

На правах рукописи

Синицын Сергей Владимирович

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГИБЕЛИ КЛЕТОК У ЦИАНОБАКТЕРИЙ И РАСТЕНИЙ

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2007

Работа выполнена на кафедре физиологии микроорганизмов Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: доктор биологических наук
профессор **В.Д. Самуилов**

Официальные
оппоненты: доктор биологических наук
профессор **Ю.В. Балнокин**
кандидат биологических наук
доцент **О.Г. Полесская**

Ведущая организация: Институт микробиологии им. С.Н.Виноградского РАН

Защита состоится 20 марта 2007 г. в 15 ч 30 мин на заседании диссертационного совета Д.501.001.52 при Московском государственном университете им. М.В.Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, д. 1, корп. 12, биологический факультет МГУ, ауд. М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан 12.02.2007

Ученый секретарь

диссертационного совета

кандидат биологических наук



Е.Н. Калистратова

Актуальность работы. Гибель клеток может быть реализована несколькими способами. Для апоптоза характерны уменьшение объема клетки, сморщивание цитоплазматической мембраны, конденсация ядра, наличие разрывов ДНК и последующий распад ядра на части, фрагментация клетки на мембранные везикулы с внутриклеточным содержимым (апоптозные тельца), фагоцитируемые макрофагами и клетками-соседями (Самуилов, 2000). Аутофагия – саморазрушение клетки с участием ферментов вакуоли или лизосомы, которые поглощают и подвергают гидролизу капельки цитоплазмы (van Doorn and Woltering, 2005). Автолиз встречается как у про- (Lewis, 2000), так и у эукариот (Nakashima, 2000). При автолизе эукариотных клеток нарушается проницаемость мембраны лизосомы или тонопласта, гидролитические ферменты оказываются в цитоплазме и приводят к разрушению клетки. У бактерий автолиз является, по-видимому, основным способом программируемой клеточной смерти (ПКС) (Самуилов и др., 2000; Гордеева и др., 2004) и реализуется при участии ряда гидролаз, названных автолизинами (Rice and Bayles, 2003). Биоэнергетические структуры эукариотной клетки играют важную роль при реализации механизмов ПКС. Дыхательная цепь митохондрий является одним из источников активных форм кислорода, вызывающих гибель клеток животных. Митохондрии являются поставщиком ряда апоптогенных факторов (цитохрома *c*, флавопротеина AIF и др.) при апоптозе у животных. Показано, что в ПКС растений принимают участие хлоропласты (Самуилов и др., 2002, Samuilov et al., 2003). Так, эпидермис листьев гороха содержит два типа клеток. Устьичные клетки, содержащие и хлоропласты, и митохондрии, гибнут по типу апоптоза (Samuilov et al., 2003). Как происходит гибель окружающих их эпидермальных клеток, содержащих только митохондрии, но не хлоропласты? Обнаруживают ли признаки ПКС клетки цианобактерий, которые по теории эндосимбиоза дали начало хлоропластам эукариот?

Цель и задачи работы. Цель работы – провести сравнительное изучение гибели клеток у цианобактерий и растений.

Задачи:

1. Разработать экспериментальную модель изучения программируемой клеточной гибели на цианобактерии *Anabaena variabilis* ATCC 29413 в условиях солевой и окислительной обработки.
2. Изучить состояние фотосинтетического и наследственного аппаратов при гибели клеток цианобактерии *A. variabilis*, вызванной солевым и окислительным воздействием.

3. Исследовать влияние H_2O_2 на CN^- -индуцированную гибель устьичных и эпидермальных клеток из листьев гороха.
4. Изучить действие акцепторов электронов в реакции Хилла на CN^- -индуцированную гибель эпидермальных клеток из листьев гороха и клетки *A. variabilis*.
5. Изучить влияние ингибиторов переноса электронов в фотосинтетической электротранспортной цепи хлоропластов на CN^- -индуцированную программируемую смерть эпидермальных клеток из листьев гороха.
6. Испытать действие хинакина, ингибитора NADPH-оксидазы плазматической мембраны, на CN^- -индуцированную программируемую смерть эпидермальных клеток.

Научная новизна работы. Проведено сравнительное изучение клеточной гибели у цианобактерий и растений. Окислительная и солевая обработка *A. variabilis* вызывала сначала повреждение фотосистемы II (ФСII), а затем приводила к распаду фотосинтетических пигментов, лизису клеток, разрушению нуклеоидов. Потеря активности ФСII и нарушение фотосинтетического транспорта электронов при обработке клеток *A. variabilis* пероксидом водорода происходила вследствие экстракции Mn из кислородвыделяющего комплекса ФСII. Инкубация клеток с H_2O_2 и CN^- в течение 2 часов не оказывала влияния на спектры их поглощения. Продление времени инкубации до 20 часов приводило к распаду фикобилинов и хлорофилла *a*, лизису клеток. Флуоресцентная микроскопия при окрашивании ДНК-специфичным красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) позволила выявить разрушение нуклеоидов *A. variabilis* при солевой и окислительной обработке. Методом фазовой когерентной микроскопии показано снижение показателя преломления клеток в этих условиях. В устьичных клетках листьев гороха пероксид водорода усиливал CN^- -индуцированное разрушение ядер в концентрациях 10-100 мкМ, вызывал образование многолопастных структур ядер и их фрагментацию. Ядра эпидермальных клеток листьев гороха, содержащих митохондрии, через 30 мин инкубации с H_2O_2 и CN^- подвергались деформации, вздутию и фрагментации. Показана CN^- - и $(\text{CN}^- + \text{H}_2\text{O}_2)$ -индуцированная олигонуклеосомная фрагментация ДНК, выделенной из эпидермиса листьев гороха. CN^- -Индукцированное разрушение эпидермальных клеток не предотвращалось 3-(3',4'-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевинной (DCMU), ингибитором транспорта электронов между первичным и вторичным пластохинонами, а также динитрофениловым эфиром йоднитротимола (DNP-INT), конкурентным ингибитором окисления пластохинола на участке *o bcf*-цитохромного

комплекса хлоропластов. Хинакрин как ингибитор NAD(P)H-оксидазы плазматической мембраны не предотвращал CN^- -индуцированное разрушение ядер эпидермальных клеток. NAD(P)H-оксидаза плазматической мембраны, по-видимому, не участвует в CN^- -индуцированном разрушении ядер эпидермальных клеток.

