

А. В. ХОМЯК¹, Ю. В. ЗАДВОРНОВА², В. П. ЕГОРОВА^{1,3}

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ ПРИ СТАРЕНИИ СЕМЯДОЛЕЙ РАЗВИВАЮЩИХСЯ ПРОРОСТКОВ СОИ (*Glycine max* L.)

¹Белорусский государственный педагогический университет им. М. Танка, Минск
²Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск,
³Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск

Введение. Исследования, проведенные в последние годы, свидетельствуют об общности механизмов программируемой клеточной смерти (ПКС) у животных, растений и грибов [1].

Общезвестно, что ПКС у растений служит для выполнения таких жизненно важных функций, как реализация программы развития, дифференцировка клеток и тканей при эмбриогенезе и постэмбриональном развитии, защита от патогенов и неблагоприятных воздействий окружающей среды [2].

Как и у животных, в клетках растений наблюдается ряд характерных структурно-морфологических изменений: конденсация хроматина и дробление ядра, сжатие протопласта, складчатость и вакуолизация цитоплазмы [3].

На биохимическом уровне растительные клетки, в которых индуцирована ПКС, характеризуются доменной и межнуклеосомной фрагментацией ядерной ДНК, активацией терминальных эндонуклеаз и сериновых протеаз [4].

К настоящему времени данных о механизме ПКС у растений накоплено недостаточно. Ряд авторов полагают, что реально у растений представлены по меньшей мере две формы ПКС, одна из которых реализуется в онтогенезе как обязательная программа развития и старения (физиологическая клеточная смерть) [5], а другая индуцируется при внедрении патогена или воздействии абиотических стрессоров (апоптоз) [6]. Хотя во многом пути этих двух форм пересекаются и скоординированы, активация летальных генов и генов-маркеров ПКС при старении и при вирусной инфекции различна [6].

Старение у растений можно рассматривать как конечный этап их вегетативного и репродуктивного развития, который предшествует общей гибели клеток и отмиранию всех органов, а также сопровождается гидролизом полимеров клеток и активным оттоком из стареющего органа мономеров и минеральных солей для использования их в других органах [5].

У семядолей сои (*Glycine max* L.) процесс старения, который сопровождает прорастание семян и развитие проростков, укладывается в достаточно короткий интервал времени [7]. В связи с тем что морфологические и биохимические изменения также проявляются за короткий период времени, в данной работе семядоли сои были выбраны в качестве модельной системы для исследования возможного проявления специфических (маркерных) признаков ПКС во время старения данного органа. Семядоли сои относятся к гипогейальному типу. Основная функция гипогейальных семядолей заключается в обеспечении распада содержащихся в них питательных веществ и переброски образующихся подвижных метаболитов в растущие части проростка. Питательные вещества семядолей сои, как и у всех бобовых, локализованы в запасочной паренхиме и представлены главным образом глобулинами двух типов: легуминами и вицилинами. Запасочные белки сосредоточены в особых дискретных образованиях, которые получили название белковых тельц. Белковые тельца двудольных растений, к которым относится и соя, формируются посредством заполнения вакуолей незрелых семян и, следовательно, имеют вакуолярную природу. После прорастания семян, когда запас питательных веществ исчерпан, запасочная паренхима погибает [8].

Цель работы – исследование особенностей процесса старения семядолей сои для выявления некоторых морфологических и биохимических признаков ПКС, характерных для растительных клеток.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования служили семядоли семян и этиолированных 1–9-дневных проростков сои (*Glycine max* L. сорта Wilczek), выращенных в темноте при 25 °С на вермикулите [7]. На соответствующих стадиях прорастания семядоли сои изолировали и замораживали в жидком азоте и хранили до использования при – 80 °С.

