

ЭФФЕКТ ИОНОВ МАРГАНЦА НА АСКОРБАТ-ИНДУЦИРУЕМОЕ ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО КАЛЬЦИЯ В КЛЕТКАХ КОРНЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

В. А. Кучинская

*Белорусский государственный университет, г. Минск;
kuchynskayaVA@gmail.com; науч. рук. – М. А. Войтехович*

L-аскорбиновая кислота способна вызывать редокс-зависимое повышение уровня цитоплазматической активности кальция, обусловленное действием ионов переходных металлов (главным образом, медь и железо). Марганец, как один из представителей таких металлов, потенциально может быть задействован в запуске данного механизма. В связи с этим было исследовано действие ионов марганца на аскорбат-индуцируемое повышение уровня цитоплазматической активности кальция в клетках корня высших растений. Было показано, что в отличие от меди и железа, марганец не участвует в редокс-зависимом повышении цитоплазматической активности кальция, а выступает ингибитором окислительного стресса. Такое действие марганца может быть обусловлено его весьма незначительным восстановительным потенциалом, и как следствие, неспособностью вызывать образование активных форм кислорода.

Ключевые слова: кальциевая сигнализация; кальций-проницаемые каналы; L-аскорбиновая кислота; ионы марганца; эквориновая хемиллюминометрия; *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh..

ВВЕДЕНИЕ

L-аскорбиновая кислота или L-аскорбат (АК) – многофункциональное соединение, участвующее в окислительно-восстановительных реакциях, фотосинтезе, прорастании семян, цветении, клеточной регуляции активных форм кислорода (АФК), системе окислительной защиты, стабильности мембран, запрограммированной клеточной гибели и т.д. Недавние исследования показали, что АК, известная как основной антиоксидант клетки, может выступать в качестве сигнально-регуляторного агента [1, 2]. В основе данного механизма апопластный пул аскорбата выступает восстановителем переходных металлов (главным образом Cu^{+2+} и $\text{Fe}^{2+/3+}$, содержащихся в следовых количествах в клеточной стенке), передающих электрон на кислород в H_2O_2 с образованием гидроксильного радикала. Генерация АФК приводит к активации Ca^{2+} -проницаемых катионных каналов и входу Ca^{2+} в клетку, т.е. запуску кальциевой сигнализации [1, 2]. Таким образом, внеклеточная АК способна индуцировать рост активности цитоплазматического Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$) в результате гидроксил-зависимой активации Ca^{2+} -

проницаемых катионных каналов, обусловленной действием ионов переходных металлов. Таким образом, переходным металлам принадлежит важная роль в запуске данного механизма.

Марганец – один из представителей переходных металлов, играющий важную роль в метаболизме высших растений наряду с медью и железом [3]. В клетках растений марганец принимает участие в активации ферментов, участвующих в синтезе аминокислот и лигнина, регуляции выработки гормонов, вовлечен в процесс дыхания, участвует в редокс-реакциях, происходящих в фотосинтетических ЭТЦ, образует Mn-содержащий кластер, катализирующий окисление воды [3]. В связи с этим, целью настоящей работы являлось установление влияния ионов переходного металла марганца ($Mn^{2+/3+}$) на аскорбат-индуцируемое повышение $[Ca^{2+}]_{цит.}$ в клетках корня высших растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Регистрация уровней Ca^{2+} осуществлялась с использованием хемилюминометра Turner BioSystems 20/20 (США). Для определения $[Ca^{2+}]_{цит.}$ применялись стандартные экспериментальные подходы, основанные на регистрации и анализе экворин-люминесценции [4, 5].

Корни примерно 200 проростков 7-10-дневных растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотипа Col-0, конститутивно экспрессирующие Ca^{2+} -связывающий фотобелок экворин под контролем вирусного промотора S35, отсекались от побегов и инкубировались в растворе, содержащем 0,1 ммоль/л $CaCl_2$ с рН 6,0 (Tris / Mes) и 4 мкг/мл целентеразина в течении 12-18 ч в полной темноте. Инкубация корней в растворе с целентеразином необходима для восстановления экворина. Экворин – люминесцентный белок, выделенный из медузы эквореи (*Aequorea victoria*), состоит из белковой части (апопротеин) и простетической группы целентеразина. Апоэкворин реагирует с целентеразином в присутствии кислорода, в результате формируется активная форма фотобелка – экворин, способная связывать 3 иона кальция. Связывание Ca^{2+} переводит экворин в возбужденное состояние и вызывает испускание синего света при длине волны 469 нм. При этом целентеразин превращается в целентерамид, который может быть в дальнейшем окислен кислородом до целентеразина. Белок теряет Ca^{2+} и снова превращается в апоэкворин, готовый к новому циклу реакции. После восстановления экворина корни распределялись в кюветы, содержащие 300 мкл раствора 10 ммоль/л $CaCl_2$ с рН 6,0 (Трис / Мес) и 4 мкг/мл целентеразина. Каждая кювета выдерживалась в покое и полной темноте не менее 20 мин для стабилизации базального $[Ca^{2+}]_{цит.}$ Да-

лее, кюветы помещались в рабочий отсек люминометра, и записывался временной ход эмиссии светового сигнала от экворина с частотой 1 Гц. Равный объем (300 мкл) тестируемого раствора вводился в кювету через канал, ведущий в рабочий отсек люминометра. В конце каждого эксперимента производилось гашение всего пула экворина раствором 2 моль/л CaCl₂ в 20 % этаноле.

