

На правах рукописи



Сулкарнаева Альбина Гарифулловна

**СОСТАВ СТЕРИНОВ И АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ С24-СТЕРИН
МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ *TRITICUM AESTIVUM* ПРИ СТРЕССЕ**

03.01.05. – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2016

Работа выполнена в лаборатории окислительно-восстановительного метаболизма Федерального государственного бюджетного учреждения науки Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук (КИББ КазНЦ РАН)

Научный руководитель: **Минибаева Фарид Вилевна**
доктор биологических наук, заведующий лабораторией окислительно-восстановительного метаболизма КИББ КазНЦ РАН, г. Казань

Официальные оппоненты: **Новикова Галина Викторовна**
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных основ внутриклеточной регуляции Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва

Розенцвет Ольга Анатольевна
доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории экологической биохимии Института экологии Волжского бассейна РАН, г. Тольятти

Ведущая организация: Дальневосточный федеральный университет, Школа естественных наук, г. Владивосток

Защита состоится « 7 » июня 2016 г. в 11.00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.005.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при ФГБУН КИББ КазНЦ РАН по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, а/я № 30, тел/факс (843)2927347, e-mail: dissovet@mail.knc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Казанского научного центра РАН и на официальном сайте КИББ КазНЦ РАН <http://www.kibb.knc.ru>.

Автореферат разослан «___» апреля 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Пономарева Анастасия Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка проблемы и ее актуальность. Стерины являются важным структурным элементом биологических мембран. В настоящее время исследование функций растительных стерinov вышло на новый уровень. Стеринам отводится не только структурная, но и регуляторная роль. Известно, что стерины являются предшественниками растительных гормонов brassinosteroidов (БР), регулирующих рост и развитие растений (Benveniste, 2004; Wang, 2006; Ikekawa *et al.*, 2013). Выявлена роль стерinov при растяжении клеток, их полярности, пролиферации, при формировании сосудов, тканей и органов, в развитии зародыша, фертильности растений, гравитропизме, гормональном сигналинге (Schrick *et al.*, 2004; Titapiwatanakun *et al.*, 2009; Vriet *et al.*, 2013). Предполагают, что стерины участвуют в клеточном сигналинге, являясь основным компонентом мембранных микродоменов, так называемых «липидных рафтов» (Mongrand *et al.*, 2010; Casas *et al.*, 2012; Zauber *et al.*, 2014). Стериновый состав растений, в отличие от такового животных и грибов, весьма сложен и многообразен. Преобладающими мембранными стеринами высших растений являются β -ситостерин, кампестерин и стигмастерин, показано также наличие холестерина (Schaller, 2003; Benveniste, 2004; Valitova *et al.*, 2011). Несмотря на имеющуюся в литературе информацию о роли стерinov и их производных в жизнедеятельности растений, молекулярные механизмы вовлечения стерinov в стрессовые ответы растений остаются малоизученными. В частности, в настоящее время острым вопросом является выявление вклада ключевых ферментов биосинтеза растительных стерinov в изменение соотношения различных видов стерinov в условиях стресса.

Биосинтез растительных стерinov – многоступенчатый процесс, характеризующийся наличием множества альтернативных путей. Многие ферменты синтеза растительных стерinov в настоящее время еще не охарактеризованы. Ключевым ферментом в биосинтезе стерinov, определяющим образование конечных продуктов синтеза, является С24-стерин метилтрансфераза (SMT). Показано, что данный фермент необходим для нормального роста и развития растений, и активность SMT меняется при действии различных стрессовых факторов (Luo *et al.*, 2008; Neelakandan *et al.*, 2009). У растений арабидопсиса, табака, сои аннотированы и охарактеризованы различные изоформы белков SMT (Diener *et al.*, 2000; Nes *et al.*, 2003; Carland *et al.*, 2010; Haubrich *et al.*, 2015). В 1997 г. был секвенирован ген пшеницы, кодирующий SMT, который получил название ген *Triticum aestivum* дельта-24-стерин метилтрансферазы (*TaSMT*) (Subramaniam *et al.*, 1999), однако информация о других генах SMT в пшенице, их структуре и экспрессии отсутствует.

Важным шагом к пониманию функций белков является анализ промоторной области генов, кодирующих эти белки. Информация о промоторной области гена *TaSMT* чрезвычайно ограничена, в базе данных NCBI есть лишь короткая последовательность регуляторной области гена *TaSMT* размером в 266 нуклеотидов. Отсутствует информация о последовательностях стресс-чувствительных мотивов. Можно полагать, что наличие таких мотивов позволяет регулировать активность гена *TaSMT* и, в конечном итоге, обуславливает изменения в биосинтезе стерина в стрессовых условиях. Таким образом, анализ стресс-индуцированных изменений активности генов, ответственных за синтез стерина растительной клетки, исключительно актуален.

Эффективным подходом в изучении роли стеринового компонента во внутриклеточных процессах является связывание эндогенных стерина (истощение) с применением специфических агентов (амфотерицин В, нистатин, кандицидин, пимарицин, метил- β -циклодекстрин (*M β CD*)). Однако специфичность этих агентов для растительных стерина и физиологические последствия их применения для клеток растений практически не изучены.

Знание закономерностей изменений в содержании растительных стерина и соотношении их молекулярных видов в стрессовых условиях является необходимой фундаментальной основой для направленного изменения процессов роста растений, формирования их устойчивости к различным неблагоприятным факторам и, в конечном итоге, повышения качества урожая и сохранения биоразнообразия.

Цель и задачи исследования. Цель настоящего исследования – изучение изменений состава стерина и других мембранных липидов в проростках пшеницы при действии низкой положительной температуры, а также анализ структуры и активности генов *S24*-стерин метилтрансферазы.

Были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать изменения липидного состава и физиолого-биохимических параметров в корнях пшеницы в условиях стеринового истощения, вызванного действием стерин-связывающих агентов нистатина и *M β CD*;
2. Изучить изменения проницаемости мембран для электролитов, редокс-статуса и индукцию аутофагии в клетках проростков пшеницы при действии низкой положительной температуры и совместном действии гипотермии и стерин-связывающего агента *M β CD*;
3. Провести анализ состава и содержания стерина, гликоцерамидов и фосфолипидов в корнях и листьях проростков пшеницы в условиях низкотемпературного стресса;

4. Секвенировать и проанализировать структуру генов *TaSMT1* пшеницы, кодирующих фермент стерина биосинтеза С24-стерин метилтрансферазу 1;

5. Провести секвенирование *de novo* промоторных последовательностей генов *TaSMT1* и осуществить поиск стресс-чувствительных *cis*-элементов. Оценить уровень экспрессии генов *TaSMT1* пшеницы в условиях низкотемпературного стресса.

Научная новизна работы. Впервые обнаружено, что специфические механизмы связывания стерин-связывающих агентов со стеринами определяют различия физиологических эффектов этих агентов в клетках растений. В отличие от нистатина, токсичность которого обусловлена истощением стерина в сочетании с образованием пор в мембранах, физиологические последствия истощения стерина при действии олигосахарида *MβCD in vivo* проявляются лишь в стрессовых условиях. Выявлено, что действие низкой положительной температуры индуцирует изменения в соотношениях 24-метил-/этилстерина, общего содержания стерина, гликоцерамидов и фосфолипидов и их соотношениях в корнях и листьях проростков пшеницы. Поддержание баланса основных мембранных липидов способствует повышению стабильности мембран в листьях. Нарушение этого баланса, а также сдвиги редокс-статуса приводят к меньшей устойчивости корней к действию низкой положительной температуры. Впервые идентифицированы три копии гомеологичных генов *TaSMT1*, расположенные на хромосомах А, В, D гексаплоидного генома *T. aestivum*, проведен детальный биоинформатический анализ этих генов и первичной структуры белка SMT1 пшеницы. Проведено секвенирование *de novo* промоторных последовательностей генов *TaSMT1*, выявлены стресс-чувствительные *cis*-элементы. Получены новые экспериментальные данные об изменении профиля экспрессии генов *TaSMT1* в корнях и листьях в условиях холодного стресса.

