ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>

СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ РЕДОКС-СТАТУСА МХА *DICRANUM* *SCOPARIUM* HEDW.

Часов А.В., Викторова Л.В., Минибаева Ф.В.

Казанский институт биохимии и биофизики

ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань, Россия

E-mail: chasov@kibb.knc.ru

STRESS INDUCED CHANGES IN THE REDOX STATUS OF MOSS *DICRANUM SCOPARIUM* HEDW.

Chasov A.V., Viktorova L.V., Minibayeva F.V.

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,

FRC KazSC RAS, Kazan, Russia

E-mail: chasov@kibb.knc.ru

В настоящей работе обсуждается изменение редокс-статуса мха *Dicranum scoparium* Hedw. при стрессе. Показано, что некоторые изоферменты пероксидазы *D. scoparium* способны проявлять как про-, так и антиоксидантные свойства. Обнаружено, что одна из изоформ пероксидазы *D. scoparium* способна как к образованию супероксидного анион-радикала, так и к проявлению супероксиддизмутазно-подобной активности. Предполагается, что пероксидазы бриофитов подобно пероксидазам сосудистых растений – являются одними из основных компонентов стрессового ответа, выступая в качестве регулятора редокс-статуса клеток.

Ключевые слова: *Dicranum scoparium*, бриофиты, редокс-ферменты, пероксидаза, активные формы кислорода

In this paper, stress induced changes in the redox status of moss *Dicranum scoparium* Hedw. are discussed. It is shown that some peroxidase isoforms of *D. scoparium* can display both pro- and antioxidative properties. It is found that one peroxidase isoform of *D. scoparium* possesses both superoxide anion radical producing activity and superoxide dismutase-like activity. It is suggested that peroxidases from bryophytes, similarly to peroxidases from vascular plants, are among the main components of stress response and regulators of cellular redox status.

Keywords: *Dicranum scoparium*, bryophytes, redox enzymes, peroxidase, reactive oxygen species

Поступила в редакцию: 26.04.2020

DOI: [10.31163/2618-964X-2020-3-2-198-203](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-2-198-203)

ВВЕДЕНИЕ

По современной классификации мхи, печеночники и антоцеротовые – самостоятельные отделы высших наземных растений [Троицкий и др., 2007; Chang et al., 2011]. Бриофиты – собирательное название этих трех отделов – одни из древнейших наземных растений, представляющих гаметофитную линию эволюции. Все они являются несосудистыми растениями, так как не имеют настоящих сосудов, и редко достигают больших размеров, тем не менее, они широко распространены на планете, их можно обнаружить как в Арктике, так и на экваторе. Многие бриофиты являются экстремофилами и способны выживать в чрезвычайно неблагоприятных условиях [Wood, 2007]. При этом механизмы стрессовой устойчивости до конца не изучены. Таким образом, исследование вовлечения редокс-ферментов в стрессовые ответы бриофитов задача важная и актуальная.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили побеги мха *Dicranum scoparium* Hedw. собранные близ города Казани. Талломы мхов массой 0,5 г растирались при добавлении жидкого азота. Затем приливали 5 мл 0,25 М трис-HCl буфера (pH 8,0) и центрифугировали 20 мин при 8000 об/мин, после чего извлекался супернатант и использовался для дальнейших исследований.

