

На правах рукописи

**ТОМИЛИН
Михаил Вадимович**

**ПЕРОКСИДАЗНАЯ ФЕРМЕНТНАЯ СИСТЕМА ПРОРОСТКОВ
ПШЕНИЦЫ ПРИ РАЗВИТИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В
УСЛОВИЯХ СМЕНЫ СВЕТОВОГО РЕЖИМА**

03.01.04 – Биохимия

*Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук*

Нижний Новгород
2011

Работа выполнена на кафедре биохимии и физиологии растений
Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,
доцент Л.Н. Олюнина

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор В.В. Анастасиев

доктор биологических наук,
доцент В.А. Воденеев

Ведущая организация: Институт биохимии и генетики Уфимского научного
центра РАН

Защита состоится «___» _____ 2011 г. в _____ часов на заседании
диссертационного совета Д212.166.15 при Нижегородском государственном
университете им. Н.И. Лобачевского (603950, г. Нижний Новгород, пр.
Гагарина, д. 23)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского
государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Автореферат разослан «___» _____ 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент

Копылова С.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Известно, что любой фоторегулируемый процесс включает несколько последовательных стадий: поглощение кванта света и образование электронно-возбужденного состояния фоторецептора; фотофизическую реализацию энергии возбуждения и сенсбилизацию фотохимической реакции; образование промежуточных фотопродуктов и конечное проявление фотобиологического эффекта (Конев, 1979; Полевой, 1989; Рубин, 1999). Примерами, в которых свет выступает в роли сигнала, является экспрессия ядерных генов стрессовых белков - *ELIP*, *COP*, *DET*, *FUS* и др., продукты которых регулируют морфогенез растений (Головацкая, 2009; Осипенкова, 2009). В частности, опосредованно через сигнальные белки, фитохромы А и В модифицируют факторы транскрипции, вызывая экспрессию генов, кодирующих пероксидазы (Креславский 2010). Пероксидаза (ПО), имея различные функции (оксидазную и пероксидазную), способна катализировать разнообразные реакции, что позволяет предполагать в каталитическом действии ПО участие двух независимых активных центров (Рогожин, 2004; Газарян, 2006; Граскова, 2008; Максимов и др., 2011). Этот фермент может выступать как фактор, участвующий в элимировании H_2O_2 ; в других ситуациях (например, при окислении пиридиннуклеотидов, индол) – как источник кислородных радикалов (Escribano et al., 2002; Минибаева, Гордон, 2003; Pogany et al., 2006; Graskova et al., 2008). Таким образом, ПО, выполняя двойственную функцию, может быть вовлечена в контроль уровня АФК и, соответственно, выступать в роли регулятора окислительных процессов. В этой связи, представляется актуальным исследовать участие пероксидазной ферментной системы в регуляции окислительно-восстановительных реакций в стрессовых ситуациях, при действии изменяющихся факторов окружающей среды на растения. Отдельной проблемой является механизм преобразования действия внешнего фактора в изменение активности фермента; также остается слабо изученным участие отдельных изопероксидаз в стрессорных реакциях и их роль в изменении функций пероксидазной ферментной системы.

Диссертационное исследование выполнено при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (Государственный контракт № 14.740.11.0732 от 12.10.2010).

Цель и задачи исследования.

Целью работы являлось изучение интенсивности окислительных реакций, катализируемых пероксидазной ферментной системой, а также изменений уровня активных форм кислорода и низкомолекулярных антиоксидантов проростков пшеницы в условиях резкой смены светового режима.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительную оценку влияния света на уровень гемсодержащих белков в апопластном, цитоплазматическом компартментах побегов и корней этиолированных проростков пшеницы.

2. Выявить во внутри- и внеклеточном компартментах проростков пшеницы динамику светозависимой модификации активности пероксидазной ферментной системы, исследуя изоферментный состав пероксидаз, активность отдельных изоформ в реакциях с про-/антиоксидантными субстратами.

3. Определить уровень гемсодержащего белка и углеводных компонентов отдельных изопероксидаз, выделенных из этиолированных и подвергнутых световому воздействию проростков пшеницы.

4. Выявить влияние света на активность супероксиддисмутазы и каталазы апопластного и цитозольного компартментов опытных проростков.

5. Оценить изменения содержания супероксидного анион-радикала, гидропероксидных группировок, уровня низкомолекулярных антиоксидантов во внутри- и внеклеточном компартментах проростков пшеницы при смене светового режима.

Основные положения, выносимые на защиту.

- Процесс восприятия светового сигнала опосредован изменениями в механизме генерации и утилизации АФК как во вне-, так и во внутриклеточных компартментах побегов, корней проростков пшеницы.

- В инициации светозависимых изменений уровня АФК определяющее значение имеют модуляции про-/антиоксидантной активности пероксидазной ферментной системы, при этом возможны следующие ситуации:

- а) сдвиг в соотношении оксидазно-пероксидазной активности фермента (вне- и внутриклеточный компартменты побегов);

- б) сбалансированность отмеченных изменений (корни проростков пшеницы).

- Фоторегуляторный эффект света на пероксидазную ферментную систему сопряжен с изменениями в спектре изоформ пероксидаз, а также перераспределением в системе ионсвязанные - растворимые гемсодержащие белки отдельных изоформ пероксидаз.

- Специфичность светозависимых изменений уровня АФК в апопластном и цитозольном компартментах побегов и корней проростков пшеницы связана с вовлечением наряду с пероксидазной ферментной системой супероксиддисмутазы, каталазы и скооперированностью их функционирования, в котором, вероятно, приоритетное значение имеют изменения в пероксидазной активности.

Научная новизна.

Получены новые данные, свидетельствующие о влиянии света на функционирование пероксидазной ферментной системы; выявлено, что

пероксидазный отклик – часть защитного механизма, который вовлечен в реакцию растений на изменение светового режима.

Показано, что при быстром перемещении проростков из темноты на свет происходит изменение уровня АФК, количества низкомолекулярных антиоксидантов.

Установлено, что свет модифицирует активности оксидазно/пероксидазных реакций; инициирует перераспределение в системе растворимые – связанные белки, индуцируя изменения уровня растворимого гемсодержащего белка и углеводного компонента отдельных изоформ ПО.

Впервые обнаружено, что в условиях смены светового режима в различных компартментах растений происходят неоднозначные изменения баланса про-/антиоксидантной активности пероксидазной ферментной системы, а также активности отдельных изопероксидаз, супероксиддисмутазы, каталазы, низкомолекулярных антиоксидантов.

Научно-практическая значимость.

Полученные результаты важны для понимания механизмов участия изопероксидаз в адаптации растений к изменяющимся условиям окружающей среды. Знания особенностей модификаций отдельных изопероксидаз, их вовлечения в стресс-реакции расширяют представления о механизмах контроля генерирования и детоксикации АФК в клетках растений. Данные о пероксидазной ферментной системе, в частности её про-/антиоксидантной функции, могут быть полезными для использования в индикации устойчивости растительных организмов, подвергнутых воздействиям экологических стресс-факторов. Основные выводы и результаты исследований могут быть использованы в учебно-исследовательской работе, а так же включены в соответствующие разделы спецкурсов, лекций общего курса по биохимии.

Апробация работы.

