

*На правах рукописи*



**Пиотровский Михаил Сергеевич**

**Участие НАДФН-оксидазы плазмалеммы в генерации  
супероксид-анион радикала в апопласте**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2012

Работа выполнена в лаборатории мембран растительных клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук

**Трофимова Марина Сергеевна**

**Официальные оппоненты:**

**Новикова Галина Викторовна**, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, лаборатория молекулярных основ внутриклеточной регуляции, ведущий научный сотрудник

**Дыкман Лев Абрамович**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, лаборатория иммунохимии, ведущий научный сотрудник

**Ведущая организация:** Биологический факультет, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.

Защита диссертации состоится «9» октября в «11» часов на заседании диссертационного совета Д 002.210.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, Ботаническая ул., 35.

Факс: (499) 977-80-18, электронная почта: [m-azarkovich@ippras.ru](mailto:m-azarkovich@ippras.ru); [ifr@ippras.ru](mailto:ifr@ippras.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук

Автореферат диссертации размещен на сайтах ВАК РФ и [www.ippras.ru](http://www.ippras.ru)

**Автореферат разослан «7» сентября 2012 г.**

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат биологических наук

Азаркович Марина Ивановна

**Актуальность проблемы.** Согласно исследованиям последних лет функции активных форм кислорода (АФК) в физиологических процессах растительной клетки являются более разнообразными и важными, чем предполагалось (Dat *et al.*, 2000; Apel and Hirt, 2004). Если ранее считали, что эти молекулы оказывают деструктивное действие на белки, липиды, ДНК (Moller *et al.*, 2007), являются важным элементом в реализации фитоиммунитета (Bindschedler *et al.*, 2006), а также выполняют субстратную роль в синтезе лигнина и суберина (Bernards *et al.*, 2004), то в последнее время все более подтверждается их значение как регуляторов роста и развития растений (Foreman *et al.*, 2003; Tsukagoshi *et al.*, 2010) и модуляторов внутриклеточных процессов сигналинга (Miller *et al.*, 2008; Pitzschke and Hirt, 2009). Известно, что в растительной клетке АФК образуются в хлоропластах, митохондриях, пероксисомах и апопласте. Значение апопласта в жизни клетки достаточно велико. Именно апопласт является компартментом, в котором локализованы первичные сенсоры стрессовых сигналов, работает механизм их декодирования и передачи декодированного сигнала на белки-регуляторы, через апопласт транспортируются потоки воды, ионов и других веществ, определяя в значительной степени внутреннюю среду цитозоля (Miller *et al.*, 2010). Уровень АФК в апопласте зависит от активности ряда ферментов, таких как аминоксидазы (Angellini *et al.*, 2008), оксалатоксидазы (Galiskan and Cuming, 1998) и пероксидазы III типа (Bolwell *et al.*, 2002; Kawano, 2003) – секретлируемые белки, а также интегрального белка плазмалеммы – НАДФН-оксидазы (Togres and Dangl, 2005). Биохимическая функция НАДФН-оксидазы состоит в катализе реакции образования  $O_2^-$  путем переноса электрона от НАДФН на  $O_2$  (Vignais, 2002). Образующийся  $O_2^-$  в результате реакции дисмутации с участием супероксиддисмутазы или самопроизвольно переходит в более долгоживущую форму АФК –  $H_2O_2$ . Согласно молекулярно-генетическим исследованиям, НАДФН-оксидазы растений имеют гомологию с каталитической субъединицей gp91phox фагоцитов и принадлежат к NOX-семейству белков (Sagi and Fluhr, 2006; Kawahara *et al.*, 2007). В оптимальных условиях существования растений стационарная концентрация АФК поддерживается на достаточно низком уровне. При возникновении температурного или других типов неблагоприятных воздействий образование АФК резко возрастает, что индуцирует окислительный стресс и активирует защитные реакции организма (Miller *et al.*, 2008). Какие изменения в структуре и активности НАДФН-оксидазы плазмалеммы происходят при этом, пока не исследовано, однако о наличии ответной реакции на изменение температурного режима свидетельствует ряд фактов. Например, показано, что растения *Arabidopsis*, трансгенные по генам *rboh*, более чувствительны к температуре, чем дикий тип (Larkindale *et al.*, 2005). Кроме того, обнаружено участие продукта гена *rbohD* в дистанционной передаче информации о содержании АФК по растению в ответ на изменение температуры или других факторов (Miller *et al.*, 2009). Исходя из данных о молекулярных характеристиках и физиологических эффектах, можно предполагать, что НАДФН-оксидаза плазмалеммы является наиболее вероятным претендентом на роль участника системы клеточного сигналинга среди других АФК-производящих

ферментов в апопласте. Одним из экспериментальных подходов для доказательства этой роли может быть исследование особенностей активации этого фермента при изменении температуры выращивания растений, что и было предпринято в настоящей работе.

**Цель и задачи исследования.** Цель настоящей работы состояла в исследовании свойств и активности НАДФН-оксидазы плазмалеммы как источника образования АФК в апопласте клеток растений при изменении условий роста.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

- 1) Оценить и охарактеризовать супероксид-продуцирующую НАДФН-оксидазную активность плазмалеммы, изолированной из этиолированных проростков кукурузы;
- 2) Определить динамику образования перекиси водорода в проростках после снижения температуры выращивания от 25 до 6°C;
- 3) На системах разного уровня сложности (плазмалемма, клетки, проростки) исследовать активность НАДФН-оксидазы в зависимости от аналогичных изменений температуры выращивания;
- 4) В белковом спектре плазмалеммы выявить белки, обладающие супероксид-продуцирующей активностью, и идентифицировать среди них вестерн-блот анализом белки NOX-семейства.
- 5) С помощью нативного электрофореза высокого разрешения (hrCN-PAGE) выяснить необходимость белок-белковых взаимодействий для проявления активности НАДФН-оксидазы.
- 6) Путем сопоставления молекулярных масс белковых комплексов плазмалеммы с супероксид-продуцирующей и пероксидазной активностями проверить возможность их локализации в одном и том же мембранном комплексе.

**Научная новизна.** Впервые обнаружено, что активность НАДФН-оксидазы плазмалеммы возрастает относительно исходного уровня в течение первых часов снижения температуры выращивания до 6°C и опускается ниже исходного уровня при дальнейшем выдерживании проростков на холоду. В результате наблюдается ингибирование их роста. Таким образом, активация фермента носит транзиторный характер, что предполагает его включение в каскад процессов, запускаемых в ответ на низкотемпературный стресс. В плазматической мембране впервые идентифицирован содержащий НАДФН-оксидазу  $O_2^{\cdot-}$ -продуцирующий надмолекулярный белковый комплекс, активность которого подавляется дифенилен иодониумом.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные в работе данные об особенностях активации НАДФН-оксидазы плазмалеммы при снижении температуры выращивания проростков являются существенным аргументом в пользу того, что образованный этим ферментом  $O_2^{\cdot-}$  является молекулой, участвующей в системе клеточного сигналинга. Совокупность экспериментальных данных и

подходов может быть использована для продолжения исследования этой проблемы при других типах (а)биотических стрессов, а теоретические обобщения – для чтения курсов лекций студентам биологических специальностей ВУЗов.

**Апробация работы.** Основные результаты работы были представлены на: Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва 2008), Международной научной конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений» (Екатеринбург, 2008), Международной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и нанотехнологии, посвященной 75-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (Москва-Пушино, 2010), VII Съезде Общества физиологов растений России (Нижний Новгород, 2011) и других научных мероприятиях.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 7 работ, из которых 1 – в рецензируемом журнале, рекомендованном ВАК.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 114 страницах, включает 18 рисунков и 1 таблицу. Список литературы содержит 195 источников, из которых 193 – на иностранных языках.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объектами исследования** были 5-дневные этиолированные проростки кукурузы (*Zea mays* L.) и изолированные из них плазматические мембраны, а также клетки суспензионной культуры *Arabidopsis* (Степанченко и др., 2012), полученные и любезно предоставленные д.б.н. Носовым А.В. (ИФР РАН).

**Содержание  $H_2O_2$  в тканях проростков** оценивали по абсорбции пероксидов титана при 415 нм как в (Brennan and Frenkel, 1977), экстрагируя  $H_2O_2$  холодным ацетоном.

**Плазмалемму получали** разделением микросомальных мембран в водной двухфазной полимерной системе 6.2% ПЭГ3500 – 6.2% Декстран T500 (Larsson *et al.*, 1994). Степень обогащения фракции плазмалеммой оценивали по активности маркерных ферментов в сопряженной системе (Palmgren, 1990). **Содержание белка** определяли по Bradford (1976) или с помощью бичинхониновой кислоты (Smith *et al.*, 1985), в качестве стандарта используя БСА.