Научно-практическая значимость. Разработан комплекс методических подходов для анализа мембранных стерина в клетках растений с целью выяснения роли этих липидов при стрессе. Эффективным подходом является изучение состава стерина, экспрессии генов стерина биосинтеза в сочетании с универсальными стрессовыми маркерами, в том числе проницаемостью мембран, уровнем активных форм кислорода (АФК) и жизнеспособностью клеток. Данные параметры могут быть использованы при оценке стрессовой устойчивости растений. На основе проведенного сравнительного анализа действия на растения двух стерин-связывающих агентов нистатина и *MβCD*, имеющих различные механизмы связывания со стеринами, показана меньшая токсичность для растений *MβCD*. Экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе, могут быть применены в учреждениях сельскохозяйственного, биологического и биотехнологического профиля, а также при чтении курсов лекций по физиологии и биохимии растений и молекулярной биологии в ВУЗах.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование. Работа проводилась с 2012 по 2016 г.г. в соответствии с планом научных исследований КИББ КазНЦ РАН по теме «Молекулярные механизмы антиоксидантной защиты растительных клеток» (государственный регистрационный № 01201357062). Исследования автора, как руководителя и исполнителя, поддержаны грантами РФФИ, ФЦП, ВНШ, МКБ, стипендиями Биохимического общества (Великобритания) и Правительства Франции. Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора.

Положения, выносимые на защиту.

1. Вовлечение стериннов в стрессовый ответ растительной клетки реализуется через изменение общего содержания стериннов, соотношения их молекулярных видов, соотношения стериннов с другими мембранными липидами.

2. Ген стеринового биосинтеза *TaSMT1* представлен в геноме пшеницы в виде трех гомеологичных копий, которые характеризуются высокой степенью сходства кодирующих областей, существенными различиями в структуре промоторов, дифференциальной экспрессией при стрессе.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались автором на III и VI всероссийских с международным участием конгрессах молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия» (Нижний Новгород, 2010; Иркутск, 2013); XVIII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, Россия, 2011); третьем международном симпозиуме «Клеточная сигнализация у растений» (Казань, Россия, 2011); VII съезде физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Нижний Новгород, Россия, 2011); II всероссийской школе-конференции молодых ученых Уфимского научного центра РАН и Волго-Уральского региона по физико-химической биологии и биотехнологии «БИОМИКА – наука XXI века» (Уфа, Россия, 2011); IV азиатском симпозиуме «The 4th Asian Symposium on Plant Lipids» (Покфулам, Гонконг, 2011); 15-ой и 16-ой международных Пущинских школах-конференциях молодых ученых «Биология – Наука XXI века» (Пушино, Россия, 2011, 2012); 11-ой международной конференции «Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants» (Варшава, Польша, 2013); международном симпозиуме «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» (Казань, Россия, 2013); международной конференции, проводимой совместно FEBS и Biochemical Society «Membrane, Morphology and Function» (Фара-Сан-Мартино, Абрुццо, Италия, 2014); годовом собрании Общества физиологов растений России и международной научной конференции и школы молодых ученых «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Калининград, Россия, 2014);

международной конференции «Plant Abiotic Stress Tolerance III» (Вена, Австрия, 2015); 18-ом Европейском симпозиуме студентов-биологов «Symbiose 2015» (Александрополис, Греция, 2015); VI совместном азиатском симпозиуме «6th International Singapore Lipid Symposium and 6th Asian Symposium on Plant Lipids» (Сингапур, 2015), а также на итоговых конференциях КИББ КазНЦ РАН (2012, 2013, 2014, 2015, 2016).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 19 работ, из них 3 статьи в рецензируемых изданиях (FEBS Journal, ДАН – 2 статьи), рекомендуемых ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 157 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения. В работе представлено 13 таблиц, 33 рисунка. Список литературы включает 331 источника, из которых 305 – иностранных.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Объект исследования. В качестве объекта исследований использовали проростки яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта «Казанская юбилейная». Растения выращивали на 0,25 мМ CaCl₂ при температуре +22° С и освещенности 100 Вт/м² с 12 ч фотопериодом в течение 4 суток. Затем растения перемещали на исследуемые растворы или условия и выдерживали в течение 1-12 ч.

1.2. Анализ липидов. Общие липиды корней проростков пшеницы экстрагировали по методу Николса (Nichols, 1963) с модификациями (Kotlova *et al.*, 2009). Индивидуальные фосфо- и гликолипиды анализировали с помощью двумерной высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ТСХ) (Benning *et al.*, 1995). Хроматографические зоны, соответствующие липидным соединениям, визуализировали с помощью 5%-ного раствора H₂SO₄ в метаноле. Фосфолипиды (ФЛ) и гликоцерамиды (ГлЦер) идентифицировали с использованием стандартов (Kates, 1972). Количество общих ГлЦер и индивидуальных ФЛ определяли с помощью денситометра ДенСкан (Ленхром, Россия). Стерины разделяли с помощью одномерной ТСХ и визуализировали с помощью паров йода. Далее стерины анализировали с помощью газового хромато-масс-спектрометра GSMS-QP5050A (Shimadzu, Япония). Количественный анализ проводили с использованием хроматографического программного обеспечения UniChrom с помощью внутреннего стандарта – нафталина.

1.3. Анализ размера (D_{eff}) и ζ -потенциала частиц M β CD, β -ситостерина и комплекса M β CD/ β -ситостерин. Размер (эффективный гидродинамический диаметр кинетически подвижной частицы в максимуме кривой распределения, D_{eff}) и

электрокинетический потенциал (ζ -потенциал – электрический потенциал кинетически подвижной частицы на границе скольжения в постоянном электрическом поле) частиц М β CD, β -ситостерина и комплекса М β CD/ β -ситостерин в водных растворах 0,2% ДМСО регистрировали методом динамического светорассеяния и микроэлектрофореза на анализаторе Zetasizer Nano ZN (Malvern Instruments, Великобритания).

1.4. Определение проницаемости мембраны для ионов и электролитов, окислительно-восстановительного статуса и жизнеспособности клеток. Проницаемость плазмалеммы оценивали по выходу из клеток K^+ и электролитов. Содержание K^+ измеряли с помощью пламенного фотометра Phlapho-41 (Carl Zeiss, Германия). Выход электролитов (С) оценивали с помощью кондуктометра Cond 7310 (WTW, Германия), индекс мембранной стабильности (ИСМ) рассчитывали в процентах от полного выхода электролитов. Содержание H_2O_2 определяли в растворимой фракции гомогената корней и листьев с использованием ксиленола оранжевого ($\lambda = 560$ нм). Интенсивность ПОЛ определяли в растворимой фракции гомогената по содержанию ТБК-реагирующих продуктов ($\lambda = 532$ нм). Активность пероксидазы определяли с использованием субстрата дианизидина ($\lambda = 460$ нм). Уровень жизнеспособности клеток корней определяли с помощью 0,25% красителя Эванса синего ($\lambda = 600$ нм).

1.5. Флуоресцентная визуализация аутофагосом. Визуализацию аутофагосом осуществляли с помощью флуоресцентного маркера аутофагосом LysoTracker Red DND-99 (LT, Invitrogen, США, λ_{ab} 577 нм / λ_{em} 590 нм), изменения флуоресценции которого детектировали с использованием лазерного конфокального микроскопа LSM-510 Meta (Carl Zeiss, Германия).

1.6. Анализ уровня экспрессии генов. Тотальную РНК пшеницы выделяли с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия). Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили в амплификаторе C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США) в реакционной смеси, содержащей 1 мкМ Oligo(dT)₁₆ праймеров, а также 200 ед. обратной транскриптазы RevertAid RT (Thermo Scientific, США). Накопление ПЦР продуктов оценивали по эмиссии зонда TaqMan с помощью амплификатора с оптическим модулем ICycler IQ-4 (Bio-Rad, США). Для оценки изменения экспрессии генов использовали сравнительный метод (Pfaffl, 2001). В качестве референсных генов были использованы гены фактора АДФ-рибозилирования и ингибитора РНКазы L-подобного белка (Paolacci *et al.*, 2009). Праймеры и флуоресцентные зонды синтезировали в НПО «Синтол» (Москва).