Практическое значение работы. Результаты работы расширяют представления о происхождении механизмов программируемой клеточной гибели, роли фотосинтетических цепей переноса электронов в этих процессах у эу- и прокариот. Они могут быть использованы в курсах лекций и практикумах по клеточной биологии, цитологии, биоэнергетике, микробиологии и физиологии растений. В будущем исследования в области программируемой клеточной гибели цианобактерий могут помочь в решении проблемы цветения водоемов, а изучение ПКС у растений – при создании новых сортов растений, устойчивых к патогенам.

Апробация работы. Результаты работы были доложены на кафедре физиологии микроорганизмов биологического факультета МГУ (Москва, 2005), III съезде биофизиков России (Воронеж, 2004), VIII молодежной конференции ботаников (Санкт-Петербург, 2004), на стендовой сессии международной конференции «Российская биоэнергетика: от молекул к клетке» (Москва, 2005), XII международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2005» (Москва, 2005), международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация (Пушино, 2005), международной научной конференции «Физиология микроорганизмов в природных и экспериментальных экосистемах» (Москва, 2006), 14-й Европейской биоэнергетической конференции (Москва, 2006).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 135 страницах, иллюстрирована 19 рисунками и 4 таблицами.

В обзоре литературы изложены современные представления о формах клеточной гибели, происхождении механизмов ПКС, их связи с биоэнергетикой клетки, особенностях клеточной гибели у растений и фототрофных микроорганизмов.

Список литературы содержит 164 источника.

Объекты и методы исследования

Объекты исследования.

A. variabilis – цианобактерия из четвертой подгруппы порядка *Nostocales* семейства *Nostocaceae*. Характеризуется многоклеточным неветвящимся трихомом, который имеет прямую, спиральную или изогнутую форму. Клетки в трихоме сферической, цилиндрической и овальной формы с многослойной клеточной стенкой с пептидогликановым слоем. Деление клеток происходит интеркалярно в одной плоскости. Трихомы не имеют чехлов, но часто имеется слизистый покров (Определитель бактерий Берджи, 1997).

Клетки цианобактерии *A. variabilis* ATCC 29413 выращивали при непрерывном освещении (~1000 лк) в периодических условиях на минеральной среде BG-11 (Rippka et al., 1979). В опытах использовали клетки из 3–5-суточных культур, находящихся в экспоненциальной фазе роста. Клетки осаждали центрифугированием при 2000 g, три раза отмывали 10 mM Перес-NaOH-буферным раствором, pH 8,0, содержащим 25 mM KCl, и суспендировали в том же буфере. В опытах с обработкой EDTA отмывые клетки инкубировали в буфере, содержащем 5 mM Na₂EDTA, в течение 10 мин и затем трижды отмывали от EDTA буферным раствором.

Другим объектом исследования служили пленки из нижнего эпидермиса листьев 7–15-суточных проростков гороха (*Pisum sativum* L. сорта Альфа), выращенного в условиях постоянного освещения (~1000 лк) при 20–24°C (Самуилов и др., 2000). Эпидермальные пленки отделяли пинцетом и помещали в дистиллированную воду. Пленки нижнего эпидермиса – монослой из клеток двух типов: устьичных (УК, содержат хлоропласты и митохондрии) и эпидермальных (ЭК, содержат только митохондрии).

ЭПР-Спектроскопия

ЭПР-спектроскопию клеток цианобактерий проводили на кафедре биофизики биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова совместно с К.Н.Тимофеевым. В

работе был использован радиоспектрометр РЭ-1307. Суспензии клеток с содержанием хлорофилла *a* 1 мг/мл в 10 мМ Нерес-NaOH-буфере, pH 8,0, с 25 мМ KCl помещали в плоскую кварцевую кювету объемом 100 мкл с длиной оптического пути 0,02 см. Сигнал ЭПР реакционных центров P700 индуцировали прямоугольными импульсами света длительностью 0,2 с непосредственно в резонаторе прибора лампой накаливания мощностью 300 Вт ($2000 \text{ мкЕ/м}^2\text{с}$). Условия измерения сигналов ЭПР: мощность СВЧ – 20 мВт, амплитуда модуляции – 0,3 мТ, частота модуляции – 100 кГц, постоянная времени прибора – 10 мкс. H_2O_2 , NaCN и другие реагенты добавляли в суспензии клеток непосредственно перед регистрацией сигналов ЭПР. Все ЭПР-измерения проводили не менее, чем в трех повторностях, при комнатной температуре.

Когерентная фазовая микроскопия

Метод когерентной фазовой микроскопии разработан под руководством профессора В.П. Тычинского в Московском институте радиотехники, электроники и автоматики в лаборатории когерентной оптики, научное сотрудничество с которой позволило провести изучение показателя преломления клеток цианобактерии. Измерения на когерентном фазовом микроскопе «Эйрискан» проводили совместно с А.В. Кретушевым и сотрудниками лаборатории когерентной оптики.

Оптическая схема когерентного фазового микроскопа «Эйрискан» является

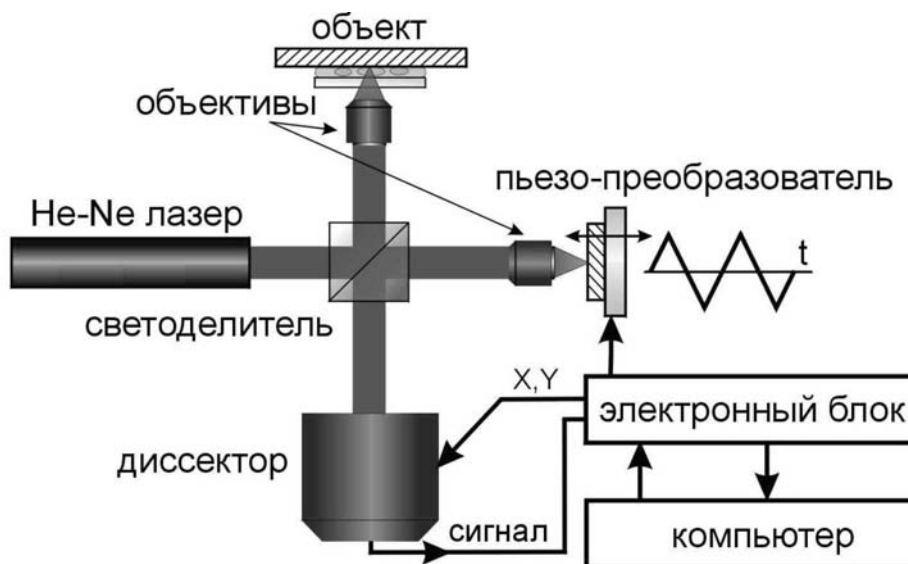


Рис. 1. Оптическая схема когерентного фазового микроскопа «Эйрискан»

