



УДК 581.1

Влияние ЭГТА на синтез Hsp101 в культуре клеток *Arabidopsis thaliana*

Е. Л. Горбылева^{1,2}, Е. Г. Рихванов¹, Т. М. Русалева¹,
И. В. Федосеева¹, А. В. Федяева¹, Г. Б. Боровский¹

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

²Национальный исследовательский Иркутский государственный технический университет, Иркутск

E-mail: dzubina@sifibr.irk.ru

Аннотация. Кальций играет важную роль в сигнальной трансдукции растений. При тепловом стрессе происходит повышение его уровня в цитозоле. Предобработка разными концентрациями хелатора кальция этилендиоксидиэтилендинитротетраацетата (ЭГТА) не влияла на жизнеспособность культуры клеток арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* при нормальной температуре инкубации, однако несколько снижала её в условиях мягкого теплового стресса. Блокирование притока ионов кальция с помощью ЭГТА ингибировало индуцируемую термотолерантность (ИТ), теплоиндуцируемый синтез и экспрессию Hsp101 и других белков теплового шока (БТШ). Полученные результаты свидетельствуют о зависимости синтеза Hsp101 и других БТШ от уровня кальция в клетке.

Ключевые слова: ЭГТА, Ca²⁺, белки теплового шока, *Arabidopsis thaliana*, индуцируемая термотолерантность, тепловой стресс.

Введение

Общая черта ответа всех организмов на тепловой стрессор заключается в том, что предобработка умеренно высокими температурами способствует выдерживанию организмом последующей летальной температуры. Это явление было названо «индуцируемой термотолерантностью» (ИТ) [6]. Развитие ИТ во многом определяется белками теплового шока (БТШ). У растений развитие ИТ определяется HSP101 и низкомолекулярными БТШ, например, HSP17.6 [6].

Структура и функции БТШ на сегодняшний день изучены довольно хорошо, однако в механизмах регуляции их синтеза до сих пор остаётся много неясного. На сегодняшний день показана важная роль участия Ca²⁺ в развитии устойчивости к стрессовым факторам [2; 3]. В то же время чрезмерное накопление Ca²⁺ в митохондриях клеток млекопитающих приводит к обратной реакции – активации программируемой клеточной смерти (ПКС) [5].

В настоящее время известно, что при мягком тепловом стрессе наблюдается увеличение уровня цитозольного кальция, по-видимому, происходящее из органелл и из внешней среды [12; 14]. Предполагается, что этот процесс участвует в активации экспрессии генов БТШ. На животных показана связь между повышением уровня цитозольного кальция и повышением потенциала на внутренней митохондриальной мембране [13]. Таким образом, раскрытие механизмов взаимосвязи изменения уровня кальция с развитием стрессовых ответов является важной задачей современной биологии.

Одним из способов изучения влияния изменения уровня Ca^{2+} на биохимические процессы является применение хелаторов кальция – соединений его связывающих. В литературе имеются данные, где показана зависимость между уровнем цитозольного кальция и индукцией синтеза Hsp70 при действии теплового стресса [12], однако для Hsp101 таких данных нет. В связи с этим целью данной работы является изучение влияния хелатора кальция ЭГТА (этилендиоксидиэтилендинитротетраацетат) на синтез белка Hsp101 в культуре клеток арабидопсиса *Arabidopsis thaliana*.

Материалы и методы

В работе использовали 8-дневную культуру клеток *Arabidopsis thaliana* (L.) Heun. (раса Columbia). Культуру клеток выращивали в темноте при 26 °С [1] в среде, содержащей соли по Murashige и Skoog. Определение жизнеспособности клеток *A. thaliana*, ОТ-ПЦР-анализ и иммуноблоттинг с антителами проводили согласно ранее опубликованным методикам [1; 11]. В качестве контрольных генов для ОТ-ПЦР-анализа использовали гены «домашнего хозяйства» *ACT2* и *B-TUB*.

Эксперименты повторяли не менее трёх раз. Полученные данные обработаны статистически: с помощью программы Excel рассчитаны средние арифметические значения и их стандартные отклонения.

