

АНАЛИЗ АВТОФАГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ, ИНДУЦИРУЕМЫХ ИОНАМИ НИКЕЛЯ, ПРИ ПОМОЩИ ATG8a-mCHERRY

А.В. Ныч

Белорусский государственный университет, г. Минск;

v.mackievic@gmail.com;

науч. рук.- В.С. Мацкевич

В условиях недостаточного количества питательных веществ автофагическая деградация макромолекул и их повторное использование являются неотъемлемой частью способности растения адаптироваться к окружающей среде. Принципиальной задачей является изучение структуры и функций ключевых автофагических белков, в частности, молекулярного маркера автофагии ATG-8. Также одной из важных экологических проблем современности является загрязнение почв тяжелыми металлами. Избыток Ni^{2+} в почве вызывает торможение или полную остановку роста корневой системы, хлороз и некроз листьев, отмирание репродуктивных органов, нарушение процессов дифференцировки клеток, минерального питания и фотосинтеза. Целью данной работы стало протестировать влияние повышенных уровней никеля в среде на индукцию автофагии в клетках корня арабидопсиса при помощи ATG8a-mCherry.

Ключевые слова: автофагия; никель; гистидин; флуоресцентная микроскопия; пропиридиум йодид; корень; арабидопсис; ATG8a-mCherry.

ВВЕДЕНИЕ

В отличие от животных, растения являются неподвижными организмами, которые вынуждены переносить переменные и суровые условия окружающей среды. Для обеспечения выживания в таких условиях растительные организмы имеют ряд механизмов, одним из которых является автофагия – процесс утилизации избыточных или поврежденных белков, белковых комплексов и клеточных органелл, осуществляемый самой же клеткой [3]. Автофагия играет двоякую роль: с одной стороны, она направлена на выживание клетки, с другой – служит частью процесса клеточной гибели. Автофагия в растениях недостаточно хорошо изучена, однако имеющиеся научные сведения свидетельствуют о важности этого процесса в жизни растений. Целью настоящей работы стало протестировать влияние повышенных уровней никеля в среде на индукцию автофагии в клетках корня арабидопсиса при помощи ATG8a-mCherry. В последнее время ученые сходятся во мнении, что токсичность избытка Ni^{2+} для растений обусловлена его высокоспецифичным связыванием с рядом внутриклеточных лигандов, а также индукцией окислительного стресса вследствие гиперпродукции активных форм кислорода (АФК) [2, 4]. Тем не менее, Ni^{2+} не обладает редокс-активностью, т. е. напрямую не может катализировать Фентон-подобные реакции, генерирующие гидроксильный радикал. Известно, что растения в ответ на никелевый стресс синтезируют

аминокислоту гистидин (Гис), которая может формировать редокс-активные комплексы данного металла (Ni-Гис и Ni-Гис₂) [2]. Синтез Гис, приводящий к устранению избытка свободной формы никеля, является важной эволюционной стратегией выживания на фоне повышенных уровней Ni²⁺ в среде. Однако, по ряду оценок, Ni-Гис комплексы могут обладать большей токсичностью, отличаясь от свободных ионов никеля высокой способностью катализировать генерацию АФК [1]. Соответственно, возникает вопрос о токсичности Ni-Гис для растений, а также о роли генерации АФК при Ni-стрессе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись растения *Arabidopsis thaliana*, у которых экспрессируется меченый mCherry белок ATG8a. Арабидопсис выращивался в стерильной вертикальной культуре в чашках Петри на полной среде Мурасиге и Скуга (МС), pH 6,0, 1 % сахароза, 0,35 % Phytigel, в контролируемых условиях 22°C, 16 ч свет / 8 ч темнота. Для проведения ростовых тестов растения культивировались на среде МС в течение 5 сут. Затем для индукции автофагии проростки перемещались на новые среды: 1) полноценная МС (контроль); 2) 10 % МС; 3) полноценная МС без сахарозы. Для индукции Ni-стресса растения переносились на среды, содержащие: 1) 1 mM Ni; 2) 1 mM Ni, 2 mM Гис. Регистрация симптомов автофагии производилась на 5 сут после переноса. Для тестирования острого действия сублетальных и летальных уровней Ni 7–10 дневные растения помещались в растворы Ni и Ni-Гис на 15 ч. Контролем выступал буферный раствор (mM): 0,1 KCl, 0,1 CaCl₂, 1 Трис / 2 Мес, pH 6,0. Затем растения окрашивались PI (10 мкг/мл) в течение 10 мин, после чего корни промывались 3 раза в буфере и анализировались при помощи инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse TS100F при $\lambda_{ex}=470$ нм; $\lambda_{em}=680$ нм. Интенсивность флуоресценции в корнях арабидопсиса определялась в приложении ImageJ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве тест-системы для регистрации автофагии был выбран дефицит сахарозы. Нами были опробованы различные варианты ростовых техник: тест на прорастание, замена среды и перенос растений. В первом варианте отсутствие сахарозы практически полностью останавливало прорастание семян. Во втором случае изымалась лишь 2/3 среды, следовательно, уровень сахарозы не был критически малым и значительное торможение роста либо другие негативные симптомы дефицита питательных веществ не регистрировались при культивировании в течение 5 сут. Та-

