

На правах рукописи



ШАШУКОВА Антонина Васильевна

**УЧАСТИЕ ПРОЛИНА В РЕГУЛЯЦИИ УРОВНЯ ПОЛИАМИНОВ
И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ
У РАСТЕНИЙ *SALVIA OFFICINALIS* L.
ПРИ ДЕЙСТВИИ УФ-В ОБЛУЧЕНИЯ**

03.00.12. – Физиология и биохимия растений

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2009

Работа выполнена в лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Радюкина Наталия Львовна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

Кондратьев Михаил Николаевич

доктор биологических наук, профессор

Хрянин Виктор Николаевич

Ведущая организация: Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН

Защита диссертации состоится «22» декабря 2009 г. в 13 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: (495) 977-80-18, e-mail: ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

Автореферат разослан «19» ноября 2009 г.

Учёный секретарь

совета по защите докторских
и кандидатских диссертаций,
кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Действие абиотических стрессоров вызывает снижение продуктивности культурных и уменьшение биоразнообразия дикорастущих растений. Исследование клеточных и молекулярных механизмов, позволяющих растениям адаптироваться к действию неблагоприятных факторов внешней среды, является одной из фундаментальных проблем биологии в целом и физиологии растений в частности. Формирование адаптационного ответа растительного организма на действие абиотических стрессоров происходит в результате множественных метаболических изменений (Bouchereau et al., 1999; Zhu, 2001; Kavi Kishor et al., 2005; Kuznetsov, Shevyakova, 1999; 2007). Учитывая многообразие и сложность метаболических путей, ответственных за адаптацию растений, следует ожидать, что их регуляция является координированной. Для изучения такого типа регуляции особый интерес могут представлять пути метаболизма низкомолекулярных антиоксидантов - пролина и полиаминов.

В норме гомеостаз пролина и полиаминов у растений поддерживается сбалансированной системой их биосинтеза и деградации. Чаще всего, общим предшественником в их биосинтезе является глутамат. Глутамат превращается в пролин в результате протекания двух последовательных реакций, ключевым ферментом которых является Δ^1 -пирролин-5-карбоксилатсинтетаза. В биосинтезе полиаминов глутамат служит более отдаленным предшественником, превращающимся сначала в орнитин или аргинин. Образовавшиеся аминокислоты являются прямыми субстратами двух ферментов (орнитиндекарбоксилазы или аргининдекарбоксилазы), катализирующих биосинтез путресцина (Пут) – родоначальника высокомолекулярных полиаминов (спермидина (Спд) и спермина (Спм)). Несмотря на тесную взаимосвязь путей синтеза пролина и полиаминов, вопрос о возможности координированной регуляции метаболизма этих низкомолекулярных соединений, особенно в стрессорных условиях, остается дискуссионным.

В настоящее время все исследования, касающиеся изучения взаимодействия пролина и полиаминов, сосредоточены на изучении влияния полиаминов на содержание пролина (Aziz et al., 1998; Tonon et al., 2004). Исследование участия пролина в регуляции уровня полиаминов до настоящего времени не проводилось. Наименее изучено взаимодействие двух классов метаболитов в условиях УФ-В

облучения, несмотря на то, что одним из ответов растений на УФ-В является интенсивная аккумуляция полиаминов, прежде всего Пут (Ракитин и др., 2009). Кроме того, основным повреждающим эффектом УФ-В облучения является образование активных форм кислорода (АФК), для нейтрализации которых растения используют низкомолекулярные соединения (в том числе, пролин и полиамины), а также специальные ферменты-антиоксиданты (Jenkins, 2009). В связи с тем, что пролин, полиамины и антиоксидантные ферменты являются компонентами одной антиоксидантной защитной системы, изменение внутриклеточного уровня пролина, возможно, модифицирует не только содержание и спектр полиаминов в клетке, но и функционирование антиоксидантных ферментов.

В последние годы появились сведения о том, что стресс-зависимое изменение эндогенного содержания пролина, может участвовать в регуляции активностей антиоксидантных ферментов в растениях (Ozturk, Demir, 2002; Радюкина и др., 2008). Однако эти данные носят противоречивый характер и конкретные механизмы взаимодействия пролина с антиоксидантными ферментами до сих пор не ясны.

Цель и задачи исследования. Целью данного исследования являлось выяснение участия пролина в регуляции уровня полиаминов и функционирования ферментов антиоксидантной системы *Salvia officinalis* L. при УФ-В облучении.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать влияние различных доз УФ-В облучения на растения *S. officinalis*.
2. Изучить функционирование компонентов антиоксидантной защитной системы *S. officinalis* при УФ-В облучении.
3. Изучить действие УФ-В облучения на содержание и спектр свободных и конъюгированных полиаминов.
4. Исследовать влияние экзогенного пролина на содержание полиаминов и функционирование ферментов антиоксидантной защитной системы *S. officinalis* при УФ-В облучении.

Научная новизна. Впервые показано, что пролин модифицирует процессы аккумуляции полиаминов как в оптимальных условиях выращивания растений, так и в стрессорных. Характер влияния экзогенного пролина на содержание полиаминов определяется не только его концентрацией, но и продолжительностью действия на растение, органной спецификой объекта исследования, природой и интенсивностью стрессорного воздействия, а также соотношением свободных и конъюгированных

форм полиаминов. Установлено, что пролин принимает участие в регуляции функционирования антиоксидантных ферментов при действии УФ-В облучения. Впервые показано, что пролин стабилизирует активность супероксиддисмутазы (СОД), вызывая появление дополнительных изоформ Fe-СОД и замедляя изменения в экспрессии генов, кодирующих изоформы СОД, а также снимает ингибирующий эффект УФ-В облучения на активность каталазы и ингибирует активность гваякол-зависимых пероксидаз. Впервые определены нуклеотидные последовательности центральных частей генов, кодирующих изоформы СОД в растениях шалфея, и показана их 80-93% идентичность с последовательностями генов-ортологов других видов растений.

Практическая значимость. Полученные в работе экспериментальные данные по изменению содержания пролина, полиаминов семейства Пут и активностей антиоксидантных ферментов у *S. officinalis* в условиях УФ-В облучения и при действии экзогенного пролина имеют существенное значение для понимания механизмов координированной регуляции антиоксидантов при адаптации растений к окислительному стрессу (ОС) и могут использоваться в разработке технологии создания трансгенных растений с повышенной устойчивостью к ультрафиолету. Теоретические обобщения и совокупность экспериментальных данных работы могут быть использованы в курсах лекций для студентов биологических факультетов ВУЗов.

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на 11-й Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2007); 12-й Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2008); годовом собрании общества физиологов растений России и Международной конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений» (Екатеринбург, 2008); годовом собрании общества физиологов растений России и Международной конференции «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего севера» (Апатиты, 2009).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 работ, из которых 1 статья в рецензируемом журнале.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, изложения полученных

результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Работа изложена на 155 страницах машинописного текста, включая 2 таблицы, 40 рисунков; библиография содержит 272 названия, из которых 248 на иностранном языке.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования – растения шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.) из семейства Lamiaceae; семена получены из коллекции Сибирского ботанического сада (г. Новосибирск). Шалфей лекарственный, выбранный в качестве объекта исследования, отличался низким как конститутивным, так и стресс-индуцируемым уровнем пролина, что делало сопоставимым эндогенные уровни пролина и полиаминов в клетке и, как следствие, возможным изучение влияния экзогенного пролина на уровень полиаминов в нормальных и стрессорных условиях.

Растения выращивали **в условиях водной культуры** в камере фитотрона при 12-часовом световом периоде и мощности освещения 37,6 Вт/м² люминесцентных ламп Philips (F36W/54). Температура воздуха – 23±1°C/15±1°C, относительная влажность воздуха – 55/70% день/ночь.

Условия проведения опытов. При обработке УФ-В растения переносили в камеру с ультрафиолетовыми лампами и облучали в течение 10, 20, 30 мин (дозы облучения равнялись 12,25; 24,5; 36,75 кДж/м² соответственно). Экзогенный пролин вносили в питательную среду до конечной концентрации 5 мМ одновременно с обработкой УФ-В радиацией. Пробы листьев и корней растений отбирали через 6, 12, 24, 30, 36, 48 ч после начала эксперимента, фиксировали жидким азотом и хранили при - 70°C до проведения анализов.

Содержание **малонового диальдегида (МДА)** определяли методом, описанным Heath and Packer (1968), который основан на образовании окрашенного комплекса МДА с тиобарбитуровой кислотой. Содержание **H₂O₂** определяли по методу Brennan and Frenkel (1977).

Содержание **свободного пролина** измеряли по методу Bates с соавт. (1973). **Полиамины** определяли в виде их дансильных производных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (Flores, Galston, 1982).

Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли спектрофотометрически по методу Beauchamp and Fridovich (1971). **Активность пролиндегидрогеназы**

(ПДГ) определяли спектрофотометрическим методом по изменению концентрации восстановленного НАД (Mattioni et al., 1997). Определение **активности каталазы** проводили по методу Maehly and Chance (1954). **Активность гваякол-зависимой пероксидазы** определяли по методу Ridge and Osborn (1971).

