

БИОФИЗИКА РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

ЭКСПРЕССИЯ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ В РАСТЕНИЯХ *ARABIDOPSIS THALIANA*

**Бакакина Ю.С., Содель Д.Л., Колеснева Е.В., Дубовская Л.В.,
Волотовский И.Д.**

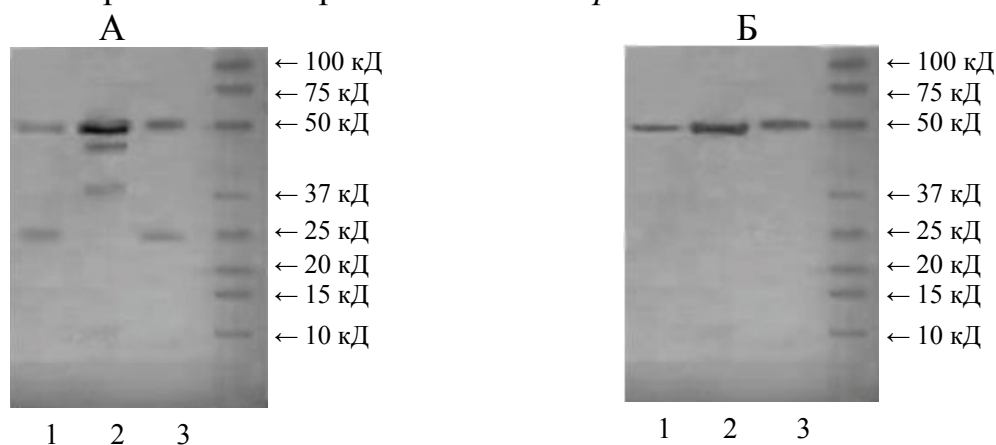
*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
Минск, Беларусь, bakakina@mail.ru*

Гуанилатциклазная сигнальная система играет ключевую роль в стрессовой сигнализации в растительной клетке. Ранее нами впервые было показано, что гуанилатциклазная сигнальная система принимает участие в процессе трансдукции температурного стрессового сигнала в растениях. В ответ на действие экстремальных температур в клетке происходит активация гуанилатциклазы (ГЦ), что приводит к увеличению содержания циклического гуанозин 3',5'-монофосфата (цГМФ), основного интермедиата данной сигнальной системы. Присутствие цГМФ в растительных тканях свидетельствует о необходимости существования в клетках фермента синтеза цГМФ – ГЦ. Однако до настоящего времени ГЦ в растениях не охарактеризована, и все данные об участии этого фермента в сигнальной трансдукции основаны, в основном, на результатах измерения ферментативной активности и ингибиторного анализа.

Таким образом, целью данной работы было выяснить наличие в растениях арабидопсиса белка, подобного гуанилатциклазе животных, и исследовать действие экстремальных температур на уровень его экспрессии в клетках растений *Arabidopsis thaliana*.

Для достижения поставленной цели использовали метод иммуноблоттинга. Данный подход используется для определения изучаемых белков в образце, детектируемых с использованием специфических антител. Для того, чтобы визуализировать белок ГЦ в проростках арабидопсиса, были выбраны поликлональные антитела к фрагменту каталитического домена – $\alpha 1$ -субъединице растворимой ГЦ крыс («Sigma», США) и поликлональные антитела к С-терминальному участку каталитического домена мембранной ГЦ человека («Santa Cruz Biotechnology, Inc.», США). Для выяснения возможной локализации белка ГЦ в клетках арабидопсиса, были проанализированы грубый гомогенат, растворимая и мембранная фракции.

В результате проведенных экспериментов белок, подобный ГЦ животных, был визуализирован во всех изученных растительных фракциях проростков арабидопсиса. При этом в грубом гомогенате и растворимой фракции с использованием антител к растворимой ГЦ детектировано две белковые полосы (25 и 50 кД) (рисунок 1А), в мембранной – три (37, 45 и 50 кД), в то время как с помощью антител к мембранной ГЦ во всех изученных фракциях был выявлен только один белок с молекулярной массой 50 кД (рисунок 1Б). По интенсивности окраски полос можно предположить, что белок, подобный ГЦ животных, преимущественно локализован в мембранах клеток растений *Arabidopsis*.



1 – фракция грубого гомогената, 2 – мембранная фракция,
3 – растворимая фракция, 4 – маркерные белки.

