

На правах рукописи



Сошинкова Татьяна Николаевна

**ПРООКСИДАНТНЫЕ И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА
ПРОЛИНА У РАСТЕНИЙ И КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК
*THELLUNGIELLA SALSUGINEA***

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2013

Работа выполнена в лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Радюкина Наталия Львовна

Официальные оппоненты:

Кондратьев Михаил Николаевич, доктор биологических наук, профессор, Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, кафедра физиологии растений, профессор

Леонова Татьяна Геннадиевна, кандидат биологических наук, Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии Российской академии сельскохозяйственных наук, лаборатория стрессоустойчивости растений, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, биологический факультет

Защита диссертации состоится «20» июня 2013 года в 11:00 ч на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 002.210.01 по специальности 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений» (Биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (499) 977-80-18, www.ippras.ru, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru, ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук

Автореферат разослан «18» мая 2013г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Около 3 млрд лет назад кислород стал необходимым компонентом окружающей среды и одним из условий существования аэробных организмов. При этом образование активных форм кислорода (АФК) явилось негативным следствием жизни организма в аэробной среде. В процессе эволюции у растений происходило формирование и развитие сложных многоступенчатых защитных реакций, контролирующих уровень АФК. Действие на растительный организм любого стрессорного фактора, как абиотического, так и биотического, провоцирует сверхпродукцию АФК и нарушает равновесие между их уровнем и активностью антиоксидантной защитной системы (Mittler, 2002; Foyer, Noctor, 2005; Gechev et al., 2006). Достижение нового равновесного состояния в изменившихся условиях представляет собой интегральный процесс, включающий множество метаболических путей, регуляция которых может осуществляться на транскрипционном, посттранскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях. Однако механизмы взаиморегуляции между компонентами антиоксидантной системы на сегодняшний день практически не известны. Одними из ключевых компонентов антиоксидантной системы являются ферменты аскорбат-глутатионового цикла, супероксиддисмутаза (СОД), каталаза и др. Роль низкомолекулярного многофункционального метаболита – пролина в ответе на окислительный стресс исследована далеко не достаточно.

С момента первого сообщения об аккумуляции пролина у стареющих растений райграса (*Lolium perenne*) (Kemble, MacPherson, 1954) число исследований об увеличении внутриклеточного содержания пролина у высших растений при действии разнообразных стрессорных факторов достигло впечатляющих значений. В настоящее время хорошо известны данные, демонстрирующие осмопротекторные свойства пролина, его способность стабилизировать структуру белков и регулировать рН цитоплазмы, снижать содержание АФК, а также регулировать соотношение НАД/НАД·Н (Krishnan et al., 2008; Szabados, Savoure, 2009; Verslues, Sharma, 2010). Однако молекулярные механизмы пролин-опосредованной защиты клеток растений остаются не выясненными; антиоксидантное действие пролина также требует

серьезных дополнительных исследований. Кроме того, практически не изученным остается вопрос о том, что происходит с ферментами и низкомолекулярными компонентами антиоксидантной защиты при повышении содержания пролина в растениях. В последние годы появляются сведения о том, что стресс-зависимое изменение внутриклеточного содержания пролина может участвовать в регуляции активностей антиоксидантных ферментов в растениях (Ozturk, Demir, 2002; Радюкина и др., 2008). Но эти данные немногочисленны и конкретные механизмы взаимодействия пролина с антиоксидантными ферментами до сих пор не ясны. В связи с этим важно исследовать участие пролина в регуляции функционирования ряда антиоксидантных ферментов в растениях при развитии окислительного стресса, вызванного действием абиотических стрессоров.

В последнее время в качестве модельного объекта для изучения устойчивости растений к различным стрессорам стали использовать *Thellungiella salsuginea*. Это близко родственное с *Arabidopsis thaliana* растение проявляет повышенную устойчивость к холодному и солевому стрессам (Amtmann, 2009). Молекулярные механизмы устойчивости *Th. salsuginea* к абиотическим воздействиям пока остаются мало изученными. Представляет также интерес вопрос о том, реализуется ли способность *Th. salsuginea* аккумулировать высокие уровни пролина лишь на уровне целого организма или она проявляется также и на клеточном уровне. В связи с этим, нам представлялось актуальным провести сравнительные исследования влияния пролина на функционирование антиоксидантной системы у растений и культивируемых *in vitro* клеток *Th. salsuginea*.

Цель и задачи исследования. Цель работы заключалась в изучении участия пролина в регуляции функционирования ферментов антиоксидантной системы растений и культивируемых клеток *Th. salsuginea* в условиях окислительного стресса.

Задачи исследования:

1. Изучить действие экзогенного пролина на активность ферментов антиоксидантной системы, изоферментный состав СОД, аскорбатпероксидазы (АП) у растений и культивируемых клеток *Th. salsuginea*.

2. Исследовать развитие окислительного стресса и функционирование ряда компонентов антиоксидантной системы при действии экзогенного пероксида водорода на растения и культивируемые клетки *Th. salsuginea*.

3. Изучить совместное действие пролина и пероксида водорода на функционирование ряда компонентов антиоксидантной системы растений и культивируемых клеток *Th. salsuginea*.

4. Провести сравнительное исследование действия пролина, пероксида водорода и их совместного действия на экспрессию генов метаболизма пролина и генов, кодирующих изоформы СОД и АП у растений и культивируемых клеток *Th. salsuginea*.

Научная новизна. Впервые показано, что экзогенный пролин вызывает окислительный стресс в листьях растений и культивируемых клетках *Th. salsuginea*, то есть проявляет прооксидантные свойства. Этот эффект был сходен с действием экзогенного пероксида водорода на объекты исследования. Защитное действие пролина проявлялось в условиях окислительного стресса, вызываемого действием пероксида водорода. Впервые показано, что в условиях окислительного стресса, вызываемого пролином и пероксидом водорода, повышается содержание свободного окипролина. Пролин при совместном действии с пероксидом водорода снимает ингибирующее действие последнего на экспрессию генов СОД и АП в листьях растений и культивируемых клетках *Th. salsuginea*. Впервые показана работа «пролинового цикла» при совместном действии пролина с пероксидом водорода у растений и культивируемых клеток *Th. salsuginea*, существование которого ранее было известно для клеток животных.

Практическая значимость. Полученные в результате исследований данные по влиянию пролина на функционирование антиоксидантной защитной системы растений и культивируемых клеток *Th. salsuginea* в нормальных условиях и при действии окислительного стресса имеют существенное значение для понимания механизмов координированной регуляции компонентов защитного ответа растительного организма в процессе реализации адаптивных программ. Эти фундаментальные знания могут использоваться в разработке технологии создания трансгенных растений с

повышенной устойчивостью к абиотическим стрессорам. Вся совокупность теоретических обобщений и полученных экспериментальных данных работы может быть использована в курсах лекций для студентов биологических факультетов ВУЗов.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на 14-ой Пущинской международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI» (Пущино, 2010); Всероссийском симпозиуме «Растение и стресс (Plants under Environmental Stress)» (Москва, 2010); 15-ой Пущинской международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI» (Пущино, 2011); VII Съезде ОФР «Физиология растений - фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Нижний Новгород, 2011); II(X) Международной Ботанической Конференции молодых ученых (Санкт-Петербург, 2012); семинаре молодых ученых в Институте физиологии растений им. К.А.Тимирязева (Москва, 2013)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Материалы диссертации изложены на 113 страницах машинописного текста и иллюстрированы 5 таблицами и 12 рисунками. Список цитируемой литературы включает 250 наименований, в т.ч. 238 на иностранных языках.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследований использовали 6-недельные растения *Thellungiella salsuginea* (Pall.) O.E. Schulz (*Th. salsuginea*) (экотип Shandong). Семена проращивали в перлите, после чего проростки в возрасте 3-х недель переносили в условия водной культуры. Растения выращивали в условиях фитотрона при минеральном питании по Кнопу с микроэлементами по Хогланду (pH = 6,0) с 12- часовым световым периодом под лампами Philips (F36W/54) при интенсивности светового потока в диапазоне ФАР 250 ± 50 мкмоль фотонов/м²с⁻¹. Температура воздуха составляла $23 \pm 5^\circ\text{C}$ и $16 \pm 5^\circ\text{C}$ (день/ночь), относительная влажность воздуха - 55/70% (день/ночь).

Вторым объектом исследования служила суспензионная культура клеток *Th. salsuginea* (экотип Yakutsk). Культура выращивалась в среде SH (Shenk and Hildebrandt, 1972) в стеклянных колбах в темноте при температуре $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ и постоянном перемешивании. Период субкультивирования составлял 10 дней.

