

УДК 577.21+57.045+58.031+58.02

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СТРЕССОВОГО ОТВЕТА ЯЧМЕНЯ  
*HORDEUM VULGARE*, ВЫРОСШЕГО НА БОРТУ  
МЕЖДУНАРОДНОЙ КОСМИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ**

*Е.И. Шагимарданова, О.А. Гусев, В.Н. Сычев,  
М.А. Левинских, М.А. Шарипова, М. Сугимото*

**Аннотация**

Перспективность использования высших растений для создания систем жизнеобеспечения на борту космических кораблей не вызывает сомнения, в связи с чем предпринята попытка установить закономерности их роста, развития и экспрессии генов в космической среде. Семена ячменя сорта *Haruna Nijo* были транспортированы на Международной космической станции (МКС), хранились на борту российского сегмента более четырех месяцев, после чего культивировались в оранжерее «Лада». Характер роста космического и земного ячменя был схож: высота растений достигала 50–60 см при 24-часовом освещении при температуре 25 °С. Данное наблюдение свидетельствует о том, что среда МКС не оказывает влияния на рост ячменя. Космический ячмень использовали для оценки экспрессии генов-антиоксидантов методом ПЦР с обратной транскриптазой. Было показано, что уровни мРНК всех исследованных генов – глутатионтрансферазы, супероксиддисмутазы, каталазы, аскорбатпероксидазы и фенилаланинаммонийлиазы – увеличивались в ячмене, выросшем на МКС, по сравнению с контрольными «земными» растениями. Установлено, что космическая среда индуцирует окислительный стресс в растениях ячменя. Однако уровень этого стресса не оказывает влияния на рост и развитие ячменя в оранжерее «Лада» на борту МКС.

**Ключевые слова:** *Hordeum vulgare*, микрогравитация, космический стресс, экспрессия генов, антиоксидантная защита.

---

**Введение**

С момента начала исследования космоса до настоящего времени накоплено немало данных о том, как эта уникальная среда влияет на живые организмы. На борту пилотируемых и непилотируемых аппаратов было проведено множество экспериментов с использованием растений в качестве объекта изучения. Однако даже спустя более полвека исследований наши знания о механизмах, лежащих в основе молекулярного, клеточного и физиологического ответов на отсутствие земной гравитации и наличие ряда других факторов, крайне малы. Главным достижением ученых явилось создание адекватной установки, позволяющей культивировать многие виды растений. В настоящее время на борту МКС действует оранжерея «Лада», способная обеспечить условия, необходимые для завершения полного цикла развития растений от семени до семени. Оранжерея стала плацдармом для тестирования новых технологий, которые в конечном итоге приведут к созданию систем жизнеобеспечения для полетов на дальние

расстояния. Одним из ключевых компонентов функционирования таких систем будут живые растения, что обусловило необходимость исследования механизмов, лежащих в их основе стрессового ответа на влияние факторов космической среды. Настоящая работа посвящена исследованию экспрессии стрессовых генов ячменя, культивировавшегося в оранжерее «Лада» на борту Международной космической станции (МКС).

### 1. Материалы и методы

**Культивирование растений ячменя.** Эксперимент по культивированию на борту МКС проводился командиром экспедиции 13 П.В. Виноградовым. Семена ячменя *Hordeum vulgare* L. были транспортированы на МКС на борту ракеты Прогресс М-56 24 апреля 2006 г. Семена хранились упакованными в пластиковый пакет в модуле «Звезда» российского сегмента МКС более четырех месяцев. 31 августа 2006 г. семена были высажены в оранжерее «Лада». Проростки развивались в условиях двадцатичетырехчасового освещения при 25 °С. На 26-й день культивирования проростки были срезаны, помещены в пластиковый пакет и отправлены на Землю на борту космического аппарата Союз ТМА-8. В лаборатории на Земле образцы были помещены в холодильник при –80 °С и подвергнуты дальнейшему анализу.

Контрольные растения культивировались в аналогичном модуле «Лада» на Земле в условиях, максимально приближенных к космическим.

