

## СИНТЕЗ СТРЕССОВЫХ БЕЛКОВ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ГИПЕРТЕРМИИ

*Т.П. Побежимова<sup>1</sup>, Н.С. Забанова<sup>1,2</sup>, О.И. Грабельных<sup>1,2</sup>, В.К. Войников<sup>1</sup>*  
<sup>1</sup>ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск  
<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, Иркутск,  
e-mail: pobezhimova@sifibr.irk.ru

Выживаемость растительных клеток в условиях высокотемпературного стресса зависит от содержания в клетке в момент воздействия стрессовых белков, особенно белка теплового шока Hsp101 (БТШ101) (Queitsch et al., 2000). Известно, что другие БТШ, а именно – низкомолекулярные (нмБТШ), защищают при стрессе дыхательную цепь митохондрий (Downs, Neckathorn, 1998; Hamilton, Neckathorn, 2001). Одной из причин гибели растений при температурном стрессе может быть окислительный стресс, связанный с избыточной генерацией активных форм кислорода (АФК) (Marchi et al., 2012). В ряде работ показано усиление образования АФК в растительных клетках при повышении температуры (Федяева и др., 2014). При этом в этиолированных тканях растений основной вклад в продукцию АФК в клетке вносят митохондрии и их электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) (Møller, 2001). Регуляция функционирования митохондрий важна для поддержания клеточного гомеостаза в клетках растений при стрессе (Schwarzlander, Finkemeir, 2013). Ранее нами на этиолированных проростках кукурузы было показано, что флуктуации температур вызывают изменения в способности митохондрий растений генерировать АФК, при этом происходят изменения целостности митохондрий и их окислительной и фосфорилирующей активности (Grabelnych et al., 2015). Однако связь между синтезом стрессовых белков и функциональной активностью растительных митохондрий при температурном стрессе не изучалась. Целью работы явилось изучение связи между содержанием АФК, синтезом стрессовых белков и функциональной активностью митохондрий озимой пшеницы.

В качестве объекта исследования в работе использовали этиолированные проростки озимой пшеницы (сорт «Иркутская»). Проростки выращивали до возраста 3-х суток (контроль) и подвергали действию закалывающей температуры 37 °С (2 и 24 ч) (тепловое закалывание, ТЗ) с последующим действием на закаленные проростки повреждающей температуры 47 °С, 30 мин (тепловой шок, ТШ). Жизнеспособность клеток после теплового шока оценивали кондуктометрически по выходу электролитов из тканей побегов, а выживаемость проростков по их отрастанию через 7 суток после воздействия. Определение содержания АФК в побегах пшеницы проводили с использованием 1 мкМ H<sub>2</sub>DCF·DA (Грабельных и др., 2014). Выделение митохондрий из побегов проростков и очистку в градиенте плотности перколла проводили по методике (Побежимова и др., 2004). Интактность и активность митохондрий оценивали полярографически с использованием платинового электрода и Oxytherm Oxygen Electrode Unit system (Hansatech). Интактность внешней митохондриальной мембраны определяли по скорости аскорбат-зависимого цитохром *c*-стимулируемого KCN-чувствительного поглощения кислорода в отсутствие и в присутствии 0,04 % Тритона X-100. Для анализа окислительной активности митохондрий использовали смеси субстратов: 10 мМ малат + 10 мМ глутамат, 8 мМ сукцинат + 5 мМ глутамат и 3 мкМ ротенона, 1 мМ НАД·Н, 1 мМ НАДФ·Н, 2 мМ аскорбат + 0,2 мМ тетраметил-*p*-фенилендиамин (ТМФД). При окислении НАД·Н и НАДФ·Н из состава среды инкубации исключали ЭДТА и включали 0,06 мМ CaCl<sub>2</sub>. Для определения активности альтернативной внутренней НАД·Н-дегидрогеназы (НАД·Н-ДГ) использовали 10 мМ малат + 10 мМ глутамат и 3 мкМ ротенон. В качестве ингибитора цитохромного пути дыхания использовали 0,4 мМ KCN,

а альтернативного пути дыхания, связанного с функционированием альтернативной оксидазы (АО), – 1 мМ бензгидроксамовую кислоту (БГК). Для изучения синтеза стрессовых белков общие клеточные и митохондриальные белки разделяли электрофоретически в денатурирующих условиях и проводили иммуноблоттинг с антителами против Hsp101, Hsp70/Hsc70, Hsp17,6 (I и II Classes), AOX1/2, используя актин и порин как внутренние контроли.

Наши результаты показали, что предварительный прогрев проростков озимой пшеницы при 37 °С в течение 2 ч приводит к повышению устойчивости мембран к действию температуры 47 °С, о чем свидетельствует отсутствие повышения выхода электролитов в раствор из тканей закаленных проростков и выживаемость самих проростков после отрастания. Увеличение длительности обработки до 24 ч приводило к некоторому росту устойчивости проростков к тепловому шоку.

С использованием H<sub>2</sub>DCF-DA было выявлено, что тепловой шок приводит к развитию окислительного стресса в побегах озимой пшеницы, который можно предотвратить предварительной обработкой проростков закаливающей температурой. Так, при обработке незакаленных проростков температурой 47 °С содержание АФК в тканях побегов озимой пшеницы значительно возрастало, а при действии 47 °С на закаленные проростки содержание АФК было на уровне контроля.

