Вероятные функции белков, синтезирующихся при гипотермии

Имеется относительно мало данных о природе и функциях белков, синтез которых стимулируется гипотермией. В большинстве работ показана только корреляция процесса закаливания к холоду с синтезом белка. В то же время эта корреляция позволяет предполагать важную роль белков в формировании закаленного состояния растения. Предполагается, что одним из непременных факторов, требующихся для индукции морозоустойчивости озимой ржи, является усиленное образование протоплазмы и клеточных мембран.

В ряде работ показано влияние генов, локализованных в определенных хромосомах ядра, на активность митохондрий при гипотермии. Было установлено, что охлаждение морозоустойчивых растений озимых злаков вызывает значительные изменения в интенсивности работы дыхательной цепи митохондрий и в степени сопряженности процессов окисления и фосфорилирования. Впоследствии был показан ядерный контроль за проявлением этого признака, поскольку введение в малохолодоустойчивый генотип озимой пшеницы хромосом из Х-генома высокоморозоустойчивого пырея сопровождалось реакцией митохондрий на охлаждение, типично для высокоморозостойких форм, то есть быстрым переходом митохондрий в низкоэнергетическое состояние. Замена же хромосом Х-генома пырея на хромосомы пырейного D-генома в клетках пшенично-пырейного гибрида замедляла эту реакцию митохондрий на охлаждение. Исследования, проведенные на митохондриях 43 хромосомных лини показали, что гены, контролирующие данный признак митохондрии, локализованы, вероятно, в двух хромосомах Х-генома. Изучение линий с межсортовым замещением хромосом, при котором все пары хромосом D-генома, а также некоторые хромосомы А- и В-геномов озимой пшеницы Безостая 1 были замещены на соответствующие пары хромосом высокоморозоустойчивой пшеницы сорта Альбидум 114, показало, что только две хромосомы генома пшеницы Альбидум 114 контролируют энергетическую активность митохондрий при гипотермии. Таким образом, поскольку, как показано выше, блокировка цитоплазматического синтеза белка не позволяет пере ти митохондриям при гипотермии в низкоэнергетическое состояние, можно выдвинуть предположение, что ядро посредством изменения синтеза белков участвует в регуляции митохондриальной активности при гипотермии.

Дегидрины и ABA – регулируемые белки

В последнее время большой интерес исследователе привлекает изучение изменений в синтезе дегидринов под действием холодовой акклиматизации. Изменение транскрипции генов белков LEA, RAB и DHN было первоначально отмечено при действии водного стресса и после обработки растений абсцизовой кислотой. Все эти группы белков характеризуются высокой гидрофильностью белковой молекулы. Во время обезвоживания клетки под действием водного стресса эти белки за счет свое высоко гидрофильности препятствуют потерей клеткой воды и стабилизируют клеточные белки. Впоследствии было обнаружено, что синтез этих белков усиливается и во время холодовой акклиматизации. Дегидрины при этом, по-видимому, препятствуют образованию льда в клетках и также стабилизируют клеточные белки.

Среди белков, накапливающихся в растениях в ответ на обезвоживающее воздействие или действие низких температур, наиболее интенсивно исследуются дегидрины семейства LEA D II. Дегидрины состоят из различных типичных для белков данного вида доменов, соединяющихся в несколько наиболее распространенных вариантов полипептидов, а также многочисленных редко встречающихся вариаций. Эти домены включают в себя один или более небольших регионов альфаспиралей амфипатичных остатков, остатки серина и N-терминальную последовательность. До сих пор неизвестны все биохимические функции дегидринов, но значительное число исследований, посвященных выяснению локализации дегидринов в клетке при помощи клеточного фракционирования и иммунолокализации, установили, что дегидрины могут локализоваться и в ядре, и в цитоплазме. Более того, полученные данные показывают, что этот класс белков ассоциируется с макромолекулами нуклеопротеинового комплекса в ядре и с мембранами цитоплазмы. В настоящий момент считают, что дегидрины являются факторами, предотвращающими коагуляцию ряда макромолекул, сохраняя их структурное единство во время стрессового воздействия.

При исследовании отвечающих на охлаждение дегидринов ежевики было установлено, что обработка низкими закаливающими температурами вызывает холодовую акклиматизацию растений, а также накопление трех дегидриноподобных белков с молекулярными массами 65, 60 и 14 кДа. Денситометрия гелей показала тесную взаимосвязь между содержанием дегидринов и степенью холодовой закалки всех трех исследованных сортов ежевики. Авторы делают вывод, что изменения в экспрессии дегидринов более тесно связаны с холодовым закаливанием, чем с состоянием покоя растения.