**Выделение общей РНК.** РНК выделялась с помощью RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Maryland, USA) с небольшими изменениями в инструкции. 1 мл раствора RLT, содержащего тиоцианат гуанидина, был добавлен к 100 мг растительной ткани листа. Для разрушения клеток образцы сначала помещали в пластиковые пробирки, содержащие стеклянные шарики (lysing matrix D), а затем в гомогенизатор FastPrep Instrument (Qbiogene, Inc, CA). Процедуру гомогенизации проводили дважды в течение 40 с при силе в 6 об/мин, охлаждая образцы на льду 2 мин для предотвращения перегрева и возможной деградации РНК между раундами. Далее образцы центрифугировали 5 мин при 13000 об/мин. Супернатант переносили в колонки QIAshredder и центрифугировали 2 мин при 13000 об/мин для удаления нерастворившихся материалов и уменьшения вязкости раствора за счет растворения желатиновых компонентов, часто образующихся в растительных лизатах. Супернатант переносили в другую пробирку и добавляли равный объем 98%-ного этанола для обеспечения избирательного связывания РНК с мембраной RNeasy колонки. Супернатант, помещенный в колонку, центрифугировали 15 с при 10000 об/мин. Далее колонку последовательно промывали 700 мкл буфера RW1 и дважды 500 мкл буфера RPE, центрифугируя 15 с при 10000 об/мин каждый раз. РНК элюировали 30 мкл воды в течение 1 мин при 10000 об/мин.

Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре SmartSpec 3000 (BioRad).

Целостность РНК была подтверждена при помощи биоанализатора Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies).

Табл. 1

Целевой ген	Последовательность праймеров	Кол-во циклов ПЦР	Размер продукта, пар оснований
<i>α-tubulin</i>	5'-ATCACCAACAGTGCATTCGAGCCTTCC-3' 5'-CCATCGTCGAACTCAGCACCAACTTCT-3'	28	457
<i>gst</i>	5'-AAGCAGCCATGGTGGACGTATGGACGGA-3' 5'-ACTGCACGCTGGTGAATCCCAGCCGCG-3'	28	502
<i>sod</i>	5'-ATGGTGAAGGCTGTTGCTGTGC-3' 5'-TCAGCCTTGAAGTCCGATGATCCC-3'	28	459
<i>cat</i>	5'-TGCAGGAGTACTGGCGCTTTCGACTT-3' 5'-AGATCCCAGGACGACGAGGCCGCGGGCC-3'	28	504
<i>apx</i>	5'-GGAGTTGTCGCCGTGGAGGTGTCCGGTG-3' 5'-CAAGATCACCCCTGGTCGCGCATAGTAGC-3'	33	502
<i>pal</i>	5'-GCAGTTCTCAGAGCTCGTGGAT-3' 5'-GGCAATCTCGATGCCTTTGA-3'	33	352

**Синтез первой цепи кДНК.** Синтез одноцепочечной кДНК проводили в соответствии со стандартным протоколом PrimeScript 1<sup>st</sup> strand cDNA Synthesis kit (Takara Bio, Япония) из 1.5 мкг общей мРНК. Обратную транскриптазу инактивировали нагреванием при 95 °С в течение 5 мин.

**ПЦР с обратной транскриптазой.** ПЦР с обратной транскрипцией проводили в смеси, содержащей 1 мкл одноцепочечной кДНК, 0.4 мМ смесь дезоксирибонуклеотид трифосфатов, 1×ПЦР-буфер, 2.5 ед. ExTaq ДНК-полимеразы и 10 пмоль каждой комбинации праймеров (табл. 1) в общем объеме 50 мкл на амплификаторе iCycler (BioRad), по следующей программе:

94 °С – 1 мин      1 цикл

94 °С – 15 с

60 °С – 15 с

68 °С – 1 мин      до 35 циклов в зависимости от гена.

Количество ПЦР-продукта определяли методом гель-электрофореза в агарозе. Брали 4 мкл реакционной смеси, добавляли 3 мкл ТЕ-буфера и 1 мкл красителя. В лунки геля загружали 5 мкл получившейся смеси. Амплифицированные фрагменты детектировались при помощи окрашивания в этидий бромиде. Концентрацию одноцепочечной кДНК для каждого образца уравнивали после подсчета экспрессии гена *α*-тубулина.

## 2. Результаты и обсуждение

**Рост и развитие ячменя в оранжерее «Лада».** Растения ячменя *H. vulgare* были использованы в данном эксперименте вследствие уникальности его свойств, а также широкого использования его в пищевой индустрии. Ранее было показано, что ячмень высоко устойчив к неблагоприятным внешним воздействиям, таким, как засоленность почвы, засуха и другие [1]. Устойчивость к засухе – особенно ценное свойство объектов космической биологии вследствие ограниченности количества воды, которое допустимо иметь на борту космических аппаратов. Большое количество накопленных биологических данных, а также

интенсивное использование в пищевой промышленности сорта *Haruno Nijo* обусловили его выбор в качестве объекта исследований. Данный сорт является модельным растением во многих исследованиях и способен к формированию зерен при 24-часовом освещении.

