційного впливу.

Важной составляющей неспецифической стрессовой реакции живых систем на воздействия внешних факторов является синтез белков теплового шока (heat shock protein, Hsp) [1, 2]. Являясь молекулярными шаперонами, они обеспечивают фолдинг/рефолдинг белков клетки, предотвращение агрегации денатурированных белков, сборку олигомерных комплексов, транспорт белков через мембраны внутриклеточных компартментов и т. д. Вместе с тем генная экспрессия различных семейств Hsp характеризуется определенной стресс-специфичностью [2]. Очевидно, это связано с тем, что белки каждого семейства функционируют согласно собственной стратегии [3, 4].

В настоящей работе Hsp рассматриваются в связи с исследованием механизмов адаптации растения к действию гипергравитации — одного из негативных факторов космического полета. Известны единичные публикации по генной экспрессии этих белков в организмах, подвергнутых гравитационным перегрузкам, причем почти все они выполнены на животных объектах [5, 6]. На растительных объектах проведен анализ генной экспрессии в культуре клеток *Arabidopsis thaliana* после 1-часового действия гипергравитации (7g), показавший резкое возрастание количества транскриптов Hsp90 и Hsp60 [7]. Однако детальные исследования генной экспрессии Hsp в растениях под влиянием гипергравитации до сих пор не проводились. В данном сообщении приведены результаты определения количества Hsp70 и Hsp90 в проростках гороха при кратковременном действии гипергравитации в диапазоне 3–14g, а также в процессе реадaptaции.

Материалы и методы исследования. Пятидневные проростки гороха (*Pisum sativum* L., сорт Интенсивный), выращенные в темноте при $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$, подвергали центрифугированию с ускорениями 3, 7, 10 и 14g в течение 15 мин и 1 ч, используя центрифугу с бакет-ротором радиусом 0,65 м. Часть проростков была заморожена в жидком азоте сразу же после центрифугирования, другая часть — после реадaptaции в течение 1,5 ч (после 15 мин центрифугирования), 1,5 ч и 24 ч (после 1 ч центрифугирования). Контролем служили проростки, растущие стационарно при 1g. Для выделения растворимых белков замороженный материал гомогенизировали с буфером, содержащим 25 мМ *трис*-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА, 20 мМ NaCl, 1 мМ ФМСФ. Гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 14000g (4°C). Концентрацию белка измеряли по [8]. Затем к гомогенату добавляли равное количе-

ство буфера, содержащего 0,125 М *трис*-HCl, pH 6,8, 4% ДС-Na, 20% глицерин, 5% β -меркаптоэтанол. Количество Hsp70 и Hsp90 анализировали с помощью Вестерн-блот-анализа. Белки разделяли в 10%-м полиакриламидном геле, содержащем ДС-Na (ПААГ-ДС-Na) [9], затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану в течение 1 ч при 300 мА. Иммунодетекцию белков проводили как описано в [10], используя антитела к Hsp70, Hsp90 и актину, антимышьиные IgG, конъюгированные с биотином, и экстравидин-пероксидазную систему их визуализации (“Sigma”). Актин использовали в качестве внутреннего контроля загрузки белка в геле. С помощью денситометрического анализа с использованием компьютерной программы ImageMasterTM TotalLab, version 2.00 (“Amersham”) было определено количество белка (в усл. ед.), соответствующее каждой зоне на блотах. Эксперименты проводились в трехкратной повторности.

Результаты исследования и их обсуждение. С помощью Вестерн-блот-анализа выявлены значительные количественные изменения Hsp70 и Hsp90 в проростках гороха, подвергнутых действию гипергравитации. Уже после 15 мин центрифугирования количество Hsp70 возрастало, причем процент превышения увеличивался с увеличением ускорения — от 13% при 3g до почти 100% при 14g по сравнению с контрольными растениями (рис. 1, А). Через 1,5 ч после окончания 15-минутного центрифугирования количество Hsp70 снижалось в проростках, подвергнутых действию 3 и 7g, однако продолжало возрастать в проростках после действия 10 и 14g, что наглядно видно на гистограммах, изображающих относительное количество исследуемых белков в процентах от контроля (см. рис. 1, А, б). После центрифугирования проростков в течение 1 ч количество Hsp70 превышало таковое в контроле на 40–85% (рис. 1, Б). В ходе реадaptации уровень Hsp70 оставался высоким в течение 1,5 ч и снижался через 24 ч, достигая контрольного в проростках, подвергнутых действию 3 и 7g (см. рис. 1, Б, б).

Количество Hsp90 после 15-минутного центрифугирования существенно не изменялось, тогда как после 1-часового — повышалось на 60–80% (см. рис. 1). В ходе реадaptации после 1-часового центрифугирования уровень Hsp90 оставался высоким в течение первых 1,5 ч и снижался до нормального к 24-му часу (см. рис. 1, Б, б). Следует отметить, что Hsp90 детектировался в значительном количестве во всех образцах, включая контрольные, что характерно для белков этого семейства и, как полагают, связано с их участием в основных метаболических процессах клетки (“housekeeping functions”) [4].

