

*На правах рукописи*



**Королькова Диана Валерьевна**

**ВЛИЯНИЕ СПЕРМИНА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ  
АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ *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, Москва.

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук

**Радюкина Наталия Львовна**

**Официальные оппоненты:**

**Тараканов Иван Германович**, доктор биологических наук, профессор, Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, кафедра физиологии растений, заведующий кафедрой

**Живухина Елена Александровна**, кандидат биологических наук, доцент, Московский педагогический государственный университет, биолого – химический факультет, доцент кафедры ботаники

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет

Защита диссертации состоится «26» декабря 2013 года в 13:00 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](http://www.ippras.ru), электронная почта: [m-azarkovich@ippras.ru](mailto:m-azarkovich@ippras.ru), [ifr@ippras.ru](mailto: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 «22» ноября 2013г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Жизнь растений – это чётко организованная, генетически запрограммированная и регулируемая система взаимосвязанных превращений органических веществ и связанной в них потенциальной энергии (Ничипорович, 1972). Вместе с тем, в природных условиях растения постоянно подвергаются действию неблагоприятных факторов окружающей среды, что приводит к нарушению равновесия между различными метаболическими реакциями, протекающими в клетке.

Общим признаком действия стрессоров является усиление генерации активных форм кислорода (АФК), приводящее к развитию окислительного стресса (ОС) (Mittler, 2002; Foyer, Noctor, 2005). В процессе эволюции в растениях развивалась сложная система строго координированных реакций, контролирующая уровень АФК. Антиоксидантная защитная система (АОС) растений включает в себя как высокомолекулярные антиоксиданты (ферменты аскорбат-глутатионового цикла, супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ) и др.), так и низкомолекулярные метаболиты (пролин (Про), полиамины (ПА), соединения фенольной природы и прочие). До сих пор остаются практически не выясненными механизмы, лежащие в основе взаиморегуляции между компонентами АОС.

В последнее время особое внимание учёных уделяется низкомолекулярным метаболитам, в частности Про и ПА. В ряде работ показано, что ПА путресцинового ряда (путресцин (Пут), спермидин (Спд), спермин (Спм)), обладающие антиоксидантными и хелатирующими свойствами, вовлечены в регуляцию многих физиологических процессов (Аронова и др., 2005; Кузнецов и др., 2006; Hussain et al., 2011; Moschou et al., 2012).

Вопрос о том, какой эффект оказывают экзогенные ПА, в частности Спм, на окислительно-восстановительный статус растения, остается в настоящее время открытым. Практически неизвестно, как искусственное повышение ПА в клетках растений влияет на функционирование и взаиморегуляцию компонентов АОС в оптимальных условиях выращивания, а также при действии стрессоров.

Внутриклеточный уровень веществ определяется соотношением скоростей синтеза и распада. Рассматривая влияние ПА на окислительно-восстановительный статус клетки, необходимо, прежде всего, обращать внимание на реакции катаболизма ПА, которые контролируются полиаминоксидазой (ПАО) или диаминоксидазой (ДАО) (Аронова и др., 2005). Существуют разрозненные данные о том, что ПАО, регулируя внутриклеточный уровень ПА, может вовлекаться в повышение устойчивости растений к неблагоприятным факторам (Sebela et al., 2001;

Sona et al., 2006). Имеются предположения, что, образующийся при катаболизме ПА, пероксид водорода участвует в индукции АОС, что, возможно, является основой защитного действия ПА в клетках растений (Yoda et al., 2003; Wan et al., 2009; Aleasar et al., 2011). Исследования по данному вопросу единичны и до сих пор неясно вовлекается ли ПАО в индукцию защитного ответа растения на стрессы.

В связи со всем вышесказанным представляется целесообразным исследование влияния экзогенных ПА на функционирование компонентов АОС как в оптимальных условиях выращивания растений, так и при действии окислительного стресса.

**Цель и задачи исследования.** Цель заключалась в исследовании роли полиаминов в регуляции функционирования компонентов антиоксидантной системы и индукции защитного ответа растений *Th. salsuginea* при обработке спермином, пероксидом водорода, а также при их совместном действии.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние спермина на функционирование компонентов антиоксидантной защитной системы растений *Th. salsuginea* в оптимальных условиях выращивания, а также при действии окислительного стресса, индуцированного пероксидом водорода.

2. Исследовать функционирование компонентов антиоксидантной защитной системы растений *Th. salsuginea* при совместном действии спермина и пероксида водорода.

3. Исследовать функционирование полиаминоксидазы и роль фермента в регуляции внутриклеточного пула полиаминов в растениях *Th. salsuginea* в условиях обработки растений спермином, пероксидом водорода и при их совместном действии.

4. Провести сравнительный анализ уровней мРНК генов, кодирующих изоформы полиаминоксидазы, в растениях *Th. salsuginea* в условиях обработки растений спермином, пероксидом водорода и при их совместном действии.

5. Изучить влияние спермина на изоферментный состав ключевых антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, аскорбатпероксидаза) и уровни мРНК генов, кодирующих изоформы данных ферментов, в растениях *Th. salsuginea* при обработке экзогенным спермином, пероксидом водорода и при их совместном воздействии.

6. Изучить влияние спермина на метаболизм пролина и уровни мРНК генов, кодирующих ключевые ферменты синтеза и катаболизма пролина, у растений *Th. salsuginea* при обработке экзогенным спермином, пероксидом водорода и их совместном действии.

**Научная новизна.** Впервые показано, что экзогенный спермин в растениях *Th. salsuginea* активировал супероксиддисмутазу и аскорбатпероксидазу как в оптимальных условиях выращивания, так и при действии окислительного стресса, индуцированного пероксидом водорода. В оптимальных условиях спермин вызывал изменения в изоферментном составе и уровнях мРНК генов, кодирующих изоферменты супероксиддисмутазы и аскорбатпероксидазы. Впервые показано существование ПАОЗ-зависимой обратной конверсии высокомолекулярных полиаминов в растениях *Th. salsuginea*. Экзогенный спермин приводил к изменению уровня мРНК генов, кодирующих изоформы полиаминоксидазы как в оптимальных условиях выращивания, так и при действии окислительного стресса. Подтверждена гипотеза о взаимосвязи биосинтеза пролина и полиаминов. Спермин вовлекается в регуляцию метаболизма пролина, вызывая изменения в содержании свободного пролина в растениях, а также повышение уровней мРНК генов, кодирующих ключевые ферменты метаболизма пролина.

**Практическая значимость.** Полученные данные по влиянию спермина на функционирование антиоксидантной системы *Th. salsuginea* имеют существенное значение для понимания роли полиаминов в индукции защитного ответа растений. Результаты исследования расширяют представления о механизмах, лежащих в основе координированной взаиморегуляции компонентов защитной системы растительного организма. Полученные данные могут быть использованы в технологиях создания трансгенных растений, обладающих повышенной устойчивостью к стрессам различной природы. Возможно использование результатов настоящего исследования в практике растениеводства. Вся совокупность теоретических обобщений и экспериментальных данных этой работы может быть рекомендована для разработок курсов лекций для студентов биологических факультетов ВУЗов.

**Апробация работы.** Результаты работы были представлены на 16-ой Пушкинской международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI» (Пушино, 2012); XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2012» (Москва, 2012); II(X) Международной Ботанической Конференции молодых ученых (Санкт-Петербург, 2012); на семинаре молодых ученых в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева (Москва, 2012); XX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2013» (Москва, 2013); 17-ой Пушкинской международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI» (Пушино, 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 115 страницах машинописного текста и иллюстрированы 4 таблицами и 23 рисунками. Список цитируемой литературы включает 225 наименований, в т.ч. 215 на иностранных языках.

## **ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В качестве объекта исследований использовали 6-недельные растения *Thellungiella salsuginea* (Pall.) O.E. Schulz (*Th. salsuginea*) (экотип Shandong), выращенные на питательной среде Кнопа с микроэлементами по Хогланду (рН = 6,0). Растения культивировали в камере фитотрона при 12 - часовом световом периоде под лампами Philips (F36W/54) (интенсивность светового потока в диапазоне ФАР  $250 \pm 50$  мкмоль фотонов/м<sup>2</sup>с<sup>-1</sup>). 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).

**Условия проведения опытов.** Взрослые растения, находящиеся на стадии розетки (6 недель) переносили на питательную среду, содержащую Спм (1 мМ или 2 мМ), ингибитор активности полиаминоксидазы НЕН ( $\beta$  - *hydroxyethyl hydrazine*) (1 мМ или 2 мМ) или оба эти соединения. Окислительный стресс индуцировали нанесением на листья раствора пероксида водорода (500 мкМ). Контрольные растения выращивали на исходной питательной среде.

Через 12 ч культивирования растений в указанных выше условиях отбирали пробы листьев и корней; материал фиксировали жидким азотом и хранили при  $-70^\circ\text{C}$  до проведения биохимических и молекулярно - биологических анализов.

**Содержание свободных ПА** определяли в виде их дансил-производных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (Marcelli et al., 2008).

**Определение содержания свободного Про** проводили по методу Bates с соавт. (Bates et al., 1973).

**Содержание малонового диальдегида (МДА)** оценивали спектрофотометрическим методом, основанном на образовании окрашенного комплекса МДА с тиобарбитуровой кислотой при нагревании (Heath, Packer, 1968).

**Определение активности ПАО** проводили по методу Cona et al. (2003). Активность ПАО рассчитывали по количеству образовавшегося пероксида

водорода при окислительной дегградации спермидина.

**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 КАТ** измеряли спектрофотометрически по скорости разрушения пероксида водорода каталазой грубого экстракта (Maehly, Chance, 1954).

**Активность гваяколовых пероксидаз (ПО)** измеряли спектрофотометрически по скорости окисления гваякола (Ridge, Osborne, 1971).