модификацией схемы микроинтерферометра Линника (Тычинский, 2001). В качестве источника когерентного излучения использовали одномодовый He-Ne-лазер ЛГ-207А

(632,8 нм), что обеспечило высокую точность фазовых измерений (до 0,3 нм) (рис. 1). Излучение лазера отражается от полупрозрачного слоя светоделителя; часть излучения через объектив попадает на объект и после отражения и вторичного прохождения через светоделитель – на фотокатод диссектора. Второй (опорный) луч, отражаясь от зеркала, закреплённого на пьезо-преобразователе, проецируется на фотокатод координатно-чувствительного фотоприемника - диссектора ЛИ-620, где интерферирует с предметным лучом. Управление колебаниями пьезо-преобразователя, а также развёрткой диссектора осуществляется с помощью электронного блока, в котором формируется измерительный интервал и напряжение управления фазой опорной волны, а также производится оцифровка выходного сигнала. Скорость ввода изображения определяли частотой модуляции 1 кГц (или 1 мс на пиксель). Цианобактерии помещали между полированной кремниевой подложкой и покровным стеклом.

Инфильтрация и инкубация эпидермальных пленок из листьев гороха с реагентами

Для быстрой доставки добавленных реагентов в клетки эпидермиса из листьев гороха использовали метод инфильтрации путем вакуумирования. Эпидермальные пленки инкубировали в растворе реагентов при 5–8 мм Нг в течение 1 мин. Образцы помещали в полистирольные планшеты и инкубировали в дистиллированной воде с добавками реагентов (состав представлен в подписях к рисункам) при комнатной температуре в темноте или под люминесцентной лампой при интенсивности света ~1000 лк.

Фиксация объекта, окрашивание и оптическая микроскопия

По завершении инкубации образцы обрабатывали 5 мин фиксатором Батталья (смесь хлороформа, 96%-ного этанола, ледяной уксусной кислоты и 40%-ного формалина в соотношении 5:5:1:1). Вслед за этим образцы отмывали этанолом 10 мин для удаления фиксатора, инкубировали 5 мин в воде и окрашивали красителем ядер, гематоксилином Карацци, в течение 20 мин. Окрашенные эпидермальные пленки отмывали водопроводной водой и исследовали с применением светового микроскопа. Из 300–500 клеток определяли долю клеток с разрушенными ядрами и лишенных ядер (Самуилов и др., 2000).

Флуоресцентная микроскопия

Для флуоресцентной микроскопии пленки эпидермиса фиксировали, как описано выше, и окрашивали 4,6-диамидино-2-фенилиндолом дигидрохлоридом (DAPI, 0,2 мкМ водный раствор) в течение 15 мин. Клетки цианобактерии *A. variabilis* окрашивали в 20 мкМ DAPI в течение 1 часа без фиксации. Наблюдения проводили на флуоресцентном микроскопе с конфокальной приставкой Carl Zeiss Axiovert 200M (Германия) при длине волны возбуждающего света 360–380 нм, а также в режиме фазового контраста.

Экстракция и электрофорез ДНК

Эксперименты по исследованию фрагментации ДНК проводили в совместной работе с Н.В. Лобышевой (НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова). ДНК выделяли из нижнего эпидермиса 10-дневных проростков гороха сорта Альфа. Навеска эпидермиса для выделения ДНК составляла 25 – 35 мг. После инкубации с реагентами, образцы растирали в ступке с жидким азотом и суспендировали в лизирующем буферном растворе (0,05 М Трис-НСl, pH 7,4, 0,025 М ЭДТА, 1%-ный додецилсульфат натрия) при комнатной температуре. Гомогенаты дважды депротеинизировали встряхиванием с фенолом. Нуклеиновые кислоты из отделенной центрифугированием водной фазы осаждали добавлением 1 объема изопропанола. После растворения осадка в ТЕ-буфере (0,05 М Трис-НСl, pH 7,5, 0,005 М ЭДТА) к смеси добавляли раствор РНКазы А (Sigma, США) в концентрации 100 мкг/мл и смесь инкубировали 20 мин при 37°. После повторной фенольной депротеинизации ДНК осаждали добавлением изопропанола и осадок растворяли в ТЕ-буфере. Электрофорез препаратов ДНК проводили в течение 1,5 ч при 4–5 В/см в 1%-ном агарозном геле в 0,04 М Трис-ацетатном буфере, pH 8,0, содержащем бромистый этидий (0,5 мкг/мл).

Результаты и их обсуждение

H₂O₂ подавляет фотосинтетический перенос электронов и вызывает гибель клеток цианобактерии *A. variabilis*

Рисунок 2, а иллюстрирует фотоиндуцированный сигнал ЭПР с g-фактором 2,0026, обусловленный окислением P700, первичного донора электрона ФСІ в клетках *A. variabilis*. В ответ на освещение устанавливается стационарный уровень P700⁺. В темноте происходит восстановление P700⁺, и сигнал ЭПР исчезает с полувременем (t_{1/2}) 30 мс (табл. 1). H₂O₂ увеличивал амплитуду сигнала ЭПР и замедлял его послесветовую

релаксацию (рис. 2, б и табл. 1). CN^- снижал амплитуду сигнала P700^+ , но не влиял на скорость его темнового затухания (рис. 2, в и табл. 1). Этот результат свидетельствует об ингибирующем действии H_2O_2 на восстановление компонентов электрондонорной ветви ФСІ.