ким образом, оптимальным вариантом представлялся эксперимент с использованием техники переноса среды. Перенос растений арабидопсиса на контрольную среду (100 % МС) или среду с уменьшенным количеством минеральных веществ (10 % МС) не индуцировал увеличение красной флуоресценции ATG8a-mCherry (рисунок 1). Перенос проростков на МС без сахарозы увеличивал флуоресценции ATG8a-mCherry в кончиках корней на 50 %, в зрелой зоне на 80–90 %, что свидетельствует об индукции автофагии. Таким образом, для получения энергии в отсутствие источника углеводов, запускалась реакция деградации внутриклеточных молекул, в особенности в старых клетках.

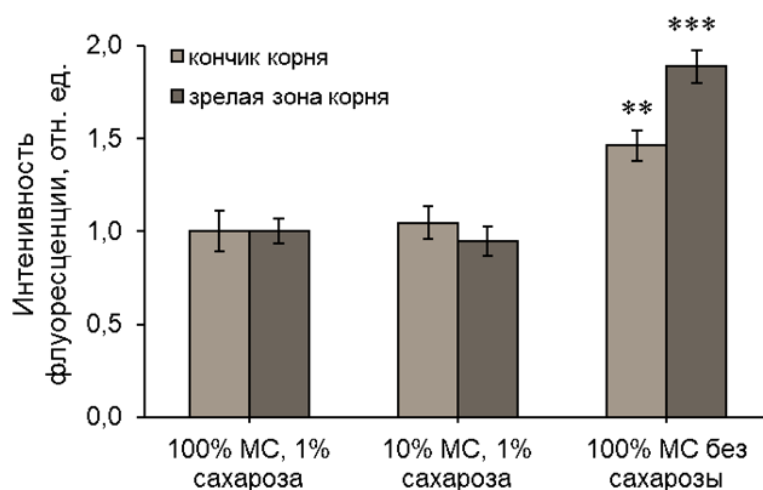


Рис. 1. Индукция автофагии в корнях арабидопсиса при сахарозном голодании: средние значения интенсивности флуоресценции ATG8a-mCherry ($X \pm SE$, $n=5-17$). Достоверность различий рассчитывалась по отношению к контролю при помощи ANOVA-теста: ** – $p \leq 0,01$ и *** – $p \leq 0,001$

Выращивание растений на никелевой среде не вызывало значительного изменения в флуоресценции ATG8a-mCherry (рисунок 2). Введение Гис совместно с Ni в соотношении 1:2 индуцировало увеличение флуоресценции mCherry в зоне кончика корня на 20 %, в то время как в зрелой зоне флуоресценция была на уровне контроля. Вероятно, взаимодействие Ni с Гис играет важную роль в запуске автофагии. В комплексе никель приобретает редокс-активность и катализирует синтез АФК, которые могут служить сигналом для индукции автофагических реакций.