Условия проведения опытов. Взрослые растения (6 недель, стадия розетки) переносили на питательную среду с добавлением 0,2; 2; 5 мМ пролина. Пероксид водорода (500 мкМ) наносили на листья растений и добавляли в питательную среду культивируемых клеток. В случае совместной обработки клеток *in vitro* в питательную среду вносили вначале 2 мМ пролин, а затем через час добавляли 500 мкМ H_2O_2 . Контролем служили растения и культивируемые клетки, не подвергнутые обработке. Через 6, 12, 24 ч культивирования отбирали пробы листьев для последующего анализа. Обработку клеток проводили на 6-ой день культивирования. По окончании обработки материал фиксировали жидким азотом и хранили при -70°C до проведения биохимических и молекулярно-биологических исследований.

Количество живых клеток оценивали с помощью красителя феносафранина Б (0,2% водный раствор), не проникающего в живые клетки.

Определение содержания свободного пролина в листьях растений и культивируемых клетках проводили по методу Bates с соавт. (Bates et al., 1973).

Оценка содержания малонового диальдегида (МДА) в листьях растений и культивируемых клетках. Содержание МДА оценивали спектрофотометрическим методом, основанном на образовании окрашенного комплекса МДА с тиобарбитуровой кислотой при нагревании (Heath, Packer, 1968).

Определение содержания свободного оксипролина проводили методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии на кафедре аналитической химии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Определение общей активности СОД проводили по методу, основанному на ингибировании СОД фотохимического восстановления нитросинего тетразолия до формазана (Beauchamp, Fridovich, 1971), и выражали в условных единицах активности СОД/мг белка.

Активность АП определяли спектрофотометрически по скорости разрушения аскорбиновой кислоты (Nakano, Asada, 1981).

Активность пролиндегидрогеназы (ПДГ) определяли спектрофотометрически по изменению концентрации восстановленного НАД (Mattioni et al., 1997).

Нативный гель-электрофорез СОД, АП проводили в полиакриламидном геле (12% разделяющий и 5% концентрирующий) по стандартной методике Ornstein и Davis (Ornstein, 1964; Davis, 1964) на приборе «Mini protean 3», (Bio-Rad, США). При проведении гель-электрофореза образцы выравнивали по содержанию белка. Белок определяли методом, основанном на восстановлении меди при взаимодействии с белками в щелочных условиях в присутствии бицихониновой кислоты (Smith, 1985). В качестве стандарта использовали БСА. Визуализацию отдельных изоформ СОД проводили методами, предложенными Мизальским (Miszalski, 1998). Визуализацию отдельных изоформ АП проводили по методике, предложенной Миттлером (Mittler, Zilinskas, 1993).

Определение белка в ферментных препаратах проводили спектрофотометрически с использованием красителя Кумасси R-250 по Эсену (Esen, 1978).

Экспрессию генов изоформ АП, СОД, а также генов метаболизма пролина исследовали методом ОТ-ПЦР с использованием специфических праймеров, сконструированных в программной среде Vector NTI и AliginX (Invitrogen, США), программы Vector NTI и базы данных www.ncbi.nlm.nih.gov. Тотальную РНК выделяли кислым фенол-хлороформом (Krapp et al., 1993). Очистку от примесей ДНК, синтез кДНК осуществляли с использованием ферментов и реактивов фирмы «Fermentas» по протоколу производителя. Результаты ПЦР оценивали методом электрофореза нуклеиновых кислот в 1%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Обработку полученных фореграмм проводили с помощью программы GelPro.

Представленные данные являются результатом трех независимых экспериментов и получены не менее чем в 3-кратной биологической и аналитической повторностях. Результаты, представляющие собою малые выборочные совокупности, обрабатывали

статистически в среде Microsoft Excel 2007 и выражали как среднюю арифметическую величину \pm ошибка средней величины.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*1. Развитие окислительного стресса при обработке пролином растений и культивируемых клеток *Th. salsuginea**

Антиоксидантная роль пролина в последнее время находит все большее подтверждение в литературе (Phang, 2009). Однако, мало известно, что происходит в клетке, если внутриклеточный уровень пролина будет искусственно повышен. В начале исследований необходимо было определить рабочую концентрацию экзогенного пролина для обработки растений и культивируемых клеток *Th. salsuginea*. При всех использованных концентрациях (от 0,2 до 5 мМ) отмечалось повышение внутриклеточного содержания пролина в тканях растения и клетках суспензии, что указывает на интенсивный транспорт этого метаболита. Наряду с этим возрастало и содержание МДА – маркера развития окислительного стресса. Чем выше было внутриклеточное содержание пролина, тем больше было МДА.

Для растений и культивируемых клеток *Th. salsuginea* была выбрана оптимальная концентрация экзогенного пролина – 2 мМ, при которой через 6ч происходило увеличение содержания пролина примерно в 2–5 раз (с $8,21 \pm 0,53$ до $19,28 \pm 0,82$ мкмоль/г сухой массы листьев и с $4,34 \pm 0,23$ до $23,32 \pm 1,9$ мкмоль/г сухой массы культивируемых клеток) и одновременное увеличение в 2 раза активности ПДГ (с $4,23 \pm 0,40$ до $9,27 \pm 0,82$ нмоль НАД/(мг белка мин) в листьях и с $7,12 \pm 0,61$ до $15,21 \pm 1,04$ нмоль НАД/(мг белка мин) в культивируемых клетках). И в листьях, и в культивируемых клетках увеличение содержания пролина и активация ПДГ сопровождалось развитием окислительного стресса, на что указывало двукратное повышение содержания МДА (с $22,31 \pm 1,34$ до $46,42 \pm 2,28$ нмоль МДА/г сырой массы листьев и с $20,61 \pm 1,05$ до $41,21 \pm 2,12$ нмоль МДА/г сырой массы культивируемых клеток). Экзогенный пролин вызывал повышение содержания свободного оксипролина (с 1500 ± 100 нг/г сырой массы в контроле до 2700 ± 180 нг/г сырой массы в присутствии пролина).

В клетках *in vitro* при действии 2 мМ экзогенного пролина происходило увеличение активности СОД (с $8,72 \pm 0,58$ до $11,45 \pm 0,36$ ед. акт./мг белка) и АП (с $10,32 \pm 0,52$ до $23,03 \pm 1,04$ мкмоль аскорбата/(мг белка мин)) уже в первые часы эксперимента. В листьях растений *Th. salsuginea* экзогенный пролин повышал общую активность СОД (с $1,17 \pm 0,21$ до $4,17 \pm 0,26$ ед. акт./мг белка) и активность АП (с $8,24 \pm 0,57$ до $15,08 \pm 0,53$ мкмоль аскорбата/(мг белка мин)).

Таким образом, увеличение содержания МДА, повышение активности СОД и АП указывает на прооксидантную функцию пролина в нормальных условиях культивирования как растений, так и клеток *in vitro* *Th. salsuginea*.

2. Развитие окислительного стресса при обработке пероксидом водорода растений и культивируемых клеток *Th. salsuginea*

Пероксид водорода образуется в качестве побочного продукта в ряде биохимических реакций в клетке и удаляется при взаимодействии с широким спектром низкомолекулярных соединений и ферментов. Известно, что обработка растений и культивируемых клеток как растительного, так и животного происхождения разбавленными растворами H_2O_2 вызывает развитие окислительного стресса, а также индуцирует экспрессию генов и синтез белков, содержание которых обычно возрастает в стрессовых условиях (Dat et al., 2000; Bowler, Fluhr, 2000; Foyer, Noctor, 2005). В связи с этим представлялось важным сравнить прооксидантный эффект экзогенного пролина с окислительным стрессом, вызываемым действием H_2O_2 как на организменном, так и на клеточном уровнях.

В отличие от действия экзогенного пролина, обработка листьев растений *Th. salsuginea* 500 мкМ H_2O_2 вызывала незначительное увеличение содержания МДА только лишь через сутки (с $42,11 \pm 1,94$ до $52,70 \pm 2,01$ нмоль МДА/г сырой массы). Это, по нашему мнению, могло быть связано с достаточно эффективными и многочисленными реакциями «детоксикации» H_2O_2 в растениях. Обработка культивируемых клеток H_2O_2 , также как и пролином, вызывала быстрое повышение содержания МДА уже через час (с $20,21 \pm 1,01$ до $38,44 \pm 1,21$ нмоль МДА/г сырой массы), что свидетельствует о большей восприимчивости клеток *in vitro*, вследствие более быстрого поступления H_2O_2 в клетки.

При обработке H_2O_2 происходило повышение содержания пролина: в растениях (с $13,78 \pm 0,82$ до $21,65 \pm 0,97$ мкмоль/г сухой массы) через сутки, а в культивируемых клетках (с $3,82 \pm 0,23$ до $10,20 \pm 0,63$ мкмоль/г сухой массы) через 3 ч. Однако только у клеточной культуры оно сопровождалось быстрой активацией ПДГ (с $5,02 \pm 0,35$ до $10,34 \pm 0,64$ нмоль НАД/(мг белка мин)). Очевидно, что культивируемые клетки оказались более чувствительными к изменению внутриклеточной концентрации пролина. При действии H_2O_2 в растениях и культивируемых клетках было также обнаружено незначительное повышение содержания свободного оксипролина (с 1500 ± 100 нг/г сырой массы до 2200 ± 150 нг/г сырой массы). Эти факты могут указывать на вовлечение пролина в детоксикацию H_2O_2 .