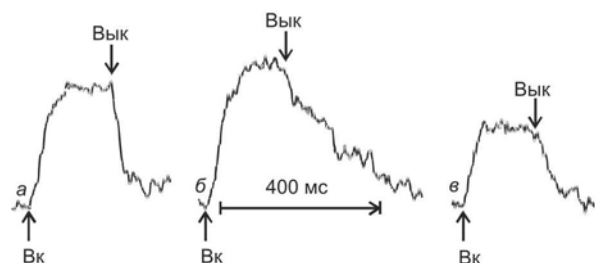


Рис. 2. Действие H_2O_2 и NaCN на фотоиндуцированный сигнал ЭПР реакционных центров P700 в клетках *A. variabilis*: а - контроль, без добавок, б - 25 мМ H_2O_2 , в - 1 мМ NaCN . Вк и Вык - включение и выключение света

Таблица 1. Амплитуда сигнала ЭПР реакционных центров P700 и время $t_{1/2}$ их послесветового восстановления в клетках *A. variabilis* до и после обработки EDTA

Добавки	Концентрация, мМ	Амплитуда сигнала ЭПР, %	Время темновой релаксации сигнала ЭПР, мс $t_{1/2}$
До обработки EDTA			
Контроль	—	100	30
H_2O_2	25	120	130
NaCN	1	70	30
EDTA	10	100	30
$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NaCN}$	100 + 1	120	150
$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NaCN} + \text{EDTA}$	100 + 1 + 10	110	270
После обработки EDTA			
Контроль	—	100	50
H_2O_2	25	100	125
NaCN	1	70	50
$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NaCN} + \text{EDTA}$	100 + 1 + 10	100	400

Увеличение времени послесветовой релаксации сигнала ЭПР реакционных центров ФСІ, по-видимому, связано с экстракцией марганца из кислородвыделяющего комплекса (КВК) и ингибированием фотосинтетического транспорта электронов на уровне ФСІІ.

Ионы Mn^{2+} в водных растворах характеризуются шестиполосным спектром ЭПР. Сигнал ЭПР исчезал в присутствии комплексообразователя EDTA и снижался при добавлении CN^- : связанный Mn не дает характеристического спектра ЭПР. Несвязанный (или, возможно, непрочно связанный) Mn^{2+} содержится в отмытых клетках *A. variabilis* (рис. 3, а) и составлял 20% общего марганца клеток. Добавление HCl к суспензии клеток приводило к значительному увеличению сигнала ЭПР в результате высвобождения связанного марганца и его восстановления до Mn^{2+} (рис. 3, а, в). Содержание свободного Mn^{2+} в клетках

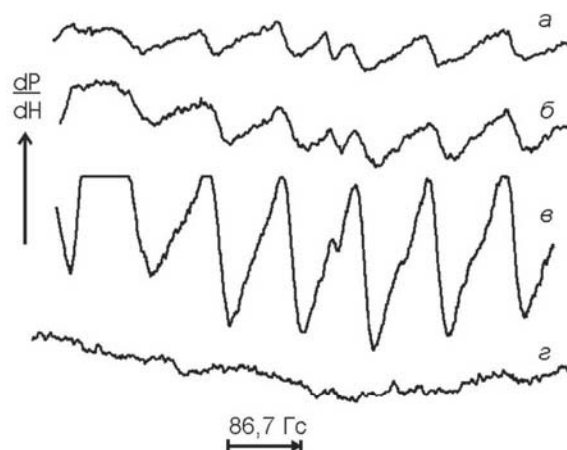


Рис. 3. ЭПР-Спектры Mn^{2+} в суспензии клеток *A. variabilis*: а - контроль, б - 40 mM H_2O_2 , в - 100 mM HCl, г - клетки, преинкубированные с 5 mM EDTA и 3 раза отмытые для удаления EDTA

возрастало до 25% при добавлении H_2O_2 в концентрации 40 mM (рис. 3, б) и даже до 30% общего марганца при добавлении H_2O_2 в концентрации 200 mM и значительно снижалось при обработке клеток EDTA (рис. 3, г). Высвобождение марганца из КВК при воздействии H_2O_2 приводило к окислительному повреждению реакционных центров ФСII, так как КВК не мог эффективно восстанавливать P_{680}^+ (Самуилов и др., 2004, Nakala et al., 2005).

Таблица 2. Индуцированное H_2O_2 разрушение фикоцианина ($\Delta D_{630-720 \text{ нм}}$), хлорофилла а ($\Delta D_{680-720 \text{ нм}}$) и уменьшение светорассеяния ($D_{720 \text{ нм}}$) суспензий клеток *A. variabilis*. Клетки инкубировали в темноте с H_2O_2 в течение 20 ч

H_2O_2 , mM	$\Delta D_{630-720 \text{ нм}}$	$\Delta D_{680-720 \text{ нм}}$	$D_{720 \text{ нм}}$
0	0,18	0,17	0,67
1	0,11	0,12	0,38
10	0,08	0,12	0,29
100	0,03	0,08	0,10

Темновая инкубация клеток с H_2O_2 и CN^- (добавленного для ингибирования H_2O_2 -разлагающих гемовых ферментов – каталазы и пероксидаз) в течение 2 ч не оказывала

влияния на спектры поглощения. Увеличение срока инкубации с H_2O_2 до 20 часов приводило к прогрессирующему с увеличением концентрации H_2O_2 снижению оптической плотности фикобилинов и в меньшей степени хлорофилла *a*, а также к уменьшению светорассеяния клеточных суспензий (табл. 2). Значительному разрушению подвергался фикоцианин (табл. 2), нейтрализующий радикалы $\text{HO}^\bullet$, $\text{HO}_2^\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, а также пероксинитрит (см. Bhat and Madyastha, 2001 и литературу, цитированную там).

Таким образом, H_2O_2 вызывал экстракцию марганца из интактных клеток цианобактерий, подавлял активность КВК и фотосинтетический перенос электронов, приводил к разрушению фотосинтетического аппарата и гибели клеток *A. variabilis*.