Для светооптических и ультраструктурных исследований материал фиксировали 2,5%-ным раствором глутарового альдегида в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,2), затем дофиксировывали 1%-ным раствором четырехокси осмия и обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации. Материал заливали в эпоксидную смолу (Fluka, Германия). После полимеризации из полученных блоков на ультрамикротоме Leica Ultracut E (Leica, Германия) готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм, которые окрашивали

1%-ным толуидиновым синим. Препараты исследовали на световом микроскопе Zeiss Axioplan 2 (Карл Цейс, Германия).

Для изучения образцов в просвечивающем режиме электронного микроскопа в работе были использованы серийные ультратонкие срезы толщиной 90 нм. Полученные препараты исследовали и фотографировали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа CM 100 (Philips, Япония) [9].

Выделение геномной ДНК из семян сои проводили ЦТАБ-методом (цетилтриметиламмоний бромид) с некоторыми модификациями [10].

Анализ фрагментации ДНК проводили методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле с последующим просмотром и документированием гелей на приборе Gel Doc2000 (Bio-Rad, США) [11].

Межнуклеосомную фрагментацию ДНК (DNA ladder) выявляли методом блоттинга по Саузерну [11]. Для этого фрагменты ДНК, предварительно разделенные с помощью гель-электрофореза, переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond-N, Amersham, Ирландия) и идентифицировали посредством гибридизации с меченой тотальной геномной ДНК сои.

Эндонуклеазную активность в цитозольной фракции семян сои определяли по способности гидролизовать суперскрученную ДНК (ссДНК) плазмиды pBR322 (MBI Fermentas, Литва) [12]. Известно, что в присутствии ДНКаз суперспирализованная ДНК плазмид сначала релаксирует в кольцевую форму с односторонним разрывом, а затем переходит в линейную форму. Анализ продуктов рестрикции ссДНК плазмиды pBR322 проводили методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле.

Для выявления протеазной активности в цитозольной фракции семян сои использовали опосредованное ингибирование эндонуклеазной активности необратимым пептидным ингибитором каспазы-3 ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-трифторметилкетон (Ac-DEVD-fmk, Calbiochem).

Результаты и их обсуждение. Семядоли сои являются хорошей модельной системой для исследования ПКС, так как все обменные процессы и морфологические изменения, происходящие в период прорастания, характеризуются отсутствием клеточного деления и относительной однородностью клеток в этом органе [7].

Известно, что морфологическими признаками старения органов растения на ранних стадиях являются интенсивное пожелтение и уменьшение веса. Для более поздних стадий характерен переход желтого окрашивания в коричневое, сморщивание, хрупкость и ломкость, которые обусловлены потерей воды. Проявление морфологических признаков старения семян сои на разных стадиях развития проростков представлено на рис. 1.

Семядоли набухающих семян и однодневных проростков отличались гладкой поверхностью и светлой (белой) окраской (рис. 1, б, в, г). В ходе дальнейшего роста у семян сои 3-дневных проростков проявилось желтое окрашивание и легкая морщинистость (рис. 1, д). Для семян сои 5- и 7-дневных проростков было характерно увеличение интенсивности желтого окрашивания, уменьшение веса и усиление сморщивания (рис. 1, е, ж). Терминальная стадия прорастания сопровождалась появлением у семян сои 9-дневных проростков коричневой окраски, а также хрупкости и ломкости (рис. 1, з). На этой стадии семядоли с легкостью отделялись от проростков, что свидетельствовало об их гибели.

