

ТРУХАН ИРИНА СЕРГЕЕВНА

**РЕДОКС-СИСТЕМА ГЛУТАТИОНА
ВАКУОЛЕЙ КОРНЕПЛОДОВ СТОЛОВОЙ СВЕКЛЫ (*Beta vulgaris* L.)**

03.01.05 – Физиология и биохимия растений

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Работа выполнена в лаборатории физиологии растительной клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Прадедова Елена Владимировна

Официальные оппоненты:

кандидат биологических наук

Дударева Любовь Виссарионовна

доктор биологических наук,

профессор

Саловарова Валентина Петровна

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН

Защита диссертации состоится «18» декабря 2013 года в 12.00 часов на заседании диссертационного совета Д 003.047.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Сибирском институте физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН по адресу: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317. Факс (3952) 510754; e-mail: matmod@sifibr.irk.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН.

Автореферат разослан «__» ноября 2013 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д 003.047.01,

Кандидат биологических наук



Г.П. Акимова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Глутатион (GSH) – многофункциональный трипептид, обнаруженный практически у всех живых организмов (Noctor et al., 2012). У растений, продуцирующих активные формы кислорода в процессе фотосинтеза, клеточного дыхания или фотодыхания, глутатион в составе аскорбат-глутатионового цикла играет важную роль в нейтрализации H_2O_2 (Foyer, Noctor, 2011). Помимо антиоксидантной функции глутатион участвует в детоксикации ксенобиотиков и тяжелых металлов (Coleman et al., 1997; Dixon et al., 1998; Jozefczak et al., 2012), в трансдукции сигналов при абиотическом и биотическом видах стресса, а также является основным редокс-буфером в большинстве компартментов растительной клетки (Noctor et al., 2012). В редокс-систему глутатиона помимо самого трипептида входят глутатион-зависимые ферменты (глутатион-S-трансферазы, глутатионпероксидазы) и фермент, обеспечивающий его восстановление (глутатионредуктаза). Несмотря на то, что роль глутатиона в качестве антиоксиданта была выявлена исторически первой и активно исследуется с момента открытия глутатиона, в последние десятилетия больше внимания привлекает участие редокс-системы глутатиона в детоксикации ксенобиотиков (Coleman et al., 1997; Dixon et al., 1998; Tausz et al., 2004). В связи с этим глутатион и элементы его редокс-системы интенсивно изучаются в таких компартментах растительной клетки, как цитозоль, хлоропласты, митохондрии, пероксисомы и ядра (Noctor et al., 2012). Однако сведения о глутатионовой системе вакуолей до сих пор крайне скудны и носят отрывочный характер. На сегодняшний день известно, что в вакуоль посредством ABC-транспортеров депонируются глутатионовые конъюгаты ксенобиотиков и эндогенных метаболитов (Coleman et al., 1997; Dixon et al., 1998). При участии этих же переносчиков в вакуоль избирательно транспортируется глутатион в окисленной форме (GSSG). Тем не менее, вакуолярный пул глутатиона мало исследовался, и присутствие этого трипептида в вакуолях считается тканеспецифичным или видоспецифичным, поскольку у некоторых видов растений содержание вакуолярного глутатиона было незначительным или недоступным для детекции (Zechmann, Müller, 2010; Noctor et al., 2012). Практически ничего не известно и о ферментах редокс-системы глутатиона вакуолярной локализации. Об активности вакуолярной глутатионредуктазы (GR, К.Ф. 1.8.1.7) упоминается только в связи с изучением транспорта аскорбата в вакуоли протопластов листьев ячменя (Rautenkranz et al., 1994), и наличие нескольких вакуолярных изоформ глутатион-S-трансфераз (GST, К.Ф. 2.5.1.18) было показано при помощи протеомного анализа у *Arabidopsis thaliana* L. (Carter, 2004). Однако свойства и кинетические характеристики этих ферментов ранее не исследовались. В связи с возрастающим интересом к участию центральной вакуоли растительной клетки в детоксикации ксенобиотиков и поддержании клеточного редокс-гомеостаза мы посчитали важным исследовать в данном компартменте компоненты редокс-системы глутатиона, выполняющей ключевую роль в антиоксидантной защите и детоксикации в других клеточных органеллах. Полученные результаты расширят представление об участии центральной вакуоли в основных метаболических процессах растительной клетки и обеспечении нормальной жизнедеятельности растения в изменяющихся условиях среды.

Цель и задачи исследования. Цель представляемой работы заключалась в изучении элементов редокс-системы глутатиона в вакуолях корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) в сравнении с относительно хорошо изученной системой глутатиона такого компартмента, как пластида.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить содержание окисленного и восстановленного глутатиона во фракциях вакуолей и пластид, а также в тканевом экстракте корнеплодов столовой свёклы.
2. Изучить активность, рН-оптимум, кинетические характеристики, изоферментный состав, взаимодействие с ингибитором и зависимость уровня активности от стадии развития глутатионредуктазы и глутатион-S-трансферазы вакуолей, пластид и тканевого экстракта корнеплодов столовой свёклы.
3. Определить концентрацию пероксида водорода как соединения, активно взаимодействующего с глутатионом и истощающего его пул в экстрактах вакуолей, пластид, а также в тканевом экстракте корнеплодов столовой свёклы.
4. Исследовать содержание свободных аминокислот, входящих в состав глутатиона, в вакуолях, тканевом экстракте корнеплодов столовой свёклы.

Научная новизна. В результате проведенной работы получены новые данные о компартментации компонентов редокс-системы глутатиона в клетках запасующей паренхимы корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). В вакуолях клеток корнеплодов выявлена довольно высокая концентрация глутатиона (в среднем 30-40 мкМ/мг белка). Показано, что вакуолярный пул глутатиона представлен главным образом восстановленной формой (GSH), при этом соотношение GSH/GSSG составляло 8,4. В вакуолях клеток корнеплодов впервые выявлена и исследована активность глутатионредуктазы, фермента, поддерживающего глутатионовый пул в восстановленном состоянии. Восстанавливаемый внутри вакуоли глутатион, вероятно, вовлекается в процессы локальной утилизации активных форм кислорода (АФК) или детоксикации высокорепактивных метаболитов. В последнем случае важное значение имеют реакции конъюгации, катализируемые глутатион-S-трансферазами, активность которых также впервые выявлена в вакуолях клеток корнеплодов столовой свеклы. Специфичность активности глутатион-зависимых ферментов вакуолярной локализации была подтверждена при помощи ингибиторного анализа, зимографического исследования ферментативной активности в полиакриламидном геле, иммуноферментного исследования (вестерн-блот анализа), а также при сравнении со свойствами аналогичных ферментов пластид клеток корнеплодов столовой свеклы. Полученные данные свидетельствуют в пользу предположения о том, что транспортируемый в вакуоли глутатион не утилизируется, как полагали ранее, а активно вовлекается в метаболические процессы, происходящие в вакуолярном компартменте и опосредующие его роль в поддержании клеточного редокс-гомеостаза.

Теоретическая и практическая значимость. Глутатион, глутатионредуктаза и глутатион-S-трансфераза, обнаруженные в вакуолях, являются частью общеклеточной редокс-системы глутатиона, которая стоит на первых рубежах защиты от негативного действия АФК, эндогенных токсичных соединений и ксенобиотиков. Исследования вакуолярной системы глутатиона значительно расширят представление о вкладе этого компартмента в процессы детоксикации цитотоксичных соединений в растительной клетке. Особое значение изучение данной системы приобретает в связи с возрастающими количествами пестицидов, вносимых ежегодно в почву для повышения урожая сельскохозяйственных культур. Поэтому исследование внутриклеточных механизмов детоксикации опасных для здоровья человека соединений в растениях, употребляемых в пищу, имеет большую практическую значимость. Кроме того, сейчас широко обсуждается роль антиоксидантов, поступающих с продуктами питания, в профилактике заболеваний

человека разной этиологии, что также указывает на необходимость изучения компартментации и аккумуляции антиоксидантов в клетках запасающей паренхимы корнеплодов.

Материалы диссертации могут быть включены в курсы лекций по физиологии и биохимии растений, использоваться в профильных научно-исследовательских институтах РАН.

Связь с научными программами. Исследования проводились в соответствии с приоритетными направлениями СИФИБР СО РАН (проект VI.56.1.3., № гос. регистрации 01201353696), поддержаны грантом Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 12-04-31383 мол_а) и Министерством образования и науки Российской Федерации (соглашение 8266).

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 9 работ, в том числе 2 в российских рецензируемых журналах из списка ВАК РФ.

Результаты исследования были представлены на III Международном симпозиуме «Клеточная сигнализация у растений» (Казань, 2011), VII Съезде Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Н. Новгород, 2011), Всероссийской научной конференции с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений» (Москва, 2013), Всероссийской научной конференции «Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде» (Иркутск, 2013), I Международном симпозиуме «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» (Казань, 2013).

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 182 странице машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, методической части, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы. В работе представлено 25 рисунков и 6 таблиц. Список литературы включает 272 источников, в том числе 240 зарубежных авторов.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили корнеплоды столовой свёклы (*Beta vulgaris* L.) сорт Бордо, выращенные на опытном участке СИФИБР СО РАН. Корнеплоды отбирали на разных фазах онтогенеза, условно обозначенных как стадия активного роста (август – сентябрь), стадия глубокого покоя (сентябрь – апрель) и поздняя стадия покоя или стадия выхода из покоя (май – июнь). В зимний период корнеплоды хранили при температуре +4°C.