Состояние клеток *A. variabilis* при солевой обработке и инкубации с H_2O_2 и менадионом

Ранее показано, что внутриклеточное образование H_2O_2 в присутствии менадиона (витамина K_3), также как и добавленный H_2O_2 в концентрациях 0,1–10 мМ, ингибируют

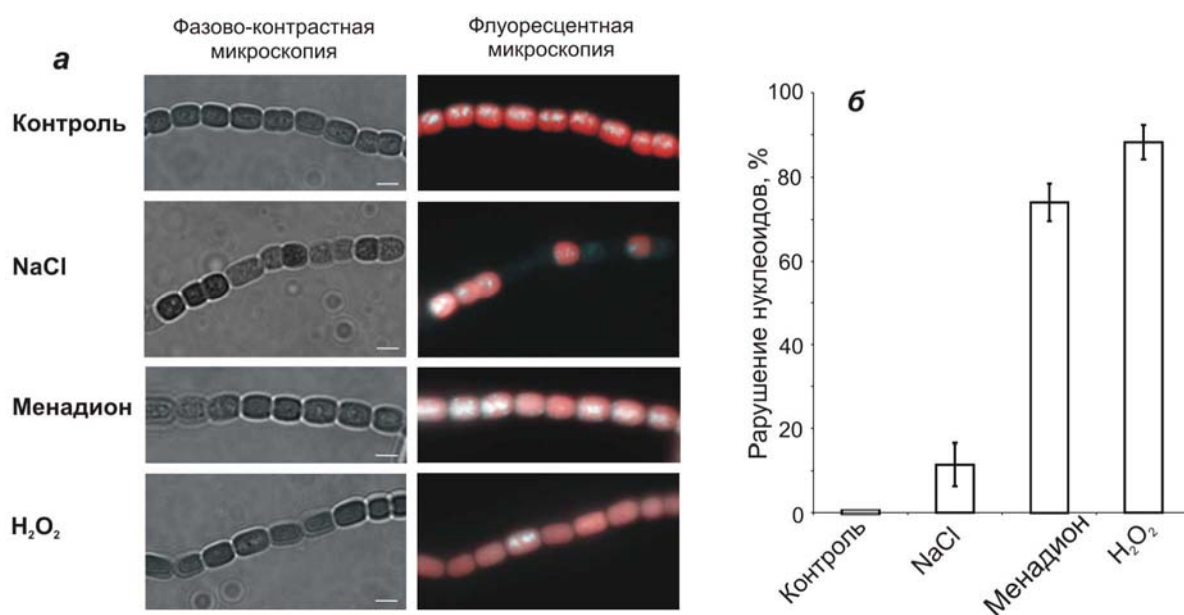


Рис. 4. Разрушение нуклеоидов *A. variabilis*. Инкубация с 0,5 М NaCl, 100 мкМ менадиона или 10 мМ H_2O_2 – 20 ч на свету. а - данные фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии, б - доля клеток с разрушенными нуклеоидами. ДНК в клетках цианобактерии окрашивали 20 мкМ диамидинофенилиндолом (DAPI) (инкубация 1 ч). Масштабный отрезок – 2 мкм.

рост цианобактерий (Самуилов и др., 1999). Добавление 100 мМ NaCl вызывает гибель *A. variabilis* по механизму апоптоза: в клетках увеличивается активность протеаз, происходит фрагментация ДНК, цитоплазма вакуолизируется, на терминальной стадии клетки подвергаются автолизу (Ning et al., 2002).

Клетки *A. variabilis* инкубировали с 0,5 М NaCl, 10 мМ H₂O₂ и 0,1 мМ менадиона. Изучение при помощи световой микроскопии в контроле, без добавок, показало, что *A. variabilis* образует длинные нити вегетативных клеток. Флуоресцентная микроскопия с окраской при помощи DAPI показала, что ДНК нуклеоидов флуоресцирует в виде гранул преимущественно в центре клеток. Флуоресценция хлорофилла наблюдалась во всех клетках. Трихомы укорачивались при инкубации с 0,5 М NaCl в течение 20 часов. Флуоресценция DAPI-ДНК в клетках снижалась, в некоторых исчезала полностью (рис. 4, а). Обработка менадионом вызывала исчезновение флуоресценции нуклеоидов, связанной с DAPI у части клеток, при добавлении пероксида водорода нуклеоиды разрушались почти во всей популяции *A. variabilis* (рис. 4, а и б). Флуоресценция хлорофилла при этом сохранялась (рис. 4). Сходные данные в отношении показателя преломления в центре клетки цианобактерии были получены с использованием когерентной фазовой микроскопии клеток *A. variabilis*, обработанных 0,5 М NaCl, 10 мМ H₂O₂ и 0,1 мМ менадиона.

Ингибирующее действие солевой (Allakhverdiev et al., 2002) и окислительной (Nishiyama et al., 2005) обработки связывают с подавлением синтеза белка D1 ФСII на уровне транскрипции и трансляции. Добавление менадиона вызывает внутриклеточную генерацию H₂O₂. Менадион способен образовывать O₂⁻ и H₂O₂, восстанавливаясь ФС II, *b₆f*-цитохромным комплексом и ФС I хлоропластов и окисляясь кислородом.

Действие H₂O₂ на CN⁻-индуцированное разрушение ядер устьичных и эпидермальных клеток из эпидермиса листьев гороха

Ранее было показано, что CN⁻ является эффективным индуктором ПКС у растений и вызывает разрушение ядер УК и ЭК (Самуилов и др., 2000). Пероксид водорода усиливал CN⁻-индуцированное разрушение ядер в устьичных клетках листьев гороха в концентрациях 10–100 мкМ. Стимулирующее действие H₂O₂ на разрушение ядер ЭК, обработанных 2,5 мМ KCN, было ниже, чем на УК, проявлялось при более высоких концентрациях H₂O₂ (100 мкМ и выше) и на некоторых препаратах эпидермиса отсутствовало.

