

УДК 581.1

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗ АПОПЛАСТА ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ В ПРОЦЕССЕ ДЕЭТИОЛЯЦИИ

© 2010 г.

М.В. Томилин, Л.Н. Олюнина, А.П. Веселов

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

Aleksandrova@bio.unn.ru

Поступила в редакцию 01.04.2010

Определены активности бензидин- и НАДН-пероксидаз в апопласте у 5–6-дневных проростков пшеницы. Обнаружены светозависимые изменения активности фермента, обусловленные модификацией степени гликозилирования гемсодержащего белка. Выявлена органоспецифичность пероксидаз в апопласте проростков пшеницы. Предполагается, что для корней в большей мере преобладает оксидазная функция пероксидазы (прооксидантная), а для побегов проростков пшеницы – пероксидазная (антиоксидантная функция).

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., пероксидаза, свет, регуляция.

Введение

Известно, что в течение жизни растения проходят путь от этиолированного проростка с гетеротрофным питанием и специфическими физиологическими, анатомо-морфологическими и биохимическими свойствами до фотосинтезирующего организма, метаболизм которого целиком определяется световыми условиями. При переходе растений из условий темноты и выносе наземных органов проростка на свет происходит также перестройка внутриклеточных ферментных систем, множество из которых светозависимы.

Пероксидаза (КФ 1.11.1.7) – гемосодержащий гликопротеин – гистохимически выявлена в различных компартментах клетки в виде растворимой фракции и в форме, связанной как с клеточной стенкой, так и с мембранами [1–3]. Отличительной чертой всех пероксидаз (ПО) является их полифункциональность в различных биохимических реакциях, а именно в реакциях оксидазного, пероксидазного и оксигеназного окисления субстратов, что позволяет предполагать активное участие их в контроле уровня активных форм кислорода и, как следствие, процессов роста, механизмов формирования реакций растений на действие экологических факторов, один из которых – свет [1, 2].

Цель настоящей работы – выявление влияния света на некоторые биохимические свойства пероксидазы, изолированной из апопласта побегов и корней проростков пшеницы.

Экспериментальная часть

Растительный материал. Опытными объектами служили этиолированные (выращенные в

темноте) проростки яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта «Московская 35» (водная культура). Проростки в возрасте 5–6 дней переносили под люминесцентные лампы (светосила 10 000 Люкс), расположенные на расстоянии 20 см от проростков; время экспонирования варьировали от 0 до 60 мин.

Экстракция и определение гемсодержащего белка (ГСБ) в апопласт-омывающем растворе (АОР). Для экстракции внеклеточных пероксидаз навеску (1 г тканей побегов или корней исследуемых проростков) помещали в шприц, заливали 3 мл свежеприготовленной дистиллированной воды и дважды по 1 мин подвергали вакуумной фильтрации. Период релаксации составлял 2 мин [4]. В соответствии с активностью глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы в АОР, содержание данного фермента в АОР к цитоплазматическому составило меньше 1% [5]. Концентрирование пероксидазного белка осуществляли высаливанием $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (70–95%-ного насыщения). Определение концентрации ГСБ проводили спектрофотометрическим методом при 403 нм [6] и по пиридингемохромогену [7] (со спектральным показателем чистоты $\text{RZ} = 0.6$).

Определение активности бензидин пероксидазы (БПО) и специфической НАДН-пероксидазы. Определение активности БПО в АОР побегов и корней проростков пшеницы проводили спектрофотометрически [8]. Нарастание оптической плотности определяли при 590 нм через 20 с – в момент линейного протекания реакции. Состав реакционной смеси: 2 мл 0.2 М ацетатного буфера (pH 5.4), 0.25 мл 0.015% H_2O_2 и