1.7. Выделение ДНК растений и молекулярное клонирование участков целевых генов. Геномную ДНК пшеницы выделяли с использованием СТАВ-буфера. Концентрацию ДНК оценивали спектрофотометрически с помощью NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США),

качество выделенной ДНК оценивали электрофоретически в 1% агарозном геле. Для амплификации целевых фрагментов гомеологичных генов *TaSMT1* были построены праймеры на консервативные участки *TaSMT1*. Для амплификации промоторных областей гомеологичных генов *TaSMT1* были сконструированы специфичные обратные праймеры, построенные на первые экзоны генов, и прямые праймеры, построенные на последовательности, расположенные перед генами. ПЦР проводили в амплификаторе C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США) с использованием геномной ДНК, праймеров и полимераз Maxima Hot Start Taq DNA (Thermo Scientific, США) и GoTaq Flexi DNA (Promega, США). Полученные ПЦР-фрагменты очищали с помощью AxyPrep™ PCR Cleanup Kit (Axygen Biosciences, США) и встраивали в вектор pGem-T Easy (Promega, США). Нуклеотидные последовательности ДНК определяли с помощью ДНК-анализатора ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, США).

1.8. Биоинформатический анализ. Поиск и сравнение гомологичных последовательностей проводили с помощью программы BLAST на сервере NCBI. Подбор праймеров, трансляцию и выравнивание последовательностей выполняли с помощью программы Vector NTI Advance 9 (Invitrogen, США). Нуклеотидные последовательности и хромосомную локализацию генов *TaSMT1* определяли с использованием BLAST базы данных IWGSC (www.wheatgenome.org) на сервере URGI. Анализ экзон-интронной структуры проводили с помощью онлайн-сервера Spidey – mRNA to Genomic Alignment. Потенциальные *cis*-элементы промоторных областей анализировали с помощью баз данных PlantCARE, PLACE и PlantPAN.

1.9. Статистическая обработка. Все опыты проводили как минимум в 3-х биологических и 4-х аналитических повторностях. В таблицах и на рисунках данные представлены в виде среднеарифметических значений и их стандартных отклонений. Статистическую обработку результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента при $P \leq 0,05$ средствами программы Microsoft Excel 2013.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Действие стерин-связывающих агентов MβCD и нистатина на корнях проростков пшеницы. Одним из эффективных подходов для изучения роли стеринового компонента во внутриклеточных процессах является искусственное истощение стеринов с помощью стерин-связывающих агентов. В настоящей работе были использованы два стерин-связывающих агента – полиеновый антибиотик нистатин и макроциклический олигосахарид MβCD. Методом динамического светорассеивания *in vitro* было установлено, что нистатин и

$M\beta CD$ образуют устойчивые комплексы с растительными стеринами, в частности с β -ситостерином (данные представлены в диссертации, Valitova *et al.*, 2011, 2014). Действие стерин-связывающих агентов на корни пшеницы *in vivo* приводило к снижению содержания стерина в корнях (рис. 1 А) и, напротив, значительному увеличению содержания ГлЦер (рис. 1 Б). Кроме того, было отмечено небольшое увеличение содержания большинства ФЛ при действии $M\beta CD$. Таким образом, полученные нами результаты подтверждают специфичность связывания растительных стерина нистатином и $M\beta CD$ и свидетельствуют о сходстве действия этих стерин-связывающих агентов на липидный состав корней пшеницы.

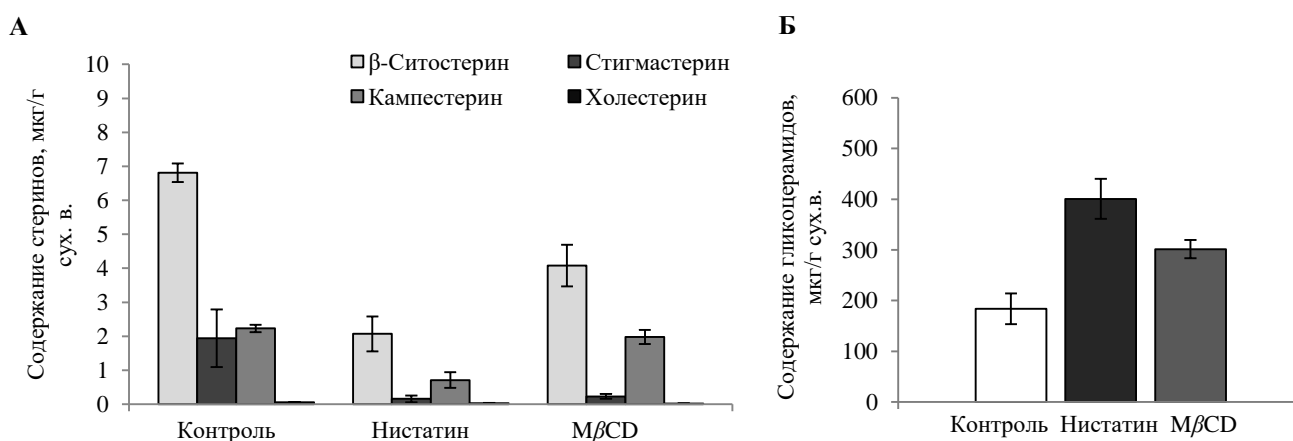


Рис. 1. Изменения содержания молекулярных видов стерина (А) и общего содержания ГлЦер (Б) в корнях пшеницы при действии нистатина и $M\beta CD$.

Известно, что механизмы связывания стерина этими агентами различны. Антибиотик нистатин уменьшает количество эндогенных стерина путем их связывания и образования каналов в мембранах клеток, действие же $M\beta CD$ заключается во взаимодействии олигосахарида со стеринами по принципу «гость-хозяин» и приводит к истечению стерина из мембран. Сравнительный анализ действия нистатина и $M\beta CD$ на корни пшеницы показал, что вызываемое ими уменьшение содержания стерина имело различные физиологические последствия. $M\beta CD$ не оказал токсического воздействия на проростки, в то время как обработка интактных проростков нистатином приводила к повышению проницаемости плазмалеммы для K^+ , индуцировала окислительный стресс (табл. 1) и аутофагию (рис. 2), вызывала снижение уровня жизнеспособности (табл. 1).

Нистатин проявляет непосредственное токсичное действие на растительные клетки, в то время, как физиологические эффекты $M\beta CD$ на проростки проявлялись только при совместном действии с другими стрессовыми факторами. Так, 12 ч выдерживание проростков пшеницы с $M\beta CD$ и последующее 1 ч воздействие на них низкой положительной температуры приводило к резкому (в 11 раз) увеличению содержания H_2O_2 в корнях (табл. 2).

Таблица 1. Изменение содержания K^+ и H^+ , содержания H_2O_2 , экспрессии генов *TaPOX* и жизнеспособности клеток корней пшеницы при 12 ч воздействии нистатина и *MβCD*

Параметры	Контроль	Нистатин (1 мкМ)	<i>MβCD</i> (5 мМ)
Апопластный pH	$5,9 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,2$	$5,9 \pm 0$
Содержание K^+ в апопласте, мкэкв/г сыр. в.	$0,5 \pm 0$	$1,4 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0$
Содержание H_2O_2 , мкМ/г сыр. в.	$6,3 \pm 0,4$	$19,8 \pm 0,4$	$6,0 \pm 0,6$
Относительный уровень экспрессии <i>TaPOX</i> , отн. ед.	1 ± 0	$6,0 \pm 0,1$	–
Жизнеспособность клеток, %	100 ± 3	92 ± 5	98 ± 3

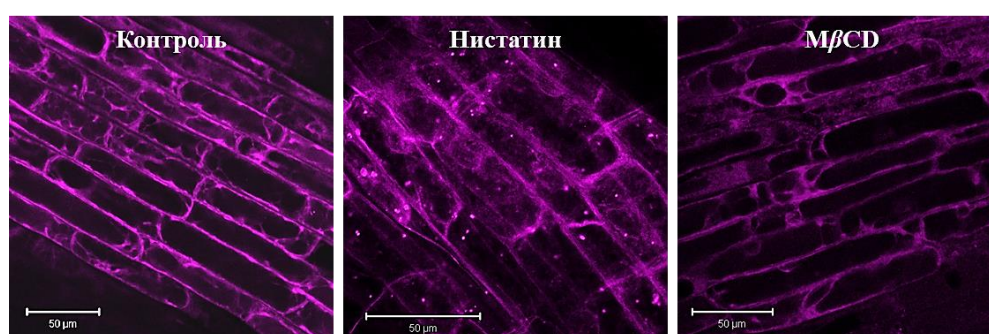


Рис. 2. Визуализация аутофагосом в клетках корней пшеницы с использованием флуоресцентного красителя LysoTracker при 12 ч воздействии *MβCD* и нистатина. Масштабный отрезок – 50 мкм.

