

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН

УДК 581.1: 57.044: 582.683.2

**РАННЄ ЗБІЛЬШЕННЯ ВМІСТУ H_2O_2 І АКТИВНОСТІ ПЕРОКСИРЕДОКСИНУ
Й ТІОРЕДОКСИНУ В КУЛЬТУРІ ТКАНИНИ *ARABIDOPSIS THALIANA*
ПРИ ОСМОТИЧНОМУ СТРЕСІ РІЗНОЇ ІНТЕНСИВНОСТІ**

С. Жадько

*Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, Київ 01601, Україна
e-mail: ukrkiev55@mail.ru*

При дії м'якого осмотичного стресу (10% ПЕГ) в культурі тканини *A. thaliana* відбувається поступове збільшення вмісту H_2O_2 і активності пероксиредоксину (ПР) й тіоредоксину (ТР), і ці зміни не можна віднести до ефектів раннього стресового оксидативного спалаху та H_2O_2 -індукованого сигналінгу. Проте при дії сильного осмотичного стресу (25% ПЕГ) відбувається раннє та високоамплітудне збільшення вмісту H_2O_2 з подальшим H_2O_2 -залежним збільшенням активності ПР і ТР і формуванням H_2O_2 -ПР-ТР стресової сигнальної системи. При цьому ПР і ТР, окрім їх антиоксидантної функції, також беруть участь у сприйнятті і трансдукції H_2O_2 редокс сигналів.

Ключові слова: культура тканини, осмотичний стрес, H_2O_2 сигналінг, пероксиредоксин, тіоредоксин.

Активні форми кисню (АФК), зокрема H_2O_2 , пероксиредоксини (ПР) і тіоредоксини (ТР) можуть утворювати в клітинах так звану H_2O_2 -ПР-ТР сенсорно-трансдукторну сигнальну систему, яка має важливе значення в розвитку стрес-реакції рослин при різних діях [1, 2, 7, 5]. При цьому АФК утворюються в перші хвилини стресу в процесі раннього стресового оксидативного спалаху (СОС), і потім ці АФК як вторинні месенджери, за участю ПР, викликають збільшення активності ТР у рослин [1, 7]. Це приводить відповідно до ТР-залежного збільшення відновлення дисульфідів у різних білках до сульфгідридів, змінюючи таким чином структуру та функцію багатьох сигнальних білків і беручи участь у регуляції метаболізму клітин. У даному випадку ПР виконують роль акцепторів, а ТР -трансдукторів редокс сигналів від АФК СОС до інших редокс чутливих білків клітин [2, 7, 15].

Раніше нами було показано, що при оксидативному й осмотичному стресах у клітинах культури тканини *A. thaliana* в перші хвилини відбувається раннє стресове збільшення вмісту АФК, які як вторинні месенджери викликають АФК-залежне збільшення активності ПР і ТР. Було висловлено припущення, що в досліджуваній культурі тканини, яка росла у темряві, такі процеси відбуваються в основному в мітохондріях за участю мітохондріальних ПР і ТР, і молекулярний механізм такої відповіді повинен мати свою стрес-специфічність як за дії H_2O_2 (оксидативного стресу), так і за впливу ПЕГ-індукованого осмотичного стресу [1].

Разом із цим, також становить інтерес вивчення додозалежного характеру прояву H_2O_2 -ПР-ТР сенсорно-трансдукторної системи в реакції рослин при розвитку осмотичного стресу. Проте такі дослідження не проводилися.

Метою даних досліджень було вивчення особливостей ранніх змін вмісту H_2O_2 й активності ПР і ТР у клітинах культури тканини *A. thaliana* при дії низьких і високих концентрацій поліетиленгліколю (ПЕГ) для індукції осмотичного стресу різної інтенсивності.