Электрофоретическое разделение проводили в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) в модифицированной системе [Laemmli, 1970] на Mini-PROTEAN Tetra Cell («Bio-Rad», США) в полу-нативных условиях с добавлением 1% SDS, без добавления додецилсульфата Na, меркаптоэтанола и нагревания образцов. Визуализацию пероксидазной активности проводили с помощью 5 мМ *o*-дианизидина, приготовленного на 0,1 мМ Na-цитратном буфере pH 5,5, с добавлением 1 мМ H₂O₂. Образование супероксидного анион-радикала в ПААГ визуализировали с помощью нитротетразолия синего (NBT). Для этого гель промывали в 10% глицерине, 50 мМ Na-фосфатном буфере pH 7,4; 0,1 мМ MgCl₂ и 1 мМ CaCl₂ в течение 30 мин. Затем гель инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в том же буфере при добавлении 0,4 мМ NADH и 0,5 мМ NBT. Для визуализации супероксиддисмутазы (СОД) гель в течение 20 мин инкубировали в темноте в 10 мл 50 мМ К-фосфатного буфера pH 7,5, содержащего 2 мг NBT, 15 мг ЭДТА, 10 мкл 0,1% раствора рибофлавина в дистиллированной H₂O. После инкубации гель облучали лампами дневного света мощностью 36 Вт до появления нужной четкости и интенсивности окрашивания.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В нашей лаборатории ранее было продемонстрировано, что талломы различных мхов и антоцероса характеризуется высокой активностью редокс-ферментов. Было показано, что при обезвоживании в течение 68 ч в талломе антоцероса происходило достоверное снижение активностей внутриклеточных пероксидаз, тирозиназ и ДОФА-пероксидаз [Часов и др., 2015]. При этом активность каталазы достоверно повышалась через 24 ч обезвоживания, снижалась через 48 ч и оставалась на уровне, близком к уровню, наблюдаемому до обезвоживания, даже после 68 ч инкубации и регидратации. Было показано, что аскорбатпероксидаза *D. scoparium* активируется при обезвоживании и регидратации таллома мха [Онеле и др., 2019]. Не обнаружено существенных отличий у образцов мхов, собранных из районов с высоким и низким уровнем атмосферного загрязнения по тяжелым металлам, в уровнях таких антиоксидантных ферментов как каталаза и супероксиддисмутаза (данные не представлены).

Среди исследованных редокс-ферментов таких как: каталаза, аскорбатоксидаза, аскорбатпероксидаза, фенолоксидаза, 3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА)-оксидаза (тирозидаза) и ДОФА-пероксидаза наибольшую активность проявляет пероксидаза [Часов и др., 2015; Onele et al., 2018; Онеле и др., 2019]. Нами обнаружено, что пероксидазы несосудистых высших растений, подобно пероксидазам цветковых растений, в частности пероксидазам пшеницы [Часов, Миннибаева, 2009], активируются при стрессе. Так, активность пероксидазы может активироваться при обезвоживании [Onele et al., 2018] и регидратации талломов бриофитов [Часов и др., 2015; Onele et al., 2018], при холодовом и тепловом воздействии [Онеле и др., 2019]. Кроме того, активность пероксидазы детектировалась в экстраклеточном растворе, в котором проводилась регидратация [Часов и др., 2015; Onele et al., 2018], что, вероятно, обусловлено присутствием на клеточной поверхности таллома бриофитов легко растворимых мобильных пероксидаз. Другими авторами так же показано, что пероксидазы бриофитов высокомолекулярны и активируются при различных видах стресса [Hirata et al., 2000; Lehtonen et al., 2009].

Пероксидаза является гемсодержащим ферментом и мономерным гликопротеидом. Классическим считается, что пероксидаза выступает в роли антиоксиданта, когда реакция

проходит по пероксидазному циклу и перекись водорода расходуется [Berglund et al., 2002]. С другой стороны, в определенных условиях этот фермент может приводить к образованию активных форм кислорода (АФК), например, работая по оксидазному циклу, генерируя перекись водорода [Berglund et al., 2002]. Кроме того, реакции в пероксидазном цикле идут по одноэлектронному механизму, при этом образуются промежуточные формы фермента и радикальные формы субстратов, взаимодействие их с кислородом может приводить к образованию АФК. Таким образом, в пероксидазном цикле может образовываться супероксидный анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$), согласно схеме Чанса [цит. по Mika et al., 2004]:

где Fe(III), Co - различные окисленные состояния пероксидазы, RH – восстановитель.

Для доказательства образования АФК пероксидазами в тканях растения учеными используются различные методы. Наиболее часто применяется акцепторный метод определения АФК с использованием ингибиторов [Minibayeva et al., 2009]. В наших экспериментах было показано, что ферменты из различных фракций белков клеточной стенки таллома антоцероса способны к образованию супероксида [Часов и др., 2015], так же как и из экстракта *D. scoparium* [Onele et al., 2018]. При этом восстановление 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксанилида (ХТТ) до ХТТ-формаза супероксидным анион-радикалом ингибировалось добавлением супероксиддисмутазы – подтверждая, что образуется именно этот радикал. Другие методы, доказывающие участие пероксидаз в образовании $O_2^{\bullet-}$, – метод ЭПР, акцепторный метод при непосредственном определении $O_2^{\bullet-}$ в образцах с очищенной пероксидазой [Minibayeva et al., 2009], а также методы электрофоретического разделения со специфическим окрашиванием ПААГ на активность пероксидазы, гем и $O_2^{\bullet-}$ [Minibayeva et al., 2009; Onele et al., 2018].

