

# Comparative Analysis of Some Hsps Synthesis in Leaves of Transgenic Potato Plants with Gene *gox* at High Temperature

G.B. Borovskii<sup>1</sup>, I.V. Lyubushkina<sup>1,2</sup>, O.A. Borovik<sup>1</sup>,  
O.I. Grabelnych<sup>1,2\*</sup>, D.V. Sauchyn<sup>3</sup>, O.Yu. Urbanovich<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS, Irkutsk, Russia

<sup>2</sup> Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

<sup>3</sup> Institute of Genetics and Cytology of NAS of Belarus, Minsk, Belarus

\*E-Mail: [grolga@sifibr.irk.ru](mailto:grolga@sifibr.irk.ru)

Received September 8, 2015

Analysis of control and transgenic plants of potato, grade Skarb, transformed by vector constructions pBI-L-GOX (*LP* line) и pBI-F-GOX (*F* line) with native gene of glucose oxidase *gox* and pBI-GOX-mod (*MOD* line) with modified gene *gox-mod* has been carried out. It has been shown that transgenic potato plants with genes *gox* and *gox-mod* did not have phenotypic differences with control plants. It has been confirmed that there was an increase of level of hydrogen peroxide produced by reaction, which catalyzed by glucose oxidase in leaves of transgenic plants. Using antibodies against some heat shock proteins (Hsp101, Hsp70/Hsc70, Hsp60, Hsp17.6C-1, Hsp17.6C-2) we revealed an increased content of Hsp17.6C-2 in leaves of *LP* line and Hsp60 in leaves of *LP* and *F* in the morning. It has been shown that rise in temperature in the daytime (from 18-23°C to 35-43°C) led to intensification of all studied Hsps synthesis both in control and in transformed lines.

*Key words:* glucose oxidase, hydrogen peroxide, high temperature, heat stress proteins, potato

Неблагоприятные факторы среды, в частности значительные изменения температуры, негативно влияют на рост и продуктивность растений, в связи с чем получение трансгенных растений с повышенной устойчивостью к действию данных стрессоров является весьма актуальным. Активные формы кислорода (АФК) являются важными сигнальными молекулами. Показано, что увеличение их содержания в клетках может приводить к повышению устойчивости растений к разным биотическим и абиотическим факторам (Wu *et al.*, 1995). АФК могут запускать синтез ряда стрессовых белков, в том числе белков теплового шока (БТШ или Hsp, англ. "Heat Shock Protein"), участвующих в защите клеток (Piterkova *et al.*, 2013). Разные семейства БТШ выполняют различные функции, при этом большинство БТШ работают в клетке в качестве "молекулярных шаперонов" (Ellis, van der Vies, 1991; Vierling, 1991). Так, шаперонин Hsp60 локализован в митохондриях и участвует в импорте синтезированных в цитоплазме белков в митохондрии (Bukau, Horwich, 1998; Frydman, 2001). Конститутивно синтезируемые белки семейства БТШ70 - Hsc70 ("Heat shock cognate 70-kD") способствуют фолдингу синтезируемых *de novo* белков, транспорту белков в клеточные органеллы и деградации поврежденных белков, а стресс-индуцируемые формы Hsp70 препятствуют агрегации денатурированных белков, способствуют рефолдингу и восстановлению их биологических функций (Vierling, 1991). Другое семейство БТШ - нмБТШ (sHsps) представляют

собой группу молекулярных шаперонов с размером субъединиц 15-30 кД, они предотвращают денатурацию и агрегацию белков, поврежденных каким-либо воздействием (Vierling, 1991).

Увеличение содержания АФК в клетках можно вызвать не только действием внешних факторов, но и путем введения гена глюкозооксидазы *gox* в геном растения (Wu *et al.*, 1995; Sauchyn *et al.*, 2012). Результатом активности данного фермента является превращение  $\beta$ -D-глюкозы в  $\beta$ -D-глюконо- $\delta$ -лактон и сопряженное с ним восстановление молекулярного кислорода до пероксида водорода. Влияет ли повышение содержания пероксида водорода, вызванное действием глюкозооксидазы, на синтез БТШ, неизвестно.

В связи с этим целью данной работы было изучение синтеза БТШ в листьях картофеля с измененной экспрессией гена глюкозооксидазы *gox*.

## MATERIALS AND METHODS

В работе использовали контрольные и трансгенные растения картофеля (*Solanum tuberosum* L., сорт Скарб). Трансгенные растения картофеля были получены в ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси». Для трансформации был использован ген глюкозооксидазы высокоактивного грибного штамма *Penicillium funiculosum* 46.1. Агробактериальная трансформация растений проводилась векторными конструкциями pBI-L-GOX (линия LP) и pBI-F-GOX (линия F) с нативным геном глюкозооксидазы *gox* и pBI-GOX-mod (линия

*MOD*) с модифицированным геном *gox-mod*, созданными на основе векторной плазмиды pBI121 (Sauchyn et al., 2012; Sauchyn et al., 2015).