Основные результаты работы были доложены на 14-й, 16-й и 17-й международной конференции по фундаментальным наукам среди студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2007, 2009, 2010), 12-й, 14-й и 15-й Нижегородской сессии молодых ученых (Нижний Новгород, 2007, 2009, 2010), международной конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений» (Екатеринбург, 2008), I международной научной конференции среди студентов, аспирантов и молодых ученых «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии» (Донецк, 2009), 13-й и 14-й международной Пушчинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2009, 2010), 7-м международном симпозиуме по фенольным соединениям (Москва, 2009), на 3-м Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010» (Нижний Новгород, 2010), Всероссийском симпозиуме «Растение и стресс» (Москва, 2010), 7-м съезде ОФР (Нижний Новгород, 2011).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследований, 5 глав результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы (241 источник, в том числе 109 иностранных). Работа изложена на 124 страницах, содержит 25 рисунков и 5 таблиц.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объект исследований и постановка опытов. В опытах были использованы этиолированные проростки яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта «Московская 35», выращенные на водопроводной воде в темноте при постоянной температуре (25-26⁰С). Проростки после достижения шестидневного возраста помещали под люминесцентные лампы, продолжительность экспонирования составляла 5, 10, 15 или была увеличена до 30, 60 мин; в качестве контроля использовали растения, не подвергнутые воздействию света.

Измерения исследуемых параметров проводили в цитоплазматической фракции и апопласт-омывающем растворе (АОР), изолированных из побегов и корней опытных проростков. Апопластный раствор получали путем инфильтрации дистиллированной водой и последующей вакуумной фильтрации (Паду, 1995); цитоплазматическую фракцию – экстрагируя растворимые белки 0.06М фосфатным буфером (рН 8.0) в присутствии поливинилпирролидона (15 мг на 1 г навески). После центрифугирования и высаливания белка (NH₄)₂SO₄, во всех полученных фракциях определяли концентрацию гемсодержащих белков (ГСБ) спектрофотометрическим методом при 403 нм (Ogawa et al., 1979).

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ) и пероксидазы (ПО). Активность данных ферментов оценивали спектрофотометрически в момент линейного протекания реакции. Активность СОД определяли по восстановлению нитросинего тетразолия (Чевари и др., 1985), активность КАТ по убыли пероксида водорода (Patterson, et al 1984). При оценке ПО использовали различные субстраты: бензидин (БПО), гваякол (ГПО), активности ПО в этих вариантах регистрировали по увеличению продукта в реакционной смеси (Гавриленко и др., 1975); в реакции с аскорбатом (АПО) (Досон и др., 1991), НАД(Ф)Н-ПО (Fecht-Christoffers et al., 2006) и ИУК-ПО (Loukili et al., 1999) – по убыли субстрата.

Электрофоретический анализ изоформ ПО. Электрофорез белков проводили в блоках ПААГ в модифицированной системе (Laemmli, 1970).

Для выявления ПО активности в ПААГ использовали диаминобензидиновый метод (Гавриленко и др., 1975). Полученные электрофореграммы фотографировали, интенсивность окраски выявленных изоформ и электрофоретическую подвижность (Rf) отдельных изопероксидаз определяли с использованием компьютерной программы One-Dscan.

С целью получения биохимических характеристик отдельных изопероксидаз, их элюировали из ПААГ (Сафонов, Сафонова, 1971) и подвергали тестированию, в частности определяли: активность отдельных изоформ ПО с различными субстратами, а также степень гликозилирования выявленных изопероксидаз по реакции с 4,4'-диаминодифенилом (Досон и др., 1991).

Определение содержания гидропероксидных группировок, супероксид-анион-радикала, низкомолекулярных водорастворимых антиоксидантов. Содержание гидропероксидов (R-OOH) оценивали по реакции с роданистым аммонием (Курганова и др., 1997), количество супероксид-анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$) - с использованием эпинефрина (Barber, Kay, 1996). Уровень низкомолекулярных антиоксидантов оценивали по методике А.И. Ермакова и др. (1987) с нашими модификациями.

Статистическая обработка результатов. Полученные результаты статистически обрабатывали методом парных сравнений для связанных выборок (t-критерий Стьюдента). Различия в каждой паре сравниваемых значений считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$ (Гланц, 1999). На рисунках и в таблицах представлены средние арифметические значения измеряемых величин и их среднеквадратичные отклонения. Корреляционную зависимость между выборками, подчиняющихся нормальному распределению, оценивали по критерию Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Пероксидазная ферментная система этиолированных и экспонированных на свету проростков пшеницы

В качестве модельной системы, на которой исследовали влияние смены светового режима, служили этиолированные проростки пшеницы, подвергнутые кратковременной деэтиоляции путем быстрого перемещения проростков из условий полной темноты под люминесцентные лампы. В последнее время в литературе активно обсуждается возможность экстраклеточной продукции АФК и роль пероксидазной ферментной системы (изменение оксидазной/пероксидазной функциональной активности ПО) в поддержании про-/антиоксидантного статуса (Минибаева, Гордон, 2003; Часов и др., 2010). В этой связи, в данной работе была осуществлена сравнительная оценка изменения уровня H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, активности изопероксидаз в апопластном и цитоплазматическом компартментах в ходе развития быстрой реакции шестидневных проростков пшеницы на световое воздействие.

1.1. Светозависимые модификации уровня гемсодержащих белков

Простетическая гемовая группировка ПО, а также других гемсодержащих белков (ГСБ), обладает ярко выраженными спектральными свойствами, благодаря которым данные соединения, присутствующие в растительных тканях в низких концентрациях, могут быть определены высоко чувствительным спектрофотометрическим методом. Количественная характеристика распределения ГСБ между апопластным и цитозольным компартментами представляет самостоятельный интерес, так как известно, что растительные ПО принадлежат к III классу, которые транспортируются во внеклеточное пространство или в вакуоль. Данный процесс значительно усиливается в стрессовых условиях (Mensen et al., 1998; Hiraga et al., 2001; Газарян и др., 2006).

Результаты проведенных экспериментов показали, что свет, как в побегах, так и корнях оказывает модифицирующее воздействие на концентрацию ГСБ в апопласт-омывающем растворе и цитоплазматической фракции (рис. 1). Однако эти изменения более четко выражены во внутриклеточном компартменте. В данной фракции (корни)

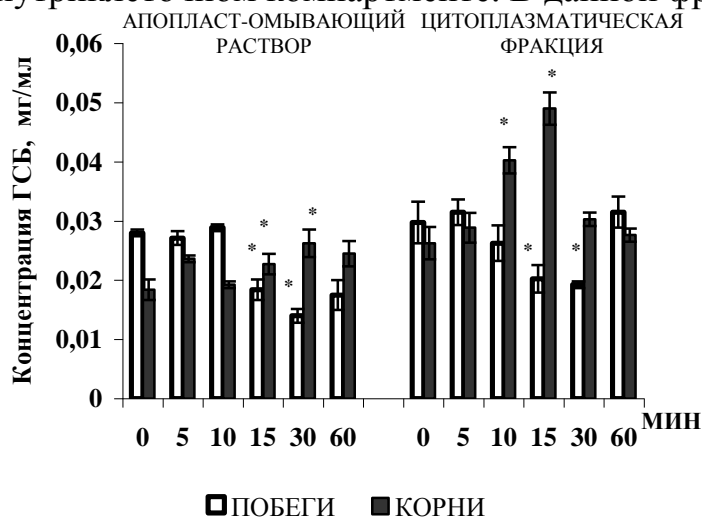


Рис. 1 Изменение уровня гемсодержащих белков в апопласт-омывающем растворе (АОР) и цитоплазматической фракции побегов и корней проростков пшеницы при смене светового режима. *Примечание:* здесь и на следующих рисунках * - значимость различий по сравнению с контролем ($p \leq 0.05$)

зафиксировано плавное, статистически значимое по сравнению с контролем, повышение; в надземных органах уже через 15 мин после воздействия - достоверное (при $p \leq 0.05$) уменьшение содержания ГСБ. Максимальные светоиндуцированные изменения уровня ГСБ в АОР были отмечены через 15-30 мин после смены светового режима: для корней увеличение, в побегах - соответственно снижение.

