Вестник Томского государственного университета. Биология. 2011. № 3 (15). С. 143–146

УДК 581.1

А.В. Демиденко, Д.А. Барташевич

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (г. Москва)

ПРОДУКТЫ ГЕНОВ *At1g21670* и *At4g01870 A. thaliana* – ВОЗМОЖНЫЕ УЧАСТНИКИ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА ФИТОГОРМОНА АБК

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант № 10-04-00594).

Материалы опубликованы в рамках проекта ФЦП «Организационно-техническое обеспечение проведения Международной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (ГК № 14.741.12.0153 от 07 июня 2011 г.).

На основе анализа данных полногеномных ДНК-микрочипов Affimetrix 25k, с помощью программы Microarray Expression Search выявлены характеристики двух генов Arabidopsis thaliana – At1g21670 и At4g01870. Для изучения экспрессии этих генов на уровне белка применяли вестерн-блоттинг с использованием поликлональных антител, полученных на рекомбинантный фрагмент гомологичного белка из Lupinus luteus. Исследование этих генов показало, что их белковые продукты участвуют в сигналинге абсцизовой кислоты; изменения экспрессии генов At1g21670 и At4g01870 связаны с эмбриогенезом и ранними стадиями развития проростков A. thaliana, с действием холодового стресса и засолением.

Ключевые слова: *A. thaliana; сигналинг абсцизовой кислоты; экспрессия генов; биоинформатика.*

Введение

Одним из фундаментальных направлений в физиологии растений, имеющих важное прикладное значение, является изучение механизмов толерантности растений к стрессовым условиям окружающей среды. Абсцизовая кислота (АБК) играет ключевую роль в регулировании механизмов обеспечения устойчивости к широкому спектру стрессов окружающей среды, а также к биопатогенам. АБК отвечает за устойчивость к засухе, повышенной засоленности и холодовому стрессу, позволяя растениям колонизировать экологические ниши, где доступность воды крайне ограничена либо непостоянна.

В связи с обнаружением в последнее время совершенно новых регуляторных белков, играющих ключевую роль в сигналинге АБК [1], представляется перспективным дальнейший поиск участников, вовлеченных в сигнальную систему этого гормона.

Ранее нами были описаны два гена *A. thaliana* – *At1g21670* и *At4g01870* [2]. С помощью биоинформатического анализа было показано, что кодируемые ими белки содержат богатые триптофаном, аспартатом и пролином аминокислотные повторы PD40, образующие консервативный бета-пропеллерный домен, который служит платформой для сборки мультисубъединичных

комплексов. Белки, содержащие подобные повторы, участвуют в таких жизненно важных функциях клетки, как перенос различных сигналов (бета-субъединица гетеротримерной ГТФ-азы), синтез белка (в качестве кофактора белкового синтеза), сборка транскрипционного аппарата, деградация «отработанных» белков клетки (белок Cop1) и многих других процессах. Кроме того, с помощью нозерн-блоттинга нами было показано, что экспрессия мРНК, кодируемой данными генами, усиливается в ответ на обработку АБК, а также в ответ на абиотические стрессы [2]. В настоящей работе отражен прогресс в направлении изучения роли данных генов и их продуктов в передаче сигнала АБК.

Материалы и методики исследования

Характеристика двух генов *Arabidopsis thaliana – At1g21670* и *At4g01870* – была дана с помощью анализа данных полногеномных ДНК-микрочипов Affimetrix 25k в программе Microarray Expression Search, веб-интерфейс которой представлен на TAIR (http://arabidopsis.org) – международном научном портале, посвященном исследованиям модельного растения *A. thaliana*. Для изучения экспрессии данных генов на уровне белка применяли вестерн-блоттинг с использованием поликлональных антител, полученных на рекомбинантный фрагмент гомологичного белка из *Lupinus luteus*, который является предметом отдельной работы.