Выделение органелл. Вакуоли изолировали из клеток корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) при помощи модифицированного макрообъемного метода (Саляев и др., 1981). Обогащенную фракцию пластид получали общепринятым методом согласно Boyle et al., 1986. **Содержание глутатиона** в образцах измеряли спектрофотометрически (Smith et al., 1984) с модификацией для окисленного глутатиона (Behr, 1997) и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (Rellán-Álvarez et al., 2006). В последнем случае измерения проводили на жидкостном микроколоночном хроматографе “Милихром А-02” (Россия). **Активность глутатионредуктазы** определяли спектрофотометрически согласно Anderson et al., 1990. Ингибиторный анализ глутатионредуктазы с 1-хлор-2,4-динитробензолом (ХДНБ) проводили методом, предложенным Bilzer et al., 1984. **Глутатион-S-трансферазную активность** исследовали спектрофотометрически с субстратами ХДНБ (Habig et al., 1974) и флуородифеном

(Pascal, Scalla, 1999). Ингибиторный анализ глутатион-S-трансфераз проводили с 0,5 мМ этакриновой кислотой (Kilili et al., 2004). **Содержание НАДН и НАД⁺** в образцах определяли спектрофотометрическим методом, описанным Heber, Santarius, 1965. **Содержание пероксида водорода** измеряли при помощи FOX-метода (Galletti et al., 2008). **Содержание аминокислот** в образцах определяли на автоматическом анализаторе аминокислот ААА 339 (Чехия) согласно протоколу. **Электрофоретическими методами** исследовали изоферментный состав белков. Для сохранения ферментативной активности белки разделяли в неденатурирующих условиях согласно общепринятому методу (Гааль и др., 1982). Использовали 7,5% и 10% полиакриламидный гель (ПААГ). Маркером перемещения белка служил калибровочный КИТ (Sigma). Изоэлектрическое фокусирование белков (ИЭФ) проводили в ПААГ (Т 5%; С 3%), содержащем 10% глицерина и 3% амфолита (рН 3,5-10,5). Анолитом служила 0,06 N H₃PO₄, католитом – 0,1 N NaOH (Ригетти, 1986). В качестве маркера перемещения белка использовали калибровочный КИТ для ИЭФ, содержащий белки, изоэлектрические точки (рI) которых находились в пределах рН от 3,75-9,3. В полученных гелях выявляли активность глутатион-S-трансферазы и глутатионредуктазы или использовали их для переноса белка на нитроцеллюлозную мембрану и последующего иммуоблоттинга. **Визуализацию активности в ПААГ** глутатионредуктазы (Левитес, 1986; Aravind et al., 2005), глутатион-S-трансферазы (Gupta, Rathaur, 2005), малатдегидрогеназы (Левитес, 1986) и каталазы (Гааль и др., 1982) проводили общепринятыми методами. **Для вестерн-блот анализа** изоформ глутатионредуктазы использовали поликлональные антитела мыши, полученные на GR пекарских дрожжей (Sigma). Иммунизацию мышей проводили в 2 этапа, вводя антиген внутривенно дважды с двухнедельным интервалом. 100 мкг вводимого антигена объединяли с равным количеством полного адьюванта Фрейнда. После 50-60 дней иммунизации мышей осуществляли забор крови, содержащей поликлональные антитела (Кэтти и др., 1991). Перенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану проводили описанным ранее методом (Побежимова и др., 2004) с незначительными модификациями.

Исследования проводили в 3-5 аналитических и 3-5 биологических повторностях. При статистической обработке материала использовали общепринятые показатели: среднее арифметическое значение, стандартное или квадратическое отклонение (Лакин, 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение органелл и проверка чистоты полученных фракций

Центральная вакуоль растительной клетки считается многофункциональным компартментом, который играет основную роль в поддержании клеточного гомеостаза, обеспечивая депонирование, детоксикацию или деградацию ксенобиотиков и эндогенных метаболитов, а также участвует в клеточном сигналинге (Carter et. al., 2004; Андреев, 2012). Однако исследования ферментативных систем или низкомолекулярных соединений вакуолей не так многочисленны, как можно было бы ожидать. Это связано со сложностью изолирования интактных вакуолей и получения чистой фракции в количествах, достаточных для проведения биохимических анализов. В СИФИБР СО РАН в 80-е годы был модифицирован макрообъемный метод (Leigh, Branton, 1976), основанный на последовательных этапах дифференциального центрифугирования и очистке в градиенте плотности сахарозы. Данный метод позволяет получать чистые фракции интактных вакуолей из корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.), достаточные для проведения

биохимических исследований как вакуолярного сока, так и тонопласта (Саляев и др., 1981; Пузанова и др., 1982; Кузеванов и др., 1985). Для вакуолей корнеплодов столовой свеклы характерно формирование двух фракций в градиенте плотности сахарозы, которые условно были обозначены как “легкие” и “тяжелые” (Кузеванов и др., 1985) (Рис 1, А). Ранее было высказано предположение, что эти фракции образованы двумя популяциями вакуолей. Вакуоли с меньшей плавучей плотностью, так называемые “легкие” (в градиенте сахарозы располагаются на границе 1,050 и 1,080 г/см³), предположительно относятся к клеткам зоны межкольцевой паренхимы корнеплода и содержат больше ионов калия, натрия, органических кислот и аминокислот. Тогда как вакуоли с большей плавучей плотностью и преобладающим содержанием сахарозы и бетацианинов, или “тяжелые” (располагаются на границе 1,080 и 1,145 г/см³), относятся к клеткам зоны кольцевой паренхимы, содержащей сосудисто-волокнистые пучки (Кузеванов и др., 1985; Катков и др., 1990).

В настоящей работе данный метод использовали для получения общей фракции изолированных вакуолей, объединяя популяции “тяжелых” и “легких” вакуолей. Чистоту

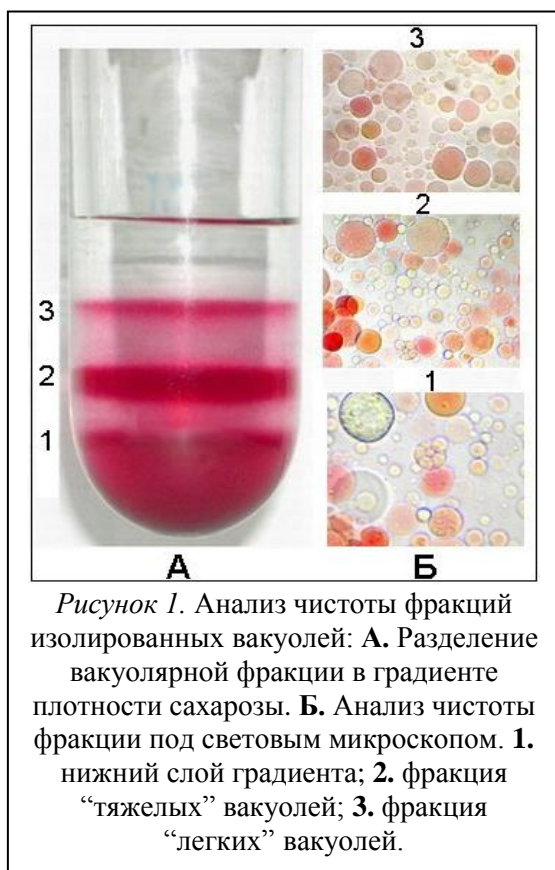


Рисунок 1. Анализ чистоты фракций изолированных вакуолей: **А.** Разделение вакуолярной фракции в градиенте плотности сахарозы. **Б.** Анализ чистоты фракции под световым микроскопом. **1.** нижний слой градиента; **2.** фракция “тяжелых” вакуолей; **3.** фракция “легких” вакуолей.

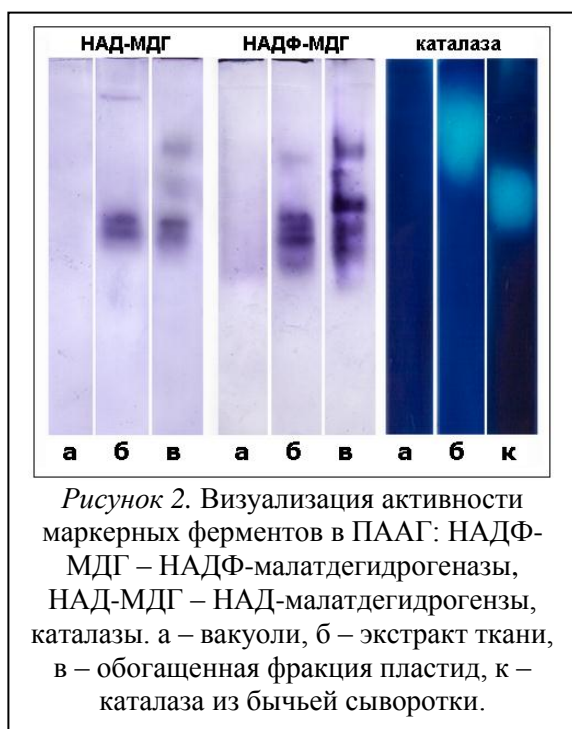
полученных фракций и интактность вакуолей контролировали при помощи световой микроскопии и биохимических методов (Рис. 1 и 2). В результате анализ при помощи светового микроскопа NU-2E (“Carl Zeiss”, Германия) показал, что во фракции из нижних слоев градиента плотности присутствовали элементы клеточных стенок и более мелкие органеллы, структурированные внутри, вероятно, ядра (Рис 1, Б). Однако во фракциях “тяжелых” и “легких” вакуолей, подобные примеси не обнаружены.

Подтверждение чистоты общей фракции и интактности изолированных вакуолей также получали путем зимографического определения активности маркерных ферментов в полиакриламидном геле (Рис. 2).

Пероксисомы не являются потенциальными контаминантами вакуолярной фракции из-за малого размера органелл и, следовательно, высокой скорости седиментации. Однако чтобы исключить

вероятность взаимодействия пероксисом и вакуолей с последующим слиянием мембран или везикуляции тонопласта с одновременным захватом цитоплазматического содержимого в процессе выделения, мы исследовали в геле активность маркерного фермента пероксисом – каталазы (К.Ф. 1.11.1.6) (Chandlee et al., 1983). Зимографическим методом каталазная активность была визуализирована в тканевом экстракте (Рис. 2, б), однако в вакуолярном экстракте активность данного фермента не проявлялась, что подтверждает чистоту и интактность полученной фракции вакуолей (Рис. 2, а).

Кроме того, для подтверждения интактности изолированных вакуолей



использовали определение НАД- и НАДФ-малатдегидрогеназной активности (МДГ) в геле. НАДФ-МДГ (К.Ф. 1.1.1.82) специфична для пластид (Edwards et al., 1985), тогда как НАД-МДГ (К.Ф. 1.1.1.37) была обнаружена во многих клеточных компартментах: митохондриях, цитозоле, глиоксисомах, пероксисомах, микросомах, а также в пластидах (Yudina, 2012). Например, известно, что этиопласты, выделенные из листьев выращенного в темноте ячменя, и амилопласты, выделенные из корней гороха, содержали оба типа МДГ (Neuhaus et al., 1993). Зимографический анализ вакуолярной и пластидной фракций, а также экстракта ткани на присутствие НАД- и НАДФ-МДГ показал активность этих ферментов в тканевом экстракте и в обогатщенной фракции пластид

(Рис. 2, б, в). В вакуолях специфическая активность как НАД-, так и НАДФ-МДГ отсутствовала (Рис. 2, а), что исключает контаминацию полученных изолированных вакуолей двумембранными или одномембранными органеллами, а также повреждение и последующую везикуляцию вакуолярных структур, сопровождающуюся захватом цитоплазматического содержимого.

Содержание глутатиона в образцах

Глутатион является неотъемлемым компонентом всех органов растений, но его содержание в значительной степени зависит от типа исследуемой ткани, вида растения, стадии его развития, условий произрастания (т.е. доступности серы и азота, воздействия стрессовых факторов, наличия симбионтов) и во многом от метода анализа. Были определены как десятки наномолей глутатиона на грамм сырого веса, так и несколько миллимолей в протопластах отдельных клеток (Noctor, Foyer, 19986; Meyer et al., 2001; Rellán-Álvarez et al., 2006).

