

УДК 581.1

Азаркович М.И., Гумилевская Н.А.

(Москва)

ОТВЕТ РЕКАЛЬЦИТРАНТНЫХ СЕМЯН *AESCULUS HIPPOCASTANUM* L. НА ДЕЙСТВИЕ ТЕПЛООВОГО ШОКА

Аннотация. Исследовано действие теплового шока (ТШ) на синтез белка в тканях зародышей покоящихся рекальцитрантных семян каштана конского (*Aesculus hippocastanum* L.) во время стратификации. Во всех частях зародыша, особенно в осях, общий уровень белкового синтеза возрастает при ТШ в начале стратификации семян и понижается при их проклёвывании. Выявлены 10 белков теплового шока (БТШ), которые в основном относятся к фракции термолabileльных белков цитозоля. Одновременно с синтезом БТШ при ТШ продолжается синтез нормальных клеточных белков. Предполагается, что эта особенность ответа на ТШ свойственна именно тканям зародыша и может рассматриваться как дополнительный молекулярный механизм, повышающий устойчивость зародыша к неблагоприятным условиям среды.

Ключевые слова: *Aesculus hippocastanum*, рекальцитрантные семена, покой семян, белки теплового шока, стратификация.

M. Azarkovich, N. Gumilevskaya

(Moscow)

RESPONSE OF RECALCITRANT *AESCULUS HIPPOCASTANUM* L. SEEDS TO A HEAT SHOCK

Abstract. The effects of a heat shock (HS) on the protein synthesis in the embryo tissues of dormant recalcitrant horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) seeds in the course of their stratification were studied. It was established that in all embryo parts, especially in axes, the HS markedly activated protein synthesis in the beginning of stratification, and the HS suppressed protein synthesis at radicle emersion. 10 proteins were singled out which behaved as obvious heat shock proteins (HSP); they were predominantly thermolabile cytosolic proteins. Simultaneously with HSP the bulk of normal cell proteins continued to be synthesized under the conditions of the HS. It is suggested that such response to the HS is characteristic just of embryo tissues; it could be considered an additional molecular mechanism improving embryo tolerance to unfavorable environmental conditions.

Key words: *Aesculus hippocastanum*, recalcitrant seeds, seed dormancy, heat shock proteins, stratification.

Семена растений представляют собой уникальный объект для изучения механизмов устойчивости и адаптации к абиотическим стрессам. Это объясняется следующим. Семена не могут покинуть среду обитания в случае появления неблагоприятных условий и должны быть приспособлены преодолевать их, чтобы сохранить способность прорасти и выполнить своё физиологическое назначение по сохранению и распространению вида. На стадии семени происходит переключение программ индивидуального развития растения с эмбриогенеза на прорастание. Зародыш семени в период созревания, покоя и раннего прорастания, сталкиваясь с неблагоприятными стрессовыми условиями, должен, с одной стороны, изменить клеточную активность на уровне экспрессии генов и индуцировать синтез антистрессовых белков, чтобы защитить себя и преодолеть действие стресса, а с другой – обеспечить экспрессию генов белков, необходимых для дальнейшего развития, т. е. самого прорастания.

Семена каштана конского (*Aesculus hippocastanum* L.), исследованию которых посвящена наша работа, обладают двумя физиологическими особенностями. С одной стороны, они неустойчивы к высушиванию и относятся по этому признаку к рекальцитрантному типу, но способны поддерживать определённый уровень оводнённости длительное время после опадения. Они не способны прорасти в благоприятных для роста условиях, так как находятся в состоянии глубокого физиологического покоя. Состояние глубокого покоя преодолевается длительным воздействием пониженных температур (стратификацией). Совокупность и последовательность молекулярных механизмов, ответственных за эти явления, пока остаётся неизвестной. Одним из подходов к выявлению и пониманию молекулярных механизмов, ответственных за устойчивость и жизнеспособность семян растений, может быть характеристика ответа на тепловой шок (ТШ). ТШ или кратковременное повышение температуры на 8-10°C выше оптимальной температуры роста вызывает в клетках всех живых организмов быстрые временные и обратимые изменения в экспрессии генов, приводящие к индукции синтеза специфической группы полипептидов, называемых белками теплового шока (БТШ), и репрессии (полной или частичной) синтеза «нормальных» клеточных белков, продуцируемых клетками до тепловой обработки. Это общебиологическое явление было квалифицировано как ответ на ТШ [5–7]. Универсальность и консерватизм ответа на ТШ свидетельствуют о его важной роли в физиологии клетки. Поскольку накопление БТШ при ТШ в клетках вегетативных органов и проростков растений коррелировало с выработкой у них устойчивости