Также нами была протестирована общая жизнеспособность клеток корня арабидопсиса при 15-часовом воздействии смесей Ni и Ni-Гис при помощи PI. Было выявлено, что обработка растений летальными концентрациями Ni вызывала 30 % прирост флуоресценции PI в кончиках корня и 20 % – в зрелой зоне. Добавление Гис не оказывало достоверно значи-

мых изменений жизнеспособности клеток. Введение Гис совместно с никелем снижало токсичность металла, свечение PI было на уровне контроля. Таким образом, Гис оказывал протекторное действие.

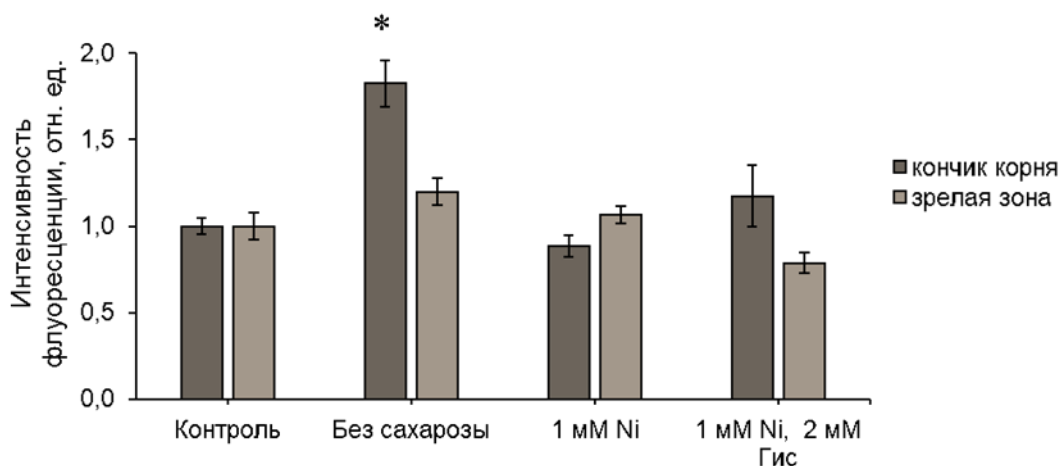


Рис. 2. Флуоресценции ATG8a-mCherry в контрольных условиях и при выращивании на средах, содержащих Ni^{2+} и Ni-гистидиновые комплексы: средние значения интенсивности флуоресценции ATG8a-mCherry ($\bar{X} \pm \text{SE}$, $n=8-16$). Достоверность различий рассчитывалась по отношению к контролю: * – $p \leq 0,05$

В результате нами было показано: 1) при помощи ATG8a-mCherry можно детектировать индукцию автофагии в клетках растений; 2) при сахарозном голодании наблюдается индукция автофагии в кончиках корня и в зрелой зоне корня; 3) 1 mM Ni не оказывает влияния на индукцию автофагии, а комплекс Ni-Гис увеличивает автофагию в кончиках корней. Вероятно, взаимодействие никеля с Гис играет важную роль в распознавании никелевого стресса: в комплексе с Гис никель приобретает редокс-активность и способен катализировать продукцию АФК, которые могут служить сигналом для индукции автофагических реакций; 4) летальные уровни Ni значительно снижают общую жизнеспособность клеток корня, введение Гис совместно с никелем нивелирует токсичность металла. Таким образом, Гис оказывает протекторное действие.

Библиографические ссылки

1. Demidchik, V. Reactive oxygen species and oxidative stress in plants / V. Demidchik. – In: Plant stress physiology. 2nd edition. S. Shabala (ed.), 2012. – P. 24–58.
2. Occurrence, physiological responses and toxicity of nickel in plants / T.V.M. Sreekanth [et al.] // International Journal of Environmental Science and Technology. – 2013. – Vol. 10, № 5. – P. 1129–1140.
3. Senescence and death of plant organs: nutrient recycling and developmental regulation / A. Guiboileau [et al.] // C. R. Biol. – 2010. – Vol. 333, № 4. – P. 382–391.
4. The role of ion disequilibrium in induction of root cell death and autophagy by environmental stresses / V. Demidchik [et al.] // Functional plant biology. – 2017. – Vol. 45, № 1. – P. 28–46.