Полученные данные свидетельствуют об усилении генной экспрессии Hsp70 и Hsp90 в ответ на действие гипергравитации, при этом степень изменений коррелирует с величиной ускорения и длительностью воздействия. Отметим, что наиболее значительное и продолжительное повышение содержания этих стрессовых белков выявлялось после действия 10 и 14g, что превосходит перегрузки во время взлета и посадки космического аппарата (3,5–8g). Повышение количества Hsp70 и Hsp90, в свою очередь, указывает на возникновение в клетке потребности в интенсификации функционирования молекулярных шаперонов. Можно предположить, что активизация окислительных процессов в клетке, выявленная в реакции растения на гравитационное воздействие [11], приводит к нарушению белковых конформаций и к возникновению опасности накопления частично денатурированных белков и их агрегации. Появление в клетке белков в ненативных конформациях в количестве, превышающем определенный уровень, по одной из существующих моделей транскрипционной регуляции генов Hsp, может активировать их экспрессию [12]. Согласно другой модели, основанной на роли цитоплазматической мембраны как первичного сайта восприятия внешних сигналов, изменения в состоянии мембраны передаются в ядро через каскад хи-

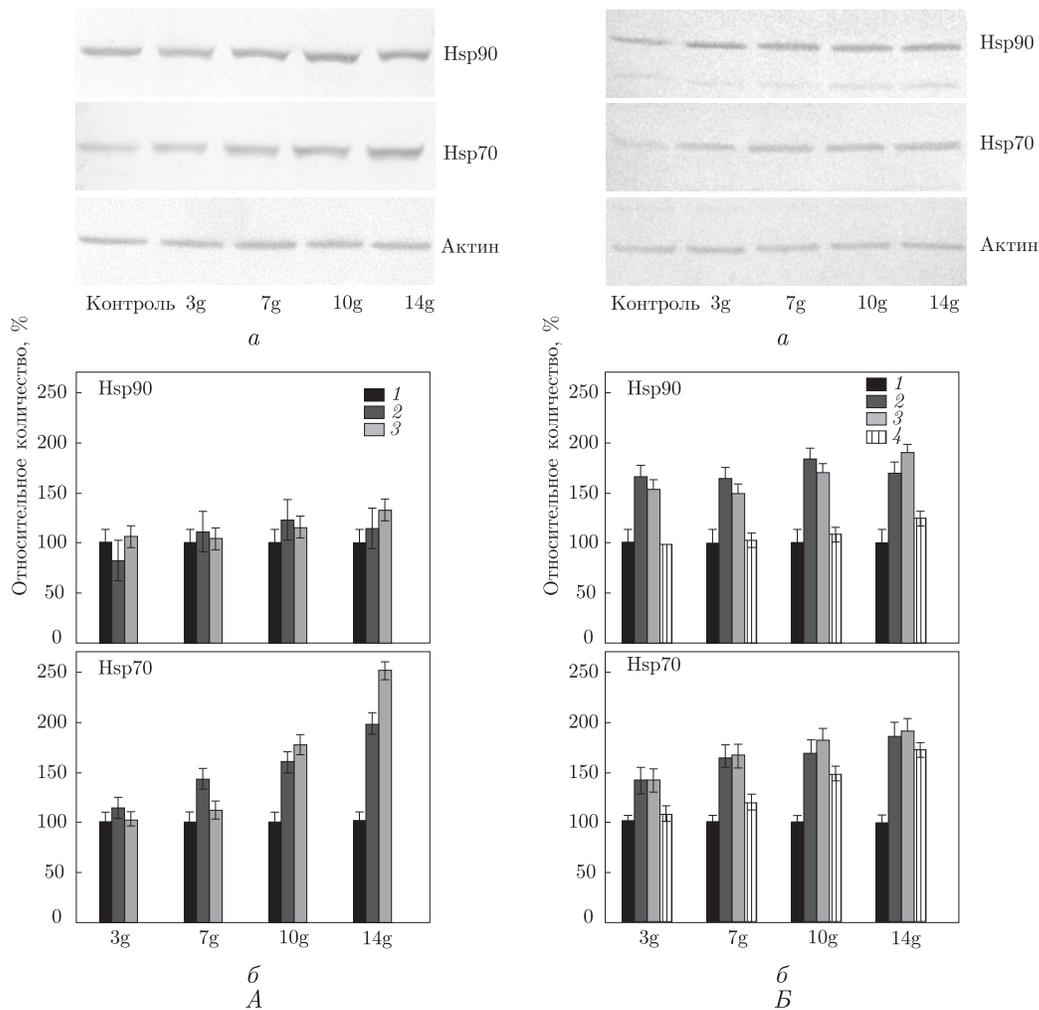


Рис. 1. Результаты Вестерн-блот-анализа Hsp90 и Hsp70 в проростках гороха, подвергнутых действию гипергравитации в течение 15 мин (А) и 1 ч (В): а — иммуноблоты Hsp90, Hsp70 и актина после электрофоретического разделения в ПААГ-ДС-На суммарных растворимых белков проростков после гравитационного воздействия; б — гистограммы относительного содержания Hsp90 и Hsp70 в контрольных проростках (1), проростках после гравитационного воздействия (2), 1,5- и 24-часовой реадaptации (3, 4 соответственно). На гистограммах дается ср. значение \pm ср. ошибка по трем независимым экспериментам