Оценку уровня экспрессии генов СОД проводили методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Тотальную РНК выделяли из растительного материала кислым фенол-хлороформом (Krapf 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% агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Обработку полученных фореграмм экспрессии генов СОД проводили с помощью программы GelPro. **Специфические праймеры для проведения ПЦР генов СОД шалфея** конструировали с помощью филогенетических дендрограмм кДНК последовательностей соответствующих генов родственных видов с использованием базы данных Национальной медицинской библиотеки (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) в среде Vector NTI 9.0.0.

Разделение **изоформ СОД** проводили при помощи нативного электрофореза фракции белков в 12%-ном ПАА-геле по методу Laemmli (1970). Для окрашивания гелевых пластин использовали методику Beauchamp and Fridovich (1971).

Эксперименты были проведены в 3-х кратной биологической повторности. Результаты обрабатывали общепринятыми методами статистики (Зайцев, 1984).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние УФ-В облучения на растения шалфея.

Влияние УФ-В облучения на рост растений шалфея. УФ-В радиация в зависимости от дозы облучения оказывала негативное влияние на рост растений или вызывала их гибель. В ходе проведенных исследований было установлено, что доза облучения $36,75 \text{ кДж/м}^2$ (30 мин) являлась летальной для растений шалфея, которые гибли на пятый день после облучения; 20-ти минутное облучение ($24,5 \text{ кДж/м}^2$) вызывало торможение роста (на 60%) и появление некрозов. Доза облучения $12,5 \text{ кДж/м}^2$ (10 мин) тормозила рост растений в меньшей степени (на 40%) и оказалась более умеренной для растений шалфея.

Развитие ОС в растениях *S. officinalis* при действии УФ-В радиации. Одним из основных повреждающих эффектов УФ-В облучения на растения является образование АФК. Развитие ОС при УФ-В радиации у растений оценивали по изменению содержания перекиси водорода – продукта свободно-радикальных реакций, и малонового диальдегида (МДА) – индикатора перекисного окисления липидов мембран.

УФ-В облучение вызывало увеличение содержания перекиси водорода в листьях больше, чем в корнях (рис. 1А). Увеличение уровня перекиси водорода могло быть связано и с известной сигнальной ролью H_2O_2 , которая наряду с другими АФК является вторичным мессенджером (Xiong, Zhu, 2002; Jenkins, 2009).

При действии УФ-В облучения повышался также уровень перекисного повреждения липидов мембран и как следствие образование МДА. В листьях уровень МДА, как и ожидалось, был существенно выше, чем в корнях, что связано с селективностью действия стресс-фактора (рис. 1Б). Облучение растений в течение 20 и 30 мин приводило к более сильному развитию ОС, о чем свидетельствовало двукратное повышение содержания МДА в листьях по сравнению с растениями, облученными в течение 10 мин.

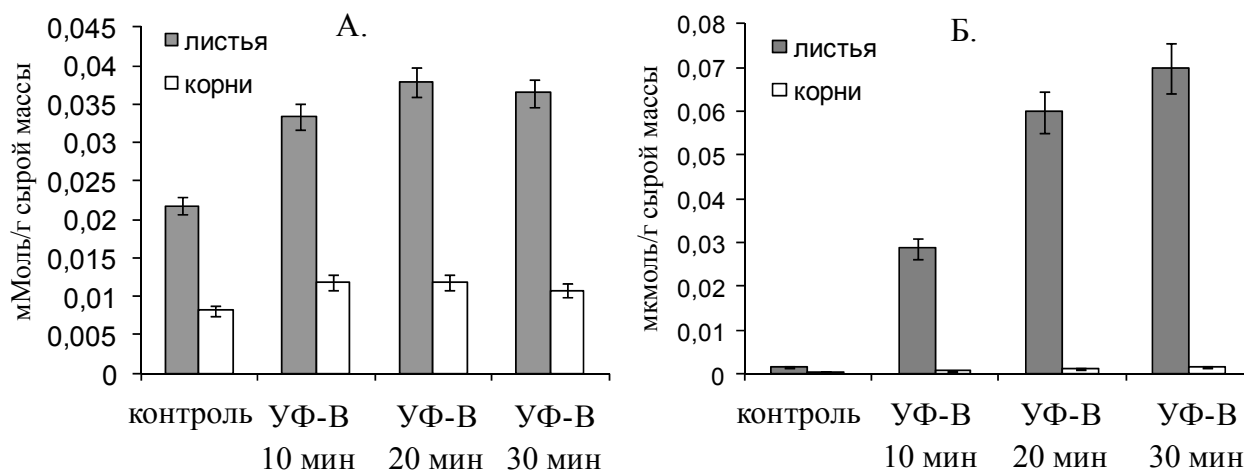


Рис. 1. Влияние различных доз УФ-В облучения на содержание перекиси водорода (А) и содержание МДА (Б).

Продemonстрировано, что УФ-В радиация вызывает развитие ОС в растении, доза облучения влияет на степень развития повреждений окислительного характера, и гиперпродукция АФК наблюдается в органах, непосредственно подверженных действию радиации.

Поскольку при 10-ти минутном облучении растения шалфея испытывали наименьшие повреждения, то для дальнейших исследований была выбрана экспозиция растений под УФ-В в течение 10 мин.

Влияние УФ-В облучения на эндогенное содержание пролина. Для нейтрализации активных радикалов растения используют высокомолекулярные ферменты и низкомолекулярные антиоксиданты, в том числе пролин и полиамины (На et al., 1998). Прежде чем исследовать взаимодействие этих метаболитов в условиях УФ-В облучения, важным представлялось изучить, как влияет УФ-В радиация на их эндогенное содержание в растениях шалфея.

Изучение содержания пролина в органах шалфея показало, что его конститутивный уровень был достаточно низким как в листьях (0,2 мкмоль/г сырой массы), так и в корнях (0,35 мкмоль/г сырой массы). УФ-В радиация вызывала увеличение уровня пролина в 2 раза через 36 ч после облучения, как в надземных, так и в подземных органах (рис. 2). Из полученных результатов следует, что внутриклеточный уровень пролина растений шалфея в стрессорных условиях не достигал максимальных концентраций, найденных у многих видов растений (Радюкина и др., 2007).