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

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

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

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

**Экспрессию генов изоформ ПАО, АПО, СОД, а также генов метаболизма Про** 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](http://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 трёх независимых экспериментов, получены не менее, чем в 3-кратной биологической и аналитической повторностях. Итоговые данные обрабатывали статистически в среде Microsoft Excel 2007 и выражали как среднюю арифметическую величину  $\pm$  ошибка средней величины.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Влияние спермина на содержание МДА и активность антиоксидантных ферментов в растениях *Th. salsuginea*

Для выяснения роли ПА в функционировании компонентов АОС представлялось целесообразным исследовать реакцию растений на действие экзогенных ПА, в частности Спм, как в оптимальных условиях выращивания, так и при развитии окислительного стресса.

Добавление в питательную среду растений 1 мМ и 2 мМ Спм не приводило к изменениям уровня МДА и активности КАТ в корнях. При этом происходило некоторое повышение активностей СОД (с  $2,03 \pm 0,14$  ед. акт./мг белка мин) до  $2,46 \pm 0,27$  и  $3,06 \pm 0,21$  ед. акт./мг белка мин), АПО (с  $56,15 \pm 2,80$  мкмоль аскорбата/(мг белка мин) до  $80,03 \pm 3,08$  и  $74,26 \pm 3,10$  мкмоль аскорбата/(мг белка мин)), ПО II (с  $43,13 \pm 2,70$  нмоль гваякола/(мг белка мин) до  $118,26 \pm 8,47$  и  $102,00 \pm 7,90$  нмоль гваякола/(мг белка мин)) и снижение активности ПО I (с  $512,47 \pm 35,80$  нмоль гваякола/(мг белка мин) до  $261,89 \pm 21,18$  и  $289,01 \pm 24,10$  нмоль гваякола/(мг белка мин)). 2 мМ Спм вызывал изменения в спектре изоформ СОД (увеличение активности Cu/Zn-СОД и снижение Mn-СОД), что сопровождалось увеличением уровня мРНК генов, кодирующих Cu/Zn- СОД изоформу (рис. 1 и 2а).

При обработке растений 1 мМ Спм в листьях не было отмечено изменений содержания МДА, а также существенного повышения активности АПО, гваяколовых ПО и КАТ. Не было изменений и в общей активности и изоферментном составе ключевого фермента антиоксидантной системы – СОД. 2 мМ Спм оказывал действие, сходное с действием 1 мМ Спм. Не было отмечено существенных изменений в спектре изоформ СОД и уровнях мРНК генов *CSD1*, *CSD2* и *FeSD1* (рис. 1 и 2б).

Таким образом, Спм, добавленный в питательную среду, не вызывал развитие у растений окислительного стресса, но приводил к изменениям в активностях антиоксидантных ферментов. Предположительно, увеличение активности цитозольной изоформы СОД связано с функционированием ПО в качестве оксидазы (Lüthje et al., 2011).



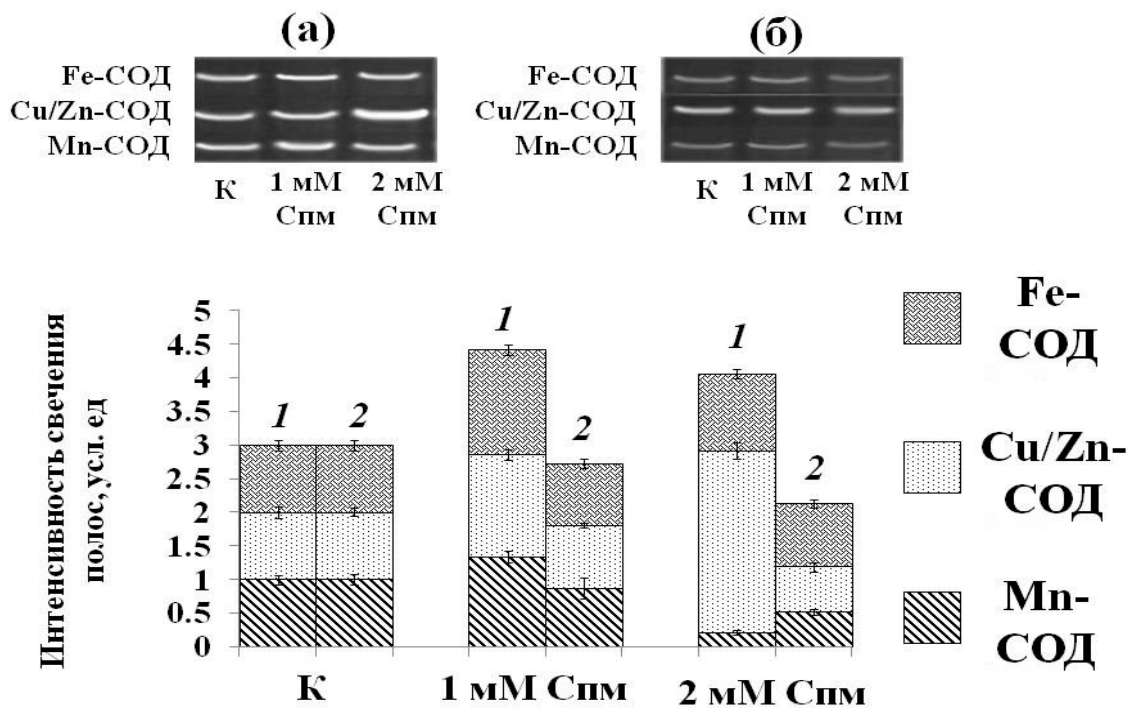


Рисунок 1 – Изоферментный состав СОД в растениях *Th. salsuginea*. 1 – корни, 2 – листья; а – корни, б – листья.

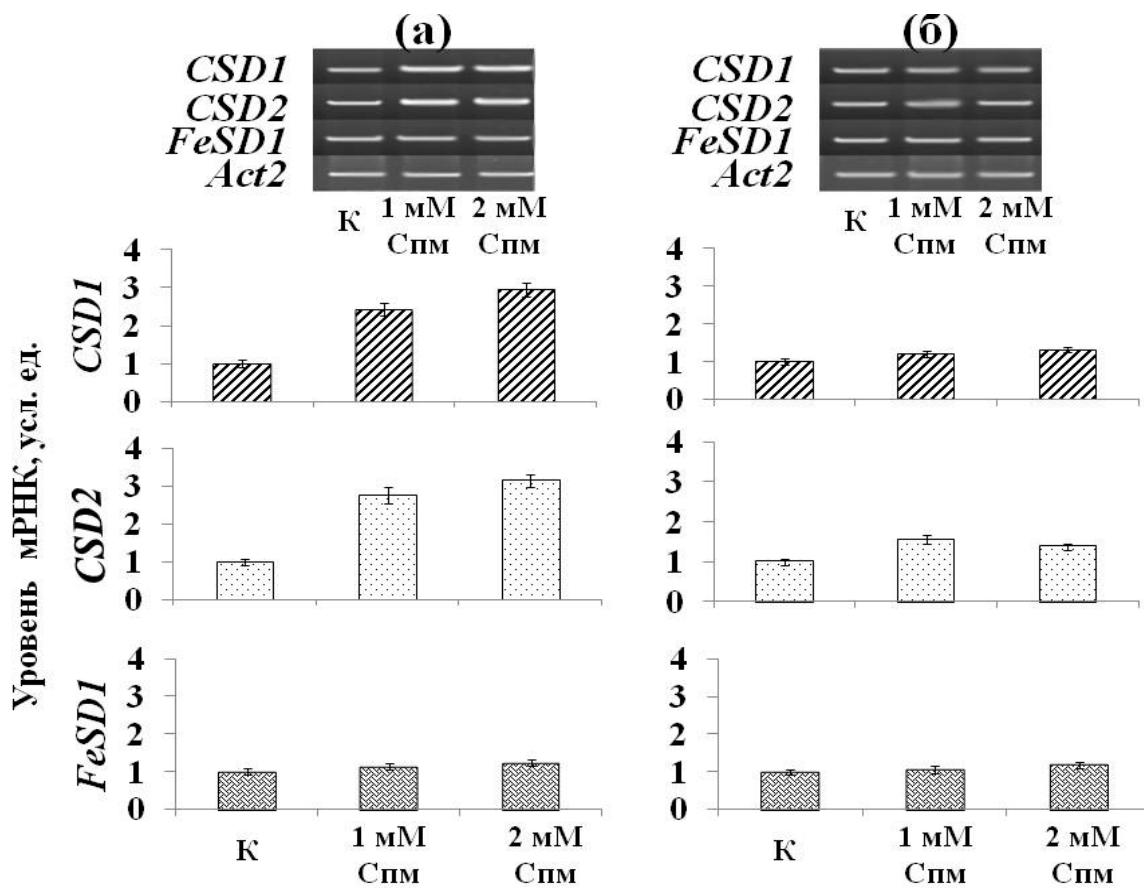


Рисунок 2 – Уровень мРНК генов, кодирующих изоферменты СОД в растениях *Th. salsuginea*. а – корни, б – листья.

## 2. Влияние спермина на активность и изоферментный состав АПО в растениях *Th. salsuginea*

В ДНК растений *Th. salsuginea* нами были идентифицированы пять генов, кодирующих изоформы АПО (*APX1*, *APX2*, *APX3*, *APX4*, *APX5*). На уровне мРНК было обнаружено присутствие двух генов, кодирующих цитозольные изоформы АПО (*APX1*, *APX2*) и гена, кодирующего микросомальную изоформу (*APX4*). В корнях и листьях *Th. salsuginea* при добавлении 1 мМ и 2 мМ Спм в питательную среду возрастал уровень мРНК генов *APX1* и *APX4* (рис. 3а и 3б). Однако не было отмечено достоверных изменений уровня мРНК гена *APX2* изоформы.

