

Д. И. Литвин, Г. В. Портниченко, А. И. Емец, К. Бергуню,
академик НАН Украины Я. Б. Блюм

Участие метаболизма инозитолов в NO-зависимом опосредовании оксидативного стресса, индуцированного ультрафиолетом В

*Изучено влияние ультрафиолета В (УФ-В) на индукцию оксидативного стресса в растительной клетке и опосредование оксидом азота (NO) данных эффектов. Исследования проведены с использованием линий *Arabidopsis thaliana* дикого типа и мутантной по гену 1-L-мио-инозитол-1-фосфатсинтазы (*atips1*), которые были трансформированы геном, кодирующим редоксчувствительный флуоресцентный белок (*roGFP2*) как высокочувствительный сенсор окислительно-восстановительного потенциала в клетке. Установлено протекторное действие донора NO нитропруссид натрия при облучении растений УФ-В. Антиоксидативный эффект NO был более выражен в клетках мутантной линии, что свидетельствует о взаимосвязи метаболизма NO и мио-инозитолов в опосредовании индуцированного УФ-В оксидативного стресса.*

В последние десятилетия все большую актуальность получили исследования механизмов воздействия ультрафиолета В (УФ-В) (280–315 нм) на живые организмы. В первую очередь это связано с повышением количества УФ-В излучения, которое достигает земной поверхности вследствие активного разрушения атмосферного озонового слоя [1]. Одним из эффектов, инициируемых повышенным уровнем данного спектра солнечного излучения, является развитие процессов, приводящих к оксидативному стрессу [2].

Метаболизм мио-инозитола и его производных играет одну из критических ролей в жизнедеятельности растительной клетки [3]. Данные соединения принимают участие в функционировании значительного количества клеточных процессов — биогенеза клеточной стенки и мембранных структур, депонирования фосфатов, обеспечения передачи клеточных сигналов, а также устойчивости клетки к внешним стрессовым воздействиям [3]. Так, известна роль мио-инозитолов в опосредовании солевого и холодового стресса у растений [4]. УФ-В излучение способно индуцировать сигнальные каскады в клетке, а производные мио-инозитола, являясь одной из ключевых сигнальных молекул, способны опосредовать эти воздействия. Например, было показано [5], что инозитолгексафосфат способен ингибировать индуцированную УФ-В активацию транскрипционных факторов AP-1 и NF-κB в животной клетке, влияя тем самым на зависимую от УФ экспрессию генов. Критическим звеном биосинтеза мио-инозитола является высококонсервативный фермент 1-L-мио-инозитол-1-фосфатсинтаза 1 (*AtIPS1*, E. C.5.5.1.4) [6]. Поэтому изучение роли *AtIPS1* в развитии оксидативного стресса — необходимое условие для того, чтобы установить роль метаболизма инозитолов в целом в упомянутых выше процессах.

С другой стороны, известно, что оксид азота (NO) как сигнальная молекула участвует не только в регуляции развития, роста, цветения, формирования завязи и старения растительных тканей, но также в регуляции ряда сигнальных реакций в клетке, индуцированных как биотическими, так и абиотическими факторами [7]. Поэтому, принимая во внимание тот факт, что клеточные сигнальные каскады мио-инозитола и NO могут быть тесно перепле-

тены и взаимосвязаны, задачей данного исследования было выяснение закономерностей их совместного влияния на развитие оксидативного стресса, индуцированного УФ-В.

Эксперименты проводили на проростках *Arabidopsis thaliana* экотипа Columbia-0 (Col-0). Изменения уровней оксидативного стресса сопоставляли при сравнении реакции у растений дикого типа (Col-0) и линии, мутантной по гену AtIPS1 (*atips1*) [8]. Растения дикого типа и мутантные по AtIPS1 были трансформированы геном, кодирующим слитую конструкцию глутаредоксина и редоксчувствительного белка roGFP2-*grx1-rogfp2*. Белок roGFP2 (reduction-oxidation sensitive green fluorescent protein) является высокочувствительным биосенсором, позволяющим количественно исследовать окислительно-восстановительный статус живой клетки в реальном времени с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Использование roGFP2 в виде слитого белка с глутаредоксином существенно повышает чувствительность данного метода [9].