мических и физических факторов, вызывая индукцию генов Hsp [13]. Изменение формы клетки под действием гипергравитации показано на примере животной клетки, внешним слоем которой является цитоплазматическая мембрана [14].

По результатам данной работы зависимость изменений уровня Hsp70 от дозы воздействия была более четкой, изменения инициировались раньше и сохранялись в течение более длительного периода времени, чем это было определено для Hsp90. Эти различия могут быть связаны с особенностями шаперонных функций этих белков. Согласно современным представлениям Hsp70 связывает большинство белков с нарушенной конформацией, тогда как функции Hsp90 выходят за рамки основных функций молекулярных шаперонов: при нормальных условиях Hsp90 специфически вовлечен в фолдинг и конформационную регуляцию белков, участвующих в передаче клеточных сигналов [3, 4], в условиях же клеточно-

го стресса он может участвовать в ренатурации белков с нарушенной конформацией [15]. Можно предположить, что Hsp70 первым принимает вызов опасности накопления белков с ненативной конформацией, в то время как Hsp90 выполняет свои специфические функции, а активация синтеза Hsp90 происходит при более длительном гравитационном воздействии. В целом, выявленные изменения в уровне Hsp70 и Hsp90 в проростках гороха под действием гипергравитации должны играть важную роль в контроле качества клеточных белков во время и после действия гравитационных перегрузок.

1. Маргулис Б. А., Гужова И. В. Белки стресса в эукариотической клетке // Цитология. – 2000. – **42**, № 4. – С. 323–342.
2. Vierling E. The roles of heat shock proteins in plants // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1991. – **42**. – P. 579–620.
3. Young J. C., Moarefi I., Hartl F. U. Hsp90: a specialized but essential protein folding tool // J. Cell Biol. – 2001. – **154**, No 2. – P. 267–273.
4. Picard D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation // Cell. Mol. Life Sci. – 2002. – **59**. – P. 1640–1648.
5. Sun X. Q., Li J. S., Wu X. Y. The expression of heat shock protein 70 in rat brain after +Gz exposure // J. Gravit. Physiol. – 2002. – **9**, No 1. – P. 23–24.
6. Sun X. Q., Cao X. S., Li J. S. Effects of +Gz on memory and brain heat shock protein 70 expression in rats // Ibid. – 2003. – **10**, No 1. – P. 39–40.
7. Martzivanou M., Hampp R. Hyper-gravity effects on the *Arabidopsis* transcriptome // Physiologia Plantarum. – 2002. – **118**. – P. 221–231.
8. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – **72**. – P. 248–254.
9. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – **227**, No 5259. – P. 680.
10. Kozeko L., Kordyum E. The stress protein level under clinorotation in context of the seedling developmental program and the stress response // Microgravity Sci. Technol. – 2006. – **18**, No 3/4. – P. 254–256.
11. Барабой В. А., Жадько С. И. Ранние изменения интенсивности спонтанной хемилюминесценции корней проростков гороха при гипергравитации // Докл. АН Украины. – 1992. – № 7. – С. 156–158.
12. Ananthan J., Goldberg A. L., Voellmy R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes // Science. – 1986. – **232**. – P. 522–524.
13. Leone A., Perrotta C., Maresca B. Plant tolerance to heat stress: current strategies and new emergent insights // Abiotic stresses in plants / Ed. L. Sanita di Toppi, B. Pawlik-Skowronska. – London: Kluwer, 2003. – P. 1–22.
14. van Loon J. J. W. A., van Laar M. C., Korteik J. P. et al. Gravity Changes Cell Shape // ELGRA News. – 2005. – **24**. – P. 85.
15. Nathan D. F., Vos M. H., Lindquist S. In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1997. – **94**. – P. 12949–12956.

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного
НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 07.05.2008

L. Ye. Kozeko

Quantitative changes of heat shock proteins Hsp70 и Hsp90 in the response of pea seedlings to short-term hypergravity

The expression of heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 in pea seedlings under short-term hypergravity (3, 7, 10, and 14g) has been investigated by Western-blot analysis. Significant changes in the Hsp70 and Hsp90 level during both a g-force exposure and readaptation are established. An increase in the Hsp70 amount after the 15-min exposure to hypergravity and in the Hsp90 ones after the 1-h exposure is determined. The intensity and duration of the increase depend on the hypergravity dose.