Семена хранились на борту МКС более четырех месяцев. Конечная степень прорастания составила более 90%, что указывает на сохранение высокой жизнеспособности семян при соблюдении условий влажности и аэрации.

Семена проросли через 3 дня после посадки и первого полива как в космических условиях, так и на Земле. Таким образом, прорастание семян ячменя не зависит от наличия силы тяжести. Многие другие виды растений, с которыми проводились эксперименты по выращиванию в условиях невесомости, демонстрировали сходные результаты [2].

Высота побегов и космических, и земных достигала 50–60 см, кроющий лист открылся на 26-й день. Таким образом, было показано, что на рост и развитие ячменя *H. vulgare* сорта *Haruno Nijo* не влияют невесомость, космическая радиация и другие факторы космического полета. Вышеописанный эксперимент – первый успешный опыт по выращиванию ячменя в условиях космоса.

#### **Экспрессия стрессовых генов ячменя в ответ на космический стресс.**

В ответ на стрессовое воздействие окружающей среды растения развили различные механизмы, при помощи которых увеличивается их устойчивость [3]. Эти механизмы являются компонентами сложных сигнальных путей, запускаемых какими-либо неблагоприятными внешними воздействиями. Некоторые белки, участвующие в ответе на определенное стрессовое воздействие, являются потенциальными молекулярными маркерами особенного состояния организма в конкретный момент. Экспрессия генов этих маркеров может указывать на запуск специфического пути адаптации к каждому виду стресса. Это особенно актуально в области космической биологии, так как природа космического стресса многокомпонентна и выяснение вклада каждого отдельного фактора этой специфической среды в клеточный ответ является сложной задачей.

В результате метаболизма кислорода в хлоропластах высших растений постоянно образуются так называемые активные формы кислорода (АФК) [4]. В последние годы показано, что эти молекулы являются медиаторами некоторых внутриклеточных сигналов [5]. Многие виды АФК, такие, как супероксид анион, гидропероксид, гидроксил радикал и др., способны вызывать множество повреждений в клетках живых организмов. Было показано, что внешний стресс способствует увеличению продукции АФК [6, 7]. Накопление АФК нарушает клеточный редокс-потенциал в пользу окисленных форм молекул, создавая окислительный стресс, вызывающий повреждение ДНК, инактивацию ферментов и перекисное окисление липидов [8–10]. Таким образом, живым организмам необходимо поддерживать баланс между продукцией АФК и способностью биологических систем к их детоксикации. Для контроля уровня АФК растения развили сложную систему защиты, состоящую из специфических белков, нейтрализующих эти АФК, а также набора неферментативных агентов [11, 12].

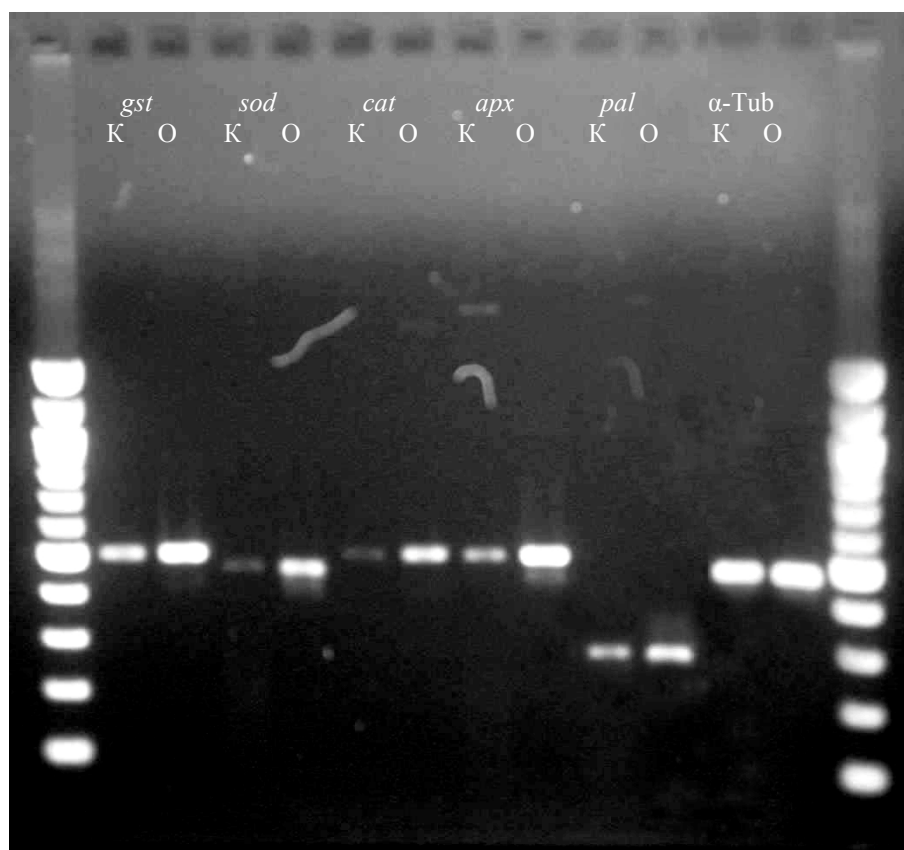


Рис. 1. ПЦР с обратной транскриптазой генов антиоксидантной защиты в ячмене, выросшем на борту МКС (О) по сравнению с контрольными «земными» растениями (К)