Выход электролитов из клеток в присутствии *MβCD* незначительно увеличивался, что сопровождалось падением индекса мембранной стабильности (ИМС). Этот эффект усиливался при совместном действии *MβCD* и низкой положительной температуры на растения (табл. 2). Эти факты могут свидетельствовать о том, что стерины участвуют в предотвращении развития окислительного стресса и стабилизации мембран в клетках корней пшеницы при действии холода, увеличивая адаптационные возможности растения при стрессе.

Таблица 2. Изменения выхода электролитов (С), ИМС и содержания H_2O_2 при действии *MβCD*, холода и совместном действии *MβCD* и холода

Варианты	H_2O_2 , мкМ/г сыр. в.	С, %	ИМС, %
Контроль	$6,9 \pm 3$	$6,4 \pm 1,7$	93,6
<i>MβCD</i>	$5 \pm 1,1$	$9,4 \pm 0,1$	90,6
Холод (+4° С, 1 ч)	$13,5 \pm 1,8$	$8,4 \pm 3,8$	91,6
<i>MβCD</i> + холод	$55,4 \pm 2,6$	$10,7 \pm 0$	89,3

Таким образом, анализ физиолого-биохимических эффектов стерин-связывающих агентов свидетельствует о важности поддержания уровня стерина для жизнедеятельности растения. Можно выделить специфику этих агентов, как в механизмах связывания стерина, так и физиологических последствиях этого связывания. Истощение стерина в сочетании с образованием пор в мембранах и нарушением мембранной целостности обуславливает острую токсичность нистатина (Valitova *et al.*, 2014). С другой стороны, физиологические последствия истощения стерина при действии $M\beta CD$ проявляются лишь в стрессовых условиях.

2.2. Действие низкой положительной температуры на проростки пшеницы.

2.2.1. Изменение индекса мембранной стабильности и редокс-статуса в корнях и листьях. Неблагоприятная температура является одним из распространенных стрессовых факторов, действию которых подвергается растение в природе. В наших экспериментах при холодном стрессе в листьях проростков пшеницы значительных сдвигов в проницаемости мембраны и редокс-статусе клеток не наблюдалось (данные представлены в диссертации). В корнях, напротив, происходило увеличение проницаемости мембран для электролитов и снижение ИМС, а также изменение редокс-статуса клеток и индукция аутофагической дегградации. Эти данные свидетельствуют о различной чувствительности листьев и корней на действие холода.

2.2.2. Изменения липидного состава в корнях и листьях проростков пшеницы: стерины, гликолипиды, фосфолипиды. Низкотемпературный стресс значительно изменяет липидный состав мембраны, в том числе степень ненасыщенности фосфо- и гликолипидов и относительное соотношение стерина, цереброзидов и ФЛ (Макаренко и др., 2010; Uemura, Steponkus, 1999; Bohn *et al.*, 2007). Изменение соотношения стерина/ГлЦер и стерина/ФЛ может влиять на функционирование мембран. В условиях стресса важным для обеспечения функциональной активности мембран является поддержание соотношения стерина с другими мембранными липидами. Несмотря на то, что стерины являются стабилизирующими компонентами мембран и могут влиять на их состояние при стрессе, информация о роли стерина в холодоустойчивости растений крайне ограничена. В основном, это данные о количественных изменениях общего содержания стерина, а не их молекулярных форм (Bohn *et al.*, 2007; Senthil-Kumar *et al.*, 2013).

В наших экспериментах при кратковременном (1 ч) действии низкой положительной температуры (+4° С) общее содержание стерина и в корнях, и в листьях проростков пшеницы значительно возрастало по сравнению с контролем. Более длительное (12 ч) воздействие низкой положительной температуры приводило к снижению общего содержания стерина (рис. 3), а также всех молекулярных видов (табл. 3) до контрольного уровня, как в корнях, так и в листьях проростков пшеницы.

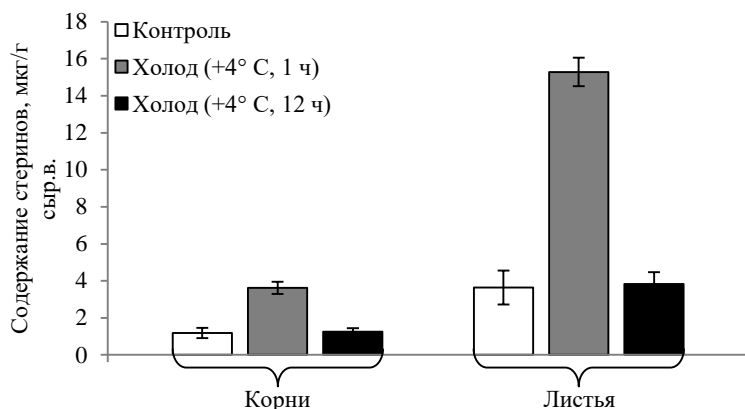


Рис. 3. Изменение общего содержания стерина в корнях и листьях проростков пшеницы при холодовом стрессе.

В растениях контрольного варианта отношение относительного содержания 24-метилстеринов к 24-этилстеринам в листьях было ниже, чем в корнях (табл. 4). При действии низкой положительной температуры в корнях наблюдалось лишь незначительное увеличение соотношения 24-метил-/этилстерина, что говорит об увеличении доли относительного содержания кампестерина. В листьях, напротив, наблюдалось уменьшение соотношения 24-метил-/этилстерина вследствие увеличения относительной доли 24-этилстеринов – β -ситостерина и стигмастерина (табл. 3, 4). Высокое содержание β -ситостерина в листьях может оказывать протекторное действие на мембраны, в том числе, проявляя свое антиоксидантное действие. Как известно, β -ситостерин обладает высокой антиоксидантной активностью (Vivancos, Moreno, 2005; Pose *et al.*, 2009).

Таблица 3. Изменение состава и содержания (мкг/г сыр. в.) молекулярных видов стерина при действии низкой положительной температуры

Варианты		β -Ситостерин	Стигмастерин	Кампестерин	Холестерин
Корни	Контроль	0,72 ± 0,14	0,09 ± 0,05	0,33 ± 0,05	0,05 ± 0,04
	Холод (+4° С, 1 ч)	2,16 ± 0,12	0,26 ± 0,01	1,12 ± 0,19	0,08 ± 0,01
	Холод (+4° С, 12 ч)	0,81 ± 0,10	0,03 ± 0,01	0,35 ± 0,08	0,06 ± 0,01
Листья	Контроль	2,23 ± 0,57	0,44 ± 0,10	0,86 ± 0,24	0,11 ± 0,01
	Холод (+4° С, 1 ч)	11,57 ± 0,34	1,08 ± 0,19	2,47 ± 0,22	0,18 ± 0,02
	Холод (+4° С, 12 ч)	2,59 ± 0,42	0,31 ± 0,05	0,86 ± 0,15	0,07 ± 0,02

Было высказано предположение, что уникальная способность растений к синтезу этилстеринов, в отличие от животных, может являться частью эволюционного процесса адаптации для преодоления широких колебаний температур и поддержания важных мембрано-связанных процессов метаболизма (Dufourc, 2008).

Таблица 4. Соотношение 24-метил-/этилстерины в корнях и листьях проростков пшеницы при действии холода (+4° С)

Соотношение 24-метил-/этилстерины		
Варианты	Корни	Листья
Контроль	0,41 ± 0,03	0,32 ± 0,05
Холод (1 ч)	0,46 ± 0,01	0,20 ± 0,01
Холод (12 ч)	0,41 ± 0,02	0,30 ± 0,03

Известно, что присутствие дополнительной этильной группы может усиливать Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия, приводящие к большему мембранному сцеплению и меньшей температурной чувствительности (Beck *et al.*, 2007).