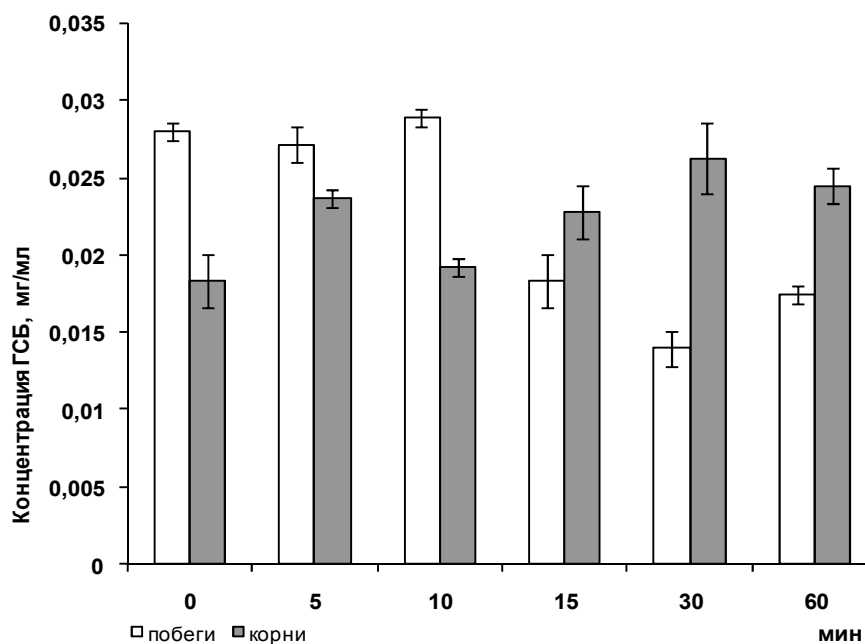


Рис. 1. Изменение уровня гемсодержащего белка в АОР побегов и корней проростков пшеницы в процессе деэтиоляции

0.25 мл (5 мМ) 4,4'-диаминодифенила ($\epsilon_{590} = 39 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$). НАДН-ПО активность в АОР исследуемых органов проростков регистрировали по уменьшению поглощения при 340 нм. В кювету вносили 0.5 мл АОР, 1 мл 0.2 М ацетатного буфера (pH 5.4), 0.5 мл 16 мМ MnCl_2 , 0.5 мл 1.6 мМ о-кумаровой кислоты и 0.5 мл 0.3 мМ НАДН ($\epsilon_{340} = 4.23 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$) [9]. Активность фермента выражали в ммоль субстрата/мг ГСБ \times 1 мин.

Кинетический анализ активности БПО. Кинетический анализ ПО в АОР проводили при постоянной температуре (25°C) и pH (5.4). В качестве субстрата использовали раствор 4,4'-диаминодифенила (1, 2, 4, 5, 6, 8 мМ). Кинетические параметры (K_m , V_m) ПО в АОР побегов и корней проростков пшеницы определяли графическим методом через обратные величины, исходя из уравнения Лайнуивера – Берка. Концентрацию [ES] рассчитывали при высоких концентрациях субстрата из соотношения: $V[E_0] = V_m[ES]$ [10].

Определение степени гликозилирования ГСБ апопласта. Для определения степени гликозилирования проводили частичный химический гидролиз белка в 3 н. HCl в течение 7 ч при постоянной температуре (90°C) [11]. Углеводный компонент регистрировали спектрофотометрически при 490 нм по реакции с 4,4'-диаминодифенилом (5 мМ) [12].

Все опыты проводили в трёх биологических повторностях. На рисунках представлены средние арифметические значения и их среднеквадратичные отклонения.

Результаты и их обсуждение

В наших исследованиях кратковременное действие света (5–60 мин) на этиолированные проростки индуцировало изменения уровня ГСБ в апопласте побегов и корней (рис. 1). Уже через 5 мин после воздействия свет обратимо повышал уровень белка в АОР корней, и через 15 мин уменьшал содержание ГСБ в апопласте наземных органов опытных проростков. Накопление (в корнях) или уменьшение (в побегах проростков пшеницы) ГСБ, в процессе деэтиоляции в большей степени было выражено при 30-минутном экспонировании проростков на свету (в 1.5–2 раза). Таким образом, свет, оказывая влияние на содержание ГСБ в апопласте, приводил к перераспределению пероксидазного белка во внеклеточном пространстве; то есть в клетке, вероятно, происходили модификации процессов экзо- и эндоцитоза низкомолекулярных белков.

