

АКТИВНОСТЬ ИЗОФОРМ КАТАЛАЗЫ ПРИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ ЗАКАЛИВАНИИ КОНТРОЛЬНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ГЕНОМ *DES A* Δ 12-АЦИЛ-ЛИПИДНОЙ ДЕСАТУРАЗЫ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ

Нарайкина Н.В., Трунова Т.И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия, trunova@ippras.ru

Аннотация. Изучали изменения общей активности каталазы, осуществляющей энергонезависимое разложение пероксида водорода (H_2O_2) и ее изоформ при низкотемпературном закаливании картофеля, а также влияние Δ 12-ацил-липидной десатуразы цианобактерий на эти процессы. В листьях трансформированных и контрольных растений выявлены две изоформы каталазы КАТ1 и КАТ2, из которых вклад КАТ1 в суммарную активность фермента был существенно выше, чем КАТ2. В процессе закаливания активность каталазы трансформантов превышала таковую у контрольных растений.

Ключевые слова: десатураза, каталаза, картофель, низкие температуры, перекись водорода, трансформированные растения, устойчивость

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-535-539

Окислительный стресс (ОС) рассматривается как один из основных факторов повреждения растений низкими температурами (особенно выраженный у чувствительных к холоду теплолюбивых растений) и приводящий к повышению уровня активных форм кислорода (АФК), в том числе и пероксида водорода (H_2O_2), что может приводить к индукции перекисного окисления липидов (ПОЛ) [Мерзляк, 1989; Лукаткин, 2002; Sharma et al., 2012 и др.]. В отличие от теплолюбивых, холодостойкие растения в условиях гипотермии более устойчивы к ОС, однако причины, препятствующие повышению у них интенсивности ОС и ПОЛ, изучены недостаточно.

Известно, что уровень ОС и ПОЛ, с одной стороны, определяется скоростью генерации АФК в электрон-транспортных цепях органелл, которая существенно зависит от текучести мембран, а, следовательно, от содержания полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в мембранных липидах, а с другой, – емкостью антиоксидантной защитной системы, состоящей, в том числе, из ферментов, в числе которых каталаза играет важную роль в инактивации H_2O_2 . В связи с этим цель настоящей работы состояла в изучении происходящих при закаливании изменений в содержании H_2O_2 и активности нейтрализующей его каталазы и ее изоформ как у контрольных растений картофеля, так и трансформированных геном *desA* Δ 12-ацил-липидной десатуразы и, следовательно, обогащенных мембранными липидами с повышенным содержанием ПНЖК [Маали и др., 2007; Демин и др., 2013]. Известно, также, что содержание ПНЖК в мембранных липидах может существенно влиять на генерацию супероксид-радикала ($O_2^{\cdot-}$) и соответственно активность субстрат-зависимого расщепляющего его фермента – супероксиддисмутазы (СОД), продуктом которого является H_2O_2 [Нарайкина и др., 2014].

Объектом исследования служили растения картофеля (*Solanum tuberosum* L., сорт Десница – контроль), трансформированные конструкцией, несущей ген *desA*, кодирующий Δ 12-ацил-липидную десатуразу цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*desA*-licBM3 растения). Методика конструирования экспрессионного вектора и процедура получения трансформированных растений изложены ранее [Маали и др., 2007]. Растения размножали вегетативно и выращивали 8 недель при еженедельном внесении удобрения «Кемира-Люкс» (Россия), температуре $22 \pm 0,5^\circ C$, 16-ч световом дне (освещенность 100 мкмоль квантов/($m^2 \cdot c$)). Закаливание проводили на свету при

температуре $5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ в течение 6 суток, согласно нашим предыдущим работам [Синькевич и др., 2011].

Изменения устойчивости при закаливании растений картофеля определяли прямым методом промораживания при температурах от 0 до -3°C с разной продолжительностью действия, а также косвенным методом путем измерения выхода электролитов из клеток листьев.