В вакуолях, пластидах и тканевом экстракте покоящихся корнеплодов столовой свеклы содержание глутатиона определяли двумя способами (Табл. 1). Первый – спектрофотометрический метод, основанный на применении 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) (ДТНБ или реактива Элмана) (Tietze, 1969). Вторым, более чувствительным и специфичным, методом – высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) (Vignaud et al., 2004). В отличие от спектрофотометрического метода ВЭЖХ позволяет определять содержание глутатиона в образцах без предварительной дериватизации и не требует восстановления GSSG, что упрощает процедуру подготовки образца и позволяет избежать изменений в редокс-состоянии глутатиона. Однако ферментативный циклический метод с ДТНБ до сих пор является наиболее широко используемой техникой для определения GSH и GSSG из-за достаточной чувствительности и доступности.

Таблица 1. Содержание глутатиона в компартментах корнеплодов столовой свеклы, определенное разными методами

Компартмент	Спектрофотометрический метод с ДТНБ, мкМ/мг белка				Хроматографический метод, мкМ/мг белка			
	GSH	GSSG	GSG+GSSG	GSH/GSSG	GSH	GSSG	GSH+GSSG	GSH/GSSG
Вакуоли	31,3	0,43±0,13	31,73±9,1	72,8	39,7±5,1	4,7±0,9	44,4	8,4
Пластиды	6,3	0,87±0,2	7,17±0,5	7,2	3,6±0,14	0,2±0,08	3,8	18
Тканевой экстракт	54,3	3,2±0,8	57,5±15,3	17	106,3±29,1	9,3±0,6	115,6	11,4

Результаты, полученные двумя методами, несколько различались (Табл. 1). Тем не менее, при сопоставлении данных были очевидны общие тенденции: наибольшим содержанием GSH характеризовались водные экстракты ткани, а самым низким – обогащенные фракции пластид. Из литературных источников известно как о высоких концентрациях глутатиона в пластидах (62-76% от суммарного содержания в клетке) (Noctor and Foyer 1998a, Foyer et al. 2001), так и о низких (на 80-90% меньше, чем в других компартментах) (Müller et al., 2004; Zechmann, Müller, 2010; Zechmann et al., 2006; Kolb et al., 2010).

В то же время в вакуолях содержание глутатиона было достаточно высоким, что не совпадало с полученными ранее результатами биохимических и иммуногистохимических исследований. Присутствие глутатиона в вакуолях по-прежнему вызывает дискуссии, поскольку в некоторых тканях и видах растений его не удавалось определить. Так в нескольких работах в вакуолях листьев и корней *A. thaliana*, *Nicotiana tabacum* и *Cucurbita pepo* иммуногистохимическим методом не было обнаружено или было обнаружено незначительное количество глутатиона (Müller et al., 2004; Zechmann et al., 2006; Kolb et al., 2010; Zechmann, Müller, 2010). Отсутствие вакуолярного глутатиона в данных исследованиях объясняли его быстрой деградацией после транспорта через тонопласт (Müller et al., 2004; Kolb et al., 2010). Однако этим же методом глутатион был обнаружен в вакуолях клеток-спутниц флоэмы и сосудистых клеток паренхимы (Zechmann, Müller, 2010). Глутатион также был обнаружен в вакуолях листьев *A. thaliana* в концентрации 17,6 нмоль на грамм сырого веса или 300 мкМ при окраске монохлоробиманом (в 100 раз меньшей, чем в других компартментах), что соответствовало 5,4% от суммарного содержания глутатиона в клетке (Queval et al., 2011). А вычисленная с учетом занимаемого объема концентрация глутатиона в вакуолях клеток мезофилла *N. tabacum* составила примерно 20 мкМ и соответствовала 17% от общего содержания (Rennenberg, 1982). При безводном фракционировании листьев *A. thaliana* методом ВЭЖХ после дериватизации монохлоробиманом концентрация глутатиона в вакуолях была определена в пределах 0,613-0,733 мМ, что было в 4 раза меньше, чем в пластидах (Krueger et al., 2009). В протопластах мезофилла листьев ячменя *Hordeum vulgare* L. содержание глутатиона в сульфгидрильной форме (GSH) в вакуолях было 0,9% от общеклеточного содержания восстановленного глутатиона, а в дисульфидной форме (GSSG) – 12% от общего содержания GSSG в клетке (Dietz et al., 1992). В этом случае отмечали низкое соотношение GSH/GSSG в вакуолях (1,3), что считается характерной особенностью этого компартмента. Что касается результатов исследования компартментации глутатиона в клетках корнеплодов столовой свеклы, то они показали не только высокое его содержание

в вакуолях, но и довольно высокое соотношение GSH/GSSG, при определении хроматографическим методом сопоставимое с пластидным и обцетканевым GSH/GSSG, хотя оно было незначительно ниже последних (Табл. 1).

Следует отметить, что высокое содержание глутатиона было характерно в целом для корнеплодов столовой свеклы, что, вероятно, связано со спецификой изучаемого объекта, так как исследования проводились на покоящихся корнеплодах. В то же время из литературных источников известно, что значительное увеличение концентрации глутатиона у растений наблюдается именно в состоянии покоя. Так, повышение уровня глутатиона от 2 до 8 раз в период покоя было характерно для хвойных и листопадных деревьев. Этот факт объясняли изменением метаболизма и воздействием низких температур (Siller-Sepeda et al., 1991). Исследуемые в настоящей работе корнеплоды противостояли воздействию низких температур (4°C), а также другим стрессирующим факторам довольно длительное время (на протяжении 6-8 месяцев). Кроме того, анализ литературы показал, что немаловажное значение при изучении содержания глутатиона в вакуолях, по всей видимости, имеет специфическая функция исследуемых органов и тканей. Ранние исследования проводились главным образом на вакуолях корней или мезофилла листа *A. thaliana*, табака, ячменя, тыквы и т.п. Мы же имели дело с корнеплодами, состоящими преимущественно из запасающей паренхимы, богатой сосудистыми пучками. При этом известно, что в вакуолях клеток-спутниц флоэмы *S. perovskii* глутатион был обнаружен иммуногистохимическим методом, которым не удалось выявить глутатион в вакуолях листьев и корней некоторых видов растений (Zechmann, Müller, 2010). Поэтому, можно предположить, что вакуоль как основной запасающий компартмент в клетках паренхимы и проводящих пучков корнеплода может аккумулировать гораздо большие количества метаболитов, и в том числе глутатиона, чем другие ткани.

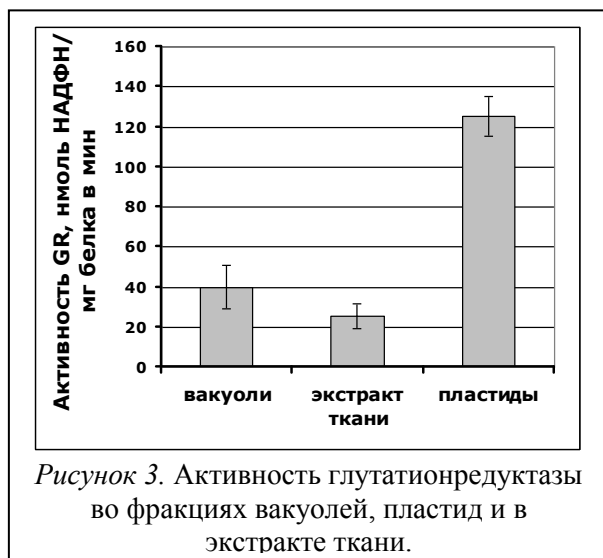
Глутатионредуктаза

Обращает на себя внимание преимущественно восстановленное состояние глутатионового пула вакуолей корнеплодов столовой свеклы (Табл. 1). Ранее при помощи биохимических методов в вакуолях также обнаруживали как окисленный, так и восстановленный глутатион, и, хотя соотношение GSH/GSSG в вакуолях изолированных протопластов листьев ячменя было более окисленным (1,3), чем в протопластах в целом (17), концентрация глутатиона восстановленного превышала концентрацию окисленной формы (Dietz et al., 1992). В то же время на сегодняшний день установлено, что в вакуоли растительных клеток глутатион транспортируется либо в окисленной форме, либо в виде глутатионовых конъюгатов (Foyer et al., 2001). По поводу физиологической роли транспорта окисленного глутатиона преобладают два мнения. Согласно первому, перенос окисленного глутатиона в вакуоль необходим для поддержания редокс-гомеостаза в цитозоле, особенно в условиях стресса (Foyer et al., 2001). Вторая точка зрения основана на том, что дисульфид глутатиона является менее реакционноспособной молекулой и потому окисленная форма более предпочтительна для транспорта (Noctor et al., 2011). Тем не менее, восстановление глутатиона под действием глутатионредуктазы в вакуолях ранее не обсуждалось (Noctor et al., 2011), и GR вакуолей отдельно до сих пор не исследовалась. О присутствии глутатионредуктазы в вакуолях упоминается только в связи с изучением транспорта аскорбата в вакуоли протопластов листьев ячменя (Rautenkranz et al., 1994). Так как в нашем случае содержание восстановленного глутатиона в вакуолях значительно

превышало содержание окисленной формы, предстояло установить присутствие GR в данном компартменте.

Глутатионредуктаза является флавопротеиновой оксидоредуктазой, которая катализирует восстановление глутатионового дисульфида (GSSG) до сульфгидрильной формы (GSH), используя в качестве восстановителя НАДФН/НАДН. Молекулярная масса растительных GR колеблется от 60 до 190 кДа (Mullineaux, Creissen, 1997).

В ходе проведенного исследования в вакуолях была определена довольно высокая GR-активность. Чтобы убедиться в специфичности наблюдаемой реакции, исследования проводили в сравнении с



пластидами и тканевым экстрактом, присутствие GR в которых не вызывало сомнения (Edwards et al., 1990; Madamanchi et al., 1992).