Таким образом, как свидетельствуют полученные результаты, в побегах и корнях проростков пшеницы характер модификаций, индуцируемых светом в метаболизме и/или транспорте ГСБ, существенно различен. Однако время, необходимое для максимального развития светового эффекта (15 минутное экспонирование проростков пшеницы на свету) в обоих органах совпадает. Можно предположить, что 15-минутное воздействие стрессующего фактора на растения - своеобразная критическая точка, время, достаточное для запуска защитных реакций. Этот вывод базируется также на результатах ранее выполненных на нашей кафедре исследований (Орлова, 2004; Пестова,

2007; Половинкина, 2007), в которых именно в таком временном интервале были зафиксированы очень важные (во многом определяющие стресс-реакцию) метаболические изменения уровня АФК, фитогормонов, активности H^+ -АТФазы и т.д. В этой связи, в последующих экспериментах мы наиболее подробно анализировали те изменения, которые инициировали 5, 10 и 15 минутным экспонированием проростков пшеницы в условиях резкой смены светового режима.

1.2. Влияние света на активность пероксидазной ферментной системы и изоферментный состав пероксидаз

Субстраты классических пероксидаз растений принято дифференцировать на 3 группы. К первой относят двухэлектронные, вторая группа - одноэлектронные доноры (пероксидазная функция); третья группа – это субстраты, окисляющиеся по цепи переноса электронов (АВТС, ИУК, НАД(Ф)Н и др.) (Газарян и др., 2006). Таким образом, фермент имеет две различные функции (оксидазную и пероксидазную), что позволяет предполагать в каталитическом действии пероксидазы участие двух, пространственно разделенных, независимых активных центров (Gibson, Liu, 1978). В качестве субстратов при выявлении оксидазной функции в наших исследованиях были использованы НАД(Ф)Н и ИУК; пероксидазной (антиоксидантной) – бензидин, гваякол и аскорбат. Как следует из результатов, суммированных в табл. 1, в побегах основной уровень антиоксидантной активности ПО представлен во внутриклеточном пространстве в реакции с бензидином, в апопласте – с аскорбатом; в обоих компартментах корней преобладала активность ПО в реакции с бензидином. Прооксидантная (НАД(Ф)Н-ПО, ИУК-ПО) (оксидазная функция ПО) сосредоточена во внеклеточном компартменте, причем в АОР корней уровень оксидазной активности в 4-10 раз выше, чем в цитозоле.

Таблица 1

Сравнение активности пероксидазной ферментной системы апопласт-омывающего раствора и цитоплазматической фракции, полученных из побегов и корней этиолированных проростков пшеницы.

| Фракции | Исследуемый орган | Активность пероксидазной ферментной системы при использовании различных субстратов (ммоль / мг ГСБ * мин) | | | | | |
|----------|-------------------|---|---|---------------|---------------|--------------------------------|----------------|
| | | БЕНЗИДИН | ГВАЯКОЛ | АСКОРБАТ | НАДН | НАДФН | ИУК |
| АОР | ПОБЕГ И | 0,42 ±0,13 | 0,26*10 ⁻³ ±0,09*10 ⁻³ | 1,18 ±0,15 | 5,84 ±0,25 | 0,01 ±0,01 | 3,08 ±0,67 |
| | КОР НИ | 8,72 ±0,09 | 0,08*10 ⁻³ ±0,03*10 ⁻³ | 0,77 ±0,02 | 1,08 ±0,16 | 0,02 ±0,01 | 39,53 ±0,75 |
| ЦИТОЗОЛЬ | ПОБЕГ И | 23,63 ±0,23 | 0,01 ±0,10*10 ⁻³ | 0,16 ±0,01 | 1,07 ±0,15 | 0,01 ±0,50*10 ⁻³ | 2,49 ±0,40 |
| | КОР НИ | 21,92 ±0,11 | 0,01 ±0,29*10 ⁻³ | 0,05 ±0,01 | 0,29 ±0,06 | 0,01 ±0,01 | 3,86 ±0,52 |

Таким образом, во внутри- и внеклеточном компартментах исследуемых органов проростков, возможно, имеет место специфическая направленность окислительно-восстановительных реакций. В литературе активно

обсуждается роль пероксидазы не только в утилизации перекиси водорода, но и в её образовании (Kawano, 2003), а также в образовании супероксид-анион-радикала (Kawano, Muto, 2000). Следовательно, ПО – это фермент, вовлеченный в метаболизм АФК и, в зависимости от ситуации, может участвовать в элиминировании H_2O_2 или служить источником кислородных радикалов.

При резкой смене светового режима выявлены быстрые изменения активности ПО во внутриклеточном (рис. 2) и внеклеточном (рис. 3) пространстве, как побегов, так и корней проростков пшеницы. При этом в цитоплазматическом компартменте корней и побегов (рис. 2) статистически значимо по отношению к контролю свет избирательно стимулировал активность АПО; активности ПО с другими антиоксидантными субстратами (бензидин, гваякол) были снижены или оставались на уровне контроля.

Динамика оксидазной активности фермента данного компартмента (кроме НАДН-ПО) в процессе экспонирования опытных проростков на свету в корнях и побегах была разнонаправленной. Изменения активности корней были

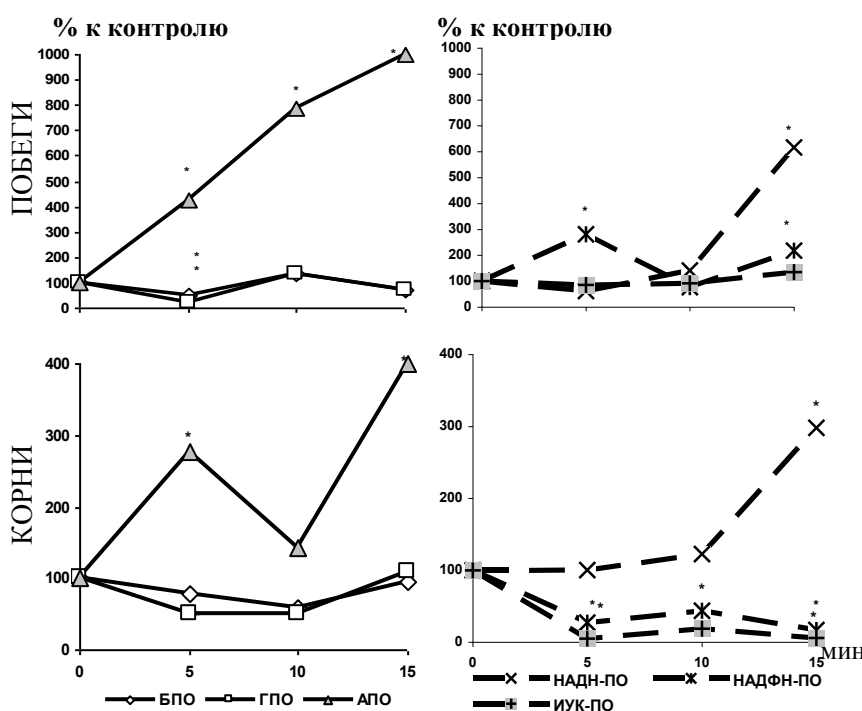


Рис. 2 Изменение активности ПО в цитоплазматическом компартменте побегов и корней проростков пшеницы при резкой смене светового режима.

корней были значимыми по отношению к контролю: наибольшее уменьшение зафиксировано при 15-минутном воздействии света; в побегах активность ПО с этими субстратами была повышена. Таким образом, происходило светозависимое нарастание прооксидантной (оксидазной функции ПО) в побегах; в корнях увеличивалась активность фермента только в реакции с НАДН.