к последующему действию летальных температур, то было предположено, что ответ на ТШ является проявлением молекулярных механизмов, обеспечивающих термоустойчивость клеток [5; 7]. За последние два десятилетия со времени открытия БТШ представления об их свойствах и роли значительно расширились и усложнились. Стало известно, что многие БТШ являются молекулярными шаперонами [8; 9] и способствуют осуществлению белок-белковых взаимодействий в клетке; что БТШ могут присутствовать в нормальных, нестрессированных клетках или же экспрессироваться на определенных стадиях развития в отсутствие теплового воздействия или при действии других видов стресса [10]. По современным представлениям [5; 6, стр. 39; 8], универсальным фактором защиты и устойчивости клеточных структур и отдельных белковых компонентов является накопление в клетке специфических (стрессовых) белков – БТШ. Их синтез может происходить в ответ на различные виды стресса [7; 9; 10], но всегда выявляется при действии ТШ [5; 6, стр. 42]. Ответ на ТШ рассматривается как проявление молекулярных механизмов, ответственных за устойчивость и адаптацию клеток к неблагоприятным условиям среды, а сам ТШ используется для выявления этих молекулярных механизмов [5; 7; 10]. Индукция синтеза БТШ, очевидно, является абсолютно универсальной чертой ответа на ТШ всех живых клеток [5; 6, стр. 42]. Однако репрессия синтеза нормальных клеточных белков в ответ на ТШ, зарегистрированная в клетках животных, микроорганизмов и вегетативных органов растений, будет иметь негативные последствия для жизнеспособности семян. К настоящему времени ответ на ТШ клеток зародышевых тканей семян исследован только на семенах ортодоксального типа с вынужденным покоем [4]. Имеющиеся данные говорят о том, что синтез БТШ в ответ на тепловой шок происходит на фоне продолжения синтеза нормальных клеточных белков и сопровождается усилением трансляционной активности клеток. При этом оставалось неясным, типичен ли вообще такой ответ на ТШ для клеток зародышей семян, или обусловлен типом семян либо видом их покоя. Это определило задачу наших исследований – охарактеризовать ответ на ТШ зародышевых тканей рекальци-трантных семян каштана конского в период глубокого покоя и раннего прорастания.

Материал и методы исследования. Работу¹ проводили на семенах каштана конского (*Aesculus hippocastanum* L.), собранных сразу после опадения в парках Москвы и подвергнутых холодному влажному хране-

¹ Работа частично поддержана Программой «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН.

нию (стратификации) при +4°C в течение 19-20 недель до момента видимого прорастания, т. е., проклёвывания. Оси, кусочки семядолей и чешушки семядолей изолировали из стерилизованных семян в различные сроки после начала холодной стратификации, инкубировали 4 часа при 28° или 40°C в бидистиллированной воде, содержащей 35S-метионин (100 микрокюри/мл) и хлорамфеникол (50 мкг/мл) с добавлением или без α -аманитина (7 мкг/мл), после чего оси отмывали большим объёмом дистиллированной воды и замораживали. Замороженные оси гомогенизировали в растворе 0,25M сахарозы, приготовленном на 0,05M Трис-HCl буфере (pH 7,2), содержащем 0,01M Mg-ацетата, 0,025M KCl, 7 мкг/мл пепстатина, 5 мкг/мл лейпептина и 1мM ФМСФ и подвергали дифференциальному центрифугированию. В результате получали суммарный клеточный экстракт (1000g-центрифугат), фракцию клеточных структур (20000g-осадок) и постмитохондриальный клеточный экстракт (20000g-центрифугат). Постмитохондриальный клеточный экстракт подвергали тепловой обработке (5-10 мин. при 75-80°C) для разделения термолабильных и термостабильных белков. Во фракции суммарного клеточного экстракта (1000g-центрифугата) измеряли ТХУ-осаждаемую и ТХУ-растворимую радиоактивность, т. е. включение и поглощение 35S-метионина. Из аликвот каждой из полученных субклеточных фракций гомогената осей получали препараты белка (ТХУ-осаждаемый материал), пригодные для SDS-электрофореза. Электрофорез проводили в восстановленных диссоциирующих условиях в пластинах геля с градиентом концентрации акриламида 10–20%. Гели окрашивали Кумасси R-250, высушивали и экспонировали на рентгеновской пленке Retina Kodak. Полученные изображения переносили на фототехническую пленку ФТ11 и получали отпечатки контактным способом. Все опыты имели не менее 3-х биологических и аналитических повторностей. Все указанные выше процедуры по постановке опытов, обработке материала, а также объемы и концентрации использованных растворов и квалификация реактивов детально описаны нами ранее [1-3].

