



УДК 581.1:57.044:582.683.2

© 2010

С. И. Жадько

Стрессорное АФК-зависимое увеличение активности пероксиредоксина, тиоредоксина и тиоредоксинредуктазы в клетках культуры ткани *Arabidopsis thaliana* при действии полиэтиленгликоля и пероксида водорода

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Е. Л. Кордюм)

*Показано, що за умов дії поліетиленгліколю (ПЕГ) та H_2O_2 в клітинах культури тканини *Arabidopsis thaliana* відбувається стресорне збільшення вмісту АФК, які у ролі вторинних месенджерів викликають АФК-залежне зростання активності пероксиредоксину, тиоредоксину та тиоредоксинредуктаз. Зроблено припущення, що у досліджуваної культури тканини *A. thaliana*, яка зростала в темряві, такі процеси відбуваються головним чином у мітохондріях. Молекулярні механізми такої стрес-відповіді повинні мати свою специфічність як при дії ПЕГ, так і H_2O_2 .*

При различных неблагоприятных факторах в клетках растений происходит раннее увеличение содержания активных форм кислорода (АФК), включая H_2O_2 , в процессе развития так называемой стрессорной оксидативной вспышки (СОВ). При этом АФК СОВ могут выступать в качестве вторичных мессенджеров в механизме развития ответной реакции клеток на данный стресс [1–4]. СОВ возникает в первые минуты воздействия и хорошо регистрируется методом спонтанной хемилуминесценции (СХЛ) интактных клеток [5].

Считается, что одним из акцепторов и трансмиттеров АФК СОВ являются пероксиредоксины (ПР) и тиоредоксины (ТР) [6–8].

ПР, или тиоредоксиновые пероксидазы, присутствуют во многих компартментах клетки и участвуют в восстановлении дисульфидных групп белков до сульфгидридов с разложением H_2O_2 , поэтому ПР прежде всего являются антиоксидантными ферментами [6]. Наряду с этим ПР также принимают активное участие в формировании стрессовых редокс-сигналов посредством использования H_2O_2 и восстановления ТР, которые в дальнейшем приводят к активации различных транскрипционных факторов и МАП киназ [6]. Увеличение экспрессии генов, белков и активности ПР у растений происходит на ранних стадиях при различных воздействиях, включая оксидативный стресс [3, 6, 7].

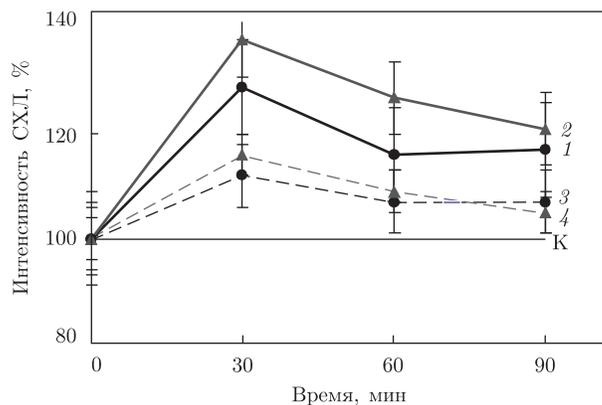


Рис. 1. Интенсивность СХЛ клеток культуры ткани арабидопсиса при действии ПЭГ (1), H₂O₂ (2), АО + ПЭГ (3) и АО + H₂O₂ (4). К — контроль

ТР — это семейство небольших (11–12 кДа) протеинов, содержащих редокс-активные участки, способные обратимо окисляться и восстанавливаться. Окисленные ТР восстанавливаются в НАДФН-зависимых реакциях с участием тиоредоксинредуктаз (ТРР) в так называемых ТР-ТРР системах. У растений имеются цитозольные, митохондриальные и хлоропластные ТР-ТРР системы [9]. Акцепторная и трансдукторная функция ТР заключается в их способности окисляться или непосредственно АФК, или в реакциях с ПР в присутствии H₂O₂ и передавать этот сигнал другим редокс-чувствительным ферментам, сигнальным протеинам и транскрипционным факторам [3]. Увеличение экспрессии генов, белков и активности ТР, так же как и ПР, происходит на ранних стадиях при различных стрессах [3, 8].

Сигнальная роль АФК СОВ с участием ПР и ТР при различных воздействиях, включая осмотический стресс, является еще малоизученной. В данной работе приведены результаты изучения раннего АФК-зависимого увеличения активности ПР, ТР и ТРР в клетках культуры ткани *Arabidopsis thaliana* при действии полиэтиленгликоля (ПЭГ) и H₂O₂.

Материалы и методы исследования. Исследовали 12-дневную каллусную культуру ткани арабидопсиса *A. thaliana*, экотип Columbia, полученную из листьев проростков в нашей лаборатории д-ром биол. наук В. В. Сарнацкой и Т. В. Воробьевой. Культуру ткани выращивали на среде Мурасиге и Скуга в темноте при 24 °С.

