

С. И. Жадько

## **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-зависимая экспрессия митохондриального пероксиредоксина и его роль в реакции клеток культуры ткани *Arabidopsis thaliana* при действии полиэтиленгликоля и оксидативного стресса**

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

*У клітинах культури тканини Arabidopsis thaliana при дії осмотичного та оксидативного стресів у перші хвилини впливу відбувається утворення H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, яке спричиняє H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-залежне збільшення експресії гена митохондриального пероксиредоксину, антиоксидантної активності та підвищення загальної стійкості клітин до розвитку оксидативної деструкції. Раннє стресорне збільшення експресії гена митохондриального пероксиредоксину вказує на можливе формування H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-індукованого редокс-сигналу саме в мітохондріях.*

Осмотический и оксидативный стрессы вызывают в клетках растений раннюю стрессорную оксидативную вспышку (СОВ), продукты которой — активные формы кислорода (АФК), включая H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, имеют двойную функцию: сигнальную и оксидативно-деструктивную [1–4]. При выполнении стрессорной сигнальной функции молекулы H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> СОВ акцептируются другими молекулами или рецепторами и этот сформированный редокс-сигнал передается далее к соответствующим стресс-реализующим системам [1, 2]. Считается, что белки пероксиредоксины (ПР), наряду с другими АФК-редокс-чувствительными механизмами, принимают участие в выполнении акцепторной функции посредством восстановления тиолов тиоредоксинов (ТР) в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> СОВ. Затем восстановленные ТР в качестве трансдукторов передают этот редокс-сигнал соответствующим МАП киназам, сигнальным белкам или транскрипционным факторам [2, 3, 5].

Особый интерес представляет изучение митохондриальных ПР (мтПР). Известно, что митохондрии участвуют в образовании многих клеточных ответов при различных стрессах, в том числе и при оксидативном [6]. ПР, включая и мтПР, также обладают ферментативными антиоксидантными свойствами и способны восстанавливать H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до H<sub>2</sub>O, таким образом защищая клетку от развития оксидативной деструкции, особенно при различных экстремальных воздействиях [7]. Обычно при различных стрессах происходит увеличение экспрессии генов и белков ПР и ТР [2, 5, 8]. Однако прямых исследований роли мтПР в реакции клеток растений при стрессах не проводилось.

Целью исследования было изучение раннего H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-зависимого увеличения экспрессии гена мтПР и его роли в реакции и оксидативной устойчивости клеток культуры ткани *Arabidopsis thaliana* при осмотическом и оксидативном стрессах.

**Материалы и методы исследования.** Исследовали 12-суточную каллусную культуру ткани *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. Осмотический стресс вызывали посредством

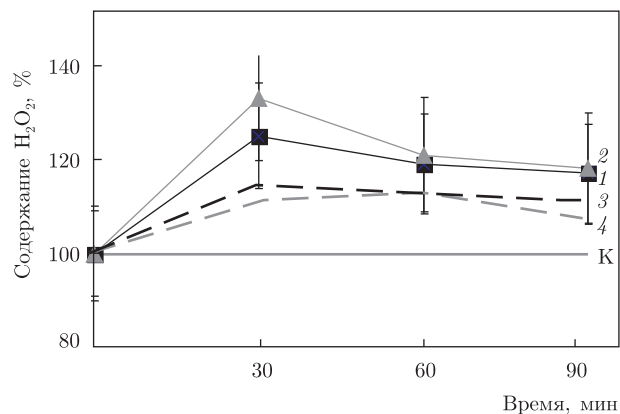


Рис. 1. Содержание  $H_2O_2$  в культуре ткани *A. thaliana* при действии ПЭГ (1),  $H_2O_2$  (2), АО + ПЭГ (3) и АО +  $H_2O_2$  (4). К — контроль

действия 30% раствора полиэтиленгликоля-6000 (ПЭГ), а оксидативный стресс — посредством действия 50 мМ  $H_2O_2$ . Содержание  $H_2O_2$  определяли по методу [9]. Для изучения роли  $H_2O_2$  СОВ использовали методику антиоксидантного (АО) ингибирования [10]. Для этого культуру ткани перед стрессом обрабатывали 10 мМ раствором аскорбата в течение 25 мин, после чего клетки сразу подвергали воздействию ПЭГ или  $H_2O_2$  (в дальнейшем варианты АО + ПЭГ и АО +  $H_2O_2$ ).

Содержание мРНК мтПР в относительных единицах определяли посредством РТ-ПЦР с применением соответствующих оптимизаций, контролей и агарозного гель-электрофореза, реактивы и протоколы Fermentas. Для целенаправленного снижения внутриклеточного количества мРНК мтПР использовали специально созданные олигодезоксинуклеотидные антисэнсы (АС). Данная процедура была применена согласно [11]. Содержание ТБК-активных продуктов (ТБКАП), как показателя степени развития оксидативной деструкции в клетках, определяли спектрофотометрически [6]. Количество белка рассчитывали по методу Брэдфорд [12]. Повторность экспериментов 3–4-кратная. Полученные данные обрабатывали статистически [13].

**Результаты исследования и их обсуждение.** В клетках культуры ткани *A. thaliana* при действии ПЭГ и  $H_2O_2$  происходило раннее увеличение содержания  $H_2O_2$ , которое к 30 мин было выше контрольного уровня в среднем на 25–33%. Затем к 60 и 90 мин содержание  $H_2O_2$  медленно снижалось (рис. 1). Раннее увеличение содержания  $H_2O_2$  и его последующее снижение соответствует изменениям динамики СОВ, зарегистрированной методом определения интенсивности спонтанной хемилюминесценции для АФК. При этом начальное увеличение АФК происходит при активации пероксидации, после чего наступает стадия снижения в результате увеличения антиокислительной активности клеток [14]. Аскорбат ингибировал стрессорное образование  $H_2O_2$  в среднем на 63–70% при обоих воздействиях (см. рис. 1, 3, 4).