Для определения общей активности каталазы, а также изоферментов каталазы с использованием нативного электрофореза выделяли белок в среде выделения, содержащей 50 мМ Трис- HCl (pH 7.6), 3 мМ ЭДТА, 250 мМ сахарозу, 3.6 мМ цистеин, 5 мМ аскорбиновую кислоту, 3 мМ MgCl_2 , 2 мМ ДТТ, 2 мМ ФМСФ. Супернатант очищали на колонках PD-10 midiTrap G-25 (“GE Healthcare”, США).

Общую активность каталазы (КФ 1.11.1.6) измеряли по скорости реакции разложения H_2O_2 , согласно методике [Kumar, Knowles, 1993]. Для определения изоферментного состава каталазы проводили электрофорез по методу [Davis, 1964] в 10% полиакриламидном геле при температуре 4°C в течение 20 ч при напряжении 80 В. Гель окрашивали по методу, основанному на восстановлении гексацианоферрата (III) калия ($\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$) перекисью водорода до гексацианоферрата (II) калия ($\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)$) и последующей реакцией гексацианоферрата (II) калия с хлоридом железа (III) (FeCl_3) с образованием окрашенного соединения – берлинской лазури [Chandlee, Scandalios, 1983]. Поскольку каталаза разлагает H_2O_2 , в местах ее расположения окрашивания не происходит. Для визуализации изоферментов каталазы гель инкубировали в 4 мМ растворе H_2O_2 в Трис- HCl буфере (50 мМ, pH 7.6) в течение 5 мин, промывали в буферном растворе и проводили специфическое окрашивание на активность каталазы в растворе, содержащем 1% гексацианоферрата (III) калия и 1% хлорид железа (III). Гели инкубировали в растворе до появления светлых полос на зеленом фоне (примерное время реакции 5 мин). Гели сканировали, инвертировали и анализировали с помощью программы One-DScan V. 1.3 (Scanalytics, CSP Inc.). Об активности каталазы судили по степени обесцвечивания фона.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы “SigmaPlot 11” со встроенным анализом (применяли критерий Стьюдента для непарных выборок, $P = 0.05$). На графиках представлены средние значения опыта, состоящего из трех-пяти биологических повторностей и их стандартные ошибки. Аналитическая ошибка, согласно техническим паспортам приборов, не превышала 0.001.

Полученные данные показали, что холодостойкие растения картофеля в результате длительного низкотемпературного закаливания повышают устойчивость к отрицательным температурам с -2 до -3°C и обладают способностью выдерживать эту температуру более длительное время, чем незакаленные растения, по-видимому, за счет переохлаждения клеток.

Как показано в нашей работе [Нарайкина и др., 2014], до и в начале закаливания скорость генерации супероксида была почти на 40%, выше у *desA-licBM3* растений, по сравнению с контролем. Характер изменений скорости генерации в течение времени закаливания был сходным у обоих генотипов: подъем показателя к первым суткам закаливания и его снижение до уровня неохлажденных растений к третьим суткам. К шестым суткам закаливания контрольные растения превышали *desA-licBM3* растения по показателю скорости генерации почти в два раза, что свидетельствует о меньшей устойчивости их мембран к низкой температуре. Кроме того, нами было показано, что у трансформантов более эффективная антиоксидантная защита клетки, чем у контрольных растений, за счет более высокой активности СОД [Нарайкина и др., 2014].

Известно, что в результате утилизации O_2^- СОД образуется H_2O_2 . Нами было показано, что содержание H_2O_2 у обеих линий растений в незакаленном состоянии

почти не различалось (1.2 и 1.5 мкМ/г сырой массы у контрольных и *desA-licBM3* растений, соответственно). В первые сутки низкотемпературного закаливания содержание H_2O_2 в листьях контрольных растений возрастало примерно на 50%, затем к третьим суткам оно заметно снижалось, а к шестым суткам снова увеличивалось. В отличие от контроля, у *desA-licBM3* растений в начале закаливания наблюдалось существенное снижение содержания H_2O_2 , а к шестому дню оно несколько увеличилось. Таким образом, у холодостойких растений в целом к концу закаливания не наблюдалось существенного повышения содержания H_2O_2 .

