

ORIGINAL ARTICLE

**Dehydrin Association with Supercomplexes of Pea Seedlings
Mitochondria Under Hypothermia**

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

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of RAS, Irkutsk, Russia

*E-Mail: borovskii@sifibr.irk.ru

Received July 22, 2013

The reaction of plant cell on many stressful conditions is accompanied by accumulation of protective proteins. Dehydrins are widespread in a plant kingdom and accumulated in reply to a drought, freezing, salt stress, and also high temperature. Earlier we found the accumulation of dehydrins in mitochondria of some plants under various stresses. This work aims to study the quantitative changes and localization of dehydrins in the mitochondria of pea seedlings under low temperature impact of varying intensity and duration. It has been found that the dehydrins content in mitochondria of pea seedlings subjected to the action of low temperatures increases. The maximum dehydrins content was found after cold hardening which is accompanied by cryotolerance increasing. For the first time it was established that the part of dehydrins of plant mitochondria is localized in the several organellar supercomplexes.

Key words: low-temperature stress, adaptation, plant mitochondria, Pisum sativum L., dehydrin, supercomplexes of mitochondrial proteins

ORIGINAL ARTICLE

**Ассоциация Дегидринов Проростков Гороха с Суперкомплексами
Дыхательной Цепи Митохондрий в Период Гипотермии**

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

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской Академии наук, 664033, Иркутск, Россия

*E-Mail: borovskii@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 22 июля 2013 г.

Реакция растительной клетки на многие неблагоприятные условия, сопровождается накоплением защитных белков. Дегидрины широко распространены в растительном царстве и накапливаются в ответ на засуху, замерзание, засоление, а также высокую температуру. Ранее нами было обнаружено накопление дегидринов в митохондриях некоторых растений в ответ на действие различных стрессов. Данная работа направлена на исследование количественных изменений и локализации дегидринов в митохондриях проростков гороха при низкотемпературном воздействии разной интенсивности и продолжительности. Было установлено, что в проростках гороха, подвергнутых действию низкой температуры, содержание дегидринов в митохондриях увеличивается, причем максимальное увеличение происходит при холодовом закаливании, которое сопровождается ростом криоустойчивости. Впервые было установлено, что в мембранах митохондрий растений часть дегидринов локализуется в суперкомплексах дыхательной цепи этих органелл.

Key words: low-temperature stress, adaptation, plant mitochondria, Pisum sativum L., dehydrin, supercomplexes of mitochondrial proteins

Реакция растительной клетки на неблагоприятные условия, связанные с дегидратацией, в том числе при низкой температуре, сопровождается накоплением водорастворимых белков, среди которых особую роль играют дегидрины. Своеобразие аминокислотного состава дегидринов приводит к тому, что эти белки чрезвычайно устойчивы к высокой температуре и не денатурируют при кипячении. Благодаря своим свойствам, дегидрины, способны связывать значительное количество воды и соединяться с белками и липидами для предотвращения повреждений, вызванных обезвоживанием (Hanin *et al.*, 2011). Эти белки, принадлежащие к семейству белков позднего эмбриогенеза, характеризуются наличием консервативного К-сегмента. Его обогащенная лизином аминокислотная

последовательность, состоящая из 15 аминокислот, использована для производства антител, с помощью которых эти белки распознают на иммуноблотах и микроскопических срезах тканей и клеток (Close et al., 1993). Дегидрины обнаружены в самых разных типах тканей (Roberts et al., 1993; Asghar et al., 1994; Danyluk et al., 1994; Close 1996). Субклеточная локализация этих белков также разнообразна. Это и плазматическая мембрана, и цитоплазматический матрикс, и хлоропласты, и вакуоль (Danyluk et al., 1998; Mueller et al., 2003; Heyen et al., 2002; Романенко и др., 2010). Ранее нами было обнаружено накопление дегидринов в митохондриях растений в ответ на действие холода (Borovskii et al., 2000), а также иных воздействий (Borovskii et al., 2002), позже накопление дегидринов при стрессах было подтверждено на других видах растений (Rurek 2010). В митохондриях наибольшее увеличение их содержания в период холодовой адаптации было отмечено при кристах (Романенко и др., 2010), в которых, как известно, содержатся ферменты электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий. Это позволило предположить, что дегидрины могут ассоциировать с митохондриальными комплексами и защищать их в период гипотермии. Поскольку связь дегидринов с их молекулярными мишенями при стрессе достаточно мягкая, анализ внутримитохондриальной локализации требует изучения белков и белковых комплексов, подвергнутых слабым воздействиям с помощью неионогенных детергентов. Данная работа направлена на исследование количественных изменений и локализации дегидринов в митохондриях проростков гороха при низкотемпературном воздействии разной