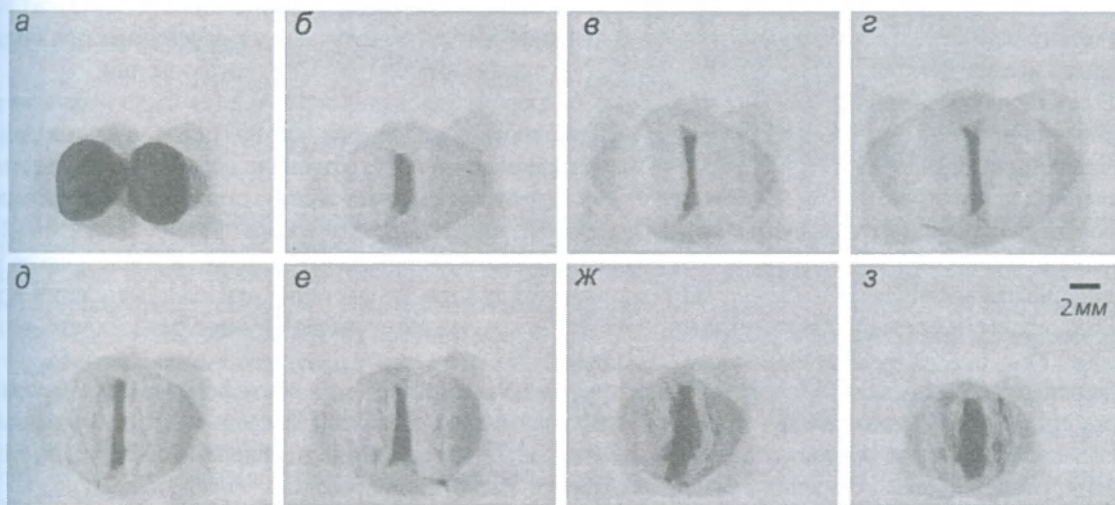


Рис. 1. Морфологические изменения семян сои, обусловленные старением: а – семядоли сухих семян (контроль 1); б – семядоли после 12 ч набухания семян при 4 °С (контроль 2); в – семядоли после 12 ч набухания семян при 25 °С; г – семядоли 1-дневных проростков; д – семядоли 3-дневных проростков; е – семядоли 5-дневных проростков; ж – семядоли 7-дневных проростков; з – семядоли 9-дневных проростков