Результаты

В первую очередь изучали влияние разных концентраций ЭГТА на жизнеспособность культуры клеток *A. thaliana* при нормальной температуре инкубации (26 °С) и при мягком тепловом стрессе (37 °С). В ранее опубликованных исследованиях использовались концентрации ЭГТА в диапазоне от 2 до 15 мМ [7; 12]. В данной работе применены концентрации 5, 7, 10 и 15 мМ. Клетки *A. thaliana* предварительно инкубировали в течение 30 мин с ЭГТА указанных концентраций и подвергали тепловому стрессу 2 ч при 37 °С. Затем клетки несколько раз промывали разведённой вдвое культуральной средой для удаления агента. Далее клетки ресуспендировали в свежей среде и инкубировали при 26 °С. Жизнеспособность определяли через 48 ч после отмывки. При обычной температуре инкубации все концентрации ЭГТА не влияли на жизнеспособность клеток *A. thaliana*, а при 37 °С несколько снижали её (рис. 1).

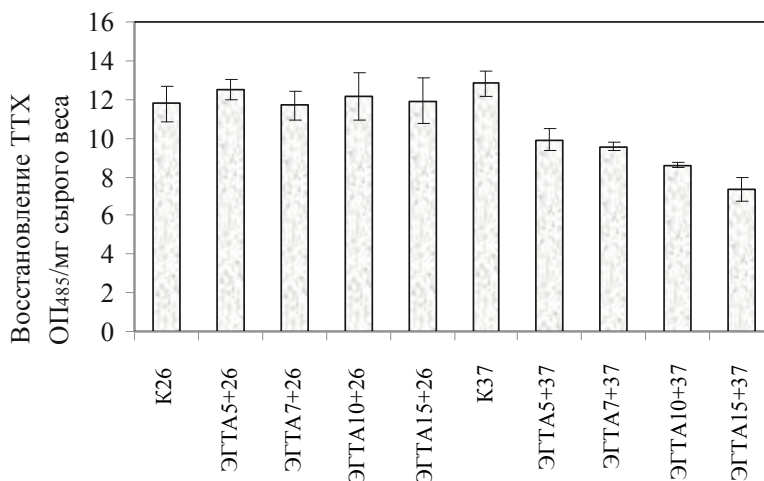


Рис. 1. Влияние ЭГТА на жизнеспособность клеток *A. thaliana*. n = 4

Далее изучали влияние ЭГТА на развитие ИТ. Клетки *A. thaliana* предварительно инкубировали в течение 30 мин с 5, 7, 10 и 15 мМ ЭГТА и подвергали тепловому стрессу 2 ч при 37 °С. Затем клетки отмывали и подвергали жёсткому тепловому шоку 50 °С в течение 10 мин. Жизнеспособность определяли спустя 48 ч инкубации при 26 °С. Обработка ЭГТА пропорционально концентрации угнетала развитие индуцированной термотолерантности в культуре клеток *A. thaliana* (рис. 2).

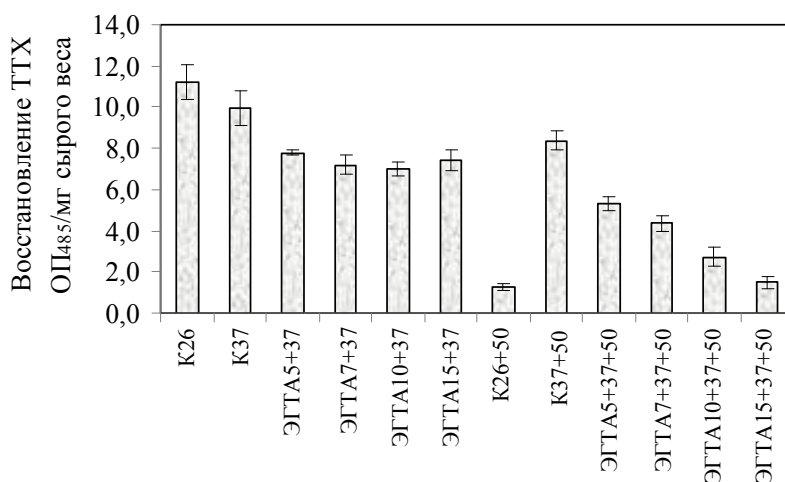


Рис. 2. Влияние ЭГТА на индуцируемую термотолерантность клеток *A. thaliana*, n = 3

