

Оценка роли свободного гистидина в индукции сигнальных и адаптивных реакций *Arabidopsis thaliana* в ответ на никелевый стресс

Мацкевич В.С., Кузнецова Н.А., Самохина В.В., Демидчик В.В.*

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

*Email: dzemidchik@bsu.by

Согласно экспертной оценке Евросоюза уровень выбросов в окружающую среду тяжелого металла никеля (Ni^{2+}) и его металл-органических форм прогрессирует и относится к «крайне высоким»; сам Ni^{2+} входит в топ-5 важнейших с точки зрения загрязнения тяжелых металлов. Для человека никель является канцерогеном и вызывает токсические симптомы, начиная с 1-5 мкмоль/л. Концентрации Ni^{2+} свыше 30 мкмоль/л оказывают токсическое воздействие на большинство растений. Токсичность Ni^{2+} обусловлена его высокоаффинным связыванием с важнейшими лигандами биополимеров клетки и с генерацией активных форм кислорода (АФК). Клеточный механизм Ni^{2+} -индуцированных повреждений до конца не понятен, т.к. свободный ион Ni^{2+} в биологических системах не способен катализировать синтез АФК. Тем не менее, в большом количестве работ отмечено свободно-радикальное окислительное влияние никеля на растительные клетки, такие как окисление важнейших липидов и белков. Также не ясным остается механизм, при помощи которого растительная клетка распознает высокие уровни никеля в среде. Никель является блокатором Ca^{2+} -проницаемых ионных каналов, ответственных за генерацию Ca^{2+} -сигналов, служащих для обеспечения явлений раннего распознавания стрессовых сигналов у растений. Примечательно, что борьба организма растения с повышенными уровнями никеля в среде связана с усилением синтеза и подъемом клеточного уровня свободного гистидина – эффективного хелатора Ni^{2+} . Концентрация гистидина при никелевом стрессе также увеличивается и в апопласте. Общий уровень гистидина может возрасти в несколько раз даже у обычных неустойчивых к никелю видов. В то же время имеется флора, эволюционно-приспособленная к высоким уровням никеля в среде, так-называемая флора серпентинных почв. Данные растения также имеют повышенный уровень гистидина в клетках и в апопласте. Также ранее были проведены испытания чувствительности к никелю растений с гиперэкспрессией ферментов синтеза гистидина. Данные растения продемонстрировали одновременно 10-кратное увеличение уровня гистидина и многократное повышение эффективной действующей концентрации, вызывающей угнетение ростовых процессов. Особая роль гистидина в адаптации растений к условиям повышенного содержания никеля в среде ставит вопрос о механизмах влияния никель-гистидиновых комплексов на организм растения на молекулярном и клеточном уровне. Теоретически данные комплексы могут участвовать в распознавании никеля растением, так как согласно ряду данных они могут обладать более высокой редокс-активностью, чем практически инертный Ni^{2+} . Интересно, что некоторые работы отмечают сильный уровень окислительных повреждений при обработке растений избытком никеля. В настоящем исследовании была протестирована гипотеза, согласно которой комплексы никеля с гистидином способны воздействовать на сигнальные процессы клетки, в частности, Ca^{2+} -сигнализацию, изменяя характер экспрессии генов, участвующих в стресс-метаболизме, и запрограммированной гибели клеток (ЗКГ). Опыты были выполнены с использованием растений *Arabidopsis thaliana*, выращенных в вертикальной гелевой культуре. Введение Ni^{2+} в среду выращивания

подавляло рост основного корня растений. Полумаксимальный эффект достигался при введении 0,3 мМ Ni²⁺, а полное ингибирование – при 3 мМ Ni²⁺. Добавление гистидина снижало токсическое действие Ni²⁺ на рост корня, в особенности, при высоких уровнях никеля в среде. Тестирование симптомов ЗКГ на фоне повышенных уровней никеля в среде показало их значительное увеличение. Добавление никеля вместе с гистидином изменяло характер симптомов ЗКГ. В присутствии гистидина росла активность протеаз ЗКГ при одновременном снижении уровня морфологических изменений, свойственных ЗКГ. Данный эффект довольно неожиданный, так как обычно вышеприведенные симптомы коррелируют позитивно. Люминометрический тест на основе системы Ca²⁺/экворин показал, что добавление Ni²⁺ к корням арабидопсиса не вызывает изменений [Ca²⁺]_{цит.}, однако его введение на фоне гистидина индуцирует значительный Ca²⁺-сигнал. Таким образом, в присутствии гистидина никель становится распознаваем системой Ca²⁺-сигнализации растительной клетки. Испытания эффектов никеля также были проведены с использованием растений-нокаутов, лишенных канала GORK, важнейшей системы, катализирующей выход из клеток ионов калия (K⁺) при стрессе. Данные каналы имеют в своей структуре АФК-чувствительный центр. Растения *gork1-1*, а также растения с модифицированным АФК-чувствительным центром, демонстрировали пониженную чувствительность к Ni²⁺ по сравнению с природным экотипом. Это свидетельствует о том, что редокс-чувствительный канал GORK может выступать в роли одной из первичных мишеней токсического действия Ni²⁺. У растений, выращиваемых на среде с Ni²⁺, также было отмечено значительное увеличение относительной концентрации транскриптов НАДФН-оксидазы RBOHC, глутатион-редуктазы GR1, Ca²⁺-зависимой протеинкиназы СРК6, K⁺-канала GORK, а также некоторых других генов, активность которых часто связывают с абиотическими стрессовыми воздействиями. Гистидин нормализовал Ni²⁺-зависимую стимуляцию экспрессии данных генов. На основе полученных результатов предложен механизм воздействия Ni²⁺ на сигнально-регуляторные системы клеток корня в присутствии гистидина. Гистидин активирует окислительно-восстановительные свойства Ni²⁺, что приводит к появлению Фентон-подобных реакций, таких как катализ синтеза HO[•] и других АФК. Это стимулирует способность Ni²⁺ к редокс-зависимой активации Ca²⁺-проницаемых каналов, Ca²⁺-сигнальных систем, экспрессии «адаптивных» генов и ЗКГ.

Характеризация симптомов NaCl-индуцируемой запрограммированной клеточной гибели в корне *Arabidopsis thaliana* L. Neuhf. диконого типа и линиях, лишенных АФК-активируемого K⁺-канала GORK

Мацкевич В.С.^А, Самохина В.В.^А, Кузнецова Н.А.^А, Демидчик В.В.^{А, В*}

^АБелорусский государственный университет, Минск, Беларусь

*Email: dzemidchyk@bsu.by

^ВБотанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Более одной трети всех обрабатываемых почв на нашей планете засолено. Ежегодные потери от токсического влияния засоления исчисляются сотнями миллиардов долларов. Основным повреждающим компонентом засоления выступает Na⁺, механизмы первичного воздействия которого на клетки корня высших растений до конца не понятны. В последние годы активно развивается представления об