Поскольку фермент пероксидаза – это гемсодержащий гликопротеин, имеющий ковалентно связанные с белком углеводные фрагменты, которые повышают способность пероксидаз связываться с углеводными компонентами клеток [13], такое взаимодействие может представлять собой один из вариантов регулирования пула ГСБ апопласта деэтиолированных проростков.

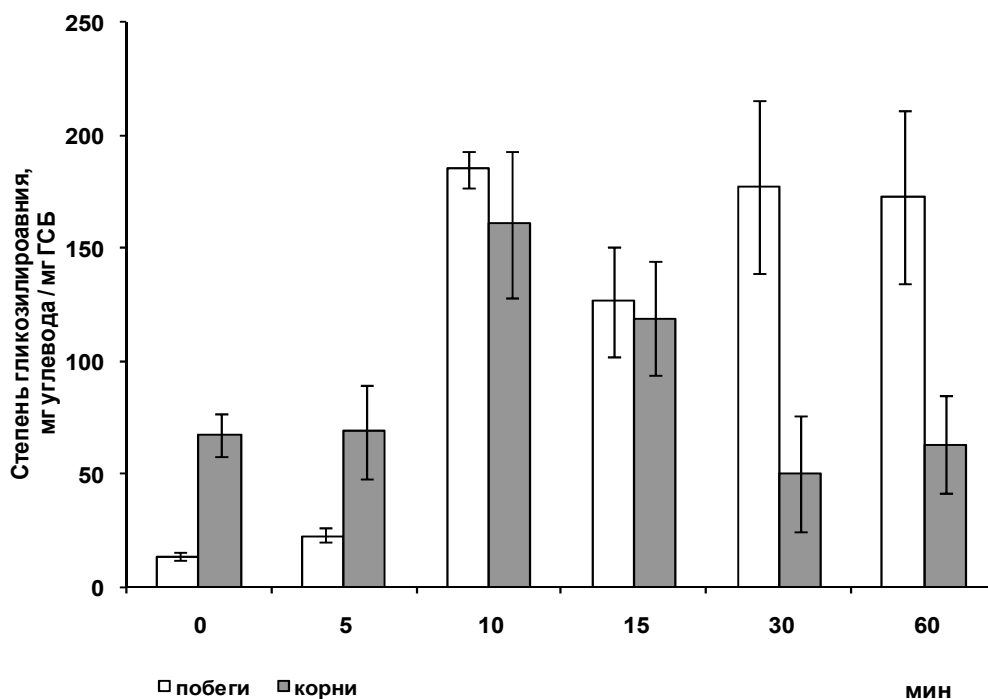


Рис. 2. Изменение степени гликозилирования гемсодержащего белка в АОР побегов и корней проростков пшеницы в процессе деэтиоляции

Как видно из рис. 2, свет кратковременно (0–10 мин) однонаправленно (в АОР побегов и корней проростков) повышал степень гликозилирования ГСБ. Максимальное светоиндуцированное накопление углеводной части у ГСБ было при 10 мин воздействия: в АОР побегов в 13.4 раза, в апопласте корней – соответственно в 2.4 раза. При увеличении экспозиции (15–60 мин) были также отмечены светозависимые изменения степени гликозилирования ГСБ в АОР у исследуемых органов проростков пшеницы. Интересно отметить, на уровне тенденции, что модификации степени гликозилирования белка при 15–60 мин воздействии света обратнo соотносилась с изменением уровня ГСБ – снижением в корнях и повышением в побегах проростков пшеницы. Таким образом, быстрая реакция растений на свет в апопласте была выражена повышением углеводного компонента ГСБ, что, вероятно, увеличивало стабильность пероксидаз апопласта проростков пшеницы под влиянием модифицирующего действия света.