Результаты исследования и обсуждение

В результате обработки данных полногеномных ДНК-микрочипов Affimetrix 25k было выявлено, что изменения экспрессии генов *At1g21670* и *At4g01870* связаны с эмбриогенезом и ранними стадиями развития проростков *A. thaliana*, с действием холодового стресса, засолением, а также содержание мРНК различно в органах растения. Наиболее яркий эффект на экспрессию изучаемых генов оказали солевой и холодовой стрессы (рис. 1).

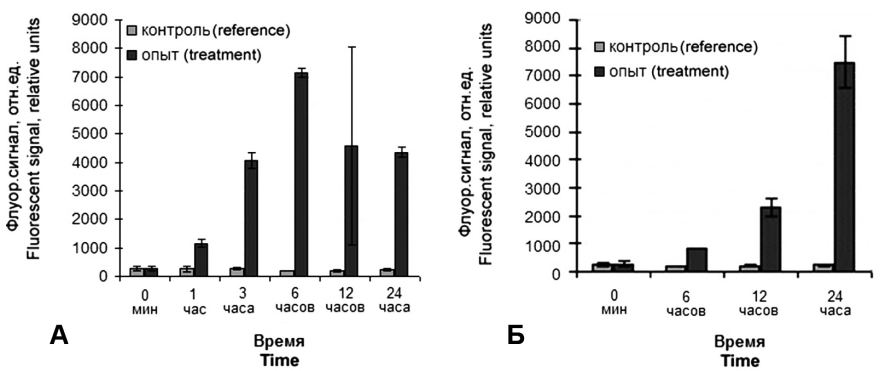

Рис. 1. Экспрессия гена *At4g01870* в корнях 18-дневных растений *A. thaliana* ответ на солевой стресс (150 мМ NaCl) (*А*) и гипотермию (4°С) (*Б*)

С целью подтвердить влияние этих факторов на экспрессию изучаемых генов на уровне белка был проведен вестерн-блоттинг с антителами на рекомбинантный фрагмент гомологичного белка из *Lupinus luteus*. Вследствие высокого сходства аминокислотных последовательностей белков, кодируемых *At1g21670* и *At4g01870*, с белком люпина желтого можно было ожидать, что полученные к его фрагменту антитела будут кросс-реактивны, т.е. будут обладать межвидовой специфичностью к близкородственным белкам. И действительно, на блоттинге с использованием этих антител нам удалось детектировать четкий сигнал в области ожидаемых величин молекулярной массы (73–77 кДа) белковых продуктов генов *At1g21670* и *At4g01870*. Кроме того, сигнал усиливался в ответ на обработку засолением и холодом, а также в ответ на предобработку растений *A. thaliana* абсцизовой кислотой (рис. 2).

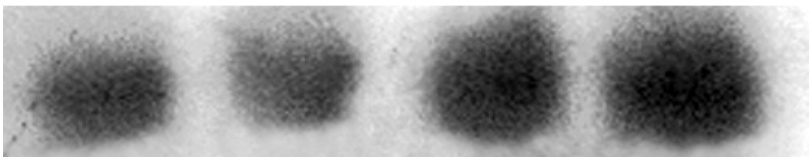

Рис. 2. Воздействие АБК и комплексного абиотического стресса «гипотермия+засоление» на содержание CIP2.1-подобных белков в растениях *Arabidopsis thaliana*: *1* – контрольные 16-дневные растения; *2* – контрольные 7-дневные растения; *3* – стресс-индуцированные 16-дневные растения, 5 последних дней находившиеся под воздействием стресса «засоление+гипотермия», 150 мМ NaCl + 4°C); *4* – 16-дневные растения, 3 последних дня находившиеся под воздействием АБК (22мкМ)

Содержание белков, определяемых на вестерн-блоте на уровне ожидаемых продуктов генов *At1g21670* и *At4g01870*, в тотальных белковых экстрактах 16-дневных растений *Arabidopsis thaliana*, обработанных в течение последних 3 дней АБК, а также в 16-дневных растениях *Arabidopsis thaliana,* подверженных в течение последних 5 дней воздействию комплексного абиотического стресса «засоление+гипотермия», заметно повышалось.