Матеріали та методи

Досліджували 12–14-денну калюсну культуру тканини *A. thaliana*, екотип Columbia, отриману з листків рослин *A. thaliana* в нашій лабораторії Т.В. Воробйовою. Культуру вирощували на середовищі Мурасиге і Скуга в темряві при 24°C. Для створення відносно м'якого або сильного осмотичного стресу, 1000–1500 мг культури тканини поміщали в розчин 10% і 25% ПЕГ-6000 відповідно. Через 30, 60, 90 і 240 хв дії визначали вміст H_2O_2 й активність ПР і ТР спектрофотометричним методом.

Для отримання супернатанту культуру тканини швидко гомогенізували в охолоджених ступках з охолодженим розчином, що містив 50 мМ Na_2HPO_4/KH_2PO_4 (рН 7,0), 0,8% тритон X-100 і 1% полівініл піролідону (ПВП). Потім гомогенат центрифугували при 17000 g протягом 17 хв і в отриманому супернатанті одразу визначали вміст H_2O_2 й активність ПР і ТР. Усі дії проводили на холоді при 4°C [12].

Вміст H_2O_2 визначали за методом Pick, модифікованим за [12]. Реакційна суміш (1 мл) містила 50 мМ калій фосфатного буфера (рН 7,0), 0,6 М фенол-сульфогалеїну (phenol red) натрієвої солі, 20 мкл пероксидази хрину (40 одиниць) і 100 мкл екстракту. Через 10 хв інкубації при 37°C аліквоту 450 мкл суміші центрифугували, і реакцію зупиняли додаванням 1 мл 1М NaOH, після чого вимірювали оптичну густину при 600 нм.

Активність ПР визначали спектрофотометрично за окисненням NADPH [10]. Реакційна суміш містила 200 мкМ НАДФН, 3 мкМ ТР, 1,5 мкМ ТР редуктази, 1 мМ ЕДТА в 50 мМ HEPES-NaOH буфера (рН 7,0). Реакцію запускали додаванням H_2O_2 або супернатанту і окислювання НАДФН визначали за 3 хв спектрофотометрично при 340 нм [10].

Активність ТР визначали за допомогою мікрометоду, заснованого на відновленні інсуліну з модифікацією [11]. Реакційна суміш містила 0,26 М HEPES (рН 7,6), 10 мМ ЕДТА, 2 мМ НАДФН, 1 мМ інсуліну і 100 нМ ТР редуктази, супернатант або буфер 100 мкл. Реакцію запускали додаванням супернатанту. Після інкубації при 37°C протягом 20 хв реакцію зупиняли додаванням суміші 0,5 мл 6М гуанідин-HCl, 0,2М Tris-HCl, рН 8,0 та 1 мМ DTNB і вимірювали оптичну густину при 412 нм [11].

Вміст білка визначали за методом Бредфорда [4]. Повторність експериментів 3–5-кратна. Отримані дані опрацьовували статистично [3].

Результати і їхнє обговорення

Контрольні зразки культури тканини *A. thaliana* характеризувалися такими середніми даними: вміст H_2O_2 – 19–22 ум. од. на мг білка; активність ПР – 37–42 та ТР – 400–450 ум. од. на мг білка відповідно. Зміни вмісту H_2O_2 і активності ПР і ТР за впливу ПЕГ представлені у відсотках до відповідних контролів.

За дії 10% ПЕГ у культурі тканини відбувалося повільне збільшення вмісту H_2O_2 і активності ПР і ТР з достовірними відмінностями в H_2O_2 і ТР на 24% та 26% лише на 240-й хв (рис. 1, А–3, А).

Проте за дії вищої концентрації ПЕГ (25%) відбувалося швидке і достовірне зростання вмісту H_2O_2 на 37% вже на 30-ту хв і до 240-й хв досліді вміст H_2O_2 значно не змінювався (рис. 1, Б). Раннє збільшення вмісту H_2O_2 індукувало достовірне збільшення активності ПР і ТР на 90-й і 240-й хв дії стресового чинника (рис. 2, Б, 3, Б).

