

## ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ РОСЛИН

УДК 581.1:582.683.2:58.032

### АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА, АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА И ТИОРЕДОКСИНА В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ *ARABIDOPSIS THALIANA* ПРИ РАЗВИТИИ ОСМОТИЧЕСКОГО И ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССОВ

© 2015 г. С. И. Жадько, Т. В. Воробьева, А. А. Сиваш

*Институт ботаники им. Н.Г. Холодного  
Национальной академии наук Украины  
(Киев, Украина)*

Исследовали содержание активных форм кислорода (АФК) и активность пероксиредоксина (ПР) и тиоредоксина (ТР) в культуре ткани *Arabidopsis thaliana* при развитии осмотического и оксидативного стрессов. Установлено, что при действии стрессоров происходило увеличение содержания АФК, за которым следовало увеличение активности ПР и ТР. Предполагается, что молекулы АФК, в частности  $H_2O_2$ , действуя в качестве вторичных мессенджеров, вызывают АФК-зависимое увеличение активности ПР и ТР. В исследуемой культуре ткани, растущей в темноте, такие процессы прежде всего могут происходить в митохондриях.

**Ключевые слова:** *Arabidopsis thaliana*, культура ткани, активные формы кислорода, пероксиредоксин, тиоредоксин, осмотический стресс, оксидативный стресс

Активные формы кислорода (АФК), в частности  $H_2O_2$ , могут выступать в качестве вторичных мессенджеров в механизме запуска ответной стресс-реакции растений при различных воздействиях (Moller, Sweetlove, 2010; Mittler et al., 2011; Drobot et al., 2013; Колупаев, Карпец, 2014). При этом АФК должны восприниматься/акцептироваться другими молекулами или специфическими рецепторами и этот редокс сигнал должен передаваться далее к соответствующим стресс-реализующим системам. Однако четких представлений о механизме акцепции и трансдукции АФК редокс сигналов еще нет (Колупаев и др., 2012; Колупаев, Карпец, 2014). Считается, что сигналы АФК могут восприниматься посредством различных редокс-чувствительных протеинов (Mittler et al., 2004; Колупаев, Карпец, 2014). Высказано предположение, что пероксиредоксины (ПР) и тиоредоксины (ТР) также могут выполнять функцию акцепторов и трансдукторов АФК

сигналов при стрессах (Dietz, 2008; Жадько, 2012).

ПР или тиоредоксиновые пероксидазы, присутствуют во многих компартментах клетки и участвуют в обезвреживании  $H_2O_2$  и органических пероксидов, поэтому ПР прежде всего являются антиоксидантными ферментами (Finkemeier et al., 2005; Dietz et al., 2006). Наряду с этим, ПР также принимают участие в формировании стрессовых редокс сигналов посредством использования  $H_2O_2$  и ТР (Dietz, 2008), затем этот сигнал передается соответствующим МАП-киназам (митоген-активированным протеинкиназам), сигнальным белкам или транскрипционным факторам (Mittler et al., 2004). Увеличение экспрессии генов, белков и активности ПР у растений происходит при различных воздействиях (Finkemeier et al., 2005; Жадько, 2014).

ТР – это протеины, которые имеют сульфгидрильные и дисульфидные группы, способные обратимо окисляться и восстанавливаться. Они так же как и ПР, выполняют антиоксидантную функцию (Santos, Rey, 2006; Couturier et al., 2013). Окисленные ТР восстанавли-

ваются в НАДФН-зависимых реакциях с участием тиоредоксинредуктаз (TRP). У растений выявлены цитозольные, митохондриальные и хлоропластные TR-TRP системы (Meyer et al., 2012). Как отмечалось выше, TR в комплексе с PR в присутствии  $H_2O_2$  также способны формировать редокс сигналы (Dietz, 2008). Увеличение активности TR и экспрессии генов, которые их кодируют, также происходит при различных стрессах (Laloi et al., 2004). Однако, роль PR и TR в акцепции и трансдукции АФК редокс сигналов при стрессах растений остается малоизученной.

Целью работы было изучение ранних изменений в содержании АФК и активности PR и TR в культуре ткани *Arabidopsis thaliana* при развитии осмотического и оксидативного стрессов.