Обработка H_2O_2 вызывала повышение общей активности СОД в листьях к 6-му часу (с $1,17 \pm 0,21$ до $3,12 \pm 0,24$ ед. акт./мг белка). В клеточной культуре наблюдалось незначительное повышение активности СОД (с $0,95 \pm 0,15$ до $1,41 \pm 0,15$ ед. акт./мг белка). В отличие от экзогенного пролина H_2O_2 не вызывал активацию АП у растений. В культивируемых клетках активность АП увеличивалась через час после обработки H_2O_2 (с $8,41 \pm 0,52$ до $14,32 \pm 0,76$ мкмоль аскорбата/(мг белка мин)) и до 3-х часов сохранялась на уровне, превышающем контрольные значения примерно в 2 раза.

Таким образом, действие экзогенных пролина и H_2O_2 вызывало развитие окислительного стресса в растениях и культивируемых клетках *Th. salsuginea*. Индикаторами окислительного стресса служили - повышение уровня МДА, оксипролина, а также изменение активностей антиоксидантных ферментов – СОД и АП.

3. Особенности совместного действия H_2O_2 и пролина на функционирование антиоксидантной системы растений и культивируемых клеток *Th. salsuginea*

Проведенное исследование влияния экзогенного пролина и H_2O_2 на растения и культивируемые клетки *Th. salsuginea* выявило, что оба этих вещества оказывали прооксидантное действие. Ранее было показано, что пролин в сочетании с УФ-В облучением снижал повреждающее действие последнего на растения шалфея (Шашукова и др., 2008; 2010). В связи с этим, важно было проверить как совместное

действие пролина и H_2O_2 сказывается на развитии окислительного стресса в растениях и культивируемых клетках *Th. salsuginea*, а именно, происходит ли усиление или снижение повреждающего действия каждого из указанных веществ.

При действии H_2O_2 через 3 ч число живых клеток *in vitro* составляло 50%. А предобработка 2 мМ пролином увеличивала количество живых клеток на 15%, что свидетельствует о снижении повреждающего действия H_2O_2 .

В экспериментах с растениями обработка H_2O_2 вызывала повышение содержание МДА в листьях, в присутствии же пролина наблюдали снижение содержание МДА через 12 ч (1 ч – $49,33 \pm 1,82$; 12 ч – $40,11 \pm 1,08$ нмоль МДА/г сырой массы), что совпадало с динамикой поступления пролина в листья (с $13,78 \pm 0,82$ до $23,70 \pm 0,97$ мкмоль/г сухой массы). При добавлении H_2O_2 в среду культивирования клеток происходило увеличение интенсивности ПОЛ на протяжении всего эксперимента. При совместном действии пролина и H_2O_2 уровень МДА был ниже, чем при действии только H_2O_2 и только пролина.

При предварительном внесении экзогенного пролина и затем H_2O_2 внутриклеточное содержание пролина в листьях изменялось волнообразно на фоне снижения активности ПДГ (с $7,21 \pm 0,42$ до $2,83 \pm 0,17$ нмоль НАД/(мг белка мин)). Кроме того, примерно в 2 раза увеличивалось содержание оксипролина (до 3100 ± 200 нг/г сырой массы). В культуре клеток при добавлении пролина совместно с H_2O_2 внутриклеточное содержание пролина увеличилось в 4 раза (с $3,84 \pm 0,23$ до $16,85 \pm 0,69$ мкмоль/г сухой массы) на фоне увеличения активности ПДГ (с $5,02 \pm 0,35$ до $15,76 \pm 0,84$ нмоль НАД/(мг белка мин)).

Совместная обработка растений пролином и H_2O_2 , в отличие от действия только H_2O_2 , активировала АП (с $8,41 \pm 0,52$ до $12,53 \pm 0,81$ мкмоль аскорбата/(мг белка мин)). У культивируемых клеток совместное действие двух указанных веществ вызывало плавное и стабильное повышение активности этого фермента, также как и при действии каждого вещества отдельно.

Таким образом, совместное действие пролина и H_2O_2 не повышало уровень окислительного стресса, наоборот, пролин снижал повреждающее действие H_2O_2 на растения и культивируемые клетки *Th. salsuginea*. Это проявлялось как в снижении

уровня МДА, так и в увеличении доли живых клеток суспензионной культуры. Кроме того, присутствие экзогенного пролина снижало ингибирующий эффект H_2O_2 на общую активность СОД и активировало АП.

4. Влияние пролина, H_2O_2 и их совместного действия на изоферментный состав СОД и АП в растениях и культивируемых клетках

Измеряемые общие активности СОД и АП являются интегральным показателем, включающим активность всех существующих у *Th. salsuginea* изоформ этих ферментов. В связи с этим было важно исследовать влияние пролина, H_2O_2 и их совместного действия на спектр и активность изоформ СОД и АП.

С помощью нативного гель-электрофореза с использованием ингибиторного анализа было показано, что в листьях и культивируемых клетках *Th. salsuginea* присутствуют три изоформы СОД: Fe-СОД, Cu/Zn-СОД, Mn-СОД.

Пролин активировал Cu/Zn-СОД и Fe-СОД и в листьях растений, и в культивируемых клетках *Th. salsuginea* (рис. 1а, рис. 2а), не влияя на активность Mn-СОД.

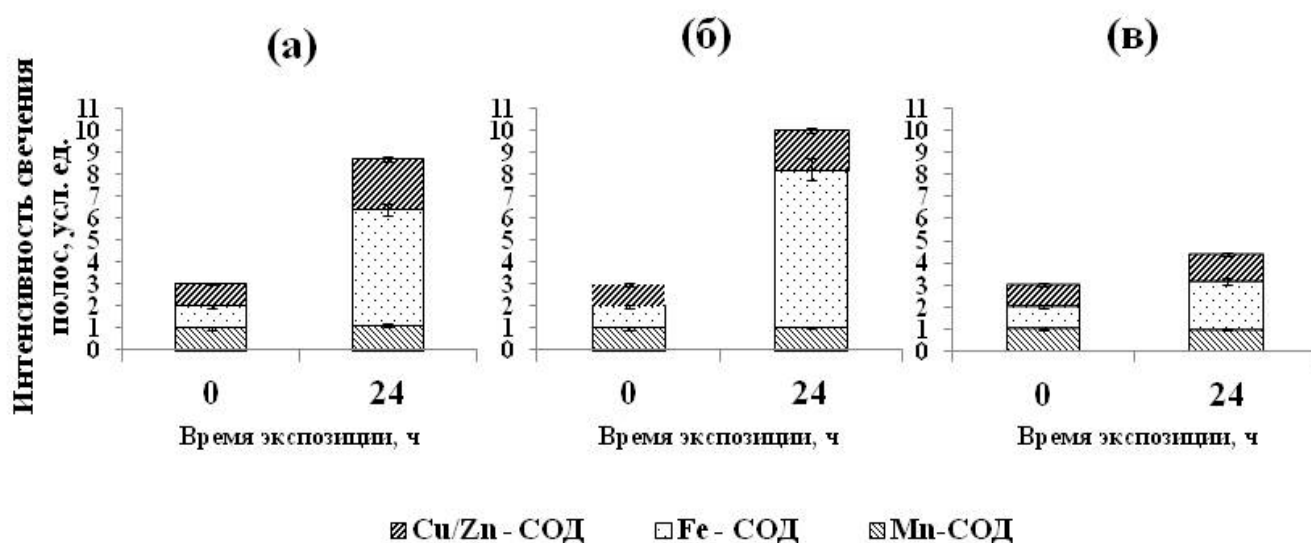


Рисунок 1 - Изоферментный спектр СОД листьев *Th. salsuginea*. а – обработка 2 мМ пролином, б – обработка 500 мкМ H_2O_2 , в – совместное действие 2 мМ пролина и 500 мкМ H_2O_2 .

Пероксид водорода в листьях и культивируемых клетках (рис. 1б, рис. 2б) не оказывал влияния на активность Mn-СОД, но активировал Fe-СОД и Cu/Zn-СОД. Возможно, изоформы СОД активировались уже вторичными супероксидрадикалами,

образовавшимися в результате окислительно-восстановительных реакций, например, Фентона или Хабера Вейса.

Совместное действие пролина и H_2O_2 в листьях повышало активность только Fe-СОД (рис. 1в), а в культивируемых клетках значительно активировало Cu/Zn-СОД и Fe-СОД (рис. 2в).