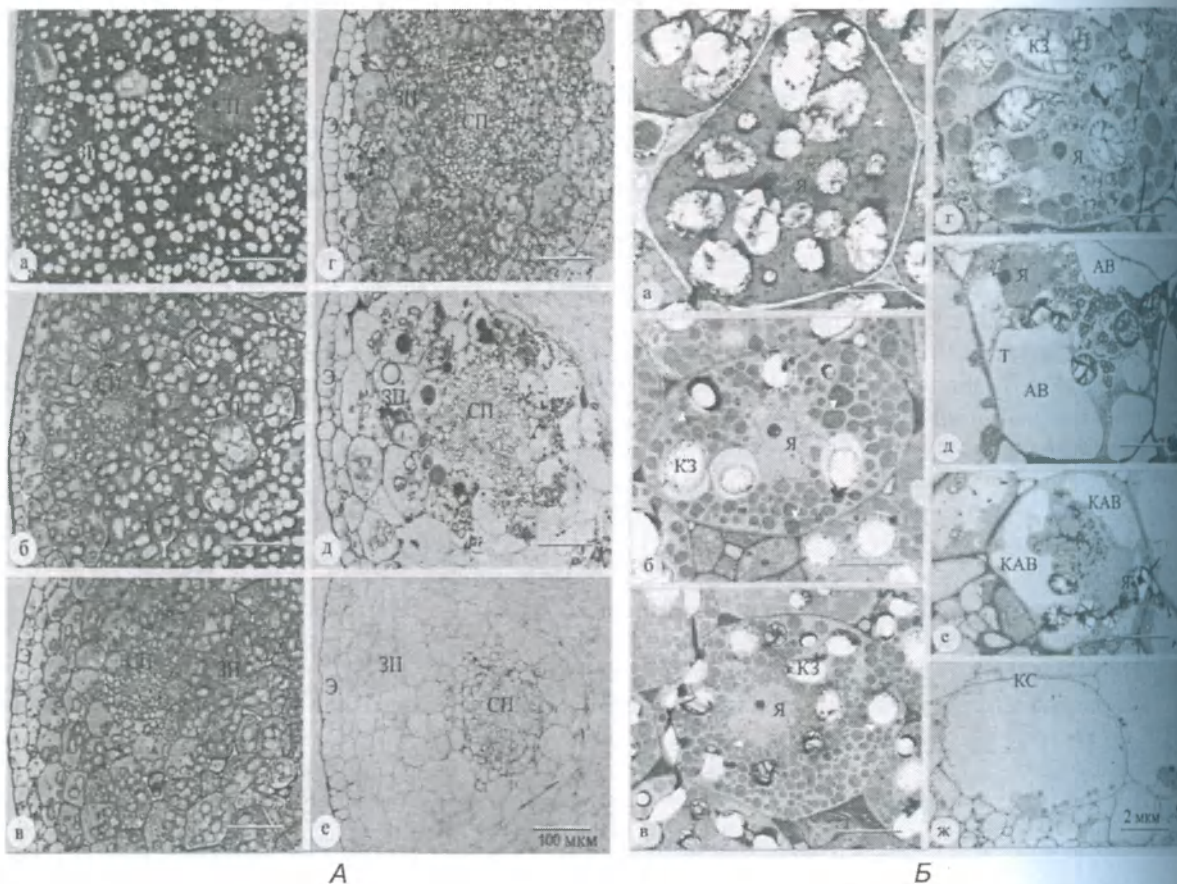


Рис. 2. А – полутонкие поперечные срезы семядолей семян и проростков сои, окрашенные толуидиновым синим; Б – ультраструктурные изменения в клетках запасочной паренхимы семядолей сои при старении (а – семядоли после 12 ч набухания семян при 4 °С (контроль 2), стрелки обозначают белковые тела; б – семядоли после 12 ч набухания семян при 25 °С; в – семядоли 1-дневных проростков; г – семядоли 3-дневных проростков; д – семядоли 5-дневных проростков, одинарной стрелкой указан тонопласт, двойными – ограниченные мембранные пространства, заполненные включениями в виде гранул; е – семядоли 7-дневных проростков; ж – семядоли 9-дневных проростков.

КЗ – крахмальные зерна; Я – ядро; КС – клеточная стенка; Т – тонопласт; АВ – автофагирующая вакуоль; КАВ – коллапс автофагирующей вакуоли; ЗП – запасочная паренхима; СП – сосудистый пучок; Э – эпидермис

Современные представления об ПКС базируются на результатах электронномикроскопических и биохимических исследований. Морфологические изменения в клетках запасочной паренхимы при старении семядолей исследовали методами световой (рис. 2, А) и электронной (рис. 2, Б) микроскопии.

В семядолях набухающих семян и однодневных проростков большинство клеток было окрашено толуидиновым синим, что свидетельствовало о незначительном расходе запасных белков из семядолей на этой стадии (рис. 2, А, а, б). В семядолях 3-дневных проростков присутствовало небольшое количество неокрашенных клеток (рис. 2, А, в). Исчезновение окрашивания объясняется отсутствием белка в клетках, что обусловлено гидролизом последнего в результате активизации соответствующих протеаз. Дальнейший рост проростков характеризовался увеличением количества неокрашенных клеток и уменьшением числа зерен крахмала в семядолях (рис. 2, А, г, д). На терминальной стадии прорастания окрашенные клетки и зерна крахмала практически отсутствовали, что соответствовало полному расходу запасочных веществ (рис. 2, А, е).

Из представленных данных следует, что интенсивность расхода запасных белков в семядолях сои хорошо согласуется с проявлением развития морфологических признаков старения. Уменьшение количества запасочных белков в клетках паренхимы может являться одним из основных факторов (триггеров), активизирующих процесс старения в семядолях сои при развитии проростков.