Результаты и обсуждение. Ранее нами было установлено [1; 3], что в клетках осевых органов и запасающей паренхимы семядолей после опадения зрелых семян сохраняется активный аппарат трансляции, и эти ткани зародыша, будучи отделенными друг от друга, способны синтезировать *in vivo* большое число разнообразных полипептидов. Чтобы оценить действие ТШ на белок-синтезирующую способность клеток зародышей в ходе стратификации и приблизиться к пониманию возможной связи между характером ответа на ТШ и состоянием глубокого

покоя целых интактных семян, было поставлено большое число опытов по включению ³⁵S-метионина в белки изолированных частей зародыша при 28° и 40°С.

Установлено, что во всех частях зародыша общий уровень белкового синтеза существенно (на 50-70%) возрастает при действии ТШ в начале стратификации, в меньшей степени (на 10%) – через 10 недель стратификации и понижается при проклёвывании и особенно росте зародышевой оси. В осях, изолированных из проклюнувшихся семян, ТШ заметно подавлял синтез белка, и уровень удельной радиоактивности суммарного белка в таких осях был в 2-3 раза ниже контрольного уровня. Таким образом, оси и кусочки семядолей, изолированные из покоящихся семян, способны синтезировать белки как при 28°С, так и при 40°С на протяжении всего времени стратификации, но обнаруживают при этом различную термочувствительность. Это обстоятельство может косвенно указывать на изменения в физиологическом состоянии частей зародыша, которые происходят во время стратификации целых нативных покоящихся семян.

Чтобы оценить влияние ТШ на экспрессию генов на уровне синтеза белка, было необходимо получить представление о том, какие полипептиды синтезируются при ТШ, какие из них можно отнести к БТШ, какова их локализация, зависимость их синтеза от транскрипции и времени стратификации. Для этой цели были использованы методы одномерного SDS-диск-электрофореза и радиоавтографии после импульсного мечения *in vivo* изолированных осей и кусочков семядолей при 28°С и 40°С в течение 4 часов. Электрофоретический и радиоавтографический анализ меченых белков показал, что, независимо от срока стратификации, которая постепенно выводит рекальцитрантные семена каштана из состояния глубокого покоя, изолированные оси и кусочки семядолей синтезируют *in vivo* большое число полипептидов как при 28°С, так и при 40°С. Набор этих белков мало меняется в ходе стратификации. Новосинтезированные полипептиды присутствуют во фракции клеточных структур и в цитозоле и различаются по молекулярным массам, интенсивности мечения (особенно при ТШ) и степени устойчивости к тепловой денатурации. Сравнение окрашенных гелей и радиоавтограмм показало, что ни один из доминирующих полипептидов, исходно присутствующих в зародышах и относящихся к термостабильным белкам цитозоля, не синтезируется ни при нормальной температуре, ни в ответ на ТШ. Это означает, что белки, синтезированные при ТШ, не имеют какой-то преимущественной внутриклеточной локализации. Это подтвердили результаты анализа удельной радио-

активности белков различных субклеточных фракций, полученных из меченых контрольных и шокированных тканей зародыша. Установлено, что ТШ не вызывает изменений в характере внутриклеточного распределения меченых полипептидов. Как и в контрольных вариантах, наибольшей радиоактивностью обладали белки фракции субклеточных структур, а активность термолабильных белков в 2–2,5 раза превосходила активность термоустойчивых белков цитозоля.