**Для оценки супероксид-продуцирующей активности** мембран регистрировали кинетику восстановления плазмалеммой 2,3-бис(2-метокси-4-нитро-5-сулфонфенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамидом (ХТТ) по абсорбции образующегося растворимого формазана при 470 нм, используя НАДФН в качестве субстрата (Sagi and Fluhr, 2001).

**Зоны продукции супероксида в проростках** выявляли по образованию фиолетового преципитата формазана, загружая в ткани нитросиний тетразолий (NBT) с использованием вакуумной инфльтрации.

**О содержании  $H_2O_2$  и активности пероксидаз в апопласте** судили по измерению интенсивности флуоресценции родамина 123 (R123), образующегося при окислении дигидрородамина 123 (DHR123) (Henderson and Chappel, 1993). Для этого DHR123 вносили в суспензию клеток или с помощью вакуумной инфльтрации загружали в проростки. Интенсивность флуоресцентного окрашивания регистрировали сканированием образцов на Typhoon Trio Plus («GE Healthcare», Великобритания) при длине возбуждающего света 532 нм, используя отсекающий светофильтр 555BP20.

**Флуоресцентное окрашивание клеток для выявления компарментов образования АФК** проводили внесением в суспензию красителей R123, DHR123 или дихлоргидрофлуоресцеин диацетата ( $H_2DCFDA$ ). Флуоресценцию визуализировали с помощью микроскопа Axio Imager Z2 («Zeiss», Германия).

**Денатурирующий электрофорез мембранных белков** проводили в 10% ПААГ по методу Laemmli (1970).

Для **нативного электрофореза высокого разрешения (hrCN-PAGE) плазмалемму солюбилизировали** в растворе 1%-ных (в/в) додецилмальтозида или дигитонина при отношении детергент/белок 5:1 в течение 30 мин при 4°C. Солюбилизованные белки разделяли в 5-20%-ном ПААГ по (Witting *et al.*, 2007). В катодный буфер, содержащий 50 мМ трицин, 15 мМ Bis-Трис и 0.02% додецилмальтозид, вводили 0.05% дезоксихолат натрия (pH=7.0). Для **электрофореза во втором направлении** дорожки геля инкубировали в денатурирующем буфере. Разделение белков проводили в 10%-ном ПААГ по Laemmli (1970), но с заменой электродного буфера на Трис-трициновый по Schagger (2006).

Для **выявления активности супероксид-продуцирующих ферментов плазмалеммы в ПААГ** после электрофореза в денатурирующих условиях (без ДТТ) белки ренатурировали, заменяя ДДСNa Тритоном X-100 и отмывая буфером как описано Rouet *et al.* (2006), а после нативного электрофореза – только буфером. Все операции выполняли при 4°C. После отмывки в обоих случаях гели перекладывали в раствор, содержащий 100 мМ Трис-HCl (pH 7.8) с 2 мМ NBT на 20 мин. Реакцию образования  $O_2^{\cdot -}$  запускали внесением НАДФН. Для **визуализации пероксидазной активности в ПААГ** после проведения нативного электрофореза гель отмывали PBS-буфером при 4°C. Пероксидазную реакцию окисления диаминобензидина (ДАБ) запускали внесением  $H_2O_2$ . После развития окрашивания гели сканировали на Epson Perfection V700 PHOTO.

Для **иммунодетекции НАДФН-оксидазы** белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C Super («Amersham», Великобритания) по Towbin *et al.* (1979) с добавлением в буфер 0,1% ДДСNa. Мембрану блокировали в PBS, содержащем 0.05% Tween 20 и 2% сухое молоко. В качестве первичных антител

использовали пептид-специфичные антитела Anti-CYBB фирмы «Sigma» (США). Для визуализации – вторичные флуоресцентно меченые антитела («Медгамал», Россия). Блоты сканировали с использованием Typhoon Trio Plus («GE Healthcare», Великобритания).

На графиках представлены средние значения и стандартные отклонения, полученные на мембранном материале, выделенном независимо, а также результаты типичных экспериментов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Изменение содержания $H_2O_2$ в тканях проростков после снижения температуры выращивания

Кукуруза является теплолюбивым растением, и снижение температуры может приводить к развитию в клетках окислительного стресса. Показателем его возникновения служит резкое увеличение содержания АФК в тканях. Чтобы проверить, развивается ли в проростках окислительный стресс после снижения температуры выращивания, растения перемещали с 25 на 6°C. Видно, что снижение температуры сопровождается увеличением содержания  $H_2O_2$  как в корнях, так и в побегах, достигая своего максимума через 2 ч после охлаждения (таблица). Увеличение содержания  $H_2O_2$  происходило и в корнях и побегах и составляло около 30% по отношению к контролю (проростки, не подвергнутые охлаждению). После 3 ч охлаждения содержание  $H_2O_2$  начинало снижаться и достигло практически контрольного уровня. Более того, к концу суточного пребывания проростков при низкой температуре уровень  $H_2O_2$  снизился даже ниже контрольного и в корнях, и в побегах. Полученные данные показали, что при временном снижении температуры выращивания изменение содержания АФК имеет транзиторный характер. При этом наблюдалось торможение роста проростков, однако другие видимые повреждения отсутствовали. Таким образом, можно заключить,

Таблица. Изменение содержания  $H_2O_2$  (мкмоль/г сырой массы) в тканях корней и побегов 5-дневных этиолированных проростков кукурузы после снижения температуры выращивания с 25 до 6°C.

Время пребывания проростков при 6°C, ч	Корни	Побеги
0	1.55 ± 0.12	4.63 ± 0.33
1	1.53 ± 0.20	4.52 ± 0.23
2	2.45 ± 0.13	5.87 ± 0.25
3	1.75 ± 0.11	4.75 ± 0.34
24	1.32 ± 0.10	3.67 ± 0.22

что в экспериментальных условиях, используемых нами, проростки не испытывали неконтролируемого окислительного повреждения. Эти данные согласуются с результатами работы (Prasad et al., 1994), где впервые был установлен транзиторный характер изменений содержания  $H_2O_2$  на начальных этапах закаливания проростков кукурузы. При обработке проростков экзогенной  $H_2O_2$  при нормальной температуре авторы получили имитацию закаленных растений. На этом основании была высказана идея о том, что транзиторный характер изменений  $H_2O_2$  имеет регуляторное значение.

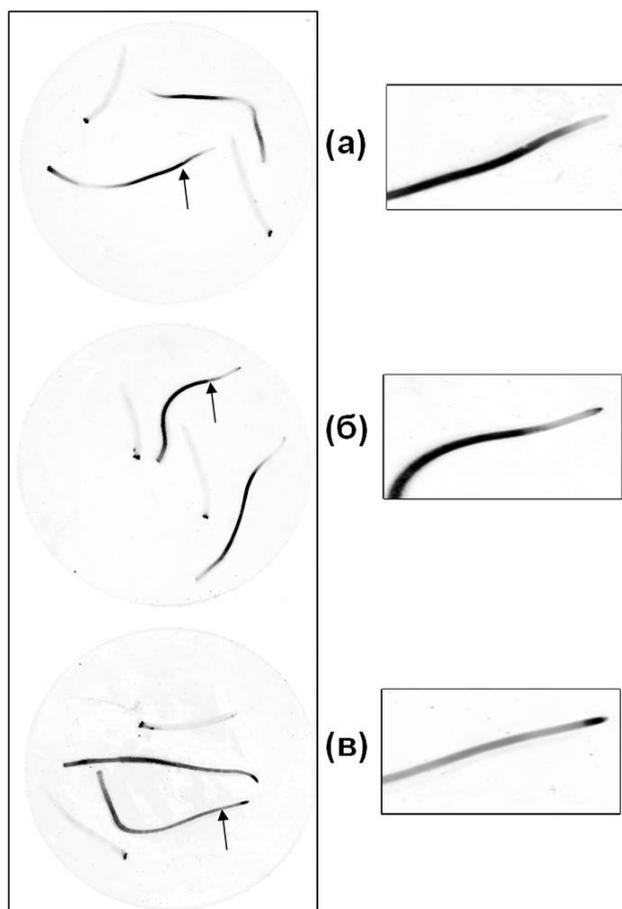
Следует отметить, что как при оптимальной температуре выращивания, так и при охлаждении проростков содержание пероксида в побегах примерно в три раза превышало его содержание в корнях (таблица).

Определение суммарной  $H_2O_2$  в тканях не позволяет идентифицировать источники ее генерации, поскольку сумма может складываться из активности большинства ферментов, способных к ее образованию, в том числе, и НАДФН-оксидазы плазмалеммы. Исследование активности этого фермента составило предмет настоящей работы, выполненной на системах различного уровня сложности: проростках, клетках, мембранах и мембранных белках.