Количественное измерение уровня оксидативного стресса проводили с использованием конфокального микроскопа Zeiss LSM 510 META, оснащенного лазерами с длинами волн излучения 405, 488 и 543 нм. Изображения были получены при 20-кратном увеличении (объектив EC Plan-Neofluar 20x/0,5, Zeiss) в режиме мультитрек при линейном сканировании и усреднении данных от двух изображений. Длина волны возбуждения для восстановленного roGFP2 488 нм, для окисленного 405 нм. Интенсивность флуоресценции окисленной и восстановленной форм белка детектировали с использованием фильтра для диапазона длин волн 505–530 нм. Мощность лазеров составляла 20% для длины волны 488 нм и 40% — для 405 нм. Во всех экспериментах проводили предварительную калибровку точности метода с окислением/восстановлением образца при использовании 10 ммоль/л H₂O₂ и 10 ммоль/л дитиотреитола соответственно. Расчет соотношения окисленной и восстановленной форм белка (соотношение уровня флуоресценции при длине волны 405 нм к 488 нм) выполняли с использованием программного пакета Carl Zeiss Laser Scanning Microscope LSM510 Release Version 4.0 SP2. Перед тем как рассчитать интенсивность флуоресценции, на полученных изображениях проводили минимизацию интенсивности базальной фоновой флуоресценции для 405 и 488 нм. Изучению подвергались клетки апикальной меристемы корня, клетки зоны элонгации и сосудов корня, а также клетки гипокотыля и эпидермиса листа.

Семена *Arabidopsis* для исследований проращивали стерильно на агаризованной среде Мурасиге–Скуга (Duchefa Biochemie, Нидерланды), содержащей половинные концентрации солей и витаминов, а также 10 г/л глюкозы, рН 5,8. Проростки выращивали в климатической камере при 24 °С с продолжительностью светового (16 ч) и темнового (8 ч) периодов и интенсивностью освещения 3200 лк. Эксперименты проводили на пятидневных проростках, растения обрабатывали нитропруссидом натрия в концентрациях 0,01, 0,1 и 1,0 ммоль/л. Перед облучением УФ-В обработку нитропруссидом натрия проводили при ярком освещении в течение 1 ч, затем растения облучали УФ-В в дозах 34 и 81 кДж/м² на твердой агаризованной среде MS, следуя методике, описанной ранее [10].

В качестве дополнительного подхода для визуализации активных форм кислорода (а именно, H₂O₂) образцы окрашивали 3,3'-диаминобензидином (ДАБ). Для окрашивания использовали 0,2%-й раствор ДАБ (в/о) (“Sigma”, США), предварительно отфильтрованный через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Образцы инкубировали в растворе ДАБ в течение 1 ч при комнатной температуре с последующей фиксацией в 70%-м этиловом спирте. Затем образцы переносили в 50%-й хлоралин/глицерин (в/о), инкубировали 12 ч и монтировали препараты для световой микроскопии.

Через сутки после облучения растений УФ-В наблюдали четко выраженный оксидативный эффект. Действие ультрафиолета в качестве индуктора оксидативного стресса проявлялось не только в выраженной тканеспецифичности, но и в отличиях между растениями дикого типа и мутантной линии. Более чувствительными к действию УФ-излучения оказались клетки различных тканей корня, и данный эффект был более ярко выражен в мутантных по AtIPS1 растениях. Однако облучение растений в более высокой дозе (81 кДж/м²) приводило к сходным закономерностям развития оксидативного стресса в корнях растений дикого и мутантного типов. Надземные органы растений характеризовались существенно более высоким уровнем устойчивости к действию УФ-В. Статистически достоверные показатели оксидативного стресса, отличающиеся от контрольных, отмечались исключительно для клеток гипокотыля при применении обеих доз облучения ультрафиолетом — 34 и 81 кДж/м² (рис. 1).