Одной из характерных особенностей картины белкового синтеза при ТШ является её большое сходство с картиной, наблюдаемой в контрольных частях зародыша. Основная масса белков клеточного экстракта, синтезируемая *in vivo* изолированными осями и кусочками семядолей при 28°C, продолжает синтезироваться в условиях ТШ. Но наряду с этим появляется ряд полипептидов, синтез которых либо не регистрировался при 28°C, либо значительно усиливался при ТШ. На основании этого такие полипептиды мы посчитали возможным отнести к БТШ. Две группы БТШ с высокой (выше 65–82 кД) и низкой (16–22 кД) молекулярными массами были наиболее интенсивно мечеными полипептидами, синтезированными изолированными осями в ответ на ТШ. Слабо меченые и минорные компоненты располагались в различных зонах геля и не всегда обнаруживались в суммарном белке клеточного экстракта. В результате было выявлено не менее 10 наиболее очевидных БТШ с молекулярными массами около 16, 18, 20, 22, 34, 74, 82, 90, 100 и 220 кД. Все БТШ, за исключением 34 кД и 220 кД БТШ, являются наиболее мечеными белками гомогената при действии ТШ. Некоторые БТШ характерны для фракции клеточных структур (220, 90, 20 и 18 кД-белки), другие обнаруживаются только в цитозоле (100, 76–82, 34 кД-белки). БТШ с молекулярными массами в зоне 68–72 и 82–86 кД, а также 16–18 кД присутствуют как в структурах, так и в цитозоле. Все цитозольные БТШ, за исключением 34 кД-белка и частично 16 кД БТШ являются термолабильными белками и быстро коагулируют при тепловой обработке. Низкомолекулярный 16 кД БТШ и следовые количества высокомолекулярных БТШ можно обнаружить и во фракции термостабильных белков. Набор синтезируемых БТШ не меняется по ходу стратификации. Синтез БТШ не зависит от транскрипции и происходит с участием преформированных шоковых мРНК. Основная масса белков, синтезируемая исследованными частями зародыша при 28°, продолжает синтезироваться при ТШ наряду с БТШ. Очевидно, что ТШ вызывает изменения в экспрессии генов и индуцирует синтез БТШ, но при этом не приводит к трансляционной дискриминации нешоковых мРНК.

Таким образом, можно сказать, что индукция генов БТШ и отсутствие дискриминации в отношении трансляции «нешоковых» мРНК является характерной особенностью ответа на ТШ зародышей семян растений. Эта особенность не зависит от степени устойчивости к дегидратации (ортодоксальные или рекальцитрантные семена), а также вида их покоя, и проявляется как при созревании, так и при начальных этапах прорастания семян. Можно предположить, что такая форма ответа на ТШ имеет определённый физиологический смысл. Так, на завершающих стадиях созревания семян, когда происходит интенсивный синтез запасных отложений, устойчивость трансляции «нешоковых» мРНК при временном действии неблагоприятных условий будет способствовать формированию полноценного зародыша и обеспечивать его успешное прорастание. Устойчивость трансляции основной массы «нормальных» «нешоковых» мРНК при временном действии неблагоприятных условий среды (например, при ТШ) на ранних этапах прорастания, обнаруженная ранее у зародышей ортодоксальных семян с вынужденным покоем [4], а теперь – и у рекальцитрантных семян с глубоким покоем, также может играть важную физиологическую роль. Благодаря этой особенности ответа на ТШ клетки зародыша на ранних этапах прорастания в случае появления неблагоприятных условий сохраняют способность продолжать или поддерживать на достаточном уровне синтез белков, необходимых для переключения клеточной активности на новую программу развития, с эмбриогенеза на прорастание, и тем самым повышается надёжность самого прорастания. Мы полагаем, что отсутствие дискриминации в отношении трансляции «нешоковых» мРНК при ТШ специфично для тканей зародыша и может рассматриваться как дополнительный молекулярный механизм, способствующий адаптации семян к неблагоприятным условиям среды и содействующий успешному прорастанию.

Индукция синтеза БТШ является универсальной чертой ответа на ТШ. По нашим данным, все ткани, изолированные из зародышей покоящихся рекальцитрантных семян конского каштана, отвечают на ТШ не только продолжением синтеза «нешоковых» белков, но и индукцией синтеза сходных наборов БТШ. Интерес представляют два обстоятельства. Так, за время стратификации, которая, по-видимому, способствует преодолению глубокого покоя, мы не наблюдали каких-либо драматических изменений в наборе БТШ, синтезируемых изолированными осями в ответ на ТШ. Более того, синтез БТШ легко регистрируется в осях, изолированных из нестратифицированных семян, т. е. не зависит от способности прорасти. Это указывает на независимость синтеза