### **Образование АФК в апопласте проростков кукурузы**

Для изучения продукции АФК в апопласте проростки окрашивали нитросиним тетразолием (NBT) – соединением, которое не проникает внутрь клеток и, относительно специфично взаимодействуя с  $O_2^{\cdot -}$ , образует нерастворимый формазан, имеющий фиолетовую окраску. В результате окрашивания проростков можно выявить области образования АФК, а использование ингибиторов позволит установить, какой из ферментов отвечает за их образование в этих участках. В экспериментах с проростками были использованы  $NaN_3$  и дифенилен иодониум (ДФИ) – ингибиторы пероксидаз и НАДФН-оксидаз соответственно (Bolwell et al., 2002). Формазан интенсивно накапливался в апикальной части корня, но довольно слабо – в побегах (не представлено). Возможная причина такой разницы в NBT-восстанавливающей активности – недостаточная концентрация красителя в апопласте побегов. После обработки ингибиторами пероксидаз или НАДФН-оксидаз окрашенные зоны сокращались по сравнению с контролем. Особенностью данного вида гистохимического окрашивания является его продолжительность по времени – для стабилизации окраски требуется не менее часа, поэтому использование NBT для определения кинетики ДФИ-чувствительного образования  $O_2^{\cdot -}$  не является вполне надежным, так как за время развития окраски,  $O_2^{\cdot -}$  может частично или полностью дисмутировать в другую форму АФК.

Поэтому далее вместо NBT использовали краситель – дигидрородамин 123 (DHR123), который при взаимодействии с  $H_2O_2$  переходит во флуоресцирующую форму родамин 123 (R123). Окисление DHR123 в растворе многократно ускоряется в присутствии пероксидазы и эффективно подавляется ингибитором пероксидаз, но не



**Рис.1.** Локализация АФК-генерирующих активностей в этиолированных проростках кукурузы.

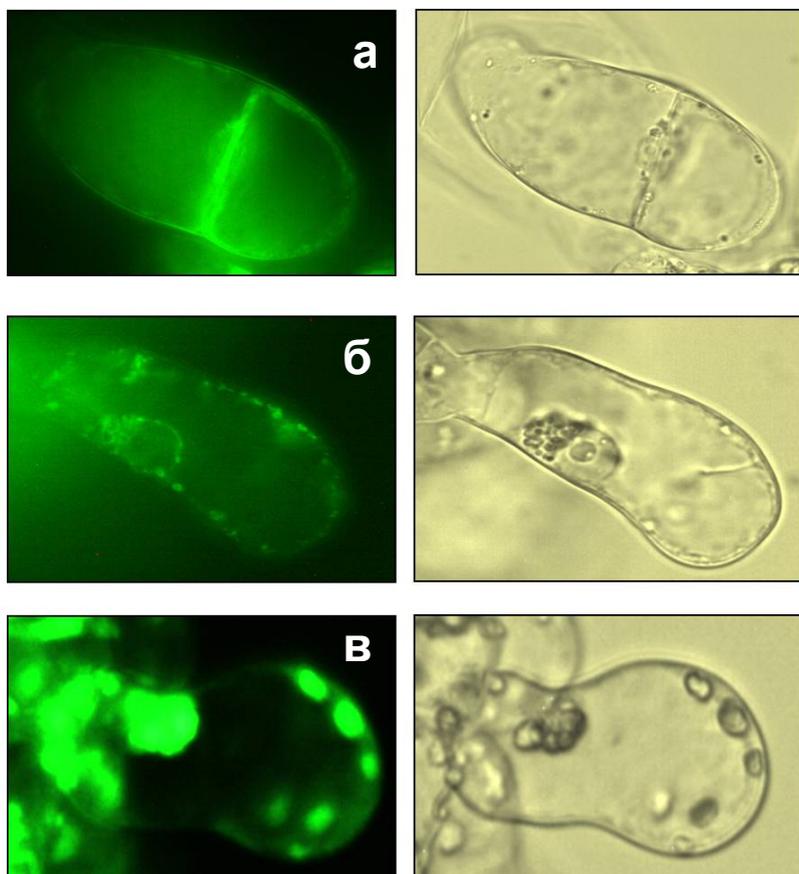
Корни проростков помещали в среду: 5 мМ Mes-KOH (рН 6.0), 1 мМ CaSO<sub>4</sub> и 2 мкг/мл DHR123. В варианте (б) вносили 100 мкМ ДФИ, в варианте (в) – 2 мМ NaN<sub>3</sub>. После вакуумной инфильтрации корни и побеги отделяли от зерновки, помещали в 9 мм чашки Петри и сканировали на Turphoon Trio Plus.

флаavin-содержащих оксидаз. Метод с использованием DHR123 является более чувствительным, чем с NBT, что позволило следить за ходом окрашивания, как корней, так и побегов (рис. 1). Можно видеть, что краситель от корней через зерновку достигает апикальной части coleoptilya, то есть время инфильтрации проростков достаточно для загрузки красителя. Видно, что окрашивание в побегах слабее, чем в корнях. Судя по окрашиванию, в месте отсечения побега от зерновки пероксидазная активность с DHR123 проявляется наиболее интенсивно. Вместе с тем окрашивание корня DHR123 от апикальной части к побегу обнаруживало специфику: в кончике корня оно почти отсутствовало, в то время как с NBT именно эта область наиболее интенсивно прокрашивалась. Совместная загрузка красителя с ингибиторами пероксидаз или НАДФН-оксидаз позволила заключить, что эти ферменты либо различаются по активности, либо по гетерогенности локализации в тканях корня. Так в присутствии NaN<sub>3</sub> (рис. 1в) интенсивность флуоресценции

существенно снижалась по всей длине корня, кроме кончика, в то время как с ДФИ (рис. 1б) интенсивное окрашивание сохранялось по всему корню, кроме апикальной части. Следует отметить, что с помощью инфильтрации DHR123 в побегах не было выявлено гетерогенности по интенсивности зон флуоресценции. Учитывая равномерное и слабое окрашивание побегов по сравнению с корнями, можно предположить, что пероксидазы в побегах распределены относительно гомогенно, так как использованный метод позволяет судить не только о количестве H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, но и об эндогенной пероксидазной активности. Нечувствительность флуоресцентного окрашивания к ДФИ может указывать на отсутствие НАДФН-оксидазы в побегах, что маловероятно, либо свидетельствовать о неприменимости этого подхода для идентификации активности фермента.

## Продукция АФК клетками суспензионной культуры *Arabidopsis thaliana*

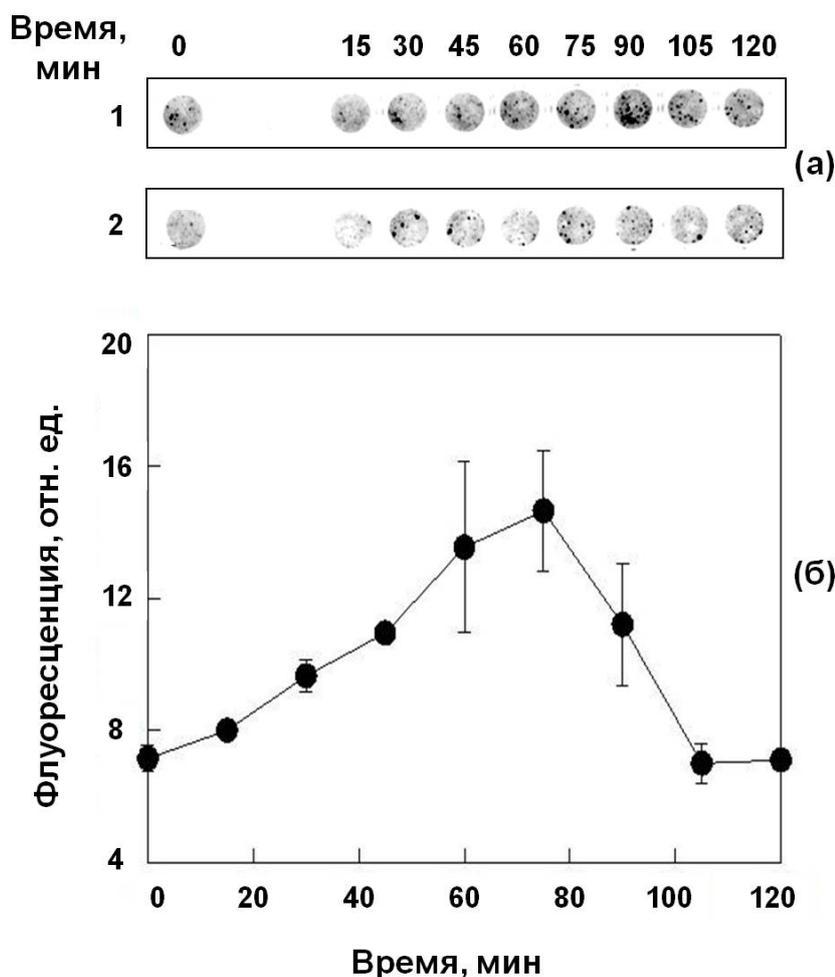
В дальнейших экспериментах использовали клетки суспензионной культуры, имеющие большую площадь поверхности, непосредственно контактирующую с АФК-индикатором. На рис. 2 представлены клетки, окрашенные в присутствии DHR123, R123 или дихлордигидрофлуоресцеин диацетата ( $H_2DCFDA$ ). При окрашивании DHR123 флуоресценция наблюдается в виде ровного слоя, располагающегося преимущественно по периферии клеток, и ее интенсивность выше в местах их контакта. R123 является потенциал-зависимым реагентом, который накапливается в активно работающих митохондриях. Действительно, на рис. 2б можно видеть мелкие флуоресцирующие структуры внутри клеток. Существенно, что DHR123 как субстрат апопластных пероксидаз применялся нами в концентрациях на порядок ниже тех, что обычно используются для визуализации митохондрий в клетках, и за время экспозиции клеток с этим реагентом не выявлялось какого-либо внутриклеточного окрашивания (рис. 2а и 2б). На рис. 2в показана микрофотография клеток, окрашенных проникающим индикатором  $H_2DCFDA$ , переходящим в цитозоле под действием неспецифических эстераз в  $H_2DCF$ , который взаимодействует с АФК неферментативным путем с образованием флуоресцирующего дихлорфлуоресцеина. Характерно, что в этом случае флуоресценция не распределяется в цитозоле гомогенно, а обнаруживается внутри клеточных компартментов, идентификация которых требует специальных исследований (рис. 2а и 2в).