С помощью метода электронной микроскопии показано, что расходование запасочных белков в семядолях сои приводит к превращению белковых тел в лизирующие вакуоли (рис. 2, Б, б, в). В дальнейшем наблюдалось увеличение объема вакуолей и уменьшение объема протопласта (рис. 2, Б, г, д), в результате чего за счет процессов автофагии и автолиза сформировалась большая центральная вакуоль. Коллапс

центральной вакуоли повлек за собой уменьшение тонопласта и полный лизис протопласта (рис. 2, Б, е), что в итоге ознаменовало собой физиологическую смерть клеток запасующей паренхимы (рис. 2, Б, ж).

Известно, что межнуклеосомная фрагментация ядерной ДНК является одним из проявлений ПКС, развивающейся по механизму апоптоза, как в животной, так и в растительной клетке [4]. Поскольку размер ДНК в составе одной нуклеосомы составляет ~ 200 пар оснований, то в агарозном геле при электрофорезе образуется нуклеосомная лестница, каждая ступень которой соответствует фрагменту ДНК с длиной, кратной 200 парам оснований.

Для исследования характера деструкционных процессов, происходящих в ядре при старении, ядерная ДНК была проанализирована нами с помощью метода блоттинга по Саузерну (рис. 3, А).

Показано, что незначительная межнуклеосомная фрагментация ДНК впервые детектируется в семядолях 1- и 3-дневных проростков сои. В дальнейшем наблюдалась интенсификация фрагментации ДНК в семядолях проростков, находившихся на более поздних стадиях развития.

Также необходимо отметить, что усиление процесса межнуклеосомной фрагментации ДНК было характерно только для тех клеток паренхимы, которые уже потеряли большую часть запасных белков. Поскольку межнуклеосомная фрагментация ДНК является маркерным признаком апоптоза, то полученные результаты свидетельствуют о том, что старение семядолей при развитии проростков сопровождается индукцией ПКС по механизму апоптоза.

Ряд авторов отмечают, что, как и у животных, при ПКС у растений проявляется активность эндонуклеаз, ответственных за деградацию ДНК [13]. Для обнаружения эндонуклеазной активности, ответственной за деградацию ДНК семядолей сои при старении, была проведена рестрикция суперспирализованной ДНК (ссДНК) плазмиды pBR322 в присутствии цитозольных фракций семядолей сои [12].