В наших образцах уровень активности, определяемый спектрофотометрически, был выше в пластидах (Рис. 3), что согласуется с литературными данными о том, что до 80% клеточной активности GR принадлежит хлоропластным изоформам (Edwards et al., 1990; Yousuf, 2012). Однако уровень

активности GR вакуолей был также достаточно высок и превышал общетканевую (Рис. 3), хотя из полученных ранее результатов было известно лишь о следовой активности GR в вакуолях протопластов листьев ячменя, где она составляла примерно 1% от суммарной активности GR протопласта (Rautenkranz et al., 1994). В целом уровень активности GR из разных компартментов клеток корнеплодов столовой свеклы был сопоставим с данными



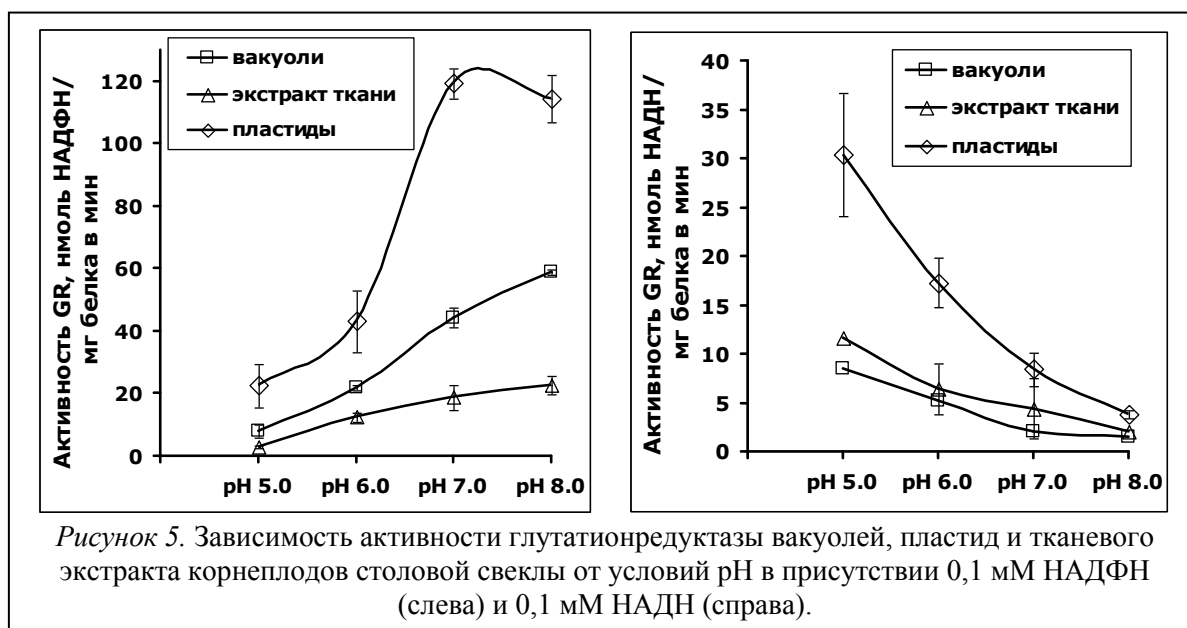
об активности этого фермента у других видов растений: от 30 до 150 нмолей НАДФН/мг белка/мин в листьях томата (Kuzniak, Skłodowska, 2001); от 35 до 55 нмолей НАДФН/мг белка/мин в проростках кукурузы (Edwards et al., 1990).

Как показали дальнейшие исследования, активность GR вакуолей зависела от стадии развития корнеплода и возрастала почти в 2 раза на поздней стадии покоя (Рис. 4), когда в корнеплодах столовой свеклы с одной стороны наблюдается возобновление ростовых процессов, а с другой – поражение корнеплодов грибковыми и бактериальными патогенами. Старения

тканей, как правило, сопровождается окислительным стрессом, что связано с нарушением баланса и компартментации окислительно-восстановительных реакций в клетке (del Rio et al., 1998), такие изменения возможны и при длительном хранении корнеплодов. В то же время участие GR в ответах растений на окислительный стресс подтверждается

множеством сообщений о высокой активности глутатионредуктазы в устойчивых к стрессу и трансгенных растениях со сверхэкспрессией GR (Liu et al., 2012; Yousuf, 2012). Например, известно, что GR активность в листьях повышается при увеличении концентрации кислорода, низкой температуре, засухе, обработке гербицидами и воздушными поллютантами (Kubo et al., 1993; Edwards et al., 1994). Также сообщалось о значительном повышении активности GR после заражения листьев томата возбудителем серой гнили *Botrytis cinerea* (до 211%) (Kuzniak, Skłodowska, 2001).

Для GR из разных организмов характерна ярко выраженная зависимость активности фермента от условий pH и природы пиридиннуклеотида. Большинство изоформ GR растений обладают высоким сродством к НАДФН (<10 мкМ), хотя в качестве донора электронов могут также использовать НАДН, несмотря на то, что сродство к этому пиридиннуклеотиду ниже в десятки раз (Halliwell, Foyer, 1978). При этом оптимальными условиями pH для реакции с НАДФН являются нейтральные и слабощелочные (Halliwell, Foyer, 1978; Hausladen, Alscher, 1994a; Kubo et al., 1993), а для реакции с НАДН – кислые (Halliwell, Foyer, 1978). Результаты наших экспериментов подтвердили эту зависимость (Рис. 5). Реакции восстановления дисульфида глутатиона в наших образцах протекали более активно с НАДФН при pH 7,0-8,0, а с НАДН – при pH 5,0. Однако даже при оптимальных условиях реакция с НАДН протекала в среднем в 4-5 раз медленнее, чем с



НАДФН, что объясняется меньшим сродством фермента к НАДН.

Исследование GR-активности при разных концентрациях GSSG показало ярко выраженную концентрационную зависимость, которая соответствовала зависимости Михаэлиса-Ментен. При расчете K_m и V_{max} для GSSG было установлено, что кинетические параметры GR вакуолей, пластид и тканевого экстракта были сопоставимы (Табл. 2). Однако V_{max} была наивысшей у фермента из обогащенной фракции пластид на обеих стадиях развития корнеплода. Вакуолярный фермент также показал достаточно высокую V_{max} , в то время как максимальная скорость фермента тканевого экстракта была в 1,5-2,0 раза меньше, чем V_{max} GR вакуолей и в 2,5-4,0 раза меньше, чем V_{max} GR пластид. Таким образом, данные по V_{max} для ферментов разной локализации строго коррелируют с уровнем активности GR в данных компартментах. В то же время на поздней стадии покоя V_{max} ферментов вакуолей и тканевого экстракта возрастала в 2-3

раза, что однако не было связано с изменением значений K_m , так как константы Михаэлиса ферментов различались незначительно и соответствовали данным литературы, из которых известно, что кажущиеся и истинные значения K_m для GSSG варьируют в довольно широких пределах – от 15 до 200 мкМ (Halliwell, Foyer, 1978; Anderson et al., 1990; Edwards et al., 1990; Kubo et al., 1993; Chalapathi Rao, 2008). Более объективным показателем сродства фермента к субстрату можно считать кинетическую константу первого порядка (V_{max}/K_m). Сопоставление значений V_{max}/K_m показало, что наибольшим сродством к GSSG на стадии глубокого покоя, по всей видимости, обладал фермент из обогащенной фракции пластид (Табл. 2). С увеличением активности на поздней стадии покоя заметно возросло также сродство к субстрату у GR из вакуолярной фракции (константа V_{max}/K_m повысилась в среднем в 2 раза и несколько превысила V_{max}/K_m фермента пластид). В тоже время GR тканевого экстракта показала наименьшее сродство к GSSG на обеих стадиях развития.

Таблица 2. Кинетические параметры глутатионредуктазы вакуолей, пластид и экстракта ткани корнеплодов столовой свеклы на разных стадиях покоя

Объект исследования	Стадия глубокого покоя			Поздняя стадия покоя		
	K_m , мкМ	V_{max} , мкМ GSSG мин ⁻¹	V_{max}/K_m	K_m , мкМ	V_{max} , мкМ GSSG мин ⁻¹	V_{max}/K_m
Вакуоли	13,1 ± 2,1	41,8 ± 10,1	3,19	16,2 ± 2,9	113,4 ± 18,5	7,0
Пластиды	22,8 ± 3,6	114,5 ± 11,2	5,02	24,7 ± 5,8	157,2 ± 27,8	6,36
Экстракт ткани	15,7 ± 2,3	28,4 ± 5,7	1,8	20,6 ± 4,9	60,9 ± 9,2	2,96

Специфических природных ингибиторов или активаторов для GR не обнаружено. Установлен ингибирующий эффект на активность фермента нитрофуранов и 1-хлор-2,4-динитробензола (ХДНБ) (Bilzer et al., 1984). В связи с этим мы исследовали влияние ХДНБ на активность GR вакуолей, пластид и экстрактов тканей. При добавлении ХДНБ в реакционные среды происходило выраженное ингибирование ферментативной активности, которое зависело от концентрации GSSG (Табл. 3).

Таблица 3. Кинетические параметры глутатионредуктазы вакуолей, пластид и экстракта ткани корнеплодов столовой свеклы в контрольных условиях и в присутствии ингибитора

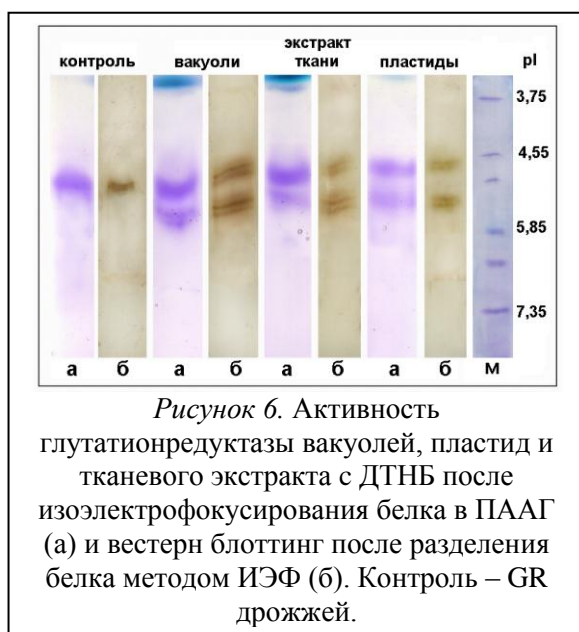
Объект исследования	Контроль		ХДНБ (2 мМ)	
	K_m , мкМ	V_{max} , мкМ мин ⁻¹	K_m , мкМ	V_{max} , мкМ мин ⁻¹
Вакуоли	16,2 ± 2,9	113,4 ± 18,5	16,3 ± 1,6	78,7 ± 6,9
Пластиды	24,7 ± 5,8	157,2 ± 27,8	22,8 ± 0,5	78,3 ± 3,1
Экстракт ткани	20,6 ± 4,9	60,9 ± 9,2	21,1 ± 2,9	36,7 ± 6,1

Расчет кинетических параметров показал значительное снижение максимальной скорости как у вакуолярной GR, так и у изоферментов пластид и тканевого экстракта. Однако несмотря на снижение скорости реакций, сродство к субстрату у GR всех исследуемых объектов оставалось прежним. Это указывает на неконкурентный тип

ингибирования, что было также продемонстрировано на глутатионредуктазе животных с ХДНБ (Bilzer et al., 1984).