500 мг культуры ткани помещали в 30% раствор ПЭГ-6000 или в 50 мМ раствор H₂O₂. Через 30, 60 и 90 мин воздействия определяли интенсивность СХЛ [5] и активность ПР [10], ТР и ТРР [11].

При изучении АФК-зависимого увеличения активности ПР и ТР использовали методику антиоксидантного (АО) ингибирования СОВ [12]. Для этого культуру ткани перед стрессом обрабатывали 10 мМ раствором аскорбата в течение 25 мин, после чего клетки сразу подвергали воздействию ПЭГ или H₂O₂ (в дальнейшем варианты АО + ПЭГ и АО + H₂O₂).

Содержание белка определяли по методу Брэдфорд [13]. Повторность экспериментов 3–4-кратная. Полученные данные обрабатывали статистически [14].

Результаты исследования и их обсуждение. При действии ПЭГ и H₂O₂ в клетках культуры ткани арабидопсиса установлено раннее увеличение интенсивности СХЛ. К 30 мин интенсивность СХЛ превышала соответствующий контроль в среднем на 29–38%, а затем к 60 и 90 мин — медленно снижалась (рис. 1, 1, 2). Зарегистрированное раннее уве-

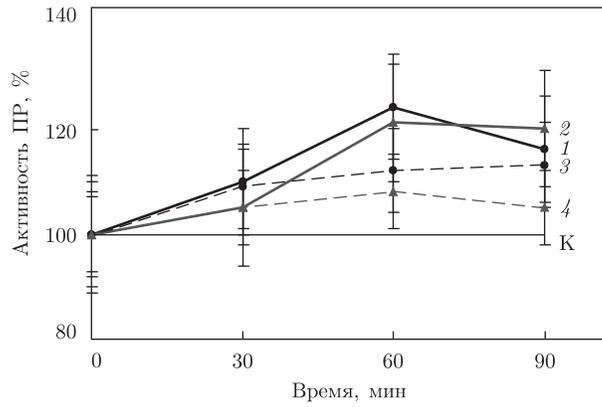


Рис. 2. Активность ПР в клетках культуры ткани арабидопсиса при действии ПЭГ (1), H₂O₂ (2), АО+ПЭГ (3) и АО + H₂O₂ (4). К — контроль

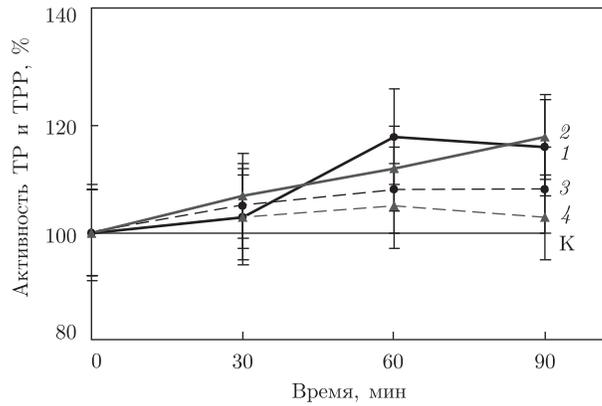


Рис. 3. Активность ТР и ТРР в клетках культуры ткани арабидопсиса при действии ПЭГ (1), H₂O₂ (2), АО + ПЭГ (3) и АО + H₂O₂ (4). К — контроль

личение СХЛ и последующее его снижение соответствует СОВ. При этом начальное увеличение свечения происходит в результате активации процессов пероксидации и накопления АФК, после чего наступает стадия снижения свечения в процессе увеличения антиоксидательной активности клеток [5].

При добавлении к культуре ткани аскорбата до воздействий ПЭГ и H₂O₂ увеличивалась АО-активность клеток и ингибировалось развитие СОВ в среднем на 50–60% (см. рис. 1, 3, 4), что является подтверждением ее пероксидативной природы [12].

После раннего увеличения содержания АФК при обоих воздействиях происходило увеличение активности ПР (рис. 2, 1, 2), ТР и ТРР (рис. 3, 1, 2) в среднем на 5–10, 12–24 и 16–20% к 30, 60 и 90 мин соответственно.

В следующей серии экспериментов было установлено АФК-зависимое увеличение активности ПР, ТР и ТРР при действии ПЭГ и H₂O₂. Посредством АО ингибиторного анализа с использованием аскорбата показано, что уменьшение концентрации АФК СОВ в среднем на 50–60% (см. рис. 1, 3, 4) приводит к снижению активности этих ферментов почти в 2 раза (см. рис. 2, 3, 4; рис. 3, 3, 4).

