

АКТИВНОСТЬ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ЛИПОКСИГЕНАЗЫ РАСТЕНИЙ ГОРОХА В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ И CO₂-СРЕДЫ

А.Н. Ершова, О.С. Бердникова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный педагогический университет», Воронеж, Россия, *aershova@vspsu.ac.ru*

Аннотация. Методом нативного электрофореза и специфического окрашивания показано присутствие в митохондриях липоксигеназы. Определена молекулярная масса фермента, которая составила 99 ± 2 кДа. Отмечено увеличение активности фермента в условиях гипоксии и CO₂-среды, но только в первые 3-6 часов действия газовых сред. Определены кинетические параметры митохондриальной липоксигеназы K_M и V_{max} у растений в условиях нормальной аэрации, гипоксии и высоких концентраций диоксида углерода.

Ключевые слова: горох, липоксигеназа, митохондрии, физико-химические свойства, гипоксия

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-312-315

Различные стрессовые факторы внешней среды, включая дефицит кислорода, влияют не только на изменение содержания в клетках растений активных форм кислорода, но и на активность ферментов, связанных с их детоксикацией [Ершова, 2011]. Показано, что в условиях недостатка кислорода (гипоксия) также усиливаются процессы перекисного окисления липидов. В большей степени эти изменения в активности ферментов, содержании активных форм кислорода происходят при действии на растения среды высоких концентраций диоксида углерода [Ершова, 2007].

Растительные липоксигеназы (КФ 1.13.11.12) принадлежат к классу диоксигеназ. Липоксигеназы катализируют реакцию окисления полиненасыщенных высших жирных кислот с образованием гидропероксидных производных. Субстратами растительных липоксигеназ обычно являются свободные, реже связанные в фосфолипидах полиненасыщенные жирные кислоты, такие как линолевая и линоленовая [Liavonchanka, 2006]. Липоксигеназы имеют разную локализацию в клетках растений. Кроме цитоплазмы и хлоропластов, фермент обнаружен и в митохондриях [Braidot, 2004]. Ранее было показано [Ершова, 2009], что активность липоксигеназы, определяемая в тканевых гомогенатах растений гороха, находящихся в условиях кратковременной гипоксии и среды высоких концентраций CO₂, возрастала. Определяли активность и некоторые физико-химические свойства фермента липоксигеназы, локализованной в митохондриях растений гороха, подвергнутых воздействию кратковременной гипоксии и CO₂-среды.

Объектами исследования служили 10-дневные проростки гороха «Рамонский 77», которые помещали в темновые условия в различные газовые среды на 3-24 часа. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования при +4 °С. Чистоту фракции митохондрий оценивали по активности маркерного фермента СДГ и содержанию хлорофилла. Перекрестное загрязнение фракций митохондрий по содержанию хлорофилла составляло 2%, при этом в ней определялось до 90% активности суммарной СДГ. Активность липоксигеназы определяли спектрофотометрическим методом, используя в качестве субстрата линолевою кислоту по методике [Ильинская, 2000] в нашей модификации и рассчитывали с использованием соответствующего коэффициента экстинкции. Удельную активность выражали в ФЕ на мг белка, содержание которого определяли методом Лоури. Все

опыты по определению активности фермента проводились в двух биологических и двух химических повторностях, в таблицах представлены их средние значения и отклонения.

Согласно литературным данным, основным местом локализации липоксигеназы являются хлоропласты и цитоплазма растительных клеток. Однако в исследованиях [Braidot, 2004] было обнаружено накопление продуктов перекисидации жирных кислот за счет фермента липоксигеназы в митохондриях растительных клеток. Кроме этого, в работе [Hunter, 1983] было отмечено, увеличение активности липоксигеназ в условиях аноксического стресса в клетках растения касатика, что определялось по увеличению содержания соответствующей мРНК.