При обработке перед облучением растений нитропруссидом натрия, являющимся широко используемым донором NO, наблюдали четко выраженный протекторный эффект. Так, предобработка растений дикого типа нитропруссидом натрия в концентрации как 0,01 ммоль/л, так и 0,1 ммоль/л приводила к снижению уровня оксидативного влияния УФ-В в тканях корня более чем в 6, 16 и 3 раза для апикальной меристемы, клеток зоны элонгации и клеток сосудов соответственно. В этом случае происходило восстановление белка roGFP2 до уровня, превышающего таковой в контроле. В клетках мутантных растений наблюдались аналогичные результаты. Соотношение уровня окисления в группах сравнения было не столь ярко выраженным, в частности за счет изначально более высокой толерантности мутанта к воздействию УФ-В. С меньшей степенью выраженности подобные закономерности наблюдали и при предварительной обработке нитропруссидом натрия в надземных тканях растений (см. рис. 1, а).

Облучение растений ультрафиолетом в более высокой дозе позволило обнаружить закономерности, указывающие на вовлечение метаболизма мио-инозитола в регуляцию окислительно-восстановительных процессов, происходящих под воздействием облучения. В большинстве тканевых локализаций предобработка растений нитропруссидом натрия не обеспечивала ожидаемого восстановительного эффекта, очевидно, из-за мощности данной дозы УФ. Однако в образцах растений, мутантных по AtIPS1, наблюдали существенное статистически достоверное протекторное воздействие донора NO на клетки зоны элонгации корня и клетки сосудов. Так, при использовании нитропрussa натрия в концентрации 0,1 ммоль/л уровень восстановления белка roGFP2 в клетках зоны элонгации был в 1,9 раз выше, чем в облученных образцах, не подвергавшихся предобработке донором NO. Аналогично, для клеток проводящих тканей данный показатель был выше в 2 раза (см. рис. 1, б).

Количественные данные по реакции флуоресцентного белкового биосенсора на уровни оксидативного стресса в клетках *A. thaliana* дикого типа и мутанта *atips1* также были подтверждены в дополнительных экспериментах с применением качественной реакции окрашивания с помощью ДАБ (рис. 2).

Роль NO как регулятора активности антиоксидантных ферментов при оксидативном стрессе, индуцированном УФ-В, уже описана ранее [11, 12]. В частности, было показано повышение активности таких важных компонентов антиоксидантной системы, как каталаза, аскорбатпероксидаза и супероксиддисмутаза при облучении листьев фасоли УФ-В в присутствии NO по сравнению с облученными, но необработанными NO растениями [12]. Достаточно хорошо охарактеризованы и пути участия NO в регуляции функционального