## МЕТОДИКА

Исследовали 12-14 дневную каллусную культуру ткани *A. thaliana*, экотип Columbia, находящуюся в фазе стационарного роста, полученную из листьев растений. Культуру ткани выращивали на твердой агаризованной МС-среде в темноте при  $24^\circ\text{C}$ .

Осмотический и оксидативный стрессы создавали посредством помещения культуры ткани в 20% раствор полиэтиленгликоля с  $M_r$  6000 (ПЭГ) или в 30 мМ  $H_2O_2$  на 30, 90 и 180 мин соответственно. Затем определяли интенсивность спонтанной хемилюминесценции (СХЛ), активность PR, TR и содержание тиобарбитуровой кислоты активных продуктов (ТБКАП).

Для получения супернатанта культуру ткани гомогенизировали в охлажденных ступках с раствором, содержащим 50 мМ  $Na_2HPO_4/KH_2PO_4$  (рН 7,0), 0,8% тритон X-100 и 1% PVP. Затем гомогенат центрифуговали при 17000 g в течение 17 мин и в полученном супернатанте сразу определяли активность PR, TR и содержание ТБКАП. Все действия проводили на холоде при температуре  $+4^\circ\text{C}$ .

СХЛ определяли на основании методики, описанной ранее (Жадько, 2012). Для этого культуру ткани помещали в кювету и специальную камеру хемилюминометра ХЛМЦ-01. Через 10 мин, после так называемого «эффекта высвечивания» в темноте, определяли интенсивность СХЛ. Интенсивность свечения соответствовала содержанию АФК в исследуемой нативной культуре ткани. Интенсивность СХЛ выражали в имп./с/г ткани.

Активность PR определяли по окислению НАДФН. Реакционная смесь содержала 200 мкМ НАДФН, 3 мкМ TR, 1,5 мкМ TR редуктазы, 1 мМ ЭДТА в 50 мМ HEPES-NaOH буфере (рН 7,0). Реакцию запускали добавлением  $H_2O_2$  или супернатанта и окисление НАДФН определяли спектрофотометрически при 340 нм (Жадько, 2014).

Активность TR определяли при помощи микрометода, основанного на восстановлении инсулина с некоторой модификацией (Kumar, Holmgren, 1999; Жадько, 2014). Реакционная смесь содержала 0,26 М HEPES (рН 7,6), 10 мМ ЭДТА, 2 мМ НАДФН, 1 мМ инсулина и 100 нМ тиоредоксинредуктазы, 100 мкл супернатанта или буфера. Реакцию запускали добавлением супернатанта. После инкубации при  $37^\circ\text{C}$  в течение 20 мин реакцию останавливали добавлением смеси 0,5 мл 6 М гуанидин-HCl, 0,2 М Tris-HCl, рН 8,0 и 1 мМ DTNB и измеряли оптическую плотность при 412 нм.

Содержание ТБКАП как показателя уровня перекисного окисления липидов и развития оксидативной деструкции определяли спектрофотометрически при 532 нм и выражали в нмоль/г ткани (Zhang, Kirkham, 1996).

Содержание белка определяли по методу Bradford (1976).

Эксперименты повторяли независимо 3-5 раз. Полученные данные обрабатывали статистически. На рисунках приведены средние значения и их стандартные отклонения. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Полученные данные обрабатывали при помощи программы «Microsoft Excel». Обсуждаются изменения, достоверные при  $P \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При действии ПЭГ в культуре ткани к 30 мин происходило достоверное увеличение интенсивности СХЛ с сохранением приблизительно одинакового уровня до 180 мин (рис. 1. А). Аналогичные, но более выраженные изменения в свечении происходили и при действии  $H_2O_2$  (рис 1, Б). В то же время достоверное увеличение активности PR и TR при стрессах происходило только к 90-180 мин (рис. 2, 3). При этом значительных изменений в содержании ТБКАП не было выявлено (рис. 4).