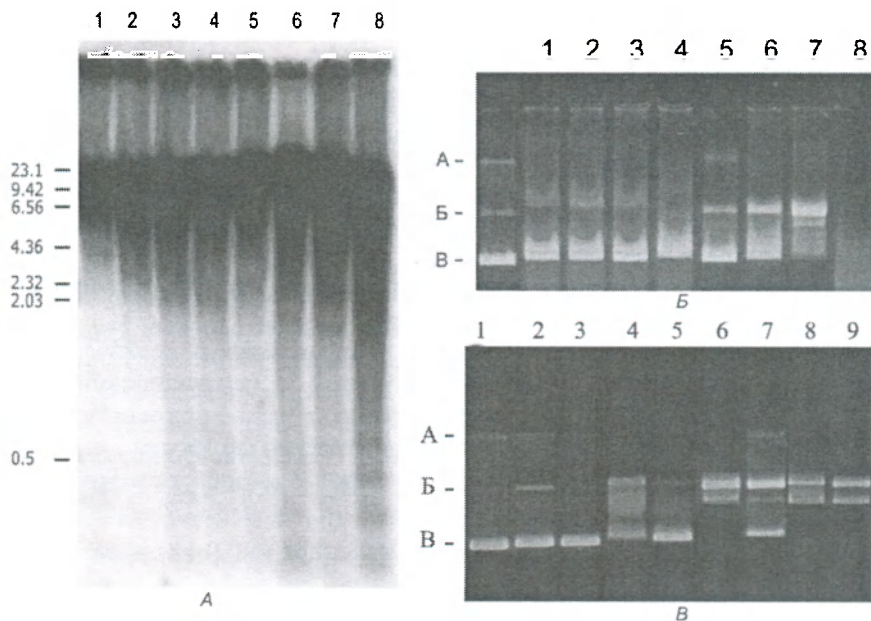


Рис. 3. А – анализ фрагментации ядерной ДНК семядолей сои при старении методом Саузерна: дорожка 1 – семядоли сухих семян (контроль 1); дорожка 2 – семядоли после 12 ч набухания семян при 4 °С (контроль 2); дорожка 3 – семядоли после 12 ч набухания семян при 25 °С; дорожка 4 – семядоли 1-дневных проростков; дорожка 5 – семядоли 3-дневных проростков; дорожка 6 – семядоли 5-дневных проростков; дорожка 7 – семядоли 7-дневных проростков; дорожка 8 – семядоли 9-дневных проростков. Б – электрофореграмма продуктов гидролиза ДНК плазмиды pBR322 после ее инкубации с фракциями цитозоля семядолей сои при старении: дорожка 1 – контроль (pBR322); дорожки 2–9 – плазмидная ДНК и цитозольные фракции семядолей сои при старении: дорожка 2 – семядоли после 12 ч набухания семян при 4 °С; дорожка 3 – семядоли после 12 ч набухания семян при 25 °С; дорожка 4 – семядоли 1-дневных проростков; дорожка 5 – семядоли 3-дневных проростков; дорожка 6 – семядоли 5-дневных проростков; дорожка 7 – семядоли 7-дневных проростков; дорожка 8 – семядоли 9-дневных проростков. В – электрофореграмма продуктов гидролиза ДНК плазмиды pBR322 после ее инкубации с фракциями цитозоля семядолей сои в присутствии ингибитора ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-трифторметилкетона (Ac-DEVD-fmk) при старении: дорожка 1 – контроль (pBR322); дорожки 2–8 – плазмидная ДНК и цитозольные фракции семядолей (дорожки 2, 3 – семядоли сухих семян; дорожки 4, 5 – семядоли 3-дневных проростков; дорожки 6, 7 – семядоли 5-дневных проростков; дорожки 8, 9 – семядоли 7-дневных проростков (3, 5, 7, 9 – в присутствии ингибитора). А – кольцевая, Б – линейная плазмидная ДНК, В – суперспирализованная

На рис. 3, Б представлены результаты анализа продуктов рестрикции ссДНК плазмиды pBR332 с отбором аликвот через 30 мин после ее инкубации с цитозольной фракцией семядолей сои при старении. После 30 мин инкубации ссДНК плазмиды pBR332 с цитозолем 3-дневных проростков сои только незначительное количество ссДНК плазмиды перешло в кольцевую форму: при инкубации с цитозолем 5- и 7-дневных проростков отмечена интенсификация процесса перехода ссДНК в кольцевую форму и появление линейной формы; при инкубации с цитозолем 9-дневных проростков наблюдалась неконтролируемая дезинтеграция ссДНК плазмиды, что свидетельствовало о проявлении максимальной эндонуклеазной активности.

Динамика рестрикции ссДНК плазмиды pBR332 в присутствии цитозольной фракции четко коррелировала по времени с прогрессивной межнуклеосомной фрагментацией ДНК. Полученные результаты указывают на то, что при старении семядолей сои во время роста проростков индуцируется терминальная эндонуклеазная активность, ответственная за межнуклеосомную фрагментацию ДНК.

Главным орудием дезинтеграции клетки при ПКС у животных являются цистеиновые протеазы, называемые каспазами. Так, например, каспаза-3 расщепляет ДНК-зависимую протеинкиназу (ICAD), ответственную за межнуклеосомную фрагментацию ДНК при ПКС в клетках животных [14].

Применительно к растениям нет прямых данных об участии каспаз в ПКС, но имеются косвенные указания, полученные со специфическими тетрапептидными ингибиторами каспаз. Добавление таких ингибиторов вызывает подавление ПКС у растений [14].