В апопластном компартменте корней свет через 5 мин после воздействия статистически значимо стимулировал антиоксидантную активность ПО со всеми исследованными субстратами и снижал прооксидантную (рис. 3), при этом в побегах активности внеклеточных ПО (кроме БПО) были снижены. 15-минутная деэтиоляция в АОР надземных органов индуцировала снижение пероксидазной и нарастание оксидазной функции ПО; в корнях – активность

ПО с большинством субстратов (кроме гваякол и НАДН) была снижена.

Таким образом, в исследуемых органах проростков пшеницы свет, оказывая специфическое воздействие на пероксидазную ферментную систему апопластного раствора, индуцировал в побегах проростков пшеницы сдвиг про-/антиоксидантного равновесия активности ПО в сторону прооксидантной функции;

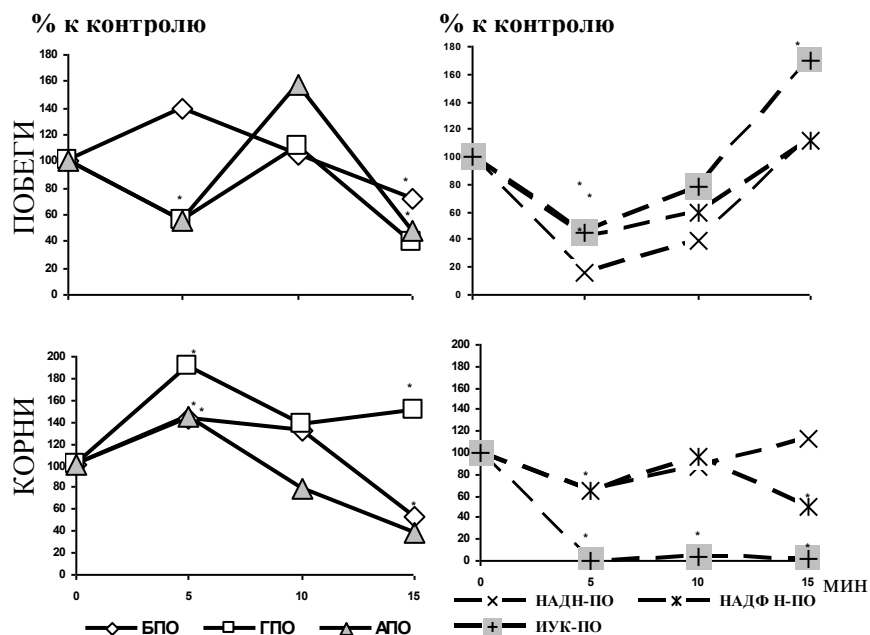


Рис. 3 Изменение активности ПО в апопластном компартменте побегов и корней проростков пшеницы при смене светового режима

в корнях - вызывал быстрое нарастание и в дальнейшем сохранение повышенной антиоксидантной активности ПО (в частности ГПО). В цитозольном компартменте происходили довольно близкие светозависимые изменения как пероксидазной (в корнях и побегах – преимущественная активация АПО), так и оксидазной активности: возрастание НАД(Ф)Н-ПО (в побегах); НАДН-ПО (в корнях).

На изменение активности пероксидазной ферментной системы, ее регуляцию в исследуемых компартментах могут оказывать влияние светозависимые модификации в изоферментных спектрах ПО. Все изоферменты ПО подразделяют на кислые (анионные) с изоэлектрической точкой (pI~3.5-5.0), нейтральные (5.0-7.5) и щелочные (катионные, ~7.5-9.5) (Chen, Vierling, 2000; Garnczarska et al., 2004; Максимов, Черепанова, 2006). На электрофореграммах, после

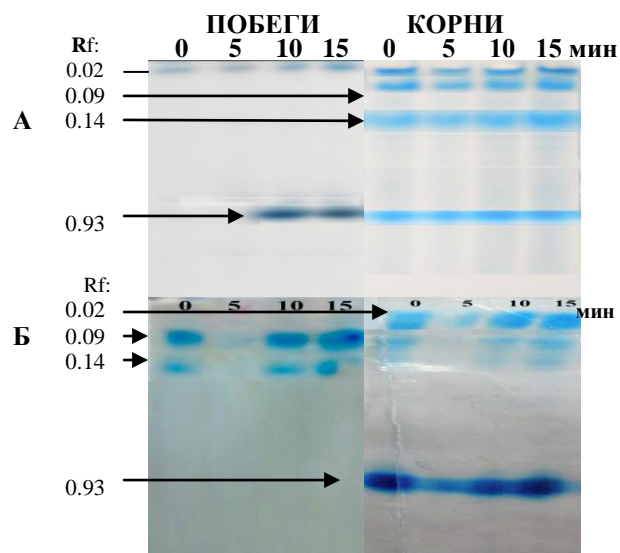


Рис. 4 Электрофореграммы изопероксидаз апопласт-омывающего раствора (А) и цитоплазматической фракции (Б), полученных из побегов и корней опытных проростков пшеницы.

проявления на ПО активность в реакции с бензидином (рис. 4), в наших исследованиях было выявлено: в корнях проростков пшеницы (в цитозоле и

АОР) присутствие 4 изопероксидаз (Rf 0.02; 0.09; 0.14; 0.93); в побегах этиолированных проростков (АОР) зафиксирована одна изоформа ПО с Rf 0.02 и две - в составе цитоплазматической фракции. В процессе светового воздействия зафиксировано появление дополнительной белковой зоны (Rf 0.93) в апопласте побегов (рис. 4) и избирательные изменения активности существующих изоформ ПО в реакциях с про-/антиоксидантными субстратами (рис. 5, 6). В частности, в побегах, как в апопластном (изоформа с Rf 0.02), так и в цитоплазматическом компартменте (изоформ с Rf 0.09, 0.14) свет вызывал повышение активности ПО с большинством прооксидантных субстратов, т.е. для надземных органов проростков пшеницы выявлена преимущественная активация оксидазной функции ПО. При этом изменения антиоксидантной активности ПО было отмечено только для изоформ с Rf 0.09 и 0.14 в реакции с аскорбатом в составе цитоплазматической фракции. Таким образом, проведенный анализ изменения активности отдельных изопероксидаз в апопластном и цитозольном компартментах опытных проростков пшеницы, подтвердил ранее сделанный вывод о сдвиге равновесия пероксидазной ферментной системы побегов (при смене светового режима) в сторону прооксидантной активности.