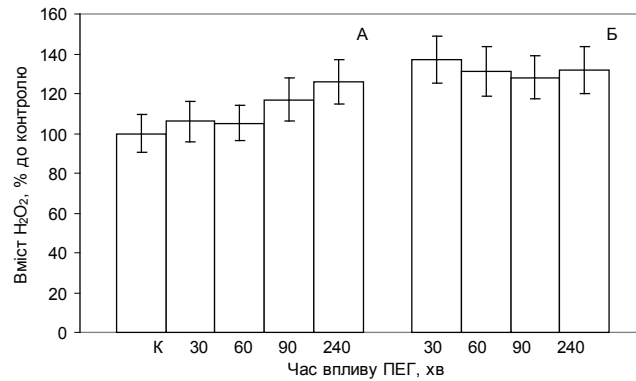


Рис. 1. Динаміка вмісту H_2O_2 в культурі тканини *A. thaliana* за короткострокової дії ПЕГ: А – 10% ПЕГ, Б – 25% ПЕГ, К – контроль.

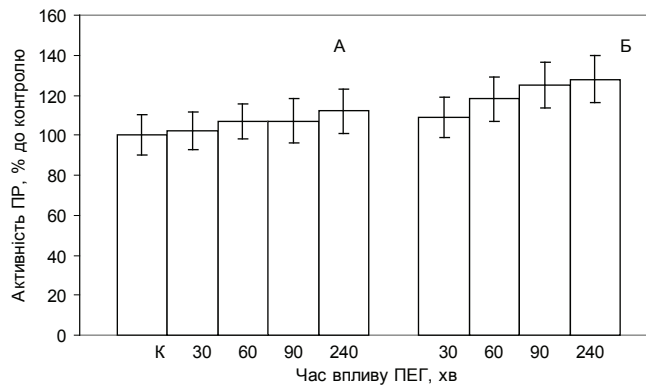


Рис. 2. Динаміка активності пероксиредоксину (ПР) в культурі тканини *A. thaliana* за короткострокової дії ПЕГ. Позначення, як на рис. 1.

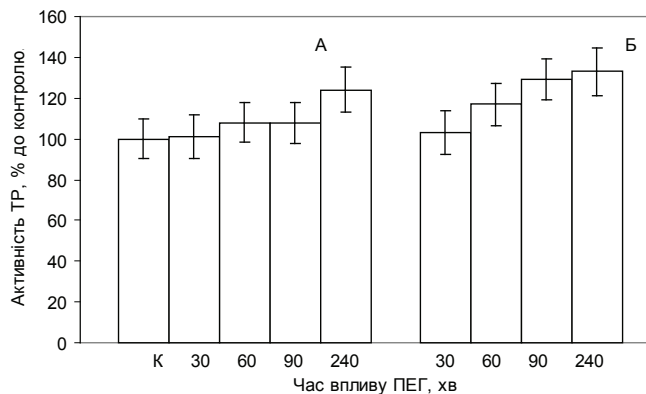


Рис. 3. Динаміка активності тіоредоксину (ТР) в культурі тканини *A. thaliana* за короткострокової дії ПЕГ. Позначення, як на рис. 1.

Отримані дані свідчать, що за дії відносно низької концентрації ПЕГ (10%) у культурі тканини *A. thaliana* на початкових етапах відбувається поступове зростання вмісту H_2O_2 і активності ПР і ТР, зафіксоване нами впродовж 240 хв. Проте за дії вищої концентрації

ПЕГ (25%) раннє стресове збільшення вмісту H_2O_2 відбувається вже в перші хвилини, яке індукує чітке H_2O_2 -залежне зростання активності ПР і ТР (рис. 1–3).

