

**АННОТИРОВАННЫЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ОТЧЕТ
О РЕЗУЛЬТАТАХ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ РАБОТ,
ВЫПОЛНЕННЫХ НА ЭТАПЕ № 1**

«Характеристика мембранных липидов и анализ изменений содержания и качественного состава стерина и гликолипидов в растительных клетках при действии различных стрессовых факторов. Оценка последствий стресс - индуцированных изменений липидного состава клеток для процессов формирования устойчивости растений»

Соглашение №8117 от 23 июля 2012 года.

Тема: «Мембранные стерин и гликолипиды растений: физико-химические свойства, метаболические превращения и роль при стрессе»

Исполнитель: КИББ КазНЦ РАН

Ключевые слова: фитостерин, гликолипиды, стресс, оксипирины

1. Цель проекта

1.1. Формулировка задачи / проблемы, на решение которой направлен реализованный проект (2-3 предложения).

Исследование роли мембранных растительных липидов в стрессовых условиях с целью направленного изменения процессов формирования устойчивости растений к действию неблагоприятных факторов, а также обеспечение достижения научных результатов мирового уровня, подготовку и закрепление в сфере науки и образования научных и научно-педагогических кадров, формирование эффективного научного коллектива, специализирующегося в области молекулярной физиологии и биохимии растений.

1.2. Формулировка цели реализованного проекта, места и роли результатов проекта в решении задачи / проблемы, сформулированной в п. 1.1 (2-3 предложения).

Изучение содержания и качественного состава стерина, гликолипидов и фосфолипидов в условиях стеринного истощения, оценка физиологических последствий воздействия стерин-связывающих агентов на клетки корней пшеницы. Изучение изменений в структуре и составе продуктов липоксигеназного метаболизма мембранообразующих липидов, продуцируемых в листьях льна (*Linum usitatissimum*) в ответ на инфицирование растений бактерией *Pectobacterium atrosepticum* и механическое повреждение. Полученные результаты будут способствовать пониманию роли стерина и гликолипидов в стрессовом ответе растительных клеток.

2. Основные результаты проекта

2.1. Краткое описание основных полученных результатов (основные теоретические и экспериментальные результаты, фактические данные, обнаруженные взаимосвязи и закономерности, характеристики созданной научной продукции) / Указание основных характеристик созданной научной продукции (при наличии научной продукции).

1) Результаты обработки данных, полученных при проведении экспериментов по выявлению и идентификации молекулярных видов мембранных стерина и гликолипидов в корнях пшеницы при связывании стерина.

Показано, что действие стерин-связывающего агента метил- β -циклодекстрина (Me β CD) приводит к резкому снижению содержания стерина в корнях пшеницы. Анализ временной динамики действия Me β CD на липидный состав корней проростков

пшеницы (6 ч) показал, что через 2 ч воздействия Me β CD, также как и при действии другого стерин-модулирующего агента нистатина, заметно увеличилось содержание гликоцерамидов (ГлЦер). Через 6 ч воздействия наблюдались заметные изменения молекулярных видов ГлЦер, в частности, происходило увеличение процентного содержания ионов с m/z 864. Воздействие Me β CD оказало лишь небольшое влияние на содержания большинства фосфолипидов.

2) Результаты обработки данных, полученных при изучении окислительного метаболизма мембранообразующих липидов, опосредованного липоксигеназами.

Показано, что в листьях растений льна, выращенных в нормальных условиях, синтезируется один оксигенированный галактолипид – линолипин А. В ответ на инфицирование сначала индуцируется синтез линолипинов В и С, а позднее (при появлении некротических пятен на листьях) – линолипина D. При повреждении листьев льна образуются три новых линолипина. Согласно данным ЯМР и масс-спектрометрии они являются молекулярными видами МГДГ, ацилированного по галактозе. При закислении среды или контакте с воздухом, наблюдаемых при повреждениях клеток, эти метаболиты быстро разрушаются с образованием (3Z)-гексенала и этерифицированной формы раневого гормона травматаина или динортравматаина. Полученные данные свидетельствуют, что оксигенированные галактолипиды листьев льна являются запасной формой соединений, участвующих в защитных ответах на поранение и атаку патогенов.

3) Оценка уровня образования АФК, перекисного окисления липидов, уровня экспрессии пероксидазных и аутофагических генов в клетках корней пшеницы в условиях стеринного истощения.

Показано, что 12 ч действие 1 мкМ нистатина на интактные проростки приводит к накоплению H₂O₂ в корнях. В присутствии Me β CD усиления образования H₂O₂ не наблюдалось. Анализ экспрессии генов пероксидаз 37 кДа, проведенный с использованием метода ПЦР в реальном времени со специфичными праймерами, выявил, что при действии нистатина уровень продукта экспрессии повышался в 6 раз по сравнению с контролем.

4) Результаты обработки данных, полученных при проведении экспериментов по анализу образования аутофагосом, активности аутофагических белков и жизнеспособности в условиях стеринного истощения.