Для наших исследований были выбраны гены, кодирующие белки, которые являются основными и главными компонентами системы клеточного ответа на окислительный стресс – гены супероксиддисмутазы, глутатион трансферазы, аскорбатпероксидазы и каталазы. В нашем эксперименте экспрессия генов антиоксидантов в ячмене, выросшем в условиях отсутствия земной гравитации на борту МКС, была исследована методом ПЦР с обратной транскриптазой. Выявлено, что в ответ на космический стресс в листьях ячменя наблюдается накопление транскриптов генов супероксиддисмутазы, аскорбатпероксидазы, глутатионтрансферазы и каталазы (рис. 1). Ранее было показано, что продукция АФК и активность ферментов-антиоксидантов увеличиваются в условиях моделирующей микрогравитации в клиностате [13, 14]. Таким образом, наши результаты подтверждают теорию индукции синтеза ферментов-антиоксидантов в условиях микрогравитации.

В последние годы появляется все больше доказательств участия небелковых молекул, в частности вторичных метаболитов ферментов пути биосинтеза флавоноидов, в антиокислительной защите клеток [15, 16]. Основным ферментом этого пути является фенилаланинаммонийлиаза [17], что дает основания относить его к системе защиты от свободных радикалов. Увеличение экспрессии этого гена прямо приводит к увеличению накопления небелковых молекул-

антиоксидантов в клетках. Нами была обнаружена повышенная экспрессия гена *pal* в клетках ячменя, выросшего на борту МКС.

Таким образом, показано, что космический стресс вызывает нарушение тонкого баланса в редокс-статусе клеток, инициируя усиленную продукцию АФК. В свою очередь, клетки индуцируют повышение синтеза и активности белков-антиоксидантов, что позволяет им успешно противостоять внешнему стрессу. Нами впервые получены данные о наличии окислительного стресса на борту МКС. Наиболее вероятной причиной является космическая радиация и микрогравитация. Следует также помнить, что космическая станция является закрытой системой с постоянно меняющимся газовым составом среды, четко коррелирующим с частотой пристыковок транспортных и грузовых кораблей к МКС. Полученные данные чрезвычайно важны для исследователей и вносят вклад в понимание реакций живых организмов в ответ на космический стресс. Становится ясным, что живые организмы, в частности растения, могут быть использованы в качестве биоиндикаторов на борту космических кораблей, помогая поддерживать нормальную жизнедеятельность космонавтов и космических туристов на борту МКС.

Работа поддержана грантом Министерства образования, культуры, спорта, науки и техники Японии Monbukagakusho (No 062426).

### Summary

*E.I. Shagimardanova, O.A. Gusev, V.N. Sychev, M.A. Levinskikh, M.A. Sharipova, M. Sugimoto.* Stress Defense Gene Expression of Barley *Hordeum vulgare* Grown Onboard International Space Station.

The usage of higher plants for creating Life Support Systems onboard spacecrafts seems highly perspective. Thus, an attempt has been made to reveal the specifics of plants' growth, development and genes expression in space environment. The seeds of barley *Haruna Nijo* were transported to International Space Station (ISS), being kept in the Russian segment of ISS for over 4 months and cultivated in the plant growth chamber "Lada". The growth of space cultivated plants was similar to ground control: the height was about 50 to 60 cm under 24 hr lighting at 25 °C, indicating that barley growth is not affected by space environment in ISS. The space-grown barley was used to evaluate the effect of space environment on ROS scavenging genes expression by means of semi-quantitative reverse transcriptase PCR. It was shown that mRNA levels of all investigated genes, namely glutathione-S-transferase, superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase (PAL), increased in space-grown barley. Thus, space environment induces oxidative stress in the barley. Nevertheless, the stress level does not affect germination and growth of the barley in "Lada" onboard ISS.