За ранним увеличением содержания  $H_2O_2$  в процессе СОВ следовало повышение экспрессии гена мтПР. К 120 мин воздействия ПЭГ содержание мРНК этого гена было выше уровня контроля почти в 2 раза (рис. 2, а).

В следующей серии экспериментов было установлено  $H_2O_2$ -зависимое увеличение экспрессии гена мтПР при действии ПЭГ. Посредством АО ингибиторного анализа показано, что при снижении содержания  $H_2O_2$  СОВ в среднем на 65% (см. рис. 1, 3, 4) экспрессия

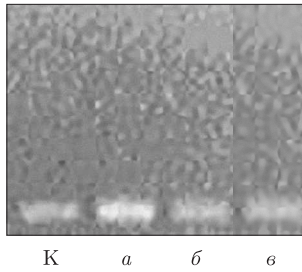


Рис. 2. Полуколичественный РТ-ПЦР анализ мРНК мтПР культуры ткани *A. thaliana* при действии ПЭГ (а), АО + ПЭГ (б) и АС (в). К — контроль

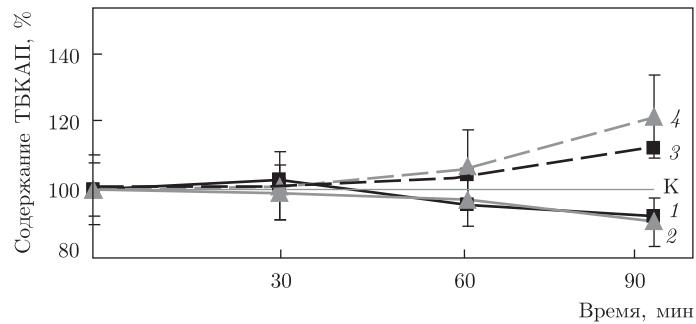


Рис. 3. Содержание ТБКАП в клетках культуры ткани *A. thaliana* при действии ПЭГ (1), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2), АС + ПЭГ (3) и АС + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4). К — контроль

этого гена уменьшалась почти в 2 раза (см. рис. 2, б). У контрольных вариантов культуры ткани АС снижали содержание мРНК мтПР в среднем на 40–50% (см. рис. 2, в).

При действии ПЭГ и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> достоверных изменений в содержании ТБКАП к 60 и 120 мин не происходило. Только к 180 мин наблюдалась некоторая тенденция в снижении уровня ТБКАП на 10–13% соответственно (рис. 3, 1, 2).

Однако в результате применения АС, вызывающих снижение содержания мРНК мтПР, а значит, и снижение АО-активности этого белка, содержание ТБКАП к 180 мин, наоборот, увеличивалось на 16 и 21% соответственно (см. рис. 3, 3, 4), что указывает на снижение устойчивости клеток культуры ткани к данным стрессам и развитие в них оксидативной деструкции.

Таким образом, в клетках культуры ткани *A. thaliana* при осмотическом и оксидативном стрессах в первые минуты происходит образование H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в процессе развития СОВ. Затем эта H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в качестве вторичного мессенджера вызывает H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-зависимое увеличение экспрессии гена мтПР, что приводит к увеличению АО-активности и, соответственно, к повышению общей устойчивости клеток к развитию оксидативной деструкции.

Раннее стрессорное увеличение экспрессии гена мтПР указывает на возможное формирование H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцируемого редокс-сигнала именно в митохондриях. Однако для подтверждения этого предположения необходимо изучить также участие в этом процессе митохондриальных тиоредоксинов.

Автор выражает признательность д-ру биол. наук В. В. Сарнацкой и Т. В. Воробьевой за предоставленную культуру ткани *A. thaliana*, а также А. С. Талалаеву за помощь в проведении РТ-ПЦР.

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. Dietz K.-J. Redox signal integration: from stimulus to networks and genes. // Physiol. Plant. – 2008. – **133**. – P. 459–468.
3. Miller G., Shulaev V., Mittler R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. // Ibid. – 2008. – **133**. – P. 481–489.
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. 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.
6. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях / Под ред. Е. Л. Кордюм. – Киев: Наук. думка, 2003. – 277 с.
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. 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.
9. Maksymiec W., Krupa Z. The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana* // Environ. and Exp. Bot. – 2006. – **57**. – P. 187–194.
10. 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.
11. Sun C., Hoglund A.-S., Olsson H. et al. Antisense oligodeoxynucleotide inhibition as a potent strategy in plant biology: identification of SUSIBA2 as a transcriptional activator in plant sugar signaling // Plant J. – 2005. – **44**. – P. 128–138.
12. 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.
13. Плохинский Н. А. Биометрия. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1970. – 367 с.
14. Барабой В. А., Жадько С. И. Ранние изменения интенсивности спонтанной хемилюминесценции корней проростков гороха при гипергравитации // Докл. АН Украины. – 1992. – № 7. – С. 156–158.

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

Поступило в редакцию 10.07.2009

**S. I. Jadko**

## **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent expression of mitochondrial peroxiredoxin and its role in reaction of *Arabidopsis thaliana* tissue culture cells to PEG and oxidative stress**

*In Arabidopsis thaliana tissue culture cells under osmotic and oxidative stresses in the first minutes of impact takes place the early increase in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content, which leads to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent increase of mitochondrial peroxiredoxin gene expression, AO activity, and general cell resistance to the development of oxidative destruction. The early stress increase of mitochondrial peroxiredoxin gene expression indicates a possible formation of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced redox signal just in mitochondria.*