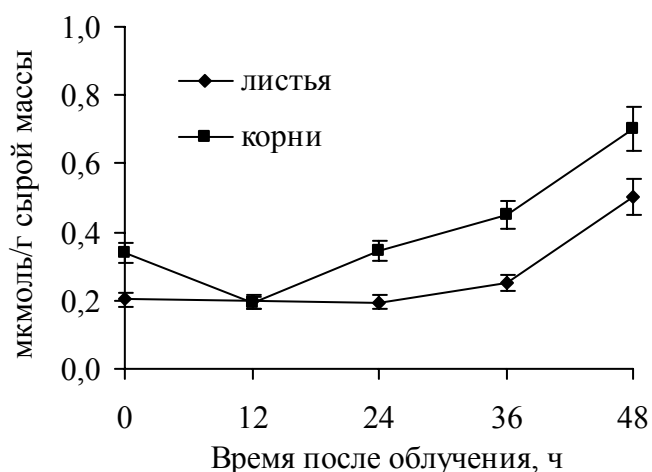
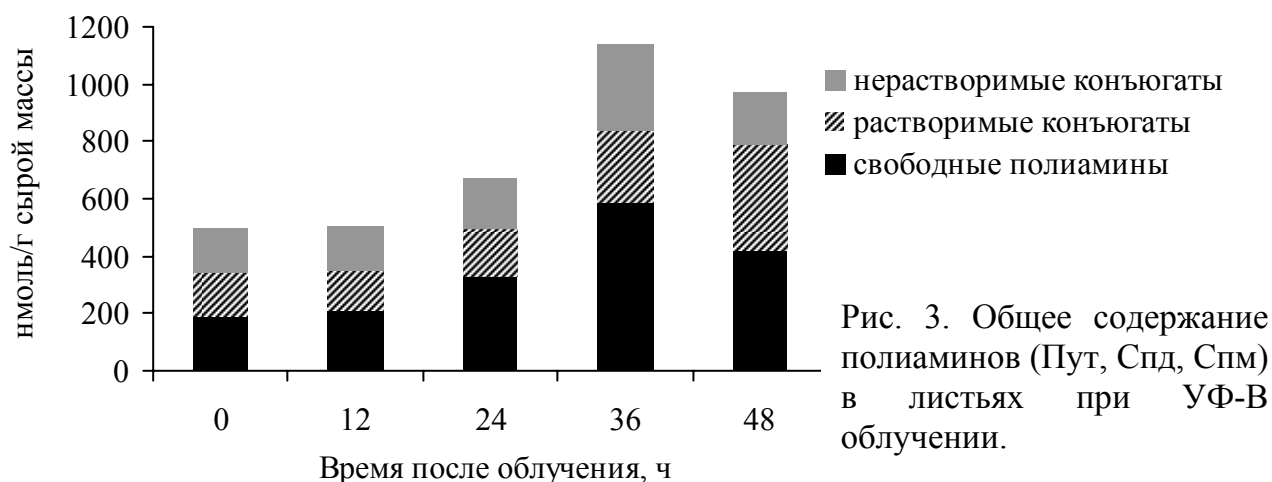
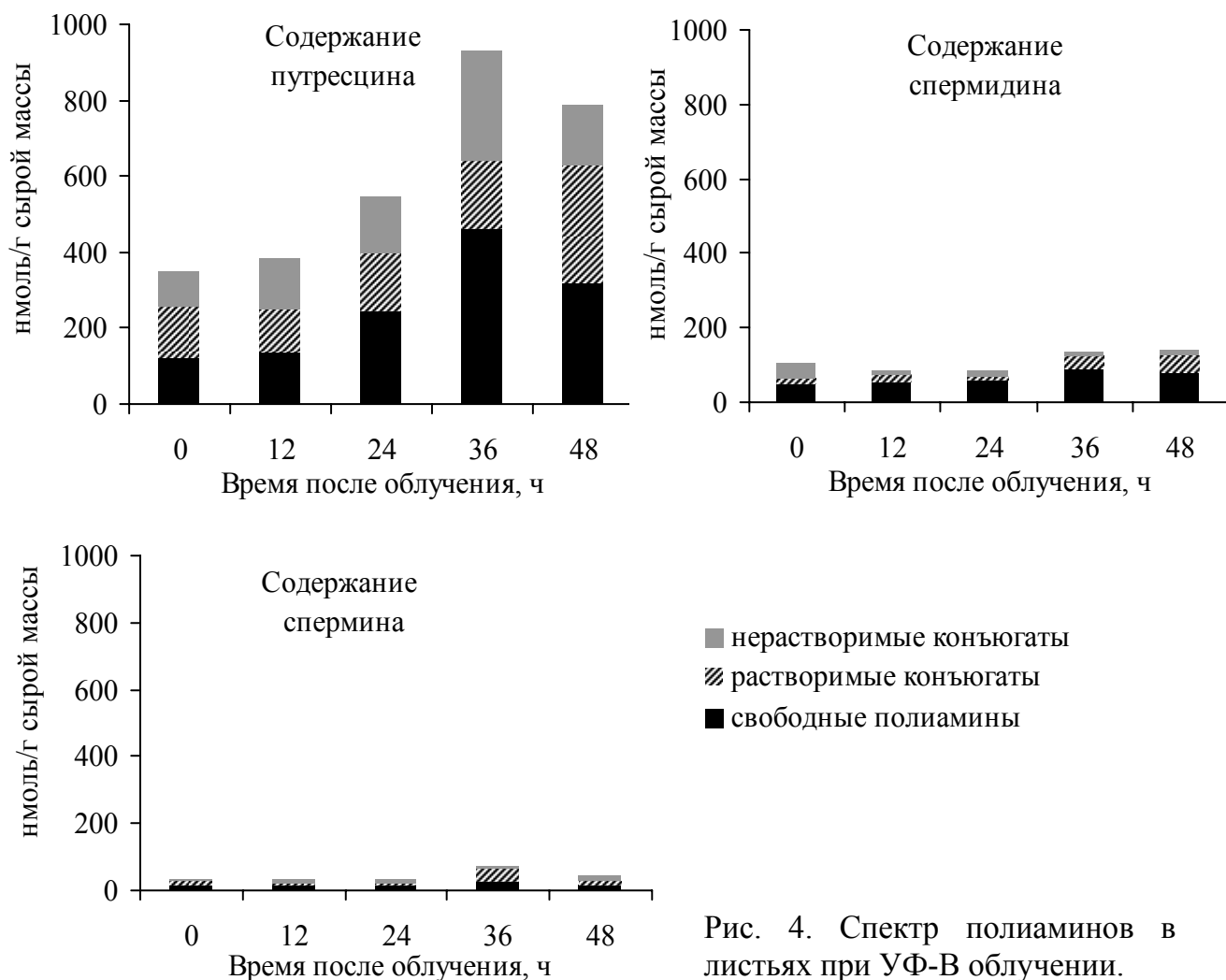


Рис. 2. Эндогенное содержание пролина в органах шалфея при УФ-В облучении.

Влияние УФ-В облучения на содержание и спектр свободных и конъюгированных полиаминов. У растений разных таксономических групп показана стресс-индуцируемая аккумуляция полиаминов в условиях УФ-В радиации (Прудникова, 2006; Иванов, 2008; Ракитин и др., 2009). В нашем исследовании в листьях общее содержание свободных полиаминов повышалось в 3 раза через сутки после облучения (рис. 3). Через 36 ч возрастала доля нерастворимых конъюгатов, а через 48 ч — доля растворимых конъюгатов.



Исследование спектра полиаминов в листьях показало, что больший вклад в изменение общего содержания полиаминов в условиях УФ-В радиации вносил Пут в свободной форме, содержание Спд и Спм практически не изменялось (рис. 4).



В корнях повышение общего содержания полиаминов наблюдалось только через 48 ч после действия облучения. Увеличение содержания полиаминов в корнях определялось, прежде всего, повышением доли растворимых конъюгатов (рис. 5).

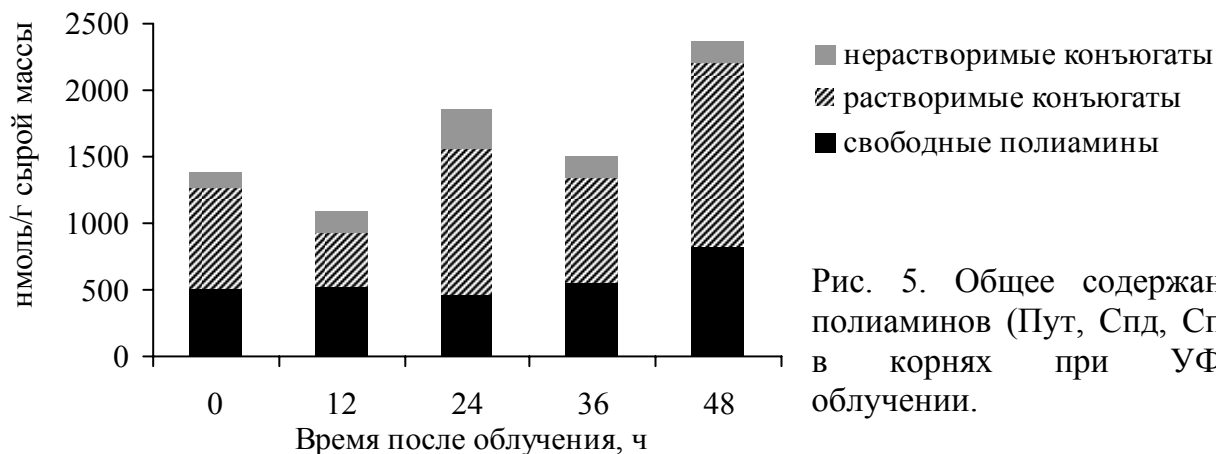


Рис. 5. Общее содержание полиаминов (Пут, Спд, Спм) в корнях при УФ-В облучении.

Основной вклад в изменение общего содержания полиаминов вносил Пут, его содержание к 48 ч возросло в 2 раза (рис. 6).