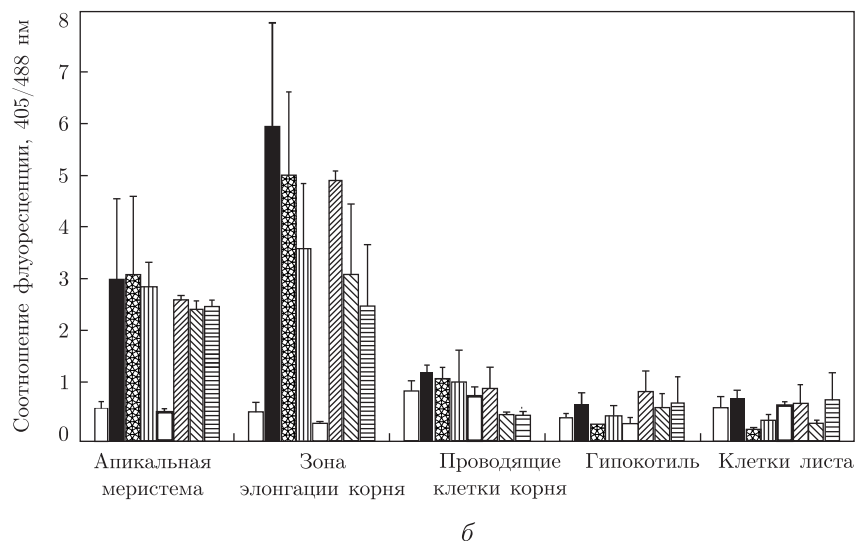
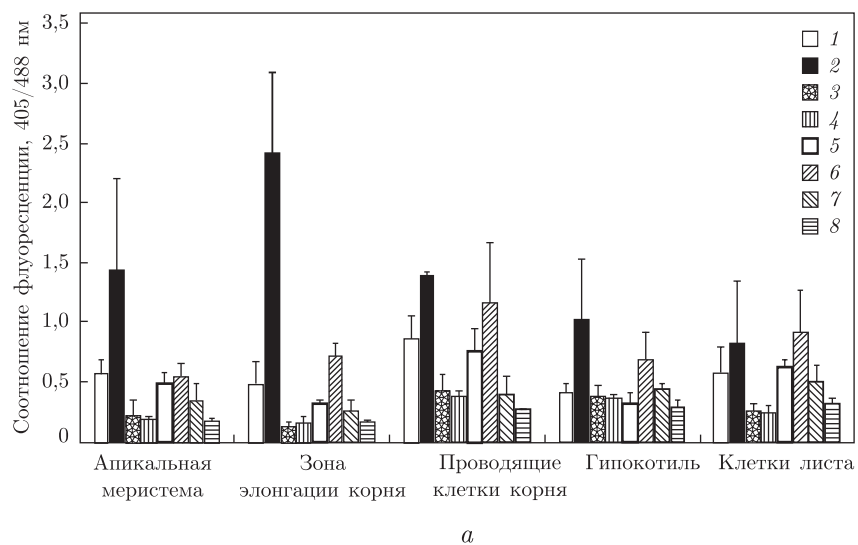


Рис. 1. Уровни оксидативного стресса в клетках *A. thaliana* дикого типа и *atips1* при обработке нитропруссидом натрия (SNP) и облучении УФ-В: а – 34 кДж/м²; б – 81 кДж/м². Условные обозначения. Col-0: 1 – контроль, 2 – УФ-В, 3 – 0,01 ммоль/л SNP + УФ-В, 4 – 0,1 ммоль/л SNP + УФ-В; *atips1*: 5 – контроль, 6 – УФ-В, 7 – 0,01 ммоль/л SNP + УФ-В, 8 – 0,1 ммоль/л SNP + УФ-В

состояния белков и активности ферментов посредством их посттрансляционных модификаций, а именно: нитротирозилирования и S-нитротирозилирования [13].

Наличие повышенной устойчивости к оксидативному стрессу у мутантной линии *atips1* может быть связано не только с каталитической функцией AtIPS1, но и с вовлечением этого фермента в регуляцию экспрессии генов. Так, белок AtIPS1 был идентифицирован также как партнер, взаимодействующий с белком ATXR5 [8]. Данный белок является метилтрансферазой, идентифицированной у *A. thaliana*, которая способна образовывать комплекс с PCNA (ядерным антигеном пролиферирующих клеток), и, таким образом, принимать участие в регуляции репликации ДНК и клеточного цикла [14]. Более того, результаты транскрипционного анализа растений *atips1*, выращенных в условиях длительного светового дня, позволяют выявить повышение уровня экспрессии 52 генов, потенциально вовлечен-