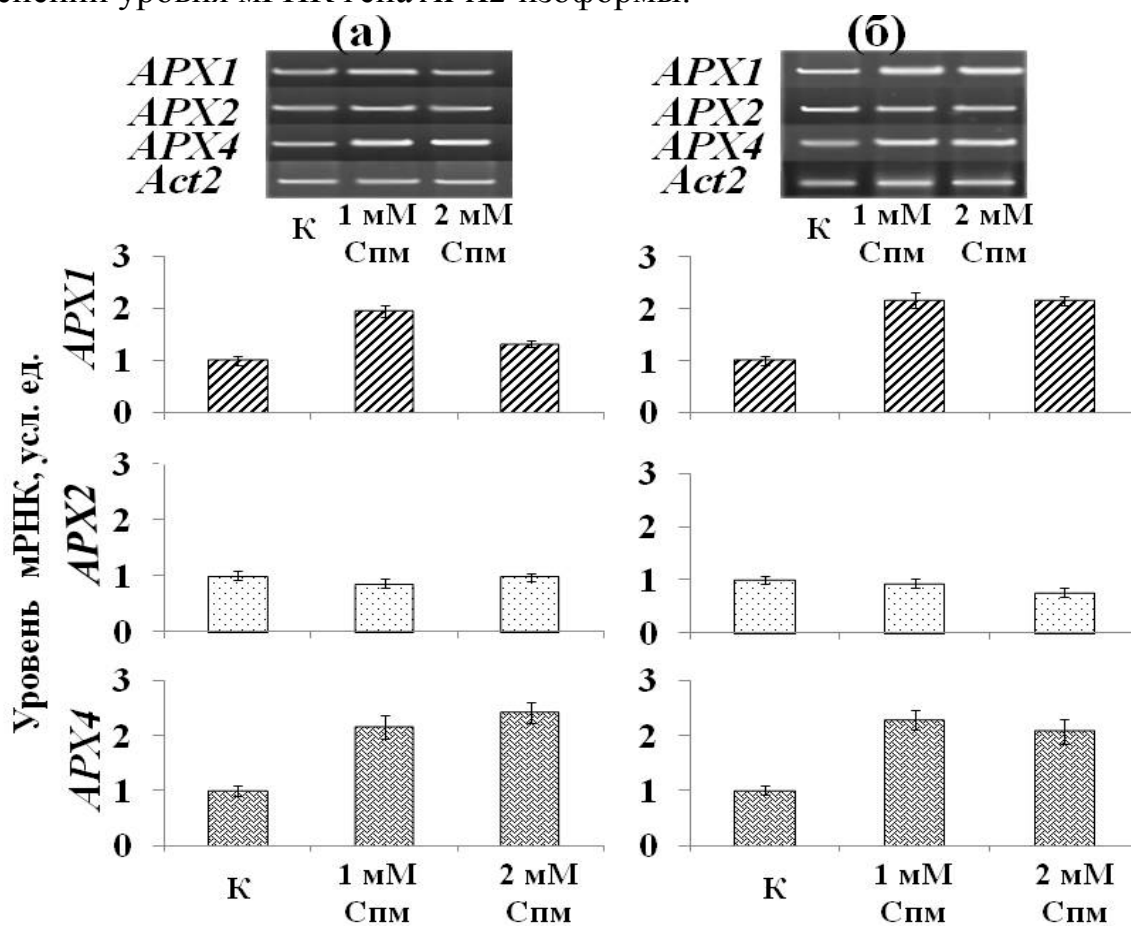


Рисунок 3 – Уровень мРНК генов, кодирующих изоформы АПО в растениях *Th. salsuginea*. а – корни, б – листья.

В корнях и в листьях растений *Th. salsuginea* было обнаружено присутствие двух высокомолекулярных изоформ АПО. В корнях при действии 1 мМ и 2 мМ Спм наблюдалось появление одной низкомолекулярной изоформы и двух дополнительных высокомолекулярных (рис. 4а). В присутствии 1 мМ и 2 мМ Спм в листьях происходило появление дополнительно одной низкомолекулярной изоформы (рис. 4б).

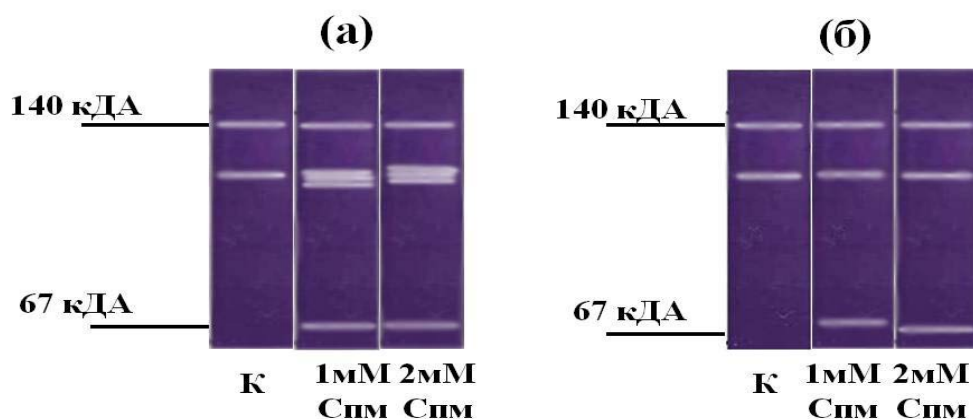


Рисунок 4 – Изоферментный состав АПО в растениях *Th. salsuginea*. а – корни, б – листья.

### 3. Влияние совместной обработки спермином и пероксидом водорода на содержание МДА и активность антиоксидантных ферментов в растениях *Th. salsuginea*

В ряде работ показано, что в условиях окислительного стресса ПА проявляют антиоксидантные свойства (Chattopadhyay et al., 2002; Groppa et al., 2003; Kakkar, Sawhney, 2003). Согласно данным, представленным в разделе 1 и 2, более яркие изменения в функционировании компонентов АОС наблюдались при воздействии Спм в концентрации 2 мМ. Поэтому, в наших опытах по проверке антиоксидантных свойств ПА мы использовали 2 мМ Спм.

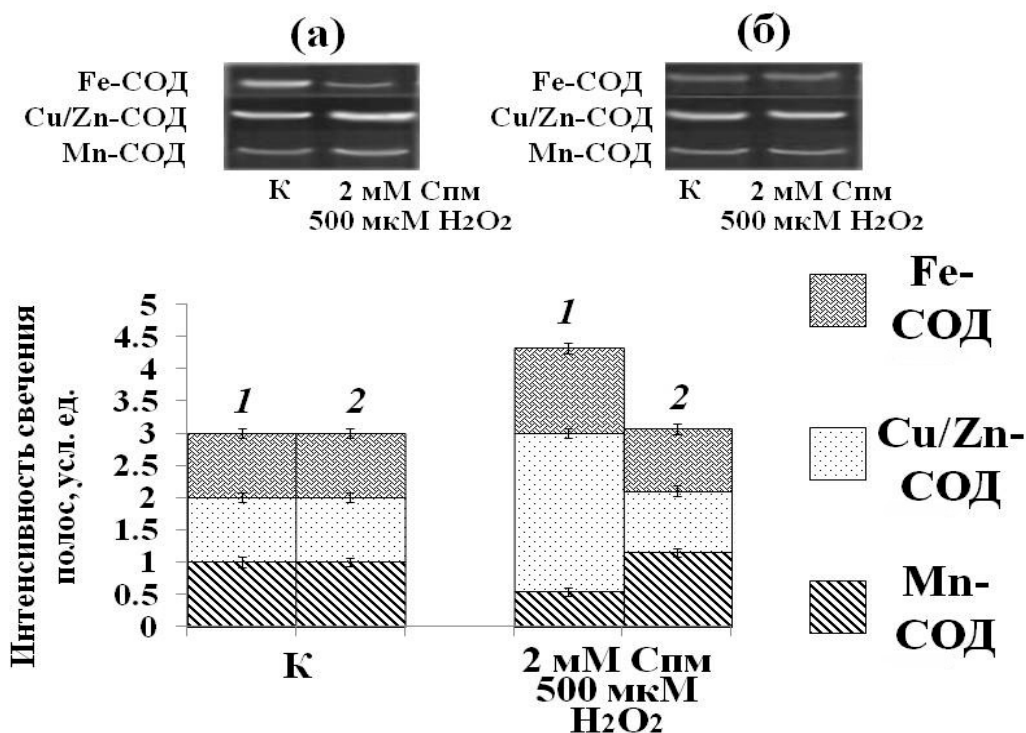


Рисунок 5 – Изоферментный состав СОД в растениях *Th. salsuginea*. 1 – корни, 2 – листья; а – корни, б – листья.

СПМ, добавленный в питательную среду растений, в условиях окислительного стресса в корнях приводил к повышению активности СОД (с  $2,03 \pm 0,14$  ед. акт./ (мг белка мин) до  $4,26 \pm 0,46$  ед. акт./ (мг белка мин)) и ПОИ ( $43,13 \pm 2,70$  нмоль гваякола/ (мг белка мин) до  $96,36 \pm 4,15$  нмоль гваякола/ (мг белка мин)), незначительному увеличению активности АПО и снижению активности ПОД (с  $512,47 \pm 35,80$  нмоль гваякола/ (мг белка мин) до  $235,92 \pm 25,26$  нмоль гваякола/ (мг белка мин)). В листьях не наблюдалось достоверных изменений содержания МДА и активности КАТ. Однако происходило увеличение активности СОД (с  $1,68 \pm 0,009$  ед. акт./ (мг белка мин) до  $3,11 \pm 0,31$  ед. акт./ (мг белка мин)) и АПО (с  $7,41 \pm 0,42$  ед. акт./ (мг белка мин) до  $12,42 \pm 0,64$  ед. акт./ (мг белка мин)).