Поскольку развитие ИТ определяется индукцией синтеза БТШ, следующим шагом было изучение влияния ЭГТА на экспрессию и синтез последних. Клетки *A. thaliana* предварительно инкубировали в течение 30 мин с 5, 7, 10 и 15 мМ ЭГТА и подвергали тепловому стрессу 2 ч при 37 °С. Далее клетки отмывали от агента и отбирали для ОТ-ПЦР-анализа или для выделения белка. Как видно из рис. 3А, экспрессия Hsp101 и низкомолекулярных БТШ (Hsp17.6C-СI и Hsp17.6C-СII) активировалась при мягком тепловом стрессе. Предобработка ЭГТА незначительно снижала экспрессию генов низкомолекулярных БТШ. Что касается Hsp101, то его экспрессия значительно активировалась в условиях мягкого теплового стресса, а в присутствии разных концентраций ЭГТА значительно подавлялась. В то же время в пробах с ЭГТА на электрофореграмме наблюдалась яркая полоса, идущая выше ожидаемой. Интенсивность этих полос была несколько ниже, чем в пробе K37. Предобработка ЭГТА никак не влияла на экспрессию гена Hsp60 как при 26 °С, так и при 37 °С.

Исследование влияния ЭГТА на БТШ на уровне трансляции (рис. 3, Б) показало значительное повышение уровня БТШ Hsp101, Hsp70 и Hsp17.6C I при инкубировании в условиях мягкого теплового стресса. Уровень синтеза Hsp60 не менялся во всех пробах. Присутствие ЭГТА вызывало снижение синтеза БТШ Hsp101, Hsp70 и Hsp17.6C I пропорционально концентрации.

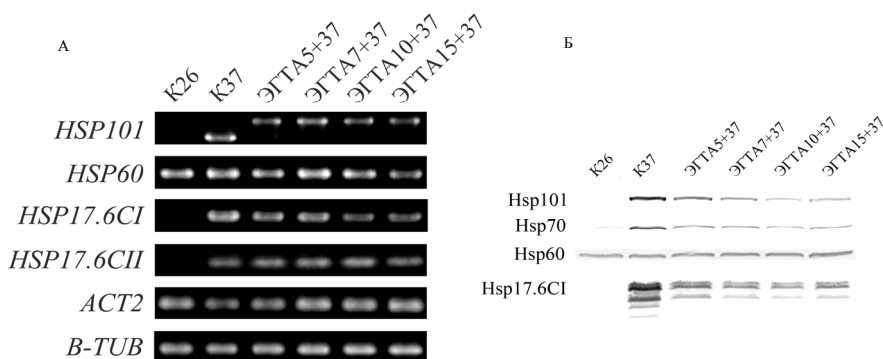


Рис. 3. Влияние ЭГТА на экспрессию генов БТШ (А) и на синтез БТШ (Б) в условиях теплового стресса: А – представлены результаты ОТ-ПЦР-анализа, $n = 3$; Б – представлены результаты иммуноблоттинга, $n = 6$

Результаты ОТ-ПЦР-анализа согласуются с данными, полученными с использованием иммуноблоттинга с соответствующими антителами. Таким образом, ЭГТА снижает ИТ у культуры клеток *A. thaliana* и ингибирует индуцируемую термотолерантность и синтез Hsp101.

Обсуждение

Кальций играет важную роль в сигнальной трансдукции [2; 3]. Многие стрессовые воздействия вызывают кратковременное повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле. Результаты, полученные в данном исследовании, показали,

что блокирование притока ионов кальция с помощью ЭГТА ингибировало ИТ в целом, а также синтез Hsp101 и других БТШ. На растительных объектах (*A. thaliana*, *Nicotiana tabaccum*, *Physcomitrella patens*) ранее уже было показано, что искусственное предотвращение притока внеклеточного кальция в цитозоль снижало ИТ [7; 9; 12]. На дрожжах недавно было показано участие кальция в синтезе БТШ, в том числе Hsp104 (аналог растительного Hsp101) [4]. На *A. thaliana* было показано, что экспрессия гена Hsp18.2 увеличивалась в ответ на экзогенный CaCl₂ и снижалась в присутствии ЭГТА [9]. Y. Saidi с соавторами [12] показали, что преинкубация с 7 мМ ЭГТА полностью подавляла тепловую индукцию синтеза Hsp70 у мха. В наших экспериментах не было зарегистрировано полного ингибирования синтеза ни одного из исследуемых БТШ ни на уровне транскрипции (см. рис. 3, А), ни на уровне трансляции (см. рис. 3, Б). Более того, инкубация клеток, обработанных ЭГТА в условиях мягкого теплового стресса, приводила к снижению жизнеспособности пропорционально концентрации. Такого не наблюдалось в клетках, обработанных ЭГТА с последующей инкубацией при 26 °С. Этот факт является довольно интересным, поскольку предобработка ЭГТА и мягкий тепловой стресс не являются токсичными для клеток *A. thaliana* по отдельности. Чем объясняется такой эффект, пока остаётся непонятным, хотя можно предположить, что в условиях мягкого теплового стресса хелатирование кальция предотвращает протекание защитных ответов в клетке, что приводит к снижению устойчивости к тепловому стрессу даже относительно невысокой температуры.