**Рис. 2.** Флуоресцентное окрашивание суспензии клеток в присутствии дигидрорамина 123 (а), родамина 123 (б) и дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (в).

Среду культивирования клеток заменяли на 5 мМ Mes-KOH (pH 6.0) и 1 мМ  $CaSO_4$ . 1 мл плотного объема клеток доводили этой средой до 10 мл. Из него отбирали 3 объема по 1 мл и вносили в конечной концентрации DHR123 – 0.5 (а); R123 – 12.5 (б) и  $H_2DCFDA$  – 5(в) мкМ. Слева – просмотр клеток во флуоресцентном режиме, справа – в проходящем свете.

Целью следующей серии экспериментов была регистрация кинетики образования  $H_2O_2$  в апопласте клеток при смене температуры культивирования и действии ингибиторов НАДФН-оксидаз и пероксидаз. Рис. 3а демонстрирует, что интенсивность флуоресцентного окрашивания в ячейках планшеты возрастала пропорционально времени пребывания клеток при низкой температуре. Видно также, что интенсивность флуоресценции снижалась при наличии в среде культивирования ДФИ. Расчет разницы в интенсивности флуоресценции между контрольными и обработанными клетками дал кривую с максимумом на 60–80 мин охлаждения и возвращением к исходному уровню (рис. 3б). Таким образом, процесс образования  $H_2O_2$  в апопласте клеток, индуцируемый снижением температуры, носит транзиторный характер. Такая транзиторность, скорее



**Рис. 3.** Влияние 10 мкМ дифенилен иодониума на кинетику изменений интенсивности флуоресценции родамина 123 в суспензии клеток *Arabidopsis* (а) при снижении температуры среды культивирования и графическое отображение (б) разности уровней флуоресценции в отсутствие и присутствии ДФИ.

Среду культивирования клеток заменяли на 5мМ Mes-КОН (рН 6.0) и 1 мМ  $CaSO_4$ . 1 мл плотного объема клеток доводили этой средой до 10 мл и переносили по 100 мкл в ячейки планшет, содержащих по 25 мкл среды указанного состава с добавкой ДФИ, конечная концентрация которого после внесения клеток составила 10 мкМ (2), или без него (1). Ячейки по очереди перемещали на  $6^{\circ}C$  на время, указанное на графике. После 2 ч эксперимент завершали и во все варианты вносили DHR 123 в конечной концентрации 0.2 мкг/мл. Через 15 мин образцы сканировали на Turphoon Trio Plus.

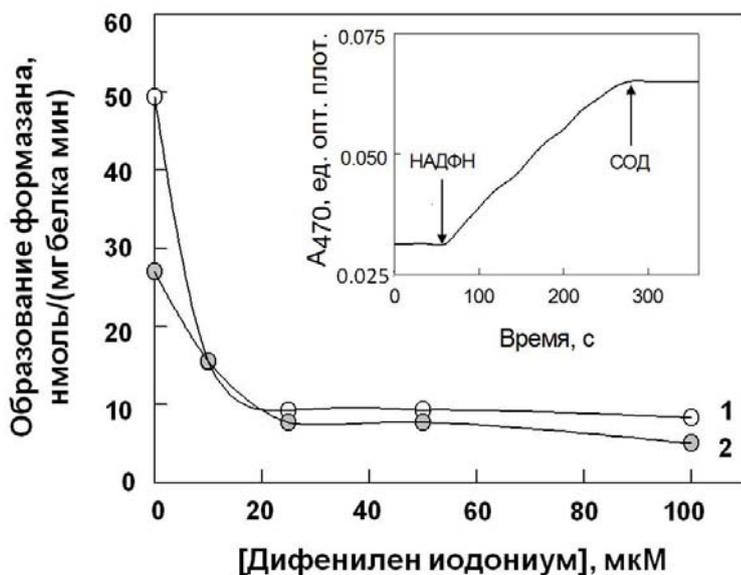
всего, отражает активность НАДФН-оксидазы, поскольку чувствительна к ДФИ. Не исключено, что определенный вклад в усиление продукции АФК вносит и активность внеклеточных пероксидаз. В пользу этого вывода свидетельствовало практически полное ингибирование окрашивания в планшетах в присутствии  $\text{NaN}_3$  в этот отрезок времени (не представлено).

Вместе с тем, вопрос об источниках генерации  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{O}_2^{\cdot-}$  при снижении температуры выращивания растений остается не до конца ясным. Разграничение участия пероксидазы (РОХIII) и НАДФН-оксидазы плазмалеммы в генерации АФК в апопласте представляет определенную проблему. Это связано с тем, что, пероксидазы РОХIII-семейства могут не только окислять субстраты с использованием  $\text{H}_2\text{O}_2$ , но также участвовать в продукции АФК (вплоть до  $\text{HO}^{\cdot}$ ) в оксидазном цикле фермента (Berglund *et al.*, 2002). Однако до сих пор не ясно, какое соединение в апопласте клеток растений служит восстанавливающим субстратом для пероксидаз (Kawano, 2003). Тем не менее, можно найти подход к оценке вклада этих ферментов в образование АФК в апопласте. Факторами разграничения могут быть разная субстратная специфичность и чувствительность к ингибиторам, а также различие в молекулярной организации ферментов. Поскольку НАДФН-оксидаза является единственным интегральным мембранным белком, то для более детального исследования условий ее активации работа была продолжена на изолированных плазматических мембранах.

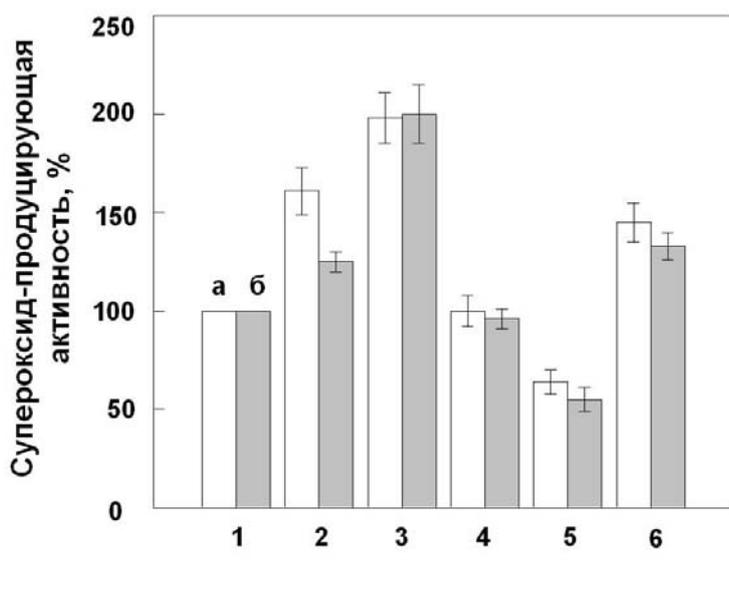
### **Супероксид-продуцирующая активность плазмалеммы**

Для обнаружения активности НАДФН-оксидазы были предприняты эксперименты, в которых в присутствии низких концентраций ДФИ – ингибитора флавин-содержащих ферментов регистрировалась НАДФН-зависимая продукция  $\text{O}_2^{\cdot-}$  плазмалеммой, изолированной из корней и побегов контрольных проростков (рис. 4). Чувствительность реакции образования супероксида к ДФИ в низких концентрациях используется в качестве критерия активности ФАД-содержащих оксидаз (Cross and Jones, 1986).