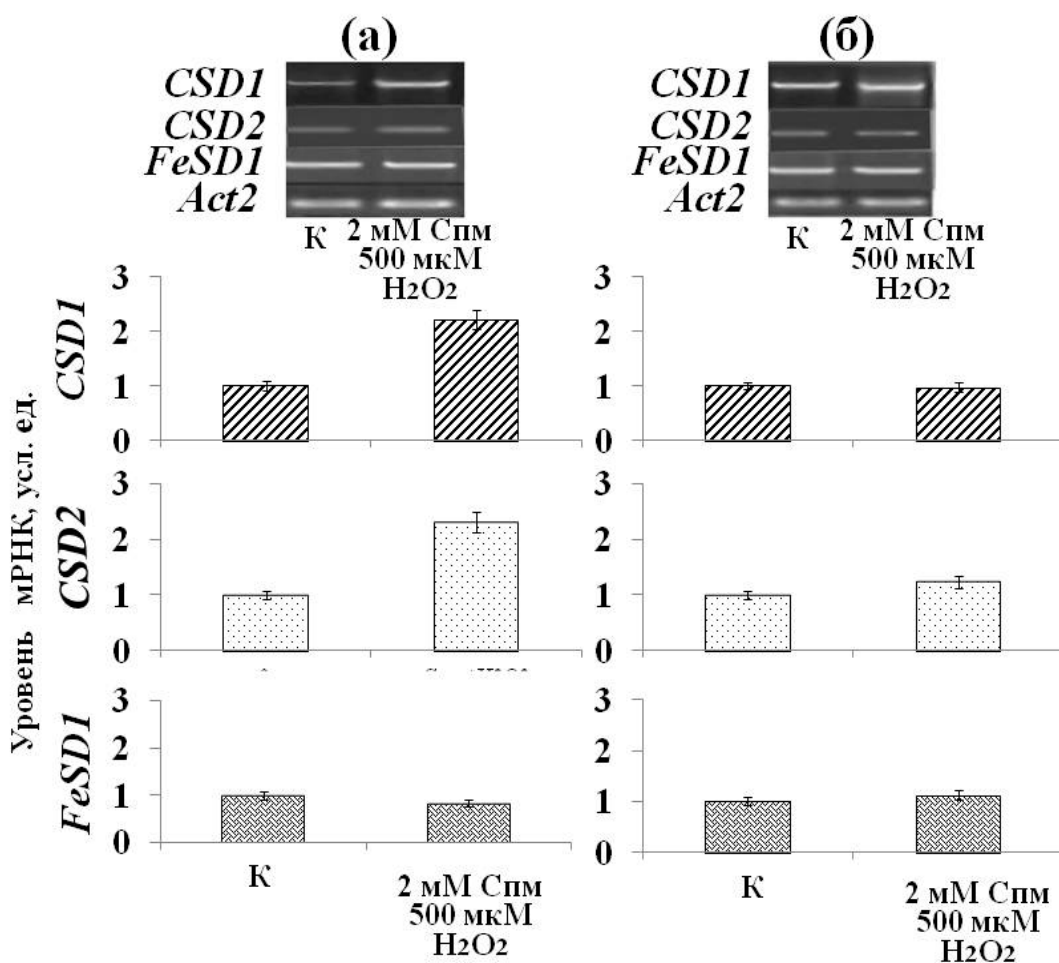


Рисунок 6 – Уровень мРНК генов, кодирующих изоферменты СОД в растениях *Th. salsuginea*. а – корни, б – листья.

В корнях в этих условиях наблюдалось увеличение активности Cu/Zn-содержащей изоформы (в 2,5 раза) и снижение активности Mn-содержащей изоформы СОД на фоне повышения уровня мРНК генов *CSD1* и *CSD2* (рис. 5 и 6а). В листьях не наблюдалось достоверных изменений ни спектра изоформ фермента, ни уровня мРНК генов *CSD1*, *CSD2*, *FeSD1* (рис. 5 и 6б).

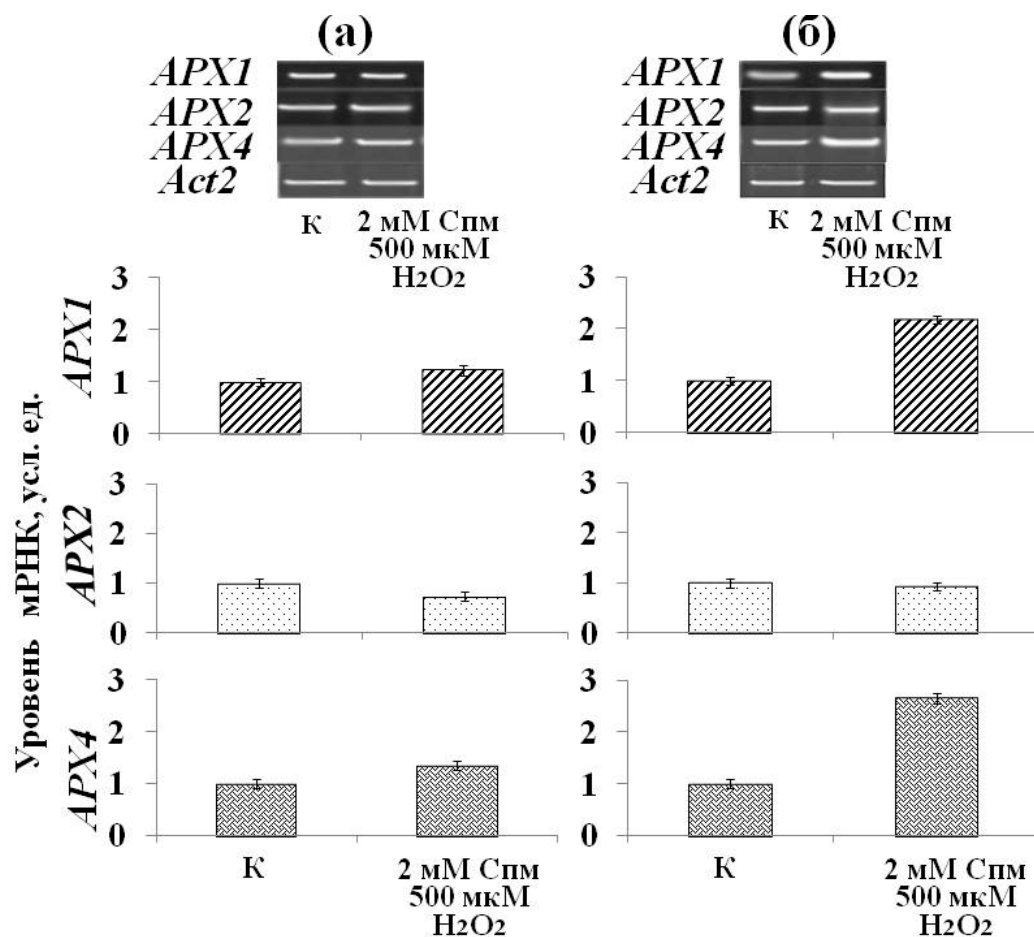


Рисунок 7 – Уровень мРНК генов, кодирующих изоформы АПО в растениях *Th. salsuginea*. а – корни, б – листья.

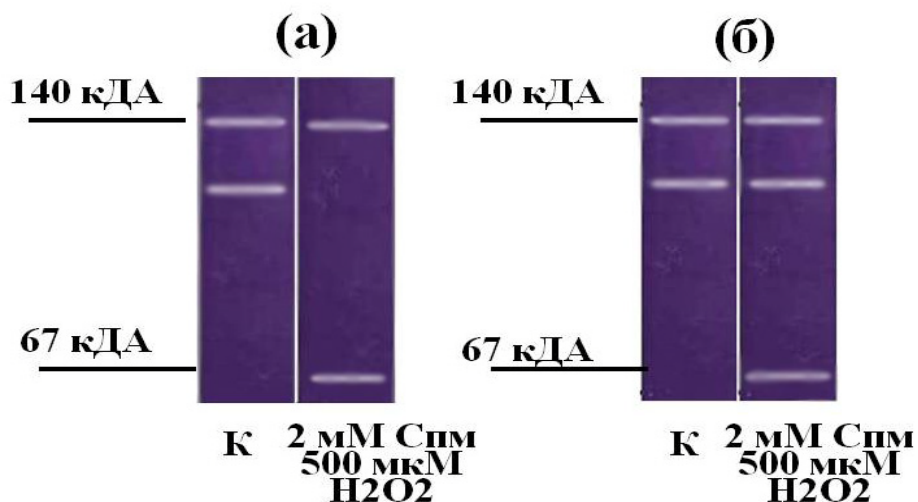


Рисунок 8 – Изоферментный состав АПО в растениях *Th. salsuginea*. а – корни, б – листья.

В корнях на фоне отсутствия значимых изменений общей активности АПО не было отмечено и изменений уровня мРНК генов, кодирующих изоформы данного фермента (рис. 7а). При этом происходило ингибирование одной из высокомолекулярных изоформ АПО и появление

низкомолекулярной (рис. 8а). В листьях в данных условиях при повышении общей активности АПО наблюдалось увеличение уровня мРНК генов, кодирующих цитозольную и микросомальную изоформы фермента (*APX1* и *APX4*) (рис. 7б). Методом гель - электрофореза в нативных условиях показано появление дополнительной низкомолекулярной изоформы АПО (рис. 8б). Возможно, изменения в спектре изоформ АПО связаны с транспортом как пероксида водорода, так и Спм.

#### 4. Влияние спермина и совместного действие спермина и пероксида водорода на метаболизм пролина в растениях *Th. salsuginea*

Известно, что одним из компонентов АОС растений является пролин, обладающий мультифункциональными свойствами (Шевякова и др., 2009; Сошинкова и др., 2013). Многие исследователи полагают, что в клетках растений поддерживается тесная корреляция между уровнями содержания Про и ПА.