Следует также учесть, что содержание H_2O_2 в клетке существенно зависит также и от активности расщепляющих его ферментов, в том числе каталазы, обладающей уникальным среди H_2O_2 -нейтрализующих ферментов свойством утилизировать H_2O_2 без участия восстановленных клеточных эквивалентов, т.е. энергоэффективным механизмом удаления H_2O_2 . В случае, когда при действии стрессорного фактора, например, низкой температуры, создается дефицит энергии, а при этом происходит быстрая генерация H_2O_2 , то его разложение каталазой может идти по энергосберегающему пути, что обеспечивает сохранение восстановленных эквивалентов и энергии, столь необходимых для синтеза протекторных белков и липидов [Scandalios et al., 1997]. Поэтому в процессе закаливания была изучена общая активность каталазы, а также оценен вклад активностей ее изоформ.

Как видно из рисунка, у контрольных и трансформированных растений в начальный период закаливания происходит повышение общей активности каталазы в 2 и 4 раза, соответственно, с последующим снижением, что соответствует изменениям содержания H_2O_2 . Согласно литературным данным, в листьях растений выявлено несколько изоформ каталазы [Anjum et al., 2016]. Для понимания их роли в утилизации H_2O_2 в период низкотемпературного закаливания растений картофеля мы попытались определить активности каждой изоформы с помощью электрофореза в неденатурирующих условиях с последующим специфическим окрашиванием для их идентификации.

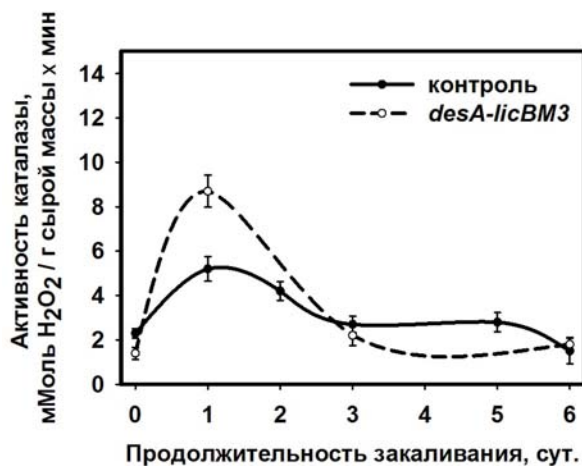


Рисунок. Изменение общей активности каталазы у контрольных и *desA-licBM3* растений картофеля в динамике закаливания при $5\pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 6 сут.

В листьях картофеля нами было выявлено две изоформы каталазы. Согласно данным литературы, у растений табака и арабидопсиса активность каталазы класса 1 составляет большую долю общей активности фермента [Anjum et al., 2016], поэтому полосу с большей активностью мы отнесли к каталазам класса 1 и обозначили ее как KAT1, а полосу с меньшей активностью – KAT2. Оцифровка изображения в программе One-DScan (таблица) подтвердила визуальную оценку данных о том, что в первые двое

суток низкотемпературного закаливания как контрольных, так и *desA-licBM3* растений картофеля активность изоформы каталазы KAT1 возрастала и поддерживалась на более высоком уровне, по сравнению с активностью KAT2, на протяжении всего периода закаливания. Полосы KAT2 были менее интенсивно окрашены и краткосрочное усиление интенсивности окрашивания KAT2 не приводило к существенным колебаниям общей активности каталазы, тогда как динамика изменений интенсивности окрашивания KAT1 в целом совпадала с общей активностью. Таким образом, показано, что при закаливании обеих линий картофеля изоформа каталазы KAT1 вносила определяющий вклад в общую активность фермента.

Таблица.

Анализ программой One-DScan активности изоформ каталазы (KAT1 и KAT2) в динамике низкотемпературного закаливания картофеля при 5°C, отн. ед. (данные типичного опыта)

Изоформа каталазы	Объект	Продолжительность закаливания, сутки					
		0	1	2	3	5	6
KAT1	контроль	3.4	40.6	45.3	32.3	32.2	23.1
	<i>desA-licBM3</i>	8.1	35.0	34.4	27.9	17.9	12.1
KAT2	контроль	14.2	13.2	17.2	8.4	5.0	15.5
	<i>desA-licBM3</i>	11.8	13.5	9.1	18.3	12.9	27.3

