

СИСТЕМА АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ВАКУОЛИ. СРАВНЕНИЕ СИСТЕМЫ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ ВАКУОЛЕЙ, ПЛАСТИД И МИТОХОНДРИЙ КЛЕТОК КОРНЕПЛОДОВ СТОЛОВОЙ СВЕКЛЫ

Е.В. Прадедова¹, А.Б. Карпова², О.Д. Нимаева¹, Р.К. Салаяв¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, praded@sisibr.irk.ru

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия

Аннотация. Установлено содержание и редокс-состояние аскорбиновой кислоты в изолированных вакуолях, пластидах и митохондриях клеток корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). В вакуолях пул окисленной аскорбиновой кислоты выше, чем в других исследуемых органеллах. По меньшей мере, три фермента вакуолярной локализации окисляют аскорбиновую кислоту и изменяют ее редокс-состояние: фенольная пероксидаза (КФ 1.11.1.7), аскорбатпероксидаза (КФ 1.11.1.11) и, возможно, аскорбатоксидаза (КФ 1.10.3.3).

Ключевые слова: *Beta vulgaris*, вакуоли, аскорбиновая кислота, аскорбатпероксидаза, аскорбатоксидаза

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-648-652

Разнообразные метаболические процессы протекают со значительным «потреблением» аскорбиновой кислоты (АА), в основном, в качестве источника электронов, поэтому в клетках постоянно образуются ее окисленные формы: монодегидроаскорбиновая кислота (МНДА) и дегидроаскорбиновая кислота (ДНА). Резкие изменения общего содержания аскорбиновой кислоты ($AA + DHA = AA_{\text{сум}}$), а также редокс-соотношения АА/ДНА наблюдаются при действии многих факторов окружающей среды [DeGara et al., 1991; Zechmann et al., 2011]. В свою очередь, изменения концентрации АА и АА/ДНА служат регуляторными факторами многих физиологических процессов.

На большую значимость аскорбиновой кислоты для растительного организма указывают ее высокие концентрации в клетках, которые могут достигать 50 мМ [Zechmann et al., 2011]. Внутри растительных клеток аскорбиновая кислота распределена неравномерно. Ее компартментализация при нормальных условиях произрастания и при действии стрессирующих факторов на растительный организм активно исследуется. Для обнаружения аскорбиновой кислоты разработаны разные методы, с помощью которых она выявлена в ядре, хлоропластах, митохондриях, пероксисомах, вакуолях, цитозоле, апопластном пространстве [Liso et al., 2004; Zechmann et al., 2011]. В настоящей работе содержание аскорбиновой кислоты в изолированных органеллах клеток корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.), находящихся в фазе физиологического покоя, определяли с помощью метода ВЭЖХ. Пул и редокс-состояние аскорбиновой кислоты вакуолей сравнивали с пулами и редокс-состоянием аскорбиновой кислоты пластид и митохондрий (таблица). Концентрация АА в вакуолях оказалась довольно высокой. В то же время, наименьшая концентрация АА установлена для митохондрий. Однако у митохондрий величины редокс-соотношений АА/ДНА были наибольшими. Тогда как у вакуолей из-за накопления ДНА эти величины были наименьшими.

Несмотря на то, что концентрация аскорбиновой кислоты была самой высокой в водном экстракте ткани, все же можно было видеть, что вакуоли аккумулировали

довольно много АА. На сегодняшний день нет единого мнения относительно содержания аскорбиновой кислоты в центральной вакуоли клеток растений. Если у одних растительных объектов в вакуолях ее не обнаруживали [Liso et al., 2004], то у других объектов в вакуолях выявляли довольно высокие концентрации аскорбиновой кислоты [Zechmann et al., 2011]. Чаще всего содержание АА_{сум} в вакуолях было значительно ниже, чем в пластидах и митохондриях, однако оно заметно повышалось в условиях, приводящих к стрессу [Zechmann et al., 2011]. Следует отметить, что самые высокие концентрации АА_{сум} были характерны для цитозоля, а самые низкие – для апопласта [Liso et al., 2004].

Таблица.

Содержание аскорбиновой кислоты и ее редокс-состояние во фракциях изолированных органелл и водном экстракте ткани

Образец	Концентрация аскорбиновой кислоты, мкМ/мг белка					
	АА	DHA	АА _{сум}	АА/ DHA	АА/ АА _{сум}	DHA, %
вакуоли	3,16 ± 0,19	1,79 ± 0,39	4,96 ± 0,78	1,77	0,64	36
пластиды	0,27 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,41 ± 0,02	1,93	0,66	34
митохондрии	0,14 ± 0,03	0,05 ± 0,01	0,19 ± 0,03	2,81	0,72	26
экстракт ткани	5,38 ± 0,32	6,71 ± 1,56	12,09 ± 1,87	0,81	0,45	56

Примечание: в таблице представлены средние значения и стандартные ошибки. Различия между вариантами опытов достоверны при $p < 0,001$.