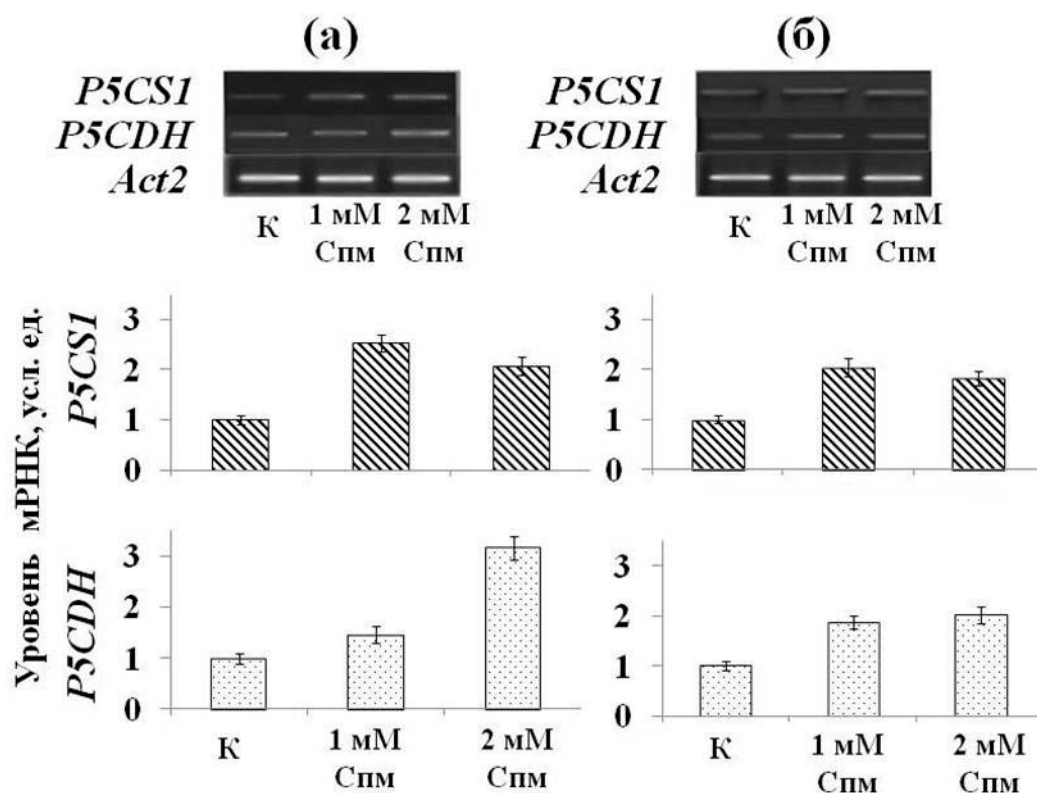


Рисунок 9 – Уровень мРНК генов метаболизма Про в растениях *Th. salsuginea*. а – корни, б – листья.

Из полученных данных следует, что внесение 1 мМ и 2 мМ Спм в питательную среду *Th. salsuginea* сопровождалось повышением в корнях содержания внутриклеточного Про в 2 раза (с  $1,24 \pm 0,006$  мг/г сырой массы до  $2,81 \pm 0,032$  мг/г сырой массы и  $2,65 \pm 0,18$  мг/г сырой массы соответственно) при отсутствии изменений активности ПДГ. В листьях не

наблюдалось достоверного увеличения уровня Про, но при этом отмечалось ингибирование активности ПДГ – ключевого фермента деградации Про (с  $11,21 \pm 0,53$  мг/г сырой массы до  $3,91 \pm 0,26$  мг/г сырой массы и  $3,24 \pm 0,23$  мг/г сырой массы соответственно). Однако экзогенный Спм повышал уровень мРНК генов ключевых ферментов метаболизма пролина *P5CS1* и *P5CDH* и в корнях и в листьях растений (рис. 9а и 9б).

Совместная обработка Спм и пероксидом водорода не оказала существенного влияния на содержание Про и активность ПДГ как в корнях, так и в листьях растений. Вместе с тем, в корнях происходило увеличение в 2,5 раза уровня мРНК ключевого гена биосинтеза Про *P5CS1* (рис. 10а и 10б). В листьях повышение относительного содержания мРНК гена *P5CS1* в 3 раза сопровождалось снижением в 2 раза уровня мРНК гена катаболизма Про *P5CDH* (рис. 10б).

Данные свидетельствуют о том, что действие экзогенного Спм на метаболизм Про проявляется на транскрипционном уровне, но, не всегда сопровождается изменениями на уровне конечного продукта.

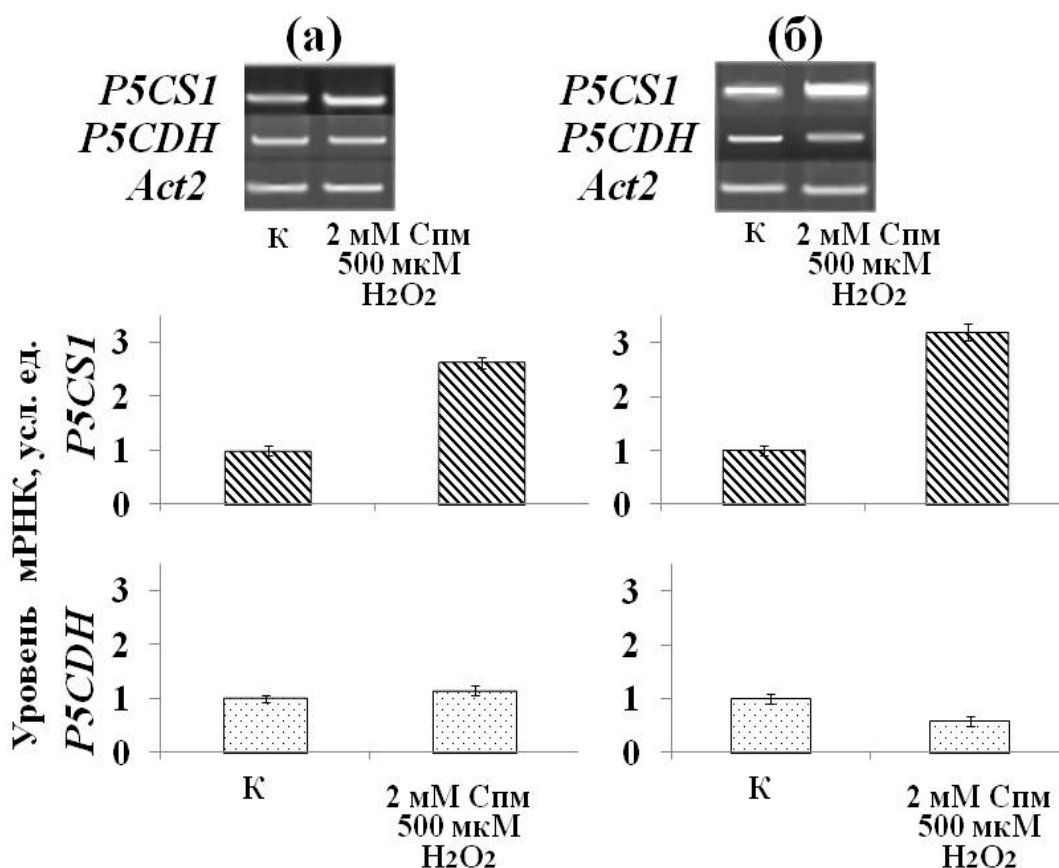


Рисунок 10 – Уровень мРНК генов метаболизма Про в растениях *Th. salsuginea*. а – корни, б – листья.

## **5. Изменение содержания и спектра свободных полиаминов при действии спермина и пероксида водорода в растениях *Th. salsuginea***

Полученные результаты показывают, что в корнях контрольных растений содержание Пут составляло  $0,139 \pm 0,011$  нмоль/г сухой массы, Спд –  $0,022 \pm 0,003$  нмоль/г сухой массы и Спм –  $0,039 \pm 0,004$  нмоль/г сухой массы. Спустя 12 ч после внесения 1 мМ Спм в питательную среду наблюдали увеличение общего пула ПА в корнях, которое было обусловлено увеличением (в 1,8 раза) содержания Пут ( $0,243 \pm 0,014$  нмоль/г сухой массы) и (в 2,2 раза) Спд ( $0,049 \pm 0,004$  нмоль/г сухой массы). Листья контрольных растений характеризовались практически таким же уровнем свободных ПА (Пут -  $0,122 \pm 0,009$  нмоль/г сухой массы, Спм –  $0,032 \pm 0,003$  нмоль/г сухой массы, Спд -  $0,035 \pm 0,004$  нмоль/г сухой массы), что и корни. При добавлении в питательную среду 1 мМ Спм содержание в листьях ПА незначительно снижалось.

Повышение концентрации Спм в питательной среде (2 мМ) сопровождалось дальнейшим увеличением в корнях общего пула ПА исключительно за счет накопления Спд ( $0,533 \pm 0,027$  нмоль/г сухой массы), тогда как в листьях наблюдалось снижение внутриклеточного содержания ПА в основном за счет падения уровня Пут ( $0,080 \pm 0,007$  нмоль/г сухой массы).

Возможным объяснением отсутствия повышения содержания внутриклеточного Спм в указанных условиях может быть ингибирование Спм собственного биосинтеза. Повышение содержания Спд, а не Спм, может служить аргументом в пользу гипотезы о функционировании у *Th. salsuginea* в условиях экзогенного добавления Спм особой изоформы ПАО, превращающей Спм в Спд, который далее превращается в Пут. Различия в действии Спм на пул свободных ПА в корнях и листьях могут свидетельствовать о том, что экзогенный Спм, добавленный в питательную среду, не достигал листьев растений.

Обработка растений *Th. salsuginea* 500 мкМ пероксидом водорода вызывала в корнях лишь незначительное повышение уровня ПА за счёт увеличения содержания Пут в 1,3 раза ( $0,174 \pm 0,019$  нмоль/г сухой массы) и Спд в 1,5 раза ( $0,032 \pm 0,002$  нмоль/г сухой массы) в первые 12 часов эксперимента. В листьях в этих условиях происходило снижение в 2,2 раза уровня Спд ( $0,016 \pm 0,001$  нмоль/г сухой массы), а также некоторое уменьшение содержания Пут (в 1,3 раза;  $0,091 \pm 0,009$  нмоль/г сухой массы) и Спм (в 1,5 раз;  $0,020 \pm 0,001$  нмоль/г сухой массы). Подобные изменения могут указывать на участие ПА в защитном ответе на действие пероксида водорода, которое в первую очередь начинается в листьях. В корнях же биосинтез ПА мог усиливаться для пополнения пула в листьях.