Улучшенное восстановление промороженных меристем и каллусов смородины было получено после 2 часов предварительно обработки в сахарозе, пролине, RAB – белках, или бычьем сывороточном альбумине. Двухчасовое погружение в 0.4 M RIB-SM до промораживания существенно улучшило отрастание меристемы по сравнению с 0, 1, 3 и 4 часовым погружением. Двухчасовое погружение меристем в 5 и 10% пролин, растворенный в 0.4 M RIB-SM, значительно улучшило отрастание после промораживания. Первичны тест с экстрактами сырого RAB P из семян пшеницы показал, что отрастание промороженных апикальных меристем смородины улучшается после 2 часов предварительно обработки погружением с максимумом выживания в 1% RAB P. RAB P препараты, содержащие эквивалентные белки, имели аналогичное действие на отрастание, что указывает на то, что эффект зависел от присутствия белков, а не сахаров и других углеводов в сырых экстрактах RAB P. Аналогичные результаты показывают меристемы и каллусы, предварительно обработанные 5 или 10% пролином, 1% раствором RAB P или 1% БСА в 0.4 M растворе сахарозы. Предварительно обработанные меристемы продолжили прирост через 3 дня после согревания и достигли максимума отрастания через 1 неделю, по сравнению с 2 неделями для предварительно необработанного контроля.

При исследовании действия короткого дня на Betula pubescens было установлено, что в дополнении к различным конститутивной синтезируемым дегидринам на коротком дне обнаруживались два специфических полипептида с молекулярными массами 34 и 36 кДа.

Из библиотеки кДНК, полученной из корней всходов проростков Triticum durum, подвергнутых водному стрессу, были охарактеризованы четыре клона дегидринов. Два из них, ptd27e и ptd16, кодируют белки с классическими характеристиками дегидринов, т.е. консенсусным мотивом KIKEKLPG, который присутствует за пределами последовательности сериновых остатков у карбоксильного конца. Белки, кодируемые Tddhn15 и Tddhn16, имеют сходство с последовательностями белков Triticum aestivum. Клоны ptd25a и ptd38 кодируют дегидрины, которые не имеют последовательности сериновых остатков и обладают сходством последовательности с Cor – белками T. aestivum. Чтобы скоррелировать устойчивость T. durum к засухе с экспрессией генов дегидринов, для четырех сортов было проведено сравнение накопления транскриптов дегидринов в корнях и побегах всходов в ответ на водный стресс и экзогенную абсцизовую кислоту. Исследование действия водного стресса во времени показало, что накопление транскриптов дегидринов запаздывает в засухоустойчивых сортах. При этом уровень аккумулированных транскриптов был более высоким в засухоустойчивых, чем в засухочувствительных сортах. Аналогичные результаты был отмечены после обработки экзогенно абсцизовой кислотой.

Роль такого гормона, как абсцизовая кислота в устойчивости растений к низким температурам изучалась у Arabidopsis путем использования мутантов, у которых был изменен либо биосинтез, либо режим де ствия данного гормона. Различные мутанты использовались для анализа роли ABA в развитии и прорастании семени и устойчивости к стрессу. Мутанты были выделены премущественной по измененным характеристикам прорастания и роста проростков. Ген зеаксантинэпоксидазы, кодируемы геном aba1, клонировался по гомологии с геном Nicotiana plumbaginifolia, блокированным на то же биосинтетической ступени. При этом были выявлены биохимические повреждения мутантов aba1, aba2 и aba3. ABA-нечувствительные мутанты также имеют фенотип, на который влияют различные ABA-зависимые процессы и, таким образом, позволяют предполагать, что они либо кодируют ранние ступени в передаче сигнала ABA, либо они влияют на специфические ступени. Гены abi1 и abi2 кодируют фермент протеинфосфатазу 2c и ген abi3 кодирует фактор транскрипции со специфической экспрессией в семенах. Гиперчувствительный к абсцизовой кислоте мутант era1 имеет нарушение в фарнезилтрансферазе.

