

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ ДЕГИДРИНЫ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА: ЛОКАЛИЗАЦИЯ И НАТИВНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ В НОРМЕ И ПРИ ГИПОТЕРМИИ

М.А. Кондакова, И.В. Уколова, Г.Б. Боровский, В.К. Войников

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *kondakova-marina@mail.ru*

Аннотация. Методами одномерного и двумерного голубого нативного электрофореза (1D BNE, 2D BNE/SDS) с последующей иммунохимической детекцией при помощи антител от разных производителей (фирмы Agrisera и предоставленные профессором Т. J. Close) изучены полиморфизм, нативная организация, и локализация митохондриальных дегидринов проростков гороха *Pisum sativum* L. в оптимальных условиях и при гипотермии.

Ключевые слова: митохондриальные дегидрины, гипотермия, *Pisum sativum* L.

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-427-429

Дегидрины являются высокогидрофильными термостабильными белками, которые относятся ко второй группе белков позднего эмбриогенеза (LEA II) или семейству LEA-D11. Данные полипептиды накапливаются после действия различных стрессоров, приводящих к дегидратации, и выполняют следующие функции: протекция мембран, криозащита ферментов, а также защита от АФК либо путем прямого взаимодействия с опасными молекулами, либо при помощи связывания свободных ионов металлов – катализаторов синтеза АФК [Hanin et al., 2011]. Для дегидринов характерно наличие высоко консервативных последовательностей K, S, и Y, а также мало консервативного Ф-сегмента. Последний обогащен полярными аминокислотными остатками и вносит неупорядоченность в структуру этих белков. В зависимости от наличия консервативных сегментов различают пять видов дегидринов: K_n , SK_n , K_nS , Y_nK_n , Y_nSK_n [Close, 1996].

В клетке дегидрины локализуются в разных компартментах. Они обнаружены в клеточной стенке, цитоплазме, митохондриях, хлоропластах, вакуолях, эндоплазматическом ретикулуме, ядре. Причем в разных компартментах локализуются разные типы дегидринов. Так, например, SK_n чаще встречается в плазматической мембране, K_nS – в митохондриальной фракции, Y_nK_n – обнаружен в цитоплазме и в ядре [Graether, Boddington, 2014]. Кроме того, показано, что наличие большого количества K-сегментов является определяющим фактором при защите от замерзания, а при засухе и солевом стрессе наблюдается индукция синтеза Y-сегментов [Graether, Boddington, 2014].

Накопление дегидринов при стрессе в митохондриях вполне закономерно, поскольку эти органеллы играют важную роль в регуляции метаболизма клетки. Ранее в нашей лаборатории было установлено, что в ответ на действие холода, обезвоживания и обработку АБК в митохондриях проростков озимой пшеницы, ржи и кукурузы происходит накопление дегидринов [Borovskii et al., 2002]. При помощи электронной иммуноцитохимии клеток тканей проростков озимой пшеницы было отмечено увеличение их содержания в период холодовой адаптации в кристах митохондрий [Романенко и др., 2010].

В данной работе мы изучили субмитохондриальную локализацию и нативное состояние дегидринов в оптимальных условиях, а также исследовали влияние гипотермии на содержание LEA-D11 в проростках гороха.

В работе использовали этиолированные проростки гороха (*Pisum sativum* L., сорт Аксайский Усатый 55). Контрольные проростки выращивали в течение 6 суток при +20 °С. Низкотемпературные обработки были следующие: закаливание (+7 °С, 7 суток), мягкий (+2 °С, 7 суток) и жесткий (-7 °С, 1,5 ч) стрессы. Все эксперименты проводили с использованием фракции митохондрий, очищенных на ступенчатом градиенте перколла.

В результате исследований обнаружено, что используемые антитела детектируют разные спектры дегидринов в митохондриях проростков гороха. Так, антитела фирмы Agrisera (Швеция) реагируют с мажорным полипептидом 52 кДа и минорными белками с массами 70, 39 и 35 кДа, тогда как антитела, любезно предоставленные профессором Т. J. Close (Калифорнийский университет, США), детектируют белки 85, 67, 61, 47 и 42 кДа. Известно, что К-сегмент не является абсолютно консервативным и возможны некоторые замены аминокислот в его последовательности [Hanin et al., 2011]. По-видимому, различия в детекции между антителами связаны с вариабельностью К-сегмента, используемого для синтеза антител. Вероятно, антитела двух производителей обнаруживают дегидрины различных видов.