Для оценки супероксид-продуцирующей активности плазмалеммы регистрировали кинетику скорости нарастания в растворе абсорбции формазана при добавлении НАДФН (рис. 4, врезка). Растворимый формазан образуется в результате восстановления ХТТ в присутствии  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Из рис. 4 видно, что образование формазана из ХТТ запускается внесением НАДФН. Реакция связана с образованием супероксид-анион радикала, поскольку полностью блокируется внесением в реакционную среду супероксиддисмутазы. НАДФН-оксидазная активность плазмалеммы побегов контрольных проростков составляла  $50 \pm 9$  нмоль формазана/(мг·белка·мин), что в 1.5 раза выше активности, обнаруженной в плазмалемме корней. При этом  $\text{EC}_{50}$  ингибирования активности дифенилен иодониумом составила 5.1 мкМ для побегов и 9.05 мкМ для корней. Эффективность ингибирования ДФИ достигала 70% от



**Рис. 4.** Концентрационная зависимость ингибирования дифенилен иодониумом НАДФН-оксидазной активности плазмалеммы, изолированной из побегов (1) и корней (2) 5-дневных этиолированных проростков кукурузы. На врезке представлена кинетика супероксид-продуцирующей активности плазмалеммы побегов и ее ингибирование внесением супероксиддисмутазы (100 ед./мл). В 1-см кювету спектрофотометра вносили 2 мл буфера, содержащего 10 мМ Трис-Мес (рН 7.5), 300 мМ сахарозу, 0.25 мМ ХТТ и 30–50 мкг мембранного белка. Реакцию запускали внесением 0.2 мМ НАДФН.

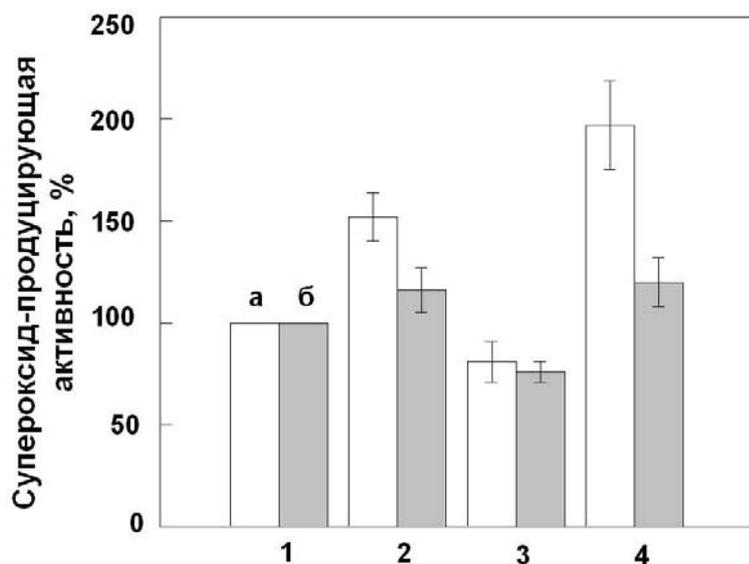


контроля. Это указывает на то, что большая часть продукции супероксид-анион радикала плазмалеммой связана с активностью НАДФН-оксидазы.

На рис. 5 представлены некоторые характеристики НАДФН-оксидазной активности плазмалеммы корней и побегов, а именно: чувствительность к ингибитору пероксидаз  $\text{NaN}_3$ , активация ионами кальция, доступность субстрата, обусловленная ориентацией везикул, и влияние осмотичности среды измерения. Из представленных данных видно, что  $\text{O}_2^-$ -продуцирующая активность не обнаруживала чувствительности к  $\text{NaN}_3$ . Это указывает, в первую очередь, на отсутствие существенной активности пероксидаз в

**Рис. 5.** Влияние 5 мМ  $\text{CaCl}_2$  (2), 0.05% Brij 58 (3), 2.5 мМ  $\text{NaN}_3$  (4) или осмолярности среды измерения (5 и 6) на НАДФН-оксидазную активность плазмалеммы, изолированной из побегов (а) и корней (б) 5-дневных этиолированных проростков кукурузы, выращенных при 25°C. В измерительную кювету с мембранами вносили добавки и инкубировали в течение 5 мин. Для оценки влияния тоничности среды мембраны вносили в буфер, содержащий 0.4 (5) или 0.1М (6) сахарозу. Реакцию запускали внесением НАДФН в конечной концентрации 0.2 мМ. За 100% принимали активность плазмалеммы побегов или корней контрольных вариантов (1).

выделяемых фракциях плазмалеммы. При обработке мембран Brij 58 – детергентом, «выворачивающим» все везикулы цитоплазматической стороной наружу, измеряемая активность выросла примерно в 2 раза, что указывает на локализацию каталитического центра, связывающего НАДФН, с внутренней стороны плазмалеммы. Измерения, проведенные в средах с различной осмолярностью, показали, что НАДФН-оксидазная активность чувствительна к ее изменению – увеличивается при снижении концентрации осмотика и, наоборот, уменьшается при увеличении. В присутствии ионов кальция  $O_2^{\cdot-}$ -продуцирующая активность возросла примерно в 1.5 раза, что совпадает с данными (Keller *et al.*, 1998; Sagi and Fluhr, 2001; Ogasawara *et al.*, 2008). рН-зависимость НАДФН-оксидазной активности плазмалеммы имела оптимум в слабощелочной области с максимумом при рН 7.5 (не представлено). На основании этого можно заключить, что каталитический центр фермента ориентирован в цитозоль, поскольку для апопласта характерны значительно более низкие значения рН. Таким образом, образование  $O_2^{\cdot-}$  плазмалеммой в присутствии НАДФН связано именно с активностью НАДФН-оксидазы.



**Рис. 6.** Изменение НАДФН-оксидазной активности плазмалеммы побегов (а) и корней (б) после снижения температуры выращивания от 25 до 6°C. Температуру в камере с 5-дневными этиолированными проростками снижали с 25 до 6°C на 2 (2) или 24 ч (3). При этой же температуре отделяли побеги и корни от зерновки и использовали для получения плазмалеммы. В контрольном варианте (1) проростки выращивали при 25°C и также отрезали корни и побеги. Отсечение проводили в течение 15 мин во всех вариантах. В серии экспериментов после отделения от зерновки корни и побеги выдерживали в течение 1 ч при 25°C (4). За 100% принимали активность плазмалеммы побегов или корней контрольных вариантов (1).

В следующей серии экспериментов исследовали возможность активации НАДФН-оксидазы плазмалеммы после изменения температуры выращивания проростков, а также влияние «раневого» стресса (рис. 6). Видно, что кратковременное (2 ч) низкотемпературное воздействие активировало НАДФН-оксидазную активность до 1.5 раз относительно контроля, причем такие изменения более выражены на мембранах побегов. После продолжительного (24 ч) охлаждения проростков  $O_2^{\cdot-}$ -продуцирующая активность плазмалеммы снижалась по отношению к контролю. Характер эффектов суммарного изменения содержания перекиси

водорода в проростках и клетках в ответ на кратковременное низкотемпературное воздействие и продукция  $O_2^{\cdot-}$  плазмалеммой оказалась идентичным, т.е. кратковременным и транзиторным.

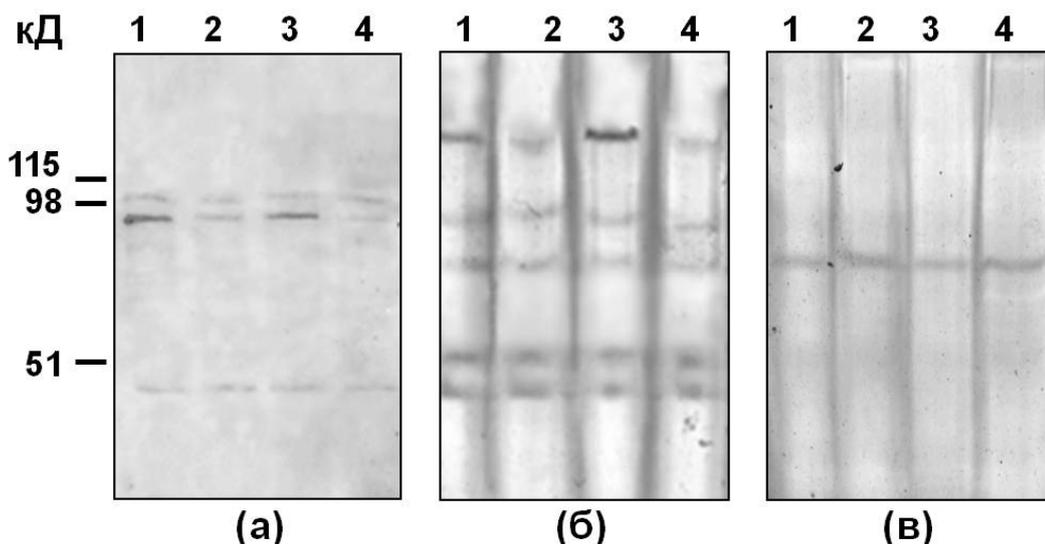
Однако прирост  $O_2^{\cdot-}$ -продуцирующей активности мембран после снижения температуры выращивания оказался существенно ниже, чем для плазмалеммы, выделенной из проростков, подвергнутых «раневому» стрессу (рис. 6) и составлял примерно 200 % от активности плазмалеммы, выделенной сразу же после отделения корней от побегов. Этот уровень генерации  $O_2^{\cdot-}$  не обязательно связан с НАДФН-оксидазой, поскольку при повреждении растительных тканей могут активироваться другие АФК-генерирующие системы примембранной области (Copa *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2007; Cosio and Dunand, 2009).