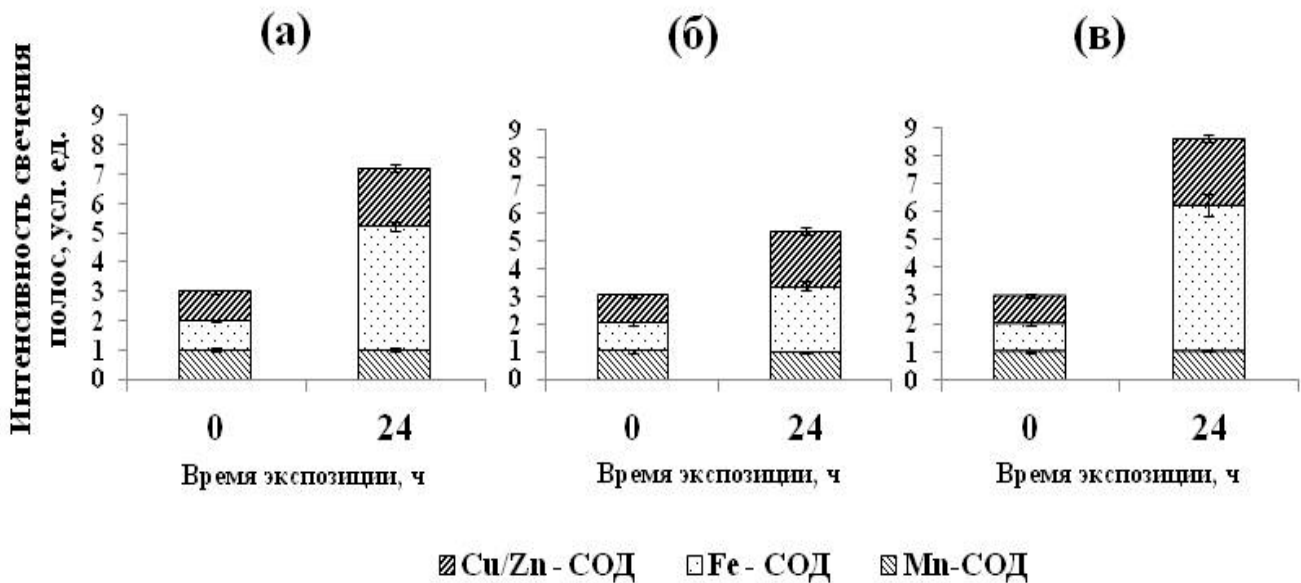


Рисунок 2 - Изоферментный спектр СОД культивируемых клеток *Th. salsuginea*. а – обработка 2 мМ пролином, б – обработка 500 мкМ H_2O_2 , в – совместное действие 2 мМ пролина и 500 мкМ H_2O_2 .

При исследовании изоферментного состава АП мы ориентировались на данные, полученные на растениях *A. thaliana*, близким родственником которого является *Th. salsuginea*. Для *A. thaliana* известно семь генов, кодирующих изоформы АП, но методом нативного электрофореза присутствие всех семи изоформ не показано. В листьях контрольных растений *Th. salsuginea* было обнаружено присутствие двух высокомолекулярных изоформ АП. В суспензионной культуре – 4-х низкомолекулярных изоформ.

Пролин вызывал появление активности дополнительных низкомолекулярных изоформ АП в листьях и высокомолекулярной в культивируемых клетках *Th. salsuginea* (рис. 3). Действие H_2O_2 не вызывало изменений в изоферментном составе

АП в листьях (рис. 3а), в культивируемых клетках отмечено ингибирование низкомолекулярных изоформ (рис. 3б).

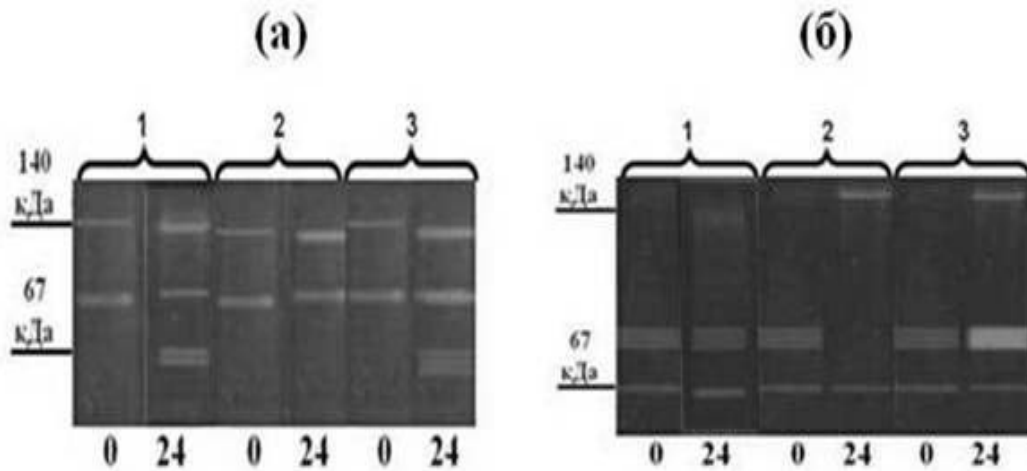


Рисунок 3 - Влияние пролина, пероксида водорода и их совместного действия на изоферментный спектр АП растений (а) и культивируемых клеток (б) *Th. salsuginea*. 1-обработка 2мМ пролином, 2-обработка 500 мкМ H₂O₂, 3-совместное действие 2 мМ пролина и 500 мкМ H₂O₂.

При совместном действии пролина и H₂O₂ в листьях появлялась активность 3-х дополнительных низкомолекулярных изоформ с мол. массой около 67 кДа, в культивируемых клетках – активировались 3 низкомолекулярные изоформы с мол. массой выше 67 кДа и появлялась дополнительная – высокомолекулярная с мол. массой примерно 140 кДа. Пероксид водорода в культивируемых клетках *Th. salsuginea* ингибировал низкомолекулярные изоформы, в то время как при совместном действии пролина и H₂O₂ их активность восстанавливалась.

5. Влияние экзогенного пролина, H₂O₂ и их совместного действия на экспрессию генов, кодирующих изоформы аскорбатпероксидазы и супероксиддисмутазы

Влияние экзогенного пролина, H₂O₂ и их совместное действие на уровень внутриклеточного пролина и активность изоферментов СОД и АП стимулировало нас к изучению вопроса – как указанные вещества влияют на экспрессию генов, кодирующих изоформы СОД и АП.

Для растения *Th. salsuginea* известно несколько генов, кодирующих изоформы СОД: *CSD1* и *CSD2* для Cu/Zn-СОД, *FeSD1* и *FeSD2* для Fe-СОД.

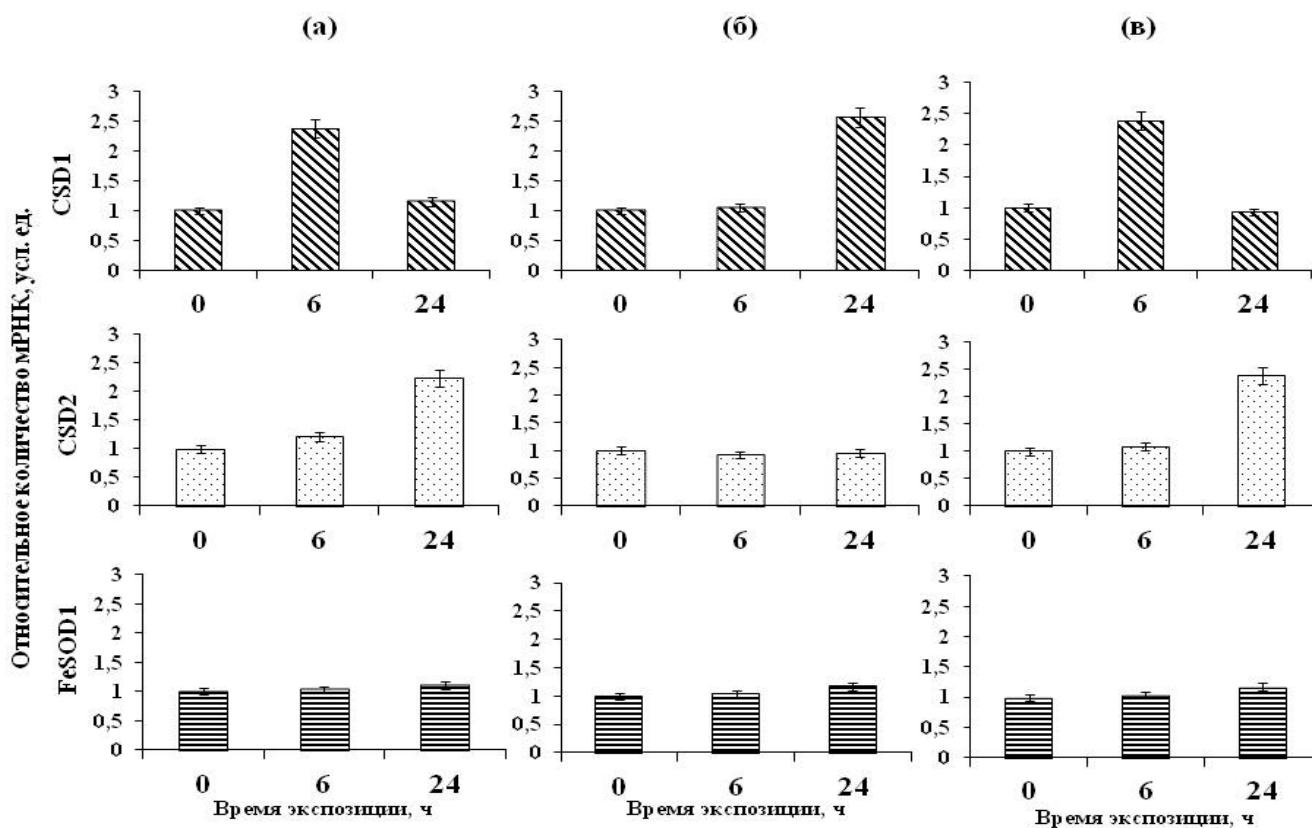


Рисунок 4 - Влияние пролина, пероксида водорода и их совместного действия на экспрессию генов, кодирующих изоформы СОД у растений *Th. salsuginea*. а - обработка 2мМ пролином, б - обработка 500 мкМ H₂O₂, в - совместное действие 2 мМ пролина и 500 мкМоль H₂O₂.