Анализ содержания ряда БТШ в тканях побегов озимой пшеницы при тепловом воздействии показал, что обработка проростков температурой 37 °С (2 и 24 ч) приводит к синтезу Hsp101, Hsp70 и Hsp17.6 (I и II Classes). В отличие от Hsp101, Hsp70 и Hsp17.6 (CII) накопление Hsp17.6 (CI) зависело от длительности обработки, и было наибольшим через 24 ч. Ранее было показано, что у арабидопсиса цитоплазматический Hsp101 обнаруживается после теплового стресса преимущественно в митохондриальной фракции (Rikhvanov et al., 2007). Это позволяет предположить, что Hsp101 может связываться с митохондриями при тепловом стрессе и модулировать их активность. Нами также показано, что Hsp101 ассоциирует с митохондриями озимой пшеницы при действии на проростки закаливающей температуры, причем Hsp101 детектировался в митохондриальной фракции и после ее очистки в градиенте плотности перколла. Наряду с Hsp101 в митохондриальной фракции озимой пшеницы после теплового воздействия обнаруживался Hsp17.6 (I и II Classes).

Поскольку прогрев при 37 °С приводил к синтезу стрессовых белков, часть из которых обнаруживалась в митохондриальной фракции, и защищал проростки озимой пшеницы от гибели при последующем тепловом шоке, необходимо было изучить функциональную активность митохондрий из незакаленных и закаленных проростков при ТШ. Тепловой шок приводил к нарушению интактности внешней мембраны митохондрий из незакаленных проростков, значительному снижению их окислительной и фосфорилирующей активности. Предварительная обработка температурой 37 °С предотвращала нарушение целостности митохондрий при ТШ и не приводила к снижению их окислительной и фосфорилирующей активности. Интересно, что воздействие закаливающей температурой в течение 2 ч приводило к снижению окислительной активности митохондрий, однако не влияло на степень сопряжения процессов окисления и фосфорилирования (на это указывают значения коэффициента ДК и отношения АДФ:О). Дальнейшая экспозиция проростков при 37 °С (до 24 ч) приводила к некоторому повышению скоростей окисления митохондриями малата в присутствии ротенона, сукцината, НАДФ Н и ТМФД. Так же как и в случае 2-х часовой обработки параметры сопряжения процессов окисления и фосфорилирования не снижались. Следует отметить, что скорость окисления экзогенного НАД Н митохондриями оставалась на уровне значения контрольных проростков. Были выявлены различия в активности внешних НАД(Ф) Н-ДГ, при этом, как оказалось, НАДФ-Н-дегидрогеназа в митохондриях озимой пшеницы менее активна. Изучение потенциальной активности АО выявило, что при 2-х ч воздействии температурой 37 °С она не изменяется независимо от субстрата

окисления, в то время как 24-х часовое воздействие приводит к увеличению активности АО при функционировании внутренних ротенон-нечувствительных НАД(Ф) Н-ДГ и внешней НАДФ·Н-ДГ. Наряду с активностью в митохондриях растёт и содержание белка АО.

Таким образом, действие неповреждающей высокой температуры приводит к синтезу стрессовых белков в проростках озимой пшеницы, при этом ряд цитоплазматических БТШ (Hsp101, Hsp17.6) обнаруживается в митохондриях, что позволяет им функционировать при тепловом шоке. Возможно, Hsp101 и нмБТШ оказывают влияние на функциональную активность митохондрий и предотвращают повреждения дыхательной цепи, вызываемые тепловым шоком, при этом снижается риск развития окислительного стресса. Сохранение сопряжения процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях является необходимым условием для развития адаптивных реакций в клетке.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-04-06533-а.*

#### Литература

*Грабельных О.И., Боровик О.А., Таусон Е.Л. (и др.).* Митохондриальные энергорассеивающие системы (альтернативная оксидаза, разобщающие белки и «внешняя» НАДН-дегидрогеназа) вовлечены в развитие морозоустойчивости проростков озимой пшеницы // Биохимия. – 2014. – Т. 79, № 6. – С. 645–660.

*Побежимова Т.П., Колесниченко А.В., Грабельных О.И.* Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез; Отв. ред. чл.-корр. РАН Р.К. Салаяев. – М.: ООО «НПК ПРОМЭКОБЕЗОПАСНОСТЬ», 2004. – 98 с.

*Федяева А.В., Степанов А.В., Любушкина И.В., Побежимова Т.П., Рихванов Е.Г.* Тепловой шок индуцирует продукцию активных форм кислорода и повышает потенциал на внутренней митохондриальной мембране в клетках озимой пшеницы // Биохимия. – 2014. – Т. 79, № 11. – С. 1476–1486.

*Downs C.A., Heckathorn S.A.* The mitochondrial small heat-shock protein protects NADH: ubiquinone oxidoreductase of the electron transport chain during heat stress in plants // FEBS Lett., 1998. – V. 430 – P. 246–250.

*Grabelnych O.I., Pobezhimova T.P., Koroleva N.A. (et al.).* Temperature stress and consequences of its influence on functional activity of mitochondria in maize etiolated seedlings // J. Stress Physiology and Biochemistry. – 2015. – V. 11, N 3. – P. 82–93.

*Hamilton E.W., Heckathorn S.A.* Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine // Plant Physiol. – 2001. – V. 126. – P. 1266–1274.

*Marchi S., Giorgi C., Suski J.M. (et al.).* Mitochondrial-ROS crosstalk in the control of cell death and aging // J. Signal Transduction. – 2012. – V. 2012. – P. 329635.

*Møller I.M.* Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species // Plant Physiol. – 2001. – V. 52. – P. 561–591.

*Queitsch C., Hong S.W., Vierling E., Lindquist S.* Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis // Plant Cell. – 2000. – V. 12, № 4. – P. 479–492.

*Rikhvanov E.G., Gamburg K.Z., Varakina N.N. (et al.).* Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in Arabidopsis cell culture // Plant J. – 2007. – V. 52, № 4. – P. 763–768.

*Schwarzlander M., Finkemeir I.* Mitochondrial energy and redox signaling in plants // Antioxid. Redox Signal. – 2013. – V. 18. – P. 2122–2144.