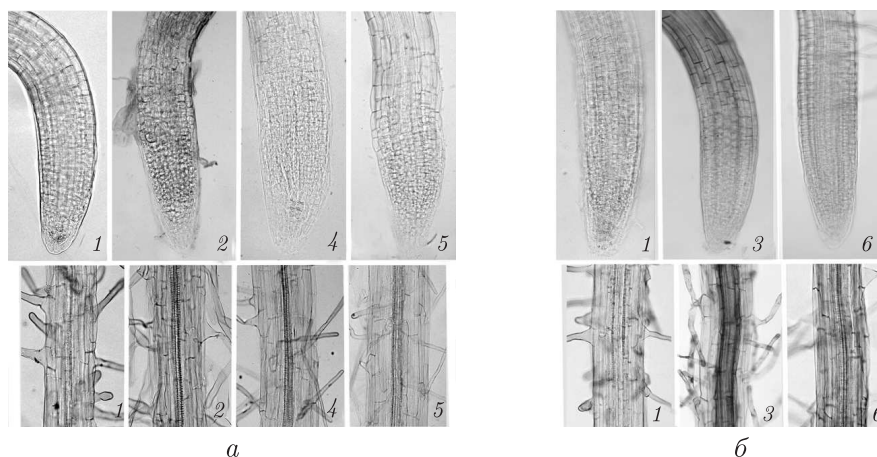


Рис. 2. Окраска ДАБ образцов *A. thaliana* дикого типа (а) и *atips1* (б) после обработки нитропруссидом натрия и облучения УФ-В.

Верхняя панель — апикальная зона корня и зона элонгации, *нижняя* — проводящие ткани корня. 1 — Контроль; 2 — облучение в дозе 34 кДж/м²; 3 — облучение в дозе 81 кДж/м²; 4 — инкубация с 0,01 ммоль/л нитропруссиды натрия (облучение в дозе 34 кДж/м²); 5 — инкубация с 0,1 ммоль/л нитропруссиды натрия (облучение в дозе 34 кДж/м²); 6 — инкубация с 0,1 ммоль/л нитропруссиды натрия (облучение в дозе 81 кДж/м²)

ных в процессы, сопряженные с оксидативным стрессом [8]. Совсем недавно в экспериментах на кукурузе было выявлено повышение уровня мио-инозитола в листьях, облученных УФ-В, а также его перемещение в листья, не подвергшиеся действию УФ. С другой стороны, повышенный уровень мио-инозитола может выступать сигналом ингибирования транскрипции мио-инозитол-1-фосфатсинтазы [15], что позволяет рассматривать это соединение как сигнальную молекулу при воздействии УФ-В на растительную клетку. Усиление защитного эффекта NO в растениях, дефицитных по белку AtIPS1, указывает на взаимосвязь данных сигнальных каскадов в регуляции экспрессии и/или активности антиоксидантных систем при воздействии УФ-В на клетку.

Таким образом, полученные нами результаты исследования позволяют предполагать, что сигнальные каскады NO, в равной степени как и метаболизм мио-инозитола, принимают участие в опосредовании оксидативного стресса в растительной клетке, а также утверждать о наличии взаимосвязи этих двух процессов, проявляющейся в нивелировании негативного воздействия УФ-В на растительную клетку. Одновременно, полученные данные являются предпосылкой для последующего изучения роли 1-L-мио-инозитол-1-фосфатсинтазы-1 в опосредовании растительной клеткой действия абиотических факторов, в том числе и УФ-В.

Исследование проведено при поддержке гранта ТОВ “ОПТЕК” для реализации проекта “Координация внутриклеточного сигналлинга активных форм кислорода и азота у растений с участием мио-инозитола и протеинкиназ при действии УФ-В и низких температур” в 2012 году.

1. McKenzie R. L., Aucamp P. J., Bais A. F. et al. Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface // Photochem. Photobiol. Sci. – 2007. – 6, No 3. – P. 218–231.
2. Chen K., Feng H., Zhang M., Wang X. Nitric oxide alleviates oxidative damage in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* caused by UV-B radiation // Folia Microbiol. – 2003. – 48. – P. 389–393.
3. Loewus F. A., Murthy P. P. Myo-inositol metabolism in plants // Plant Sci. – 2000. – 150. – P. 1–19.