В данной работе протеазную активность, аналогичную каспазе-3 клеток животных, опосредованно определяли исследованием активности выявленной ранее терминальной эндонуклеазной активности в присутствии специфического ингибитора каспазы-3 Ac-DEVD-fmk.

Анализ электрофореграммы (рис. 3, Б) показал, что терминальная эндонуклеазная активность была полностью подавлена при инкубации плазмиды pBR332 с цитозолем 3-дневных проростков в присутствии ингибитора. Уменьшение действия ингибитора на эндонуклеазную активность наблюдали при инкубации ссДНК плазмиды pBR332 с цитозолем также у 5- и 7-дневных проростков сои. Подавление активности терминальной ДНКазы, ответственной за межнуклеосомную фрагментацию ДНК, в присутствии специфического ингибитора каспазы-3 (аcетил-Asp-Glu-Val-Asp-трифторметилкетона) предполагает индукцию протеазной активности в семядолях сои при старении, аналогичной действию каспазы-3 при апоптозе в клетках животных.

Заключение. В результате проведенных исследований установлено, что старение семядолей сои при развитии проростков сопровождается индукцией программируемой клеточной смерти в клетках запасочной паренхимы. На ультраструктурном уровне показано, что расходование запасных белков приводит к превращению белковых телец в лизирующие вакуоли, которые за счет автофагии и лизиса протопласта формируют большую центральную вакуоль. Коллапс центральной вакуоли приводит к физиологической гибели клетки, запасочной паренхимы семядолей сои.

На биохимическом уровне развитие ПКС в семядолях сопровождалось межнуклеосомной деградацией ДНК, активацией терминальной эндонуклеазы, ответственной за межнуклеосомную деградацию ДНК, и проявлением протеазной активности, аналогичной действию каспазы-3 при апоптозе в клетках животных. Это свидетельствует о том, что ПКС, индуцированная при старении семядолей сои, протекает по смешанному типу, так как характеризуется проявлением признаков как физиологической смерти растительной клетки, так и апоптоза.

Литература

1. Бакеева Л. Е., Дзюбинская Е. В. и Самуилов В. Д. // Биохимия. 2005. Т. 70, № 9. С. 1177–1185.
2. Pennell R. I., Lamb C. // Plant Cell. 1997. Vol. 9, N 2. P. 1157–1168.
3. Ванюшин Б. Ф. // Успехи биологической химии. 2001. Т. 41. С. 3–38.
4. Bukner B., Johal G. S., Jenick-Bukner D. // Physiol. Plant. 2000. Vol. 108, N 3. P. 231–239.
5. Dangel J. L., Dietrich R. A., Haward T. // Biochemistry and Molecular Biology of Plants. N. Y., 2000.
6. Mittler R., Lam E. // Plant Mol. Biol. 1997. Vol. 34, N 1. P. 209–221.
7. Wen J. Q., Liang H. G. // Physiol. Plant. 1993. Vol. 89, N 2. P. 805–810.
8. Vander Wilden W., Herman E. M., Chrispeels M. J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. Vol. 77, N 3. P. 428–432.
9. Reynolds E. S. // J. Cell. Biol. 1963. Vol. 17, N 2. P. 208–221.
10. Wang M., Oppedijk B. J., Caspers M. P. M. et al. // J. Exp. Bot. 1998. Vol. 49, N 4. P. 1293–1301.
11. Sambrook J. W., Fritsch E. F., Maniatis T. // Molecular cloning. Laboratory manual. N. Y., 1998.
12. Young T. E., Gallie D. R. // Plant Mol. Biol. 1999. Vol. 39, N 3. P. 915–926.
13. Thornberry N. A., Lasebnik Y. // Science. 1998. Vol. 281. P. 1312–1316.
14. Lam E., delPozo O. // Plant Mol. Biol. 2000. Vol. 44, N 3. P. 417–428.