Специфичность GR-активности, обнаруженной в тканевом экстракте и фракциях вакуолей и пластид, была подтверждена зимографическим методом, т.е. визуализацией ферментативной активности в ПААГ после электрофореза белков в неденатурирующих условиях. В результате проведенного исследования во всех образцах были выявлены по две изоформы GR (данные представлены в диссертации). Также было проведено зимографическое исследование активности фермента после изоэлектрофокусирования белков в ПААГ (Рис. 6, а). Как видно из рисунка, во фракциях вакуолей, пластид, а также в тканевом экстракте присутствовало по 2 изоформы фермента, которые раздваивались в силу особенностей метода. Все выявленные изоформы располагались в области $pI \sim 4,0-5,0$, что близко к значениям, полученным для других видов растений, у которых было обнаружено от 2 до 8 изоформ этого фермента разной локализации с pI от 4,1 до 4,9 (Edwards et al., 1990; Anderson et al., 1995; Marty et al., 2009).

Присутствие двух изоформ также подтвердилось результатами вестерн-блот анализа с антителами, полученными на GR пекарских дрожжей (Sigma) (Рис. 6, б). Так как способ получения экстракта ткани предполагал, что он не включает содержимое двумембранных органелл, можно предположить, что в корнеплодах столовой свеклы присутствует 4 изоформы GR, две из которых содержатся в пластидах и две в вакуолях. Последние также определяются в тканевом экстракте, состоящем преимущественно из вакуолярного сока.



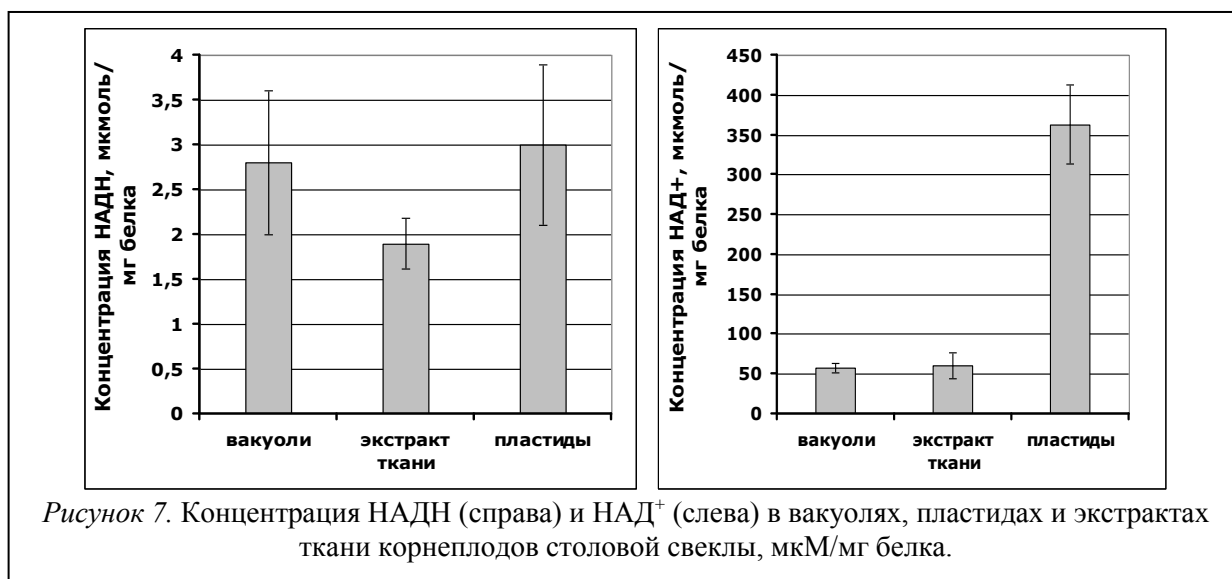
Однако в отличие от предыдущих исследований, проводимых на проростках кукурузы и листьях гороха, где хлоропластные изоформы значительно отличались от цитоплазматических и митохондриальных по характеру разделения в ПААГ и при ИЭФ (Anderson et al., 1995; Edwards et al., 1990), изоформы GR пластид корнеплодов столовой свеклы не показали существенных отличий от вакуолярных по электроподвижности, т.е. по молекулярной массе, и практически не отличались зарядом полипептида.

Сходство в электроподвижности и взаимодействие с антителами указывает на то, что вакуолярные изоформы GR близки по первичной и

третичной структуре не только аналогичным изоформам пластид, но и ферменту дрожжей. Высокая гомология GR разных организмов считается отличительной особенностью этого фермента (Contour-Ansel et al., 2006).

Проведенные исследования подтверждали специфичность ферментативной активности GR, однако важным вопросом оставалось присутствие в вакуолях пиридиннуклеотидов, необходимых для активности фермента. Так как НАДФН образуется преимущественно в анаболических путях, мы предположили, что в вакуолях может присутствовать НАДН, более распространенный в клеточных компартментах и восстанавливающийся в катаболических путях. Также в пользу этого предположения говорит кислая вакуолярная среда, в которой активность GR с НАДН выше, чем в

щелочных условиях. Мы исследовали спектрофотометрическим методом содержание НАД восстановленного и окисленного во фракциях вакуолей, пластид и в тканевом



экстракте (Рис. 7), в результате чего обнаружили в вакуолях микромолярные количества НАД⁺, сопоставимые с содержанием в тканевом экстракте, но гораздо меньшие, чем в обогащенных фракциях пластид. В то же время количество восстановленного НАД мало отличалось в разных компартментах и было крайне низким, что соотносится с литературными данными (Igamberdiev, Gardstrom, 2003; Queval, Noctor, 2007) и может быть связано с тем, что НАДН в клетках находится преимущественно в связанной с белками форме (Heber, Santarius, 1965).

Таким образом, в вакуолях может присутствовать небольшое количество свободного НАДН, сопоставимое с количеством в пластидах и в тканевом экстракте в целом, что указывает на возможность восстановления окисленного глутатиона вакуолярной GR, хотя и с гораздо меньшей эффективностью, чем при использовании НАДФН в качестве кофермента. Восстановленный глутатион может использоваться для нейтрализации внутривакуолярных АФК или для конъюгации с ксенобиотическими или эндогенными соединениями, пересекающими тонопласт в силу своей гидрофобности. Открытыми остаются вопросы о восстановлении НАД⁺ в вакуолях и его транспорте в этот компартмент.

Пероксид водорода

Обнаруженный в вакуолях корнеплодов столовой свеклы глутатион наряду с другими антиоксидантами способен регулировать содержание пероксида водорода, продуцируемого в вакуолях или депонируемого в них при окислительном стрессе. Считается, что существует прямая зависимость между содержанием внутриклеточного H₂O₂ и статусом глутатионового пула. Если концентрация глутатиона достаточна, чтобы обеспечить восстановление H₂O₂, то уровень перекиси остается низким даже в условиях недостатка других антиоксидантных систем (Noctor et al., 2002; Queval et al., 2011). Однако низкий уровень синтеза глутатиона или пониженная активность глутатионредуктазы приводят к повышенному содержанию H₂O₂ (Piquery et al., 2002). В вакуолях корнеплодов столовой свеклы обнаружены ферменты, способные продуцировать АФК: Cu,Zn-супероксиддисмутаза, катализирующая дисмутацию супероксид-радикалов с образованием пероксида водорода (Прадедова и др., 2009), и фенолзависимая

пероксидаза, обладающая оксидазной (тирозиновой) активностью и способная также продуцировать АФК (Прадедова и др., 2013б). В настоящее время АФК-генерирующая активность этих ферментов подробно исследована в апопласте (Bolwell et al., 1999; Li et al., 2010). Что касается вакуолей, то данная активность обсуждается только в рамках гипотетических процессов (Ende, Valluru, 2009). Поэтому до сих пор доминирует представление, согласно которому H_2O_2 транспортируется в вакуоль и этот транспорт становится особенно интенсивным при окислительном стрессе (Ferrerres et al., 2011).

Содержание H_2O_2 в вакуолях корнеплодов столовой свеклы ранее не исследовалось, поэтому необходимо было установить его наличие в данном компартменте и определить относительную концентрацию. Это имело особое значение в случае корнеплодов, которые длительный период находились под воздействием пониженных температур и других стрессирующих факторов (таких как обезвоживание, патогенез), что, согласно сложившимся представлениям, приводит к развитию окислительного стресса и сопровождается увеличением концентрации активных форм кислорода. По результатам исследования можно говорить о том, что концентрация H_2O_2 в вакуолярном, пластидном и тканевом экстрактах составляла примерно 50 нмоль/мг белка (данные представлены в диссертации). Однако следует отметить, что так как процедуры выделения органелл и получения экстрактов вакуолей и пластид занимают достаточно много времени, определяемый уровень H_2O_2 отражает скорее динамическое равновесие между процессами его образования и нейтрализации, осуществляемыми ферментативными и низкомолекулярными системами данных компартментов. Так как в вакуолях корнеплодов столовой свеклы были определены микромолярные концентрации глутатиона (Табл. 1) и наномолярные концентрации H_2O_2 , то можно предположить, что глутатион функционирует в рамках антиоксидантной системы вакуолей, эффективно нейтрализуя H_2O_2 , локально генерируемый или диффундирующий в вакуоли из других клеточных компартментов. При этом вакуолярный H_2O_2 может участвовать в окислении вторичных метаболитов и ксенобиотиков, депонируемых в вакуоль, или в трансдукции сигнала. С другой стороны антиоксидантная система вакуоли, и в том числе глутатион, способна регулировать концентрацию H_2O_2 и предотвращать его неконтролируемый выход в цитозоль, а также окислительное повреждение вакуолярных ферментов и мембран.

Глутатион S-трансферазы

Глутатион-S-трансферазы – суперсемейство мультифункциональных белков, которые катализируют конъюгацию электрофильных эндобиотических и ксенобиотических соединений с GSH. Получившиеся в результате глутатионовые S-конъюгаты, как правило, растворимы в воде и менее токсичны, и у растений подвергаются депонированию из-за отсутствия эффективных систем выделения. В настоящее время у растений выделяют 8 классов GST: фи, тау, лямбда, дегидроаскорбатредуктазы (ДГАР), тета, зета и тетрахлорогоидрохинондегалогеназы (ТЧНД) являются растворимыми и один класс, микросомальные GST, ассоциирован с мембранами (Öztetik, 2008). Классические GST (фи, тау, тета и зета) – гомодимерные или гетеродимерные белки с молекулярной массой около 50 кДа (Edwards et al., 2000; Frova, 2003). ДГАР и лямбда классы являются единственными GST, которые активны в виде мономеров. Помимо конъюгирующей активности некоторые GST обладают глутатионпероксидазной и изомеразной активностью, а также могут функционировать в качестве лигандин, неферментативно связывая различные соединения.