Відомо, що за дії різних стресів, особливо сильних, у рослин вже в перші хвилини відбувається раннє збільшення вмісту активних форм кисню та H_2O_2 у процесі стресового оксидативного спалаху, що зазвичай спричиняє розвиток оксидативної деструкції. При цьому активні форми кисню виконують у метаболізмі клітин подвійну функцію, оксидативно-деструктивну і сигнальну [1, 6, 7, 13, 14]. Для сигнальної функції характерна АФК-залежна активація антиоксидантної системи клітин, особливо швидко збільшується активність антиоксидантних ферментів, зокрема супероксиддисмутази, аскорбат пероксидази, каталази [12, 13], а також ПР і ТР [1, 11, 15]. При цьому якщо супероксиддисмутаза, аскорбат пероксидаза, каталаза та інші ферменти можуть виконувати лише антиоксидантну функцію, пов'язану з відновленням активних форм кисню до нейтральних молекул, то інші антиоксидантні ферменти, ПР і ТР, можуть виступати акцепторами і трансдукторами АФК редокс сигналів, утворюючи так звану редокс сенсорно-трансдукторну H_2O_2 -ПР-ТР сигнальну систему [1, 7, 8].

Слід зазначити, що для активації H_2O_2 -ПР-ТР системи необхідно, щоб у клітинах утворилися надпорогові кількості активних форм кисню, достатні для запуску H_2O_2 -ПР-ТР сигнальної системи, що нами і було виявлено на ранніх стадіях розвитку сильного осмотичного стресу при дії 25% ПЕГ (рис. 1,Б–3,Б). Тому механізм ранньої реакції культури тканини *A. thaliana* на розвиток сильного осмотичного стресу можна представити так: за дії вищої концентрації ПЕГ (25%) відбувається швидкий і високоамплітудний розвиток стресового оксидативного спалаху зі значним накопиченням H_2O_2 , який потім викликає H_2O_2 -залежне збільшення активності ПР і ТР та подальше ТР-індуковане збільшення активності ферментів антиоксидантного захисту [15].

Отже, за дії низької концентрації ПЕГ (10%) і розвитку м'якого осмотичного стресу в культурі тканини *A. thaliana* відбувається поступове збільшення вмісту H_2O_2 й активності ПР і ТР, проте ці зміни не можна віднести до ефектів раннього стресового оксидативного спалаху й АФК-індукованого сигналіну. Проте за дії вищих концентрацій ПЕГ (25%) і розвитку сильного осмотичного стресу відбувається раннє та високоамплітудне збільшення вмісту H_2O_2 , за яким настає раннє і чітко виражене H_2O_2 -залежне зростання активності ПР і ТР з формуванням H_2O_2 -ПР-ТР стресової сигнальної системи. При цьому ПР і ТР, окрім їхньої антиоксидантної функції, також беруть участь у сприйнятті та трансдукції редокс сигналів активних форм кисню.

Автор висловлює свою вдячність Т. В. Воробійовій за надану культуру тканини A. thaliana і допомогу в проведенні експериментів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Жадько С. И. Стрессорное АФК–зависимое увеличение активности пероксиредоксина, тиоредоксина и тиоредоксин редуктазы в клетках культуры ткани *Arabidopsis thaliana* при действии полиэтиленгликоля и пероксида водорода // Доп. НАН України. 2010. № 1. С. 159–163.
2. Калинина Е. В., Чернов Н. Н., Саприн А. Н. Участие тио-, перокси- и глутаредоксинов в клеточных редокс-зависимых процессах // Успехи биологической химии. 2008. Т. 48. С. 319–358.
3. Плехинский Н. А. Биометрия. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1970. 367 с.