Полученные данные показывают, что в культуре ткани *A. thaliana* при развитии осмотического и оксидативного стресса вначале происходит увеличение содержания АФК за которым следует рост активности PR и TR. При этом значительных изменений в содержании

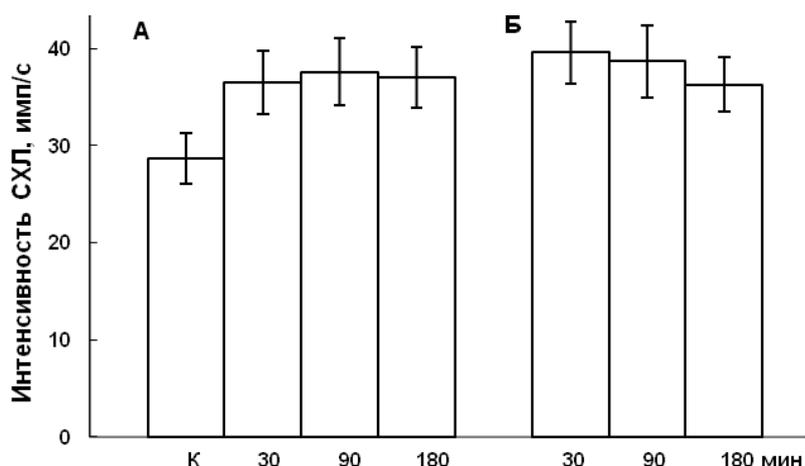


Рис. 1. Интенсивность СХЛ культуры ткани *A. thaliana* при действии ПЭГ (А) и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Б). Здесь и на рис. 2-4: К – контроль.

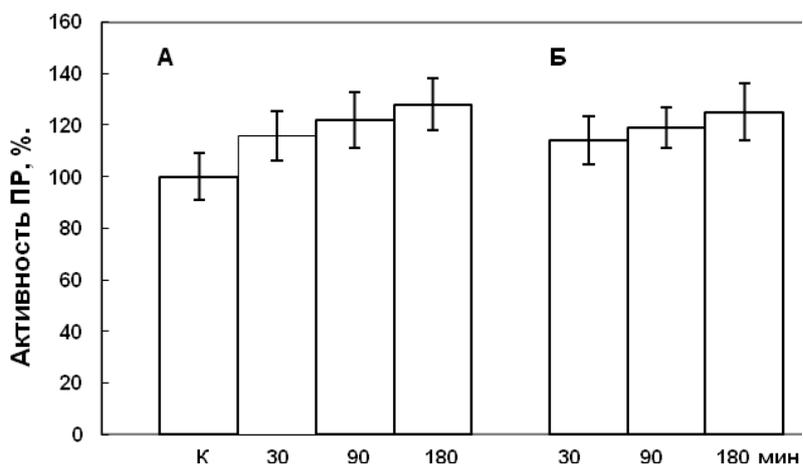


Рис. 2. Изменение активности ПР (% к контролю) в культуре ткани *A. thaliana* при действии ПЭГ (А) и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Б).

ТБКАП в этот период не было выявлено (рис. 1-4).

Зарегистрированное раннее увеличение содержания АФК соответствует так называемой «стрессорной оксидативной вспышке» у растений при различных экстремальных воздействиях. При этом АФК в качестве вторичных мессенджеров могут запускать ответную стресс-реакцию, направленную, прежде всего, на повышение антиоксидантной активности клеток и блокирование дальнейшего чрезмерного накопления АФК (Жадыко, 2012; Suzuki et al., 2012; Колупаев, Карпец, 2014).

Считается, что наиболее вероятными сигнальными молекулами АФК является молекулы H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, так как их образование и разруше-

ние находится под контролем соответствующих ферментов. Основными ферментами генерации АФК у растений являются НАДФН-оксидаза, пероксидазы и оксалатоксидаза (Колупаев и др., 2012).

АФК могут восприниматься/акцептироваться различными редокс-чувствительными сенсорами. Предполагается, что существуют следующие механизмы восприятия: с помощью АФК-рецепторов; редокс-чувствительных транскрипционных факторов; фосфатаз; двухкомпонентных гистидинкиназ; АФК-чувствительных протеинкиназ и редоксрегулируемых ионных каналов (Mittler et al., 2004; Колупаев, Карпец, 2014). Однако механизмы восприятия АФК еще мало изучены. При этом

## АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА

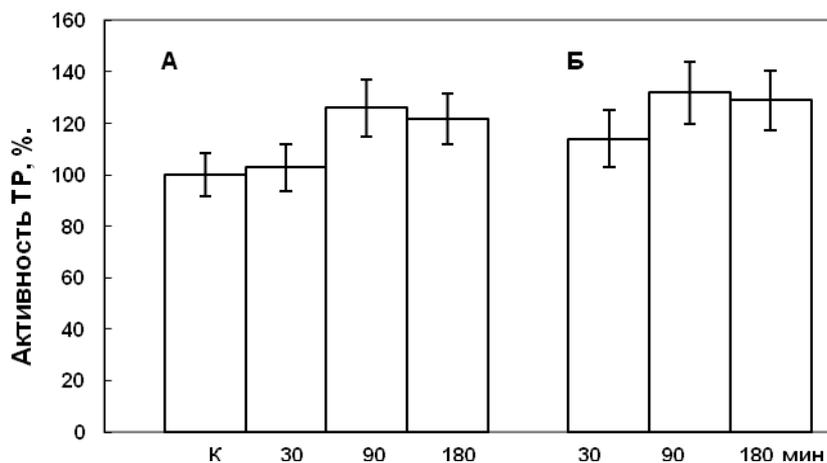


Рис. 3. Изменение активности ТР (% к контролю) в культуре ткани *A. thaliana* при действии ПЭГ (А) и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Б).

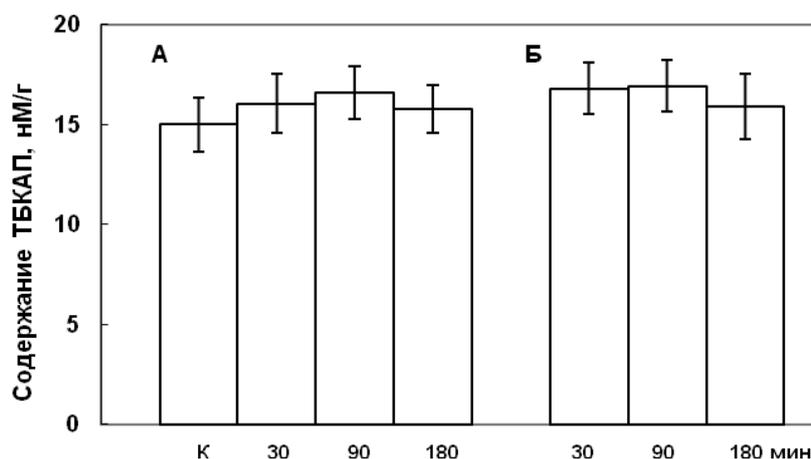


Рис. 4. Содержание ТБКАП в культуре ткани *A. thaliana* при действии ПЭГ (А) и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Б).

АФК могут формировать как самостоятельный сигнал, так и в комплексе с другими сигнальными системами. АФК сигналинг также рассматривается как один из центральных участников в сложной сигнальной сети, особенно при стрессах (Moller, Sweetlove, 2010; Mittler et al., 2011; Колупаев, Карпец, 2014). У растений *A. thaliana* не менее чем 152 гена участвуют в регулировании уровня АФК. Эта сеть очень динамична и обширна, и кодирует как АФК-удаляющие, так и АФК-продуцирующие белки (Mittler et al., 2004).

Предполагается, что при развитии обоих стрессов, осмотического и оксидативного (рис. 1-3), ПР и ТР также могут выполнять функцию акцепторов и трансдукторов редокс сигналов АФК, в частности H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. При этом может происходить формирование АФК – ПР – ТР или

АФК – ТР стрессорного сигнального пути (Dietz, 2008; Жадько, 2012). Известно, что ПР могут восстанавливать пероксиды в присутствии ТР, ТРР и НАДФН и при этом формировать H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-опосредованную сигнальную передачу (Dietz et al., 2006; Bigelow, Squier, 2011), затем этот сигнал может передаваться соответствующим МАП-киназам, сигнальным белкам или транскрипционным факторам (Mittler et al., 2004; Dietz, 2008). Акцепторная и трансдукторная функция ТР заключается в их способности окисляться или непосредственно АФК или в реакциях с ПР в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и участвовать в редокс сигналинге (Dietz, 2008). Увеличение экспрессии генов ПР и ТР у растений происходит на ранних стадиях развития стрессовых реакций (Laloi et al., 2004; Finkemeier et al., 2005).