Для доказательства присутствия в митохондриях растений гороха липоксигеназы были проведены опыты по выделению фракций митохондрий и электрофоретического анализа белков митохондриальной фракции с последующим специфическим окрашиванием на липоксигеназу в присутствии линолевой кислоты по методу [Heydeck, 1985]. В отдельном опыте растения гороха помещали в условия гипоксии и CO₂-среды на 3 часа, и далее проводили электрофоретический анализ на присутствие липоксигеназы в митохондриях растений. Как видно из данных рисунка, на электрофореграмме обнаруживалось три четких пятна липоксигеназы, которые по электрофоретической подвижности не отличались друг от друга. В то же время интенсивность окраски пятен возрастала, если растения подвергались действию гипоксии и CO₂-среды, что свидетельствовало о повышении активности липоксигеназы. При использовании маркерных ферментов (каталаза, альбумин) была рассчитана графическим способом молекулярная масса липоксигеназы, которая составила 99±2 кДа, что близко к митохондриальной липоксигеназе других растений [Braidot, 2004].

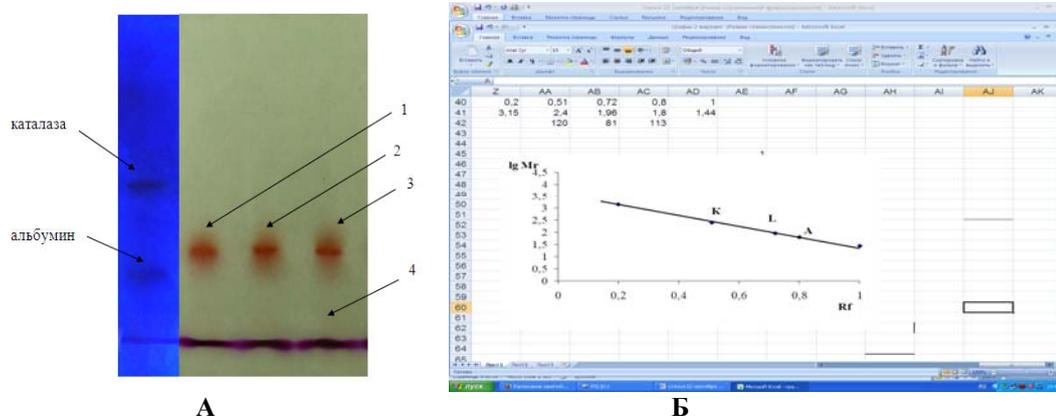


Рисунок. Специфическое проявление липоксигеназы на электрофореграммах белковой фракции митохондрий растений, находящихся в разных условиях аэрации (А), и графическое определение молекулярной массы фермента липоксигеназы по электрофоретической подвижности (Б). Маркерные белки: каталаза (250 кДа), альбумин бычий сывороточный (66 кДа), проявленные с использованием кумасси R-250 (1 – воздух; 2 – гипоксия; 3 – CO₂-среда; 4 – фронт красителя бромфенолового синего); К - каталаза (250 кДа), А - альбумин бычий сывороточный (66 кДа), L – липоксигеназа.

В следующих опытах определяли активность митохондриальной липоксигеназы растений, подвергнутых действию кратковременной гипоксии и CO₂-среды. Как видно из данных табл. 1, через три часа действия гипоксии и CO₂-среды активность митохондриальной липоксигеназы возрастала на 77 и 52% по сравнению с аэрируемыми растениями. Однако через 6 часов активность митохондриальной

липоксигеназы начинала падать и к концу опыта (24 часа) становилась ниже уровня контрольных растений.

Таблица 1.

Активность митохондриальной липоксигеназы растений гороха, подвергнутых воздействию разных газовых сред

вариант	3 часа		6 часов		24 часа	
	Удельная активность (мкмоль/ мг белка)	% от контроля	Удельная активность (мкмоль/ мг белка)	% от контроля	Удельная активность (мкмоль/ мг белка)	% от контроля
воздух	96,0±10,2	100%	158,5±7,6	100%	105,6±10,9	100%
гипоксия	170,1±15,0	177%	156,2±9,1	99%	87,9±9,2	83%
СО ₂ -среда	145,8±15,1	152%	163,2±7,0	103%	55,8±6,11	53%

При изучении кинетических характеристик (K_M и V_{max}) митохондриальной липоксигеназы было показано, что при 3-х часовой экспозиции в растениях в условиях гипоксии величина K_M фермента снижается с 1,19 до 0,65, что свидетельствует об увеличении сродства фермента к субстрату, а, следовательно, повышении активности данного фермента. В то же время в условиях высоких концентраций диоксида углерода величина K_M фермента возрастала до 1,89. Это свидетельствует об уменьшении сродства фермента к субстрату. Вследствие этого, повышение активности митохондриальной липоксигеназы при действии СО₂-среды на растения может быть и результатом увеличения содержания фермента за счет его новообразования. Подобное усиление синтеза ферментов анаэробного метаболизма было отмечено в целом ряде работ.