Активность GST вакуолей, пластид и тканевого экстракта определяли спектрофотометрическим методом с двумя субстратами: наиболее широко используемым ХДНБ и гербицидом флуородифеном (Рис. 8). С ХДНБ глутатион-S-трансферазная активность в вакуолях была сопоставима с активностью в пластидах и тканевом экстракте. В то же время активность с флуородифеном значительно превышала GST-активность

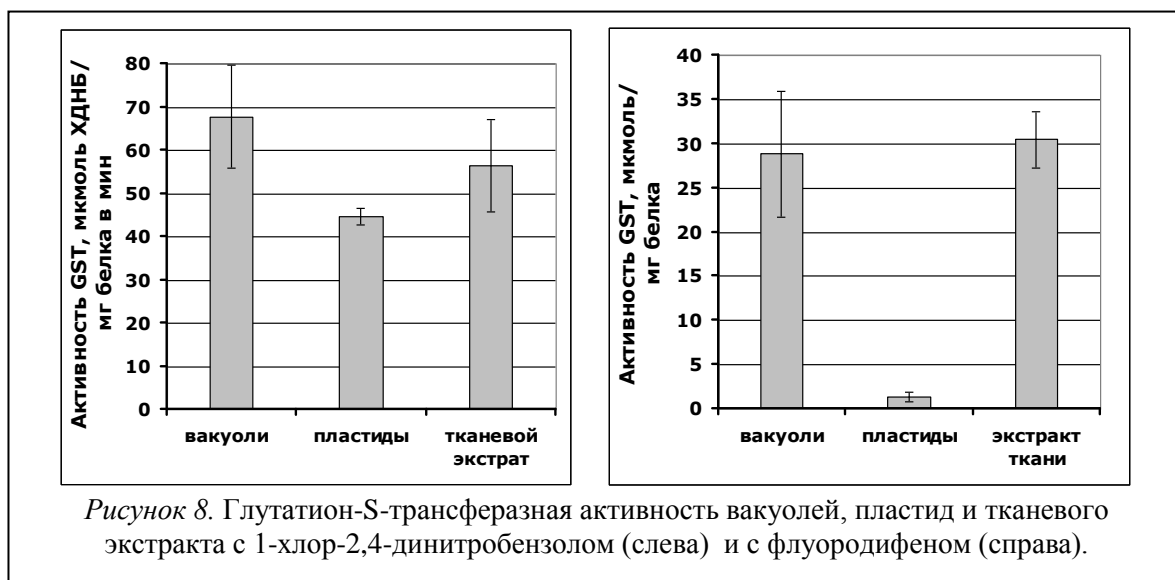


Рисунок 8. Глутатион-S-трансферазная активность вакуолей, пластид и тканевого экстракта с 1-хлор-2,4-динитробензолом (слева) и с флуородифеном (справа).

фракции пластид и была сопоставима с активностью тканевого экстракта.

Специфическая активность GST с разными субстратами является характеристикой отдельных изоформ фермента, локализованных в разных тканях или экспрессирующихся в разных условиях (Marrs, 1996; Dixon et al., 1998a). Из полученных нами данных очевидно, что пластидная популяция ферментов отличается от вакуолярной и общетканевой по субстратной специфичности. Более низкую конъюгирующую активность пластидных GST с флуородифеном можно объяснить тем, что глутатион-S-трансферазы пластид обладают более узкой субстратной специфичностью по отношению к ксенобиотическим соединениям. Возможно, GST пластид участвуют не столько в процессах детоксикации экзогенных токсичных соединений, сколько необходимы для

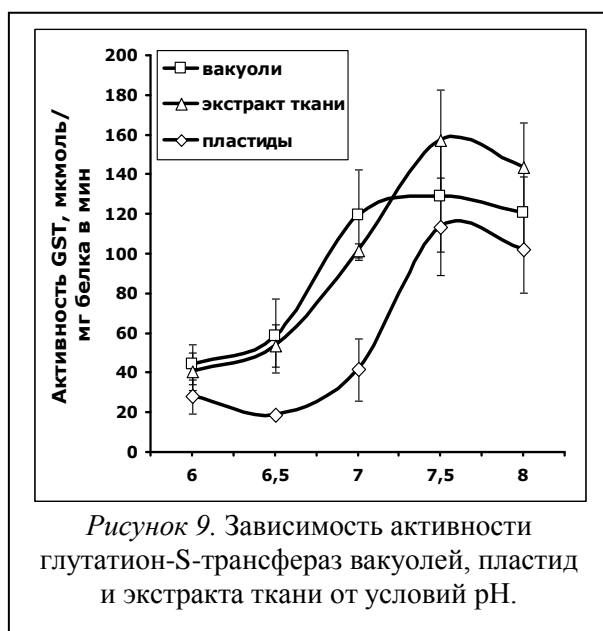


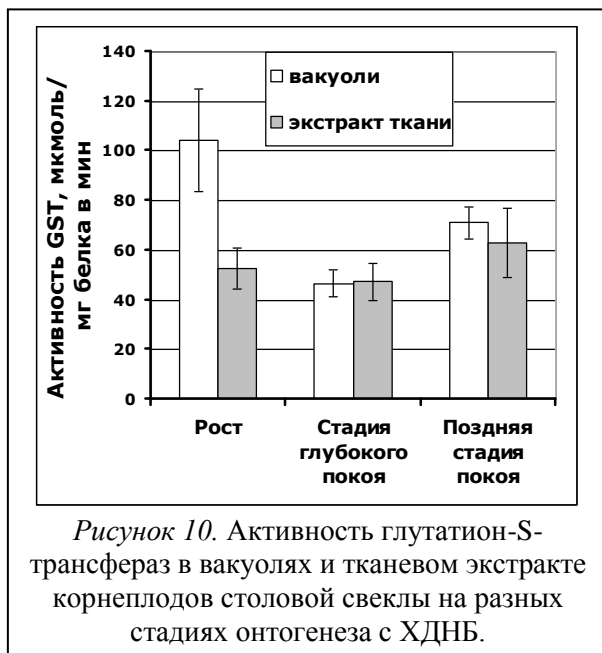
Рисунок 9. Зависимость активности глутатион-S-трансфераз вакуолей, пластид и экстракта ткани от условий pH.

конъюгации с глутатионом эндогенных метаболитов, образующихся в пластидах под действием АФК или во время активных биосинтетических процессов.

Известно, что активность GST проявляет зависимость от условий pH. Оптимальными условиями для GST вакуолей с ХДНБ в качестве субстрата были pH 7,0-7,5, а для пластид и тканевого экстракта – pH 7,5 (Рис. 9). Следует отметить, что при pH 7,0, оптимальном для GST вакуолей, активность изоферментов пластид снижалась практически в 3 раза, что также подтверждает отличие популяций GST из разных компарментов клетки. Установлено, что оптимумы pH для GST из

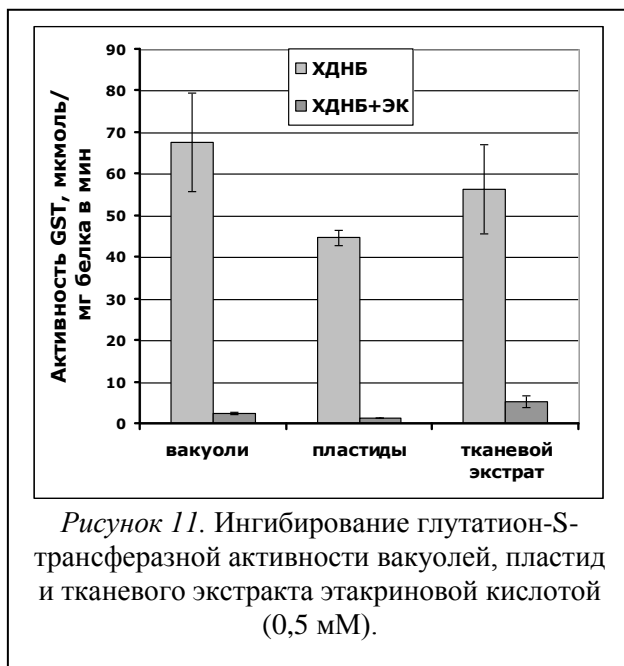
других растительных объектов варьировали в пределах 7,0-8,0 (Irzyk, Fuerst, 1993; Gronwald, Plaisance, 1998; Pascal, Scalla, 1999; Zeng et al., 2005), хотя встречаются сообщения о более низких значениях рН для оптимальной активности некоторых изоформ фермента (Deng et al., 1996; Deng, Hatzios, 2002). Предполагается, что рН-оптимум фермента также зависит от используемого субстрата и сродства фермента к нему (Deng, Hatzios, 2002).

GST-активность вакуолей изменялась в зависимости от стадии развития и была наибольшей на стадии активного роста (Рис. 10), что может быть связано с участием



фермента вакуолей в детоксикации цитотоксичных эндогенных соединений, возникающих в процессе активного метаболизма. Незначительные изменения в активности GST тканевого экстракта говорят о стабильном уровне суммарной активности, однако изменение количества изоформ, их состава и активности в отдельных компартментах клетки (вакуолях, цитозоле, ядре, пероксисомах и т.п.) могут происходить, не влияя на суммарную активность ферментов тканевого экстракта в целом. Снижение активности вакуолярных изоформ на стадии глубокого покоя и некоторое повышение их активности на последней стадии покоя свидетельствует о том, что изоферменты этого компартмента

регулируются в зависимости от изменений в метаболизме корнеплода и подтверждает их



роль в детоксикации токсичных соединений, накапливающихся в активно функционирующей клетке.

Еще одним субстратом GST является этакриновая кислота (ЭК) – производное фенилуксусной кислоты, которое содержит электрофильную группу, подобную α - β -алкеналям, генерируемым в растительных клетках при окислительном стрессе (Kilili et al., 2004). В сочетании с ХДНБ этакриновая кислота проявляет свойства ингибитора. В наших исследованиях ЭК (0,5 мМ) подавляла реакции с ХДНБ более, чем на 90% (Рис. 11). Результаты по разным компартментам варьировали незначительно. Как было отмечено и для ферментов, выделенных из растений

других видов (Droog et al., 1995; Pascal, Scalla, 1999), для GST корнеплодов столовой свеклы ЭК оказалась сильным ингибитором, конкурируя с ХДНБ за активный центр или воздействуя на аллостерический сайт фермента (Phillips, Mantle, 1991).

ХДНБ не является природным субстратом фермента, что определяет низкое сродство к нему GST. При исследовании кинетических параметров с ХДНБ для GST вакуолей, пластид и тканевого экстракта корнеплодов столовой свеклы были получены довольно высокие значения константы Михаэлиса (Табл. 4), что соответствовало полученным ранее данным, согласно которым кажущееся значение K_m для ХДНБ могут варьировать от 0,12 до 4,5 мМ, а для GSH – от 0,12 до 0,6 мМ (Dixon et al., 1998б; Gronwald, Plaisance, 1998; Pascal, Scalla, 1999; Deng, Hatzios, 2002). Однако если учитывать такую характеристику фермента, как V_{max}/K_m , то наибольшее сродство к ХДНБ и GSH проявляли GST вакуолей и тканевого экстракта, а наименьшее – ферменты пластид (Таблица 4). Более высокое значение константы V_{max}/K_m может свидетельствовать о том, что суммарно ферменты с конъюгирующей активностью количественно преобладают над GST с пероксидазной или изомеразной активностями. Таким образом, вакуолярные изоформы, показывающие достаточно высокую конъюгирующую активность с разными субстратами (Рис. 8) и высокое сродство к ХДНБ, являются более вероятными кандидатами на активное участие в процессах детоксикации как ксенобиотических, так и эндогенных метаболитов, чем ферменты фракции пластид.