Заключение

Полученные данные по экспрессии генов *At1g21670* и *At4g01870 Arabidopsis thaliana* на уровне мРНК и белка – усиление уровня транскрипции и трансляции под воздействием АБК и абиотических стрессов – дают дополнительное подтверждение высказанной ранее гипотезе о вовлечении их белковых продуктов в сигналинг АБК. Кроме того, данные, полученные в нашей лаборатории с использованием инсерционных мутантов по исследуемым генам (данные не приводятся, так как являются предметом отдельной публикации), также подкрепляют эту гипотезу.

Литература

1. *Umezawa T., Nakashima K., Miyakawa T. et al.* Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport // Plant Cell Physiol. 2010. Vol. 51. P. 1821–39.

2. *Демиденко А.В., Кудрякова Н.В., Черепнева Г.Н. и др.* Участие белков, содержащих WD40-like домены, в ответе растений на фитогормоны и стресс // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 2008. № 4. С. 58–61.

Поступила в редакцию 25.06.2011 г.

Artem V. Demidenko, Darja A. Bartashevich

K.A. Timiriazev Institute of Plant Physiology of Russian Academy of Science, Moscow, Russia

PROTEINS ENCODED BY *A. thaliana* GENES At1g21670 And At4g01870 – POSSIBLE PARTICIPANTS OF SIGNAL TRANSMISSION PHYTOHORMONE ABA

Investigation of the mechanisms of plant tolerance to stressful environments is one of the fundamental trends in plant physiology that has important applications. Abscisic acid (ABA) plays a key role in regulating the mechanisms of resistance to a wide range of environmental stresses, as well as to biopathogenic. ABA is responsible for resistance to drought, high salinity and cold stress, thus allowing plants to colonize ecological niches where water availability is extremely limited or variable. The discovery in recent years completely new regulatory proteins that play a key role in signaling of ABA provided a major breakthrough in understanding the signaling of this hormone, but its picture is still not complete. Thus further search of actors involved in the signaling system of the hormone is promising and important problem.

We have previously described two genes of A. thaliana At1g21670 and At4g01870. Using bioinformatics analysis was shown that they encoded proteins containing tryptophan-, proline- and aspartate-rich PD40 repeats, which form the conservative beta-propeller domain. This structure can serve as a platform for the assembly of multysubunit protein complexes.

The methods were used: analysis of genome-scale DNA microarray Affimetrix 25k using Microarray Expression Search. Web-based interface of this programm is placed on TAIR (http://arabidopsis.org) – an international scientific web-resource dedicated to research a model plant A. thaliana. Also to study the expression of these genes at the protein level Western blot with polyclonal antibodies against homologous protein from L. luteus was used.

As a result of Affimetrix 25k DNA-microarray data processing was found that changes in At1g21670 and At4g01870 gene expression associated with embryogenesis and early stages of development of A. thaliana seedlings, with the effect of cold stress, salinity. The most striking effect on the expression of the studied genes was in case of salt and cold stress.

Western blotting was performed to confirm the effect of these factors on the expression of studied genes at the protein level. Because of the high similarity of amino acid sequences of proteins encoded by At1g21670, At4g01870 and a homologous protein from yellow lupine antibodies used in Western-blot have cross-species activity. Indeed, on blots using these antibodies we were able to detect a clear signal of the expected values of molecular weight (73–77 kDa) for protein products of genes At1g21670 and At4g01870. The signal is amplified in response to salinity and cold treatment, as well as in response to the pretreatment of A. thaliana plants with abscisic acid.

The data obtained on expression of A. thaliana genes At1g21670 and At4g01870 at the level of mRNA and protein – transcription and translation level increase under the influence of ABA and abiotic stress – provide further evidence of the previously suggested hypothesis of the involvement protein products of studied genes in ABA signaling. In addition, data obtained in our laboratory using insertional mutants of the genes studied (data not shown, as are the subject of a separate publication) also support this hypothesis.

Key words: *A. thaliana; signaling of ABA; bioinformatics.*

Received June 25, 2011