На основе результатов изменения активности БПО и НАДН-ПО в АОР этиолированных проростков удалось установить, что для корней характерна повышенная НАДН-ПО, а для побегов – БПО-активность (рис. 3). Для корней, в сравнении с побегами, активность НАДН-ПО в 3.2 раза выше, а активность БПО в 1.5 раза меньше. Следовательно можно предположить, что динамика ответной реакции пероксидазной

системы проростков в процессе деэтиоляции будет сопровождаться разнонаправленным изменением активности фермента в исследуемых органах растения. Действительно, была показана светозависимая активация активности БПО в корнях и активности НАДН-ПО в побегах проростков пшеницы. Уже через 5 мин после воздействия света в АОР корней активность БПО возрастала в 2.2 раза (с максимумом при 60 мин), а в апопласте надземных органов повышение активности НАДН-ПО было в 25.5 раза. Кроме того, имело место и светозависимое снижение активности БПО в АОР побегов и активности НАДН-ПО апопласта корней проростков пшеницы. Отмеченное уменьшение ферментативной активности было максимальным в побегах при 60 мин воздействии в 1.3 раза, а в АОР корней в 6.3 раза при 15 мин воздействии света. Следовательно, выявляется органоспецифика пероксидазной системы проростков в норме и в условиях модифицирующего действия света. Поскольку расчёт активности ПО произведён на ГСБ, то полученные результаты однонаправленного действия света на изменения уровня ГСБ и активности ПО в апопласте свидетельствуют о происходящих химических модификациях в молекуле белка данного фермента.

Основной механизм ферментативной регуляции в клетке – это, прежде всего, генетический контроль (регуляция биосинтеза ферментов, их изоформ). В работах И.В. Максимова,