Растения картофеля выращивали в вегетационных сосудах в условиях теплицы на базе Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН. Для экспериментов отбирали листья среднего яруса у растений, находящихся в фазе бутонизации. Отбор проб проводили в утреннее (9.00 ч) и дневное (15.00 ч) время. Температура воздуха в период отбора проб составляла 18-23°C утром и 35-43°C днем.

Определение содержания пероксида водорода в листьях проводили с помощью 3,3'-диаминобензидина (ДАБ) (Tarasenko et al., 2012). Листья инфильтровали и инкубировали с ДАБ (0,2 мг/мл) в трис-ацетатном буфере (pH 5,0) в темноте при 26°C в течение 5 ч. Затем образцы помещали в 70% этанол и инкубировали при 80°C до тех пор, пока весь хлорофилл не переходил в раствор. По интенсивности коричневого окрашивания судили о содержании пероксида водорода в листьях (Thordal-Christensen et al., 1997).

Для выделения суммарного клеточного белка образцы ткани замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C. Затем образцы размораживали в буфере для выделения белка (0,1 М Трис-НСl, 0,003 М ДДС-Na, 0,001 М β-меркаптоэтанол, pH 7,4-7,6), в соотношении 1:4, добавляли 0,5-1 мМ фенилметилсульфонил-флюорид для ингибирования протеаз и растирали в фарфоровых ступках в жидком азоте. Грубые клеточные компоненты удаляли центри-

фугированием при 15000 g в течение 15 мин на центрифуге Allegra 64R («Beckman Coulter», США). Белок из супернатанта осаждали трехкратным объемом охлажденного ацетона. Осадок белка растворяли в буфере для образца (0,125 М Трис-НСl, 0,008 М ДДС-Na, 0,1 М β-меркаптоэтанол, 10% глицерин, 0,001% бромфеноловый синий, pH 6,8), инкубировали 5 мин при 100°C, центрифугировали 15 мин при 5000 g. Концентрацию белка определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951).

Белковый электрофорез проводили в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия в модифицированной системе Лэммли (Laemmli, 1970) с использованием Mini-PROTEIN 3 Cell (BIO-RAD, США). Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в Таубин буфере в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, BIO-RAD, США). Для изучения синтеза стрессовых белков в растительных клетках использовали антитела против различных групп БТШ: Hsp101 (AS07253, «Agrisera», Швеция), Hsp70/Hsc70 (SPA-820, «StressGen», США), Hsp60 (H1830-77B, «US Biological», США), Hsp17.6C-1 (AS07254, «Agrisera», Швеция), Hsp17.6C-2 (AS07255, «Agrisera», Швеция).

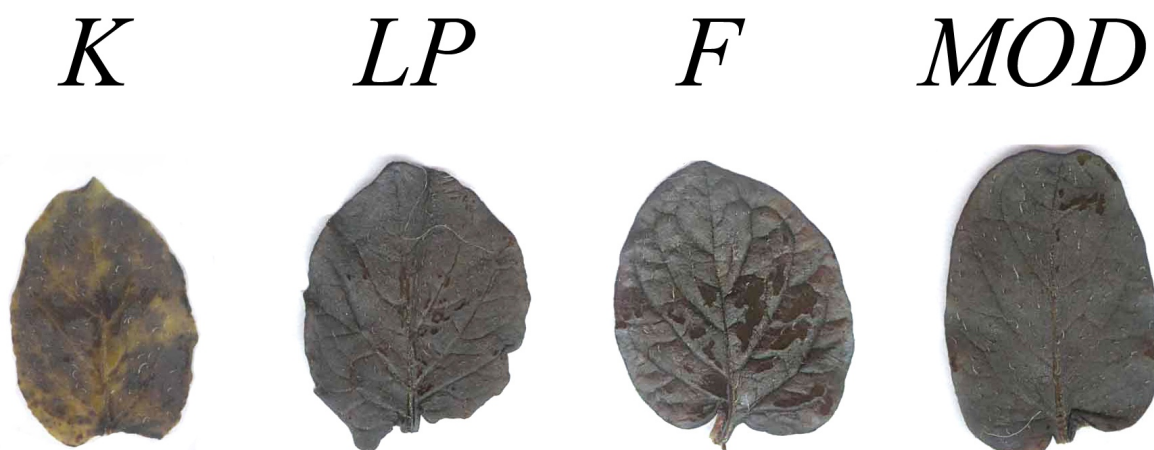
## RESULTS AND DISCUSSION

В работе было проанализировано 3 независимых линии *LP* и по 5 независимых линий *F* и *MOD*. Выявлено, что трансгенные растения не имели морфологических отличий, как между собой,

