

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР «БИОРЕСУРСЫ»
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
Отдел биохимии и биотехнологии растений

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ
АСПЕКТЫ БИОХИМИИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ
РАСТЕНИЙ**

Сборник научных трудов
III Международной научной конференции
14–16 мая 2008 г., Минск

*К 50-летию Отдела биохимии
и биотехнологии растений*

Минск
«Издательский центр БГУ»
2008

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55
Т33

Научные рецензенты:

д-р биол. наук, проф., акад. НАН Беларуси *В. Н. Решетников*;
д-р биол. наук, проф. *В. М. Юрин*;
д-р биол. наук, проф. *В. Л. Калер*

Редакционная коллегия:

*В. Н. Решетников, О. П. Булко, И. И. Паромчик, Т. И. Фоменко,
Е. В. Спиридович, Т. В. Антипова*

Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений : сб. науч. тр. 3-й Междунар. науч. конф., 14–16 мая 2008 г., Минск : к 50-летию Отд. биохимии и биотехнологии растений / НАН Беларуси, Центр. ботан. сад [и др.] ; редкол. : В. Н. Решетников [и др.] . — Минск : Изд. центр БГУ, 2008. — 562 с.
ISBN 978-985-476-604-1.

В сборнике изложены результаты исследований по составу, свойствам, организации интерфазных клеточных ядер и пластид высших растений, путей регулярного воздействия на ядерный аппарат, включая реконструкцию генома с помощью трансгеноза. Представлены отдельные проблемы регуляции морфогенеза растительных клеток и микрклонального размножения некоторых культур, использования молекулярных маркеров в документировании ботанических коллекций. Рассмотрены биохимические основы практического использования растительных ресурсов.

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55

ISBN 978-985-476-604-1

© Центральный ботанический сад
НАН Беларуси, 2008

582.951.4:57.04:581.19:577.15

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕАЛИЗАЦИИ ПРОГРАММЫ ЛИСТОВОГО СТАРЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *NICOTIANA TABACUM*

2. ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В СТАРЕЮЩИХ ЛИСТЬЯХ

Кузовкова А.А., Шабуня П.С., Чумакова И.М., Спиридович Е.В.

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», г. Минск, 220012, ул. Сурганова, 2В e-mail: floraia@nm.ru

На трансгенных растениях табака, экспрессирующих ген β -1,4-глюканазу – один из генов, связанных со старением, исследовались особенности экспрессии антиоксидантных ферментов при реализации программы листового старения. Выявленные изменения в активности, вероятно, определяются модификациями экспрессии генов, кодирующих данные ферменты. Некоторые из экспрессируемых изоформ ПГТ и АПО, по-видимому, могут быть отнесены к продуктам генов SAGs. Активность других изоформ антиоксидантных ферментов в процессе листового старения ингибируется, что позволяет рассматривать данные изоформы как продукты генов SDGs.

Введение. В 1956 в своей «теории старения из-за свободных радикалов» Harman [1] впервые постулировал связь между формированием свободных радикалов и старением. Сегодня известно, что во время старения, например, при деградациии хлорофилла и мембран, происходит возрастание количества свободных радикалов и восстановленного кислорода (перекиси водорода). В то же время аккумуляция в клетке этих радикалов благодаря их токсической природе в свою очередь может вызывать процессы старения и соответствующие явления деградациии. Таким образом, окислительные процессы – важный компонент старения. Растения реагируют на них активацией антиоксидантных ферментов, таких как каталазы, супероксиддисмутазы (СОД) и компоненты аскорбат-глутатионового цикла, утилизирующие данные токсические метаболиты. Основным источником активных форм кислорода (АФК) в листьях являются хлоропласты. Избыточное формирование АФК вызывается нарушениями в электронтранспортных цепях. Также образование АФК индуцируется и такими процессами, свойственными старению, как активация пероксидаз в пероксисомах и активация связанных с мембранами липоксигеназ. Перекисное окисление липидов приводит к формированию свободных радикалов, которые в свою очередь инициируют возрастание количества этилена, вызывающего старение. Также показано, что усиленная аккумуляция в стареющих клетках радикалов является следстви-

ем не только повышенного образования радикалов, но и также потери компенсаторной функции антиоксидантных ферментов. Антиоксидантная способность и потенциальная продолжительность жизни, по-видимому, коррелируют между собой. В настоящее время одной из главных проблем для ученых является понимание скоординированной регуляции генов антиоксидантных ферментов. Например, показано, что в *Arabidopsis* существует сложный баланс между экспрессией генов каталазы и АПО [2]. Антиоксидантные ферменты кодируются целыми семействами генов с различной регуляцией, они локализованы в различных местах, их субстраты могут выступать в роли сигнальных молекул — все это очень усложняет понимание скоординированной регуляции данных ферментов в клетке в общем и в процессе старения, в частности.

Целью наших исследований было изучение особенностей экспрессии антиоксидантных ферментов при реализации программы старения на примере модельных трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, конститутивно экспрессирующих бактериальный ген *cel7*, относящийся к SAGs (senescence-associated genes) и кодирующий фермент β -1,4-глюканазу.

Материалы и методы исследований. Растения табака выращивали в колбах в стерильных условиях на 1/2 среде Мурасиге - Скуга [3] при температуре 22 – 25⁰С, освещенности 3-5 тыс.лк, 16-тичасовом световом дне. Исследовались листья 40- и 70-дневных растений. Выбор временных экспозиций обусловлен различным физиологическим состоянием растений (40-дневные – зрелые, 70-дневные – активно стареющие).

Общую фракцию легкорастворимых белков выделяли из листьев табака методом [4]. Щелочерастворимые белки экстрагировали 37,5 мМ трис-НСl буфером (рН 8.8) с 1 мМ аскорбиновой кислоты, кислоторастворимые белки – 0,1М ацетатным буфером (рН5.2). Буфера содержали ингибитор сериновых протеиназ 0,1мМ ФМСФ, за исключением буфера для экстракции протеаз. Выделение ядер и хлоропластов из листьев табака проводили как описано в [5]. Ядра лизировали 20мМ трис-НСl- буфером (рН 7.4) с 0,35М NaCl, хлоропласты – тем же буфером, но без соли [5]. Содержание белка в образцах определяли методом Bredford [6]. Активность пероксидаз гаваяколового типа (ПГТ) тестировали по Бояркину [7], используя в качестве хромогенного субстрата бензидин. Каталазную активность определяли по модифицированному нами методу на основе методов Chance, Maehly [8] и Aebi [9]. Субстратом фермента служила H₂O₂, приготовленная на 50мМ фосфатном буфере (рН7.0) по прописи из каталога фирмы «Sigma» [10]. Электрофоретическое разделение изопероксидаз и изокаталаз проводили методом вертикального электрофореза в 7,5% ПААГе в анодной буферной системе Девиса (система 1 по Мауреру [11]) в нативных условиях. Активность пероксидаз в гелях обнаруживали бен-

зидиновым методом по [4] в модификации Чаяновой и Хавкина [12]. Изоформы каталаз выявляли методом Woodbury et al. [13]. Электрофорез аскорбатпероксидаз проводили в тех же условиях, что и для пероксидаз и изокаталаз, но с модификациями Mittler, Zilinskas [14]. Активные изоформы СОД выявляли методом Beauchamp, Fridovich [14].

Результаты исследований и их обсуждение. Как видно из рис.1А, экспрессия ПГТ с R_f 0,39 - 0,59 не связана с листовым старением, тогда как в активности изоформ пероксидаз с R_f 0,12 - 0,22 есть существенные изменения. В стареющих листьях не экспрессируются ПГТ с R_f 0,17; 0,19 и 0,25 и снижается уровень экспрессии пероксидаз с R_f 0,12. Отдельного обсуждения заслуживает ПГТ с R_f 0,15. Данный изофермент высоко активен в листьях 40-дневных трансформантов табака *re2*, но совсем не экспрессируется в контроле на данном этапе развития. При этом в стареющих листьях трансгенных и контрольных растений активность данной изоформы практически одинакова. Интересна и изоформа ПГТ с R_f 0,59. Если в листьях 40-дневных контрольных растений и линии *re2* экспрессия данной изоформы идентична, то в листьях трансгенных растений в возрасте 70 дней она уже приблизительно в 2 раза выше, чем в контроле (сравнима с контрольным образцом в двойной концентрации белков). Анализ активности ПГТ в хлоропластах листьев трансгенных и контрольных растений табака показал, что с возрастом в данных органеллах происходит падение общей активности ПГТ (на 51,8% – в контроле и на 41,65% – в трансформанте *re2*). При этом, что примечательно, хлоропласты трансгенных растений проявляют сверхвысокую активность ПГТ по сравнению с контролем независимо от возраста. Несмотря на общее падение активности, в хлоропластах стареющих листьев трансформантов (рис. 1Б) на фоне слабой экспрессии пероксидаз с R_f 0,39; 0,42; 0,45; 0,50; 0,52 и 0,59 индуцирована *de novo* экспрессия новых изоформ ПГТ с R_f 0,36 и 0,62 и усилена активность изоформы с R_f 0,55. Последняя является главной изоформой хлоропластных ПГТ, по-видимому, в огромной степени формирующей суммарную ферментную активность. Интересно отметить, что спектр хлоропластных изоформ ПГТ включает 10 из 17 компонентов общей клеточной фракции. Используемый спектрофотометрический метод оценки активности ПГТ недостаточно чувствителен для исследования активности этих ферментов в ядрах листьев табака. Так, удалось оценить лишь активность ядерных ПГТ стареющих листьев табака, в листьях же 40-дневных растений она совсем не тестировалась. Это значит, что уровень активности ядерных ПГТ определенно увеличивается с возрастом растений. При этом установлено, что в ядрах трансгенных растениях активность ПГТ в 2 раза выше, чем в контроле, что косвенно говорит о наличии повышенных уровней перекиси водорода в данных органеллах

трансформанта. Дополнительно отметим, что, в целом, активность ядерных ПГТ в табаке существенно ниже, чем активность хлоропластных ПГТ, что и понятно, поскольку главными генераторами и аккумуляторами АФК и, в частности, перекиси водорода в клетке являются хлоропласты. Из-за низкой активности не удалось получить четкие зимограммы изоформ ядерных ПГТ табака, но, тем не менее, они (рис. 1В) подтвердили результаты спектрофотометрического исследования ферментной активности и даже позволили выявить 2 изоформы ПГТ с R_f 0,42 и 0,50 в ядрах 40-дневных растений линии ре2. В стареющих же листьях трансформанта экспрессируется еще одна изоформа ядерных ПГТ с R_f 0,08, тогда как в контроле – только две вышеописанные. Отметим также, что изоформы с R_f 0,42 и 0,50 присущи всем исследуемым нами структурам клетки табака – и ядру, и хлоропластам, и общей фракции легкорастворимых белков, тогда как ПГТ с R_f 0,08 – только ядру.

Таким образом, изоформы ПГТ с R_f 0,12; 0,17; 0,19 и 0,25 из общей фракции легкорастворимых белков листьев табака с определенной долей вероятности можно отнести к продуктам генов SDGs (senescence-downregulated genes), а изоформы с R_f 0,15 и 0,59 – к SAGs. В хлоропластах на роль продуктов генов SAGs претендуют ПГТ с R_f 0,36; 0,55 и 0,62, а в ядрах – ПГТ с R_f 0,08.

Электрофоретическое исследование общей фракции легкорастворимых белков 40-дневных листьев табака (рис. 1Д) с последующим выявлением каталазной активности показало, что для листовых клеток табака на данном этапе развития характерна экспрессия только одной изоформы с R_f 0,17. За 30 дней развития растения активность данной изоформы фермента уменьшается, особенно резко – в листьях трансгенных растений, где она не обнаруживается данным методом исследования вовсе. При этом в стареющих листьях контроля начинает экспрессироваться, но на слабом уровне, новая изоформа каталазы с R_f 0,51. Тенденция к снижению каталазной активности сохраняется и в хлоропластах (в контрольных растениях – на 34,48%, в линии ре2 - на 49,88 %). Следует отметить, что абсолютные значения активности каталазы в хлоропластах трансгенных растений выше, чем в контрольных независимо от возраста листьев. Интересно, что, по-видимому, существует определенная синхронизация работы хлоропластных ПГТ и каталаз в процессе листового старения. Электрофорез хлоропластных белков в нативных условиях с последующей специфической окраской геля подтвердил выявленную спектрофотометрически динамику изменения активности каталаз в хлоропластах листьев табака в процессе старения (рис. 1Е). Показано, что и контрольные, и трансгенные растения табака на исследуемых стадиях развития имеют

только одну изоформу с R_f 0,17. Эта же изоформа экспрессируется и в ядрах листовых клеток 40-дневных контрольных и трансгенных растений (рис. 1Ж). С возрастом в контроле ядерная каталазная активность снижается и уже не выявляется используемыми нами методами, тогда как в линии *re2* она все еще обнаруживается. Таким образом, можно заключить, что процесс физиологического листового старения сопровождается снижением активности ядерных каталаз, хотя в модельных трансгенных растениях данная тенденция менее заметна. Интересно, что, как и в случае с ПГТ, тестирование каталазной активности методом электрофореза белков оказалось намного чувствительнее, чем спектрофотометрический метод оценки уровня активности данных ферментов.

Другие значимые клеточные антиоксидантные ферменты – АПО и СОД. Нами установлено, что процессы листового старения табака сопровождаются усилением активности АПО (рис. 1Г). При этом, что интересно, в контрольных и трансгенных растениях табака экспрессируются разные изоформы АПО. Если в листьях 40-дневных растений линии реактивны только 2 минорные АПО с R_f 0,81 и 0,83, то в контроле к ним добавлены еще 2 мажорные изоформы с R_f 0,44 и 0,54. В листовых клетках 70-дневных трансгенных растений индуцируется активность двух совершенно иных мажорных АПО с R_f 0,49 и 0,62 и блокируется экспрессия минорных с R_f 0,81 и 0,83. В контроле же с возрастом наряду с ингибированием миноров наблюдается усиление мажоров, характерных для 40-дневных растений.

Таким образом, изоформы АПО с R_f 0,44; 0,49; 0,54 и 0,62 из общей фракции легкорастворимых белков листьев табака, вероятно, можно отнести к продуктам генов SAGs, а изоформы с R_f 0,81 и 0,83 – к SDGs.

Много непонятного в поведении СОД в процессе листового старения табака. Как видно из рисунка 13, в листьях 40-дневных контрольных растений есть 2 слабо экспрессирующихся изоформы СОД (с R_f 0,44 и 0,46), и их активность возрастает в процессе листового старения. В зрелых листьях линии *re2* обнаруживается только одна мало активная СОД с R_f 0,44, которая через 30 дней развития растения не регистрируется данным методом исследования. Если рассматривать листья 70-дневных контрольных растений как находящиеся на более ранних стадиях листового старения, а листья того же возраста у трансформантов – на более поздних в силу высокой экспрессии гена *cel7*, то можно предположить, что прогрессирование листового старения сначала связано с повышением активности СОД, а потом с существенным снижением, вероятно, даже ниже уровня активности в зрелых листьях. По этой же причине изоформы СОД нельзя однозначно отнести или к продуктам генов SAGs, или – к SDGs.

Таким образом, процесс листового старения в табаке, по-видимому, сопровождается снижением общей клеточной активности каталазы на фоне повышения в клетках активности АПО и снижения ПГТ в хлоропластах и повышения – в ядрах. При этом поведение СОД неоднозначно. Такие изменения в активности, вероятно, определяются модификациями экспрессии генов, кодирующих данные ферменты. Некоторые из экспрессируемых изоформ ПГТ и АПО с определенной долей вероятности могут быть отнесены к продуктам генов SAGs. Активность других изоформ антиоксидантных ферментов в процессе листового старения ингибируется, что позволяет рассматривать данные изоформы как продукты генов SDGs.

Литература

1. Zimmermann, P. The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development / P. Zimmermann, U. Zentgraf // Cellular and Molecular Biology Letters. – 2005. – Vol. 10. – P. 515-534.
2. Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) / P. Zimmermann [et al.] // Plant, Cell and Environment. – 2006. - Vol. 29. - P. 1049-1060.
3. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // Ibid. - 1962. - Vol. 15. - P.473-497.
4. Сафонов, В.И. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле / В.И. Сафонов, М.П. Сафонова // Биохимические методы в физиологии растений: Сб. ст./ Под ред. Ю.Г. Молотковского. - М.:Наука, 1971. - С. 113-119.
5. Техника биохимического исследования субклеточных структур и биополимеров растительной клетки / О.П. Булко [и др.]; под ред. А.С. Вечера. – Минск: Наука и техника, 1986. - С.11-24.
6. Bredford, M.M. A rapid sensitive method for the action of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein –dye binding / M.M. Bredford // Anal. Biochem. - 1976. - Vol. 72. - P. 248-254.
7. Гавриленко, В.Ф. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание. / Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М.; под ред. Б.А. Рубина. - Минск: Высшая школа, 1975. - С. 194-196.
8. Chance, B. Assay of catalases and peroxidases / B. Chance, A.C. Maehly // Methods in Enzymology. - 1955. - Vol. 2. - P. 764-773.
9. Aebi, H.E. Catalase / H.E. Aebi // Methods in Enzymatic Analyses / Ed. H.U. Bergmeyer - 1955. - Vol. 2. - P. 764-773.
10. Реактивы для биохимии и исследований в области естественных наук: каталог фирмы «Sigma» (США).- 1999.- С. 229.
11. Маурер, Г. Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле / Г. Маурер - Москва: Мир, 1971. - 247с.
12. Чаянова, С.С. Использование нейтрального полиакриламидного геля для изоферментного анализа пероксидаз и эстераз / С.С. Чаянова, Э.Е. Хавкин // Физиол. раст. - 1990. - Т. 37. - С. 1037-1039.
13. Woodbury, W. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes / W. Woodbury, A.K. Spencer, M.A. Stahmann // Anal. Biochem. – 1971. - Vol. 44. - P. 301-305.

14. Beauchamp, C. Superoxide dismutase. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels / C. Beauchamp, I. Fridovich // Analytical Biochemistry. - 1971. - Vol. 44. - P. 276-287.

Summary

Features of antioxidant enzymes expression during leaf senescence were investigated on transgenic plants of *Nicotiana tabacum* expressing β -1,4-glucanase (senescence associated gene). Revealed changes in activity are determined probably by modifications in expression of genes coding for these enzymes. Some of peroxidase and ascorbatperoxidase isoforms could be considered among products of SAGs. Activity of other isoforms of antioxidant enzymes is inhibited during leaf senescence and this fact allows considering these isoforms as products of SDGs genes.