Таблица 4. Кинетические характеристики GST из вакуолей, пластид и тканевого экстракта корнеплодов столовой свеклы

Объект исследования	ХДНБ			GSH		
	K_m , мкМ	V_{max} , мкМ/мин	V_{max}/K_m	K_m , мкМ	V_{max} , мкМ/мин	V_{max}/K_m
Вакуоли	295,62± 63,35	75,07± 11,7	0,26	130,23± 12,34	120,50± 18,3	0,93
Пластиды	134,52± 28,1	13,75± 1,51	0,102	112,18± 21,19	62,62± 10,93	0,56
Экстракт ткани	407,08± 43,3	95,51± 4,4	0,23	167,28± 23,2	126,54± 126,54	0,75

Изоферментный состав GST вакуолярной и пластидной фракций, а также тканевого экстракта исследовали при помощи зимографического метода выявления активности в полиакриламидном геле (Рис. 12). Изоферментный состав GST варьировал в зависимости от используемого субстрата. Контрольный вариант не содержал ни ХДНБ, ни гербицидов (Рис. 12, а). При этом с GSH без второго субстрата наблюдали неспецифическое окрашивание, которое указывало на присутствие других глутатион-зависимых ферментов. При добавлении ХДНБ, глифосата или флуородифена появлялись одна или две изоформы GST, специфичные к используемому субстрату (Рис. 12, б, в, г). В присутствии ХДНБ и ЭК число полос сокращалось и оставалась только неспецифическая активность, что также указывало на ингибирование фермента этакриновой кислотой (Рис. 12, д). По результатам зимографического исследования можно говорить о 1-2 изоформах GST вакуолей и 3 изоформах пластид с разной субстратной специфичностью. В тканевом экстракте также присутствовали изоформы, не относящиеся к пластидным и локализованные, вероятно, в вакуолях, цитозоле, пероксисомах или ядрах. Следует отметить, что в вакуолях были продемонстрированы изоформы GST, активные по отношению ко всем использованным субстратам, два из которых являются гербицидами.

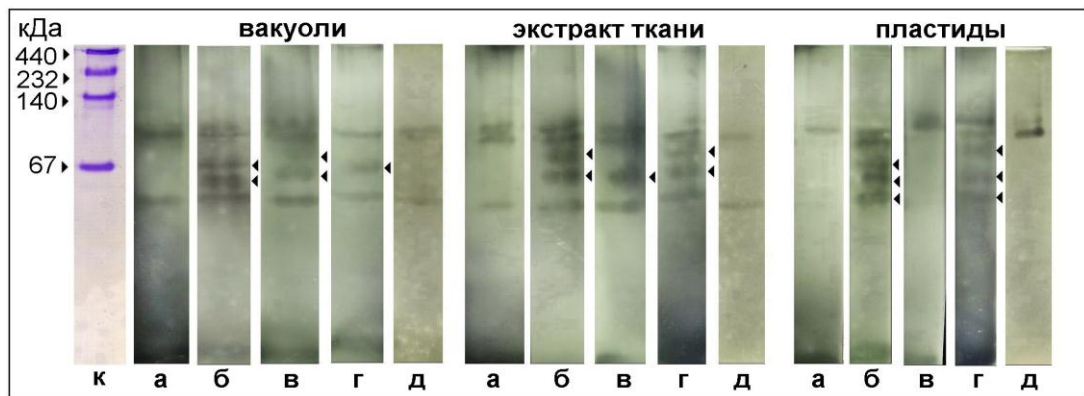


Рисунок 12. Активность GST вакуолей, пластид и экстрактов ткани в полиакриламидном геле: (а) – с глутатионом, (б) – с глутатионом и ХДНБ, (в) – с глутатионом и глифосатом, (г) – с глутатионом и флуородифеном, (д) – с глутатионом, ХДНБ и этакриновой кислотой. Негативное изображение.

Присутствие GSTs в вакуолях, специфичность активности которых подтверждена спектрофотометрическим и зимографическим методами, указывает на вклад центральной вакуоли в процессы детоксикации ксенобиотиков и эндогенных метаболитов и обеспечения нормальной жизнедеятельности растительных клеток.

Содержание аминокислот

Согласно сложившимся на сегодняшний день представлениям, глутатион транспортируется в вакуоль в дисульфидной форме главным образом для дальнейшей деградации. Таким образом контролируется редокс-соотношение глутатиона в цитозоле и редокс-статус цитоплазмы клетки в целом (Foyer et al. 2001; Noctor et al., 2011). Для деградации глутатиона в растениях было предложено два механизма. Первый включает отщепление глутамата с образованием цистенилглицина, катализируемое γ -глутамилтранспептидазами (GGT) (Ohkamu-Ohtsu et al., 2009). Второй начинается с отщепления глицина и катализируется карбоксипептидазой или фитохелатинсинтазой (Beck et al., 2003; Wolf et al., 1996), в результате чего образуется γ -глутамилцистеин. При этом последовательность реакций, приводящая к гидролизу глутатиона у растений, может быть видоспецифичной (Martin, Slovin, 2000). В вакуолях *A. thaliana* была обнаружена GGT4 (Ohkamu-Ohtsu et al, 2007б), а в вакуолях ячменя – карбоксипептидаза (Wolf et al., 2006), которые предположительно также могут участвовать в деградации глутатионовых конъюгатов.

Вопрос о деградации глутатиона в вакуолях столовой свеклы до сих пор не исследовался. В связи с этим было решено определить в вакуолях концентрацию свободных аминокислот, входящих в состав глутатиона (Табл. 5). В результате было установлено, что в вакуолях накапливается значительное количество глутаминовой кислоты (в среднем 1 мкМ), некоторое количество глицина и цистеина в окисленной форме (цистина, цистеиновой кислоты) (в среднем 0,250 мкМ). Обращало на себя внимание то, что концентрация восстановленного глутатиона в вакуолях была на два-три порядка выше, чем концентрация входящих в его состав аминокислот. Несмотря на то, что в последнее время в литературе широко обсуждается возможность деградации глутатиона в вакуолях, концентрационное соотношение глутамат : глицин : цистеин (с учетом того, что в состав цистина входит две молекулы цистеина), соответствующее в данном компартменте 5:1:2, не может служить фактическим подтверждением этого предположения. Кроме того, следует отметить, что глутамат при деградации глутатионовых конъюгатов и дисульфида глутатиона γ -глутамилтранспептидазами может

переноситься на другие соединения с образованием ди- и трипептидов (Ohkamu-Ohtsu et al., 2009).

Таблица 5. Содержание свободных аминокислот в вакуолях и тканевом экстракте

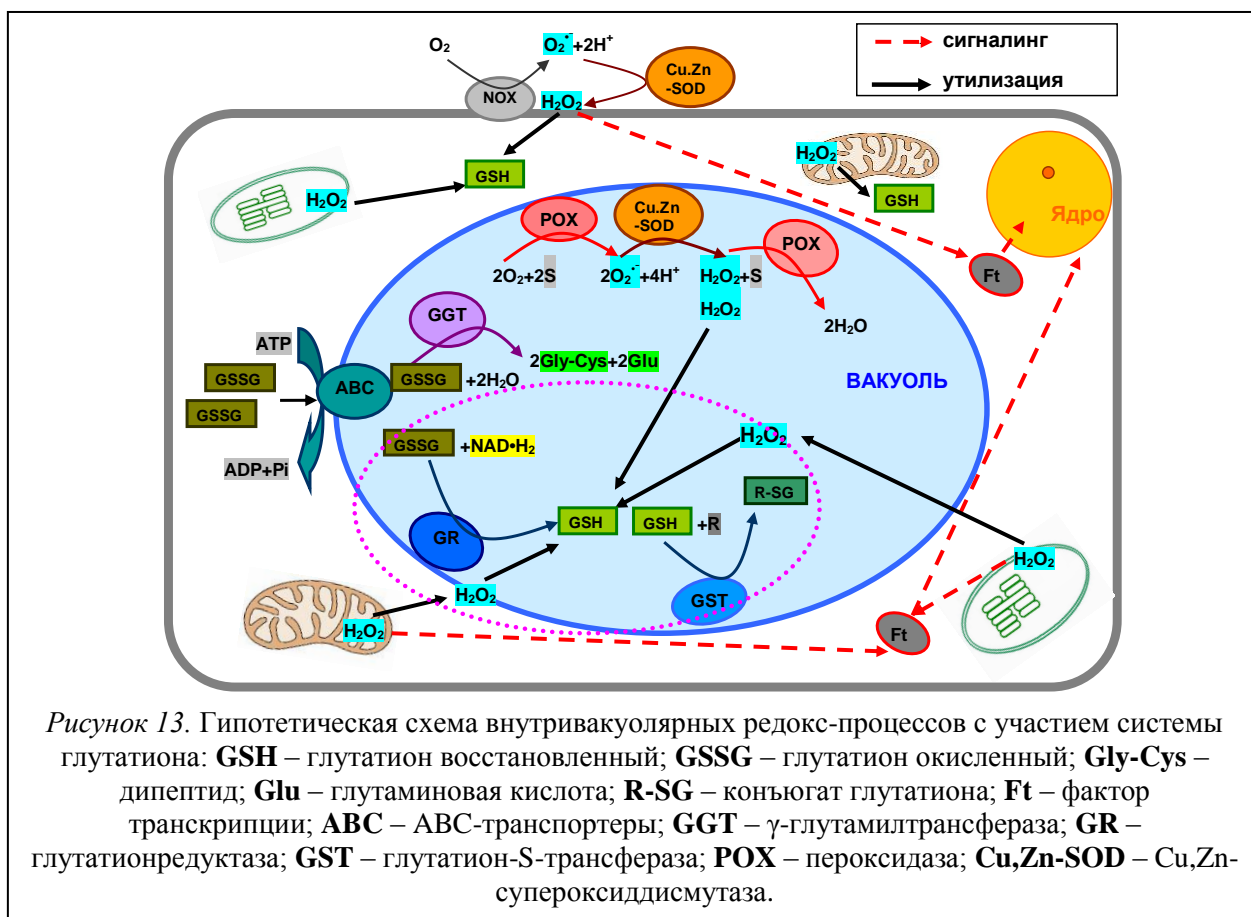
Объект исследования	Цистеин, к-та, мкМ	Асп, мкМ	Асн, мкМ	Глу, мкМ	Глн, мкМ	Гли, мкМ	Цистин, мкМ
Вакуоли	0,10± 0,01	0,94± 0,18	0,65± 0,19	1,39± 0,26	11,41± 1,52	0,17± 0,04	0,26± 0,05
Экстракт ткани	0,14± 0,03	1,16± 0,33	0,39± 0,07	1,21± 0,26	4,76± 1,75	0,07± 0,01	0,17± 0,05