Обработка растений Спм совместно с пероксидом водорода не вызывала существенных изменений содержания и спектра ПА ни в корнях, ни в листьях. Это может быть связано с прямым участием поступающего в растения Спм с детоксикацией пероксида водорода.

### 6. Функционирование ПАО в растениях *Th. salsuginea*

Рассматривая влияние ПА на окислительно-восстановительный статус клетки, представляют интерес реакции катаболизма ПА, которые контролируются ПАО или ДАО. В процессе катаболизма ПА образуется пероксид водорода, который выступает не только в качестве сигнальной молекулы, но и является одной из АФК, повышение концентрации которой может нарушать равновесие между компонентами АОС.

Для растения *Arabidopsis thaliana* известно 5 генов, кодирующих ПАО: *AtPAO1*, *AtPAO2*, *AtPAO3*, *AtPAO4*, *AtPAO5* (Tavladoraki et al., 2006; Alcazar et al., 2006, 2008; Kamada-Nobusada et al., 2008; Moschou et al., 2008). Ген *AtPAO3* был идентифицирован как осуществляющий ПАО3-зависимое обратное превращение Спм в Спд и Спд в Пут (Moschou et al., 2008). Мы обнаружили присутствие *PAO4* и *PAO5* в геноме *Th. salsuginea*, однако действие пероксида водорода и Спм не индуцировали экспрессию этих генов на уровне мРНК. Возможно, данные гены являются для растения *Th. salsuginea* молчащими или малокопийными.

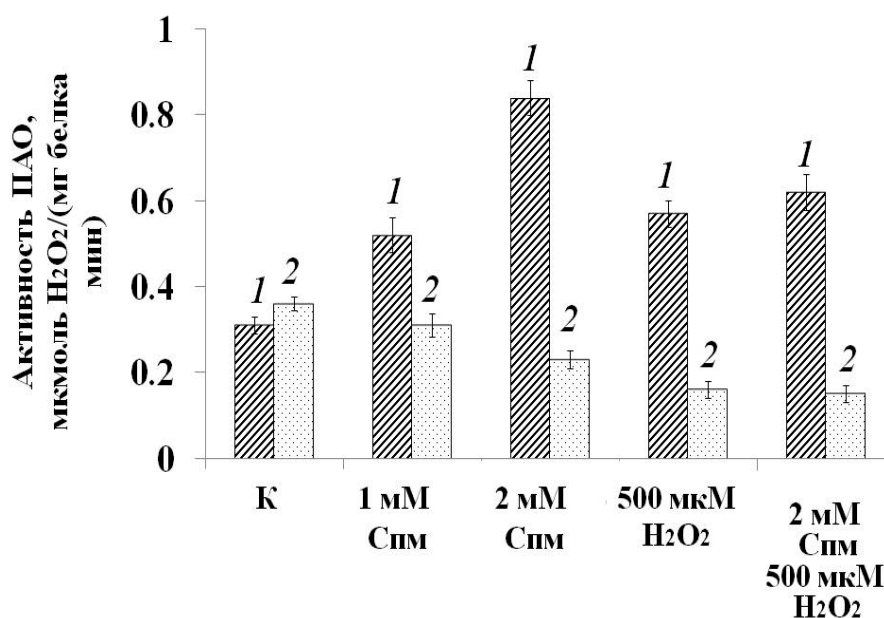


Рисунок 11 – Активность ПАО в растениях *Th. salsuginea*. 1 – корни, 2 – листья.

Обработка растений 1 мМ и 2 мМ Спм сопровождалась увеличением активности ПАО в корнях (в 1,8 и 2,7 раз соответственно) (рис. 11). В этих

условиях наблюдалось увеличение уровня мРНК *PAO1*, *PAO2*, *PAO3*, причём использование 2 мМ Спм приводило к более существенным изменениям (рис. 12а). При этом в листьях наблюдалось незначительное снижение активности ПАО на фоне отсутствия изменений экспрессии генов, кодирующих изоформы данного фермента (рис. 11 и 12б). Полученные данные изменений активности ПАО согласуются с данными по содержанию и спектру ПА и подтверждают её участие в строгой регуляции пула ПА.

Сопоставление содержания ПА и активности ПАО при действии пероксида водорода также показало увеличение активности ПАО в корнях почти в два раза, при снижении пула ПА и снижение активности ПАО в листьях (рис. 11). Важно отметить, что уровень мРНК генов *PAO1*, *PAO2*, *PAO3* в корнях был сопоставим с данными, полученными при обработке 2 мМ Спм (рис. 12а). В листьях добавление пероксида водорода приводило только к увеличению уровня мРНК гена *PAO3*, инициирующего ПАО3 – зависимое обратное превращение высокомолекулярных ПА (рис. 12б). Можно предположить, что в листьях пероксид водорода окислял ПА и восстановление пула происходило за счёт обратной конверсии из Спм.

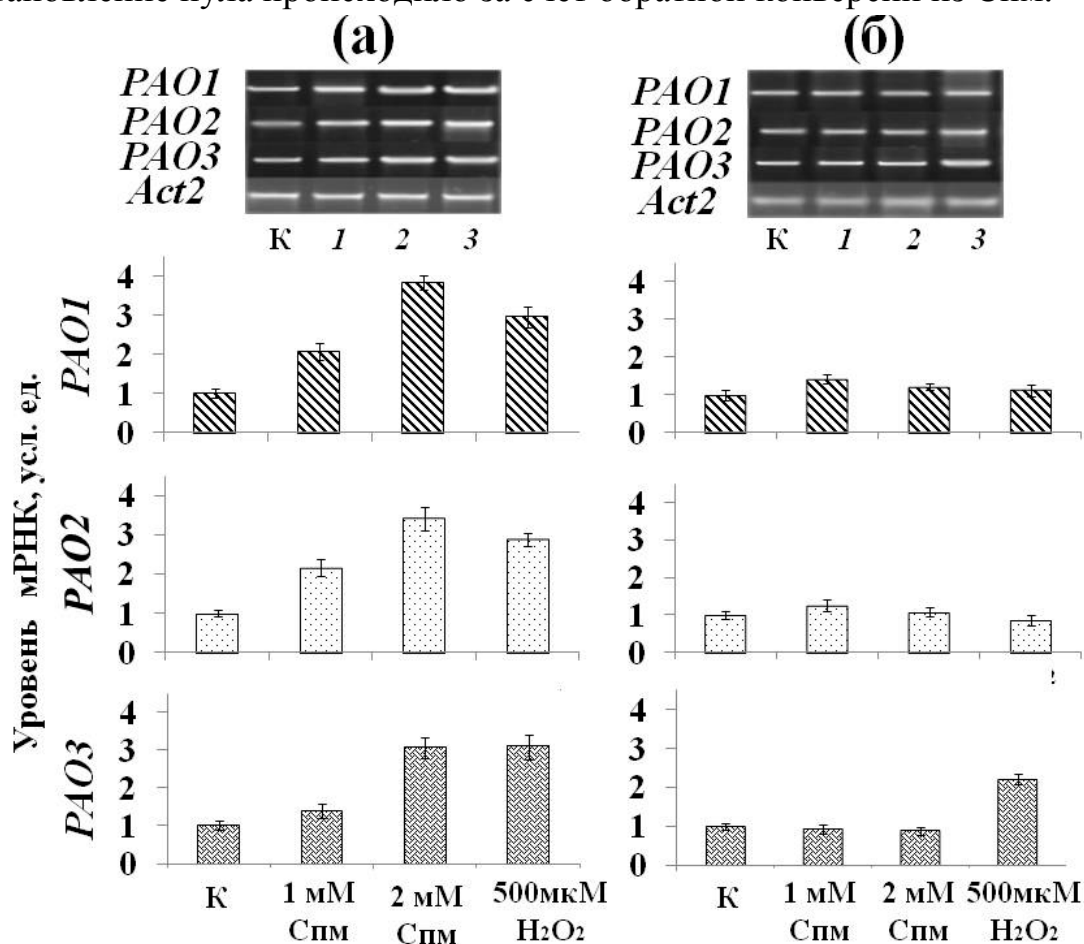


Рисунок 12 – Уровень мРНК генов, кодирующих изоформы ПАО в растениях *Th. salsuginea*. 1 – 1мМ Спм, 2 – 2мМ Спм, 3 – 500мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; а – корни, б – листья.

При совместной обработке пероксидом водорода и Спм в листьях активность ПАО снижалась на фоне отсутствия изменений в уровнях мРНК генов, кодирующих изоформы фермента (рис. 11 и 13б). В корнях активность ПАО увеличивалась в 2 раза (рис. 11). Также происходило увеличение уровня мРНК гена *PAO3* (рис. 13а). Достоверного изменения относительного содержания мРНК генов *PAO1* и *PAO2* отмечено не было.