Еще одним липидным компонентом мембран являются гликоцерамиды, важной особенностью которых является их повышенное сродство к стеринам, обусловленное взаимодействием боковых цепей стерина с насыщенными алкильными цепями ГлЦер. Это определяет их плотную упаковку и способствует образованию липидных рафтов, или микродоменов, в связи с чем часто в литературе эти два класса липидов называют «рафтообразующими» (Simons, Ikonen, 1997; Zauber *et al.*, 2014). Нами была выявлена интересная закономерность между изменениями в содержании стерина и ГлЦер при действии холода. При кратковременном (1 ч) действии низкой положительной температуры увеличение содержания стерина в корнях и листьях пшеницы (рис. 3) сопровождалось значительным снижением содержания ГлЦер (рис. 4). Заметное снижение уровня стерина при длительном (12 ч) выдерживании растений на холоде также сопровождалось увеличением содержания ГлЦер. Похожую обратную зависимость между стеринами и ГлЦер мы наблюдали ранее при действии стерин-связывающих агентов в корнях пшеницы (см. главу 2.1.). Эти данные свидетельствуют о возможной тесной функциональной взаимосвязи между стеринами и ГлЦер, в том числе при рафтообразовании. Однако детальные механизмы такой обратной зависимости остаются неизвестными и требуют дальнейшего изучения.

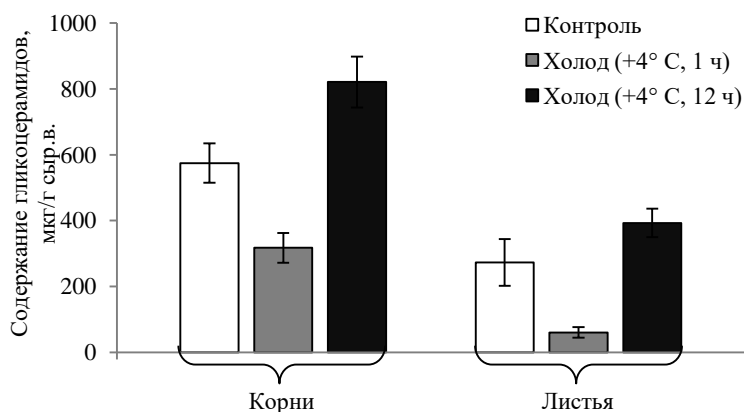


Рис. 4. Изменение общего содержания ГлЦер в корнях и листьях проростков пшеницы при холодном стрессе.

Анализ фосфолипидного состава в корнях и листьях пшеницы при кратковременном (1 ч) действии низкой положительной температуры выявил лишь незначительное уменьшение основных ФЛ в корнях, в то время как в листьях происходили существенные изменения в составе основных ФЛ

(данные представлены в диссертации). Наиболее явные изменения наблюдались в содержании двух основных классов мембранных ФЛ – ФХ и ФЭ: значительное уменьшение ФХ и повышение ФЭ при действии холода (табл. 5). Длительное (12 ч) действие низкой положительной температуры приводило к более выраженным изменениям в составе основных ФЛ как в корнях, так и листьях. Изменение соотношения ФХ/ФЭ при действии различных стрессовых факторов является одним из механизмов поддержания физико-химических параметров мембраны (Wu *et al.*, 2005).

В наших экспериментах развитие холодового стресса сопровождалось различным характером изменений соотношения ФХ/ФЭ. Если в корнях содержание ФЭ заметно возрастало лишь после 12 ч холодового воздействия, то в листьях оно значительно повышалось уже после 1 ч. Такое изменение соотношения ФХ/ФЭ в листьях, вероятно, способствует поддержанию физико-химических параметров мембраны и ее проницаемости. Полученные нами данные свидетельствуют о временных и качественных различиях в изменениях фосфолипидного профиля в корнях и листьях проростков пшеницы в условиях низкотемпературного стресса. В корнях изменения содержания основных ФЛ наблюдались лишь при длительном холодовом воздействии, в то время как в листьях динамичные изменения содержания основных ФЛ происходили в течение всего времени воздействия.

Таким образом, холодовой стресс в проростках пшеницы характеризуется универсальными стрессовыми реакциями, такими как сдвиги редокс-статуса и изменениями проницаемости мембран, а также количественными и качественными изменениями в содержании стеринов, гликолипидов и ФЛ. Было показано, что комплекс изменений, происходящих в липидном составе листьев, в том числе в соотношении молекулярных видов стеринов, способствует поддержанию стабильности мембран и формированию большей температурной устойчивости листьев, по сравнению с таковой корней. Повышенное содержание 24-этилстеринов в листьях может являться частью процесса адаптации для преодоления колебаний температур, в том числе посредством обеспечения антиоксидантной

Таблица 5. Соотношение ФХ/ФЭ в корнях и листьях проростков пшеницы при действии холода (+4° С)

Соотношение ФХ/ФЭ		
Варианты	Корни	Листья
Контроль	1,83 ± 0,2	1,75 ± 0,3
Холод (1 ч)	2,68 ± 0,2	0,18 ± 0,4
Холод (12 ч)	0,24 ± 0,4	2,95 ± 1

защиты, усиления Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий и поддержания важных мембрано-связанных процессов метаболизма. Можно полагать, что изменения стеринового профиля при стрессе обусловлены также изменениями на генном уровне. В связи с этим, нами был проведен анализ структуры и активности генов, контролирующих биосинтез стеринов.

2.3. Характеристика C24-стерин метилтрансферазы пшеницы.

2.3.1. Биоинформатический анализ белка TaSMT1. Структурной особенностью основных стеринов растений, отличающей их от стеринов животных, является наличие метильной или этильной групп при 24-м атоме углерода (C24) в боковой цепи (Nes *et al.*, 2004). В связи с этим, C24-метилирование, которое катализируется C24-стерин метилтрансферазой (SMT), является важнейшим этапом биосинтеза растительных стеринов. Для растений характерно два типа SMT, участвующих в первичном (SMT1) и во вторичном (SMT2) метилировании 24-го атома углерода боковой цепи стеринов (Shi *et al.*, 1996; Bouvier-Navé *et al.*, 1997). В базе данных NCBI нами была обнаружена аминокислотная последовательность C24-стерин метилтрансферазы *T. aestivum* (TA-MT, GenBank: AAB37769.1, Subramaniam *et al.*, 1999). Это трансмембранный белок с молекулярной массой 41 кДа, состоящий из 363 аминокислот. Известно, что коферментом данного белка является S-аденозил-L-метионин – донор метильной группы, а кофактором – глутатион, кроме того, для работы фермента необходимо присутствие ионов Mg^{2+} . Информация о том, к какому семейству C24-стерин метилтрансфераз относится данный белок пшеницы, отсутствовала. Проведенное нами сопоставление аминокислотной последовательности с гомологичными белками из базы данных NCBI показало, что данный белок пшеницы консервативен и имеет более высокую степень сходства с последовательностями белков семейства SMT1 (59,7%), по сравнению с белками семейства SMT2 (30,7%). Наибольшая идентичность аминокислотной последовательности TA-MT была установлена с SMT1 других злаковых, в частности, ячменя (86,8%), *Brachypodium* (86%), кукурузы (84,6%) и риса (82,6%). C24-стерин метилтрансфераза пшеницы обладает характерными для белков данного семейства особенностями, а именно трех стерин-связывающими сайтами, S-аденозил-L-метионин-связывающим сайтом и C-терминальным доменом, необходимыми для фолдинга и функциональной активности белка (рис. 5). Кроме того, на рисунке 5 показаны консервативные остатки аминокислот, непосредственно участвующих в связывании стерина и аденозил-метионина с ферментом с помощью водородных связей: Glu₈₂, His₉₀, Asp₁₂₅, Glu/Asp₁₅₂, Glu₁₉₅, Glu₂₂₄, Asp₂₇₆. Таким образом, первичная структура данного белка, идентифицированного нами как C24-стерин метилтрансфераза 1 пшеницы (TaSMT1), имеет типичные консервативные последовательности, характерные для SMT1 других растений.