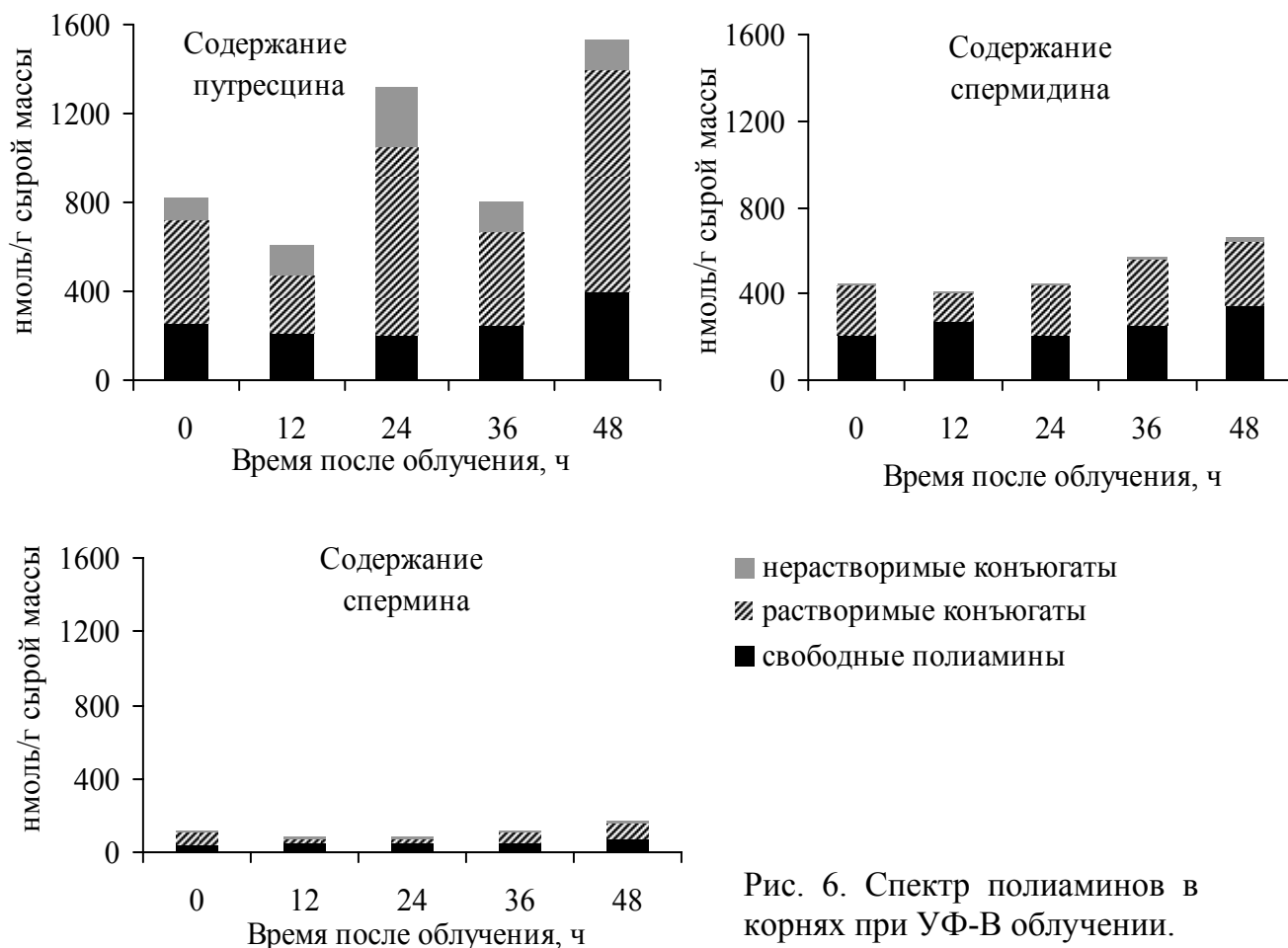


Рис. 6. Спектр полиаминов в корнях при УФ-В облучении.

В корнях содержание растворимых конъюгатов Спд и Спм незначительно возросло к 48 ч, доля Спд в корнях была больше, чем в листьях (рис. 4; 6).

Образование конъюгированных форм полиаминов в стрессовых условиях могло способствовать повышению эффективности антиоксидантной системы защиты, поскольку конъюгаты полиаминов с фенольными соединениями имеют более высокие константы связывания с активными радикалами, чем свободные полиамины (Bors et al., 1989).

Анализ полученных результатов показал, что аккумуляция полиаминов в растениях шалфея при действии УФ-В облучения является органоспецифичной. В листьях она начиналась раньше и обусловлена повышением содержания свободных полиаминов; в корнях наблюдалось более медленное повышение уровня полиаминов, которое осуществлялось преимущественно за счет фракции растворимых конъюгатов полиаминов. Основной вклад в изменения общего содержания полиаминов вносил Пут.

УФ-В облучение приводило к повышению содержания низкомолекулярных антиоксидантов: пролина и полиаминов, но изменения в содержании и спектре полиаминов предшествовали аккумуляции пролина, которая была незначительной.

Влияние экзогенного пролина на содержание и спектр полиаминов и функционирование антиоксидантных ферментов в нормальных условиях и при УФ-В облучении.

Влияние экзогенного пролина и совместного действия УФ-В облучения и экзогенного пролина на эндогенное содержание пролина. Для проверки предположения об участии пролина в регуляции уровня полиаминов в условиях УФ-В радиации экзогенный пролин добавляли в питательную среду, что приводило к изменению его эндогенного уровня в растениях шалфея. При добавлении пролина (5 мМ), его эндогенное содержание в корнях достигло 9 мкмоль/г сырой биомассы через 12 ч после начала эксперимента, что почти в 30 раз превышало его конститутивный уровень (рис. 7). Через 36 ч экспозиции растений на среде с экзогенным пролином наблюдалось падение его эндогенного уровня в корнях (рис. 7), что могло быть следствием увеличения активности ПДГ, ключевого фермента, регулирующего уровень пролина. Активность ПДГ в листьях не обнаружена. В ответ на добавление экзогенного пролина в культуральную среду его эндогенный уровень в листьях

кратковременно возрастал, достигая 10-кратного превышения контрольных значений через 24 ч экспозиции (рис. 7).

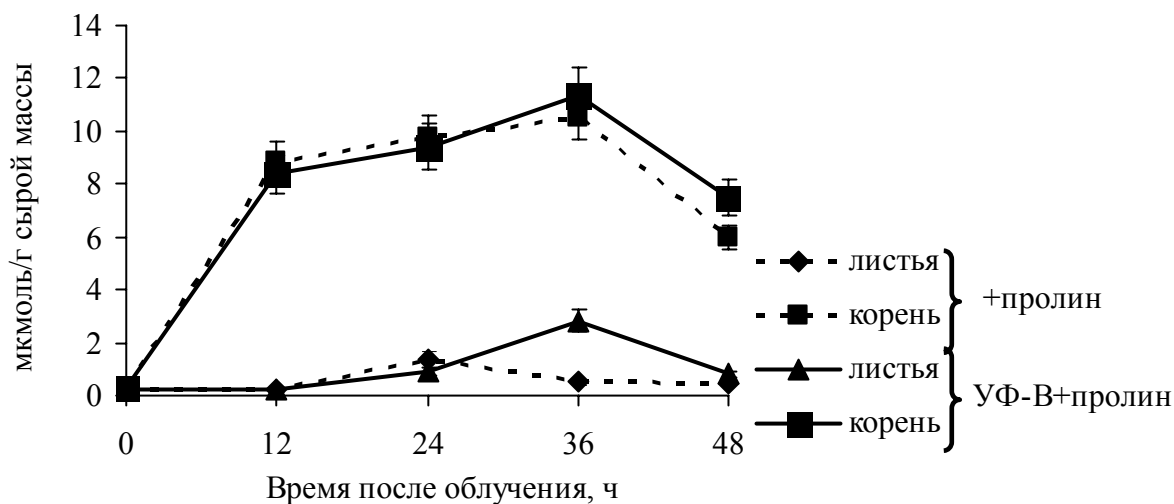


Рис. 7. Содержание эндогенного пролина при добавлении экзогенного пролина (пунктир) и при совместном действии УФ-В облучения и пролина (сплошные линии).

Кратковременное облучение растений УФ-В на фоне экзогенного пролина не влияло на поглощение его корнями из питательной среды, но инициировало интенсивную транзиторную аккумуляцию пролина в листьях после 24 ч и несколько увеличивало активность ПДГ в корнях в конце эксперимента, что сопровождалось снижением в них внутриклеточной концентрации пролина (рис. 7).

Влияние экзогенного пролина на эндогенное содержание полиаминов в необлученных растениях. Внесение экзогенного пролина в среду могло повлиять на содержание и спектр полиаминов в отсутствие УФ-В облучения. Было установлено, что поступление пролина из питательной среды в растение не приводило к изменению содержания свободного Пут, Спд и Спм в листьях необлученных растений. Содержание конъюгатов полиаминов в листьях при искусственном увеличении содержания пролина не изменялось. Возможно, в отсутствие стресса эндогенный уровень полиаминов у шалфея вполне достаточен для осуществления их регуляторных функций в клетках и не индуцируется при обработке экзогенным пролином.

В корнях в отличие от листьев поступление пролина из питательной среды вызвало резкое транзиторное увеличение свободного Пут в 4,5 раза (1088 нмоль/г сырой массы) через 24 ч после облучения, с последующим снижением его содержания. Изменения в содержании свободных Спд и Спм отмечены не были.

Экзогенный пролин ингибировал накопление конъюгированных форм всех исследованных видов полиаминов в корнях.

Полученные данные свидетельствуют не только об усилении синтеза Пут в ответ на необычно высокую для растений шалфея концентрацию пролина в корнях, но и указывают на прооксидантную роль экзогенного пролина. Прооксидантные свойства пролина в данных исследованиях можно объяснить его спонтанной окислительной деградацией, прежде всего, в апопласте корня с образованием АФК, индуцирующих активность СОД, а затем при поступлении пролина в митохондрии его деградацию катализировала ПДГ, локализованная в этой органелле. Повышение в корнях окислительного статуса индуцировало биосинтез Пут, который мог выполнять антиоксидантную функцию (Ye et al., 1997).

Совместное влияние экзогенного пролина и УФ-В облучения на эндогенное содержание полиаминов. Установлено, что при совместном действии облучения УФ-В и экзогенного пролина в листьях накопление свободных полиаминов к 48 ч было значительно усилено по сравнению только с УФ-В (рис. 8).



Рис. 8. Общее содержание разных форм полиаминов в листьях шалфея при добавлении экзогенного пролина в условиях УФ-В облучения по сравнению с действием только УФ-В облучения.