Транзиторность изменений НАДФН-оксидазной активности при охлаждении проростков предполагает как активацию, так и инактивацию фермента. Пока не ясно, связано ли это с ассоциацией/диссоциацией ферментного комплекса НАДФН-оксидазы с регуляторными белками по аналогии с оксидазой фагоцитов (Bedard and Krause, 2007; Wong *et al.*, 2007), либо с увеличением/уменьшением содержания молекул самого фермента в плазмалемме посредством везикулярного транспорта. Механизмы транзиторности активации пока не совсем понятны, хотя интенсивно исследуются.

### **Идентификация НАДФН-оксидазы среди белков плазмалеммы с супероксид-продуцирующей активностью**

Иммунологическое исследование белков плазмалеммы с антителами, полученными против 50-ти аминокислотного С-терминального пептида НАДФН-оксидазы фагоцитов представлено на рис. 7а. Антитела реагировали с белками, молекулярные массы которых составляли 48, 88 и 98 кД. Массы двух последних соответствуют массам белков, кодируемых генами *rboh* растений (Fluhr, 2009). Также видно, что интенсивность иммуноокрашивания белков плазмалеммы побегов выше, чем корней. Это может свидетельствовать о более высоком содержании НАДФН-оксидаз в надземных частях проростков и быть причиной того, что  $O_2^{\cdot-}$ -продуцирующая активность плазмалеммы побегов в 1.5 раза выше, чем корней. Судя по интенсивности иммуноокрашивания содержание НАДФН-оксидаз после изменения температуры выращивания в плазмалемме корней и побегов не изменилось. Это предполагает, что усиление продукции  $O_2^{\cdot-}$  плазмалеммой не обусловлено увеличением количества молекул фермента в мембране, а скорее связано с посттрансляционными модификациями НАДФН-оксидазы.

В последующих экспериментах было проведено сопоставление молекулярных масс белков, выявляемых антителами, с белками, способными восстанавливать NBT в геле в присутствии НАДФН. Для этого после проведения денатурирующего электрофореза белки в гелях ренатурировали и выявляли полосы с максимальной



**Рис. 7.** Иммунодетекция НАДФН-оксидазы (а) плазмалеммы, изолированной из побегов (1 и 3) или корней (2 и 4) кукурузы, и супероксид-продуцирующая активность в геле (б и в) после снижения температуры выращивания 5-дневных этиолированных проростков кукурузы.

Температуру в камере снижали с 25 до 6°C на 2 ч (3 и 4), в контрольном варианте (1 и 2) проростки не подвергали охлаждению. Белки плазмалеммы разделяли электрофорезом в денатурирующих условиях. На дорожку наносили 7 (а) или 20 мкг (б и в) белка. После ренатурации гели инкубировали 20 мин в растворе с 2 мМ NBT в отсутствие (б) или в присутствии (в) 25 мкМ ДФИ, реакцию образования формазана запускали внесением НАДФН. Для иммунодетекции использовали СУВВ-антитела, для визуализации – меченые флуоресцеином вторичные антитела.

продукцией формазана. Как видно на рис. 7б, таких полос оказалось по пять в плазмалемме корней и побегов. Они имели молекулярные массы 130, 88, 74, 51 и 48 кД. При этом белки с молекулярной массой 130 кД и 48 кД были наиболее интенсивно окрашены, но только белки с молекулярной массой 88 и 48 кД детектировались антителами. Кроме того, инкубирование геля с дифенилен иодониумом вызывало исчезновение всех НАДФН-окисляющих полос за исключением полосы с молекулярной массой 74 кД, интенсивность окрашивания которой формазаном в этих условиях даже повышалась (рис. 7в). Из представленных результатов следует, что только 88 кД белок в плазмалемме побегов и корней проростков кукурузы может идентифицироваться как белок gboh-семейства, так как только он выявляется с антителами и обнаруживает зависимое от ДФИ и НАДФН образование супероксид-анион радикала.

Максимальную  $O_2^-$ -продуцирующую и ингибируемую ДФИ активность в геле проявляли белки с молекулярной массой в области 130 кД (рис. 7б и 7в). Однако они не реагировали с антителами против каталитической области белков семейства NOX. Причина этого может состоять в недоступности сайта связывания антител у фермента, принявшего каталитически наиболее активную конформацию. Кроме того, недоступность сайта связывания с антителами может объясняться его блокированием

в результате агрегации гидрофобных белков мембран, в том числе, и НАДФН-оксидаз, при солюбилизации и проведении денатурирующего электрофореза. И наконец, не исключено, что белковая полоса с этой молекулярной массой вообще не содержит НАДФН-оксидазу.

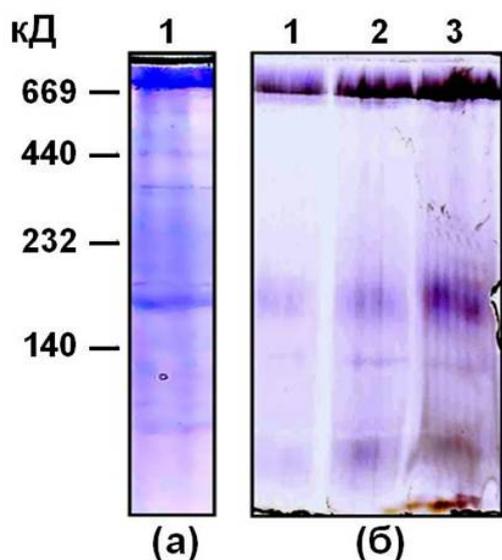
Как сообщают Oda с соавт. (2010), активная конформация для НАДФН-оксидазы представляет собой димер, мономеры которого взаимодействуют между собой посредством С-терминальных цитоплазматических доменов, и такое взаимодействие зависит от присутствия ионов  $\text{Ca}^{2+}$ .

Учитывая все сказанное выше, было сделано предположение о том, что в непосредственном контакте с молекулой НАДФН-оксидаз должны находиться определенные белки, от которых зависит ее функциональная активность. Одним из таких известных белков является малая ГТФаза (Wong et al., 2007), и возможно, что она не единственный партнер в окружении НАДФН-оксидазы в плазмалемме. Для идентификации таких партнеров в нашей работе был использован нативный электрофорез, когда электрофоретическому разделению подвергаются солюбилизированные в присутствии неионных детергентов белковые комплексы мембран и не нарушаются белок-белковые связи.

### **Значение белок-белковых взаимодействий для активности НАДФН-оксидазы плазмалеммы**

На первом этапе была предпринята попытка выявить в плазматической мембране белковые комплексы с  $\text{O}_2^-$ -продуцирующей активностью (рис. 8). С этой целью был использован метод нативного электрофореза высокого разрешения, характерной особенностью которого является введение в катодной буфер ионного детергента 0.05% дезоксихолата для придания заряда гидрофобным белковым комплексам мембран (Witting et al., 2007).