В два раза было улучшено восстановление криоконсервированных in vitro концов побегов березы повисло при помощи включения абсцизовой кислоты в культуральную среду во время холодового закаливания материнских побегов. Уровень восстановления концов побегов после холодового закаливания в течение 28 дне при +5 0C в 8/16 часовом фотопериоде на среде, содержавше 10 -4 M абсцизово кислоты был более 40%. Абсцизовая кислота была эффективно только в сочетании с низко температурой и коротко длиной дня, хотя в ходе экспериментов и были отмечены большие генотипические различия. Абсцизовая кислота имела два различных варианта влияния: усиление холодовой закаленности и усиление формирования каллуса во время регенерации криоконсервированных концов побегов.

Белки, препятствующие льдообразованию

Одной из функций белков, синтезирующихся в растениях при гипотермии, в частности, при действии отрицательных температур, является препятствование процессу льдообразования. Хотя, как было отмечено выше, в основном снижение температуры начала льдообразования происходит за счет накопления в растительной клетке сахаров в результате усиления синтеза и повышения активности соответствующих ферментов, в растительных клетках при гипотермии происходит также и синтез специфических белков, непосредственно влияющих на температуру начала льдообразования и рост ледяных кристаллов.

Способность контролировать внеклеточное образование льда во время замораживания является критической для выживаемости толерантных к замораживанию растений. Антифризные белки, которые являются белками, способными тормозить рост кристаллов льда, недавно были отождествлены как самые распространенные апопластные белки в листьях акклиматизированной к холоду озимой ржи. Сравнения амино-терминальных последовательностей, иммуно-перекрестной реактивности и ферментативной активности показали, что эти антифризные белки сходны с членами трех классов белков, относящихся к патогенезу, а именно, с эндохитиназами, эндо-бета– 1,3– глюканазами и тауматин-подобными белками. Апопластные эндохитиназы и эндо-бета–1,3–глюканазы сильно индуцируются патогенами в чувствительном к замораживанию табаке и не обладают антифризной активностью. Полученные данные позволяют предлагать, что в патогенез-связанных белках могли развиться тонкие структурные различия, которые позволили этим белкам получить возможность связываться со льдом.

В листьях озимой ржи наблюдался синтез белка, продуцируемого эндогенно и выделяющегося в вакуоли и межклеточное пространство, который значительно изменял картину роста ледяных кристаллов и понижал температуру замерзания раствора. В дальнейшем этими же авторами из апопласта листьев озимой ржи были выделены шесть антифризных белков, обладающих способностью абсорбироваться на поверхности льда и подавлять рост кристаллов. Антифризные белки ржи накапливались во время холодовой акклиматизации и сходны с растительными белками, связанными с патогенезом, включая два эндоглюканазоподобных, два хитиназоподобных и два тауматинподобных белка. Иммунолокализация эндоглюканазоподобных белков показала, что они накапливаются на межклеточной поверхности клеточных стенок мезофилла, в опектиненных районах, во вторичных клеточных стенках ксилемных сосудов и в эпидермальных клеточных стенках. Поскольку антифризные белки ржи локализованы в местах, где возможен их контакт со льдом, они могут выполнять функцию барьера на пути распространения льда или подавлять рекристаллизацию льда. Антифризные белки, сходные с патогенез-связанными белками, были также обнаружены в других видах трибы Triticae, но не у морозоустойчивых двудольных растений. Было установлено, что у озимой пшеницы накопление антифризных белков и развитие холодоустойчивости регулируются пятой хромосомой.

Синтез значительного количества апопластных белков с молекулярными массами от 15 до 109 кДа наблюдался в процессе повышения морозоустойчивости озимой ржи. Для определения того, является ли накопление этих антифризных белков общим явлением для травянистых растений, были исследованы антифризная активность и общее содержание белка в экстракте апопласта листьев ряда видов растений, растущих при низких температурах, включая как однодольные, так и двудольные. Белки апопласта разделялись SDS-ПААГ электрофорезом и с помощью иммуноблоттинга определялось, действительно ли растения отвечают на низкие температуры накоплением белков, связанных с патогенезом. Полученные результаты показывают, что значительны уровень антифризной активности присутствовал только в апопласте морозоустойчивых однодольных растений после холодовой акклиматизации при 5,20С. Более того, во время холодовой акклиматизации только тесно связанная группа растений – рожь, пшеница и ячмень – накапливали антифризные белки, сходные со связанными с патогенезом белками. При этом накопление антифризных белков является специфическим ответом, который может быть скорее важен в холодоустойчивости некоторых видов растений, чем как общи ответ всех растений на низкотемпературны стресс.