интенсивности и продолжительности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали этиолированные проростки гороха (*Pisum sativum* L., сорт Аксайский Усатый 55), прошедшие различную низкотемпературную обработку. Контрольные проростки выращивали на влажной фильтровальной бумаге в термостате без освещения в течение 6 суток при 20 °С. Температурные обработки проводили в камерах Binder (Germany). В работе применяли следующие низкотемпературные обработки: закаливание, мягкий и жесткий стрессы. Закаливание пятисуточных этиолированных проростков гороха проводили в течение семи суток в термостате при температуре 7 °С. При мягком стрессе контрольные шестисуточные проростки дополнительно выдерживали 7 суток при температуре 2 °С, при жестком стрессе шестисуточные проростки помещались в камеру на 1.5 часа при температуре -7 °С. По окончании охлаждения проростки срезали и использовали для выделения митохондрий, либо подвергали промораживанию при -7 °С в течение 1.5 ч, после чего растения переносили в 10 °С на 1 час, а затем оставляли на несколько суток при естественном освещении (20 °С) для определения процента выживших растений.

Выделение митохондрий из проростков гороха проводили методом дифференциального центрифугирования по ранее описанной методике (Voinikov et al., 1991) с модификациями для митохондрий проростков гороха (Stupnikova et al., 2006). Для выделения митохондрий использовали среду выделения (pH 7.5), содержащую 0.3 М маннит, 30 mM MOPS, 2 mM ЭДТА, 0.5% поливинилпирролидон,

0.05% цистеин, 0.4% BSA. Митохондриальный осадок промывали средой промывания (pH 7.5), в которую входили 0.3 М маннит, 20 mM MOPS, 2 mM ЭДТА, 0.2% BSA. Полученную фракцию митохондрий ресуспендировали в среде с pH 7.5, содержащей 0.3 М маннит и 20 mM MOPS и использовали для дальнейшей очистки на ступенчатом градиенте перколла, приготовленном на среде (pH 7.5), содержащей 0.3 М сахарозу, 10 mM MOPS, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂ и 0.2 % BSA. Очистку проводили по методике, описанной ранее (De Virville *et al.*, 1994). Прерывистый градиент для органелл, выделенных из контрольных растений, состоял из 23% (18 мл) и 40% (8мл) перколла, а для митохондрий, выделенных из охлажденных проростков - из 22 % (18 мл) и 40% (8 мл) перколла. Фракция интактных митохондрий находилась на границе 22(23)/40% перколла. Осадок очищенных митохондрий ресуспендировали в среде, содержащей 0.3 М сахарозу и 20 mM MOPS (pH 7.5). Очищенные митохондрии сразу использовали для солюбилизации мембранных митохондриальных белков по методу Sunderhaus и др. (2007) (соотношение белок:дигитонин =1:5) для BN-PAGE и дот-блоттинга, либо небольшими порциями хранили в жидком азоте и затем использовали в экспериментах для выделения митохондриального денатурированного белка для SDS-PAGE (Borovskii *et al.*, 2002). Концентрацию белка определяли по методу Bradford согласно протоколу производителя (Bio-Rad Protein Assay). Для SDS-PAGE на трек наносили по 25 мкг, для BN-PAGE – 100 мкг белка. Денатурирующий электрофорез проводили в 12%-ном ПААГе с ДДС-На в модифицированной системе Laemmli (1970),

нативный BN-форез проводили согласно методу Sunderhaus и др. (2007) в градиенте 4.5-16%.