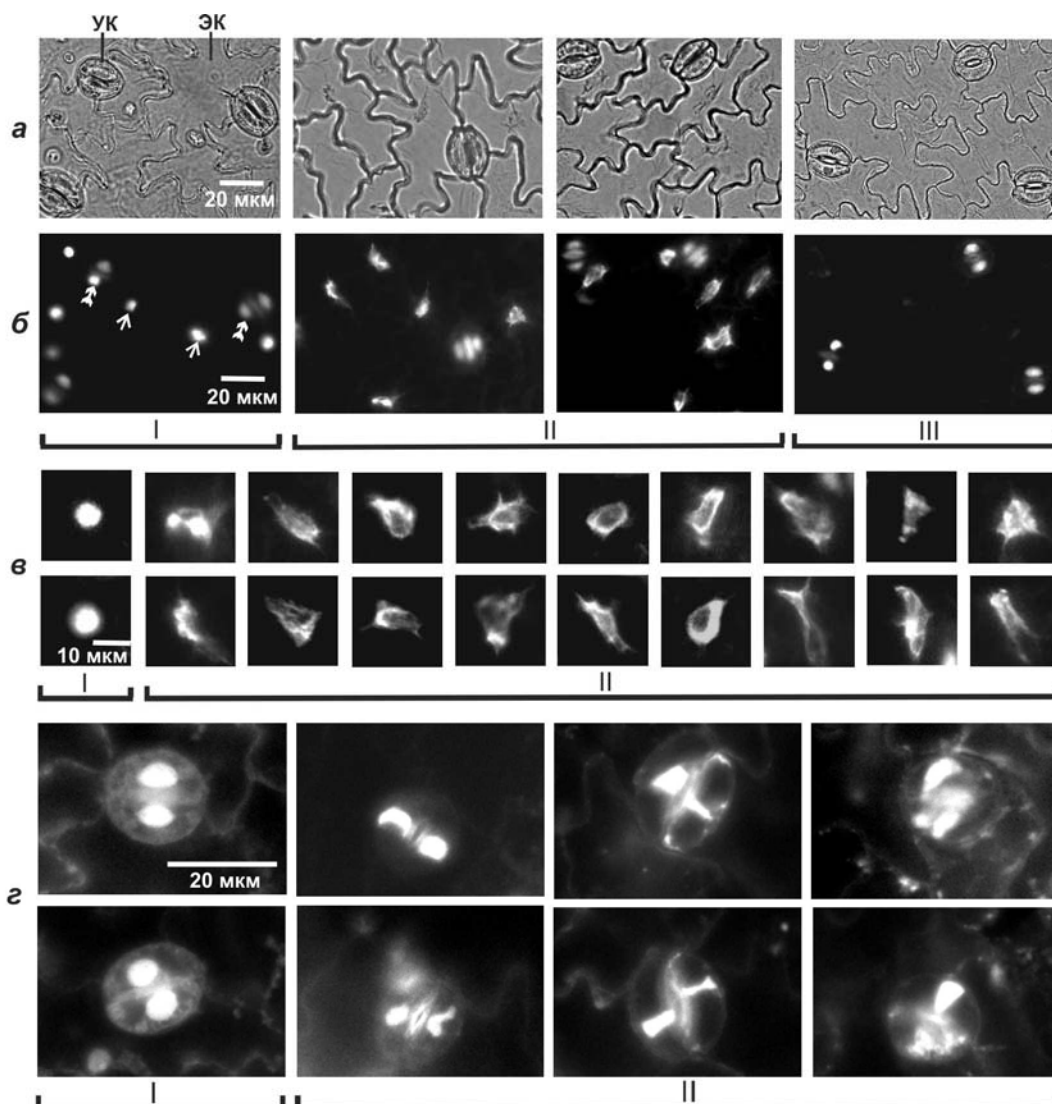


Рис. 5. Данные оптической (а) и флуоресцентной микроскопии (б, в, г, окраска DAPI) ЭК, УК (а, б, г) и ядер ЭК (в) в эпидермисе из листьев гороха: I – контроль, без добавок, II и III – инкубация с 2,5 мМ KCN и 100 мкМ H₂O₂ в течение 0,5 ч (б, II и в, II), 2,5 ч (б, III) и 8 ч (г, II). Одинарные стрелки (б) показывают ядра ЭК, двойные – ядра УК.

Рис. 5 иллюстрирует данные оптической (а) и флуоресцентной (окраска DAPI) микроскопии (б, в, г) клеток в пленках эпидермиса. DAPI – проникающий в клетки флуоресцирующий краситель, который связывается с обогащенными тимин и аденин участками в малых бороздках двунитевой ДНК (см. Trotta et al., 2003 и литературу, цитированную там). Морфология ядер ЭК значительно менялась уже через 30 мин инкубации с CN⁻ и H₂O₂ (рис. 5, б, II и в, II): происходили их вздутие и деформация, разделение на доли, вызванные фрагментацией ДНК. Спустя 2,5 ч инкубации с CN⁻ и H₂O₂ ядра ЭК исчезали (рис. 5, а, б, III). Структурные изменения ядер УК происходили

позднее. Образование многолопастных структур в ядрах УК, их фрагментация наблюдались через 8 ч инкубации с CN^- и H_2O_2 (рис. 5, з, II). CN^- -Индукцированное разрушение ядер УК зависит от активных форм кислорода (АФК) (Samuilov et al., 2003).

Межнуклеосомная фрагментация ДНК при обработке CN^- и $\text{CN}^- + \text{H}_2\text{O}_2$

Одним из признаков апоптоза эукариот является распад ДНК на фрагменты, кратные размеру нуклеосомы – 180-200 пар оснований (Wyllie, 1980). Образование таких фрагментов хорошо регистрируется методом электрофореза. На рис. 6 представлены электрофореграммы препаратов ДНК, выделенных из нижнего эпидермиса листьев 10-дневных проростков гороха. Обработка пленок эпидермиса 2,5 мМ CN^- в течение 15 и 30 мин не вызывала фрагментации ДНК (рис. 6, а). В контроле (без добавок) ДНК не образовывала расщепленных фрагментов. При обработке 2,5 мМ CN^- характерная для апоптоза «лестница» наблюдалась через 3 ч инкубации, при этом значительная часть ДНК находится в высокомолекулярной форме (рис. 6, б). Через 6 ч инкубации эпидермальных пленок с CN^- межнуклеосомный распад ДНК продолжался, уменьшалось количество