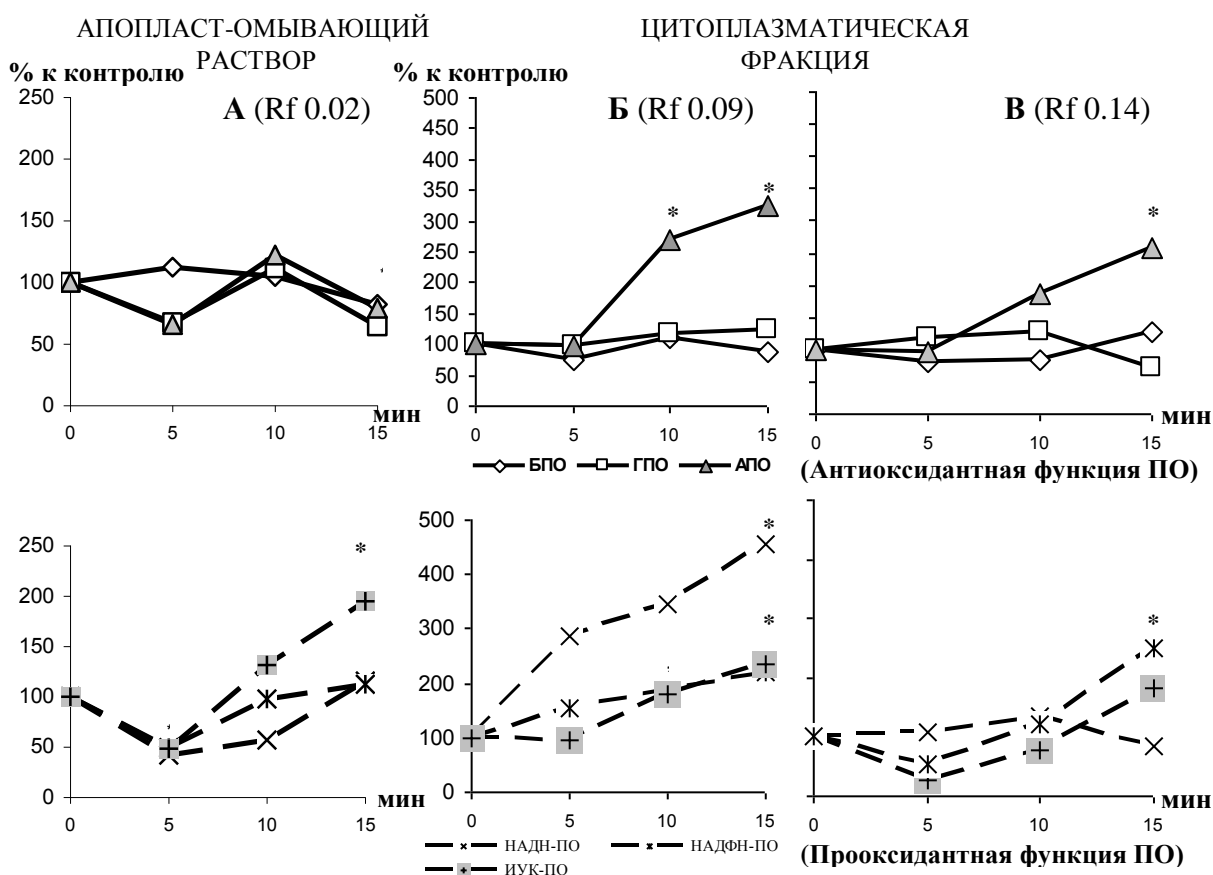


Рис. 5 Изменение антиоксидантной и прооксидантной активности изопероксидазы с Rf 0.02 (А) апопласт-омывающего раствора и изопероксидазы с Rf 0.09 (Б); 0.14 (В) цитоплазматической фракции побегов проростков пшеницы при смене светового режима.

В корнях, из всех выявленных изоформ ПО (рис. 4), свет в большей мере

модифицировал активность изопероксидаз с R_f 0.09; 0.14 апопластного и изоформ с R_f 0.02; 0.09 цитозольного компартмента (рис. 6). Так, в апопласте свет индуцировал статистически значимое повышение антиоксидантной

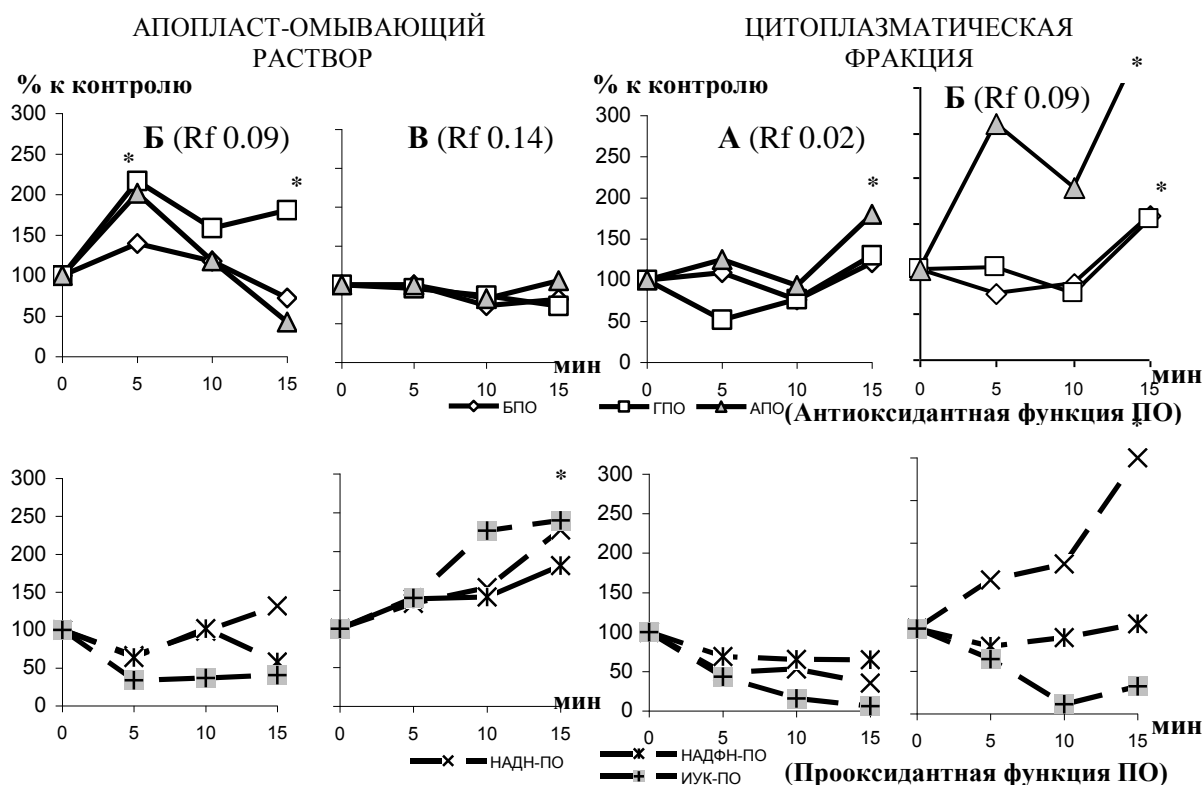


Рис. 6 Изменение антиоксидантной и прооксидантной активности изопероксидазы с R_f 0.09 (Б); 0.14 (В) апопласт-омывающего раствора и изопероксидазы с R_f 0.02 (А); 0.09 (Б) цитоплазматической фракции корней проростков пшеницы при смене светового режима

активности ПО в реакции с гваяколом (изопероксидаза с R_f 0.09) и прооксидантную - в реакции с НАДН и ИУК (изоформа с R_f 0.14). В цитоплазматическом компартменте корней проростков пшеницы эффект света реализовался в разнонаправленной модификации активности изопероксидаз с R_f 0.02; 0.09: свет стимулировал активность пероксидазы с антиоксидантными и снижал с прооксидантными субстратами (кроме активности изоформы ПО с R_f 0.09 в реакции с НАДН). Следовательно, в корнях за счёт скоординированных изменений про- и антиоксидантной активности отдельных изоформ в апопластном и цитозольном компартментах сохранялся баланс оксидазно-пероксидазных реакций.