Экзогенный пролин не изменял экспрессию гена *FeSD1*, но кратковременно индуцировал экспрессию гена *CSD1* (рис. 4а). Экспрессия гена *CSD2* усиливалась через сутки. Сравнивая картину экспрессии генов с активностью белков, кодируемых этими генами, можно предположить, что пролин влияет на Fe-СОД на посттрансляционном уровне. Усиление экспрессии генов *CSD1* и *CSD2* на фоне постоянной активности Cu/Zn-СОД может указывать на то, что функционирование этой изоформы индуцируется при деградации пролина, а также, возможно, при образовании вторичных супероксидрадикалов. В культивируемых клетках наблюдалась схожая картина, за исключением отсутствия индукции экспрессии гена *CSD2*.

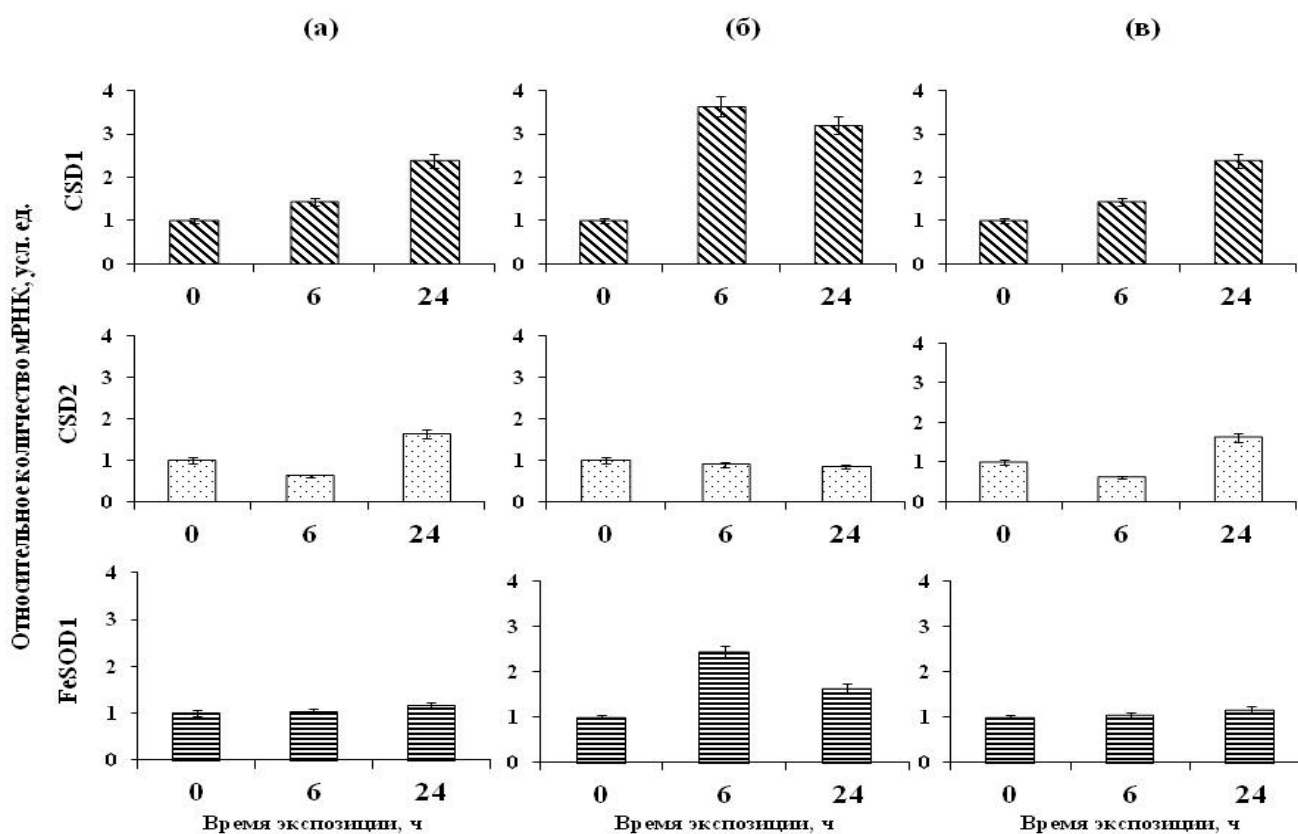


Рисунок 5 - Влияние пролина, пероксида водорода и их совместного действия на экспрессию генов, кодирующих изоформы СОД у культивируемых клеток *Th. salsuginea*. а - обработка 2мМ пролином, б - обработка 500 мкМ H₂O₂, в - совместное действие 2 мМ пролина и 500 мкМ H₂O₂.

Анализ экспрессии генов изоформ СОД при действии H₂O₂ показал, что в листьях *Th. salsuginea* уровень транскриптов генов *CSD1* заметно повышался через сутки (рис. 4б). Уровень транскриптов *FeSD1* и *CSD2* оставался неизменным, а активность самих изоформ ферментов увеличивалась. В культивируемых клетках возрастало количество транскриптов генов *FeSD1* и *CSD1*, а уровень транскриптов гена *CSD2* достоверно не изменялся на фоне активации изоформы этого фермента.

При совместном действии пролина и H₂O₂ в листьях *Th. salsuginea* наблюдалась стабильная экспрессия генов *FeSD1* и *CSD1*. Индукция экспрессии гена *CSD2* также, как и при действии пролина, начиналась через 24 ч, что соответствовало стабильной активности Cu/Zn-СОД. В культивируемых клетках пролин совместно с H₂O₂ усиливали экспрессию *CSD1* и *CSD2* через 24 ч (рис. 5в), экспрессия *FeSD1* повышалась через 6 ч, что также соответствовало динамике активностей изоферментов (рис. 2в).

Таким образом, при обработке пролином совместно с H_2O_2 в листьях *Th. salsuginea* сохранялась индукция генов *CSD1* и *CSD2*, наблюдавшаяся при действии только пролина. В культивируемых клетках совместное действие двух веществ изменяло только динамику экспрессии *CSD2* по сравнению с их действием по-отдельности.

Для *A. thaliana* известны семь изоформ АП и столько же генов, кодирующих эти белки: два гена цитозольной изоформы *APX1* и *APX2*, гены микросомальной изоформы *APX3* и *APX4*, ген хлоропластной, локализованной в строме, изоформы *sAPX*, и тилакоид-связанной изоформы *tAPX* (Fourcroy et al., 2004; Yoshimura et al., 2000; Keyster et al., 2011).