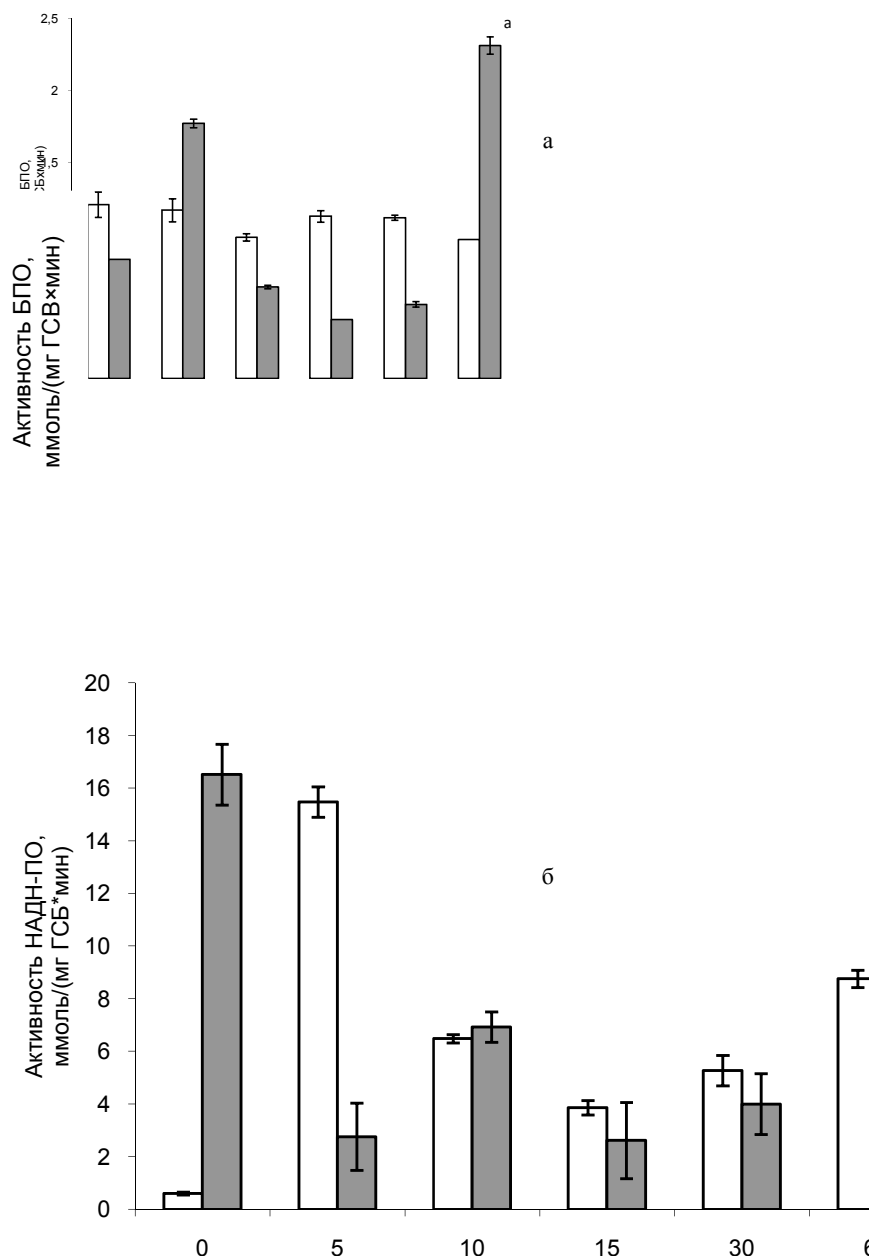


Рис. 3. Динамика активности БПО (а) и НАДН-ПО (б) в АОР побегов и корней проростков пшеницы в процессе деэтиоляции

Е.А. Черепановой [14] было показано, что генов, кодирующих ПО или близкие к ней по структуре белки, в растениях насчитывается не менее семидесяти, что обуславливает высокую гетерогенность пероксидаз в различных компартментах клетки. Другая регуляция ферментативной активности – аллостерическая регуляция, механизм которой позволит обеспечить более быструю регулировку метаболических процессов, чем изменение процессов биосинтеза ферментов [15].

Для более детального раскрытия особенностей светозависимой регуляции активности в

пероксидазной системе апопласта был проведён кинетический анализ ПО в АОР побегов и корней проростков пшеницы. Исходя из уравнения Лайнуивера – Берка, были рассчитаны кинетические параметры (K_m и V_m) БПО у исследуемых объектов. Свет снижал K_m БПО в апопласте побегов и тем самым повышал сродство фермента к 4,4'-диаминодифенилу при 5–15 мин (в 3.4 раза после 15 мин воздействия света, табл. 1). Кратковременная реакция корней (5–15 мин), в сравнении с побегами, была выражена всплеском K_m БПО, что говорит об органоспецифической особенности ПО. Однако

Таблица 1

**Изменение кинетических параметров пероксидазы (Km и Vm)
в АОР побегов и корней проростков пшеницы в процессе деэтиоляции**

Параметры	Органы	0	5	10	15
Km, мМ/с	Побеги	7.50	6.82	3.95	2.21
	Корни	17.39	40.00	100.00	160.00
Vm, мМ/с	Побеги	0.54	0.37	0.34	0.28
	Корни	1.89	3.33	3.04	0.48

Таблица 2

**Изменение концентрации фермент-субстратного комплекса в реакциях пероксидазного окисления
4,4'-диаминодифенила в АОР побегов и корней проростков пшеницы в процессе деэтиоляции**

Органы	0	5	10	15	30	60
Побеги	0.361807	0.307434	0.190827	0.176373	0.110538	0.057598
Корни	0.024052	0.033112	0.012726	0.090676	0.010777	0.077034

V_m БПО при вышеотмеченных временных точках экспонирования проростков на свету было снижено: для побегов в 1.5–2.0 раза, а для корней только при 15 мин воздействия (в 3.9 раза). Несоответствие между Km и Vm БПО в АОР побегов и корней проростков пшеницы дало основание рассчитать другой кинетический параметр – концентрацию фермент-субстратного комплекса ([ES]), образующегося в ходе реакции, которая позволяет выявить степень взаимодействия E и S. Показано (табл. 2), что свет вызывает на протяжении экспозиции в побегах и в корнях (только при 10 и 30 мин воздействия) проростков пшеницы снижение концентрации [ES]. В корнях было также зафиксировано активирующее действие света с максимумами при 15 и 60 мин. Суммируя полученные данные кинетического анализа, можно сделать вывод, что свет в побегах проростков пшеницы оказывал активирующее действие на скорость обратной реакции, а в корнях (кроме 10 и 30 мин экспозиционного времени) – на скорость прямой реакции.