На рис. 8а представлены результаты электрофореза, где хорошо различимо примерно 10 белковых комплексов, окрашенных Coomassie R-250. Справа

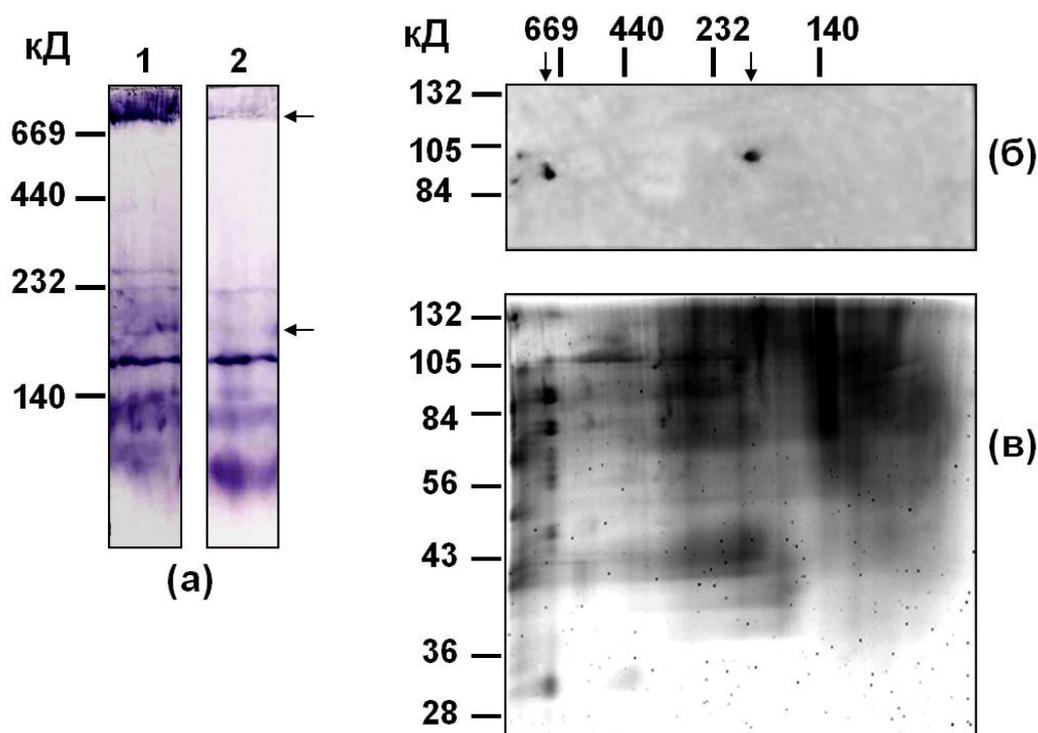


**Рис. 8.** Белковые комплексы плазмалеммы, разделенные нативным электрофорезом (а), выявление комплексов, обладающих супероксид-продуцирующей активностью (б), и ее зависимость от количества наносимого на дорожку белка.

Плазмалемму солюбилизировали в присутствии 1%-ного додецилмальтозида в отношении детергент/белок 5:1. На дорожку наносили 50 (1), 100 (2) или 200 (3) мкг белка. Гель (а) окрашен Coomassie R-250. Для определения супероксид-продуцирующей активности в геле (б) использовали NBT и НАДФН в качестве субстрата.

представлена концентрационная зависимость образования  $O_2^{\cdot -}$  комплексами в геле. Видно, что с увеличением количества нанесенного белка, увеличивается интенсивность окрашивания формазаном полос в геле. Это подтверждает, что образование супероксида в присутствии НАДФН осуществляется ферментативным путем (рис. 8б). По результатам окрашивания на супероксид, в плазматической мембране выявляется, по крайней мере, четыре белковых комплекса с разной скоростью восстановления NBT, причем высокомолекулярный комплекс ( $\geq 669$  кД) проявляет самую высокую  $O_2^{\cdot -}$ -продуцирующую активность.

Для идентификации НАДФН-оксидазы в белковых комплексах после денатурирующего электрофореза второго направления использовали вестерн-блот анализ с антителами против gp91phox (рис. 9). В белковом комплексе с массой выше 669 кД были обнаружены белки, проявляющие кросс-реактивность с антителами. Молекулярная масса этих белков соответствовала массе белков gboh-семейства. Также из рисунка 9 видно, что образование супероксида высокомолекулярным



**Рис. 9.** Выявление НАДФН-оксидазы в ДФИ-чувствительных супероксид-продуцирующих белковых комплексах плазмалеммы.

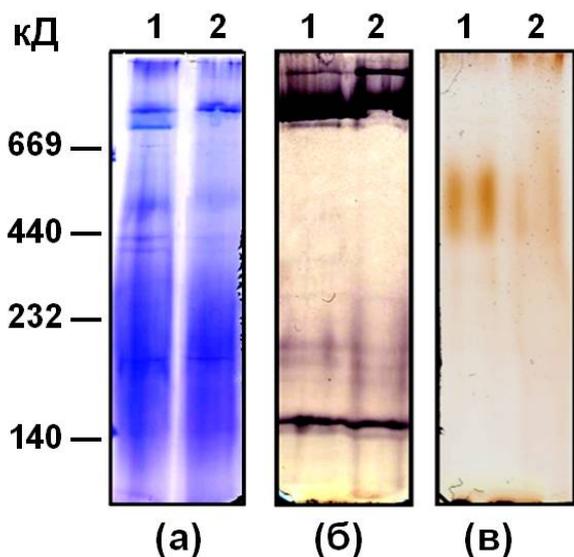
Плазмалемму солибилизировали в присутствии 1%-ного додецилмальтозида в отношении детергент/белок 5:1 и разделяли нативным электрофорезом на белковые комплексы. Гель разрезали на дорожки. Одну часть дорожек переносили в растворы, содержащие 100 мМ Трис-НСI (рН 7.8) с 2 мМ NBT, в один из которых вносили 25 мкМ ДФИ (2), а в другой – нет (1). Реакцию образования формазана запускали внесением НАДФН (а). Другую часть дорожек инкубировали в денатурирующем буфере и проводили электрофорез второго направления по Laemmli (в). После электрофореза вестерн-блот анализом выявляли НАДФН-оксидазу (б). Для иммунодетекции использовали СУВВ-антитела, для визуализации – меченые флуоресцеином вторичные антитела.

комплексом ингибируется ДФИ – инкубация геля в буфере с ДФИ заметно уменьшала осадок формазана в этой полосе. Кроме того антитела против gp91phox взаимодействовали с белком из комплекса с массой  $\leq 232$  кД. Однако этот низкомолекулярный комплекс характеризовался существенно более слабой способностью к НАДФН-зависимому восстановлению NBT, которое полностью блокировалось ДФИ.

Таким образом, впервые обнаружено, что уровень активности растительных gp91phox-белков зависит от их нахождения в комплексе с другими мембранными белками, пока еще не идентифицированными.

В последнее время идет активная дискуссия о том, связана ли  $O_2^{\cdot-}$ -продуцирующая активность плазмалеммы с функционированием исключительно НАДФН-оксидазы или в этот процесс могут быть вовлечены и другие белки. Наиболее часто считают, что такими белками являются пероксидазы POXIII (Bindschedler et al. 2006). Более того, некоторые исследователи предполагают возможность сопряжения между этими белками, когда продукт одного фермента является субстратом для другого (Luthje et al., 2009). По мнению других, такое сопряжение между  $O_2^{\cdot-}$ -продуцирующей НАДФН-оксидазой и POXIII-пероксидазной чрезвычайно опасно и вряд ли возможно, поскольку в присутствии  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$  железо гема пероксидаз может выступать катализатором в реакции Fenton с генерацией  $HO^{\cdot}$  (Heyno et al., 2011).

Для проверки этих альтернатив был проведен сравнительный анализ  $O_2^{\cdot-}$ -продуцирующей и пероксидазной активностей белковых комплексов плазмалеммы побегов 5-дневных этиолированных проростков кукурузы после их разделения нативным электрофорезом высокого разрешения (рис. 10). В экспериментах для солюбилизации использовали два типа детергентов: додецилмальтозид и дигитонин, различающихся по способности разрушать липид-липидные и/или липид-белковые контакты, что позволяет получать мицеллы, содержащие разный набор белковых



**Рис. 10.** Белковые комплексы плазмалеммы, разделенные нативным электрофорезом (а), и выявление среди них комплексов с супероксид-продуцирующей (б) и пероксидазной активностями (в).

Плазмалемму солюбилизировали в присутствии 1%-ных додецилмальтозида (1) или дигитонина (2) в отношении детергент/белок 5:1. Гель (а) окрашен Coomassie R-250. Для выявления комплексов с супероксид-продуцирующей активностью использовали NBT и НАДФН в качестве субстрата (б), с пероксидазной активностью – диаминобензидин с  $H_2O_2$  (в). На каждую дорожку геля нанесено по 100 мкг белка.

комплексов и липидов (Reisinger and Eichacker, 2008).

Комплекс с кажущейся массой выше 669 кД, проявляющий максимальную супероксид-продуцирующую активность в присутствии НАДФН, выявлялся после солюбилизации обоими детергентами (рис. 10б). Пероксидазная активность, регистрируемая по окислению ДАБ в присутствии экзогенной  $H_2O_2$ , локализовалась в геле в области  $\geq 440$  кДа. Скорость образования продукта окисления зависела от использованного детергента и была выше в случае додецилмальтозида. При этом после солюбилизации дигитонином обнаруживалась дополнительная полоса с пероксидазной активностью и кажущейся молекулярной массой  $\geq 900$  кДа (рис. 10в).