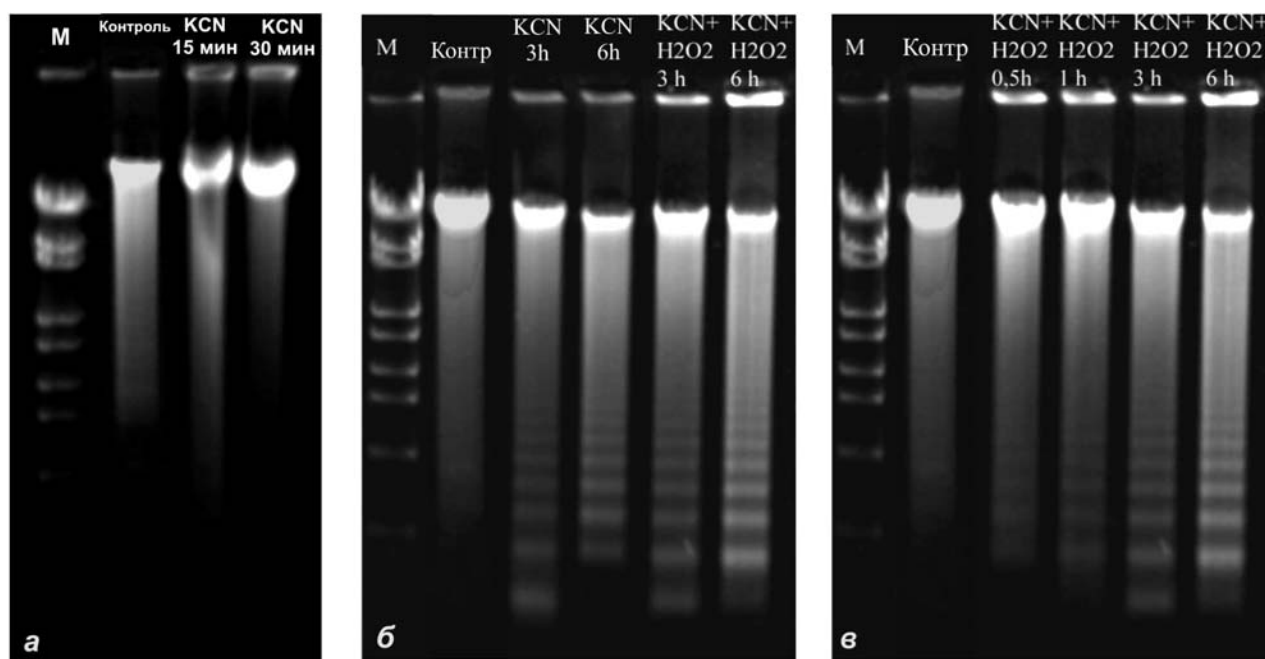


Рис. 6. Разделение фрагментов ядерной ДНК, выделенной из нижнего эпидермиса листьев гороха, а – инкубация с 2,5 мМ KCN 15 и 30 мин, б – усиление фрагментации ДНК при совместной инкубации с 2,5 мМ KCN + 100 мкМ H_2O_2 , в – увеличение степени фрагментации ДНК при обработке 2,5 мМ KCN + 100 мкМ H_2O_2 во времени. Разделение проводили в 1%-ном агарозном геле с добавлением бромида этидия. М – маркеры.

высокомолекулярной ДНК. При обработке эпидермиса комбинацией CN^- и H_2O_2 наблюдалось усиление распада ДНК на фрагменты (рис. 6, в). Так, фрагментация ДНК начиналась уже через 30 мин инкубации с $\text{CN}^- + \text{H}_2\text{O}_2$. Интенсивность фрагментации ДНК увеличивалась со временем инкубации. Через 3 и 6 часов инкубации доля фрагментированной низкомолекулярной ДНК была заметно выше при обработке $\text{CN}^- + \text{H}_2\text{O}_2$, чем при обработке одним CN^- (рис. 6, в).

Влияние ингибиторов электротранспортных цепей на CN^- -индуцированное разрушение ядер эпидермальных клеток

CN^- -Индукцированный апоптоз УК предотвращался DCMU, ингибитором транспорта электронов между первичным (Q_A) и вторичным (Q_B) пластохинонами в ФСII хлоропластов, и DNP-INT, ингибитором окисления пластохинола на участке *o b f*-цитохромного комплекса хлоропластов (Самуилов и др., 2002, Samuilov et al., 2003). Их действие на УК снималось или резко снижалось при обработке эпидермиса комбинацией $\text{CN}^- + \text{H}_2\text{O}_2$ (рис. 7). Возможно, между УК и ЭК существует взаимодействие на уровне активных форм кислорода и сигнал о гибели передается от УК к ЭК. Для проверки этого предположения изучено действие DCMU и DNP-INT на CN^- -индуцированное разрушение ядер ЭК. Сами по себе DCMU и DNP-INT не вызывали разрушения ядер ЭК (рис. 7), CN^- вызывал почти 100%-ное разрушение ядер ЭК. Свет, DCMU и DNP-INT лишь незначительно влияли на этот процесс, что не подтверждает взаимодействия УК и ЭК в апоптозном разрушении ядер ЭК.

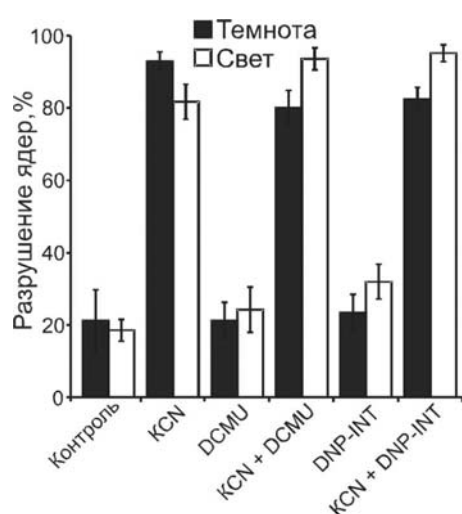


Рис. 7. Действие света, DCMU и DNP-INT на CN^- -индуцированное разрушение ядер ЭК в эпидермисе из листьев гороха. Пленки эпидермиса после инфильтрации с 10 мкМ DCMU или 10 мкМ DNP-INT инкубировали 30 мин в темноте, затем проводили инфильтрацию с 2,5 мМ KCN 1 ч.

Действие хинакрина на CN^- -индуцированное разрушение ядер ЭК

Было испытано действие хинакрина, ингибитора NAD(P)H-оксидазы плазматической мембраны (Van Gestelen et al., 1997, Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 1999, Frahry and Schopfer, 2001, Dat et al., 2003). Хинакрин в концентрациях до 100 мкМ не влиял на дыхание митохондрий и фотосинтетическое выделение O_2 хлоропластами в нарезках листьев, но предотвращал CN^- -индуцированное разрушение ядер УК в плёнках эпидермиса листьев (Самуилов и др., 2006). Хинакрин сам по себе не вызывал разрушения ядер ЭК и не влиял на CN^- -индуцированное разрушение ядер ЭК (рис. 8).

Гибель УК и ЭК в пленках эпидермиса гороха зависит от наличия АФК и предотвращается антиоксидантами или в анаэробных условиях (Самуилов и др., 2002, Samuilov et al., 2003). Хинакрин ингибировал H_2O_2 -зависимое окисление нефлуоресцирующего DCFH до флуоресцирующего DCF в ответ на добавление H_2O_2 или менадиона (Самуилов и др., 2006).