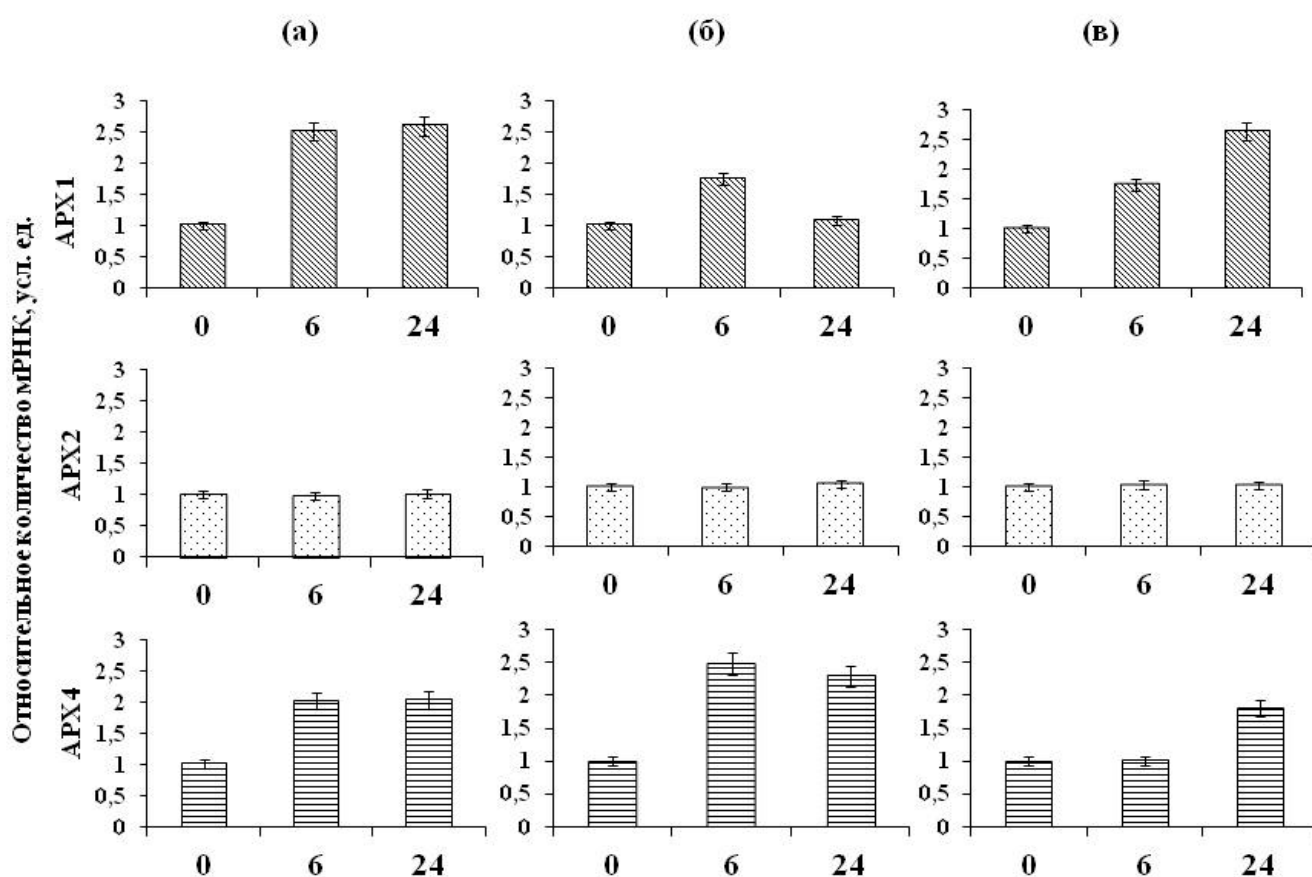


Рисунок 6 - Влияние пролина, пероксида водорода и их совместного действия на экспрессию генов, кодирующих изоформы АП у растений *Th. salsuginea*. а - обработка 2мМ пролином, б - обработка 500 мкМ H_2O_2 , в - совместное действие 2 мМ пролина и 500 мкМ H_2O_2 .

В контрольных растениях *Th. salsuginea* было обнаружено накопление матриц трех генов *APX1*, *APX2* и *APX4*. В культивируемых клетках экспрессия *APX2* не обнаружена.

Экзогенный пролин в листьях вызывал индукцию *APX1* и *APX4*, но не изменял экспрессию *APX2* (рис. 6а). В культивируемых клетках также происходила индукция экспрессии *APX4*, но для *APX1* отмечалось лишь кратковременное повышение экспрессии (рис. 7а).

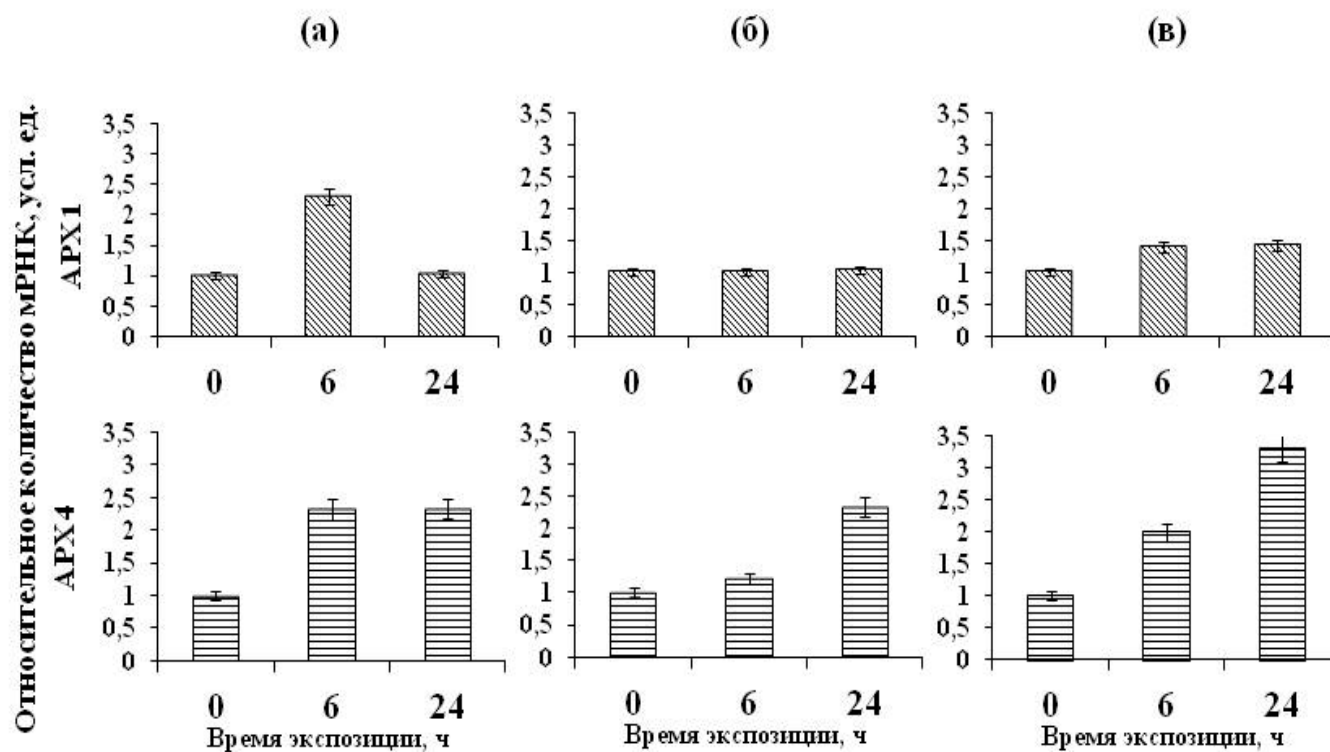


Рисунок 7 - Влияние пролина, пероксида водорода и их совместного действия на экспрессию генов, кодирующих изоформы АП в культивируемых клетках *Th. salsuginea*. а - обработка 2мМ пролином, б - обработка 500 мкМ H₂O₂, в - совместное действие 2 мМ пролина и 500 мкМ H₂O₂.

Добавление H₂O₂ как к растениям, так и к культивируемым клеткам приводило к увеличению количества матриц гена *APX4*, кодирующего микросомальную изоформу АП, не изменяя уровней транскриптов *APX1*.

При совместном действии пролина и H₂O₂ уровни транскриптов генов *APX4* и *APX1* повышались как в растении, так и в культивируемых клетках *Th. salsuginea*. Экспрессия гена *APX2* в листьях не изменялась при действии обоих факторов.

6. Влияние пролина, H₂O₂ и их совместного действия на экспрессию генов метаболизма пролина

Усиление экспрессии генов *P5CS1* и *P5CR* отмечается, обычно, в условиях солевого стресса у различных растений. Однако изменение экспрессии генов метаболизма

пролина в присутствии искусственно созданного его избытка практически не изучалось.