БТШ при ТШ в ходе стратификации от физиологического состояния зародыша и его способности прорасти. В то же время ряд полученных нами данных свидетельствует о том, что стратификация каким-то образом отражается на физиологическом состоянии зародыша. Так, в ходе стратификации снижается чувствительность ростовой активности изолированных осей к действию АБК и ИУК, изменяются некоторые характеристики протеома, изменяется чувствительность трансляционной способности изолированных осей к действию ТШ. Однако это не затрагивает способности тканей зародыша отвечать на ТШ. Очевидно, что сигналы, обеспечивающие состояние покоя, выход из него и прорастание, не взаимодействуют с сигналами, обуславливающими индукцию синтеза БТШ. Далее, во-вторых, экспрессия генов ТШ в изолированных тканях покоящихся рекальцитрантных семян конского каштана не зависит от транскрипции и регулируется преимущественно на уровне трансляции. Из этого следует, что все элементы сложного молекулярного механизма экспрессии генов ТШ уже присутствуют в клетках зрелых семян и сформировались ещё при созревании семян, возможно, при действии повышенных температур. После опадения зрелых семян этот механизм сохраняется в клетках в функционально активном состоянии и способен при необходимости быстро инициировать синтез БТШ в ответ на тепловой сигнал или иной вид стресса. Однако реализация механизма накопления БТШ в естественных условиях при стратификации представляется мало вероятной из-за низкой скорости синтеза белка при пониженной температуре и отсутствии теплового сигнала. Но, тем не менее, семена каштана конского благополучно переносят (и даже нуждаются для преодоления состояния глубокого покоя) период длительного охлаждения (18–22 недели) при сохранении высокого уровня влажности клеток и, следовательно, приспособлены преодолевать или исправлять возникающие при этих условиях повреждения. Но именно данной функцией обладают, по современным представлениям, БТШ. На основании этого можно предположить, что в зрелых покоящихся рекальцитрантных семенах конского каштана уже присутствует запас необходимых БТШ. Эти БТШ могли синтезироваться и накапливаться в клетках зародышей в ходе созревания или после опадения семян при действии повышенных температур, т. е. в ответ на ТШ, и сохранились в клетках после наступления периода глубокого покоя в метаболически активном состоянии. БТШ могут содействовать устойчивости зародыша к неблагоприятным условиям среды при стратификации и повышать тем самым жизнеспособность семян каштана

Литература:

1. *Азаркович М.И., Гумилевская Н.А.* Анализ белков семян конского каштана // Физиология растений. – 2006. – Т. 53. – С. 711–720.
2. *Гумилевская Н.А., Азаркович М.И., Комарова М.Е., Обручева Н.В.* Белки осевых органов покоящихся и прорастающих семян конского каштана: I. Общая характеристика белков // Физиология растений. – 2001. – Т. 48. – С. 5–17.
3. *Гумилевская Н.А., Азаркович М.И., Литягина С.В., Обручева Н.В.* Белки осевых органов покоящихся и прорастающих семян конского каштана. II. Белок-синтезирующая способность зародышевых осей // Физиология растений. – 2003. – Т. 50. – С. 517–527.
4. *Гумилевская Н.А., Чумикина Л.В., Арабова Л.И., Зимин М.В., Шатилов В.Р.* Влияние высокой температуры на синтез белка в осях набухающих зародышей гороха // Физиология растений. – 1996. – Т. 43 – С. 247–255.
5. *Кулаева О.Н.* Белки теплового шока и устойчивость растений к стрессам // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – Т. 1. – № 2. – С. 5–13.
6. *Лось Д.А.* Сенсорные системы цианобактерий – М.: Научный Мир, 2010. – 218 с.
7. *Kimpel J.A., Key J.L.* Heat shock in plants // Trends in Biochem. Science – 1985. – V. 10 – N. 9. – P. 353–357.
8. *Vierling E.* The roles of heat shock proteins in plants// Ann. Rev. Plant Physiology and Plant Mol. Biol. – 1991. – V. 42. – P. 579–620.
9. *Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A.* Role of plant heat-shock proteins and molecular shaperones in the abiotic stress response // Trends in Plant Science. – 2004. – V. 9. – № 5. – P. 244–252.
10. *Wehmeyer N., Vierling E.* The expression of small heat shock proteins in seeds responses to discrete development signal and suggests a general protective role in desiccation tolerance // Plant Physiol. – 2000. – V. 122. – № 7. – P. 1099–1108.