Таким образом, NAD(P)H-оксидаза плазматической мембраны, вероятный источник активных форм кислорода при программируемой гибели устьичных клеток в эпидермисе листьев гороха (Самуилов и др., 2006), по-видимому, не участвует в CN^- -индуцированном разрушении ядер ЭК.

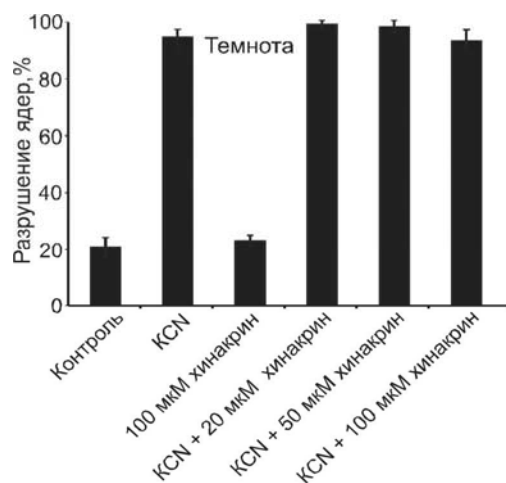


Рис. 8. Действие хинакрина на CN^- -индуцированное разрушение ядер эпидермальных клеток из листьев гороха. Пленки эпидермиса после инфильтрации с 20, 50, 100 мкМ хинакрина инкубировали 30 мин в темноте, затем проводили инфильтрацию с 2,5 мМ KCN 1 ч в темноте.

Выводы

1. Предложена экспериментальная модель изучения программируемой клеточной гибели на цианобактерии *A. variabilis* в условиях солевой и окислительной обработки.
2. H_2O_2 оказывал деструктивное воздействие на цианобактерию *A. variabilis*, вызывал распад фикобилинов и хлорофилла *a*. Инкубация клеток с пероксидом водорода вызывала повреждение ФСII, экстракцию Mn^{2+} из кислородвыделяющего комплекса, подавляла фотосинтез.
3. Солевая (NaCl) и окислительная (H_2O_2 , менадион) обработка *A. variabilis* приводили к гибели клеток с признаками программируемой смерти – разрушением нуклеоидов и фотосинтетического аппарата. Разрушение наследственного аппарата является универсальным звеном при ПКС у бактерий и эукариот.
4. H_2O_2 значительно усиливал CN^- -индуцированную гибель устьичных клеток в эпидермисе, изолированном из листьев гороха и, в меньшей степени, гибель эпидермальных клеток.
5. Ингибиторы переноса электронов в фотосинтетической электронтранспортной цепи хлоропластов DCMU и DNP-INT эффективно предотвращали CN^- -индуцированную программируемую смерть устьичных клеток из листьев гороха на свету и лишь незначительно влияли на ПКС эпидермальных клеток, вызванную CN^- . Это указывает на отсутствие взаимосвязи устьичных и эпидермальных клеток на уровне активных форм кислорода.
6. Хинакрин, ингибитор NADPH-оксидазы плазматической мембраны, предотвращал CN^- -индуцированную программируемую смерть устьичных клеток, что может свидетельствовать об участии NADPH-оксидазы как источника АФК в их гибели. Однако хинакрин не влиял на CN^- -индуцированную гибель эпидермальных клеток.
7. Таким образом, признаки программируемой клеточной смерти обнаруживаются как у растений, так и цианобактерий. Разрушение нуклеоида у бактерий и ядра у клеток эукариот, а также нарушение функции ФСII служат, по-видимому, свидетельством того, что первыми универсальными мишенями при ПКС являются энергообеспечение и наследственный аппарат клетки.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. Самуилов В.Д., Тимофеев К.Н., Синицын С.В., Безряднов Д.В. (2004) H_2O_2 -Индуктируемое ингибирование фотосинтетического выделения O_2 клетками *Anabaena variabilis*. *Биохимия*, **69**, 926-33.
2. Синицын С.В., Несов А.В., Безряднов Д.В., Тимофеев К.Н., Федоренко Т.А., Самуилов В.Д. H_2O_2 -Индуктированное ингибирование фотосинтетического выделения O_2 клетками *Anabaena variabilis*. III съезд биофизиков России, 24-29 июня 2004 г., Воронеж, 2004, с. 456-457.
3. Киселевский Д.Б., Синицын С.В., Федоренко Т.А., Самуилов В.Д. Мембранные H_2O_2 -каналы? Материалы VIII Молодежной конференции ботаников, Санкт-Петербург, 17-21 мая 2004 г., с. 126-127.
4. Несов А.В., Синицын С.В., Самуилов В.Д. Жизнеспособные, но не культивируемые формы бактерий у растений. Материалы VIII молодежной конференции ботаников, Санкт-Петербург, 17-21 мая 2004 г., с. 131-132.
5. Синицын С.В. Участие активных форм кислорода в дифференцировке гетероцист *Anabaena variabilis*. Тезисы докладов XII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2005», Москва, 2005, с. 196-197.
6. Синицын С.В., Киселевский Д.Б., Самуилов В.Д. Пероксид водорода усиливает программируемую клеточную смерть в листьях гороха. Тезисы международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация», 6-9 июня 2005 г., Пущино, 2005, с. 384-386.
7. Самуилов В.Д., Киселевский Д.Б., Синицын С.В., Шестак А.А., Лагунова Е.М., Несов А.В. (2006) H_2O_2 усиливает CN^- -индуцированный апоптоз в листьях гороха. *Биохимия*, **71**, 481-492.
8. Синицын С.В., Киселевский Д.Б., Лагунова Е.М., Самуилов В.Д. (2006) Разрушение нуклеоидов при солевой и окислительной обработках клеток *Anabaena variabilis* ATCC 29413. Международная научная конференция “Физиология микроорганизмов в природных и экспериментальных экосистемах” 16–19 мая 2006 г, Москва. Сборник тезисов, с. 64.
9. Kiselevsky D.B., Shestak A.A., Sinitsyn S.V., Nesov A.V., Samuilov V.D. (2006) Cyanide-induced apoptosis in pea leafs. 14th European Bioenergetics Conference EBEC, Moscow State University, Moscow, 22–27 July 2006. Abstract book, p. 499.