При этом увеличилось также содержание растворимых конъюгатов и не изменилось содержание нерастворимых конъюгатов (рис. 8).

По сравнению с действием экзогенного пролина на необлученные растения, где изменения в уровне полиаминов не наблюдались, совместное действие пролина на фоне УФ-В сопровождалось увеличением содержания всех трех полиаминов, но, в основном, определялось увеличением содержания Пут.

В корнях экзогенный пролин на фоне облучения растений УФ-В дополнительно стимулировал образование свободных полиаминов и растворимых конъюгатов (рис. 9). Уровень свободных полиаминов повышался через 24 ч, растворимых конъюгатов - через 12 ч. Основной вклад в накопление всех форм полиаминов вносил также Пут, но его содержание увеличилось в меньшей степени, чем только при добавлении экзогенного пролина, что может свидетельствовать об использовании Пут в процессе репарации растений после УФ-В облучения. Содержание конъюгатов полиаминов после 24 ч снижалось, что, возможно, связано с их расходом на "тушение" АФК (рис. 9).

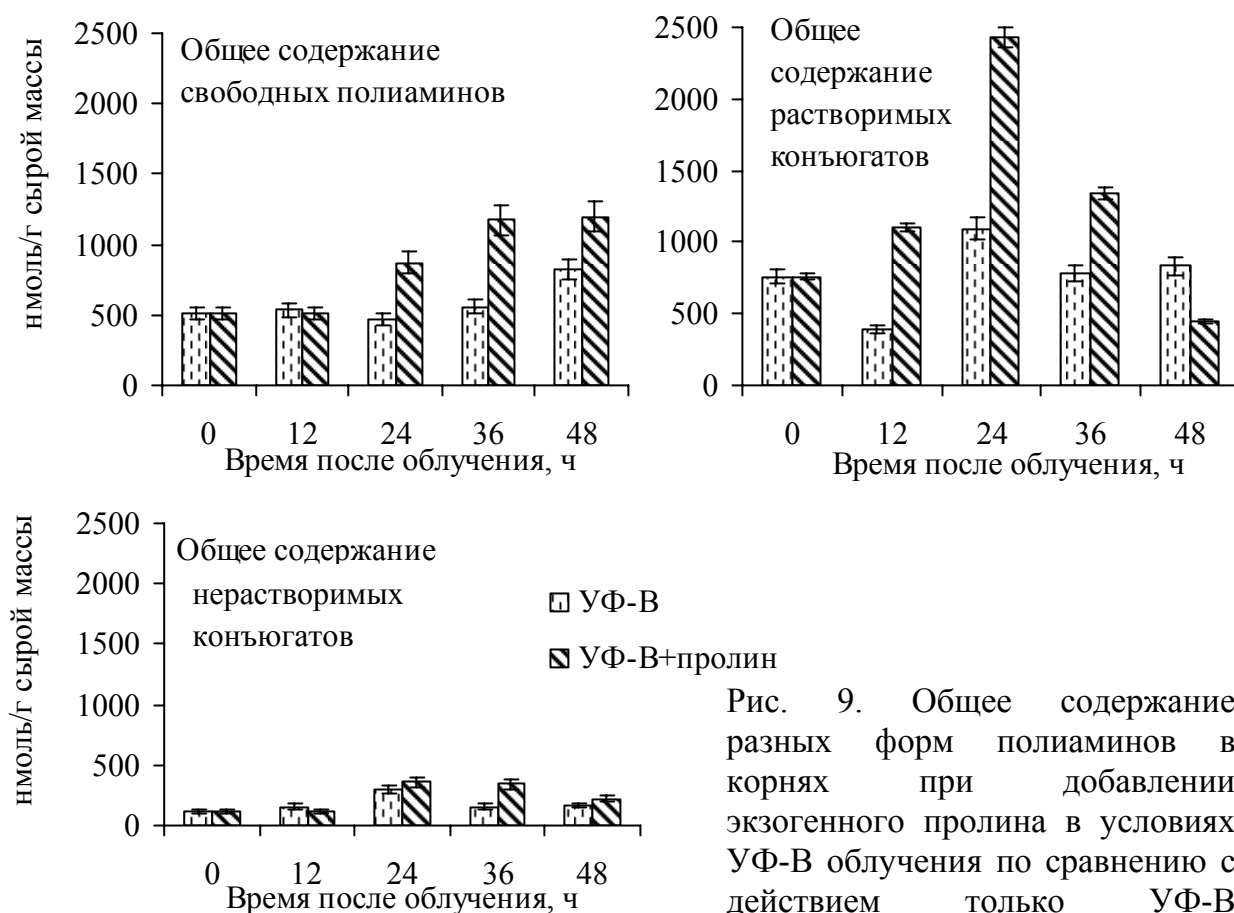


Рис. 9. Общее содержание разных форм полиаминов в корнях при добавлении экзогенного пролина в условиях УФ-В облучения по сравнению с действием только УФ-В облучения.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что в листьях без облучения экзогенный пролин не вызывал изменений в содержании полиаминов. При облучении экзогенный пролин дополнительно стимулировал синтез полиаминов в условиях действия стресс-фактора, увеличивая содержание свободных полиаминов в 2 раза. Это косвенно могло свидетельствовать о том, что метаболические пути биосинтеза пролина и полиаминов строго координируются, и пересечения этих путей могут быть связаны с изменением окислительного статуса и только тогда, когда повреждающее действие стрессора является достаточно сильным.

Стимуляция синтеза полиаминов могла происходить за счет вовлечения пролина в орнитинный цикл митохондрий и активации биосинтеза Пут через орнитиндекарбоксилазный путь при деградации экзогенного пролина до глутамата. Однако, в корнях, где накопление пролина было наиболее выражено, экзогенный пролин мог выступать как прооксидант и уже без облучения индуцировал синтез полиаминов. Доказательством прооксидантной роли избыточного накопления в корнях пролина могут служить изменения в активности СОД.

Влияние экзогенного пролина, совместного действия УФ-В облучения и экзогенного пролина на активность СОД. Ключевым ферментом антиоксидантной защиты является СОД. При исследовании стресс-зависимой стимуляции активности СОД в условиях действия только УФ-В облучения было показано, что в листьях активность фермента снижалась в первые сутки после облучения, а затем возрастала после 36 ч и превысила контрольный уровень в 2 раза (рис. 10А). Снижение активности фермента в первые сутки после облучения УФ-В могло объясняться инактивацией фермента в стрессорных условиях. Активность СОД в листьях незначительно изменялась в течение экспозиции растений, как в присутствии, так и в отсутствие в среде пролина (рис. 10А). Совместное действие УФ-В и пролина привело к тому, что активность фермента стабилизировалась на постоянном уровне, и снижение активности фермента (следовательно, и инактивации) отмечено не было. Полученные результаты подтверждают, что пролин способен оказывать протекторное действие на макромолекулы в условиях стресса (Ozturk, Demir, 2002). В корнях, которые в отличие от листьев испытывали опосредованное действие УФ-В стресса, транзиторная вспышка активности СОД наблюдалась уже через 12 ч, затем активность фермента, хотя и снижалась через 24 ч после облучения, но оставалась на гораздо более высоком уровне, чем в листьях в тех же условиях (рис. 10Б).

На среде с экзогенным пролином без воздействия облучения в корнях максимум активности СОД появлялся позже (через 36 ч экспозиции растений) (рис. 10Б), по сравнению с действием только облучения. В корнях растений, подвергавшихся облучению, накопление экзогенного пролина снимало ярко выраженный транзиторный характер повышения активности СОД, наблюдаемый в условиях действия только УФ-В, т.е. аккумуляция пролина способствовала стабилизации высокой активности СОД более длительное время. Увеличение активности СОД в корнях, которые не подвергались облучению, свидетельствует о возможной трансдукции стрессового сигнала из облученных листьев в корни, что так же было показано в опытах с действием УФ-В на растения кукурузы (Casati, Walbot, 2004) и арабидопсиса (Kilian et al., 2007).