Изоформы ПО, для которых преимущественно были выявлены изменения ферментативной активности, подвергнуты дополнительным исследованиям, в частности осуществлена оценка уровня ГСБ данных изоформ и связанных с ними углеводных компонентов. Из литературы известно, что ковалентносвязанные с белком углеводные фрагменты пероксидаз влияют на их способность взаимодействовать с субклеточными структурами и представляют собой один из вариантов регулирования концентрации растворимых ГСБ (Рогожин, 2004). Кроме того, повышение степени гликозилирования ПО снижает до 85 % чувствительность данного

белка к протеолизу (Duarte-Vazquez et al., 2003). В наших экспериментах количественные исследования показали, что уровень ГСБ отдельных изоформ (Rf 0.02, 0.09, 0.14) в спектре ПО исследуемых фракций этиолированных проростков был различен (рис. 7). Через 15 минут после воздействия света, для большинства анализируемых изоформ ПО зафиксировано однонаправленное снижение количества белка изопероксидаз апопластного, цитоплазматического компартментов побегов и корней проростков пшеницы. Однако для изоформы с Rf 0.02 (корни,

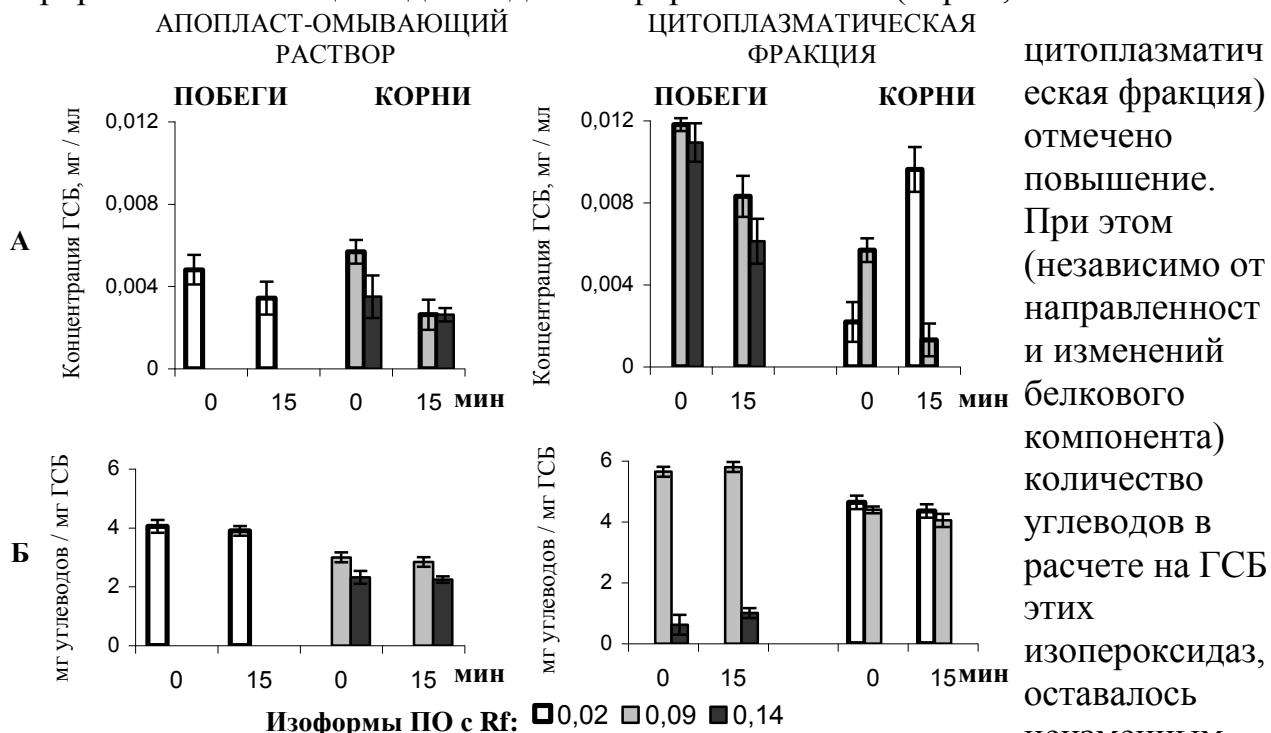


Рис. 7 Изменение уровня гемсодержащего белка (А) и углеводных компонентов (Б) отдельных изопероксидаз апопласт-омывающего раствора, цитоплазматической фракции, экстрагированных из побегов и корней этиолированных и экспонированных на свету проростков пшеницы.

цитоплазматическая фракция) отмечено повышение. При этом (независимо от направленности и изменений белкового компонента) количество углеводов в расчете на ГСБ этих изопероксидаз, оставалось неизменным. Следовательно, при смене светового режима,

зафиксированные изменения как уровня гликозилирования, так и уровня ГСБ анализируемых изоформ ПО апопластного и цитоплазматического компартмента опытных проростков были однонаправленными. Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что в механизме регуляции пула растворимых изопероксидаз, в условиях смены светового режима, определенное значение имело перераспределение в системе ионсвязанные - растворимые белки. По мнению И.А. Грасковой и др (2004), Ф.В. Минибаевой (2005), в ходе ранних реакций при стрессе (авторы исследовали патогенный, раневой стресс) происходит высвобождение локализованных в плазмалемме, клеточной стенке экстраклеточных ПО, что связано, в частности, с изменением микровязкости поверхностного заряда плазмалеммы.

2. Активность супероксиддисмутазы и каталазы опытных проростков

Побеги и корни этиолированных проростков специфически отличаются не только по пероксидазной активности, но и по уровню активности СОД, КАТ в исследуемых фракциях (рис. 8). Наибольшая активность этих ферментов характерна для надземных органов. Кратковременное действие света на этиолированные проростки индуцировало во внутриклеточном

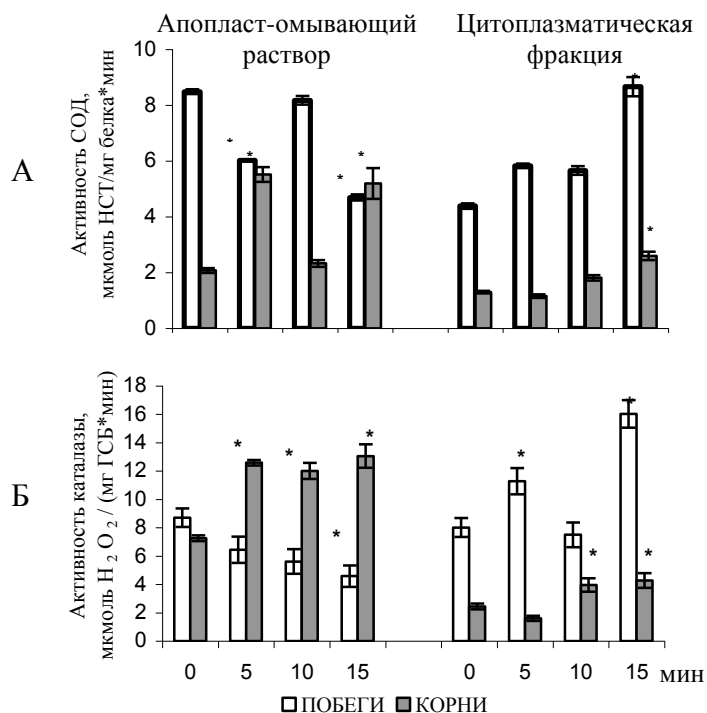


Рис. 8 Изменение активности супероксиддисмутазы (А) и каталазы (Б) в апопласт-омывающем растворе и цитоплазматической фракции, полученных из побегов и корней этиолированных и экспонированных на свету проростков пшеницы.

продукции $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 (Тарчевский и др., 1999; Тарчевский, 2000). Пероксидазная ферментная система способна, в отличие от СОД и КАТ, не только к детоксикации этих метаболитов, но и к их генерации и, как следствие, может осуществлять более тонкую регуляцию АФК в клетках растений (Kawano, 2003; Рогожин, 2004; Passardi et al., 2005; Газарян и др., 2006).