Предшествующая инкубации в условиях мягкого теплового стресса обработка ЭГТА ингибировала теплоиндуцируемый синтез Hsp101, Hsp70 и Hsp17.6Cl на уровне транскрипции и трансляции (см. рис. 3, А; Б). Причём в первом случае в пробах, предобработанных ЭГТА, наблюдалась дополнительная полоса на электрофореграмме, идущая выше основной. Это явление – так называемое удержание интронов – сохранение интрона в последовательности транскрипта. Удержание интронов – распространённый механизм альтернативного сплайсинга у растений, хотя зачастую является нарушением сплайсинга или присутствием в образце недосплайсированных транскриптов. Обычно такие транскрипты считаются экспериментальными артефактами и не являются функциональными [8; 10], что, по-видимому, имеет место в наших экспериментах, поскольку результаты иммуноблоттинга соответствуют нижней полосе Hsp101 на электрофореграмме. Тем более, что у Hsp101 альтернативных форм не выявлено.

Полученные результаты свидетельствуют о важной роли кальция в активации синтеза БТШ при тепловом стрессе и развитии ИТ в целом. Следует также отметить, что ЭГТА является хелатором кальция, не проникающим внутрь клетки, следовательно, препятствующим поступлению кальция извне. Это несколько ограничивает поле исследований, поскольку источником повышения уровня цитозольного кальция при стрессе могут быть органеллы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 8266). В работе использовано оборудование Байкальского аналитического центра (ЦКП) СО РАН при Президиуме ИИЦ СО РАН.

Список литературы

1. Влияние салициловой кислоты на развитие индуцированной термотолерантности и индукцию синтеза БТШ в культуре клеток *Arabidopsis thaliana* / Е. Л. Павлова [и др.] // Физиология растений. – 2009. – Т. 56. – С. 78–84.
2. Медведев С. С. Кальциевая сигнальная система растений / С. С. Медведев // Физиология растений. – 2005 – Т. 52. – С. 1–24.
3. Тарчевский И. А. Сигнальные системы клеток растений / И. А. Тарчевский. – М. : Наука, 2002. – 294 с.
4. Эффект ионов кальция на синтез Hsp104 и термотолерантность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / И. В. Федосеева [и др.] // Микробиология. – 2010. – Т. 79. – С. 173–179.
5. Cerella C. The dual role of calcium as messenger and stressor in cell damage, death, and survival / C. Cerella, M. Diederich, L. Ghibelli // Int J. Cell Biol. – 2010. – Vol. 2010. – P. 1–14.
6. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis* / C. Queitsch [et al.] // Plant Cell. – 2000. – Vol. 12. – P. 479–492.
7. Heat-shock-induced changes in intracellular Ca²⁺ level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance / M. Gong [et al.] // Plant Physiol. – 1998. – Vol. 116. – P. 429–437.
8. Keren H. Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function / H. Keren, G. Lev-Maor, G. Ast // Nat. Rev. Genet. – 2010. – Vol. 11. – P. 345–355.
9. Liu H. T. Ca²⁺ and AtCaM3 are involved in the expression of heat shock protein gene in *Arabidopsis* / H. T. Liu, D. Y. Un, R. G. Zhou // Plant Cell Environ. – 2005. – Vol. 28. – P. 1276–1284.
10. Ner-Gaon H. Intron retention is a major phenomenon in alternative splicing in *Arabidopsis* / H. Ner-Gaon [et al.] // Plant J. – 2004. – Vol. 39. – P. 877–885.
11. Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in *Arabidopsis* cell culture / E. G. Rikhvanov [et al.] // Plant J. – 2007. – Vol. 52. – P. 763–778.
12. The heat shock response in moss plants is regulated by specific calcium-permeable channels in the plasma membrane / Y. Saidi [et al.] // Plant Cell. – 2009. – Vol. 21. – P. 2829–2843.
13. The hyperfluidization of mammalian cell membranes acts as a signal to initiate the heat shock protein response / G. Balogh I [et al.] // FEBS J. – 2005. – Vol. 272. – P. 6077–6086.
14. Wu H.-C. Heat shock-triggered Ca²⁺ mobilization accompanied by pectin methyltransferase activity and cytosolic Ca²⁺ oscillation are crucial for plant thermotolerance / H.-C. Wu, T.-L. Jinn // Plant Sign. Behav. – 2010. – Vol. 5 – P. 1252–1256.