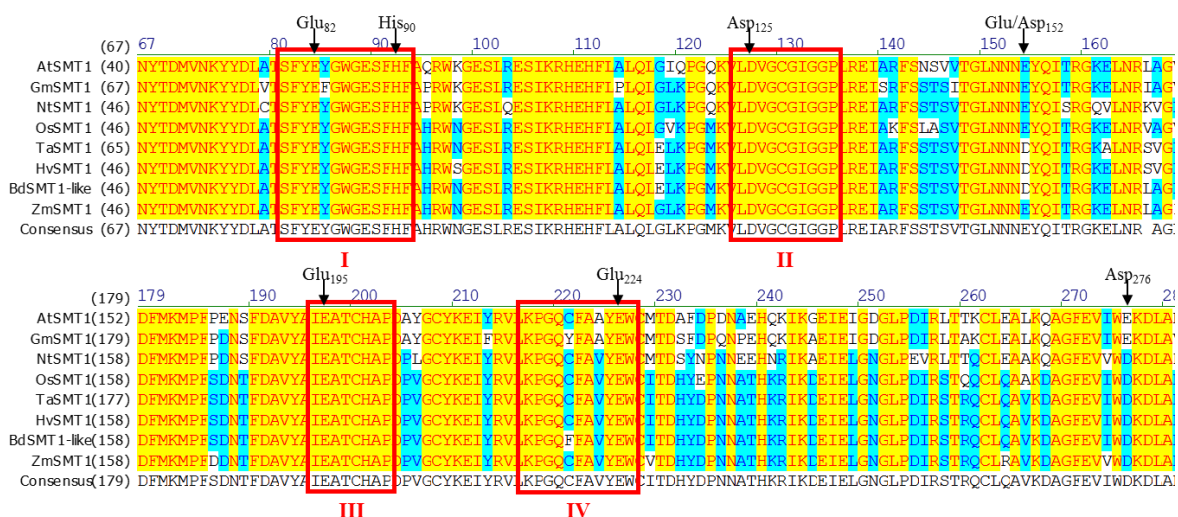


Рис. 5. Выравнивание аминокислотных последовательностей охарактеризованных и клонированных в растениях белков семейства SMT1: AtSMT1 – *Arabidopsis thaliana*, GmSMT1 – *Glycine max*, NtSMT1 – *Nicotiana tabacum*, OsSMT1 – *Oryza sativa*, TaSMT1 – *Triticum aestivum*, HvSMT1 – *Hordeum vulgare*, BdSMT1-like – *Brachypodium distachyon*, ZmSMT1 – *Zea mays*. Выделены консервативные сайты: стерин-связывающие сайты (I, III и IV), аденозилметионин-связывающий сайт (II).

2.3.2. Идентификация и характеристика гомеологичных генов пшеницы

TaSMT1. В настоящее время для многих растений, таких как арабидопсис, соя, табак и рис, показано наличие множества изоформ белков SMT и кодирующих их генов (Bouvier-Navé *et al.*, 1997; Schaller *et al.*, 1998; Neelakandan *et al.*, 2009, 2010; Carland *et al.*, 2010). Удивительно, что для пшеницы в базе данных представлена информация лишь об одном гене SMT (GenBank: U60755.1, Subramaniam *et al.*, 1999). Учитывая, что геном пшеницы является сложноорганизованным и состоит из трех субгеномов, можно полагать, что для этого злака также характерно наличие нескольких генов SMT. В связи с этим, нами был осуществлен поиск возможных изоформ генов SMT пшеницы. В результате экспериментов были выявлены и секвенированы нуклеотидные последовательности трех генов *TaSMT1* пшеницы (рис. 6).

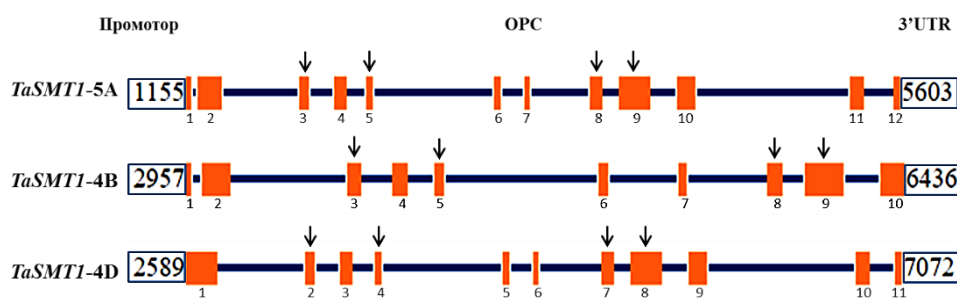


Рис. 6. Схема структуры трех гомеологичных генов *TaSMT1* пшеницы: прямоугольниками показаны экзоны, линией – интроны, стрелками – консервативные экзоны (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/>). OPC – открытая рамка считывания.

Биоинформатический анализ показал, что это гомеологичные гены, расположенные на длинных плечах хромосом 5AL, 4BL и 4DL гексаплоидного генома *T. aestivum*. Эти гены характеризуются структурным сходством и состоят из двенадцати (*TaSMT1-5A*), десяти (*TaSMT1-4B*) и одиннадцати (*TaSMT1-4D*) экзонов, в число которых входят четыре консервативных экзона (рис. 6), что соответствует структуре гомологичных генов *SMT1* других растений.

Выравнивание кодирующих последовательностей трех генов *TaSMT1* выявило наличие полиморфных участков, где встречались замены и делеции нуклеотидов. Возникает вопрос, к чему могут привести такие замены и делеции нуклеотидов в генах *SMT1*? Одним из последствий может быть различная транскрипционная активность этих генов.

2.3.3. Экспрессия генов *TaSMT1* в условиях холодого стресса. С целью выявления особенностей активности различных генов *TaSMT1* нами был проведен анализ их экспрессии в корнях и листьях проростков пшеницы при действии низкой положительной температуры. Мы не обнаружили транскриптов гена *TaSMT1-4B* при использовании специфичных для этого гена праймеров. Возможно, это связано с тем, что этот ген не активен и не транскрибируется с образованием мРНК, однако этот факт требует дальнейших проверок. Результаты показали, что в нестрессированных (контрольных) растениях ген *TaSMT1-5A* интенсивнее экспрессируется в листьях (рис. 7 А), а ген *TaSMT1-4D* проявляет большую активность в корнях (рис. 7 Б), что может свидетельствовать об органоспецифичной экспрессии этих генов. Кроме того, эти гены характеризуются различной активностью в условиях холодого стресса. Так, экспрессия гена *TaSMT1-5A* при действии холода практически не изменялась в корнях и листьях проростков пшеницы (рис. 7 А). Напротив, активность гена *TaSMT1-4D* при действии холода и в корнях, и листьях повышалась, причем, наибольшие изменения происходили после 12 ч действия низкой положительной температуры. Активность этого гена повышалась в 4 раза корнях и в 5 раз листьях (рис. 7 Б).

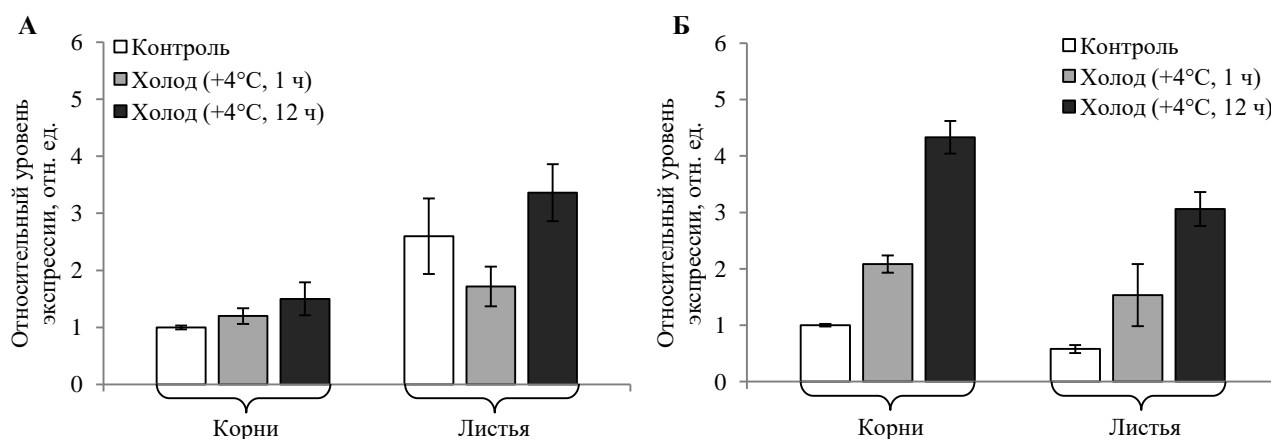


Рис. 7. Относительный уровень экспрессии генов *TaSMT1-5A* (А) и *TaSMT1-4D* (Б) при холодом стрессе. Уровень транскриптов контрольного варианта корней принят за единицу.