3. Изменение уровня АФК и низкомолекулярных антиоксидантов в проростках пшеницы при смене светового режима

На рис. 9 представлены результаты, отражающие изменения уровня АФК во внутри- и внеклеточном компартментах исследуемых проростков пшеницы в ответ на смену светового режима. В АОР надземных органов было отмечено статистически значимое (при 15 мин экспонировании на свету) увеличение уровня $O_2^{\cdot-}$, в корнях – снижение; уровень R-ООН в обоих органах (5-15 мин экспонирование на свету) плавно повышался. В цитоплазматической фракции через 15 мин после смены светового режима было зафиксировано повышение гидропероксидных группировок у

компартменте побегов и корней однонаправленное статистически значимое повышение активности СОД и КАТ. В апопластном компартменте зафиксированы колебательные изменения активности СОД; однако, в ходе 15 минутного экспонирования, свет стимулировал активность в корнях и уменьшал в надземных органах опытных проростков. В этих условиях уровень активности КАТ увеличивался в корнях; в побегах было отмечено плавное снижение. Известно, что изменение активности СОД и КАТ в клетках растений зависит от кислородных метаболитов, в частности от

надземных органов, в клетках корней их концентрация оставалась близкой к контрольным значениям. Таким образом, свет, оказывая непосредственное влияние на надземные органы проростков, индуцировал накопление R-ООН во внутри- и внеклеточном компартментах побегов и O_2^- в апопласте, т.е. реакцию фотоокислительного взрыва. Для более подробной характеристики окислительно-восстановительного баланса в растительных клетках исследуемых органов проростков пшеницы была проведена количественная оценка низкомолекулярных водорастворимых антиоксидантов.

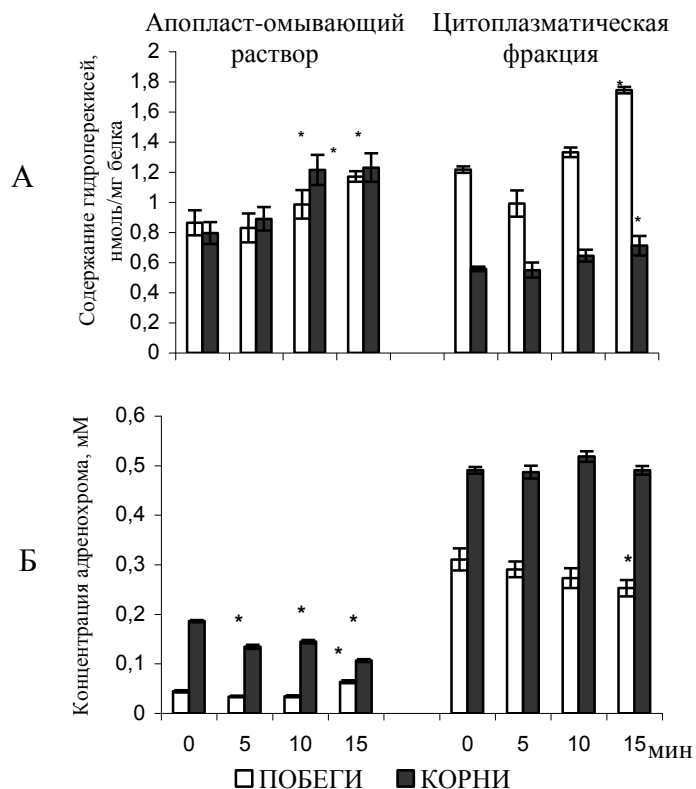


Рис. 9 Динамика уровня гидропероксидных группировок (А) и супероксид-анион-радикала (Б) в апопласт-омывающем растворе и цитоплазматической фракции, выделенных из побегов и корней в процессе экспонирования проростков пшеницы на свету. антиоксидантов; через 15 мин, на фоне сниженной антиоксидантной активности побегов, в корнях зафиксировано статистически значимое светозависимое повышение уровня данных соединений по сравнению с контролем.

Таким образом, удалось показать, что корни проростков пшеницы

Известно, что сумма антиоксидантов создает буферную систему, обладающую определенной емкостью, при этом изменение содержания одного из индивидуальных биоантиоксидантов может привести к изменению всей системы. В частности было выявлено, что повышенный пул антиоксидантов в апопластном растворе характерен для корней, цитоплазматической фракции – для побегов проростков пшеницы (рис. 10). Быстрая смена светового режима в апопластном компартменте корней и в надземных органах (обе фракции) через 5-10 мин после воздействия вызывала снижение уровня

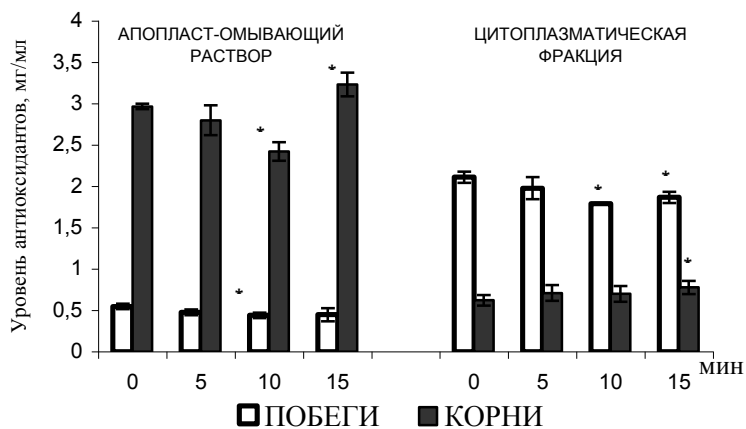


Рис. 10 Влияние света на содержание антиоксидантов апопласт-омывающего раствора и цитоплазматической фракции побегов и корней опытных проростков пшеницы.

обладают более эффективной системой низкомолекулярной антиоксидантной защиты. Инициация накопления АФК в побегах при смене светового режима не была скомпенсирована соответствующими изменениями уровня антиоксидантной активности. В этой связи, можно сделать вывод, что в побегах при быстрой смене светового режима имело место развитие окислительного стресса; ответ корней в условиях наших экспериментов, по-видимому, не может быть отнесен к стрессорному.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют в пользу неспецифического ответа со стороны растительной клетки на смену светового режима. Такой ответ заключается в довольно быстрой светозависимой модификации активности пероксидазной ферментной системы, т.е. ее оксидазно-пероксидазных реакций, что, по-видимому, является одной из причин развития в надземных органах проростков пшеницы окислительного взрыва. Как показывают результаты корреляционного анализа, выявленное накопление во внутри- и внеклеточном компартментах побегов R-ООН (рис. 9), преимущественно связано со снижением ПО активности в реакциях с бензидином, гваяколом (статистически значимый коэффициент корреляции (при $p \leq 0.05$) равен -0.86 , -0.95), и одновременным нарастанием прооксидантной активности ПО в реакциях с НАД(Ф)Н, ИУК: в апопласте r 0.60 и 0.88 ; в цитоплазматическом компартменте -0.93 , 0.94 . Накопление $O_2^{\cdot-}$ в апопласте побегов отмечено за счет увеличения активности ПО в реакциях с НАД(Ф)Н, ИУК (r от 0.88 до 0.97) и снижения активности СОД (рис. 8); в цитоплазматическом компартменте уровень супероксидного анион-радикала снижался вследствие активной дисмутации $O_2^{\cdot-}$ в H_2O_2 и активации оксидазных реакций ПО, способствуя тем самым интенсивной наработке R-ООН. Таким образом, в побегах при смене светового режима происходит смещение прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону прооксидантного - следовательно, в побегах свет инициирует развитие окислительного стресса, что подтверждается также быстрым снижением суммы низкомолекулярных антиоксидантов (коэффициент корреляции уровня антиоксидантов с гидропероксидными группировками в апопласте составил -0.72 , в цитозольном компартменте -0.73). Однако, в сравнении с апопластным, в цитоплазматическом компартменте надземных органов опытных проростков, по-видимому, развивается более мягкий окислительный стресс за счет сдерживания избыточного увеличения АФК повышением активности СОД-КАТ. В корнях выявлена скоординированность реакций между:

- оксидазно/пероксидазной функцией ПО;
- уровнем гидропероксидных группировок/низкомолекулярных антиоксидантов;
- активностью СОД/КАТ.