Два антифризных белка ржи с молекулярными массами 32 и 35 кДа аналогичны в их аминокислотных последовательностях и эпитопах бета – 1,3 – эндоглюканазе. Локализация этих антифризных белков, которые были обозначены как глюканазоподобные белки, была установлена с использованием иммунной сыворотки, полученной против антифризного белка 32 кДа. Иммуноэлектронная микроскопия высокого разрешения листьев акклиматизированных к холоду растений выявила высокое содержание GLP в стенках клеток мезофилла, в стенках клеток, смежных с межклеточными пространствами, и во второстепенных сосудах ксилемы. Учитывая отсутствие GLP в вакуолях, эти результаты подтверждают накопление апопластных антифризных белков в акклиматизированных к холоду растениях озимой ржи. В пределах клетки GLP локализовались в цистернах шероховатого эндоплазматического ретикулума, аппарате Гольджи и плазматической мембране, что указывает на то, что GLP выделяются через экзоцитозный путь. Наличие высокого содержания GLP в листьях акклиматизированных к холоду растений, их низкое содержание в листьях неакклиматизированных растений и недостаток GLP в корнях позволяют считать, что имеется корреляция между возрастающим накоплением GLP и повышением морозоустойчивости этих растений. Кроме того, локализация GLP в непосредственной близости к магистралям для свободно воды в пределах тканей подтверждает, что эти белки играют важную роль в кристаллизации и / или рекристаллизации воды при ее замораживании.

Антифризные белки обладают способностью тормозить образование льда. Для того, чтобы объяснять их роль в данном процессе, были проведены определение их концентрации и иммунолокализация этих белков в листьях, побегах и корнях озимой ржи. Каждый из общих растворимых белков, экстрагированных из акклиматизированных к холоду ржаных листьев, стебле и корне, обладал антифризной активностью, в то время как отсутствие антифризной активности наблюдалась в экстрактах из неакклиматизированных растений ржи. Антитела, полученные против трех апопластных антифризных белков из ржи, соответствующих глюконазоподобному белку, хитиназоподобному белку и тауматиноподобному белку, были использованы для обработки тканевых отпечатков. При этом было показано, что антифризные белки локализуются в эпидермисе и в клетках, окружающих межклеточные пространства, у акклиматизированных к холоду растений. Хотя GLP, CLP и TLP присутствовали в неакклиматизированных растениях, они обнаруживались в других местах и не обладали антифризной активностью, что подтверждает, что при низко температуре производятся другие изоформы связанных с патогенезом белков. Локализация антифризных белков у ржи может предотвращать вторичное повреждение клеток эпифипическим льдом или льдом, распространяющимся через ксилему. Распространение белков, связанных с патогенезом, и белков GLP, CLP, и TLP, накапливающихся под действием холода, аналогично и может отражать общие пути, которыми как патогены, так и лед входят и распространяются по тканям растения.

Синтетически ген антифризного белка экспрессировался в растениях и, как показали результаты экспериментов, снижал утечку электролита из листьев при температуре замерзания почвы. Синтетически антифризны белок экспрессировался в качестве слитого с сигнальным пептидом, направляющим его к межклеточному пространству, где вначале проявляется кристаллизация льда. Ген был введен в Solanum tuberosum L. Cv. Russet Burbank при помощи Agrobacterium-опосредованной трансформации. Трансформанты идентифицировались при помощи PCR – скрининга и экспрессия введенного белка проверялась иммуноблоттингом. Анализ высвобождения электролитов из листьев трансгенных растений выявил корреляцию между уровнем экспрессии трансгенного белка и степенью выносливости к замерзанию почвы.

Применение методик, основанных на изучении рекристаллизации льда, позволило в последнее время установить в ряде видов растений наличие белков, обладающих антифризной активностью. В частности в корне акклиматизированной к холоду моркови был выделен и идентифицирован новы индуцируемы холодом антифризный белок с молекулярной массой 36 кДа. В ходе изучения его свойств было установлено, что этот белок подавляет рекристаллизацию льда и обладает термогистерезисной активностью.

Показано, что этот полипептид существует в растворе в виде N-гликозилированного мономера. Белок, так же как и остальные известные антифризные белки, локализован в апопласте. Соответствующий этому белку ген, как показали результаты исследований, является уникальным и индуцируется холодом.