Действие каналоформеров нистатина сопровождалось усиленным образованием аутофагосом. При действии нистатина в концентрации 10 мкМ были выявлены многочисленные аутофагосомы, визуализированные с помощью специфического флуоресцентного красителя Lyso Tracker Red. При использовании большей (20 мкМ) концентрации нистатина наблюдалось скопление аутофагосом в виде агрегатов. Обработка корней Me β CD не приводила к образованию аутофагических вакуолей в клетках. Методом анализа ПЦР в реальном времени было показано, что при действии нистатина в концентрациях 1 мкМ и 10 мкМ в течение 12 ч увеличения экспрессии аутофагического гена atg4 не происходит, однако длительное (36 ч) воздействие нистатина индуцирует повышение уровня экспрессии atg4 в 8-9 раз. Изменения экспрессии аутофагического гена atg6, индуцированные обработкой растений нистатином были незначительными. Так, при 12-часовом действии 10 мкМ нистатина экспрессия гена увеличивалась в 2 раза, а при действии 1 мкМ нистатина - в 1,5 раза.

2.2. Описание новизны научных результатов.

Впервые проведен сравнительный анализ действия на клетки корней пшеницы двух стерин-связывающих агентов: нистатина и метил- β -циклодекстрина и оценка последствий их действия на физиологическом, биохимическом и молекулярном уровнях.

В рамках выполнения реализованного проекта были обнаружены 3 новых линолипина, образующихся в листьях льна в ответ на механическое повреждение. Они

идентифицированы как молекулярные виды моногалактозилдиацилглицерина (МГДГ), ацилированного по галактозе.

2.3. Сопоставление с результатами аналогичных работ мирового уровня.

В настоящее время накопилось достаточно много доказательств того, что специфические стерины играют регуляторную роль в растениях (Schaller, 2004). Предполагают, что стерины также участвуют в сигналинге в клетке, являясь основным компонентом липидных рафтов. Особенностью растительных мембран является сложный стериновый состав. Комплекс фитостеринов с разнообразными свойствами обеспечивают целостность мембран в широком диапазоне температур, которым подвергаются растения (Beck et al., 2007). Регуляция состава и соотношения фитостеринов является ключевым звеном многих процессов роста и развития, а также ранних стрессовых ответов растительных клеток. Изменения содержания стерина в мембранах растений показаны при раневом стрессе [Алексеева с соавт., 2006], холодовом стрессе [Uemura, Steponkus, 1994]. В основном, влияние стеринового компонента на функционирование мембран определяется на модельных липидных мембранах и выделенных мембранах животного происхождения (Laloi et al., 2007). Однако механизмы участия различных молекулярных видов фитостеринов в формировании стрессового ответа у растений остаются малоизученными. Наши данные по изучению состава мембранных липидов при искусственном истощении стерина с помощью полиенового антибиотика нистатина или путем их комплексообразования с метил-бета-циклодекстрином показали увеличение содержания гликоцерамидов. Эти данные подтверждают наличие взаимосвязи этих двух классов рафтообразующих липидов. Истощение стерина и нарушение мембранной целостности приводит к развитию аутофагии. Молекулярные механизмы регуляции аутофагии в растениях остаются малоизученными. В работах Bassham было предположено, что для образования аутофагосом в клетках растений необходима активность многочисленных белков ATG-семейства (Bassham, 2009). Ранее было продемонстрировано увеличение ATG транскриптов в различных стрессовых условиях, в частности, при голодании (Yoshimoto et al., 2004) и индуцированном старении (Xiao, Chye, 2010). Недостаток питательных элементов стимулирует образование АФК и приводит к окислительному стрессу, что, в свою очередь, индуцирует аутофагию (Scherz-Shouval et al., 2007). Нами проведено комплексное исследование по мониторингу образования аутофагосом и изучению профиля экспрессии аутофагических генов при изменении мембранной проницаемости и в условиях стеринового истощения. Эти данные являются новыми и перспективными для оценки последствий изменений липидного метаболизма. Ранее зарубежные коллеги показали, что дивинилэфирсинтазный путь липоксигеназного метаболизма полиеновых жирных кислот является одним из важных компонентов основного иммунитета растений (Fammartino et al., 2010; Gullner et al., 2010; Balaji et al., 2011). Полученные нами результаты впервые демонстрируют, что дивиниловые эфиры способны аккумулироваться в листьях льна в стабильной форме (в виде линолипинов).

3. Назначение и область применения результатов проекта 3.1. *Описание областей применения полученных результатов (области науки и техники; отрасли промышленности и социальной сферы, в которых могут или уже используются полученные результаты или созданная на их основе инновационная продукция).*

4. Перспективы развития исследований

Краткая информация о перспективах развития выполненного в ходе выполнения проекта исследования.

1) *Информация о том, насколько участие в ФЦП способствовало формированию новых исследовательских партнерств. Участвует ли научный коллектив в проектах по 7-й рамочной Программе Евросоюза (с указанием названия проектов и перечня партнеров по ним).*

2) *Краткая информация о проектах научного коллектива по аналогичной тематике.*

3) *Информация о том, сотрудничество с какими странами и исследовательскими центрами может способствовать наибольшей отдаче для развития в России технологий в области исследования, а также для выхода российской продукции на региональные и глобальные рынки.*

5. Опыт закрепления молодых исследователей – участников проекта (этапа проекта) в области науки, образования и высоких технологий

6. Закреплены следующие специалисты:

Сулкарнаева Альбина Гарифулловна, 29.06. 1989 года рождения, зачислена в очную аспирантуру Исполнителя;