Effect of EGTA on the Hsp101 Synthesis in *Arabidopsis thaliana* Cell Culture

E. L. Gorbyleva^{1,2}, E. G. Rikhvanov¹, T. M. Rusaleva¹, I. V. Fedoseeva¹
A. V. Fedyayeva¹, G. B. Borovskii¹

¹*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk*

²*National Research Irkutsk State Technical University, Irkutsk*

Abstract. Ca²⁺ plays an important role in plant signal transduction. Heat stress induces elevation of Ca²⁺ level in cytosol. Pretreatment by different concentrations of calcium chelator EGTA didn't affect the viability of *A. thaliana* cells at normal temperature, but slightly decreased at mild heat stress. Blocking of extracellular Ca²⁺ influx by EGTA inhibited induced thermotolerance and heat-induced expression and synthesis of Hsp101 and another heat shock proteins (HSP). The findings indicate the dependence of Hsp101 and another HSP synthesis from cell Ca²⁺ level.

Keywords: EGTA, heat shock proteins, *Arabidopsis thaliana*, induced thermotolerance, heat shock.

Горбылева Елена Леонидовна
кандидат биологических наук
младший научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
Национальный исследовательский
Иркутский государственный
технический университет
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83
тел.: (3952) 42–46–59
факс: (3952) 51–07–54
e-mail: dzubina@sifibr.irk.ru

Gorbyleva Elena Leonidovna
Candidate of Sciences (Biology)
Junior Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
National Research Irkutsk State Technical
University
83, Lermontov st., Irkutsk, 664074
tel.: (3952) 42–46–59
fax: (3952) 51–07–54
e-mail: dzubina@sifibr.irk.ru

Рихванов Евгений Геннадьевич
доктор биологических наук
ведущий научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42–46–59
факс: (3952) 51–07–54
e-mail: eugene@sifibr.irk.ru

Rikhvanov Evgenii Gennadievich
Doctor of Sciences (Biology)
Leading Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42–46–59
fax: (3952) 51–07–54
e-mail: eugene@sifibr.irk.ru

Русалева Татьяна Михайловна
ведущий инженер
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132

Rusaleva Tatyana Mikhailovna
Leading Engineer
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033

тел.: (3952) 42–46–59
факс: (3952) 51–07–54
e-mail: dzubina@sifibr.irk.ru

Федосеева Ирина Владимировна
кандидат биологических наук
научный сотрудник.
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42–46–59
факс: (3952) 51–07–54
e-mail: fedoseeva@sifibr.irk.ru

Федяева Анна Валерьевна
ведущий инженер
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42–46–59
факс: (3952) 51–07–54
e-mail: fedyaeva.anna@mail.ru

Боровский Геннадий Борисович,
доктор биологических наук, главный
научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42–46–59
факс: (3952) 51–07–54
e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru

tel.: (3952) 42–46–59
fax: (3952) 51–07–54
e-mail: dzubina@sifibr.irk.ru.

Fedoseeva Irina Vladimirovna
Candidate of Sciences (Biology)
Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42–46–59
fax: (3952) 51–07–54
e-mail: fedoseeva@sifibr.irk.ru

Fedyaeva Anna Valerievna
Leading Engineer
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42–46–59
fax: (3952) 51–07–54
e-mail: fedyaeva.anna@mail.ru

Borovskii Gennadii Borisovich
Doctor of Sciences (Biology), Chief
Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42–46–59
fax: (3952) 51–07–54
e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru