

Специализированный учебно-научный центр (факультет) —
— школа-интернат имени А.Н. Колмогорова
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Курсовая работа:

*«Сравнение изоферментных спектров антиоксидантных
ферментов у арабидопсиса при холодовом закаливании этиленовых
мутантов *etr1-1* и *ein 2-1*».*

Карпов Никита Станиславович

Научный руководитель:

Синькевич Максим Сергеевич -

к.б.н., старший научный сотрудник

лаб. зимостойкости ИФР РАН

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ
ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ
ИМ. К.А. ТИМИРЯЗЕВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

2015-2016 гг.

Оглавление

Список сокращений	3
Список терминов.....	3
Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	6
1.1 Что такое холодовой стресс.....	6
1.2 Воздействие холода на растение.....	6
1.3 Причины образования АФК в норме и при стрессе.....	7
1.4 Ферменты антиоксидантной защиты	8
1.4.1 Супероксиддисмутаза.....	8
1.4.2 Каталаза	9
1.5 Акклиматизация и её роль.....	9
Глава 2. Методы и оборудование.....	12
2.1 Культивирование растений.....	12
2.2 Выделение белкового экстракта.....	12
2.3 Определение содержания белка в пробах.....	12
2.4 Определение активности супероксиддисмутазы.....	12
2.5 Определение изоферментного состава супероксиддисмутазы.....	13
2.6 Определение изоферментного состава каталазы.....	14
2.7 Статистическая обработка данных.....	15
Глава 3. Результаты и обсуждение.....	16
Выводы.....	21
Заключение.....	22
Список литературы.....	23

Список сокращений

АФК – активные формы кислорода

ОХС – окислительный холодовой стресс

СОД - супероксиддисмутаза

Cu /Zn-СОД - изоформа СОД, содержащая ионы меди и цинка как кофакторы

Fe-СОД - изоформа СОД, содержащая ионы железа как кофактор

Mn-СОД - изоформа СОД, содержащая ионы марганца как кофактор

КАТ – каталаза

ПОЛ – перекисное окисление липидов

Определения основных понятий и терминов, общепринятые в научной литературе.

Изоферменты – ферменты, катализирующие идентичные реакции, но отличающиеся друг от друга строением и каталитическими свойствами. Либо в качестве более широкого определения можно сказать, что это – множественные формы ферментов – включает как изоферменты, так и те формы ферментов, которые обладают свойствами изоферментов, но образуются в результате посттрансляционных модификаций. (Уилкинсон Дж., Изоферменты. 1968)

Стресс – быстрый неспецифический ответ организма на любой повреждающий фактор (Selie, 1955). Функционирование системы шокового ответа обеспечивает в течение короткого времени выживание растения при действии стрессора (Кузнецов, 1992)

Акклиматизация – развитие резистентных механизмов, способствующих выживанию организма в неблагоприятных условиях, в частности, при низких температурах.

Антиоксидантная защитная система – комплекс ферментов, катализирующих реакции детоксикации АФК, и низкомолекулярные соединения (метаболиты), обладающие свойствами поглотителей АФК.

Введение.

Холод является одним из основных факторов окружающей среды, ограничивающим ареалы обитания растений и отрицательно влияющих на продуктивность хозяйственно ценных культур. В ходе эволюции растения выработали эффективные физиолого-биохимические способы ответа на губительное влияние низкотемпературного стресса. Стрессовый сигнал воспринимается клеточными рецепторами и передается по цепи мессенджеров, приводя в конечном итоге к активации генов стрессового ответа. Продукты этих генов приводят к немедленному ответу на стресс либо к адаптации растения. Немедленный ответ может привести и к ингибированию роста или клеточной смерти (Mahajan and Tuteja, 2005), адаптация (или акклиматизация) же является основой устойчивости.

В 1985 году на шпинате впервые было показано, что под действием холода происходит изменение экспрессии некоторых генов (Guy et al., 1985). Затем было установлено, что в ответ на пониженные температуры происходит ряд процессов, известных как холодовая адаптация, или акклиматизация (Guy and Haskell, 1988). Как в течение года, так и в течение суток растения умеренных регионов подвергаются воздействию колебаний температур. В теплое время года их способность противостоять холоду невысока, однако с приходом осени устойчивость к холоду многих растений повышается. Пониженные температуры включают каскады генов, приводящих к накоплению метаболитов и структурных белков, позволяющих избежать повреждений клеток (Трунова, 2007).

Очевидно, что на холодостойкость влияет далеко не один каскад реакций, но их взаимосвязь друг с другом до сих пор не исследована на должном уровне. Широко известный физиологам растений гормон – этилен – отвечает за многие процессы, но его связь со стрессовыми реакциями, наступающими при охлаждении, практически не изучалась. В этой связи представляет интерес изучить закаливание растений, отличающихся по реакции на этилен. В качестве объекта были выбраны растения арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* Heinh (L.)) экотипа Columbia (Col-0) и его мутанты по рецептору этилена (etr 1-1) и элементу сигнального каскада (ein 2-1). Растения арабидопсиса являются подходящим объектом для изучения закаливания в связи с тем, что ареал данного вида очень широк и включает в себя территории от тропических до арктических, что демонстрирует широкую способность данного вида к температурной адаптации. Дополнительным полезным фактором является то, что геном арабидопсиса известен и позволит проводить дальнейшие исследования при обнаружении генов-кандидатов на изучение молекулярно-биологическими методами. В работе (Shi et al., 2012) указывается, что данные мутанты закаливаются лучше, чем неизмененный экотип (дикий тип), что предполагает негативную регуляцию адаптации этиленом.

Цель нашего исследования состоит в следующем - сравнить изоферментные спектры антиоксидантных ферментов у арабидопсиса при холодовом закаливании мутантов etr 1-1 и ein 2-1, выяснить активность рассмотренных изоформ и проверить предполагаемую негативную связь с этиленовой регуляцией.

Задачи:

- Получить данные о выживаемости изучаемых мутантов и дикого типа после воздействия повреждающей температуры
- Оценить интенсивность окислительных процессов в ходе закаливания (ПОЛ)
- Определить скорость генерации супероксидного аниона у мутантов и дикого типа
- Определение изоферментного состава и активности СОД
- Определение изоферментного состава и активности каталазы

Актуальность этой работы состоит в том, что в современном сельском хозяйстве требования к продуктивности выращивания культурных сортов растений постоянно растут, что подводит ученых, занятых этой отраслью, к вопросу о снижении влияния негативных факторов внешней среды на растения и на выведение морозоустойчивых видов в частности. Высоких результатов в данной области можно добиться посредством глубинного понимания процессов, происходящих в растительной клетке при понижении температуры.

Глава 1.

Обзор литературы.

1.1 Что такое холодовой стресс.

Как следует из определения стресса (Селье, 1972) в растении происходит неспецифическое изменение метаболизма, происходящее в три стадии:

1. Первичная стрессовая реакция
2. Адаптация
3. Истощение ресурсов надежности при слишком длительном или сильном воздействии

Поскольку у растений отсутствуют реакции на поведенческом уровне, основные адаптивные изменения проходят на физиологическом и биохимическом уровнях.

Явления, наблюдаемые в организме растения при воздействии стрессоров, можно разделить на две категории:

1. Повреждения
2. Ответные реакции, составляющими которых являются: изменение в ходе метаболизма, изменение физиологических функций тех или иных систем, а также изменение в активности экспрессии генов. (Н. А. Гаевский, Т. И. Голованова, В. М. Гольд - Избранные главы экологической физиологии растений, гл.2)

Последнее является самым важным в данном исследовании, так как именно активность экспрессии генов влияет на количество ферментов, вызывающих повышение морозостойкости, ферментов, задающих конформацию другим ферментам и т.д.

Холодовой стресс – это подвид стресса, проявляющий себя в чрезмерной выработке АФК, что приводит к окислительному повреждению мембран и мембранных органелл. В нашем случае адаптивная реакция предположительно заключается в том, что эффективность работы ферментов, ответственных за утилизацию АФК и их количество увеличивается. Также при этом происходят некоторые другие процессы, что в комплексе приводит к акклиматизации

1.2 Воздействие холода на растение

Для каждого вида растений существует свой диапазон оптимальных температур, и отклонение от пределов нормы этого оптимума является стрессом для организма. Повреждающее воздействие холодового стресса различно при действии: низких положительных температур и температур ниже 0°C.

При положительных субоптимальных температурах в первую очередь мембранные липиды переходят из жидкой ламеллярной фазы в состояние геля, что необратимо нарушает функции мембраны (Kawamura and Uemura, 2014). Снижение уровня ненасыщенности мембранных липидов повышает температуру, при которой происходит смена фаз и, следовательно, снижает текучесть мембран при низких температурах. Показано, что чувствительность растений к холоду коррелирует со степенью ненасыщенности тилакоидных мембран хлоропластов (Kawamura and Uemura, 2014). Фотосистемы хлоропластов подвергаются фотоиндуцированным повреждениям. Восстановление кислорода на фотосистеме I приводит к образованию активных форм кислорода: перекиси водорода H_2O_2 , гидроксильного радикала – OH, супероксидного аниона – O_2^- , синглетного кислорода – O_2 , которые являются сильными окислителями разнообразных компонентов клетки (Креславский и др., 2012). Происходят также нарушения процессов метаболизма, связанные с замедлением работы ферментов, закисление цитоплазмы (Kawamura and Uemura, 2014).

При падении температуры ниже 0°C первичной мишенью становятся мембранные системы клетки (Steponkus., 1984). Образование льда в симпласте смертельно для клетки, в то время как лед в апопласте может не приводить к гибели растения. Формирование кристаллов льда начинается в межклеточном пространстве, где концентрация солей ниже, следовательно, выше температура замерзания. Необходимо отметить, что лед образуется в симпласте при температурах, близких к –38.5°C. Кристаллизация льда в апопласте происходит вокруг ядер кристаллизации (Franks, 1985). Так как химический потенциал льда меньше, чем водный, формирование внеклеточного льда приводит к выходу воды из клетки по градиенту химического потенциала. При -10°C более 90% воды выходит из клетки. Обезвоживание или комбинация обезвоживания и механического стресса, причиняемого кристаллами льда, приводит к тесному сближению плазматической мембраны с мембранами внутриклеточных органелл или дистальными участками плазматической мембраны, что вызывает формирование гексагональных структур из липидов (Kawamura and Uemura, 2014). Затем, как правило, мембраны сливаются либо разрываются, приводя к необратимым клеточным повреждениям (Steponkus, 1984). Также происходит денатурация белков (Kawamura and Uemura, 2014).

1.3 Причины образования АФК в норме и при стрессе

АФК образуются в клетке и в процессе нормальной жизнедеятельности организма. В нормальных условиях основными источниками АФК в растениях служат процессы фотосинтеза и фотодыхания (Foyer and Noctor, 2005). Было показано также, что процессы окисления низкомолекулярных субстратов в митохондриях и окисление белков в цитоплазме и других органеллах также вносят ощутимый вклад в нарушение окислительно-восстановительного баланса клетки в нормальных условиях (Kristensen et al., 2004). Существует также белковый путь образования АФК, связанный с работой (Блохина и др., 2003). Традиционно, АФК рассматриваются в первую очередь, как радикалы, повреждающие клеточные структуры. Радикалы – это атомы или группы атомов, содержащие неспаренные электроны. Радикалы как высокореактивные соединения могут участвовать в ряде клеточных процессов в отсутствие ферментов. Эти свойства очень хорошо подходят для активации сигнальных каскадов (Foyer and Noctor, 2005). К АФК относят радикалы, получающиеся при отщеплении или присоединении электронов к молекуле кислорода.

АФК в подавляющем количестве образуются в нескольких органеллах, так или иначе связанных с теми реакциями, в которых принимает участие кислород. Это хлоропласты, митохондрии и пероксисомы.

Хлоропласты – главное место образования АФК в растительной клетке. В результате Нарушение цепи переноса электронов в этой органелле, является причиной образования супероксид-радикала. Синглетный кислород образуется при переносе электрона на кислород с возбужденного хлорофилла в фотосистеме II. Молекула пигмента в возбужденном состоянии передает электрон на кислород и при взаимодействии триплетного пигмента с кислородом образуется синглетный кислород и пигмент в невозбужденном стабильном состоянии.

Пероксисомы – это дополнительный источник АФК, которые образуются за счет процесса фотодыхания или окисления жирных кислот. Фотодыхание, как известно, тесно связано с фотосинтезом. При ухудшении фиксации CO_2 в хлоропластах повышается оксигеназная активность рибулозо-1,5-бифосфат карбоксилазы/оксигеназы. Гликолят, образовавшийся в этой реакции, поступает в пероксисомы, где окисляется с образованием H_2O_2 как побочного продукта.

Дыхательная цепь митохондрий также служит источником супероксид-радикала и H_2O_2 . Образование АФК в митохондриях происходит не так активно, чем в хлоропластах. Но, тем не менее, митохондрии вносят существенный вклад в регуляцию клеточных процессов. АФК образуются и в других клеточных органеллах, но там их выработка много меньше, чем в вышеописанных.

Растения постоянно поддерживают баланс между образованием и разрушением АФК. Ухудшение условий существования нарушает этот баланс из-за повышения уровня активных радикалов и накопления перекисных соединений. Образование АФК в изменившихся условиях – очень быстрый процесс, секунды или минуты в зависимости от растения или вида растительной ткани. Поскольку АФК способны реагировать с большим количеством соединений и являются инициаторами цепи радикальных реакций, в которых

образуются все новые и новые радикалы. Такие реакции можно остановить при помощи «ловушек» радикалов, которыми могут служить ферменты, способные присоединять радикал без образования нового. В результате действия таких веществ образуется стабильное соединение, и радикальная реакция обрывается. Атаке активными радикалами чаще всего подвергаются липиды мембран (окисление полиненасыщенных жирных кислот) (Блохина и др., 2003).

1.4 Ферменты антиоксидантной защиты.

В защите растения от АФК принимают участие самые разнообразные ферменты с самыми разнообразными функциями, но мы рассмотрим лишь два фермента – те, которые мы выбрали в качестве объектов исследования. Это СОД и каталаза.

1.4.1 СОД

СОД является одним из важнейших ферментов первой линии антиоксидантной защиты. Её изоформы локализованы в различных органеллах клетки: хлоропластах, митохондриях, пероксисомах, цитозоле и апопласте (Полесская, 2007). Этот фермент присутствует во всех живых организмах, но только у растений есть все три его изоформы (Бараненко, 2006). Механизм действия СОД заключается в последовательном восстановлении и окислении супероксидными анион-радикалами металла (Me) активного центра фермента. Реакция может протекать спонтанно, но в присутствии фермента скорость повышается в 10000 раз (Бараненко, 2006).

Всего СОД в растении имеет 3 изоформы, которые отличаются по металлу в активном центре: Cu/Zn-СОД, Fe-СОД, Mn-СОД. Что интересно, эти изоформы отличаются ещё и локализацией в клетке, устойчивостью к ингибиторам, молекулярной массой, количеством субъединиц в белке и количеством атомов металлов в активном центре. (Бараненко, 2006). Так, например, Cu/Zn-СОД содержится в хлоропластах, пероксисомах, митохондриях, цитозоле и апопластах, восприимчива к CN^- группе и перекиси как к ингибитору. Цитозольная Cu/Zn-СОД является гомодимером, состоящим из двух равного размера субъединиц, связанных нековалентно (масса изоформы колеблется в пределах 32-34 кДа), хлоропластная изоформа растений является гомотетрамером. Fe-СОД локализована лишь в хлоропластах и ингибируется перекисью. Молекула Fe-СОД работает в форме гомодимера, в хлоропластах она имеет молекулярную массу 36-46 кДа. Mn-СОД располагается только в митохондриях и пероксисомах и абсолютно невосприимчива к ингибиторам. Молекулярная масса фермента 46 или 92 кДа и он состоит соответственно из 2 или 4 субъединиц одинакового размера (Бараненко, 2006). Количество изоформ колеблется у различных видов растений. Так в клетках листьев кукурузы обнаружено 9 изоформ СОД: 4 Cu/Zn-СОД в цитоплазме, 1 Cu/Zn-СОД в хлоропластах и 4 Mn-СОД в митохондриях. В *Arabidopsis thaliana* обнаружено 3 Cu/Zn-СОД, 1 Mn-СОД и 3 Fe-СОД (Jithesh et al., 2006).

1.4.2. Каталаза

Говоря о каталазе, можно сказать о том, что она широко распространена в растительных клетках: в пероксисомах, митохондриях и в цитоплазме – и состоит из 2 компонентов: собственно из белка и из железосодержащего гематина. Молекулярная масса каталазы приблизительно равна 220-270 кДа. Активность данного фермента не зависит от концентраций перекиси, действует очень быстро: 44000 молекулы в секунду, что позволяет каталазе участвовать не только в своей антиоксидантной деятельности, но и в снабжении кислородом отдаленных тканей растения. В настоящий момент известно 5 изоформ, некоторые из которых кодируются посредством разных мРНК, а не только подвергаются посттрансляционной модификации, согласно некоторым исследованиям. При этом каталаза подвергается протеолизу, причем разница между каталазой подвергшейся протеолизу и между целостным ферментом составляет 2 кДа.

1.5 Акклиматизация и её роль

Совокупность ответных реакций на стресс называется акклиматизацией. Основной характеристикой данного процесса можно назвать независимость условий окружающей среды от действий растения, то есть невозможность избежать воздействия стрессорного агента. Возникает необходимость в антиоксидантах, связанная с тем, что они позволяют предотвратить повреждение жирнокислотных остатков с образованием токсичных пероксидных продуктов или нейтрализовать уже образовавшиеся опасные вещества. В такого рода условиях растение вынуждено разработать определенный комплекс ответа, который будет обладать максимальной эффективностью в узком диапазоне воздействия. (Н. А. Гаевский, Т. И. Голованова, В. М. Гольд – Избранные главы экологической физиологии растений, гл. 2). Это возвращает нас к частному случаю применения изомерных форм одного и того же фермента в разных условиях.

Закаливание – это, *de facto*, чрезвычайно мягкий вариант стресса, при котором происходит относительно небольшая нагрузка на антиоксидантную систему. В результате процесса закаливания морозоустойчивость организма резко повышается. Собственно процесс закаливания требует комплекса внешних условий и проходит в две фазы.

Первая фаза закаливания проходит на свету при несколько пониженных плюсовых температурах (ночью около 2°C) и умеренной влажности. В эту фазу продолжается дальнейшее замедление, и даже полная остановка ростовых процессов. Особенное значение в развитии устойчивости растений к морозу в эту фазу имеет накопление веществ-криопротекторов, выполняющих защитную функцию: сахарозы, моносахаридов, растворимых белков и др. (И.И. Туманов, 1979) В этих условиях образование сахаров в процессе фотосинтеза идет с достаточной интенсивностью. Вместе с тем пониженная температура сокращает их трату, как в процессе дыхания, так и в процессах роста. Более морозостойкие виды и сорта характеризуются большей способностью к накоплению сахаров именно при пониженной температуре. Показано, что накапливающиеся в процессе закаливания сахара локализируются в разных частях клетки: клеточном соке, цитоплазме, органеллах (особенно хлоропластах). Благодаря такому распределению часть сахаров прочно удерживается в клетках.

Повышается содержание ненасыщенных жирных кислот. Это позволяет поддерживать высокую проницаемость мембран, необходимую для транспорта воды. Происходит перестройка ферментных систем процесса дыхания, возрастает альтернативный путь дыхания, что усиливает рассеивание энергии в виде тепла. Влияние света в первую фазу закаливания не ограничивается увеличением накопления сахаров, помимо этого свет оказывает регуляторное влияние. Это подтверждается тем, что этиолированные растения не способны к закаливанию даже при обогащении их сахарами. Среди механизмов адаптации к действию пониженных температур — синтез ряда стрессовых белков, к которым относят десатуразы, дегидрин, а также белки холодового шока. Эти гидрофильные белки синтезируются в цитоплазме под действием низких температур и выделяются в клеточную стенку. БХШ располагаются на поверхности кристаллов льда, препятствуют их росту, тормозят образование межклеточного льда. БХШ разобщают окислительное фосфорилирование, что позволяет использовать энергию окисления на повышение температуры органов растений на 4-7°C выше окружающего воздуха.

Вторая фаза закаливания протекает при дальнейшем понижении температуры (около 0°C) и не требует света. В связи с этим для травянистых растений она может протекать и под

снегом. В эту фазу происходит отток воды из клеток, а также перестройка структуры протопласта. Продолжается новообразование специфических, устойчивых к обезвоживанию белков. Опыты показали, что в присутствии ингибиторов синтеза белка процесс закаливания не происходит (Трунова, 2007). Перестройка цитоплазмы способствует увеличению ее проницаемости для воды. Благодаря более быстрому оттоку воды уменьшается опасность внутриклеточного льдообразования. Не для всех растений необходимо протекание процессов закаливания в две фазы. У древесных растений, обладающих достаточным количеством сахаров, сразу протекают изменения, соответствующие второй. Таким образом, в процессе закаливания возникает морозоустойчивость, которая определяется рядом изменений. У закаленных растений благодаря высокой концентрации клеточного сока, уменьшению содержания воды кристаллы льда образуются не в клетке, а в межклетниках. Количество образовавшегося в межклетниках льда у закаленных растений также значительно меньше.

Изменение свойств белков цитоплазмы приводит к тому, что они становятся более устойчивыми к обезвоживанию. Накопление сахаров оказывает дополнительное защитное влияние. Важное значение имеет повышение устойчивости мембран к обезвоживанию и механическому давлению. Имеются данные, что при закаливании увеличивается количество фосфолипидов и ненасыщенных жирных кислот. Важно отметить, что в клетках закаленных растений накапливается АТФ. Чем больше развитие указанных признаков у отдельных видов и сортов растений, тем выше их морозоустойчивость. Морозоустойчивость — комплексный признак, запрограммированный генетически, однако он проявляется в определенных условиях среды. (И.И. Туманов, 1979, Трунова Т. И., 2007)

Методы и Оборудование

Культивирование растений.

Растения выращивали в почвенной культуре. В качестве грунта использовали субстрат на основе верхового торфа «Агробалт-С» («Росторфинвест», Россия). Подкормку осуществляли один раз в неделю, используя готовую минеральную смесь «Люкс» («Fertika», Россия). Культивирование производилось в камере фитотрона Института физиологии растений РАН при фотопериоде 8 ч света/16 ч темноты и интенсивности освещения 100 мкмоль фотонов/(м²*с). В качестве источника света использовали белые лампы дневного света LB-40. Температура в камере поддерживалась на уровне 22°C. Обработку растений действием пониженной температуры проводили в климатической камере KBW-240 («Binder», Германия) в условиях 8/16 – фотопериода и освещенности 50 мкмоль квантов света/(м²*с) при температуре 2°C. Такой режим закаливания был подобран ранее в нашей лаборатории (Астахова и др., 2014) и позволяет снизить температуру гибели 50% растений с -3°C до -6°C.

Выделение белкового экстракта.

Для выделения белка навеску листьев массой 500 мг гомогенизировали в жидком азоте, помещали в виде замороженной пыли в предварительно охлажденную пробирку и добавляли 1 мл среды выделения, содержащей 50 мМ Трис-HCl (pH 7,6), 3 мМ ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), 250 мМ сахарозы, 5 мМ аскорбиновой кислоты, 3 мМ MgCl₂, 2 мМ ДТТ (дитиотрейтол), 2 мМ ФМСФ (фенилметилсульфонилфторид). Все операции по выделению белка проводили на холоде. Образцы центрифугировали в течение 20 мин при 16000 g и 4°C (13000 об/мин, центрифуга Eppendorff 2415R). Супернатант очищали на колонках PD-10 midiTrap G-25 («GE Healthcare», США). Колонки предварительно промывали 15 мл охлажденного 50 мМ Трис-HCl (pH 7,6), затем загружали 1 мл супернатанта, промывали 1,5 мл того же буфера и собирали 1,5 мл элюата. Полученный элюат использовали для определения содержания белка, общей активности антиоксидантных ферментов и проведения нативного электрофореза.

Определение содержания белка в пробах.

Содержание белка в пробах оценивали на основании реакции с бицинхониновой кислотой с использованием BCA kit («Sigma»), согласно инструкции производителя. Для этого смешивали в соотношении 50:1 «Реагент А» (бицинхониновая кислота, карбонат натрия, тартарат натрия, гидрокарбонат натрия в 0,1 Н гидроксиде натрия) и «Реагент В» (4% раствор пентагидрата сульфата меди (II)). К 0,5 мл полученного раствора добавляли 25 мкл белкового экстракта и инкубировали 30 мин при 37°C. Поглощение раствора измеряли при длине волны 562 нм на спектрофотометре Genesys 10 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) с использованием кюветы с длиной оптического пути 1 см. Количество белка в пробе рассчитывали по стандартной калибровочной кривой с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта.

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД).

Активность СОД определяли методом (Beauchamp, Fridovich, 1971; Kumar, Knowles, 1993) с небольшими изменениями. Принцип определения основан на генерации супероксидных

анион-радикалов в реакции фотоокисления рибофлавина. При этом индикатор – нитросинийтетразолий переходит в восстановленную форму – формазан, имеющую интенсивное сине-фиолетовое окрашивание. СОД конкурирует с нитросинимтетразолием за супероксидные анион-радикалы, поэтому при активной работе фермента окрашивание раствора менее выражено.

Для определения активности супероксиддисмутазы готовили два типа реакционных смесей. Опытные пробы содержали фосфатный буферный раствор (60 мМ KH_2PO_4 – Na_2HPO_4 , pH 7,5); 13 мМ метионина, 63 мкМ нитросинеготетразолия, супернатант, 4 мкМ рибофлавина. Пробы для контроля вместо супернатанта содержали аналогичные объемы буферного раствора. Пробы инкубировали на протяжении 30 мин при температуре 22°C на белом свете при интенсивности освещения 100 мкмоль/(м²*с). Далее измеряли оптическую плотность раствора при $\lambda=560$ нм на спектрофотометре Genesys 10 (ThermoFisherScientific, Inc.) против реакционной смеси без добавления растительного образца и не подвергавшейся освещению. За единицу активности супероксиддисмутазы брали 50% ингибирование окрашивания раствора.

Активность рассчитывали по формуле:

$$A = \lg \frac{D_c}{D_o} / (\lg 2 * m), \text{ где}$$

A – активность супероксиддисмутазы (ед. акт./мг белка; ед. акт./г сырой массы);

D_c – значение оптической плотности светового контроля при 560 нм (ед. опт. плотности);

D_o – значение оптической плотности опытного раствора при 560 нм (ед. опт. плотности);

m – масса белка (мг), вносимого в реакционную смесь, для расчета активности СОД (A) в ед. акт./мг белка или сырая масса исходной навески (г), приходящаяся на объем суспензии, вносимой в реакционную смесь для расчета A в ед. акт./г сырой массы.

Определение изоферментного состава супероксиддисмутазы (СОД).

Для определения изоферментного состава СОД проводили электрофорез по методу Davis (1964) в 15% разделяющем геле на приборе Mini PROTEAN Tetra (“Bio-Rad”, США); толщина геля – 1 мм. Один гель состоял из 0,5 мл пробки, 4 мл разделяющего геля и 1 мл концентрирующего геля. Раствор для заливки разделяющего геля готовили на два геля из стоковых растворов следующим образом: смешивали 2 мл Трис-НСl-буфера, (1,5 М, pH = 8,8) и 4 мл 30% акриламида (29,2% акриламида, 0,8% бисакриламида). Далее добавляли 2 мл дистиллированной воды. Для запуска полимеризации вносили 5 мкл тетраметилэтилендиамина (ТЕМЕД) и 25 мкл 10% раствора персульфата аммония. Для приготовления 4% концентрирующего геля смешивали 0,5 мл Трис-НСl-буфера (1,5 М, pH = 6,8), 0,535 мл 30% раствора акриламида и добавляли 2,965 мл дистиллированной воды. Для полимеризации добавляли 5 мкл ТЕМЕД и 30 мкл 10% персульфата аммония. В лунки вносили 30 мкг белка с добавлением 225 мг/мл сахарозы для “утяжеления” образца и 2 мкл/мл 0,5% бромфенолового синего. В качестве электродного использовали Трис-Глициновый буферный раствор (0,025 М Трис, 0,192 М глицин, pH = 8,3). Электрофорез проводили при 4°C в течение 2 ч при напряжении 180 В с использованием источника тока PowerPac™ UniversalPowerSupply («Bio-Rad», США). Для проверки эффективности выравнивания белковых проб один из гелей окрашивали в течение 1 ч 0,1% Кумасси G-250, предварительно зафиксировав его в течение 30 мин в растворе, в состав которого входили 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3% H_3PO_4 и 20% этанол, согласно процедуре (Candiano et al., 2004).

Для визуализации изоферментов СОД использовали метод (Beauchamp, Fridovich, 1971) в модификации (Miszalski et al., 1998). Гели инкубировали в растворе Трис-НCl буфера (60 мМ, pH 7,6) с добавлением 30 мкМ рибофлавина и 245 мкМ нитросинеготетразолия в течение 30 мин в темноте на качалке. Затем гели промывали буферным раствором и переносили на свет, где они приобретали фиолетовую окраску (примерное нормальное время реакции – 15 мин), а участки геля, в которых проявлялась активность СОД, оставались прозрачными. Гели сканировали, инвертировали и анализировали с помощью программы 1DScan (“Scanalytics, CSP Inc.”); об активности СОД судили по степени обесцвечивания фона.

Определение активности каталазы

Активность каталазы измеряли по скорости деградации H_2O_2 согласно методике (Kumar, Knowles, 1993) с модификациями (Синькевич и др., 2011). Для этого добавляли 100 мкл белкового экстракта к 2,8 мл фосфатного буфера (60 мМ; $KH_2PO_4 - Na_2HPO_4$, pH 7,0). Запускали реакцию добавлением 100 мкл 0,1 мМ перекиси водорода и измеряли поглощение на спектрофотометре Genesys 10 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) при $\lambda = 240$ нм через каждые 10 секунд. Контролем служил фосфатный буфер с добавлением 100 мкл 0,1 мМ перекиси водорода. Активность каталазы рассчитывали по формуле:

$A = (\Delta D \cdot V_{cp}) / (m \cdot e)$, где:

A – активность каталазы (М разложившейся перекиси/ (г сыр. массы*мин); М разложившейся перекиси/ (мг белка*мин);

ΔD – скорость изменения оптической плотности при 240 нм (у.е./мин),

V_{cp} – объем реакционной среды, при данной схеме эксперимента $V_{cp} = 3$ мл;

m – сырая масса (г), приходящаяся на 0,3 мл белкового экстракта при расчете активности в М разложившейся перекиси/ (г сыр. массы*мин) или масса белка (мг), приходящаяся на 0,3 мл белкового экстракта для расчета активности в М разложившейся перекиси/ (мг белка*мин),

e – коэффициент молярной экстинкции перекиси $e(240) = 45,2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Определение изоферментного состава каталазы.

Для определения изоферментного состава каталазы проводили электрофорез по методу Davis (1964) как описано выше в 10% полиакриламидном геле на приборе Mini PROTEAN Tetra (“Bio-Rad”, США); толщина геля – 1 мм. В лунки вносили по 30 мкг белка с добавлением сахарозы для “утяжеления” образца и 2 мкл 0.5% бромфенолового синего. Электрофорез проводили при 4°C в течение 20 ч. при напряжении 80 В. Для проверки эффективности выравнивания белковых проб один из гелей окрашивали в течение 1 ч 0,1% Кумасси G-250, предварительно зафиксировав его в течение 30 мин в растворе, в состав которого входили 10% $(NH_4)_2SO_4$, 3% H_3PO_4 и 20% этанол, согласно процедуре (Candiano et al., 2004).

Окрашивание геля производили по схеме (Woodbury et al., 1971) в модификации (Zimmermann et al. 2006). Метод основан на восстановлении гексацианоферрата (III) калия ($K_3(Fe(CN)_6)$) перекисью водорода до гексацианоферрата (II) калия ($K_4(Fe(CN)_6)$) и последующей реакцией гексацианоферрата (II) калия с хлоридом железа (III) ($FeCl_3$) с образованием окрашенного соединения – берлинской лазури. Каталаза разлагает перекись, поэтому в местах ее расположения окрашивания не происходит. Для визуализации изоферментов каталазы гель инкубировали в 4 мМ растворе перекиси

водорода в Трис-HCl буфере (50 мМ, рН 7.6) в течение 5 мин, промывали в буферном растворе и затем проводили специфическое окрашивание на активность каталазы в растворе, содержащем 1% гексацианоферрата (III) калия и 1% хлорида железа (III). Гели инкубировали в растворе для окрашивания до появления светлых полос на зеленом фоне (примерное нормальное время реакции – 5 мин). Гели сканировали, инвертировали и анализировали с помощью программы 1DScan (“Scanalytics, CSP Inc.”); об активности каталазы судили по степени обесцвечивания фона.

Статистическая обработка данных.

Данные обработаны статистически с использованием программы SigmaPlot. Представлены средние значения типичного опыта, состоящего из, как минимум трех биологических повторностей ($n \leq 3$) и их стандартные ошибки. Каждая биологическая повторность состояла из листьев, взятых с 3-5 растений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для начала необходимо было убедиться, что в результате выбранного режима охлаждения растения арабидопсиса закаливались, т.е. приобретали повышенную по сравнению с незакаленным контролем устойчивость к последующему, более жесткому, охлаждению. Для этого растения на различных стадиях закаливания подвергали промораживанию при -3°C в течение суток и оценивали выживаемость как визуально, так и по дальнейшей способности к зацветанию.

Рисунок 1

Внешний вид растений после промораживания при -3°C в течение суток. Справа – незакаленные, в центре – после 1 суток закаливания, слева – после 2 суток закаливания.



Как видно из фотографии, растения стали способны переносить суточное промораживание уже после двух суток закаливания. При промораживании растений после 3-5 суток закаливания повреждений не наблюдалось.

В качестве показателей окислительного стресса в данной работе использовали скорость генерации супероксидного анион-радикала и интенсивность ПОЛ.

Рисунок 2

Скорость генерации супероксидного анион-радикала в динамике закаливания

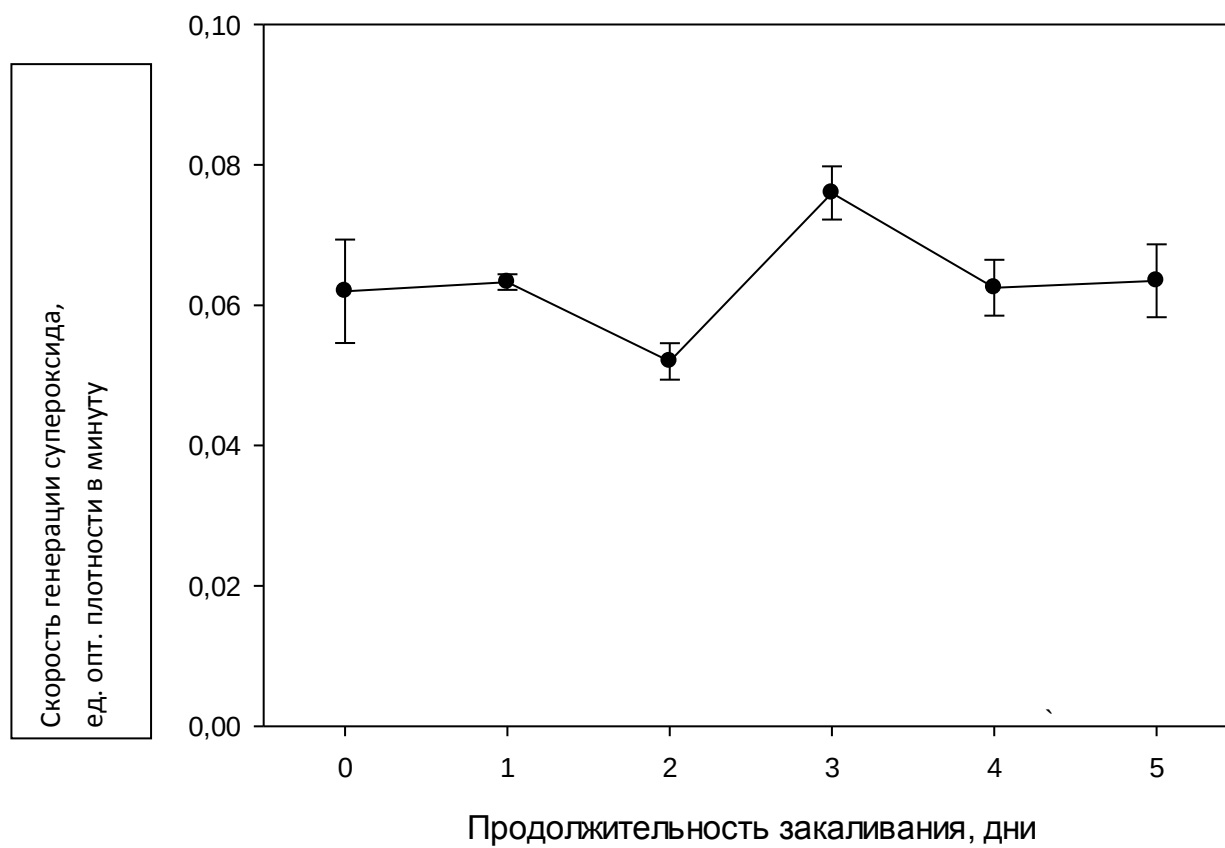


Таблица 1

Интенсивность ПОЛ у экотипа Col-0, и мутантов по этилену: *etr 1-1*, *ein 2-1* после продолжительного закаливания при 2°C [ед. оптической плотности при длине волны 532 нм], 2 повторности по 4 растения

	Col-0	Etr 1-1	Ein 2-1
После 3 суток	0,071	0,052	0,053
	0,064	-	0,108
После 4 суток	0,065	0,053	0,074
	0,086	0,072	0,078
После 5 суток	0,059	0,040	0,076
	0,070	0,070	0,073
незакаленные	0,078	0,044	0,044
	0,056	0,045	0,058

Из данных таблицы следует, что интенсивность ПОЛ держится у закаленных мутантов на уровне или несколько ниже уровня дикого типа (*Columbia*), что первично подтверждает данные (Shi et al., 2012) о негативной регуляции (подавлении) этиленовым каскадом процессов, способствующих защите растений от охлаждения.

Рисунок 3

Изоферментный спектр СОД арабидопсиса дикого типа на 3-5 сутки

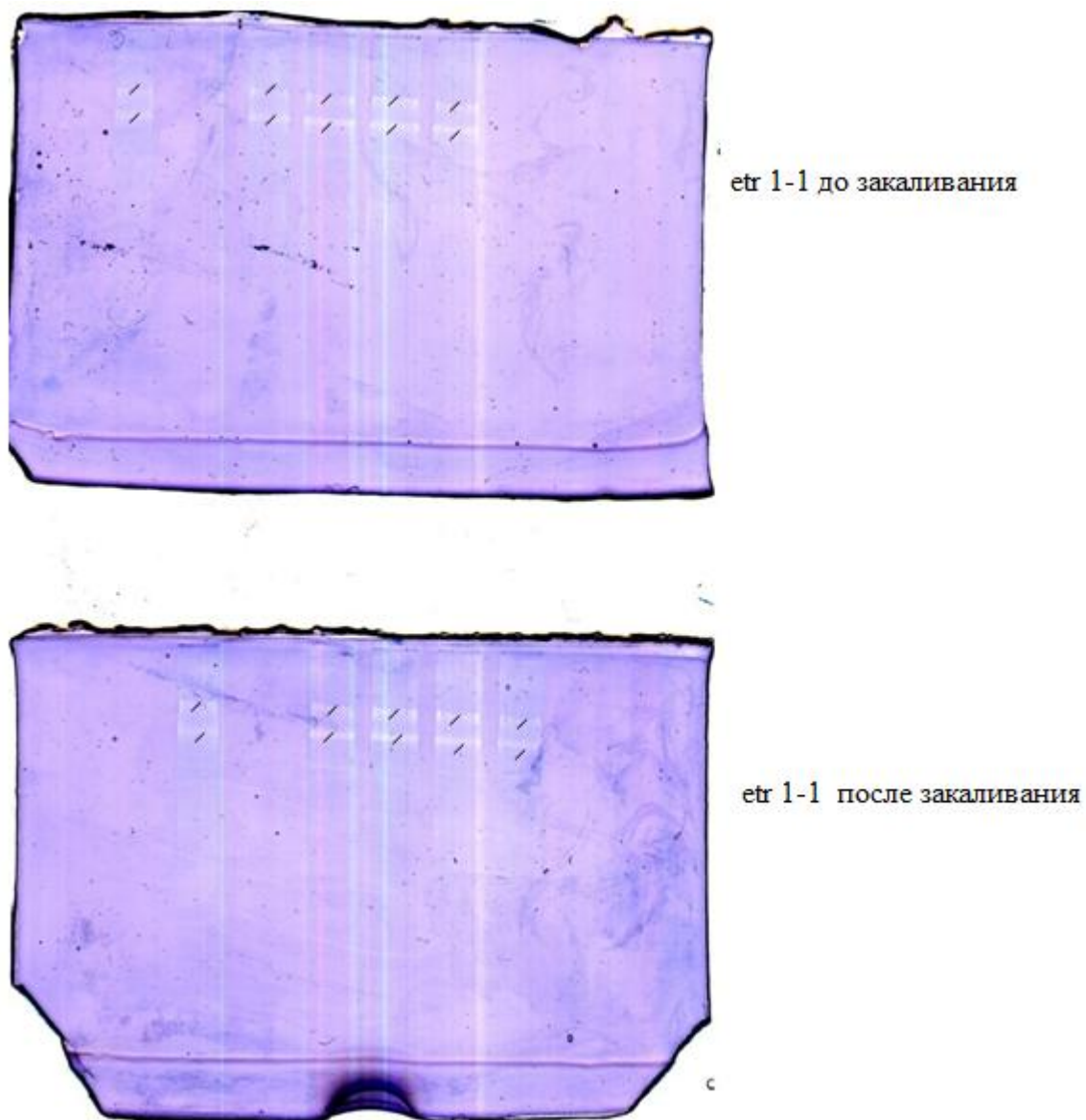


3 сутки закаливания 5 сутки закаливания

Из рисунка следует, что в процессе закаливания присутствие и активность различных изоформ меняется, что означает активацию или, наоборот, выключение соответствующих генов в процессе стрессового ответа. Мы показали, что некоторые СОД зависят от холодового закаливания. Тем не менее, анализ активности и ингибиторный анализ кофакторов (определение типовой принадлежности СОД) является делом дальнейших экспериментов.

Рисунок 4

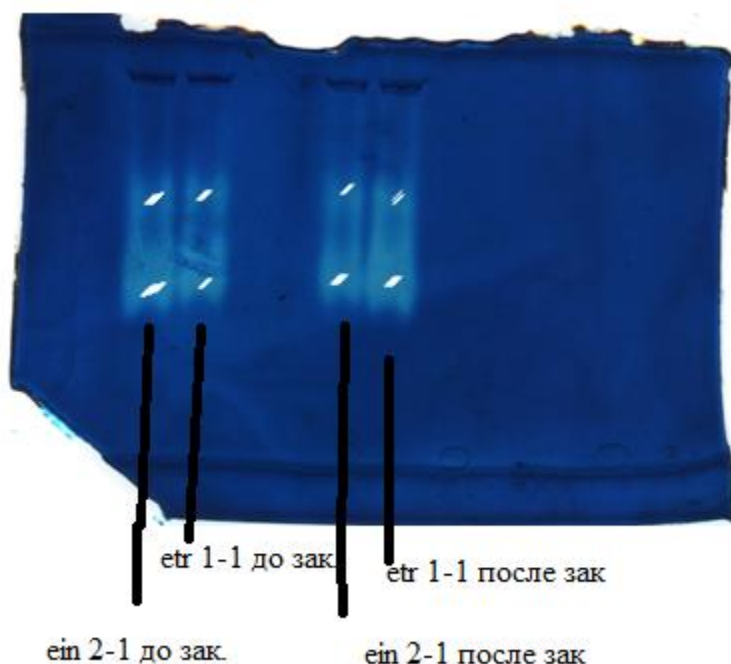
Изоферментный спектр СОД мутантных растений арабидопсиса *etr 1-1* до и после промораживания в динамике закаливания (незакаленные, _ , 1, 3, 4, 5 сутки)



В отличие от растений дикого типа, у обоих мутантов присутствие всех изоформ СОД было, по-видимому, постоянным, что подразумевает зависимость регуляции генов изменяющихся изоформ СОД от этиленового сигнального каскада. Предположительно, сигнальный каскад этилена отвечает за временное подавление активности некоторых изоформ

Рисунок 5

Спектр каталазы мутантов арабидопсиса (ein 2-1, etr 1-1) до и после 5 суток закаливания



Из рисунка следует, что активности каждой из двух изоформ каталазы (яркость соответствующего пятна) была различной у мутантов как до, так и после закаливания. Тенденции изменений активности были также разнонаправлены: активность каталазы у мутанта по рецептору была изначально выше, затем снижалась, активность каталазы мутанта по промежуточному белку каскада изначально была ниже, но повышалась в результате закаливания. Поскольку ein 2-1 – белок, задействованный не только в каскаде этилена, но и, частично, в каскаде оксида азота, можно сказать, что полное выключение обоих каскадов вследствие мутации позволяет каталазе накапливаться в процессе закаливания.

Выводы:

- Уровень экспрессии разных изоформ каталазы и СОД и их активность в мутантах etr 1-1 и ein 2-1 и в диком типе существенно отличается в закаленных и незакаленных растениях у каждого мутанта соответственно.
- Полное выключение обоих каскадов у мутанта ein 2-1 позволяет каталазе накапливаться в процессе закаливания.
- В процессе закаливания присутствие и активность различных изоформ меняется, что означает активацию или, наоборот, выключение соответствующих генов в процессе стрессового ответа

Заключение

Итак, в данной работе мы попытались подтвердить негативную этиленовую регуляцию через способность мутантов по генам этиленового каскада и сигнального элемента двух каскадов закаливаться. Также мы провели анализ активности каталазы и СОД в мутантах *etr 1-1* и *ein 2-1* и связали его с этиленовой регуляцией и закаливанием. Также мы выяснили, как зависит уровень генерации супероксид-радикала от количества суток закаливания. Важным результатом мы считаем выявление связи нескольких каскадов (этиленового и NO) при изучении активности каталазы в мутанте *ein 2-1*. Проведенные опыты дают нам шанс считать, что мы немного продвинулись в изучении связи холодостойкости и этиленовой гормональной регуляции в растениях.

Список использованной литературы.

1. Kawamura Y., Uemura M. Plant low-temperature tolerance and its cellular mechanisms //Plant Abiotic Stress, Second Edition. – 2014. – С. 109-132.
2. Mahajan S., Tuteja N. Cold, salinity and drought stresses: an overview //Archives of biochemistry and biophysics. – 2005. – Т. 444. – №. 2. – С. 139-158.
3. Дж У. Изоферменты. – 1968.
4. Shi Y. et al. Ethylene signaling negatively regulates freezing tolerance by repressing expression of CBF and type-A ARR genes in Arabidopsis //The Plant Cell. – 2012. – Т. 24. – №. 6. – С. 2578-2595.
5. Трунова Т. И. Растение и низкотемпературный стресс/64-е Тимирязевское чтение //ТИ Трунова. – 2007.
6. Гаевский Н. А., Голованова Т. И., Гольд В. М. Избранные главы экологической физиологии растений, гл. 2. – Красноярск 2012.
7. Креславский В. Д. и др. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений //Физиология растений. – 2012. – Т. 59. – №. 2. – С. 163-178.
8. Steponkus P. L. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation //Annual Review of Plant Physiology. – 1984. – Т. 35. – №. 1. – С. 543-584.
9. Foyer C. H., Noctor G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context //Plant, Cell & Environment. – 2005. – Т. 28. – №. 8. – С. 1056-1071.
10. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review //Annals of botany. – 2003. – Т. 91. – №. 2. – С. 179-194.-
11. Бараненко В. В. Супероксиддисмутаза в клетках растений //Цитология. – 2006. – Т. 48. – №. 6. – С. 465-474.
12. Полесская О. Г. Растительная клетка и активные формы кислорода //М.: КДУ. – 2007.
13. Туманов И. И. Физиология закаливания и морозостойкости растений. – М.: Наука, 1979.
14. Jithesh M. N. et al. Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defence //Journal of genetics. – 2006. – Т. 85. – №. 3. – С. 237-254.
15. Franks F. Biophysics and biochemistry at low temperatures. – Cambridge University Press, 1985.