Несовпадение молекулярных масс белковых комплексов плазмалеммы с пероксидазной и  $O_2^{\cdot -}$ -продуцирующей активностями указывает на то, что НАДФН-оксидаза и пероксидаза находятся в разных белковых комплексах и дистанцированы друг от друга. Это не способствует возможности донирования электрона от железа пероксидазы на  $O_2^{\cdot -}$  и образования  $HO^{\cdot}$ . Не исключено, что находясь на расстоянии друг от друга, эти ферменты могут функционировать сопряжено, при этом образующаяся в результате реакции дисмутации перекись становится промежуточной формой их взаимодействия.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стационарные концентрации АФК в клетках растений по сравнению с животными существенно выше (Queval *et al.*, 2008), при этом растения обладают значительной устойчивостью к этим молекулам (Halliwell, 2006). Одной из причин такой устойчивости является развитость сети антиоксидантных ферментов и метаболитов, участвующих в поддержании АФК-гомеостаза (Mittler *et al.*, 2004). Повышение концентрации АФК, с которой не справляется система антиоксидантной защиты, способно нанести вред как отдельным биомолекулам, так и клеточным структурам. С другой стороны, колебание концентрации АФК в достаточно узком диапазоне обеспечивает функционирование работы систем регулирования клеточных процессов, таких как апикальный рост (Foreman *et al.*, 2003), переход от деления к дифференцировке (Tsukagoshi *et al.*, 2010), работа устьиц (Kwak *et al.*, 2003), ионный гомеостаз (Ma *et al.*, 2012). Очевидно, что мишени, способные подвергаться регулированию АФК, должны иметь свой определенный уровень сродства к этим молекулам. Это предполагает, что для осуществления регулирующей роли АФК важен не обобществленный пул АФК в растении, а их локальные концентрации в определенных клеточных компартментах. Одним из таких компартментов с высокой концентрацией АФК является внеклеточный матрикс – апопласт, где работают АФК-генерирующие ферменты.

Для образования АФК с участием секретируемых ферментов, таких как оксалаксоксидазы, аминоксоксидазы и пероксидазы, в апопласт должны поступать и их

субстраты, которые транспортируются через плазматическую мембрану с участием переносчиков. В этом отношении НАДФН-оксидаза редко испытывает дефицит субстрата – НАДФН, поскольку он образуется в цитозоле в восстановительном пентозофосфатном цикле и акцептируется с цитоплазматической стороны плазмалеммы.

При функциональной идентификации НАДФН-оксидазы в изолированной плазмалемме существует проблема корректной оценки ее активности по причине существования интегрированных и ассоциированных с этой мембраной оксидаз, для которых восстанавливающие субстраты в условиях эксперимента становятся одинаково доступными. Нами было показано, что такая часть супероксид-продуцирующих активностей плазмалеммы, не имеющих отношения к НАДФН-оксидазе, может составлять около 30 %, что подтверждается ингибированием ДФИ, который полностью не блокировал образование  $O_2^{\cdot -}$  в присутствии НАДФН (рис. 4).

Конститутивная активность (рис. 7) отличает НАДФН-оксидазу плазмалеммы растений от оксидазы фагоцитов, активация которой требует ассоциации мембранных субъединиц gp91phox и p22phox с цитоплазматическими белками (Vignais, 2002). Однако выявление нами НАДФН-оксидазы в одном из высокомолекулярных комплексах плазмалеммы с максимальной супероксид-продуцирующей активностью (рис. 9), может указывать на необходимость контакта этого фермента с белками, регулирующими его активность. Кроме того, не исключено, что такой высокомолекулярный комплекс может содержать белки, которые являются мишенями регуляции самой НАДФН-оксидазой.

Скорость продукции  $O_2^{\cdot -}$  плазмалеммой в присутствии НАДФН не была одинаковой, а менялась по принципу транзиторности в зависимости от времени пребывания проростков при низкой температуре (рис. 6). Такая динамика изменений может быть показателем того, что повышение уровня вырабатываемого НАДФН-оксидазой супероксида обусловлено необходимостью инициации запуска каскада регуляторных реакций, в которых АФК играют роль сигнальных молекул. Спад в образовании  $O_2^{\cdot -}$  после 24 ч охлаждения можно рассматривать как свидетельство того, что потребность в них отпала, так как цепь регуляторных реакций приведена в действие.

Очевидно, что НАДФН-оксидаза не может непосредственно воспринимать сигнал об изменении окружающей температуры, поскольку таким сенсором, скорее всего, является липидный бислой мембран, который изменяет свое фазовое состояние путем повышения или снижения вязкости (Hasel, 1995), вследствие чего изменяется активность мембранных белков, чувствительных к таким изменениям. Как показано в ряде работ, к такому типу белков относятся  $Ca^{2+}$ -каналы (Demidchik *et al.*, 2003; Mori and Schroeder, 2004; Kurusu *et al.*, 2012). Их активация способствует входу внутрь клетки ионов  $Ca^{2+}$ , которые, связываясь с  $Ca^{2+}$ -связывающими сайтами НАДФН-

оксидазы, приводят ее в активное состояние. Таким образом, предполагается, что активация фермента является опосредованной.

## ВЫВОДЫ

- 1) Снижение температуры выращивания проростков кукурузы от 25 до 6°C приводило к кратковременному, в течение 2–3 ч, увеличению содержания перекиси водорода в тканях с последующим восстановлением ее исходного уровня через 24 ч.
- 2) Изменение ДФИ-зависимой продукции перекиси водорода в апопласте культивируемых клеток арабидопсиса в ответ на снижение температуры также носило транзиторный характер.
- 3) НАДФН-оксидазная активность изолированной плазмалеммы увеличивалась относительно исходного уровня в первые часы снижения температуры и понижалась при дальнейшем охлаждении проростков.
- 4) Транзиторный характер изменений содержания АФК в проростках, в апопласте культивируемых клеток и супероксид-продуцирующей активности плазмалеммы при изменении температуры выращивания свидетельствуют о возможности участия НАДФН-оксидазы в системе реакций клеточного сигналинга.
- 5) Сопоставление молекулярных масс белков с ДФИ-ингибируемой супероксид-продуцирующей активностью в геле и результатов иммунодетекции после денатурирующего электрофореза выявило присутствие в плазмалемме побегов и корней проростков двух белков NOX-семейства, из которых лишь один проявлял НАДФН-оксидазную активность.
- 6) В результате нативного электрофореза высокого разрешения в плазмалемме выявлен белковый комплекс с кажущейся молекулярной массой около 700 кД, который содержал НАДФН-оксидазу, обладал ДФИ-ингибируемой супероксид-продуцирующей, но не пероксидазной активностью.
- 7) Несовпадение молекулярных масс белковых комплексов плазмалеммы с пероксидазной и супероксид-продуцирующей активностями указывает, скорее всего, на отсутствие пероксидазы в ближайшем окружении НАДФН-оксидазы, но не исключает возможности их функционального взаимодействия через пул перекиси водорода.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. **Пиотровский М.С.**, Жесткова И.М., Трофимова М.С. (2008) Активность НАДФН-оксидазы плазмалеммы клеток корней и побегов проростков кукурузы при абиотическом стрессе. *Международная научная конференция «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений» (тезисы докладов)*, Екатеринбург, Россия, с. 332–333.
2. **Пиотровский М.С.** (2008) Функциональная идентификация НАДФН-оксидазы плазмалеммы растительных клеток. *Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2008» (тезисы докладов)*, Москва, Россия, с. 194–195.
3. **Piotrovsky M.S.** (2009) Activity of plasma membrane NADPH-oxidase from etiolated maize seedlings under lowering of growth temperature. *Book of Abstr., International Conference on Biomolecular Science in honor of the 75<sup>th</sup> anniversary of the birth of professor Yuri Ovchinnikov*, Moscow-Puschino, Russia, p. 189.
4. **Пиотровский М.С.**, Шевырева Т.А., Жесткова И.М., Трофимова М.С. (2010) Транзиторность активации НАДФН-оксидазы плазмалеммы при снижении температуры выращивания проростков кукурузы и клеток суспензионной культуры сахарной свеклы. *Всероссийский симпозиум «Растение и стресс» (тезисы докладов)*, Москва, Россия, с. 281–282.
5. **Пиотровский М.С.**, Шевырева Т.А., Жесткова И.М., Трофимова М.С. (2011) Активация НАДФ-Н-оксидазы плазмалеммы при действии низких положительных температур на этиолированные проростки кукурузы. *Физиология растений*, **58**, 234–242.
6. Shevereva T.A., **Piotrovsky M.S.**, Zhestkova I.M, Trofimova M.S., Nosov A.V. (2011) Identification of plasmalemma protein complexes with peroxidase and superoxide producing activities by high resolution clear native electrophoresis. *Book of Abstr., 10<sup>th</sup> International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants*, Budapest, Hungary, p. 30.
7. **Пиотровский М.С.**, Шевырева Т.А., Жесткова И.М., Трофимова М.С. (2011) Супероксид-продуцирующие белковые комплексы плазмалеммы, содержащие НАДФН-оксидазу. *VII Съезд Общества физиологов растений России (тезисы докладов)*, Нижний Новгород, Россия, с. 561.