На основании полученных данных можно сделать заключение, что в период длительного низкотемпературного закаливания растений картофеля содержание H_2O_2 регулируется, главным образом, изоформой каталазы KAT1. Более высокая, по сравнению с контрольными растениями, активность каталазы при закаливании *desA-licBM3* растений не только стабилизировала содержание H_2O_2 в оптимальных пределах, но даже снижала ее количество. По-видимому, вследствие модифицированного липидного состава функциональных мембран [13], *desA-licBM3* растения имели значительно большую преадаптацию к действию низкой температуры, что позволило им повысить активность антиоксидантных ферментов, в том числе и каталаз.

Авторы благодарны сотрудникам отдела биологии клетки и биотехнологии ИФР РАН за любезно предоставленные для исследований растения-регенеранты картофеля.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (молодежный грант №18-34-00604 мол_а).

Литература

Лукаткин А.С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. – Саранск: изд-во Мордовск. ун-та, 2002. – 208 с.

Маали Амири Р., Голденкова-Павлова И.В., Юрьева Н.А., Пчёлкин В.П., Цыдендамбаев В.Д., Верещагин А.Г., Дерябин А.Н., Трунова Т.И., Лось Д.А., Носов А.М. Жирнокислотный состав липидов растений картофеля, трансформированных геном $\Delta 12$ -десатуразы цианобактерии // Физиология растений. – 2007. – Т. 54. – С. 678–685.

Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки // Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений. – 1989. – Т. 6. – С. 1–168.

Нарайкина Н.В., Синькевич М.С., Демин И.Н., Селиванов А.А., Мошков И.Е., Трунова Т.И. Изменения активности изоформ СОД при низкотемпературной адаптации у растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) дикого типа и трансформированных геном $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы // Физиология растений. – 2014. – Т. 61. – С. 359–366.

Синькевич М.С., Нарайкина Н.В., Трунова Т.И. Процессы, препятствующие повышению перекисного окисления липидов у холодостойких растений при гипотермии // Физиология растений. – 2011. – Т. 58. – С. 875–882.

Anium N.A., Sharma P., Gill S.S., Hasanuzzaman M., Khan E.A., Kachhar K., Mohamed A.A., Thangavel P., Devi G.D., Vasudhevan P., Sofo A., Khan N.A., Misra A.N., Lukatkin A.S., Singh H.P., Pereira E., Tuteja N. Catalase and ascorbate peroxidase – representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants // Environ. Pollut Res. – 2016. – P. 19002–19029.

Chandlee J.M., Scandalios J.G. Regulation of CatI gene expression in the scutellum of maize during early sporophytic development // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1983. – V. 81. – P. 4903–4907.

Davis B.J. Disc Electrophoresis. 2, Method and application to human serum proteins // Ann. New York Acad. Sci. – 1964. – V.121. – P. 404–427.

Kumar G.N., Knowles N.R. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum* L.) seed-tubers // Plant Physiol. – 1993. – V. 102. – P. 115–124.

Scandalios J.G., Guan L., Polidoros A.N. Catalases in plant: gene structure, properties, regulation and expression // Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. – 1997. – P. 343–406.

Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions // Journal of Botany. – 2012. – 26 p.

THE ACTIVITY OF ISOFORMS OF CATALASE AT LOW TEMPERATURE HARDENING OF THE CONTROL AND TRANSFORMED GENE *DESA Δ12-ACYL-* LIPID DESATURASE POTATO PLANTS

Naraikina N.V., Trunova T.I.

Laboratory of Cold Resistance, K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, trunova@ippras.ru

Abstract. The changes in the total activity of catalase and its isoforms during potato adaptation (5°C, six days), as well as the effect of desaturase introduced into plants on these processes were studied. Two isoforms of catalase CAT1 and CAT2 were revealed in the leaves of transformed and control plants. In the process of hardening contribution CAT1 in total enzyme activity was significantly higher than that of CAT2. In the process of hardening the total activity of catalase transformers exceeded that of control plants.

Keywords: *desaturase, catalase, potatoes, low temperatures, hydrogen peroxide, transformed plants, resistance*