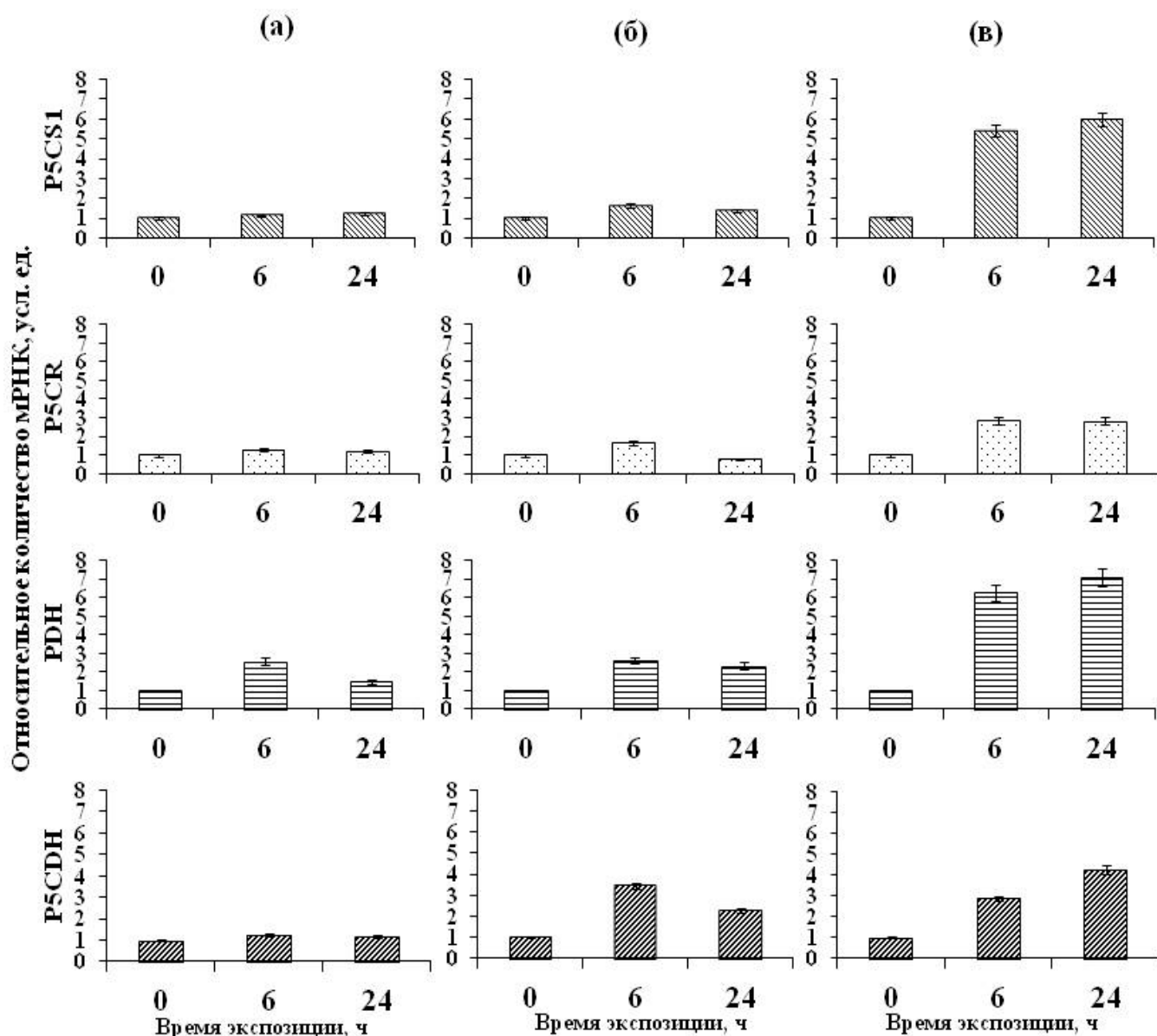


Рисунок 8 - Влияние пролина, пероксида водорода и их совместного действия на экспрессию генов метаболизма пролина в растениях *Th. salsuginea*. а - обработка 2мМ пролином, б - обработка 500 мкМ Н₂О₂, в - совместное действие 2 мМ пролина и 500 мкМ Н₂О₂.

При действии пролина ни в листьях, ни в культивируемых клетках не наблюдалось ингибирование экспрессии генов *P5CS1* и *P5CR*, кодирующих ферменты его биосинтеза (рис. 8а, 9а). Однако в листьях и в суспензионной культуре транзientно индуцировалась экспрессия гена *PDH*, кодирующего ПДГ, активность которой

повышалась. Экспрессия гена *P5CDH*, кодирующего фермент катаболизма пролина, снижалась только в культивируемых клетках.

При действии H_2O_2 наблюдаемое усиление экспрессии генов *P5CS1* и *P5CR* в листьях (рис. 8б) предшествовало повышению содержания пролина. Однако, наряду с усилением экспрессии генов ферментов биосинтеза пролина, наблюдалось усиление экспрессии генов ферментов его деградации *PDH* и *P5CDH*. Следует отметить, что значимого повышения активности ПДГ при этом не происходило. В культивируемых клетках экспрессия генов *P5CS1* и *P5CR* достоверно не изменялась (рис. 9б).

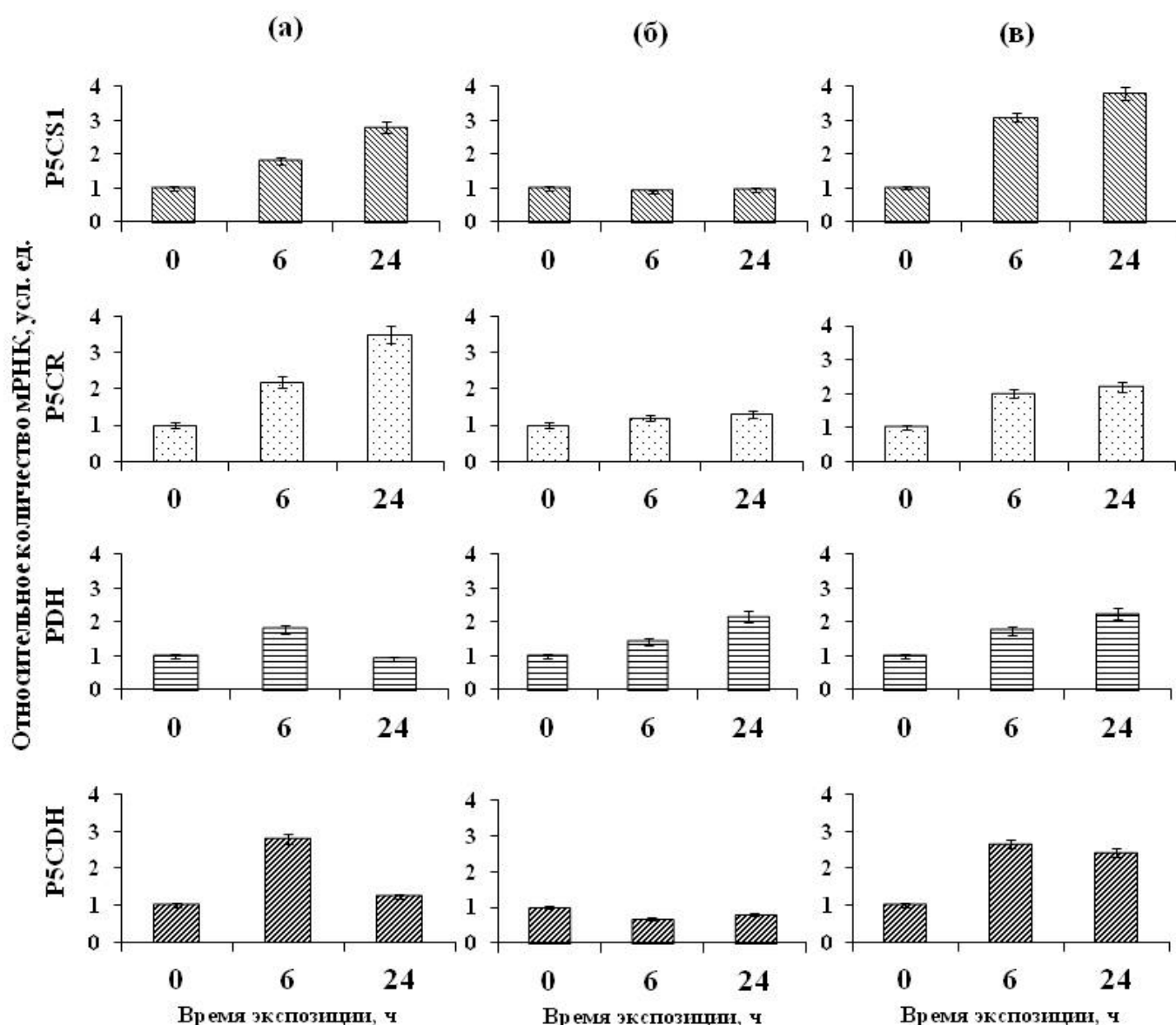


Рисунок 9 - Влияние пролина, пероксида водорода и их совместного действия на экспрессию генов метаболизма пролина в культивируемых клетках *Th. salsuginea*. а - обработка 2мМ пролином, б - обработка 500 мкМ H_2O_2 , в - совместное действие 2 мМ пролина и 500 мкМ H_2O_2 .

Повышение уровня экспрессии генов *PDH* и *P5CDH* происходило одновременно с активацией ПДГ (рис. 9б). Возможно, снижение уровня внутриклеточного H_2O_2 за счет детоксикации вызывало необходимость деградации пролина, индукция синтеза которого была вызвана H_2O_2 .