Определение молекулярных масс полипептидов при SDS-PAGE проводили, используя в качестве стандартов набор белков с мол. массами 66, 45, 36, 29, 24, 20.1, 18.4 и 14.3 кД (Sigma, USA). Иммуноблоттинг проводили по методике Timmons и Dunbar (1990), после электрофоретического перенесения белков на PVDF мембрану. Для выявления белков, иммунохимически родственных дегидринам, использовали антитела, любезно предоставленные профессором T.J. Close (США, Калифорнийский университет). В качестве вторичных использовали антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой (Jackson ImmunoResearch, USA). Эксперименты выполнены в трехкратной биологической повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Низкотемпературные обработки по-разному влияли на устойчивость проростков гороха к последующему промораживанию при -7 °С (Табл. 1). Закалка увеличивала процент выживших растений, тогда как мягкий и особенно жесткий стрессы уменьшали его. Анализ митохондриальных белков с помощью одномерного электрофореза и иммуноблоттинга показал наличие в митохондриях проростков гороха одной четко выраженной группы дегидринов с относительной молекулярной массой по данным электрофореза 85 кД (Рис. 1). Содержание этой группы белков увеличивалось при всех используемых низкотемпературных воздействиях. Относительное содержание дегидринов, определенное с помощью анализа дот-блотов, в митохондриальном белке, подготовленном для нативного электрофореза,

было наибольшим у закаленных проростков и несколько ниже у проростков, подвергнутых мягкому и жесткому стрессам. Наиболее низким содержание дегидринов в митохондриях было в контрольных проростках (Рис. 2). Анализ внутримитохондриальной локализации дегидринов по данным BN-PAGE с последующим

иммуноблоттингом показал ассоциацию дегидринов митохондрий с тремя суперкомплексами дыхательной цепи митохондрий (Рис. 3) с наиболее четкими линиями в образце, полученном из растений, подвергнутых процедуре низкотемпературной закалки.

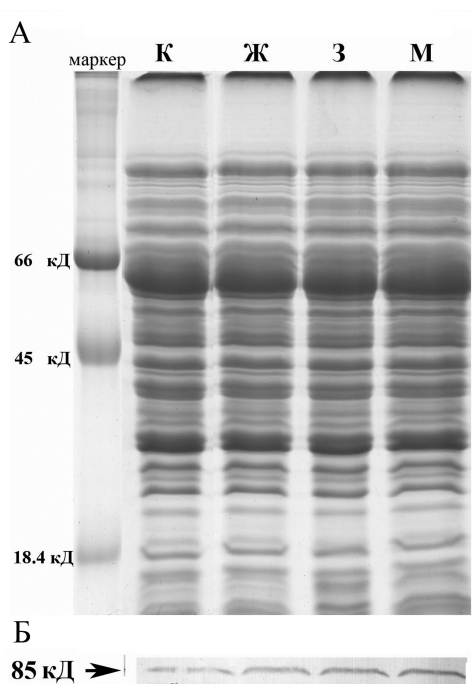


Рисунок 1. SDS-PAGE митохондриальных белков проростков гороха, окрашенных Кумасси G-250, (А) и иммуноблоттинг с антителами на дегидрины (Б).

К - контроль; Ж - жесткий стресс; З - закаливание; М - мягкий стресс.

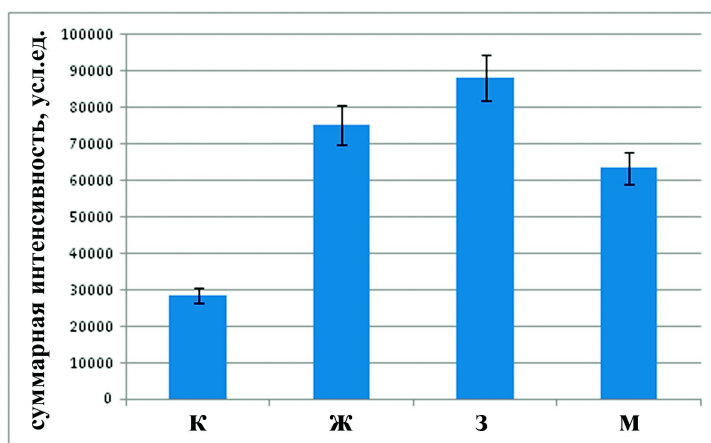


Рисунок 2. Изменение относительного содержания дегидринов в суммарной фракции нативного митохондриального белка, выделенного для BN-PAGE из митохондрий проростков гороха.

Представлен анализ дот-блотов, проведенный с помощью программы Image J. Обозначения те же, что и на рис.1. Показана средняя суммарная интенсивность пятен и стандартные отклонения. n = 3.