Это указывает на то, что более предпочтительным является иной путь поступления глутамата в вакуоль. Следует отметить, что в вакуолях клеток корнеплодов столовой свеклы было обнаружено высокое содержание глутамина, а также аспарагина, аланина, серина и аргинина (данные представлены в диссертации). Таким образом, можно предположить, что глутамат не имеет отношения к деградации глутатиона, а транспортируется через тонопласт или образуется из глутамина и накапливается в вакуолях наряду с другими аминокислотами в качестве пула свободных аминокислот.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Центральная вакуоль растительной клетки является мультифункциональным компартментом. Классическими функциями, определившими классификацию вакуолей в клетках растений, считаются запасание различных метаболитов и лизис (Полевой, 1989). В последние годы также обсуждается участие вакуоли в таких процессах, как поддержание клеточного гомеостаза, редокс-защита и детоксикация ксенобиотиков (Carter et al., 2004; Ende, Valluru, 2009; Андреев, 2012;). Тем не менее, вакуоль по-прежнему рассматривают как пассивный компартмент, необходимый для депонирования выведенных из метаболизма соединений (GSH-конъюгатов с ксенобиотиками и т.п.) или для накопления антиоксидантов (аскорбата, сахарозы, фруктанов, фенолов), которые служат для детоксикации проникающего через тонопласт пероксида водорода (Ferrerres et al., 2011; Андреев, 2012). Однако на сегодняшний день уже накоплено достаточное количество данных, свидетельствующих в пользу довольно высокой метаболической активности вакуолей. Так, в вакуолях выявлены ферменты, способные выполнять как антиоксидантные, так и прооксидантные функции (фенол-зависимая пероксидаза и Cu,Zn-супероксиддисмутаза) (Kristensen et al., 1999; Carter et al., 2004; Прадедова и др., 2009, 2011). В связи с этим можно полагать, что вакуолярный компартмент служит не только для детоксикации поступающих в него АФК, но также способен продуцировать пероксид водорода, который с одной стороны может вовлекаться в окислительную модификацию транспортируемых в вакуоль соединений, а с другой стороны пересекать тонопласт и поступать в цитозоль. Для предотвращения неконтролируемого выхода H₂O₂ в цитозоль, в вакуолярном компартменте должны присутствовать антиоксидантные системы, регулирующие концентрацию локально генерируемых АФК и не образующие при этом активных радикалов (как это происходит в случае сахаров и фенолов) и в тоже время способные быстро регенерировать восстановленное состояние. Таким требованиям соответствует редокс-система глутатиона, которая в других клеточных компартментах участвует в антиоксидантной защите, детоксикации ксенобиотиков и эндотоксинов, а также выполняет сигнальную функцию (Noctor et al., 2011). В вакуолях корнеплодов столовой свеклы мы выявили такие компоненты редокс-системы глутатиона, как сам

глутатион, глутатионредуктаза и глутатион-S-трансфераза. В ходе проведенного исследования мы установили, что соотношение восстановленной и окисленной форм глутатиона, активность и кинетические характеристики GR и GST соответствовали таковым глутатиона и ферментов пластид, характерной особенностью которых является высокая активность системы глутатиона (Полесская, 2009; Noctor et al., 2011). На сегодняшний день наиболее популярна гипотеза, согласно которой основной метаболический путь глутатиона внутри вакуолей – деградация (Рис. 13). Эта гипотеза основывается на приоритетности транспорта в вакуоль окисленной формы глутатиона посредством ABC-транспортеров тонопласта. Подкрепляют ее и факты, демонстрирующие присутствие в вакуолях ферментов, катализирующих распад глутатиона (γ -глутамилтранспептидазы или карбоксипептидазы) (Wolf et al., 1996; Ohkamu-Ohtsu et al., 2009). Однако в нашем исследовании значительное содержание глутатиона, сопоставимое с концентрацией в тканевом экстракте и превышающее содержание глутатиона в пластидах, а также крайне восстановленное состояние глутатионного пула вакуолей и присутствие глутатион-зависимых ферментов свидетельствуют о том, что в вакуолях столовой свеклы транспортируемый глутатион не подвергается полному распаду, а, по всей видимости, восстанавливается специфичными GR и используется в реакциях детоксикации H_2O_2 , экзо- и эндотоксинов (Рис. 13). В то же



время значительное содержание глутатиона и высокая активность глутатион-зависимых ферментов в вакуолях запасавшей паренхимы корнеплодов столовой свеклы могут быть связаны с особенностями данного объекта исследования, который способен противостоять длительному воздействию стрессирующих факторов (пониженной температуры, водного дефицита и т.п.) и возобновлять ростовые процессы после продолжительного периода

покоя. Поэтому наблюдаемая в нашем исследовании высокая активность компонентов глутатионовой системы, не обнаруженная в некоторых органах и тканях других растительных объектов (Dietz et al., 1992; Rautenkranz et al., 1994), может быть как видо-, так и органо- или тканеспецифичной.

ВЫВОДЫ

Полученные в ходе проведенного исследования результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. В вакуолях корнеплодов столовой свеклы показано присутствие компонентов редокс-системы глутатиона: самого глутатиона, глутатионредуктазы и глутатион-S-трансферазы.

2. Глутатион в вакуолях содержится в микромолярных количествах и преимущественно в восстановленном состоянии, что соотносимо с содержанием глутатиона в тканевом экстракте и превышает его содержание в обогащенной фракции пластид корнеплодов столовой свеклы.

3. Активность, а также кинетические характеристики изоформ GR вакуолей сопоставимы с активностью и характеристиками аналогичных изоформ пластидной фракции. рН условия, оптимальные для активности фермента с НАДФН в качестве кофактора, находятся в нейтральной и слабощелочной области (7,5-8,0). GR вакуолей проявляет активность с НАДН в качестве кофактора в кислых условиях, при этом оптимальным для реакции является рН 5,0. Кроме того, в вакуолях показано присутствие НАДН в микромолярных количествах, однако вакуолярный пул, также как и пластидный и общий тканевой, в большей степени окислен. GR вакуолей, как и фермент пластид, ингибируется 1-хлор-2,4-динитробензолом по неконкурентному типу. В вакуолях обнаружено 2 изоформы GR, которые, предположительно, также присутствуют в тканевом экстракте. В пластидной фракции также обнаружены 2 изоформы глутатионредуктазы.

4. Активность глутатион-S-трансферазы с ХДНБ в качестве субстрата сопоставима с GST-активностью пластид, в то время как активность вакуолярного фермента с флуородифеном в качестве субстрата значительно превышает аналогичную активность пластид, но соотносима с тканевой GST-активностью. Оптимальные значения рН для вакуолярных изоформ GST находятся в области 7,0-8,0. Этакриновая кислота, соединение, которое также может служить субстратом для GST является сильным ингибитором глутатион-S-трансферазной активности вакуолей и пластид. Кинетические характеристики вакуолярных изоформ GST сопоставимы с характеристиками изоформ пластид с более высоким сродством к природному субстрату глутатиону и меньшим сродством к ХДНБ в обоих случаях. В вакуолях выявлено 2 изоформы GST с разной субстратной специфичностью к ХДНБ, глифосату и флуородифену.

5. Активность GR и GST вакуолей изменялась в зависимости от стадии развития корнеплода, при этом активность антиоксидантного фермента GR повышалась на поздней стадии покоя, а активность GST, участвующей в детоксикации ксенобиотиков или эндогенных метаболитов, была выше на стадии роста.

6. Аминокислотный анализ показал в вакуолях корнеплодов столовой свеклы значительное содержание глутаминовой кислоты, гораздо меньшую концентрацию глицина и цистеина в окисленной форме (цистина).

7. Полученные данные, вероятно, могут указывать на участие редокс-системы глутатиона в антиоксидантной защите и процессах детоксикации, происходящих в вакуолях корнеплодов столовой свеклы.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. Прадедова Е.В., Ишеева О.Д., Трухан И.С., Саляев Р.К. Образование перекиси водорода в вакуолях клеток корнеплодов столовой свеклы // Материалы III международного симпозиума «Клеточная сигнализация у растений». Казань (28 июня-1 июля 2011г.). С. 146-148.

2. Прадедова Е.В., Трухан И.С., Ишеева О.Д., Саляев Р.К. Редокс-система глутатиона вакуолей корнеплодов столовой свеклы // Материалы VII Съезд Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий». Н. Новгород (4-10 июля 2011 г.). Т. 2. С. 574-575.

3. Прадедова Е.В., Трухан И.С., Нимаева О.Д., Саляев Р.К. Детоксикация – одна из основных функций центральной вакуоли клеток растений // Всероссийская научная конференция с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений», Москва (2-6 июня 2013 г.). С. 150.

4. Прадедова Е.В., Трухан И.С., Нимаева О.Д., Мурач У.А., Саляев Р.К. Вакуоль как главное звено системы детоксикации растительной клетки // Всероссийская научная конференция «Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде». Иркутск (10-13 июня 2013 г.). С.200-203.

5. Трухан И.С., Прадедова Е.В., Нимаева О.Д., Саляев Р.К. Редокс-система глутатиона вакуолей и пластид клеток корнеплодов столовой свеклы // Всероссийская научная конференция «Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде». Иркутск (10-13 июня 2013 г.). С.203-207.

6. Прадедова Е.В., Трухан И.С., Нимаева О.Д., Саляев Р.К. Механизмы вакуолярной детоксикации, на примере вакуолей клеток корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Материалы I международного симпозиума «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений». Казань (17-20 сентября 2013 г.). С. 49.

7. Прадедова Е.В., Трухан И.С., Нимаева О.Д., Саляев Р.К. Образование пероксида водорода в вакуолях клеток корнеплодов столовой свеклы // ДАН. 2013. Т. 449, № 5. С. 614-617.

8. Трухан И.С., Прадедова Е.В., Нимаева О.Д., Саляев Р.К. Глутатион и глутатинредуктаза вакуолей клеток корнеплодов столовой свеклы // Вестник ИрГСХА. 2013. Вып. 55. С. 29-36.

9. Нимаева О.Д., Трухан И.С. Механизмы нейтрализации токсичных соединений в центральной вакуоли клеток растений // Сборник статей молодых ученых Иркутского научного центра Сибирского отделения РАН. 2013. Вып. 2. С. 66-68.