4. Bohnert H. J., Nelson D. E., Jensen R. G. Adaptations to environmental stresses // *Plant Cell*. – 1995. – **7**, No 7. – P. 1099–1111.
5. Chen N., Ma W. Y., Dong Z. Inositol hexaphosphate inhibits ultraviolet B-induced signal transduction // *Mol. Carcinog.* – 2001. – **31**, No 3. – P. 139–144.
6. Loewus F. A., Loewus M. W. Myo-inositol: its biosynthesis and metabolism // *Ann. Rev. Plant Phys.* – 1983. – **34**. – P. 137–161.
7. Arasimowicz M., Floryszak-Wieczorek J. Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses // *Plant Sci.* – 2007. – **172**. – P. 876–887.
8. Meng P. H., Raynaud C., Tcherkez G. et al. Crosstalks between myo-inositol metabolism, programmed cell death and basal immunity in Arabidopsis // *PLoS One*. – 2009. – **4**, No 10. – P. 7364.
9. Gutscher M., Pauleau A. L., Marty L. et al. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential // *Nat. Methods*. – 2008. – **5**, No 6. – P. 553–559.
10. Lytvyn D. I., Yemets A. I., Blume Ya. B. UV-B overexposure induces programmed cell death in a BY-2 tobacco cell line // *Environm. Exp. Bot.* – 2010. – **68**, No 1. – P. 51–57.
11. Zhao M., Zhao X., Wu Y., Zhang L. Enhanced sensitivity to oxidative stress in an Arabidopsis nitric oxide synthase mutant // *J. Plant Physiol.* – 2007. – **164**, No 6. – P. 737–745.
12. Shi S., Wang G., Wang Y. et al. Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation // *Nitric Oxide*. – 2005. – **13**, No 1. – P. 1–9.
13. Yemets A. I., Krasnylenko Y. A., Lytvyn D. I. et al. Nitric oxide signalling via cytoskeleton in plants // *Plant Sci.* – 2011. – **181**, No 5. – P. 45–54.
14. Raynaud C., Sozzani R., Glab N. et al. Two cell-cycle regulated SET-domain proteins interact with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in Arabidopsis // *Plant J.* – 2006. – **47**. – P. 395–407.
15. Casati P., Campi M., Morrow D. J. et al. Transcriptomic, proteomic and metabolomic analysis of UV-B signaling in maize // *BMC Genomics*. – 2011. – **12**. – P. 321.

ГУ “Институт пищевой биотехнологии
и геномики НАН Украины”, Киев
Институт биологии растений,
Университет Южного Парижа, Орсе, Франция

Поступило в редакцию 01.11.2011

Д. І. Литвин, Г. В. Портніченко, А. І. Ємець, К. Бергуню,
академік НАН України **Я. Б. Блюм**

Участь метаболізму інозитолів у NO-залежному опосередкуванні оксидативного стресу, індукованого ультрафіолетом В

Вивчено вплив ультрафіолету В (УФ-В) на індукцію оксидативного стресу в рослинній клітині та опосередкування оксидом азоту (NO) даних ефектів. Дослідження проведено з використанням ліній Arabidopsis thaliana дикого типу та мутантної по гену 1-L-міо-інозитол-1-фосфатсинтази (atips1), які були трансформовані геном, що кодує редоксчутливий флуоресцентний білок (roGFP2) як високочутливий сенсор окиснювально-відновного потенціалу в клітині. Встановлено протекторну дію донора NO нітропрусиду натрію при опроміненні рослин УФ-В. Антиоксидативний ефект NO був більш виражений у клітинах мутантної лінії, що свідчить про взаємозв'язок метаболізму NO та міо-інозитолів в опосередкуванні індукованого УФ-В оксидативного стресу.

D. I. Lytvyn, G. V. Portnichenko, A. I. Yemets, C. Bergounioux,
Academician of the NAS of Ukraine **Ya. B. Blume**

Involvement of inositol metabolism in NO-dependent mediation of oxidative stress induced by ultraviolet B

The influence of ultraviolet B (UV-B) on the induction of oxidative stress in plant cells and nitric oxide (NO) mediation of these effects is studied. Experiments were performed using Arabidopsis thaliana of the wild type and plants mutant by the gene of 1 L-myo-inositol 1-phosphate synthase (atips1), which were transformed with a gene encoding the redox-sensitive fluorescent protein (roGFP2), which is a highly sensitive sensor of redox potential in a cell. The protective effect of NO donor sodium nitroprusside under irradiation of plants with UV-B is shown. The antioxidant effect of NO was more pronounced in the mutant line, indicating the relationship of NO signaling and metabolism of myo-inositols in the mediation of UV-B induced oxidative stress in plant cells.