Рисунок 1 – Иммунодетекция белка, подобного ГЦ животных, в субклеточных фракциях проростков *A. thaliana* с использованием антител к растворимой (А) и мембранной (Б) изоформам ГЦ млекопитающих

Семейство ГЦ млекопитающих включает мембраносвязанные (мГЦ) и растворимые (рГЦ) изоформы фермента, которые экспрессируются в клетках почти всех типов. мГЦ является гомодимером, состоящим из двух субъединиц массой 120 кД, а рГЦ представлена гетеродимерным белком, состоящим из α - и β -субъединиц с молекулярными массами 73-82 кД и ~70 кД, соответственно. В растениях *Arabidopsis* присутствует новый, отличный от известных ГЦ животных, класс ГЦ, имеющих меньшие молекулярные массы субъединиц 25, 37, 45 и 50 кД, но идентичные ГЦ млекопитающих эпитопы.

На следующем этапе работы было исследовано действие экстремальных температур на уровень экспрессии белка, подобного ГЦ живот-

ных, в клетках арабидопсиса. В качестве контроля использовали проростки, не подверженные температурному воздействию.

Как видно из рисунков 2 и 3, наиболее четко после иммуноблоттинга визуализировались белковые полосы с молекулярной массой 50 кД. Это свидетельствует о том, что субъединицы с данной массой присутствуют в клетках растений арабидопсиса в большом количестве, поэтому при изучении влияния температурного стрессового фактора на содержание белка ГЦ особый интерес представлял белок с молекулярной массой 50 кД.



1 – контроль (22 °С), 2 – воздействие в течение 2 ч, 3 – воздействие в течение 6 ч.

Рисунок 2 – Иммунодетекция белка, подобного ГЦ животных, в растворимой (А) и мембранной (Б) фракциях проростков *A. thaliana* после низкотемпературного воздействия (0 °С) с использованием антител к растворимой (А) и мембранной (Б) изоформам ГЦ млекопитающих



1 – контроль (22°С), 2 – воздействие в течение 2 ч, 3 – воздействие в течение 6 ч.

Рисунок 3 – Иммунодетекция белка, подобного ГЦ животных, в растворимой (А) и мембранной (Б) фракциях проростков *A. thaliana* после высокотемпературного воздействия (50°С) с использованием антител к растворимой (А) и мембранной (Б) изоформам ГЦ млекопитающих

Было обнаружено, что низкотемпературное воздействие приводило к увеличению экспрессии белка, подобного ГЦ животных, после 2 ч экспозиции, как в растворимой, так и в мембранной фракциях проростков арабидопсиса (рисунок 2). При этом в мембранной фракции наблюдалось увеличение содержания белка в 3 раза (рисунок 2Б), тогда как в растворимой фракции – в 1,5 раза (рисунок 2А), через 6 ч инкубации содержание ГЦ снижалось до контрольного значения.

Аналогичные данные были получены и при изучении влияния высоких температур на содержание белка, подобного ГЦ животных, в проростках арабидопсиса. Как видно из рисунка 3, инкубация проростков при повышенной температуре в течение 2 ч приводила к увеличению экспрессии белка, подобного ГЦ животных, в мембранной фракции (рисунок 3Б) в большей степени, чем в растворимой (рисунок 3А) по сравнению с контролем.

Таким образом, впервые детектирован белок, подобный ГЦ животных, в субклеточных фракциях растений *Arabidopsis*, установлена его локализация в клетке, и выявлен характер влияния температурного стрессового фактора на уровень экспрессии данного белка в растениях.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ, грант №Б11М-191.

ВЛИЯНИЕ УЗКОПОЛОСНОГО ОСВЕЩЕНИЯ НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ ОГУРЦА

Вязов Е.В., Шалыго Н.В.

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
Минск, Беларусь, viazau@yahoo.com*

Изучено влияние узкополосного светодиодного освещения на морфометрические характеристики, содержание хлорофилла (Хл) и каротиноидов в растениях огурца.

В опытах использовали первый лист 20-дневных растений огурца тепличного сорта «Кураж», районированного в Республике Беларусь. Растения выращивали в грунте «Родничок» (ООО «Карио», РБ) в режиме 14 часов света (люминесцентные лампы ЛД40; освещённость 4000 лк) и 10 часов темноты до полного формирования первого листа. Затем растения в течение 3-х суток непрерывно освещали синими (450-465 нм), красными (620-630 нм) и одновременно синими и красными светодиодами фирмы Cree с соотношением числа светодиодов 4:1 (варианты «Красный», «Синий» и «Кр.+Синий», соответственно). Контролем служили растения огурцов, выращенные в указанном выше световом режиме и далее непрерывно освещаемые белым светом люминесцентной лампы (вариант «Белый»). В статье представлены данные 3-х биологических повторностей.