Еще один способ доказательства – использование мутантов. Группой авторов под руководством Пола Болвелла на трансгенных линиях арабидопсиса, экспрессирующих антисмысловые кДНК, кодирующие пероксидазу из французской фасоли, гомологичную пероксидазам арабидопсиса, было показано снижение образование АФК за счет снижения экспрессии двух генов пероксидазы арабидопсиса [Bindschedler et al., 2006]. Данными авторами было показано, что трансгенные растения были более чувствительны к патогену из-за снижения уровня перекиси водорода, которую образовывали пероксидазы. Таким образом, авторами было обнаружено, что пероксидаза играет значительную роль в защитных реакциях арабидопсиса.

С помощью электрофоретического разделения белков в ПААГ со специфическим окрашиванием на пероксидазу в экстракте дикранума было выявлено 5 изоформ фермента с Rf: 0,08, 0,38, 0,43, 0,47 и 0,59 (рисунок). Другие редокс-ферменты также представлены в бриофитах рядом изоформ. Так в дикрануме обнаруживается 4 изофермента аскорбатпероксидазы (данные не представлены), 4 изофермента СОД с Rf: 0,3, 0,38, 0,42 и 0,55, а также 4 белка, способных к образованию супероксидного анион-радикала с Rf: 0,08, 0,38, 0,45 и 0,47 (рисунок). Изоферменты пероксидазы в бриофитах представлены как катионными, так и анионными формами [Часов и др., 2015; Onele et al., 2018]. При этом с помощью изоэлектрофокусирования (ИЭФ) определяется больше изоформ, чем при

проведении электрофоретического разделения белка, так в антоцеросе обнаружено 14 изоферментов при ИЭФ, а в дикрануме – 13, тогда как в ПААГ всего 5 в обоих случаях [Часов и др., 2015; Onele et al., 2018]. Дело в том, что ферменты с разной pI могут иметь одинаковую электрофоретическую подвижность. На частично очищенных (ионно-обменная хроматография после осаждения белков сульфатом аммония) экстрактах дикранума было показано, что каждый мажорный изофермент с pI 4,6, 4,8, 5,1 после ИЭФ при последующем 2D-электрофоретическом разделении в 10% ПААГ был представлен двумя белками с молекулярной массой 197 и 263 кДа, а изофермент с pI 4,0 был представлен лишь одним – 263 кДа [Onele et al., 2018]. По совпадению полос в ПААГ при одномерном разделении белков и пятен в ПААГ при 2D-электрофоретическом разделении белков после ИЭФ по специфическому окрашиванию на пероксидазу и $O_2^{\bullet-}$ было показано, что изоферменты пероксидазы дикранума способны проявлять как про-, так и антиоксидантные свойства [Onele et al., 2018]. На отсеченных корнях пшеницы было показано, что не все изоферменты пероксидазы способны к образованию $O_2^{\bullet-}$ [Minibayeva et al., 2009]. В настоящей работе обнаружено, что 3 из 5 изоферментов пероксидазы с Rf : 0,08, 0,38, и 0,47 способны к образованию супероксидного анион-радикала (рисунок). Нами впервые в дикрануме показано, что пероксидаза с Rf : 0,38 также способна проявлять СОД-подобную активность (рисунок). Аналогичные результаты были получены другими авторами на вакуолярных экстрактах корнеплодов столовой свеклы [Прадедова и др., 2014].

Рисунок. Различные изоферменты *D. scoparium* в 10 % ПААГ. Гели были специфически окрашены на: а – СОД, б – пероксидазу, в – супероксидобразующую активность.