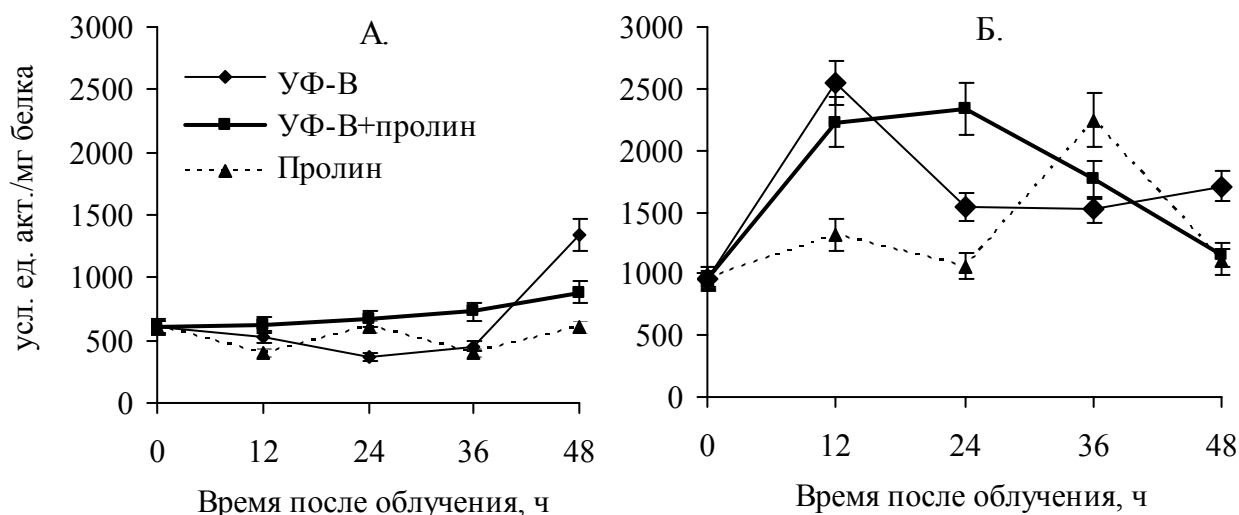


Рис. 10. Влияние УФ-В облучения, экзогенного пролина и их совместного действия на активность СОД в листьях (А) и в корнях (Б).

Поскольку в растениях присутствуют несколько изоформ СОД, вносящих различный вклад в общую активность фермента, было важно исследовать изоферментный состав СОД в листьях шалфея и оценить вклад каждой изоформы в общую активность фермента при действии УФ-В облучения. Кроме того, для установления механизма стабилизирующего влияния пролина на общую активность СОД необходимо было выяснить, как пролин влияет на активность разных изоформ фермента. Поскольку изоформы СОД отличаются разной устойчивостью к ингибиторам, определение типа изоформ было проведено с помощью ингибиторного анализа, который показал, что в растениях шалфея лекарственного содержатся три типа изоформ СОД (рис. 11А).

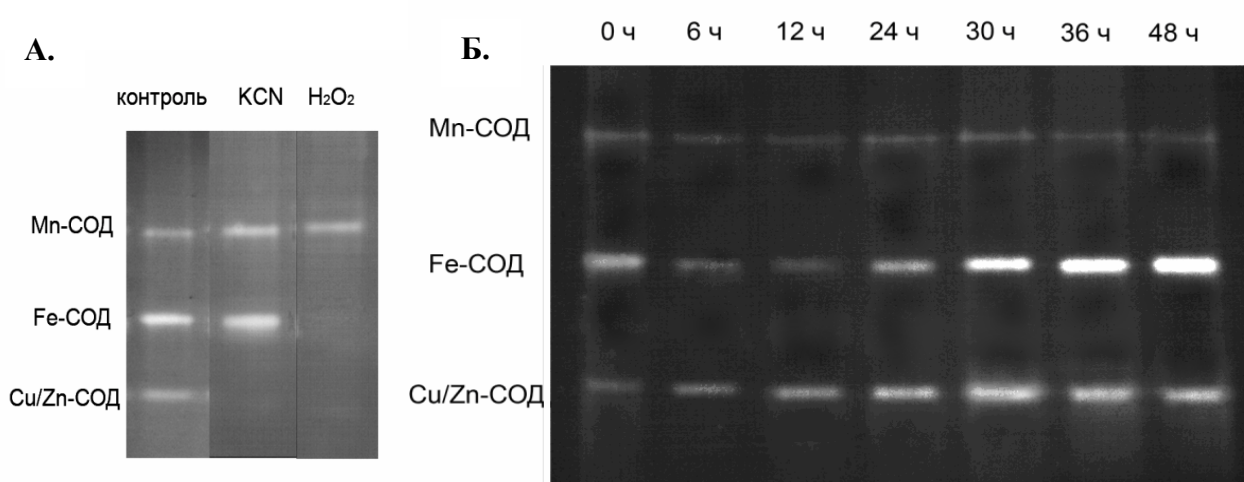


Рис. 11. Ингибиторный анализ изоферментного спектра СОД шалфея (А) и изменение активностей изоферм СОД в условиях УФ-В радиации (Б).

В листьях растений шалфея за первые 12 ч после облучения активность Fe – СОД снижалась, а ее стресс - индуцируемое повышение начиналось только через 24-30 ч после облучения (рис. 11Б). Повышалась активность Cu/Zn-СОД, активность Mn-СОД не изменялась. Результаты, полученные с помощью нативного электрофореза (рис. 11Б), позволяют предположить, что в облученных УФ-В растениях в повышение активности СОД после 36 ч (рис. 10А) вносят наибольший вклад Fe- и Cu/Zn-СОД, которые присутствуют в цитозоле и пластидах. В митохондриях, где локализуется Mn-СОД, развитие ОС, вызванного УФ-В облучением, происходит либо в незначительной степени, либо основная роль в детоксикации супероксидрадикала принадлежит Cu/Zn изоформе (Kliebenstein et al., 1998).

При совместном действии УФ-В и экзогенного пролина установлено, что активность Mn-СОД не изменялась, активность Cu/Zn-СОД также оставалась на постоянном уровне (рис. 12).

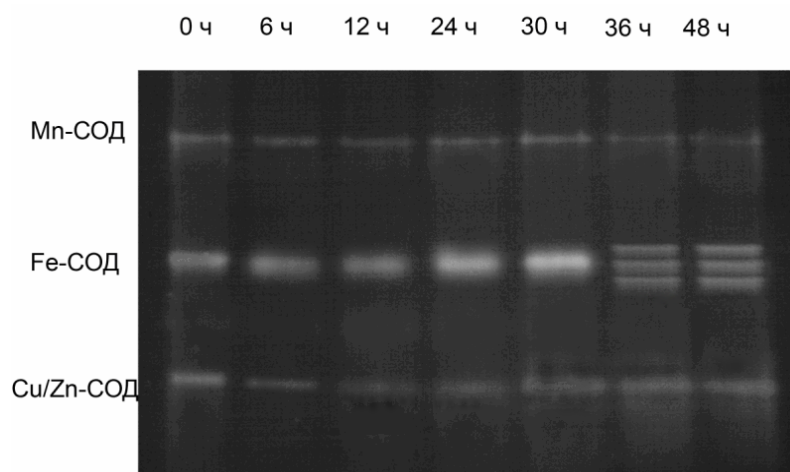


Рис. 12. Влияние совместного действия УФ-В облучения и экзогенного пролина на изоферментный спектр СОД шалфея.

Экзогенный пролин предотвращал снижение активности Fe-СОД в первые сутки после облучения и приводил к появлению дополнительных изоформ Fe-СОД. Таким образом, в стресс-индуцируемое повышение общей активности СОД наибольший вклад вносила Fe-СОД.

В связи с наблюдаемой дифференциальной стресс-зависимой индукцией активностей изоформ СОД в условиях УФ-В было важным установить, являлась ли такая индукция посттранскрипционной или затрагивала транскрипционный уровень. Необходимо было также выяснить, проявилось ли влияние экзогенного пролина на изоформы СОД на транскрипционном уровне.

Поскольку нуклеотидные последовательности генов изоформ СОД у шалфея неизвестны, необходимо было их определить. Полученные нуклеотидные последовательности продуктов ПЦР имели высокий процент сходства с последовательностями генов-ортологов: для *CSD* (ген, кодирующий Cu/Zn-СОД) 93,1%; для *MSD* (ген, кодирующий Mn-СОД) – 86,2%; для *FSD* (ген, кодирующий Fe-СОД) – 81,4%.

Исследование экспрессии генов изоформ СОД показало, что в листьях растений, облученных УФ-В, уровень транскриптов генов *CSD* и *MSD* заметно повышался через 6-12 ч после облучения, при этом уровень транскриптов генов *FSD* не изменялся (рис. 13А). Наибольшие изменения в уровне экспрессии, вызванные УФ-В облучением, наблюдались для гена *CSD*, кодирующего Cu/Zn – СОД.

В корнях, испытывавших опосредованное действие облучения, количество мРНК исследуемых генов СОД было гораздо меньше, чем в листьях. В первые часы после облучения повышалось количество транскриптов *CSD*, затем наблюдалось повышение количества матриц *MSD* с последующим снижением до контрольного значения. Пик повышения количества транскриптов *FSD* наблюдался через 30 ч после облучения (рис. 13А).

Согласно данным по изменению активности исследованных изоформ СОД в условиях радиации (рис. 11Б) и результатам, полученным в ходе исследования экспрессии генов СОД (рис. 13А), следует, что регуляция активности Mn – СОД осуществлялась на транскрипционном (повышение уровня экспрессии гена через 6 ч после облучения), и на посттранскрипционном уровнях, т.е. высокий уровень экспрессии гена не определял уровень активности этой изоформы. Несмотря на низкий уровень экспрессии гена *FSD*, активность изоформы повышалась очень

сильно в условиях УФ-В радиации (рис. 11Б). Скорее всего, регуляция активности Fe-СОД происходила на посттранскрипционном уровне. Повышение уровня экспрессии гена *CSD* коррелирует с повышением активности данной изоформы, что свидетельствует о транскрипционном уровне регуляция активности Cu/Zn- изоформы СОД. Причем уровень экспрессии гена данной изоформы изменялся под воздействием УФ-В облучения в наибольшей степени по сравнению с другими генами СОД.