Следовательно, при смене светового режима, в корнях проростков пшеницы,

по-видимому, не происходит нарушения прооксидантно-антиоксидантного равновесия, то есть, в наших экспериментальных условиях, в корнях (в отличие от побегов) не развивается стресс – реакция.

В процессе деэтиоляции проростков пшеницы, скорее всего, происходят изменения в системе ионсвязанные-растворимые ГСБ. Свет, индуцируя специфические модификации содержания и/или активности отдельных изопероксидаз, может направленно изменять функционирование пероксидазной ферментной системы во внутри- и внеклеточном компартментах опытных проростков пшеницы и осуществлять, таким образом, светоконтролируемую регуляцию окислительно-восстановительных реакций.

ВЫВОДЫ

1. Выявлено, что свет оказывает влияние на уровень гемсодержащих белков, индуцируя снижение в апопластном, цитоплазматическом компартментах побегов и увеличение в корнях проростков пшеницы.

2. Анализ изоферментного спектра растворимой пероксидазы проростков пшеницы выявил:

- в корнях (апопластный, цитозольный компартмент) четыре изоформы;
- в побегах (апопласт) – одну в этиолированных и две в деэтиолированных проростках; в цитозольном компартменте - две изоформы пероксидазы.

При смене светового режима происходило изменение про-/антиоксидантной активности пероксидазы:

- в корнях свет индуцировал равнозначные изменения оксидазной и пероксидазной активности (в апопласте за счет изопероксидаз с R_f 0.09 и 0.14; в цитозоле - изоформы с R_f 0.02, 0.09);
- в побегах, свет стимулировал прооксидантную активность пероксидазы (в апопласте вследствие изменения активности изоформы с R_f 0.02; в цитозоле - активности изопероксидаз с R_f 0.09 и 0.14).

3. Обнаружена сопряженность светозависимых изменений количества гемсодержащего белка и углеводного компонента у ряда изопероксидаз (R_f 0.02, 0.09, 0.14), что предполагает участие света в регуляции перехода растворимые - ионсвязанные белки.

4. На фоне светозависимой модификации активности изопероксидаз в опытных проростках выявлены неоднозначные изменения активности супероксиддисмутазы и каталазы: в апопласте побегов зафиксировано снижение, в цитоплазматическом компартменте и в корнях - стимуляция активности данных ферментов. Предполагается, что светозависимая регуляция супероксиддисмутазы, каталазы, скорее всего, связана с опережающими изменениями активности пероксидазной ферментной системы и, соответственно, уровня АФК, модулирующих активность этих ферментов.

5. Показано, что в побегах проростков пшеницы при смене светового режима происходит интенсификация окислительных процессов, о чем свидетельствует накопление АФК (в цитозоле R-ООН, в апопласте R-ООН и $O_2^{\cdot-}$) и снижение количества низкомолекулярных антиоксидантов, то есть индуцируется фотоокислительный стресс. Особенностью корней на ранних стадиях онтогенеза проростков, по-видимому, является их повышенная устойчивость; в ответ на смену светового режима в данных органах не было зафиксировано смещения прооксидантно-антиоксидантного равновесия.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Олюнина Л.Н., Томилин М.В., Веселов А.П. Динамика активности пероксидазы на ранних стадиях онтогенеза зелёных и этиолированных проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И.Лобачевского. 2009. №4. С. 86-90
2. Томилин М.В., Олюнина Л.Н., Веселов А.П. Изменение активности пероксидаз апопласта проростков пшеницы в процессе дэйтиоляции // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И.Лобачевского. 2010. № 2 (2). С. 596-601
3. Томилин М.В., Олюнина Л.Н., Сухов В.С., Брилкина А.А., Веселов А.П. Изменение активности пероксидаз и генерации супероксидного радикала, пероксида водорода в апопластном компартменте проростков пшеницы в процессе дэйтиоляции // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. 2011. Т. 7. №. 1. С. 21-27

Статьи, доклады, тезисы докладов региональных и международных конференций:

4. Олюнина Л.Н., Томилин М.В., Веселов А.П. Влияние света на активность, изоферментные спектры пероксидазы и фенолоксидазы в проростках яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. // Известия Иркутского государственного университета» серия «Биология. Экология». 2008. №1. С. 73-78
5. Томилин М.В. Светозависимая регуляция активности пероксидазы в побегах проростков пшеницы // XVI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых; секция «Биология»; 13-18 апреля 2009 г.; Москва, МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет: Тезисы докладов. М.: МАКС Пресс, 2009. С. 240-241
6. Томилин М.В. Олюнина Л.Н., Веселов А.П. Модифицирующее действие света на активность пероксидазы в побегах проростков пшеницы // Тезисы докладов 13-й международной пушинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века»; 28 сентября-2 октября 2009г. -Пушино, 2009. С. 249
7. Томилин М.В. Модификация пероксидазной активности в процессе дэйтиоляции проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. // XVII

Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых; секция «Биология»; 12-15 апреля 2010 г.; Москва, МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет: Тезисы докладов. М.: МАКС Пресс, 2010. С. 262-263

8. **Томили** **М.В.**, Синёва И.В. Влияние света на изоферментный спектр пероксидазы проростков пшеницы // Тезисы докладов 14-й международной пушинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века»; 19-23 апреля 2010г. - Пушкино, 2010. С. 341-342

9. **Томили** **М.В.** Олюнина Л.Н. Баланс про-/антиоксидантной активности пероксидазы в зелёных и этиолированных проростках пшеницы // Материалы III Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010» 24-29 мая 2010г., Н.Новгород, ННГУ, 2010. С. 78

10. **Томили** **М.В.**, Олюнина Л.Н., Веселов А.П. Участие пероксидаз апопласта в модификации уровня про-/антиоксидантов проростков пшеницы в процессе дэтиоляции // Тезисы докладов всероссийского симпозиума «Растение и стресс» 9-12 ноября 2010 г., Москва, 2010. С. 423-424

11. **Томили** **М.В.**, Олюнина Л.Н., Веселов А.П. Изменение активности пероксидаз проростков пшеницы в процессе дэтиоляции // Материалы всероссийской научной конференции «Актуальные проблемы науки и образования» 29 октября 2010г., Чебоксары: ЧГПУ, 2010. С. 232-236

12. **Tomilin M.V.**, Olyunina L.N., Veselov A.P. Light dependent changes in peroxidase activity and peroxide hydrogen generation in the wheat seedlings // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. 2011. V. 7. N. 1. P. 5-12

13. **Томили** **М.В.**, Олюнина Л.Н. Светозависимая модификация активности ферментов антиоксидантной защиты проростков пшеницы // Тезисы докладов VII съезда общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий»; 4-10 июля 2011г. – Н.Новгород, 2011, Часть II. С. 701-702

Список принятых сокращений

АОР – апопласт-омывающий раствор
ПО - пероксидаза
ГСБ – гемсодержащие белки
АФК – активные формы кислорода
ИУК – индолил-3-уксусная кислота
СОД – супероксиддисмутаза
КАТ – каталаза
БПО – пероксидаза в реакциях с бензидином
ГПО – пероксидаза в реакциях с гваяколом

АПО – пероксидаза в реакциях с аскорбатом
НАД(Ф)Н-ПО - пероксидаза в реакциях с НАД(Ф)Н
ИУК-ПО - пероксидаза в реакциях с ИУК
ПААГ – полиакриламидный гель
Rf – электрофоретическая подвижность
r – коэффициент корреляции