Регулируемые холодом белки

Во время холодовой акклиматизации Arabidopsis thaliana синтезируются различные регулируемые холодом полипептиды, которые не имеют или имеют очень небольшое сходство с другими известными белками. Регулируемые холодом гены cor15а и cor6.6 кодируют, соответственно, 15 и 6.6 кДа полипептиды. Известно, что полипептид COR15а транспортируется в хлоропласты и во время импорта процессируется в 9.4 кДа полипептид, обозначенный как COR15ам. Полипептид COR6.6, как считается, локализуется в цитозоле. Кодирующие последовательности ш5ам и cor6.6 были перенесены под промотор фага Т7 и экспрессированы в E. coli. Рекомбинантные полипептиды COR15аm и COR6.6 были очищены до почти гомогенного состояния с использованием комбинации фракционирования сульфатом аммония, ионообменной хроматографии и адсорбционной хроматографии на гидроксиапатите. COR15аm и большинство образцов COR15аm совместно мигрировали как на двумерном электрофорезе по O'Farrell, так и на неденатурирующем электрофорезе. Эти данные подтверждают место процессинга COR15а и показывают отсутствие различий в четвертичной структуре между COR15аm и большинством видов COR15аm в растениях. Напротив, миграция пятен COR6.6 и COR6.6 на двумерных гелях показывает, что значительная часть популяции COR6.6 в растениях модифицируется. При дальнейшем исследовании этих двух белков были определены их гидратационные характеристики и их действие на переходы смеси фосфолипидов из жидкокристаллического в гелеобразное состояние и из ламеллярной фазы в гексагональную II фазу. После обезвоживания при осмотическом давлении от 8 до 150 МПа содержание воды в COR – полипептидах было меньше, чем в БСА, причем COR15ам был гидратирован меньше, чем COR6.6. Ни COR6.6, ни COR15ам не изменяли температуру вызванного дегидратацией перехода как дипальмитоилфосфатидилхолина, так и диолеилфосфатидилхолина из гелеобразного в жидкокристаллическое состояние. В мультиламеллярных везикулах, состоящих из смеси дипальмитоилфосфатидилхолин, ни COR15ам, ни COR6.6, ни БСА не влияли на вызванное обезвоживанием образование инвертированной гексагональной фазы как на функцию осмотического давления. Тем не менее, в смеси дипальмитоилфосфатидилхолин, дегидратировавшейся в присутствии COR15аm, наблюдалось специфическое ультраструктурное изменение – образование определенно поверхностно морфологии в ламеллярных доменах. Тем не менее, ни COR15ам, ни COR6.6, по-видимому, не участвуют в специфическом белково-фосфолипидном взаимодействии, изменяющим вызванное дегидратацией состояние фаз фосфолипидных везикул. Было проверено, действуют ли COR15ам и COR6.6 на индуцируемое холодом слияние или целостность мембран небольших униламеллярных везикул, состоящих как из различных видов фосфатидилхолина, так и из смеси диолеилфосфатидилхолина, диолеилфосфатидилэтаноламина и свободных стеролов, а также на общи липидны экстракт плазматических мембран как неакклиматизированных, так и акклиматизированных к холоду листьев риса. Когда везикулы были суспендированы в буферном растворе, как COR15ам, так и COR6.6 значительно уменьшали вызванное замораживанием слияние вне зависимости от их липидного состава. В то же время, когда везикулы были суспендированы в сахарозе или в среде, содержащей NaCl, COR-белки не оказывали влияние на индуцируемое холодом слияние. Более того, COR-белки не оказывали влияние на уменьшение вызванных холодом утечек, были ли везикулы суспендированы в чистом буфере либо в буфере с добавками NaCl или сахарозы. Фактически, действие COR-белков на везикулы, составленные из отдельных видов фосфатидилхолина, суспендированных в буфере, выражалось в аномальном увеличении вызванных замораживанием утечек. Таким образом, было установлено, что ни COR15ам, ни COR6.6 не имеют прямого криопротекторного действия на везикулы, замороженные in vitro.

Многие растения, в том числе Arabidopsis, увеличивают устойчивость к замораживанию после воздействия низких незамораживающих температур. Данны ответ, называемый холодовой акклиматизацией, опосредован ДНК-регулирующим элементом «C-повтор / засухоотзывчивый элемент» и связан с индукцией генов COR. Усиление экспрессии у Arabidopsis CBF1, транскрипционального активатора, связывающегося с последовательностью CRT/DRE, индуцировало экспрессию генов COR и увеличивало устойчивость к замораживанию неакклиматизированных растений Arabidopsis. На основании этих данных был сделан вывод, что CBF1 представляет собой вероятный регулятор холодовой акклиматизации, контролирующий уровень экспрессии генов COR, и содействует повышению устойчивости к промораживанию.