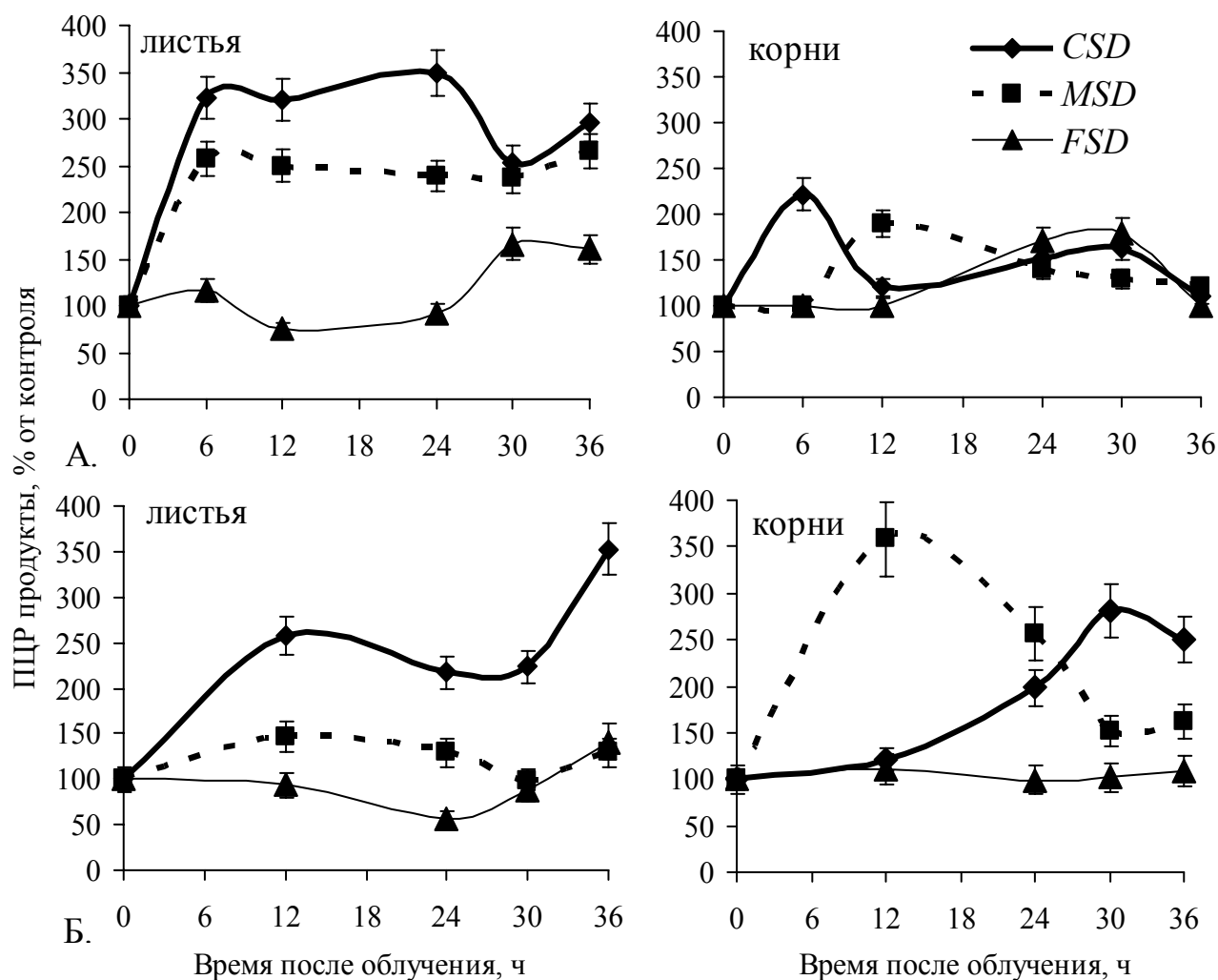


Рис. 13. Влияние УФ-В облучения (А) и совместного действия экзогенного пролина и УФ-В облучения (Б) на экспрессию генов изоформ СОД.

Исследование экспрессии генов трех типов изоформ СОД при совместном действии УФ-В и экзогенного пролина показало, что количество транскриптов *MSD* в процессе эксперимента в листьях не изменялось (рис. 13Б), как не изменялась и активность Mn-СОД (рис. 12). Было установлено, что экзогенный пролин в листьях

снимает стимулирующее действие УФ-В радиации на уровень экспрессии гена *MSD*. В корнях экзогенный пролин, напротив, особенно сильно влиял на интенсивность транскрипции гена, кодирующего Mn-SOD, которая, как известно, локализована в митохондриях. Возможно, в данном случае местом восприятия негативного сигнала при высокой концентрации пролина в корнях оказалась именно электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) митохондрий, которая могла нарушаться из-за активной дегградации экзогенного пролина до Δ^1 -пирролин-5-карбоксилата, проявляющего в высокой концентрации токсичные свойства (Verbruggen, Hermans, 2008). Изменения в количестве транскриптов в корнях *FSD* не наблюдались, в листьях уровень экспрессии этого гена незначительно возрастал после 24 ч, что возможно обеспечило увеличение активности данной изоформы при стрессе. Количество матриц *CSD* возрастало в листьях уже в первые часы эксперимента, но в меньшей степени, чем только при УФ-В облучении, в корнях – после 12 ч, и сохранялось на достаточно высоком уровне до конца экспозиции (рис. 13Б).

Обнаружено, что пролин, изменяя активность изоформ СОД, в первую очередь влияет на уровень экспрессии генов СОД. Повышение количества матриц наблюдалось позже и в меньшей степени, чем только в условиях облучения, что косвенно свидетельствует о снятии пролином негативного действия радиации на листья. В корнях экзогенный пролин нарушал ЭТЦ митохондрий, индуцируя транскрипцию *MSD*. В опыте с облучением УФ-В и при совместном действии УФ-В и экзогенного пролина наибольший уровень экспрессии наблюдался для гена *CSD*.

Влияние экзогенного пролина, совместного действия УФ-В облучения и экзогенного пролина на активность пероксидазы и каталазы. После обнаруженного эффекта пролина на активность СОД, важно было понять, являлся ли данный эффект специфичным для СОД, или пролин взаимодействует и с другими ферментами-антиоксидантами. В результате реакции дисмутации, катализируемой СОД, образуется пероксид водорода. Самыми распространенными ферментами, регулирующими уровень внутриклеточного содержания перекиси водорода, являются пероксидазы и каталаза. Облучение УФ-В приводило к повышению активности пероксидазы в листьях и в корнях (рис. 14А). Добавление экзогенного пролина в среду привело к снижению активности данного фермента в листьях. Совместное действие пролина и УФ-В активировало пероксидазу в меньшей степени, чем только облучение.

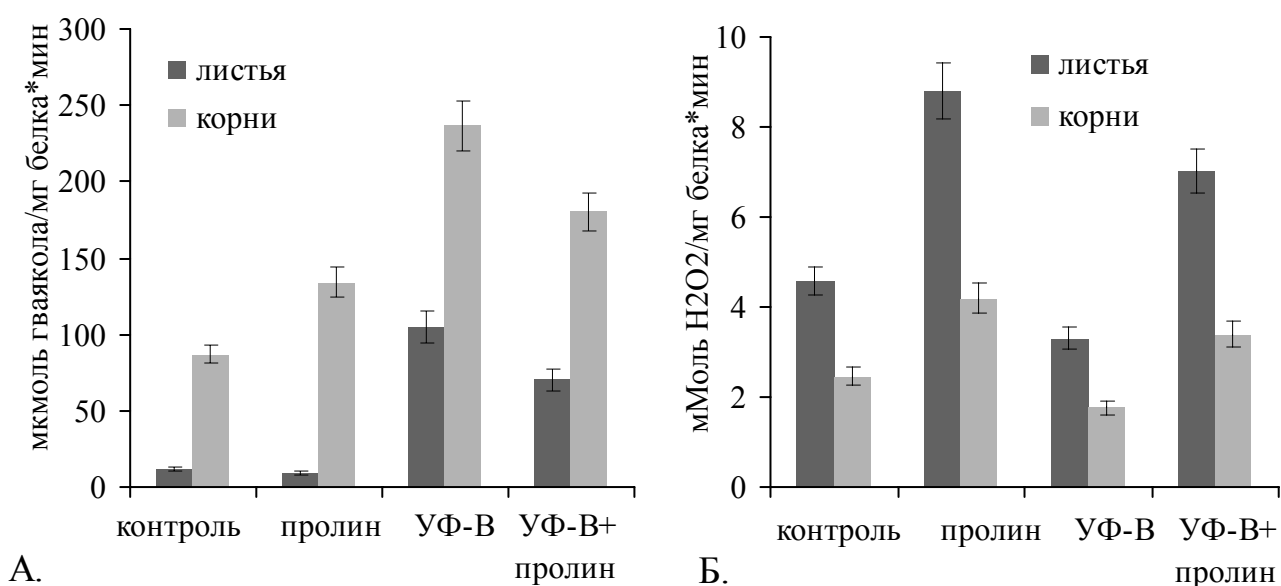


Рис. 14. Влияние экзогенного пролина, УФ-В облучения и их совместного действия на активность пероксидазы (А) и каталазы (Б).