Установлено, что концентрация DHA в большинстве субклеточных компартментов много ниже концентрации АА. Зачастую при благоприятных условиях произрастания она составляет 10% от АА_{сум}. Однако аскорбиновая кислота обладает выраженной антиоксидантной активностью, поэтому содержание АА и DHA, а также величины АА/DHA, в клеточных структурах подвержено сильным изменениям в стрессирующих условиях [Zechmann et al., 2011]. В клеточных структурах у корнеплодов столовой свеклы накапливается довольно много DHA. Так, в вакуолях доля DHA достигала 36% от АА_{сум} этого компартмента, пластидах – 34%, митохондриях – 26%, тогда как в тканевом экстракте – 56%. Величины редокс-соотношений АА/DHA для митохондрий (2,8) и пластид (1,9) клеток корнеплодов были заметно ниже, чем величины АА/DHA для митохондрий (8-9) и пластид (7-9) других ранее исследованных растений, произрастающих в относительно оптимальных условиях [Jimenez et al., 1998]. С одной стороны, довольно высокие концентрации DHA и низкие величины АА/DHA свидетельствовали в пользу интенсивных окислительных процессов, протекающих в клетках покоящихся корнеплодов. С другой стороны, DHA могла служить запасной формой аскорбиновой кислоты, как это было установлено для покоящихся семян некоторых растений. Кроме того, при низких концентрациях АА и высоких концентрациях DHA снижается митотический индекс [Tommasi et al., 1999]. Возможно, низкое редокс-соотношение АА/DHA обуславливает торможение ростовых процессов у корнеплодов свеклы в период физиологического покоя.

Редокс-состояние аскорбиновой кислоты модулируют низкомолекулярные прооксиданты (АФК, окисленные фенолы и токоферол, и др.) и многочисленные ферменты, для которых она служит кофактором (2-оксоглутарат-зависимые диоксигеназы, монооксигеназы и др.), неспецифичным субстратом (фенолазы,

фенольная пероксидаза, пролигидроксилаза и др.) и специфичным субстратом (аскорбатпероксидаза, аскорбатоксидаза и др.) [DeGara et al., 1991]. АА и специфично взаимодействующие с ней ферменты объединяют в редокс-систему аскорбиновой кислоты [Tommasi et al., 1999]. На возможность функционирования этой системы в центральной вакуоли указывали результаты некоторых исследований. В вакуолях листьев *Arabidopsis thaliana* выявлен белок высоко гомологичный аскорбатпероксидазе (APX), а в вакуолях клеток корней *Cucurbita maxima* определена активность аскорбатоксидазы (АО) [Liso et al., 2004; Jaquinod et al., 2007].

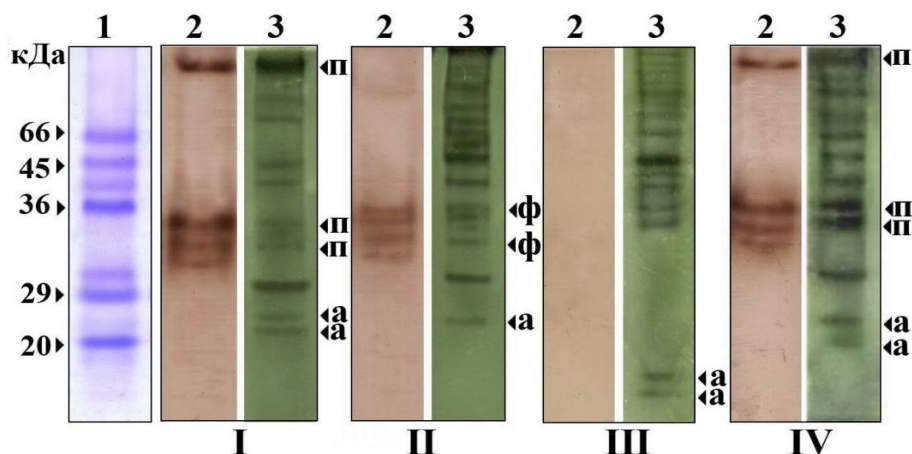


Рис. 1. Ферментативная активность в ПААГ (электрофорез отрицательнозаряженных белков в Трис-глициновой системе) в реакционной среде «Аскорбат/нитросиний тетразолий»: 1 – маркерные белки; 2 – активность пероксидазы (РОХ) и полифенолоксидазы (РРО); 3 – аскорбатпероксидазная (АРХ) активность (негативное изображение). I – вакуоли. II – пластиды. III – митохондрии. IV – экстракт ткани. (а) – АРХ. (п) – РОХ. (ф) – РРО.