Запись временного хода изменения [Ca²⁺]_{цит.} в клетках корня в ответ на введение в наружный раствор тест-агента характеризуется несколькими, непрерывно сменяющимися друг друга этапами. На первом этапе записывается базальный уровень [Ca²⁺]_{цит.} в клетках корня (~120 с). На втором этапе после добавления тест-агента следует первичное «спайкообразное» увеличение [Ca²⁺]_{цит.}, связанное с активацией механочувствительных каналов. На третьем этапе происходит вторичное «волнообразное» увеличение [Ca²⁺]_{цит.} длительностью около 600–800 с. На четвертом этапе – затухание Ca²⁺-волны (связанное с закрыванием катионных каналов и активацией систем устранения Ca²⁺ из цитоплазмы). На пятом этапе – возвращение [Ca²⁺]_{цит.} на базальный уровень. На шестом этапе – «гашение» всего пула экворина раствором 2 моль/л CaCl₂ в 20 % этаноле.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проделанной работы установлено влияние Mn^{2+/3+} на аскорбатиндуцируемое повышение [Ca²⁺]_{цит.} в клетках корня высших растений (таблица 1).

Таблица 1

Изменение [Ca²⁺]_{цит.} в ответ на введение в наружный раствор тест-агентов*

Тест-агент, ммоль/л	[Ca ²⁺] _{цит.} , нмоль/л ± SE*
10 CaCl ₂	7,34 ± 2,24
1 Mn ²⁺	19,69 ± 1,97
1 АК	56,55 ± 4,58
1 H ₂ O ₂	140,61 ± 14,60
1 Mn ²⁺ , 1 H ₂ O ₂	106,01 ± 10,55
1 Mn ²⁺ , 1 АК	12,57 ± 1,13
1 Mn ²⁺ , 1 АК, 1 H ₂ O ₂	78,73 ± 10,60
2 гистидин	17,15 ± 1,87
1 Mn ²⁺ , 2 гистидин	12,14 ± 1,95
1 Mn ²⁺ , 2 гистидин, 1 АК	12,34 ± 2,11
1 Mn ²⁺ , 2 гистидин, 1 H ₂ O ₂	109,52 ± 8,93
1 Mn ²⁺ , 2 гистидин, 1 АК, 1 H ₂ O ₂	78,73 ± 15,29

* Для расчета достоверности отличий между группами величин производился анализ на основе ANOVA-теста, где $p < 0,0001$, n (выборка) = 10–13

Показано, что введение во внеклеточное пространство 1 ммоль/л АК активирует вход Ca^{2+} в клетки и приводит к временному увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$. Добавление в наружную среду 1 ммоль/л Mn^{2+} не оказывает существенного воздействия на изменение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$ в клетках корня. Добавление смеси 1 ммоль/л Mn^{2+} , АК приводит к снижению $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$ по сравнению с 1 ммоль/л Mn^{2+} на 36 % и 1 ммоль/л АК на 78 %, т.е. наблюдается ингибирование аскорбат-индуцированного кальциевого сигнала в клетках корня арабидопсиса под действием ионов марганца. Добавление 1 ммоль/л Mn^{2+} к 1 ммоль/л H_2O_2 приводит к снижению $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$ на 25 % по отношению к 1 ммоль/л H_2O_2 . Уменьшение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$ при добавлении в среду к корням 1 ммоль/л Mn^{2+} , АК, H_2O_2 наблюдалось на 26 % по отношению к таковой смеси без аскорбата.

Кроме того, было исследовано влияние марганца в комплексе с гистидином. L-гистидин – аминокислота, способная к формированию с марганцем нескольких стабильных конформационных комплексов. Было показано, что 2 ммоль/л гистидин и комплекс 1 ммоль/л Mn^{2+} с 2 ммоль/л гистидином приводит лишь к незначительному повышению уровня $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$ в клетках. Добавление 1 ммоль/л АК в комплекс 1 ммоль/л Mn^{2+} , 2 ммоль/л гистидин не влияет на $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$. Комплекс марганца с гистидином оказывал ингибирующее влияние на рост $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$, связанное с действием 1 ммоль/л H_2O_2 . Сочетанное действие всех тест-агентов (1 ммоль/л Mn^{2+} , 2 ммоль/л гистидин, 1 ммоль/л АК, 1 ммоль/л H_2O_2) на рост $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$ было ниже на 28 % по сравнению с пробой без аскорбата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным данным, влияние $\text{Mn}^{2+/3+}$ на аскорбат-индуцируемое повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$ у высших растений проявляется иначе, чем для Cu^{+2+} и $\text{Fe}^{2+/3+}$. Это может быть связано с подавлением марганцем оксидативного стресса, вероятнее всего за счет его участия в регуляции активности супероксиддисмутаза как компонента их простетической группы.

Библиографические ссылки

1. L-аскорбиновая кислота как антиоксидант и сигнально-регуляторный агент в клетках высших растений / М. А. Войтехович [и др.] // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2018. № 2. С. 27–38.

2. Novel roles of ascorbate in plants: induction of cytosolic Ca²⁺ signals and efflux from cells via anion channels / M. Makavitskaya [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. 2018. V. 69, № 14. P. 3477–3489. DOI: 10.1093/jxb/ery056.
3. *Barker A. V., Pilbeam D. J.* Handbook of Plant Nutrition. Boca Raton, 2007.
4. *Demidchik V., Shabala S.* Mechanisms of cytosolic calcium elevation in plants: the role of ion channels, calcium extrusion systems and NADPH oxidase-mediated ‘ROS-Ca²⁺ Hub’ // *Functional Plant Biology*. 2017. V. 45, № 2. P. 9–27. DOI: 10.1071/fp16420.
5. Calcium transport across plant membranes: mechanisms and functions / V. Demidchik [et al.] // *New Phytologist*. 2018. V. 220, № 1. P. 49–69. DOI: 10.1111/nph.15266.