Исследование активности каталазы показало, что УФ-радиация снижала активность фермента (рис. 14Б). Действие экзогенного пролина приводило к увеличению активности каталазы. Облучение растений на фоне экзогенного пролина вызвало увеличение активности каталазы, что еще раз доказывает влияние пролина на активность антиоксидантных ферментов. Способность пролина активировать или ингибировать ферменты связывают с его влиянием и на конформационные изменения белков (Rajendrakumar et al., 1994).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в работе результаты по воздействию УФ-В облучения, экзогенного пролина и их совместного действия на растения шалфея (*Salvia officinalis* L.), позволили подтвердить гипотезу о существовании координированной регуляции метаболических путей при формировании адаптационного ответа. Было показано, что повышение содержания пролина в нормальных и стрессорных условиях вызвало усиление синтеза Пут, а также изменяло функционирование ферментов-антиоксидантов.

При проведении исследований в выше указанном направлении мы исходили из существующих представлений о том, что общим и начальным повреждающим компонентом стрессоров различной природы, в том числе и УФ-В радиации, является

развитие ОС (Asada, 1994; Matysik et al., 2002). Было показано, что в листьях при действии УФ-В облучения, как содержание перекиси водорода, так и интенсивность повреждения мембран повышались в большей степени, чем в корнях, которые испытывали действие облучения опосредованно. При этом накопление защитных метаболитов (пролина и полиаминов), которое было зафиксировано в листьях и корнях, резко различалось как по абсолютным значениям, так и по времени: повышение содержания полиаминов начиналось раньше, чем пролина и значительно превышало его количественно. Более того, уровень пролина в листьях и корнях шалфея не достигал тех максимальных значений, которые характерны для действия других стрессоров у большинства растений (Радюкина и др., 2007; Шевякова и др., 2009). Особый интерес представлял тот факт, что УФ-индуцированная аккумуляция полиаминов распространялась только на Пут, как в свободной, так и в конъюгированной форме.

Экзогенный пролин в листьях без облучения не вызывал изменений в содержании полиаминов. В то же время при облучении экзогенный пролин дополнительно стимулировал накопление полиаминов (Пут), увеличивая их содержание в 2 раза по сравнению с действием только УФ-В радиации. Полученные данные могут указывать на то, что накопление пролина и Пут в листьях в стрессорных условиях (в данном случае в присутствии повышенной УФ-В радиации) синергически действуют как антиоксиданты. Известно, что полиамины особенно в конъюгированной форме служат “ловушками“ АФК (Bors et al., 1989; Ha et al., 1998; Kuznetsov, Shevyakova, 2007). Возможно, антиоксидантные свойства пролина проявляются в дополнительной активации биосинтеза полиаминов.

Важным результатом исследований являются впервые установленные факты о том, что роль экзогенного пролина при действии УФ-В стресса проявлялась органоспецифично: в листьях как антиоксиданта, а в корнях как прооксиданта, что, возможно, зависело от значительного превышения его допустимой концентрации, специфичной для каждого вида растений, его адаптивных возможностей, длительности воздействия стрессора и развития адаптационного процесса.

Установлено также, что экзогенный пролин участвует в регуляции функционирования антиоксидантных ферментов, стабилизируя активность СОД, вызывая появление дополнительных изоформ Fe-СОД и изменяя экспрессию генов

СОД. Пролин ингибировал активность гваякол-зависимой пероксидазы и снимал ингибирующий эффект УФ-В облучения на активность каталазы.

Таким образом, совокупность представленных данных однозначно свидетельствует о том, что пролин модифицирует процессы аккумуляции полиаминов как в оптимальных условиях выращивания растений, так и в стрессорных. Пролин принимает участие в функционировании антиоксидантных ферментов при действии УФ-В облучения. Проявление им антиоксидантных и прооксидантных свойств зависит от его внутриклеточной концентрации, действия стрессора и стадии адаптационного процесса.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что окислительный стресс, развивающийся при УФ-В облучении, приводит к стимуляции антиоксидантной защитной системы, которая проявляется в повышении активности СОД и гваякол-зависимых пероксидаз, а также уровня внутриклеточного пролина и полиаминов.
2. Показано, что в растениях шалфея функционируют три типа изоформ одного из ключевых антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы: Mn-, Fe-, Cu/Zn-содержащие СОД. При этом установлено, что наибольший вклад в общую (конститутивную и стресс-индуцируемую) активность СОД вносит Fe-содержащая изоформа фермента.
3. Проведена оценка уровня экспрессии генов трех изоформ СОД на уровне индивидуальных мРНК с помощью метода ОТ-ПЦР в растениях шалфея при УФ-стрессе. Сравнительный анализ динамики уровней мРНК и активностей различных изоформ СОД позволил высказать предположение, что регуляция активности Cu/Zn- изоформы СОД при УФ-В облучении преимущественно происходила на транскрипционном уровне; Fe-СОД – на посттранскрипционном; Mn-СОД как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровнях.
4. Продемонстрировано, что экзогенный пролин участвует в регуляции функционирования антиоксидантных ферментов, стабилизируя активность СОД, вызывая появление дополнительных изоформ Fe-СОД и замедляя изменения в экспрессии генов СОД. Кроме того, пролин снимал ингибирующий эффект УФ-В облучения на активность каталазы и ингибировал активность гваякол-

зависимой пероксидазы. Показано, что экзогенный пролин увеличивал содержание путресцина в листьях и в корнях растений шалфея при УФ-В облучении.

5. Установлено, что аккумуляция полиаминов в растениях шалфея при действии УФ-В облучения является органоспецифичной. При этом в листьях стресс-зависимая аккумуляция полиаминов начинается раньше, и она обусловлена повышением содержания свободных полиаминов, тогда как в корнях наблюдается более медленное повышение уровня полиаминов, которое осуществляется преимущественно за счет фракции растворимых конъюгатов полиаминов.
6. Установлено, что экзогенный пролин способен проявлять не только антиоксидантные, но и прооксидантные свойства. Проявление биологического эффекта пролина в нормальных условиях и при стрессе зависело от его внутриклеточной концентрации. Показано, что 30-кратное превышение уровня эндогенного пролина в корнях шалфея вызвало окислительный стресс, что проявилось в повышении содержания перекиси водорода, интенсивности перекисного окисления липидов и активности СОД.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. **Шашукова А.В.,** Бакулина Е.А., Радюкина Н.Л., Кузнецов Вл.В. (2007) Исследование защитных систем у *Mesembryanthemum crystallinum* в ответ на действие NaCl и УФ-В // **БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА:** 11-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Сб. тезисов. (Пушино, 29 октября -2 ноября 2007 г.), Пушино, 2007. – С. 165-166.
2. **Шашукова А.В.,** Радюкина Н.Л., Кузнецов Вл.В. (2008) Сравнительное изучение антиоксидантных защитных систем *Salvia officinalis* L. при действии УФ-В и NaCl // **Материалы Международной конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений»** (Екатеринбург, 06-11 октября 2008 г.), Екатеринбург, 2008. – С. 434 – 435.
3. **Шашукова А.В.,** Радюкина Н.Л. (2008) Исследование состояния антиоксидантной системы *Salvia officinalis* L. под действием параквата // **БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА:** 12-я Международная Пущинская школа-

конференция молодых ученых. Сб. тезисов. (Пушино, 10 - 14 ноября 2008 г.), Пушино, 2008. – С. 115.

4. **Шашукова А.В.** (2008) Влияние экзогенного пролина на функционирование антиоксидантной защитной системы *Salvia officinalis* L. при действии параквата // **БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 12-я Международная Пуштинская школа-конференция молодых ученых. Сб. тезисов.** (Пушино, 10 - 14 ноября 2008г.), Пушино, 2008. – С. 115 - 116.
5. Радюкина Н.Л., **Шашукова А.В.**, Шевякова Н.И., Кузнецов Вл.В. (2008) Участие пролина в системе антиоксидантной защиты у шалфея при действии NaCl и параквата. *Физиология растений*, **55**, 721 -730.
6. **Shashukova A.**, Raduykina N., Mapelli S., Kuznetsov Vl.V. (2009) Influence of exogenous proline on polyamine content in common sage under UV-B irradiation // International Conference: Plant Abiotic Stress Tolerance. Programme and Abstracts. 8 -11 February, 2009. Vienna, Austria. P. 265.
7. **Шашукова А.В.**, Радюкина Н.Л., Макарова С.С. (2009) Пролин и полиамины у растений *Salvia officinalis* L. при действии УФ-В // **Материалы Международной конференции «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего севера»** (Апатиты, 07 – 11 июня 2009 г.), Апатиты, 2009. – С. 359 – 361.