Таким образом, нами выявлена дифференциальная экспрессия генов *TaSMT1*, как в различных органах проростков пшеницы (корни и листья), так и в ответ на действие низкой положительной температуры. Ген *TaSMT1-5A* проявляет, в основном, конститутивную активность, в то время как ген *TaSMT1-4D* обладает стресс-индуцибельной активностью. Дифференциальная экспрессия гомеологичных генов *TaSMT1-5A* и *TaSMT1-4D* пшеницы при действии холода может быть обусловлена наличием определенных последовательностей в структуре промоторов.

2.3.4. Клонирование и секвенирование промоторных областей генов *TaSMT1*.

Одним из факторов, влияющих на активность генов, является наличие определенных последовательностей в структуре промоторов этих генов. Нами были амплифицированы и секвенированы промоторные области для каждого гомеологичного гена *TaSMT1* пшеницы размерами от 1100 до 1600 п.н. до старт-кодона ATG. Анализ секвенированных нами промоторных областей генов *TaSMT1-5A/-4B/-4D* показал наличие в них консервативных сайтов (ТАТА-бокс, СААТ-бокс), а также следующих стресс-чувствительных мотивов: *цис*-элементов, индуцируемых светом (АСЕ, АЕ, G-бокс), засухой (MBS), низкими и высокими температурами (LTR, HSE) и гормонами АБК (АВРЕ), гиббереллин (GARE, P-бокс), этилен (ERE), салициловая кислота (ТСА-элемент), ауксин (TGA-элемент), метилжасмонат (TGACG-мотив) (данные представлены в диссертации). Известно, что регуляторные элементы LTR и MBS типичны для промоторов генов, активируемых при холодовом стрессе (Fowler, Thomashow, 2002; Ruelland *et al.*, 2009). Интересно отметить, что чувствительный к холоду *цис*-элемент LTR содержится в промоторных областях генов *TaSMT1-4B* и *TaSMT1-4D* и отсутствует в гене *TaSMT1-5A*. Можно полагать, что наличие в промоторной области такого элемента является одним из факторов, влияющих на активность *TaSMT1-4D* при действии низкой положительной температуры. Таким образом, нами впервые идентифицированы три гомеологичных гена *TaSMT1*, расположенные на хромосомах А, В и D гексаплоидного генома пшеницы. Несмотря на значительное сходство кодирующей области этих генов, нуклеотидные последовательности некодирующих областей генов *TaSMT1* существенно отличаются. Наличие в промоторной области специфических стресс-чувствительных *цис*-элементов, наряду с другими факторами, обуславливает дифференциальную экспрессию гомеологичных генов *TaSMT1* в проростках пшеницы при стрессе. Полученные данные свидетельствуют о вовлечении генов, ответственных за биосинтез стероидов, в стрессовый ответ растительных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Растения обладают богатым стеринным составом, что определяет их вовлечение в разнообразные процессы в жизнедеятельности растения, в том числе ответы растений на изменение условий окружающей среды. Модуляция стеринового компонента мембран при действии стрессовых факторов влияет на проницаемость и функционирование мембран и, как следствие, определяет стратегию стрессового ответа клеток (Валитова и др., 2010; Senthil-Kumar *et al.*, 2015). Это было подтверждено в экспериментах с использованием специфических стерин-связывающих агентов полиенового антибиотика нистатина и макроциклического олигосахарида $M\beta CD$, обладающих различными механизмами связывания стериннов (Valitova *et al.*, 2014). В настоящей работе впервые выявлена специфика физиологических эффектов стерин-связывающих агентов в зависимости от типа их взаимодействия со стеринами. Индуцированное нистатином истощение стериннов в сочетании с образованием пор в мембранах обуславливает острую токсичность этого антибиотика, которая характеризуется значительным увеличением проницаемости мембран для ионов, накоплением АФК и индукцией аутофагии. Негативные последствия истощения стериннов при действии на проростки $M\beta CD$ проявляются лишь в стрессовых условиях, в частности, при действии гипотермии.

Пониженная температура является одним из распространенных стрессовых факторов, действию которых в природе подвергается растение. Информация о роли стериннов в холодоустойчивости растений крайне ограничена и представлена, в основном, данными о количественных изменениях общего содержания стериннов, а не их молекулярных форм. Результаты наших экспериментов показали, что листья и корни проростков пшеницы проявляют различную чувствительность к действию пониженной температуры. Показано, что при низкотемпературном стрессе в корнях проростков пшеницы происходит увеличение проницаемости мембран для электролитов и снижение ИМС, накопление АФК и индукция аутофагии. В листьях, напротив, ИМС и редокс-статус не изменялись. Эти данные свидетельствуют об органоспецифичности стрессового ответа проростков пшеницы на действие гипотермии, что ранее было продемонстрировано и для других растений (Попов и др., 2010; Los, Murata, 2004). Нами показано, что комплекс изменений, происходящих в соотношении молекулярных видов стериннов, гликолипидах и ФЛ, способствует поддержанию стабильности мембран и формированию большей устойчивости листьев, по сравнению с корнями, к действию низкой положительной температуры. Повышенное содержание 24-этилстериннов в листьях может являться частью процесса адаптации для преодоления колебаний температур, в том числе посредством обеспечения антиоксидантной защиты,

усиления Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий и поддержания важных мембрано-связанных процессов метаболизма.

В последнее десятилетие весьма актуальным является изучение рафтообразования в растениях. Специфические липидные микродомены, или рафты, обнаружены во многих растительных объектах (Mongrand *et al.*, 2004; Sacas *et al.*, 2012; Zauber *et al.*, 2014). В наших экспериментах была выявлена обратная взаимосвязь между изменениями в содержании двух рафтообразующих липидов, стеринов и ГлЦер. Эта взаимосвязь заметно проявляется в стрессовых условиях, в частности при действии низкой положительной температуры и связывании стеринов специфическими агентами. Наличие таких согласованных изменений стеринов и ГлЦер может свидетельствовать об общей функциональной активности этих рафтообразующих липидов и предполагает компенсаторный характер изменений. Однако это предположение требует дальнейшего исследования. Таким образом, поддержание баланса между различными классами липидов является ключевым механизмом регуляции проницаемости и функционирования мембран. Нарушение этого баланса может привести не только к изменению проницаемости мембран, но и неблагоприятным физиологическим последствиям, в том числе смещению редокс-статуса и снижению устойчивости к действию стрессовых факторов.

Можно полагать, что изменения стеринового профиля при стрессе обусловлены также изменениями на генном уровне. Ключевым этапом многоступенчатого процесса биосинтеза стеринов в растениях является реакция С-метилирования 24-го атома углерода стеринов, катализируемая ферментом С24-стерин метилтрансферазой. Нами впервые были выявлены и секвенированы нуклеотидные последовательности трех генов *TaSMT1* пшеницы. Биоинформатический анализ показал, что эти гены являются гомеологичными и расположены на хромосомах А, В, D гексаплоидного генома *T. aestivum*. Дифференциальная экспрессия гомеологичных генов *TaSMT1-5A* и *TaSMT1-4D* пшеницы при действии холода, а также наличие выявленных нами стресс-чувствительных *cis*-элементов в структуре промоторов свидетельствуют о сложности регуляции активности генов *TaSMT1* при стрессе.

Таким образом, в настоящей работе на физиолого-биохимическом и генном уровнях выявлены стресс-индуцированные изменения стеринового компонента растительных мембран. Полученные данные способствуют расшифровке регуляторных функций мембранных стеринов растений.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что действие стерин-связывающих агентов нистатина и метил- β -циклодекстрина на корни пшеницы приводит к уменьшению содержания стеринов и повышению уровня гликоцерамидов. Выявлена специфика физиологических эффектов этих агентов, обладающих различными механизмами связывания стеринов. Истощение стеринов в сочетании с образованием пор в мембранах обуславливает острую токсичность нистатина. Негативные последствия истощения стеринов при действии метил- β -циклодекстрина проявляются лишь в стрессовых условиях.

2. Показано, что при низкотемпературном стрессе в корнях проростков пшеницы происходит снижение стабильности мембран, накопление активных форм кислорода и индукция аутофагии. В листьях, напротив, индекс мембранной стабильности и редокс-статус не изменялись в условиях гипотермии. Эти данные свидетельствуют об органоспецифичности стрессового ответа проростков пшеницы на действие гипотермии.

3. Показано, что комплекс и динамика изменений, происходящих в соотношении молекулярных видов стеринов, гликолипидах и фосфолипидах, способствуют поддержанию стабильности мембран и формированию бóльшей устойчивости листьев, по сравнению с корнями, к действию низкой положительной температуры.