Основными компартментами образования АФК в освещаемых фотосинтетических клетках растений являются хлоропласты, митохондрии и пероксисомы (Колупаев, Карпец, 2014). Можно предположить, что у исследуемой нами культуры ткани *A. thaliana*, растущей в темноте, такие процессы с участием АФК, ПР и ТР происходят в основном в митохондриях. Известно, что митохондрии *A. thaliana* содержат все необходимые для этого компоненты. Это наличие электронно-транспортной цепи, где при стрессах образуется значительное количество АФК, и присутствие митохондриальных форм ПР и ТР, At-PrxII F и At-TrxO1 (Finkemeier et al., 2005; Santos, Rey, 2006).

При осмотическом и оксидативном стрессе происходят в общем схожие изменения в содержании АФК и активности ПР и ТР (рис. 1-3). Однако их молекулярные механизмы должны иметь свою стресс-специфичность. В частности, при действии осмотика ПЭГ и окислителя H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, в механизм стрессорного образования АФК могут вовлекаться различные субстраты в различных компартментах клеток и соответствующие изоформы ПР и ТР (Dietz et al., 2006; Santos, Rey, 2006).

Таким образом, при развитии острого осмотического и оксидативного стресса в культуре ткани *A. thaliana* вначале происходит увеличение содержания АФК, за которым следует увеличение активности ПР и ТР. При этом значительных изменений в содержании ТБКАП не обнаружено. Раннее увеличение содержания АФК соответствует так называемой «стрессорной оксидативной вспышке», продукты которой, в основном H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, в качестве вторичных мессенджеров могут вызывать АФК-зависимое увеличение активности ПР и ТР с образованием АФК – ПР – ТР сигнального пути. Предполагается, что у исследуемой нами культуры ткани, растущей в темноте, такие процессы в основном проходят в митохондриях.

## ЛИТЕРАТУРА

Жацько С.І. Раннє збільшення вмісту активних форм кислорода і активності аскорбат пероксидази і каталази в листях рослин *Arabidopsis thaliana* при осмотическом і оксидативном стрессах // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2012. – Вип. 3 (27). – С. 58-64.

Жацько С. Раннє збільшення вмісту H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> і активності пероксиредоксину й тиоредоксину в культурі тканини *Arabidopsis thaliana* при осмотическом стресі різної інтенсивності // Вісн. Львів.

ун-ту. Сер. біологічна. – 2014. – Вип. 64. – С. 287-292.

Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Активные формы кислорода и стрессовый сигналинг у растений // Ukr. Biochem. J. – 2014. – V. 86, № 4. – С. 18-35.

Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Ястреб Т.О. Ферментативные источники активных форм кислорода в растительных клетках: регуляция активности и участие в стрессовых реакциях // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2012. – Вип. 1 (25). – С. 6-22.

Bigelow D.J., Squier T.C. Thioredoxin-dependent redox regulation of cellular signaling and stress response through reversible oxidation of methionines // Mol. Biosyst. – 2011. – V. 7. – P. 2101-2109.

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. – V. 72. – P. 248-254.

Couturier J., Chibani K., Jacquot J. P., Rouhier N. Cysteine-based redox regulation and signaling in plants // Front. Plant Sci. – 2013. – V. 4. – P. 1-7.

Dietz K.-J. Redox signal integration: from stimulus to networks and genes // Physiol. Plant. – 2008. – V. 133. – P. 459-468.

Dietz K.-J., Jacob S., Oelze M.-L., Laxa M., Tognetti V., Marina S., Miranda N., Baier M., Finkemeier I. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism // J. Exp. Bot. – 2006. – V. 57, № 8. – P. 1697-1709.

Drobot L. B., Samoylenko A. A., Vorotnikov A. V., Tyurin-Kuzmin P. A., Bazalii A. V., Kietzmann T., Tkachuk V. A., Komisarenko S. V. Reactive oxygen species in signal transduction // Укр. біохім. журн. – 2013. – Т. 85, № 6. – С. 209-217.