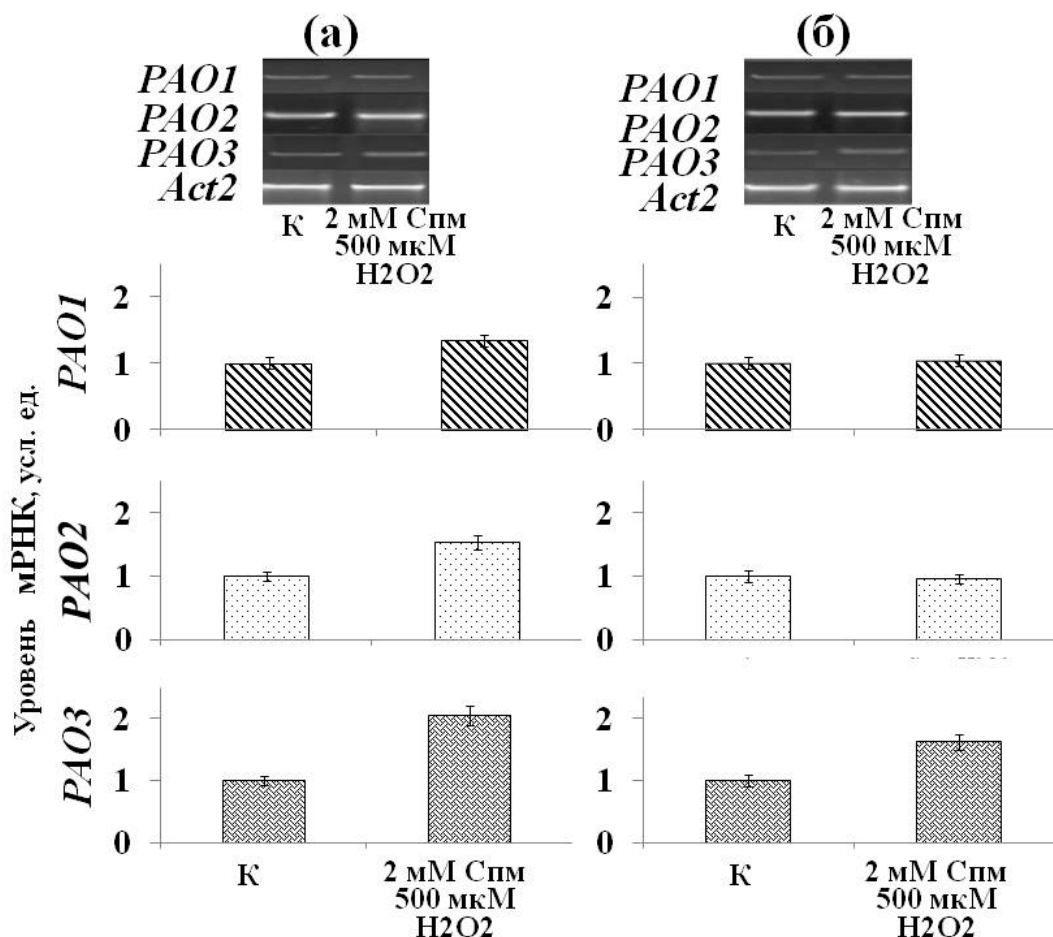


Рисунок 13 – Уровень мРНК генов, кодирующих изоформы ПАО в растениях *Th. salsuginea*. а – корни, б – листья.

Снижение активности ПАО в листьях при совместном действии двух факторов, по-видимому, связано с отсутствием избытка ПА или их деградацией неферментативным путём. В корнях же повышение активности этого фермента можно связать с локальным повышением содержания ПА.

### 7. Действие ингибитора ПАО на активность ПАО и содержание свободных ПА в растениях *Th. salsuginea*

Для оценки степени участия ПАО в регуляции внутриклеточного уровня ПА, мы добавили в питательную среду растений ингибитор активности ПАО – НЕН. Обработка 1 мМ и 2 мМ НЕН вызывала ингибирование общей активности ПАО в корнях и листьях примерно на 50% по сравнению с

контролем. Спм, добавленный совместно с НЕН, не вызывал увеличения активности ПАО (рис. 14).

При обработке 1 мМ НЕН наблюдалось некоторое снижение общего пула ПА в корнях за счет уменьшения количества Пут ( $0,093 \pm 0,007$  нмоль/г сухого веса). 2 мМ НЕН не оказывал существенного влияния на количественное содержание и спектр ПА в корнях. В листьях действие 1 мМ и 2 мМ НЕН оказывало сходное с действием 2 мМ Спм влияние: общее содержание ПА снижалось в основном за счет уменьшения количества Пут ( $0,080 \pm 0,007$  нмоль/г сухого веса и  $0,084 \pm 0,009$  нмоль/г сухого веса соответственно) и Спд ( $0,018 \pm 0,002$  нмоль/г сухого веса и  $0,020 \pm 0,003$  нмоль/г сухого веса соответственно). Возможно, ингибирование прямого синтеза ПА из Пут играет роль альтернативного регуляторного пути для сохранения уровня пула ПА.

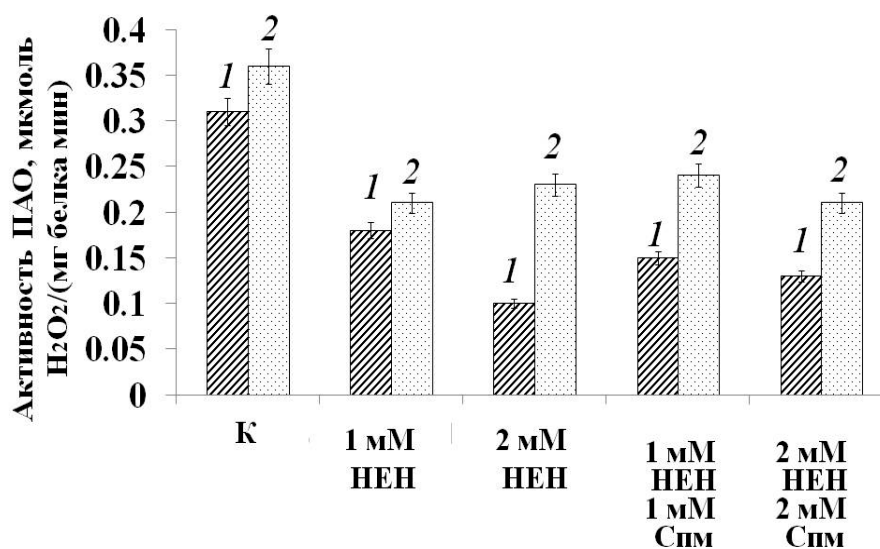


Рисунок 14 – Активность ПАО в растениях *Th. salsuginea*. 1 – корни, 2 – листья.

Спм, добавленный совместно с НЕН, практически не изменял процент ингибирования активности ПАО (рис. 14). Обработка растений 1 мМ НЕН совместно с 1 мМ Спм не вызывала значительных изменений общего содержания свободных ПА в корнях. Уровень ПА существенно не изменялся и при обработке растений 2 мМ НЕН совместно с 2 мМ Спм. Однако происходило некоторое перераспределение доли индивидуальных ПА. В листьях наблюдалось незначительное снижение содержания ПА. Таким образом, совместное действие ингибитора ПАО и Спм также демонстрирует необходимость поддержания пула ПА на определенном уровне.

Это подтверждается анализом уровня мРНК генов, кодирующих изоформы ПАО (*PAO1*, *PAO2*, *PAO3*) при применении ингибитора в концентрации 1 мМ и 2 мМ, а также ингибитора совместно со Спм. В корнях

при действии как ингибитора, так и ингибитора совместно со Спм отмечалось увеличение уровня мРНК гена *PAO3* в 2-2,5 раза на фоне отсутствия изменений в относительном содержании мРНК генов *PAO1*, *PAO2* (рис. 15а). В листьях не происходило изменений уровней мРНК генов, кодирующих изоформы ПАО, в указанных условиях (рис. 15б).

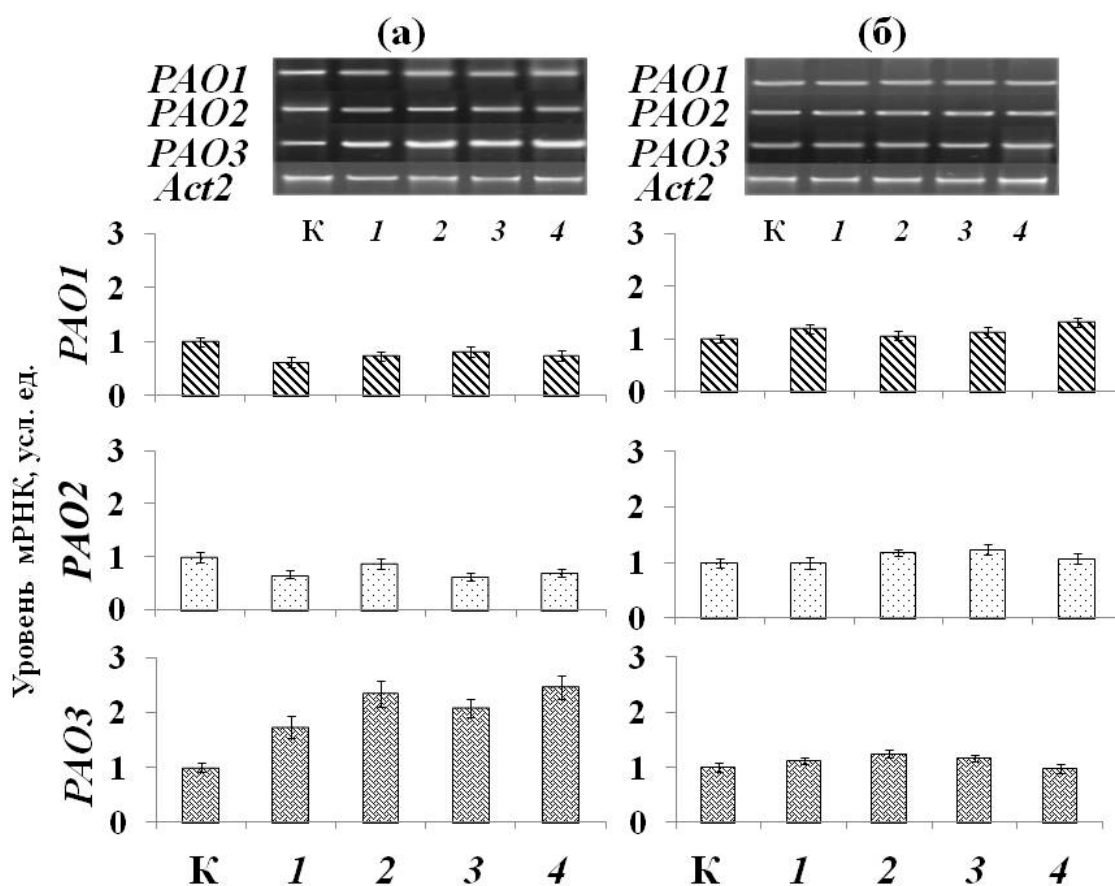


Рисунок 15 – Уровень мРНК генов ПАО в растениях *Th. salsuginea*. 1 – 1мМ НЕН, 2 – 2мМ НЕН, 3 – 1мМ НЕН + 1мМ Спм, 4 – 2мМ НЕН + 2мМ Спм; а – корни, б – листья.

Как следует из полученных данных, ингибитор в концентрации 1 мМ вызывал снижение пула ПА, однако одновременная обработка НЕН и Спм не приводила к изменениям уровня ПА. Это является аргументом в пользу гипотезы о функционировании изоформы фермента, осуществляющей обратную конверсию ПА. Также на это указывает увеличение уровня мРНК гена *PAO3* в данных условиях.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизмы взаимной регуляции между ферментами-антиоксидантами и низкомолекулярными компонентами АОС изучаются давно, но и по сей день вопрос до конца неясен. ПА, низкомолекулярные компоненты АОС,

представляют собой органические соединения катионной природы с высокой биологической активностью. Суммарное содержание ПА и соотношение между ними зависят от вида растения, типа ткани и стадии онтогенеза (Кузнецов, 2006). Конститутивно высокий уровень в клетках растений принадлежит ПА семейства путресцина (Пут, Спд, Спм) (Tavladoraki et al., 2006; Moschou et al., 2008).

Как правило, повышение внутриклеточного уровня ПА коррелирует с устойчивостью растений ко многим типам абиотических стрессов. Однако остаётся открытым вопрос о том, какой эффект оказывают экзогенные ПА, в частности Спм, на окислительно-восстановительный статус растения. Для подтверждения участия ПА в функционировании АОС представляется целесообразным исследовать реакцию растений на действие экзогенных ПА, как в оптимальных условиях выращивания, так и при развитии окислительного стресса.

Исходя из всего вышесказанного, целью данной работы было исследование роли ПА в регуляции функционирования компонентов АОС и индукции защитного ответа растений *Th. salsuginea* при обработке спермином, пероксидом водорода, а также при их совместном действии.

Экзогенный Спм (1 мМ) вызывал повышение пула и изменение спектра ПА в корнях *Th. salsuginea* через 12 ч эксперимента. Повышение концентрации Спм (2 мМ) в питательном растворе приводило к дальнейшему увеличению содержания свободных ПА. Изменение спектра ПА можно объяснить способностью данных метаболитов к образованию конъюгированных форм. Косвенным доказательством этому может служить повышение активности некоторых форм ПО, так как существует гипотеза, что конъюгаты ПА с оксикоричными кислотами способны являться субстратом для данного фермента (Martin-Tanguy, 2001).

Изменение спектра ПА в данных условиях, а также повышение активности ПАО и увеличение уровня мРНК гена *PAO3* свидетельствует о функционировании у *Th. salsuginea* ПАО3 – зависимой обратной конверсии высокомолекулярных ПА. Ранее для *A. thaliana* была высказана возможность существования подобной обратной конверсии Спм (Tavladoraki et al., 2006).

Обработка Спм, пероксидом водорода, а также их совместное действие вызывало увеличение активности ПАО в корнях, повышение уровня мРНК генов, кодирующих изоформы фермента. Это служит аргументом в пользу доказательства участия ПАО в индукции защитного ответа растений при действии стрессов. По-видимому, молекулы пероксида водорода, образующиеся при катаболизме ПА, играют роль сигнальных молекул в системе строго координированных защитных реакций растений.

В растениях хрустальной травки экзогенный Спм в малых

концентрациях (<1 мМ) проявлял антиоксидантные, а при высоких (>1 мМ) прооксидантные свойства, что было вызвано следствием интенсивной деградации ПА (Аронова и др., 2005). Исходя из полученных результатов, в растениях *Th. salsuginea* 1 мМ и 2 мМ Спм не проявлял прооксидантных свойств.

Изменение общего пула ПА при окислительном стрессе, индуцированном пероксидом водорода, а также действие экзогенного Спм в этих условиях указывает на участие ПА в регуляции защитного ответа на действие стрессовых факторов. Можно предположить, что защитное действие Спм объясняется химическими свойствами ПА как органических катионов. Они электростатически взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфатными группами фосфолипидов, нуклеиновых кислот и с карбоксильными группами белков, а также ковалентно связываются с полипептидными цепями на этапе посттрансляционной модификации белков (Galston et al., 1997; Walden et al., 1997; Bouchereau et al., 1999; Kaur-Sawhney et al., 2003). Таким образом, связывание ПА с молекулами белков или нуклеиновых кислот способствует защите их от распада, кроме того, придает им наиболее эффективную в стрессовых условиях конформацию молекулы.

Спм, подобно остальным высокомолекулярным ПА, может соединяться с фосфатными группами ДНК, не затрагивая ее вторичную нативную структуру. Тем самым, по-видимому, и обеспечивается беспрепятственная транскрипция генов, кодирующих изоформы антиоксидантных ферментов, при стрессе. Геометрия расположения NH<sub>2</sub> – групп в молекуле Спм находится в наибольшем соответствии с отрицательно заряженными группами нуклеиновых кислот (Cohen, 1990). Так, можно объяснить участие Спм в защите ДНК от воздействия эндонуклеаз.

Одним из компонентов АОС клеток растений является Про, обладающий выраженным антиоксидантным и стресс-защитным эффектом. Кроме того, Про может вступать в конкурентные отношения с ПА за единый предшественник – глутамат. Действие Спм на метаболизм Про проявляется на транскрипционном уровне, но, не всегда сопровождается изменениями на уровне конечного продукта.

Таким образом, экзогенный Спм вовлекается в регуляцию функционирования компонентов АОС, приводя к изменениям активностей, изоферментного состава и уровня мРНК генов, кодирующих изоформы антиоксидантных ферментов в растениях *Th. salsuginea*. Регуляторная роль Спм в функционировании компонентов АОС при стрессе может быть реализована через регуляцию общей активности ПАО и её изозимов. ПАО обеспечивает внутриклеточный баланс ПА и запускает реакции генерации молекул пероксида водорода, выполняющего сигнальные функции.

## ВЫВОДЫ

1. В оптимальных условиях выращивания растений *Th. salsuginea* экзогенный спермин (1-2 мМ) проявлял антиоксидантные свойства, что способствовало поддержанию редокс-баланса в клетках растений. В пользу данного положения свидетельствуют изменения общей активности и изоферментного состава супероксиддисмутазы, аскорбатпероксидазы и гваяколовых пероксидаз, увеличение в 2-3 раза уровней мРНК кодирующих их генов.

2. При окислительном стрессе, индуцированном пероксидом водорода, экзогенный спермин вовлекался в детоксикацию активных форм кислорода путем стимуляции активности и повышения уровней мРНК генов, кодирующих изозимы ключевых антиоксидантных ферментов. Также экзогенный спермин вызывал повышение содержания полиаминов и пролина – низкомолекулярных компонентов антиоксидантной системы, участвующих в индукции защитного ответа растений.

3. Подтверждена гипотеза о вовлечении спермина в регуляцию метаболизма пролина, обладающего антиоксидантными свойствами. Экзогенный спермин влиял на экспрессию генов биосинтеза и деградации пролина, что проявлялось в 2-х кратном повышении уровней мРНК генов, кодирующих ключевые ферменты его метаболизма и увеличении содержания пролина в корневой системе растений.

4. Регуляторная роль спермина в функционировании компонентов антиоксидантной системы при стрессе может быть реализована через регуляцию общей активности полиаминоксидазы и активностей ее различных изозимов, поскольку полиаминоксидаза обеспечивает внутриклеточный баланс полиаминов и запускает реакции генерации молекул пероксида водорода, выполняющих сигнальные функции.

5. Результаты опытов с использованием ингибитора активности полиаминоксидазы ( $\beta$  - hydroxyethyl hydrazine) свидетельствуют о ключевой роли данного фермента в поддержании постоянного содержания полиаминов, обладающих антиоксидантным и регуляторным действием, что проявляется в изменении спектра полиаминов при сохранении их общего содержания.

6. Подтверждена гипотеза о функционировании в растениях ПАОЗ-зависимой обратной конверсии высокомолекулярных полиаминов и продемонстрировано, что активность ПАОЗ регулируется экзогенным спермином. В пользу этой точки зрения свидетельствуют данные об изменении спектра полиаминов, повышении активности полиаминоксидазы и увеличении уровня мРНК гена *PAO3* на фоне действия экзогенного спермина



## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. **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.
5. **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.
6. **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.
7. 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.
8. 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.
9. **Королькова Д.В.**, Сошинкова Т.Н. (2013) The effect of exogenous spermine on the functioning of antioxidant enzymes and proline metabolism in

*Thellungiella salsuginea*. В сб.: *XX Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов - 2013»*. Москва, с. 297.

10. **Королькова Д.В.**, Сошинкова Т.Н., Радюкина Н.Л. (2013) Влияние спермина на функционирование антиоксидантной системы *Thellungiella salsuginea*. В сб.: *Пушинская международная школа-конференция молодых ученых*, Пушкино, с.274-275.

11. Сошинкова Т.Н., **Королькова Д.В.**, Радюкина Н.Л., Кузнецов Вл.В. (2013) Влияние пероксида водорода на функционирование антиоксидантной системы растений *Thellungiella salsuginea* В сб.: *Годичное собрание общества физиологов растений России «Инновационные направления современной физиологии растений»*, с. 340.

12. **Королькова Д.В.**, Радюкина Н.Л., Сошинкова Т.Н., Мапелли С., Кузнецов Вл.В. (2014) Влияние экзогенного спермина на функционирование антиоксидантной системы растений *Thellungiella salsuginea*. *Физиология растений*, 61, 69-76.