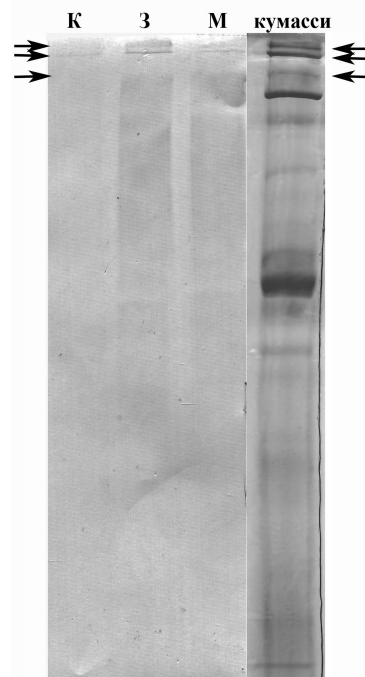


Рисунок 3. Ассоциация дегидринов с суперкомплексами дыхательной цепи митохондрий проростков гороха.

Слева представлены результаты иммуноблоттинга суммарных нативных митохондриальных белков, разделенных BN-PAGE (4.5-16%), с антителами на дегидрины. Справа показан электрофоретический трек митохондриальных белков, окрашенный Кумасси. Треки К, З и М (обозначения как рис. 1) при окраске Кумасси G-250 не демонстрировали количественных различий в содержании групп белков. Стрелками обозначены суперкомплексы ЭТЦ митохондрий, с которыми ассоциируют дегидрины.

Таблица 1: Выживаемость проростков гороха после различных низкотемпературных обработок с последующим промораживанием.

Вариант	Выживаемость, %
Контроль (6 сут. при 20 °С)	77,5 ± 4,9
Закалка (5 сут. при 20 °С и 7 сут. при 7 °С)	91,8 ± 2,9
Мягкий стресс (6 сут. при 20 °С и 7 сут. при 2 °С)	60,4 ± 9,4
Жесткий стресс (6 сут. при 20 °С и 1,5 ч при -7 °С)	34,0 ± 7,1

Выживаемость рассчитывали как процент выживших растений от общего их числа. Промораживание проводили при -7 °С в течение 1,5 ч, после чего растения переносили в 10 °С на 1 час, а затем оставляли отрастать при 20 °С при естественном освещении. Представлены средние арифметические значения трех биологических повторностей и стандартные отклонения.

ОБСУЖДЕНИЕ

Дегидрины широко распространены в растительном царстве и накапливаются растениями в ответ на стрессы, связанные с потерей воды, такие как засуха, замерзание,

засоление (Close 1996; Hanin *et al.*, 2011), а также высокую температуру (Rurek 2010; Galani *et al.*, 2013). Список возможных молекулярных защитных функций дегидринов стабильно расширяется и включает в себя защиту

ферментов при замерзании и высокой температуре, криопротекцию, защиту мембран и антиоксидантные функции, включая улавливание гидроксильных и пероксильных радикалов (Nanin *et al.*, 2011). Неудивительно, что митохондрии стали местом локализации (Рис. 1) для этих белков, поскольку митохондрии являются одной из главных мишеней окислительного повреждения при стрессе (Bartoli *et al.*, 2004), а с другой стороны, одним из наиболее важных источников АФК при стрессе из-за восстановления дыхательной цепи. Поскольку количество дегидринов в митохондриях было наибольшим после закаливания (Рис. 2), которое приводило к росту устойчивости проростков к дальнейшему промораживанию (Табл. 1), можно полагать, что накопление дегидринов в клетках проростков гороха и ассоциация их с митохондриями повышает устойчивость митохондрий и клеток к низкой температуре. Это наблюдение согласуется с полученными ранее данными для пшеницы, ржи, кукурузы (Borovskii *et al.*, 2002), арабидопсиса, люпина и цветной капусты (Rurek 2010). Особенностью данной работы служит впервые выявленная локализация дегидринов в некоторых суперкомплексах ЭТЦ митохондрий (Рис. 3).