АРХ локализованы во многих структурах клетки и представляют мономер с молекулярной массой 27-51 кДа. Тогда как АО сосредоточены главным образом в клеточных стенках и цитозоле и представляют гликозилированные гомодимеры с молекулярной массой 140-150 кДа.

В изолированных из корнеплодов свеклы вакуолях с помощью спектрофотометрического метода была выявлена довольно высокая АРХ- и АО-активность (данные не приводятся). Наличие в вакуолярном содержимом разнообразных ферментов, взаимодействующих с АА, подтвердили результаты зимографического исследования, проводимого на ПААГ после электрофореза отрицательно- и положительнозаряженных белков (рис. 1-3). Многочисленные зоны ферментативной активности с АА, подобные зонам АРХ-активности, выявлены в образцах всех исследуемых органелл (рис. 1). Некоторые изоформы фенольной пероксидазы (РОХ) вакуолей и полифенолоксидазы (РРО) пластид окисляли АА и эту реакцию можно было различить в зонах их локализации (рис. 1, I(3), II(3)). Что касается активности самой АРХ, то отделить катализируемые с ее участием реакции от реакций других ферментов можно с помощью соблюдения определенных условий. Сохранить активность АРХ позволяет постоянное присутствие АА в средах экстракции для белка и электродном буфере для электрофореза. В отсутствие АА происходит необратимая инактивация АРХ. Варьирование условиями, когда в среды вносили или не вносили АА, позволило установить, что в вакуолях и митохондриях клеток корнеплодов возможно присутствие по меньшей мере двух изоформ АРХ (рис. 1, I(3) и III(3)), а в лейкопластах – одной изоформы (рис. 1, II(3)).

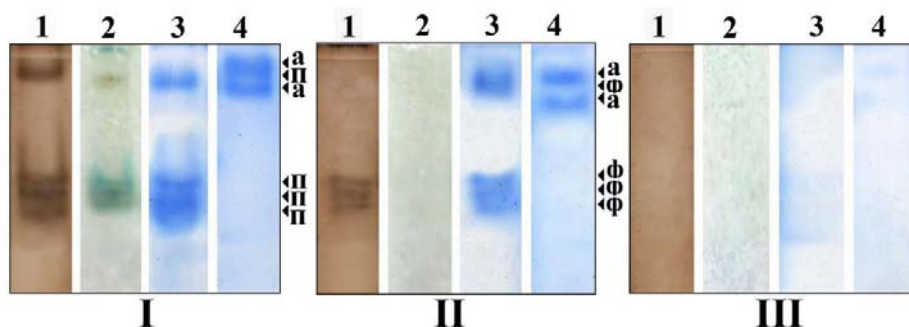


Рис. 2. Ферментативная активность в ПААГ (электрофорез отрицательно заряженных белков) в реакционной среде «Аскорбат/2,6-дихлорофенол-индофенол»: 1 – активность РОХ и РРО при инкубации в К-На-Р буфере (рН 6-7); 2 – активность гемсодержащих ферментов (с 3,3,5,5-тетраметилбензидином); 3 – аскорбатоксидазная (АО) активность при инкубации в К-На-Р буфере (рН 6-7); 4 – АО-активность при инкубации в Трис-буфере (рН 8-9). I – вакуоли. II – пластиды. III – митохондрии. (а) – АО. (п) – РОХ. (ф) – РРО.

Дальнейшие исследования показали, что РОХ и РРО, локализованные в вакуолях и пластидах, взаимодействуют с АА, проявляя выраженную АО-активность (рис. 2 и 3). Анионные (отрицательно заряженные) и катионные (положительно заряженные) изоформы этих ферментов при определенных рН-условиях окисляли АА в отсутствие H_2O_2 . АО-активность анионных изоформ РОХ вакуолей и РРО пластид проявлялась при инкубации ПААГ в К-На-Р-буфере и Трис-буфере при рН 6-7, а катионных изоформ – при рН 6-8. Если ПААГ инкубировали в Трис-буфере при рН 8-9, в зонах анионных изоформ РОХ и РРО АО-активность не проявлялась (рис. 2, I(4) и II(4)). Однако в этих условиях в области локализации высокомолекулярных белков появлялись две зоны с АО-активностью. Ферменты из этих зон не были гемсодержащими белками. Возможно, наблюдаемая активность принадлежала АО или лакказе (КФ 1.10.3.2), т.е. медьсодержащим ферментам, окисляющим АА. В отличие от вакуолей и пластид, в митохондриях не обнаружены анионные белки с каталитической активностью РРО и АО (рис. 2, III). Этими свойствами при слабокислых условиях обладал фермент, белок которого заряжен положительно (рис. 3, III).