При сравнительном анализе экспрессии генов метаболизма пролина в условиях совместного действия экзогенного пролина и H_2O_2 можно отметить увеличение уровня транскриптов всех генов, участвующих в метаболизме пролина, как в растениях, так и в культивируемых клетках. Возможно, это связано с функционированием «пролинового цикла», регулирующего внутриклеточное содержание пролина на определенном уровне (Miller, 2009).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пролин – вторичная протеогенная аминокислота, обладающая рядом уникальных свойств. Ферменты, метаболизирующие пролин тканеспецифичны, имеют разное внутриклеточное распределение и особые механизмы регуляции. Пролин, наравне с растворимыми углеводами, полиаминами и другими низкомолекулярными веществами, участвует в защитном ответе растения на действие широкого круга абиотических стрессоров. Стресс-зависимое изменение биосинтеза и катаболизма пролина показано у различных организмов. На основании ряда исследований предложена гипотеза об участии пролина в сигнальном каскаде, приводящем, например, в клетках животных через p53-зависимую индукцию пролиноксидазы к программируемой гибели клеток (Nare et al., 1997; Hu et al., 2007). В клетках растений и бактериях этот сигнальный каскад приводит к запуску осморегулирующего механизма. Однако доказательств многофункциональности пролина накоплено недостаточно и известные работы выполнены на модельных растениях, основным из которых является *A. thaliana*, не проявляющий высокую устойчивость к абиотическим стрессорам. В связи с этим основной целью настоящей работы было исследование двойной роли пролина как прооксиданта и антиоксиданта в растении и культуре клеток экстремофита *Th. salsuginea*.

Несмотря на то, что исследуемое растение и культура клеток характеризовались высоким конститутивным содержанием пролина, его добавление в питательную среду приводило к развитию окислительного стресса как на клеточном, так и на организменном уровнях, т.е. проявлению им прооксидантных свойств. Это выражалось в увеличении содержания МДА – основного продукта ПОЛ, а также в активации СОД и АП, в увеличении содержания свободного оксипролина. Прооксидантное действие пролина, показанное в наших экспериментах на листьях растения и на культивируемых клетках *Th. salsuginea*, а также на растениях шалфея (Шашукова, 2009) и в экспериментах других исследователей (Deuschle et al., 2001; Hanson et al., 2008; Miller, 2009), связывают с активацией ПДГ в P5C-пролиновом цикле. Нарушение концентрации пролина в цитозоле приводит, по-видимому, к активации этого цикла за счет усиления окисления пролина. В этой реакции, осуществляемой в митохондриях и катализируемой ПДГ, электрон и протон от пролина напрямую включаются в дыхательную цепь митохондрий. При активации ПДГ избыток электронов может нарушать окислительно-восстановительный баланс и вызывать образование АФК (Elthon et al., 1982; Cooper et al., 2008). Образовавшийся в этом цикле супероксид превращается в H_2O_2 в реакции, катализируемой СОД. Но, возможно и неферментативное образование пероксид радикала, который в водном растворе превращается в H_2O_2 . Последний и является причиной активации АП. Кроме того, наблюдаемое повышение содержания свободного оксипролина может быть сигналом для усиления экспрессии генов, кодирующих ферменты биосинтеза пролина. Таким образом, из сказанного выше следует, что обработка пролином в нормальных условиях культивирования как целых растений, так и клеток *in vitro* вызывает стрессовую реакцию и нарушает окислительно-восстановительный баланс. Более того, анализ экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболизма пролина показал, что внутриклеточный пул пролина должен находиться под строгим контролем, который осуществляется не только на уровне активности ферментов, но и на транскрипционном уровне.

При сравнении действия пролина и H_2O_2 оказалось, что оба эти вещества действовали сходным образом и на растения и на культуру клеток. Сходство

проявлялось в усилении ПОЛ, активации исследованных антиоксидантных ферментов и активностей изоформ СОД, изменении изоферментного состава АП и экспрессии генов, кодирующих изоформы указанных ферментов. Однако повышение внутриклеточного содержания пролина на фоне действия эффектора окислительного стресса способствовало восстановлению редокс-гомеостаза в клетках растений и суспензионной культуры *Th. salsuginea*.

ВЫВОДЫ

1. Культура клеток *Th. salsuginea*, в основном, повторяет закономерности изменений метаболизма и аккумуляции пролина, характер проявления окислительного стресса и особенностей функционирования компонентов антиоксидантной защитной системы, характерных для растений, что позволяет использовать её как удобную модельную систему для изучения механизмов адаптации.

2. Экзогенный пролин вызывает окислительный стресс, что проявляется в увеличении содержания МДА, повышении активностей СОД и АП и изменении интенсивности экспрессии кодирующих изоформы этих ферментов генов. Полученные данные позволяют говорить о том, что регуляция пролином активностей антиоксидантных ферментов может быть реализована, как на транскрипционном (посттранскрипционном), так и посттрансляционном уровнях.

3. Продуктом окисления пролина в растениях может быть свободный оксипролин, содержание которого увеличивается примерно вдвое в ответ на обработку растений экзогенным пролином или на совместное действие пролина и пероксида водорода.

4. Прооксидантное действие пролина сходно с прооксидантным действием пероксида водорода, что проявляется в увеличении содержания МДА, повышении активности СОД и АП.

5. Совместное действие пролина и пероксида водорода не приводит к развитию окислительного стресса. При этом отмечается проявление защитного эффекта пролина в присутствии пероксида водорода. В пользу этой точки зрения свидетельствует

способность пролина снижать содержание МДА и одновременно повышать жизнеспособность культивируемых клеток в условиях негативного действия пероксида водорода.

6. Интенсивность экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболизма пролина, изменяется не только под действием пероксида водорода и пролина, но и при совместном действии двух факторов, что указывает на необходимость поддержания оптимального уровня пролина в результате функционирования «пролинового цикла».

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сошинкова Т.Н., Иванов Ю.В., Бакулина Е.А. (2010) Паракват и NaCl регулируют экспрессию генов метаболизма пролина у *Thellungiella halophila* Mey. В сб.: *Пушчинская международная школа-конференция молодых ученых*, Пушкино, с. 338.
2. Сошинкова Т.Н., Радюкина Н.Л. (2010) Влияние экзогенного пролина на активность супероксиддисмутазы у растений *Thellungiella halophila* Mey. В сб.: *Всероссийский симпозиум «Растение и стресс»*, Москва, с. 337-338.
3. Сошинкова Т.Н., Королькова Д.В. (2011) Влияние пролина на антиоксидантный статус суспензионной культуры *Thellungiella salsuginea*. В сб.: *Пушчинская международная школа-конференция молодых ученых*, Пушкино, с. 412.
4. Радюкина Н.Л., Шашукова А.В., Мапелли С., Сошинкова Т.Н. (2011) Влияние экзогенных полиаминов на содержание пролина и эндогенных свободных и конъюгированных полиаминов растений шалфея в условиях окислительного стресса. *Физиология растений*, **58**, 673-680.
5. Сошинкова Т.Н., Королькова Д.В., Радюкина Н.Л., Носов А.В., Кузнецов Вл.В. (2011) Действие низкомолекулярных антиоксидантов на защитную систему суспензионной культуры клеток *Thellungiella salsuginea* в условиях окислительного стресса. В сб.: *VII Съезд Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий»*. *Материалы докладов Часть II*, Нижний Новгород, с. 659.
6. Сошинкова Т.Н., Королькова Д.В., Радюкина Н.Л. (2011) Экзогенный пролин участвует в защите растений *Thellungiella salsuginea* от окислительного стресса. В сб.:

Международная конференция молодых учёных «Леса Евразии» (тезисы докладов), Брянск, с. 269-270.

7. **Пашковский П.П., Сошинкова Т.Н., Радюкина Н.Л.** (2011) Исследование экспрессии микроРНК в каллусной линии *Thellungiella salsuginea* при стрессе. В сб.: *VIII Международная конференция «Молекулярная генетика соматических клеток»*. Звенигород, с. 45-46.

8. **Королькова Д.В., Сошинкова Т.Н.** (2012) Влияние полиаминов на компоненты антиоксидантной системы растений *Thellungiella salsuginea*. В сб.: *XIX Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов - 2012»*. Москва, с. 237.

9. **Королькова Д.В., Сошинкова Т.Н.** (2012) Влияние экзогенных полиаминов путресцинового ряда на метаболизм пролина в растениях *Thellungiella salsuginea*. В сб.: *Пушчинская международная школа-конференция молодых ученых*, Пушкино, с. 469.

10. **Королькова Д.В., Сошинкова Т.Н.** (2012) Влияние экзогенных полиаминов на антиоксидантный статус *Thellungiella salsuginea*. В сб.: *II (X) Международная Ботаническая Конференция молодых ученых*, Санкт-Петербург, с. 64-65.

11. **Сошинкова Т.Н., Королькова Д.В.** (2012) Индукция защитных систем *Thellungiella salsuginea* при окислительном стрессе. В сб.: *II (X) Международная Ботаническая Конференция молодых ученых*, Санкт-Петербург, с. 71.

12. **Сошинкова Т.Н., Радюкина Н.Л., Королькова Д.В., Носов А.В.** (2013) Пролин и функционирование антиоксидантной системы растений и культивируемых клеток *Thellungiella salsuginea* при окислительном стрессе. *Физиология растений*, **60**, 47-60.