Finkemeier I., Goodman M., Lamkemeyer P., Kandlbinder A., Sweetlove L.J., Dietz K.-J. The mitochondrial type II peroxiredoxin F is essential for redox homeostasis and root growth of *Arabidopsis thaliana* under stress // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280, № 13. – P. 12168-12180.

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. – V. 20, № 9. – P. 1761-1767.

Laloi C., Mestres-Ortega D., Marco Y., Meyer Y., Reichheld J.P. The Arabidopsis cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-Box-Mediated response to pathogen elicitor // Plant Physiol. – 2004. – V. 134. – P. 1006-1016.

Meyer Y., Belin C., Delorme-Hinoux V., Reichheld J. P., Riondet C. Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance // Antioxid. Redox Signal. – 2012. – V. 17. – P. 1124-1160.

## АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА

- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Breusegem F.V. Reactive oxygen gene network of plants // Trends Plant Sci. – 2004. – V. 9. – P. 490-498.
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van Breusegem F. ROS signaling: the new wave? // Trends Plant Sci. – 2011. – V. 16. – P. 300-309.
- Moller I. M., Sweetlove L. J. ROS signaling-specificity is required // Trends Plant Sci. – 2010. – V. 15. – P. 370-374.
- Santos C.V., Rey P. Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response // Trends Plant Sci. – 2006. – V. 11, № 7. – P. 329-334.
- Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress // Plant Cell Environ. – 2012. – V. 35. – P. 259-270.
- Zhang J., Kirkham M. B. Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings // New Phytologist. – 1996. – V. 132. – P. 361-373.

Поступила в редакцию  
20.01.2015 г.

## REACTIVE OXYGEN SPECIES AND THIOREDOXIN AND PEROXIREDOXIN ACTIVITIES IN TISSUE CULTURE OF *ARABIDOPSIS THALIANA* UNDER DEVELOPMENT OF OSMOTIC AND OXIDATIVE STRESSES

S. I. Jadko, T. V. Vorobyova, A. A. Syvash

*N.G. Kholodny Institute of Botany  
of National Academy of Sciences of Ukraine  
(Kyiv, Ukraine)  
e-mail: ukrkiev55@mail.ru*

Reactive oxygen species (ROS) content and peroxiredoxin (PR) and thioredoxin (TR) activities in the tissue culture of *Arabidopsis thaliana* under development of osmotic and oxidative stresses have been investigated. It was found that during the first 30-180 minutes, initially increase in ROS content with followed up increase in the of PR and TR activities occurred. It is assumed that the ROS molecules, in particular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as secondary messengers, lead to ROS-dependent increase in the PR and TR activities. In the investigated tissue culture, growing in the dark, such processes first of all can occur in mitochondria.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*, tissue culture, reactive oxygen species, peroxiredoxin, thioredoxin, osmotic stress, oxidative stress

## АКТИВНІ ФОРМИ КИСНЮ, АКТИВНІСТЬ ПЕРОКСИРЕДОКСИНУ І ТІОРЕДОКСИНУ В КУЛЬТУРІ ТКАНИН *ARABIDOPSIS THALIANA* ЗА РОЗВИТКУ ОСМОТИЧНОГО І ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСІВ

С. І. Жадько, Т. В. Воробйова, О. О. Сиваш

*Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного  
Національної академії наук України  
(Київ, Україна)  
e-mail: ukrkiev55@mail.ru*

Досліджували вміст активних форм кисню (АФК) і активність пероксиредоксину (ПР) і тіоредоксину (ТР) в культурі тканин *Arabidopsis thaliana* за розвитку осмотичного і оксидативного стресів. Встановлено, що в перші 30-180 хв, відбувалося збільшення вмісту АФК, що призводило до збільшення активності ПР і ТР. Висловлено припущення, що молекули АФК,

**ЖАДЬКО, ВОРОБЬЕВА, СИВАШ**

зокрема  $H_2O_2$ , як вторинні месенджери, викликають АФК-залежне збільшення активності ПР і TR. У досліджуваній нами культурі тканин, що росла в темряві, такі процеси відбуваються ймовірно в мітохондріях.

**Ключові слова:** *Arabidopsis thaliana*, культура тканин, активні форми кисню, пероксиредоксин, тіоредоксин, осмотичний стрес, оксидативний стрес