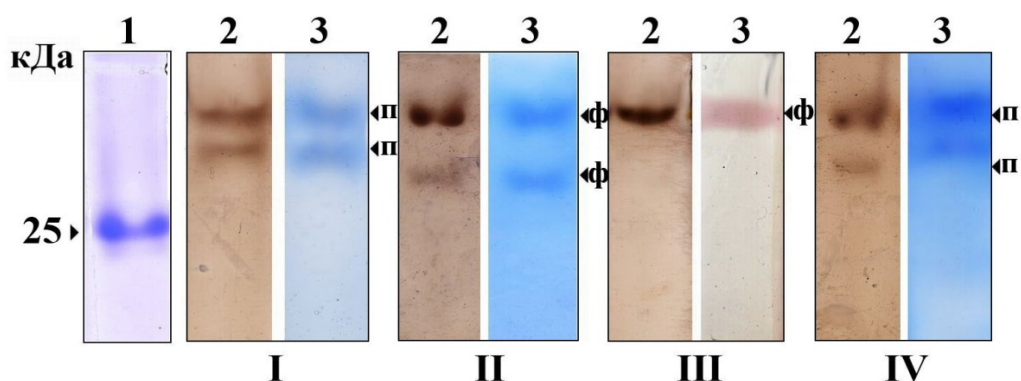


Рис. 3. Ферментативная активность в ПААГ (электрофорез положительно заряженных белков в системе В-аланин–уксусная кислота) в реакционной среде «Аскорбат/2,6-дихлорофенол-индофенол»: 1 – маркер трипсиноген (рI 9,3); 2 – активность РОХ и РРО при инкубации в К-На-Р буфере (рН 5-6); 3 – АО-активность при инкубации в Трис-буфере (рН 6-8). I – вакуоли. II – пластиды. III – митохондрии. IV – экстракт ткани. (п) – РОХ. (ф) – РРО.

Полученные результаты показали, что все исследуемые органеллы содержат довольно много разнообразных ферментов, взаимодействующих с АА. В вакуолях по меньшей мере, три различных оксидоредуктазы способны окислять АА и изменять соотношение АА/ДНА – прежде всего, это гемсодержащие ферменты ПОХ и АРХ, а также, возможно, медьсодержащий фермент АО. Однако для подтверждения присутствия в вакуолях АО требуются дальнейшие исследования.

Литература

De Gara L., Tommasi F., Liso R., Arrigoni O. Ascorbic acid utilization by prolyl hydroxylase "in vivo" // *Phytochemistry*. – 1991. – V. 30. – P. 1397–1399.

Jaquinod M., Villiers F., Kieffer-Jaquinod S., Hugouvieux V., Bruley C., Garin J., Bourguignon J. A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture // *Mol. Cell Proteomics*. – 2007. – V. 6, No. 3. – P. 394–412.

Jimenez A., Hernandez J.A., Pastori G., Rio L.A., Sevilla F. Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves // *Plant Physiol.* – 1998. – V. 118. – P. 1327–1335.

Liso R., De Tullio M.C., Ciraci S. Localization of ascorbic acid, ascorbic acid oxidase, and glutathione in roots of *Cucurbita maxima* L. // *J. Exp. Bot.* – 2004. – V. 55, No. 408. – P. 2589–2597.

Tommasi F., Paciolla C., Arrigoni O. The ascorbate system in recalcitrant and orthodox seeds // *Physiol. Plant.* – 1999. – V. 105. – P. 193–198.

Zechmann B. Subcellular distribution of ascorbate in plants // *Plant Signaling & Behavior*. – 2011. – V. 6, No. 3. – P. 360–363.

THE ASCORBATE SYSTEM OF THE CENTRAL VACUOLE. COMPARISON OF THE ASCORBATE SYSTEM OF VACUOLES, PLASTIDS AND MITOCHONDRIA OF RED BEETROOT CELLS

E.V. Pradedova¹, A.B. Karpova², O.D. Nimaeva¹, R.K. Salyaev¹

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, praded@sifibr.irk.ru

²Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

Abstract. The content and redox-state of ascorbic acid in isolated vacuoles, plastids and mitochondria of red beetroot cells (*Beta vulgaris* L.) is established. The pool of oxidized ascorbic acid in vacuoles is higher than in other investigated organelles. At least three enzymes of vacuolar localization oxidize ascorbic acid and change its redox-state, such as phenolic peroxidase (EC 1.11.1.7), ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) and, possibly, ascorbate oxidase (EC 1.10.3.3).

Keywords: *Beta vulgaris*, vacuoles, ascorbic acid, ascorbate peroxidase, ascorbate oxidase