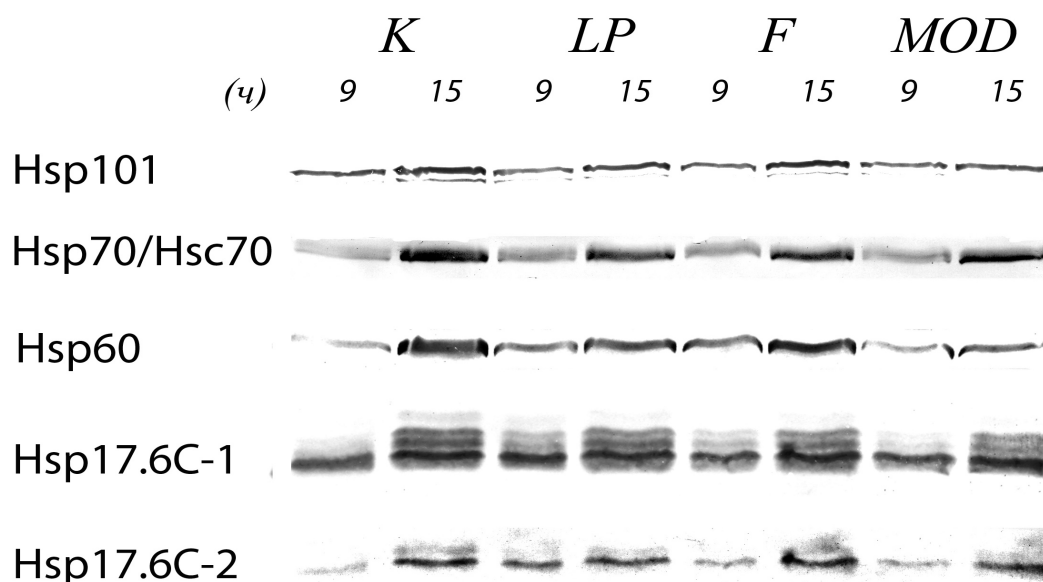
так и с контрольными растениями исходного сорта Скарб.

С использованием ДАБ было показано, что содержание пероксида водорода в листьях трансгенных растений картофеля выше по сравнению с контрольными (Рис. 1). На основании проведенного анализа были отобраны растения

линий *LP*, *F* и *MOD*, которые продемонстрировали наибольшее повышение содержания пероксида водорода в утренние часы. Из этих растений были взяты образцы листьев для выделения белков, и с помощью электрофореза и последующего иммуноблоттинга в них был изучен синтез БТШ в ответ на повышение температуры окружающей среды в дневное время.



**Figure 1.** Детекция пероксида водорода в тканях листьев растений картофеля исходного сорта (*K*) и растений трансгенных по *gox* (линии *LP*, *F*, *MOD*).



**Figure 2.** Влияние повышенной температуры в дневное время суток (15 ч) на синтез некоторых БТШ в листьях растений картофеля исходного сорта (*K*) и растений трансгенных по *gox* (линии *LP*, *F*, *MOD*).

Было показано, что содержание Hsp101, Hsp70/Hsc70 и низкомолекулярных БТШ I и II класса (Hsp17.6C-1 и Hsp17.6C-2) в листьях контрольных и трансгенных растений в утренние часы одинаково (Рис. 2). Исключение составляет образец, растений линии LP, у которого содержание Hsp17.6C-2 в утренние часы больше, чем в других образцах (Рис. 2). Содержание Hsp60 в утреннее время также было выше в листьях линии LP и линии F (Рис. 2). Содержание всех изученных БТШ значительно увеличивалось в дневные часы при повышении температуры в теплице, однако это повышение было сходным как у контрольных, так и у трансгенных линий.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что трансформация растений картофеля векторными конструкциями с нативным и модифицированным геном глюкозооксидазы *gox* повышает содержание эндогенного пероксида водорода, что приводит к изменению синтеза Hsp60 и Hsp17.6C-2. Однако требуется дальнейшая проверка возможного влияния увеличения эндогенного пероксида водорода на устойчивость растений к неблагоприятным факторам внешней среды.

## REFERENCES

- Bukau B., Horwich A.L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, **92**, 351-366.
- Ellis R.J. van der Vies S. (1991) Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 321-347.
- Frydman J. (2001) Folding of newly translated proteins *in vivo*: the role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 603-647.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Piterková J., Luhová L., Mieslerová B., Lebeda A., Petřivalský M. (2013) Nitric oxide and reactive oxygen species regulate the accumulation of heat shock proteins in tomato leaves in response to heat shock and pathogen infection. *Plant Sci.*, **207**, 57-65.
- Sauchyn D.V., Paniush A.S., Kartel N.A. (2012) Sozdanie i analiz trasgennyh rastenii kartofelia i tabaka s genom *gox Penicillium funiculosum*. *Izvestiia NAN Belarusi*, **4**, 16-20. (in Russian).
- Sauchyn D.V., Veresova T.N., Mezhnina O.A., Paniush A.S., Viacheslavova A.O., Goldenkova-Pavlova I.V. (2015) Optimizaciia kodonovogo sostava gribnogo gena *gox Penicillium funiculosum* dlia effektivnoi ekspressii v rasteniiakh *Solanum tuberosum*. *Izvestiia NAN Belarusi*, **1**, 50-56. (in Russian).
- Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y., Collinge D.B. (1997) Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.*, **11**, 1187-1194.
- Vierling E. (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **42**, 579-620.

- Wu G., Shortt B.J., Lawrence E.B., Levine E.B.,  
Fitzsimmons K.C., Shah D.M. (1995) Disease  
resistance conferred by expression of a gene  
encoding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating glucose oxidase in  
transgenic potato plants. *The Plant Cell*, **7**, 1357-  
1368.