4. 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. Vol. 72. P. 248–254.
5. Brehelin C., Laloi C., Setterdahl A. T. et al. Cytosolic, mitochondrial thioredoxins and thioredoxin reductases in *Arabidopsis thaliana* // *Photosynthesis Research.* 2004. Vol. 79. P. 295–304.
6. Breusegem F. V., Bailey-Serres J., Mittler R. Unraveling the Tapestry of Networks Involving Reactive Oxygen Species in Plants // *Plant Physiol.* 2008. Vol. 147. P. 978–984.
7. Dietz K.-J. Redox signal integration: from stimulus to networks and genes // *Physiologia Plantarum.* 2008. Vol. 133. P. 459–468.
8. Dietz K.-J., Jacob S., Oelze M.-L. et al. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism // *J. Exp. Bot.* 2006. Vol. 57. N 8. P. 1697–1709.
9. 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. Vol. 280. N 13. P. 12168–12180.
10. Kim J.-A., Park S., Kim K. et al. Activity assay of mammalian 2-cys peroxiredoxins using yeast thioredoxin reductase system // *Analytical Biochem.* 2005. Vol. 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. Vol. 20. N 9. P. 1761–1767.
12. Maksymiec W., Krupa Z. The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana* // *Environmental and Exp. Bot.* 2006. Vol. 57. P. 187–194.
13. Miller G., Shulaev V., Mittler R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress // *Physiologia Plantarum.* 2008. Vol. 133. P. 481–489.
14. Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N. et al. ROS signaling: the new wave? // *Trends in Plant Sci.* 2011. Vol. 16. N 6. P. 300–309.
15. Santos C.V.D., Rey P. Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response // *TRENDS in Plant Science.* 2006. Vol. 11. N 7. P. 329–334.

Стаття: надійшла до редакції 08.04.13

доопрацьована 30.07.13

прийнята до друку 09.09.13

EARLY INCREASING OF H₂O₂ CONTENT AND PEROXIREDOXIN AND THIOREDOXIN ACTIVITIES IN THE TISSUE CULTURE OF *ARABIDOPSIS THALIANA* UNDER OSMOTIC STRESS OF DIFFERENT INTENSITY

S. Jadko

M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine
2, Tereschenkivska St., Kyiv 01601, Ukraine
e-mail: ukrkiev55@mail.ru

Under the mild osmotic stress (10% PEG) in the tissue culture of *A. thaliana* the gradual increasing of the H₂O₂ content and the peroxiredoxin (PR) and thioredoxin (TR) activities take place. These changes can not be relate to effects of an early stress oxidative burst and a H₂O₂-induction signaling. However, under the acute osmotic stress (25% PEG),

there is the early and high peak increasing of the H_2O_2 content with subsequent the H_2O_2 -dependent increasing of the PR and TR activities and forming of the H_2O_2 -PR-TR stress signal system. At the same time the PR and TR, besides their antioxidant function, also participate in the acceptance and transduction of the H_2O_2 redox signals.

Keywords: tissue culture, osmotic stress, H_2O_2 signaling, peroxiredoxin, thioredoxin.

**РАННЕЕ УВЕЛИЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ H_2O_2 И АКТИВНОСТИ
ПЕРОКСИРЕДОКСИНА И ТИОРЕДОКСИНА В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ
ARABIDOPSIS THALIANA ПРИ ОСМОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ РАЗЛИЧНОЙ
ИНТЕНСИВНОСТИ**

С. Жадько

*Институт ботаники имени М.Г. Холодного НАН Украины
ул. Терещенковская, 2, Киев 01601, Украина
e-mail: ukrkiev55@mail.ru*

При действии мягкого осмотического стресса (10% ПЭГ) в культуре ткани *A. thaliana* происходит постепенное увеличение содержания H_2O_2 и активности пероксиредоксина (ПР) и тиоредоксина (ТР), и эти изменения нельзя отнести к эффектам ранней стрессорной оксидативной вспышки и H_2O_2 -индуцируемого сигналинга. Однако при действии острого осмотического стресса (25% ПЭГ) происходит раннее и высокоамплитудное увеличение содержания H_2O_2 с последующим H_2O_2 -зависимым увеличением активности ПР и ТР и с формированием H_2O_2 -ПР-ТР стрессорной сигнальной системы. При этом ПР и ТР, кроме их антиоксидантной функции, также участвуют в акцепции и трансдукции H_2O_2 редокс сигналов.

Ключевые слова: культура ткани, осмотический стресс, H_2O_2 сигналинг, пероксиредоксин, тиоредоксин.