Таким образом, в клетках культуры ткани арабидопсиса при действии ПЭГ и H₂O₂ в первые минуты происходит стрессорное образование АФК в процессе развития СОВ, кото-

рые в качестве вторичных мессенджеров вызывают АФК-зависимое увеличение активности ПР, ТР и ТРР. Можно считать, что при действии ПЭГ и H_2O_2 перокси- и тиоредоксины также являются важными акцепторами и трансдукторами редокс-сигналов АФК, как и при других видах стрессов.

При обоих воздействиях выявленные изменения имеют в общем схожие закономерности в динамике образования АФК и увеличения активности ПР, ТР и ТРР. Однако их молекулярные механизмы должны иметь свою стресс-специфичность. В частности, при действии осмотика ПЭГ и окислителя H_2O_2 в механизм СОВ могут вовлекаться различные субстраты пероксидации в различных компартментах клетки и, соответственно, различные изоформы ПР, ТР и ТРР.

Следует отметить, что у исследуемой культуры ткани арабидопсиса, растущей в темноте, такие процессы могут происходить в основном в митохондриях. Известно, что митохондрии арабидопсиса содержат все необходимые компоненты для данных процессов: это электронно-транспортная цепь, где при стрессах образуется основное количество АФК СОВ, и митохондриальные формы ПР и ТР — *At-PrxII F* и *At-Trxol* соответственно [6].

Автор выражает свою признательность д-ру биол. наук В. В. Сарнацкой и Т. В. Воробьевой за предоставленную культуру ткани арабидопсиса.

1. Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Breusegem F. V. Reactive oxygen gene network of plants // Trends Plant Sci. – 2004. – **9**, No 10. – P. 490–498.
2. Miller G., Shulaev V., Mittler R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress // Physiol. Plant. – 2008. – **133**. – P. 481–489.
3. Dietz K.-J. Redox signal integration: from stimulus to networks and genes // Ibid. – 2008. – **133**. – P. 459–468.
4. Breusegem F. V., Bailey-Serres J., Mittler R. Unraveling the Tapestry of Networks Involving Reactive Oxygen Species in Plants // Plant Physiol. – 2008. – **147**. – P. 978–984.
5. Барабой В. А., Жадько С. И. Ранние изменения интенсивности спонтанной хемилюминесценции корней проростков гороха при гипергравитации // Докл. АН Украины. – 1992. – № 7. – С. 156–158.
6. Finkemeier I., Goodman M., Lamkemeyer P. et al. The mitochondrial type II peroxiredoxin F is essential for redox homeostasis and root growth of *Arabidopsis thaliana* under stress // J. Biol. Chem. – 2005. – **280**, No 13. – P. 12168–12180.
7. Dietz K.-J., Jacob S., Oelze M.-L. et al. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism // J. Exp. Bot. – 2006. – **57**, No 8. – P. 1697–1709.
8. Santos C. V., Rey P. Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response // Trends Plant Sci. – 2006. – **11**, No 7. – P. 329–334.
9. Brehelin C., Laloi C., Setterdahl A. T. et al. Cytosolic, mitochondrial thioredoxins and thioredoxin reductases in *Arabidopsis thaliana* // Photosynthesis Research. – 2004. – **79**. – P. 295–304.
10. Kima J.-A., Parka S., Kimb K. et al. Activity assay of mammalian 2-cys peroxiredoxins using yeast thioredoxin reductase system // Anal. Biochem. – 2005. – **338**. – P. 216–223.
11. Kumar S., Holmgren A. Induction of thioredoxin, thioredoxin reductase and glutaredoxin activity in mouse skin by TPA, a calcium ionophore and other tumor promoters // Carcinogenesis. – 1999. – **20**, No 9. – P. 1761–1767.
12. Noctor G., Foyer C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1998. – **49**. – P. 249–279.
13. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – **72**. – P. 248–254.
14. Плехинский Н. А. Биометрия. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1970. – 367 с.

*Институт ботаники им. Н. Г. Холодного
НАН Украины, Киев*

Поступило в редакцию 19.05.2009

S. I. Jadko

Stress ROS-dependent increasing of peroxiredoxin, thioredoxin and thioredoxin reductase activity in *Arabidopsis thaliana* tissue culture cells under the action of polyethylene glycol and H₂O₂

The stress increasing of the content of reactive oxygen species (ROS) takes place in A. thaliana tissue culture cells under the action of polyethylene glycol (PEG) and H₂O₂. These ROS as second messengers induce the ROS-dependent increase of the peroxiredoxin, thioredoxin, and thioredoxin reductase activities. It is supposed that, in the investigated A. thaliana tissue culture growing in dark, such processes can take place mostly in mitochondria. Molecular mechanisms of such a stress-response must have own specificity under PEG and H₂O₂.