Было показано, что в образовании $O_2^{\bullet-}$ в бриофитах участвуют как растворимые/внутриклеточные, так и апопластные/связанные с клеточной стенкой ферменты [Часов и др., 2015; Onele et al., 2018]. Обнаружено, что скорость образования гидроксильного радикала талломом дикранума незначительно ниже в гидратированном мхе, чем в сухом

[Onele et al., 2018]. При этом показано, что экстраклеточная активность пероксидазы в предварительно гидратированном мхе значительно ниже активности, наблюдаемой при регидратации сухого мха. Не исключено, что пероксидаза *D. scoparium* может опосредовано влиять на накопления гидроксильного радикала. Считается, что гидроксильный радикал образуется апопластной пероксидазой в нормальных условиях и необходим для разрыхления клеточных стенок, например, при росте их растяжением [Francoz et al., 2015].

Таким образом, пероксидазы бриофитов, подобно пероксидазам сосудистых растений, являются одними из основных компонентов стрессового ответа, и выступают в качестве регулятора редокс-статуса, проявляя как анти-, так и прооксидантные свойства.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнялась в рамках выполнения государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Троицкий А.В., Игнатов М.С., Боброва В.К., Милютин И.А. Вклад геносистематики в современное представление о филогении и системе моховидных // Биохимия. 2007. Т. 72 (12). С. 1675–1689.
2. Онеле А.О., Часов А.В., Трифонова Т.В., Минибаева Ф.В. Аскорбатпероксидаза мха *Dicranum scoparium*: идентификация гена, активность фермента // ДАН. 2019. Т. 489 (4). С. 424–428. <https://doi.org/10.31857/S0869-56524894424-428>
3. Прадедова Е.В., Нимаева О.Д., Трухан И.С., Саяев Р.К. Тирозиназная и супероксиддисмутазная активность пероксидазы вакуолей клеток корнеплодов столовой свеклы // Физиология растений. 2014. Т. 61 (1). С. 77–87.
4. Часов А.В., Минибаева Ф.В. Действие экзогенных фенолов на супероксидобразующую способность экстраклеточной пероксидазы корней проростков пшеницы // Биохимия. 2009. Т. 74 (7). С. 946–955.
5. Часов А.В., Бекетт Р.П., Минибаева Ф.В. Активность окислительно-восстановительных ферментов в талломе *Anthoceros natalensis* // Биохимия. 2015. Т. 80 (9). С. 1391–1404.
6. Berglund G., Carlsson G., Smith A. et al. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution // Nature. 2002. V. 417. P. 463–468. <https://doi.org/10.1038/417463a>
7. Bindschedler L.V., Dewdney J., Blee K.A., et al. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in Arabidopsis required for pathogen resistance // Plant J. 2006. V. 47 (6). P. 851–863. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2006.02837.x>
8. Chang Y., Graham S.W. Inferring the higher-order phylogeny of mosses (Bryophyta) and relatives using a large, multigene plastid data set // Am. J. Bot. 2011. V. 98. P. 839–849. <https://doi.org/10.3732/ajb.0900384>
9. Francoz E., Ranocha P., Nguyen-Kim H., et al. Roles of cell wall peroxidases in plant development // Phytochemistry. 2015. V. 112. P. 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.07.020>
10. Hirata T., Ashida Y., Mori H., et al. A 37-kDa peroxidase secreted from liverworts in response to chemical stress // Phytochemistry. 2000. V. 55. P. 197–202. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00262-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00262-4)

11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
12. Lehtonen M.T., Akita M., Kalkkinen N., et al. Quickly-released peroxidase of moss in defense against fungal invaders // *New Phytol.* 2009. V. 183. P. 432–443. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02864.x>
13. Minibayeva F., Kolesnikov O., Chasov A., et al. Wound-induced apoplastic peroxidase activities: Their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species // *Plant, Cell and Environment*. 2009. V. 32 (5). P. 497–508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01944.x>
14. Onele A.O., Chasov A., Viktorova L. et al. Biochemical characterization of peroxidases from the moss *Dicranum scoparium* // *South African Journal of Botany*. 2018. V. 119. P. 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.08.014>
15. Wood A.J. The nature and distribution of vegetative desiccation-tolerance in hornworts, liverworts and mosses // *Bryologist*. 2007. 110 (2). P. 163–177. [https://doi.org/10.1639/0007-2745\(2007\)110\[163:IENFIB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1639/0007-2745(2007)110[163:IENFIB]2.0.CO;2)