**Key words:** *Hordeum vulgare*, microgravitation, space stress, gene expression, antioxidant defense.

### Литература

1. Langridge P., Paltridge N., Fincher G. Functional genomics of abiotic stress tolerance in cereals // *Brief Funct, Genomic, Proteomic.* – 2006. – V. 4, No 4. – P. 343–354.
2. Musgrave M.E. Seeds in space // *Seed Sci. Res.* – 2002. – V. 12, No 1. – P. 1–16.

3. Knight H., Knight M.R. Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk // Trends Plant Sci. – 2001. – V. 6, No 6. – P. 262–267.
4. Bowler C., Montagu M., Inze I. Superoxide dismutase and stress tolerance // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1992. – V. 43, No 4. – P. 83–116.
5. Sen C.K. The general case for redox control of wound repair // Wound Repair Regen. – 2003. – V. 11, No 6. – P. 431–438.
6. Taylor N.L., Day D.A., Millar A.H. Targets of stress-induced oxidative damage in plant mitochondria and their impact on cell carbon/nitrogen metabolism // J. Exp. Bot. – 2004. – V. 55, No 349. – P. 1–10.
7. Bartoli G.G., Gómez F., Martínez D.E., Guaiamet J.J. Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) // J. Exp. Bot. – 2004. – V. 55, No 403. – P. 1663–1669.
8. Moldovan L., Moldovan N.I. Oxygen free radicals and redox biology of organelles // Histochem. Cell Biol. – 2004. – V. 122, No 4. – P. 395–412.
9. Zhu Z., Wei G., Li J., Qian Q., Yu J. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.) // Plant Sci. – 2004. – V. 167, No 3. – P. 527–533.
10. Evans M.D., Cooke M.S. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids // Bioessays. – 2004. – V. 26, No 5. – P. 533–542.
11. Jung S., Kim J.S., Cho K.Y., Tae G.S., Kang B.G. Antioxidant responses of cucumber (*Cucumis sativus*) to photoinhibition and oxidative stress induced by norflurazon under high and low PPFs // Plant Sci. – 2000. – V. 153, No 2. – P. 145–154.
12. Finaud J., Lac G., Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training // Sports Med. – 2006. – V. 36, No 4. – P. 327–358.
13. Li G., Liu Y., Wang G., Song L. Reactive oxygen species and antioxidant enzymes activity of *Anabaena* sp. PCC 7120 (Cyanobacterium) under simulated microgravity // Acta Astronautica. – 2004. – V. 55, No 11. – P. 953–957.
14. Baranenko V.V. PEA chloroplasts under clino-rotation: lipid peroxidation and superoxide dismutase activity // Adv. Space Res. – 2001. – V. 27, No 5. – P. 973–976.
15. Schröder J. The chalcone/stilbene synthase-type family of condensing enzymes // Comprehensive Natural Products Chemistry / Ed. U. Sanakawa. – 1999. – V. 1. – P. 749–771.
16. Jang M., Cai L., Udeani G.O., Slowing K.V., Thomas C.F., Beecher C.W.W., Fong H.S., Farnsworth N.R., Kinghorn A.D., Mehta R.G., Moon R.C., Pezzuto J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes // Science. – 1997. – V. 275, No 5297. – P. 218–220.
17. MacDonald M.J., D'Cunha G.B. A modern view of phenylalanine ammonia lyase // Biochem. Cell Biol. – 2007. – V. 85, No 3. – P. 273–282.

Поступила в редакцию  
23.10.09

---

**Шагимарданова Елена Ильясовна** – аспирант кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: [rjuka@mail.ru](mailto:rjuka@mail.ru)

**Гусев Олег Александрович** – кандидат биологических наук, ассистент кафедры зоологии и беспозвоночных Казанского государственного университета.

E-mail: [ogusev@mail.ru](mailto:ogusev@mail.ru)

**Сычев Владимир Николаевич** – доктор биологических наук, заведующий лабораторией «Биологические системы жизнеобеспечения человека» Института медико-биологических проблем РАН, г. Москва, член-корреспондент Международной академии астронавтики.

E-mail: [vsychev@imbp.ru](mailto:vsychev@imbp.ru)

**Левинских Маргарита Александровна** – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории «Биологические системы жизнеобеспечения человека» Института медико-биологических проблем РАН, г. Москва.

E-mail: [ritalev@impb.ru](mailto:ritalev@impb.ru)

**Шарипова Маргарита Рашидовна** – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: [margaritasharipova@ksu.ru](mailto:margaritasharipova@ksu.ru)

**Сугимото Манабу (Sugimoto Manabu)** – доцент Исследовательского института биоресурсов, г. Курашики, Япония.

E-mail: [manabus@rib.okayama-u.ac.jp](mailto:manabus@rib.okayama-u.ac.jp)