Изучение внутримитохондриальной локализации дегидринов 70 и 52 кДа при помощи антител фирмы Agrisera выявило преимущественно их матриксное расположение. Дегидрин массой 35 кДа, по-видимому, является белком внутренней мембраны, а дегидрин 39 кДа – белком межмембранного пространства. Минорное количество дегидрина 39 кДа обнаружено на второй мере 2D BNE/SDS в области комплекса I. Это позволяет предположить его возможную ассоциацию с дыхательным ферментом с внешней стороны внутренней мембраны. Изучение нативной организации дегидринов при помощи 2D BNE/SDS с последующим иммуноблоттингом впервые показало, что дегидрин 52 кДа имеет нативную массу в пределах 200 кДа. Это может указывать либо на олигомерную, предположительно, гомотетрамерную структуру нативного дегидрина, либо на его ассоциацию с другими митохондриальными белками.

Антитела от Т. J. Close также детектировали дегидрины, преимущественно, имеющие матриксную локализацию. В отличие от дегидринов «Agrisera» белок с массой 85 кДа обнаружен в районе суперкомплекса I+NDA+III₂+IV и в области АТФ синтасомы Va+NDA+NDB+AOX, что говорит о возможной ассоциации дегидрина с этими структурами.

Показано, что при гипотермии различной интенсивности происходит накопление дегидринов «Close», в то время как содержание дегидринов «Agrisera» значительно не изменяется в изучаемых условиях. Интересно, что дегидрины как «Close», так и «Agrisera» сохраняют свою нативную массу и локализацию в условиях гипотермии.

Таким образом, можно предположить, что в митохондриях проростков гороха присутствуют разные типы дегидринов, которые функционально отличаются друг от друга. Так, дегидрины «Close» могут выполнять криопротекторную функцию и защищать как мембраны, так и ферменты от возможных повреждений при гипотермии. Дегидрины «Agrisera» могут предохранять ферменты, в частности комплекс I дыхательной цепи митохондрий, а также митохондриальные мембраны от возможного вредного воздействия АФК в оптимальных условиях развития.

Исследования структуры и функций белков семейства LEA-D11 ведутся уже более тридцати лет, однако их физиологическая роль и механизмы повышения стрессоустойчивости растений все еще до конца не изучены. Дальнейшее всестороннее исследование LEA II поможет разобраться в этом вопросе.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 14-04-01233 а.

Литература

Романенко А. С., Боровский Г. Б., Уколова И. В., Ломоватская Л. А. Субклеточная локализация дегидринов в проростках растений пшеницы при низкотемпературной адаптации // Биологические мембраны. – 2010. – Т. 27, № 2. – С. 156–165.

Borovskii G. B., Stupnikova I. V., Antipina A. I., Vladimirova S. V., Voinikov V. K. Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment // BMC Plant Biology. – 2002. – V. 2. – P. 5.

Close T. J. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins // Physiol. Plant. – 1996. – V. 97. – P. 795–803.

Graether S. P., Boddington K. F. Disorder and function: a review of the dehydrin protein family // Front. Plant Sci., 2014. – V.5. – P. 1–12.

Hanin M., Brini F. E., Ebel C., Toda Y., Takeda S., Masmoudi K. Plant dehydrins and stress tolerance: Versatile proteins for complex mechanisms // Plant signal. Behav. – 2011. – V. 6. – P. 1503–1509.

MITOCHONDRIAL DEHYDRINS OF PEA SEEDLINGS: LOCALIZATION AND NATIVE ORGANIZATION UNDER OPTIMAL CONDITIONS AND AFTER HYPOTHERMIA

M.A. Kondakova, I.V. Ukolova, G.B. Borovskii, V.K. Voinikov

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, *kondakova-marina@mail.ru*

Abstract. The polymorphism, native organization and localization of mitochondrial dehydrines in pea (*Pisum sativum* L.) shoot mitochondria were studied under optimal conditions and after hypothermia treatment by one- and two-dimensional blue native polyacrylamide gel electrophoresis (1D BNE, 2D BNE/SDS) with following immunochemical detection with antibodies of two manufacturers (Agrisera and antibodies kindly provided by Prof. T. J. Close).

Keywords: *mitochondrial dehydrins, hypothermia, Pisum sativum* L.