4. Выявлены и секвенированы нуклеотидные последовательности трех гомеологичных генов *TaSMT1*, расположенные на хромосомах 5AL, 4BL и 4DL гексаплоидного генома *T. aestivum*. Эти гены характеризуются структурным сходством и состоят из двенадцати (*TaSMT1-5A*), десяти (*TaSMT1-4B*) и одиннадцати (*TaSMT1-4D*) экзонов, в число которых входят четыре консервативных экзона, что соответствует структуре гомологичных генов *SMT1* других растений.

5. Секвенированы и проанализированы последовательности промоторов генов *TaSMT1*, выявлены стресс-чувствительные *цис*-элементы, наличие которых обуславливает дифференциальную экспрессию гомеологичных генов *TaSMT1* в проростках пшеницы при стрессе.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. Valitova, J. Sterol binding by methyl- β -cyclodextrin and nystatin – comparative analysis of biochemical and physiological consequences for plants / J. Valitova, A. Sulkarnayeva, E. Kotlova, A. Ponomareva, F. Mukhitova, L. Murtazina, I. Ryzhkina, R. Beckett, F. Minibayeva // FEBS J. – 2014. – V. 281. – P. 2051–2060.

2. **Сулкарнаева, А.Г.** Стресс-индуцированные изменения мембранных стеринов в корнях пшеницы / **А.Г. Сулкарнаева, Ю.Н. Валитова, Ф.К. Мухитова, Ф.В. Минибаева** // Доклады Академии Наук. – 2014. – Т. 455(2). – С. 229–231.

3. **Сулкарнаева, А.Г.** Характеристика гомеологичных генов С24-стерин метилтрансферазы *Triticum aestivum* L. / **А.Г. Сулкарнаева, Ю.Н. Валитова, Ф.В. Минибаева** // Доклады Академии Наук. – 2016 (принята к печати).

Работы, опубликованные в материалах научных мероприятий

1. **Сулкарнаева, А.Г.** Мембранотропный эффект 7-дегидрохолестерина на корни пшеницы / **А.Г. Сулкарнаева** // III Всероссийский с международным участием конгресс студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010»: сборник тезисов. – Нижний Новгород, 2010. – С. 75.

2. **Сулкарнаева, А.Г.** Индукция аутофагии в клетках корней пшеницы в условиях стеринового истощения / **А.Г. Сулкарнаева** // Ломоносов – 2011: XVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых Ломоносов; секция «Биология»: тезисы докладов. – Москва, 2011. – С. 225.

3. **Сулкарнаева, А.Г.** Образование аутофагосом в клетках корней пшеницы в условиях стеринового истощения / **А.Г. Сулкарнаева, А.А. Пономарева, А.В. Ишемгулова, В.В. Рябовол, Ю.Н. Валитова, Ф.В. Минибаева** // Биология – Наука XXI века: 15 Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых: сборник тезисов. – Пушкино, 2011. – С. 414.

4. **Сулкарнаева, А.Г.** Образование аутофагосом в клетках корней пшеницы при увеличении ионной проницаемости и в условиях стеринового истощения / **А.Г. Сулкарнаева, А.А. Пономарева, В.В. Рябовол, А.В. Ишемгулова, Ю.Н. Валитова, Ф.В. Минибаева** // Третий международный симпозиум «Клеточная сигнализация у растений»: тезисы докладов. – Казань, 2011. – С. 177-178.

5. Валитова, Ю.Н. Мембранные стеринны и сфинголипиды: роль в стрессовом ответе растительных клеток / Ю.Н. Валитова, Е.Р. Котлова, А.В. Новиков, А.Л. Шаварда, А.А. Пономарева, **А.Г. Сулкарнаева, Ф.В. Минибаева** // VII съезд Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий»: материалы докладов в двух частях. – Нижний Новгород, 2011. – Ч. 1. – С. 121-122.

6. **Сулкарнаева, А.Г.** Индукция аутофагии при модуляции ионной проницаемости и стеринового статуса растительных мембран / **А.Г. Сулкарнаева, А.А. Пономарева, Ю.Н. Валитова, Ф.В. Минибаева** // Биомика: специальный выпуск, содержащий материалы II Всероссийской школы-конференции молодых ученых Уфимского научного центра РАН и Волго-Уральского региона по физико-химической биологии и биотехнологии «БИОМИКА наука XXI века»: – 2011. – Т. 1. – № 2. – С. 120-121.

7. Valitova, J.N. Sterol depletion by nystatin increases membrane permeability and modifies glycosphingolipid composition in wheat roots / J.N. Valitova, F.V. Minibayeva, E.R. Kotlova,

A.V. Novikov, **A.G. Sulkarnayeva**, A.A. Ponomareva, L.I. Murtazina, I.S. Ryzhkina. // 4th Asian Symposium on Plant Lipids: Book of Abstracts. – Pokfulam, Hong Kong, 2011. – P. 22.

8. **Сулкарнаева, А.Г.** Стерин-метилтрансфераза пшеницы: биоинформатический анализ и экспрессия гена в стрессовых условиях / **А.Г. Сулкарнаева**, Ю.Н. Валитова, Ф.В. Минибаева // Биология – Наука XXI века: 16 Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых: сборник тезисов. – Пушино, 2012. – С. 477-478.

9. Minibayeva, F. Oxidative stress induced autophagic cell death in plants / F. Minibayeva, V. Ryabovol, A. Ponomareva, S. Dmitrieva, **A. Sulkarnayeva** // 11th International POG conference «Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants»: Book of Abstracts. – Warsaw, Poland, 2013. – P. 184.

10. **Сулкарнаева, А.Г.** Стресс-индуцированные изменения мембранных стероидов в корнях пшеницы / **А.Г. Сулкарнаева**, Ю.Н. Валитова, Ф.К. Мухитова, Ф.В. Минибаева. // VI Всероссийский с международным участием Конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013»: сборник тезисов. – Иркутск, 2013. – С. 415.

11. **Сулкарнаева, А.Г.** Изменения мембранных стероидов при окислительном стрессе / **А.Г. Сулкарнаева**, Ю.Н. Валитова, Ф.К. Мухитова, Ф.В. Минибаева // Первый международный симпозиум «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений»: тезисы докладов. – Казань, 2013. – С. 86.

12. **Sulkarnayeva, A.G.** Membrane sterols play essential roles in stress response of plant cells / **A.G. Sulkarnayeva**, J.N. Valitova, F.K. Mukhitova, A.A. Ponomareva, F.V. Minibayeva // A joint FEBS/Biochemical Society Focused Meeting «Membrane, Morphology and Function»: Book of Abstracts. – Fara San Martino, Abruzzo, Italy, 2014. – P. 22.

13. Валитова, Ю.Н. Физиолого-биохимические аспекты стероидного истощения в корнях пшеницы / Ю.Н. Валитова, **А.Г. Сулкарнаева**, Ф.К. Мухитова, Ф.В. Минибаева // Годичное собрание Общества физиологов растений России Международная научная конференция и школа молодых ученых «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий»: материалы докладов в двух частях. – Калининград, 2014. – Ч. 1. – С. 88-89.

14. **Sulkarnayeva, A.** Cold changes the composition of sterols and glycosceramides and induces oxidative stress in wheat seedlings / **A. Sulkarnayeva**, J. Valitova, F. Mukhitova, S. Dmitrieva, F. Minibayeva // International Conference «Plant Abiotic Stress Tolerance III»: Book of Abstracts. – Vienna, Austria, 2015. – P. 68.

15. **Sulkarnayeva, A.** Cold induces changes in the composition of sterols and glycosceramides and also the expression of C24-sterol methyltransferase gene in wheat / **A. Sulkarnayeva**, J. Valitova, F. Mukhitova, F. Minibayeva // 18th Symposium for Biology Students in Europe «Simbiose 2015»: Book of Abstracts. – Alexandroupoli, Greece, 2015. – P. 68.

16. Valitova, J. Abiotic stress induces the changes in sterols and expression of C24-sterol methyltransferase gene in wheat seedlings / J. Valitova, **A. Sulkarnayeva**, F. Mukhitova, A. Ponomareva, S. Dmitrieva, F. Minibayeva // 6th International Singapore Lipid Symposium and 6th Asian Symposium on Plant Lipids: Book of Abstracts. – Singapore, 2015. – P. 84.