Таким образом, в процессе деэтиоляции проростков свет, скорее всего, оказывал модифицирующее влияние на апофермент ПО (изменение степени гликозилирования), что инициировало молекулярно-структурные перестройки в молекуле фермента. Это, прежде всего, модификация полярности пероксидазного белка, что может вызвать изменение степени связывания фермента. Причем эти изменения были различными в апопласте побегов и корней проростков пшеницы. Обсуждается органоспецифичность пероксидаз апопласта проростков пшеницы. Предполагается, что для корней в

большей мере преобладает оксидазная функция пероксидазы (прооксидантная – НАДН-ПО), а для побегов проростков пшеницы – пероксидазная (антиоксидантная функция ПО). В процессе деэтиоляции проростков свет направленно смещает баланс про-/антиоксидантной активности фермента в пероксидазной системе наземных органов в сторону прооксидантной, в корнях проростков пшеницы – в сторону антиоксидантной активности ПО.

Поскольку реакция растений на свет опосредована через систему фоторецепторов, то их возбуждение может вызвать изменения в окислительно-восстановительном режиме, участником которого являются изопероксидазы; через цепь сигналов привести к сдвигу в балансе фитогормонов. Зависимость общей пероксидазной активности от присутствия индоллил-3-уксусной кислоты была продемонстрирована *in vitro* [16], а также показана в наших экспериментах *in vivo* [17]. Мы полагаем, что это один из возможных механизмов участия пероксидаз в адаптации растений к изменяющимся условиям внешней среды.

Список литературы

1. Андреева В.А. Фермент пероксидаза. М.: Наука, 1988. 127 с.
2. Савич И.М. Пероксидазы – стрессовые белки растений // Усп. совр. биол. 1989. Т. 107. С. 406–417.
3. Syros T., Yupsanis T., Zafiriadis H., Economou A. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. // Plant Physiol. 2004. V. 161. P. 69–77.
4. Паду Э.Х. Свойства пероксидазы и фенил-аммиак-лиазы при образовании и лигнификации клеточных стенок стебля пшеницы // Физиол. раст. 1995. Т. 42. № 3. С. 408–415.

5. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 1971. 352 с.
6. Ogawa S., Shira Y., Morishima I. Calcium binding by horseradish peroxidase C and the heme environmental structure // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1979. V. 90. № 2. P. 674-678.
7. Falk J.E. Porphyrins and Metalloporphyrins // Amsterdam – N.Y. – London: Elsevier, 1964. 236 p.
8. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. М.: Высшая школа, 1975. 327 с.
9. Fecht-Christoffers M.M., Führs H., Braun Hans-Peter, Horst W.J. The role of hydrogen peroxide-producing and hydrogen peroxide-consuming peroxidases in the leaf apoplast of cowpea in manganese tolerance // *Plant Physiol.* 2006. V. 140. P. 1451–1463.
10. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология. М.: Академия, 2005. 480 с.
11. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М.: Мир, 1976. 366 с.
12. Досон Р., Элиот Д., Элиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 544 с.
13. Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. СПб.: ГИОРД, 2004. 240 с.
14. Максимов И.В., Черепанова Е.А. Про-антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам // *Усп. совр. биол.* 2006. Т. 126. С. 250–261.
15. Коэн Ф. Регуляция ферментативной активности. М.: Мир, 1986. 144 с.
16. Рогожин В.В., Верхотуров В.В., Рогожина Т.В. Пероксидаза: строение и механизм действия. Иркутск: ИГТУ, 2004. 199 с.
17. Томилин М.В., Олюнина Л.Н. Влияние экзогенной ИУК на активность пероксидазы в проростках пшеницы // Материалы I междунауч. конф. студ., асп. и молодых ученых «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии». Донецк, 2009. Т. II. С. 317–318.

CHANGES IN APOPLASTIC PEROXIDASE ACTIVITY OF WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) SEEDLINGS DURING THE DE-ETIOLATION PROCESS

M.V. Tomilin, L.N. Olyunina, A.P. Veselov

Benzidine and NADH peroxidase (PO) apoplastic activity in five-six-day old wheat seedlings were studied. Light-dependent changes of enzyme activity caused by glycosylation level modification of heme proteins have been found. Peroxidase organo-specificity in the apoplast of wheat seedlings has been revealed. It is supposed that peroxidases have a predominantly oxidase function in roots (prooxidant function of NADH-PO) and a predominantly peroxidase function in seedlings (antioxidant function of benzidine-PO).

Keywords: *Triticum aestivum* L., peroxidase, light, regulation.