В последнее время увеличивается количество данных, которые свидетельствуют о том, что *in vivo* отдельные комплексы дыхательной цепи специфично взаимодействуют, формируя надмолекулярные структуры большого размера (до 3000 кД и выше), называемые суперкомплексами. Согласно последним данным, стехиометрия этих комплексов может быть различной и представлена комбинацией либо 2-х комплексов, например, комплекс I + 2

комплекса III, 2 комплекса I + 2 комплекса III, и т.п., либо различными соотношениями 3-х комплексов – I, III и IV, так называемыми респирасомами. Однако помимо объединения дыхательных комплексов в суперкомплексы, значительная популяция комплексов I и IV присутствует во внутренней митохондриальной мембране в виде отдельных комплексов (Ramirez-Aguilar *et al.*, 2011). На данный момент причина существования суперкомплексов до конца невыяснена, но предполагается, что, во-первых, суперкомплексы могут увеличивать стабильность отдельных белковых комплексов, во-вторых, способствовать более эффективному распределению электронов между реакционными сайтами комплексов в пределах суперкомплексов и предотвращать образование опасных интермедиатов реакций, в-третьих, участвовать в регуляции метаболических путей (Eubel *et al.*, 2003; Eubel *et al.*, 2004). Так, например, показано, что при гипоксии и низком рН происходит диссоциация комплекса I от суперкомплексов, что может являться регуляторным механизмом вовлечения альтернативных NADH-дегидрогеназ, которые, как известно, активируются низкими значениями рН (Ramirez-Aguilar *et al.*, 2011). Локализация дегидринов в суперкомплексах позволяет предполагать вовлеченность этих защитных белков в стабилизацию супермолекулярных структур митохондрий растений при стрессах.

В исследованных генах дегидринов не обнаружено классического сигнала митохондриальной локализации. Однако, наличие такого сигнала не обязательно для белков, локализованных в митохондриях. В качестве примера можно привести столь важные для функционирования митохондрий белки, как

прохибитины, у которых этот сигнал в последовательности генов отсутствует (Van Aken *et al.*, 2007). База информации о субклеточной локализации белков в арабидопсисе SUBA3 (The SUBcellular localisation database for *Arabidopsis* proteins: <http://suba.plantenergy.uwa.edu.au>) дает возможность надеяться на наличие дегидринов в митохондриях, однако сообщает, что по данным масс-спектрометрии и GFP-локализации дегидрины в митохондриях пока не обнаружены. Возможно, дело в том, что количество этих белков по сравнению с мажорными белками дыхательной цепи, цикла Кребса и других ферментов, локализованных в митохондриях, сравнительно невелико. Данные о многочисленных защитных эффектах дегидринов при различных неблагоприятных ситуациях в растительной клетке подтверждают криопротекторную функцию этих белков. Однако физиологическую важность связи дегидринов с суперкомплексами ЭТЦ митохондрий, а также механизм их действия в данном случае еще предстоит установить.

Таким образом, нами было установлено, что в проростках гороха, подвергнутых действию низкой температуры, содержание дегидринов в митохондриях увеличивается, причем максимальное увеличение происходит при холодовом закаливании. В митохондриях часть дегидринов локализуется в нескольких суперкомплексах электрон-транспортной цепи.

ACKNOWLEDGEMENT

Работа была выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (контракт №8266). В работе использовано оборудование Байкальского аналитического центра (ЦКП) при ИНЦ СО РАН. Авторы благодарны Dr. T.J. Close за

предоставленные антитела против дегидринов.

ЛИТЕРАТУРА

- Asghar, R., Fenton, R.D., DeMason, D.A., Close, T.J. (1994) Nuclear and cytoplasmic localization of maize embryo and aleurone dehydrin. *Protoplasma*, **177**, 87–94.
- Bartoli, C.G., Gómez, F., Martínez, D.E. and Guiamet J.J. (2004) Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Exp. Bot.*, **55**, 1663-1669.
- Borovskii, G.B., Stupnikova, I.V., Antipina, A.I., Downs, C.A., Voinikov, V.K. (2000) Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cold treated plants. *J. Plant Physiol.*, **156**, 797-800.
- Borovskii, G.B., Stupnikova, I.V., Antipina, A.I., Vladimirova, S.V. and Voinikov, V.K. (2002) Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. *BMC Plant Biol.*, **2**:5.
- Close, T.J. (1996) Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol. Plant.* **97**, 795–803.
- Close, T.J., Fenton, R.D, Moonan, F. (1993) A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxy terminal peptide. *Plant Mol. Biol.*, **23**, 279–286.
- Danyluk, J., Houde, M., Rassart, É., Sarhan, F. (1994) Differential expression of a gene encoding an acidic dehydrin in chilling sensitive and freezing tolerant gramineae species. *FEBS Lett.*, **344**, 20–24.
- Danyluk, J., Perron, A., Houde, M., Limin, A., Fowler, B., Benhamou, N., Sarhan, F. (1998) Accumulation of an acidic dehydrin in the

- vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell*, **10**, 623–638.
- Davy De Virville, J., Aaron, I., Alin, M.F, Moreau, F. (1994) Isolation and properties of mitochondria from *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. *Plant Physiol. Biochem.*, **32**, 159-166.
- Eubel, H., Heinemeyer, J. and Braun H.P. (2004) Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria. *Plant Physiol.*, **134**, 1450-1459.
- Eubel, H., Jansch, L. and Braun, H.P. (2003) New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol.*, **133**, 274-286.
- Galani, S., Wahid, A., Arshad, M. (2013) Tissue-specific expression and functional role of dehydrins in heat tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Protoplasma*, **250**, 577-583.
- Hanin, M., Brini, F., Ebel, C., Toda, Y., Takeda, S., Masmoudi, K. (2011) Plant dehydrins and stress tolerance. Versatile proteins for complex mechanisms. *Plant Signal Behav.*, **6**, 1503-1509.
- Heyen, B.J., Alsheikh, M.K., Smith, E.A., Torvik, C.F., Seals, D.F., Randall, S.K. (2002) The calcium-binding activity of a vacuole-associated, dehydrin-like protein is regulated by phosphorylation. *Plant Physiol.*, **130**, 675–687.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of Head Bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Mueller, J.K., Heckathorn, S.A., Fernando, D. (2003) Identification of a chloroplast dehydrin in leaves of mature plants. *Int. J. Plant Sci.*, **164**, 535–542.
- Ramirez-Aguilar S.J., Keuthe, M., Rocha, M., Fedyaev, V.V., Kramp, K., Gupta, K.J., Rasmusson, A.G., Schulze, W.X., van Dongen, J.T. (2011) The composition of plant mitochondrial supercomplexes changes with oxygen availability. *J. Biol. Chem.*, **286**, 43045-43053.
- Roberts, J.K., DeSimone, N.A., Lingle, W.L., Dure, L.III (1993) Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two Lea proteins in cotton embryos. *Plant Cell*, **5**, 769–780.
- Rurek, M. (2010) Diverse accumulation of several dehydrin-like proteins in cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis), *Arabidopsis thaliana* and yellow lupin (*Lupinus luteus*) mitochondria under cold and heat stress. *BMC Plant Biol.*, **10**:181.
- Stupnikova, I., Benamar, A., Tolleter, D., Grelet, J., Borovskii, G., Dorn, A.-J., Macherel, D. (2006) Pea seed mitochondria are endowed with a remarkable tolerance to extreme physiological temperatures. *Plant Physiol.*, **140**, 326-335.
- Sunderhaus, S., Eubel, H., and Braun, H.-P. (2007) Two-Dimensional Blue Native/Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Characterization of Mitochondrial Protein Complexes and Supercomplexes. *Meth. Mol. Biol.* **372**, 315-324.
- Timmons, T.M., Dunbar, B.S. (1990) Protein blotting and immunodetection. *Meth. Enzimol.*, **182**, 679-701.
- Van Aken, O., Pecenkova, T., van de Cotte, B., De Rycke, R., Eeckhout, D., Fromm, H., De Jaeger, G., Witters, E., Beemster, G.T.S., Inze, D. and Van Breusegem, F. (2007) Mitochondrial type-I prohibitins of *Arabidopsis thaliana* are required for supporting proficient meristem development. *Plant J.*, **52**, 850–864.

Voinikov, V.K., Varakina, N.N., Pobezhimova, T.P., Rudikovskiy, A.V. (1991) Reconstruction of energy-producing activity in in vitro mitochondria maize seedlings. *Rus. J. Plant Physiol.*, **38**, 530-537

Романенко, А.С., Боровский, Г.Б., Уколова, И.В., Ломоватская, Л.А. (2010) Субклеточная локализация дегидринов в проростках растений пшеницы при низкотемпературной адаптации. *Биол. мембраны*, **27**, 156–165.