Таблица 2.

Влияние гипоксии и среды высоких концентраций углекислого газа (3 часа) на кинетические характеристики липоксигеназы митохондрий проростков гороха

вариант	воздух	гипоксия	СО ₂ -среда
K_M	1,19	0,65	1,89
V_{max}	111,0	60,6	176,3

Проведенные нами исследования с использованием нативного электрофореза и специфического окрашивания показали присутствие липоксигеназы в митохондриях растений гороха. Было установлено, что высокие концентрации диоксида углерода повышали активность митохондриальной липоксигеназы растений гороха, однако при этом величина K_M фермента возрастала. В то же время в условиях гипоксии повышение активности фермента хорошо объяснялось за счет увеличения сродства фермента к субстрату, о чем свидетельствовало уменьшение величины K_M фермента. Было показано, что действие гипоксии и СО₂-среды не вызывает появления новых изоформ фермента митохондриальной липоксигеназы, а связано только с изменением активности фермента. Рассчитана M_r митохондриальной липоксигеназы, которая составила 99±2 кДа.

Повышение активности митохондриальной липоксигеназы в первые часы действия гипоксического стресса и СО₂-среды может способствовать повышению в митохондриях растений фонда свободных радикалов, образующихся при дефиците кислорода. Можно предположить, что липоксигеназный путь образования гидропероксидных радикалов в митохондриях вносит значительный вклад в процессы пероксидации липидов у растений в условиях гипоксии, но это характерно лишь для кратковременных экспозиций (3-6 часов).

Литература

Ершова А.Н., Бердникова О.С. Активность липоксигеназы растений в условиях гипоксии и высоких концентраций CO₂ // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. — Воронеж: ВГУ, 2009. — Вып. 11. — С. 82–85.

Ершова А.Н., Попова Н.В., Бердникова О.С. Продукция активных форм кислорода и антиоксидантные ферменты растений гороха и сои при действии гипоксии и CO₂-среды // Физиология растений. — 2011. — Т. 58, № 6. — С. 834–843.

Ершова А.Н. Метаболическая адаптация растений к гипоксии и повышенному содержанию диоксида углерода. — Воронеж: Изд-во ВГУ, 2007. — 264 с.

Ильинская Л.И., Переходов Е.А., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г., Романенко Е.Н., Зиновьева С.В., Озерецковская О.Л. Активность липоксигеназы в растениях с индуцированной устойчивостью // Физиология растений. — 2000. — Т. 47, № 4. — С. 516–523.

Braidot E. Biochemical and immunochemical evidences for the presence of lipoxygenase in plant mitochondria // Journal of Experimental Botany. — 2004. — V. 55, No. 403. — P. 1655–1662.

Heydeck D., Schewe T. Improved procedure for the detection of activity of lipoxygenases on electrophoregrams // Biochim. Biophys. Acta. — 1985. — V. 44. — P. 1261–1263.

Hunter M.I.S., Hetherington A.M., Crawford R.M.M. Lipid peroxidation – a factor in anoxia in tolerance in Iris Species? // Phytochemistry. — 1983. — V. 2, No. 5. — P. 1145–1147.

Liavonchanka A., Feussner I. Lipoxygenase: occurrence, function and catalysis // J. Plant Physiol. — 2006. — V. 163. — P. 348–357.

ACTIVITY AND PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF MITOCHONDRIAL LIPOXYGENASE OF PEA PLANTS UNDER HYPOXIA AND CO₂-MEDIA

A.N. Ershova, O.S. Berdnikova

Voronezh State Pedagogical University, Voronezh, Russia, aershova@vspsu.ac.ru

Abstract. By the method of native electrophoresis and specific coloring the presence of lipoxygenase in mitochondria was shown. Molecular mass of the enzyme was determined as 99±2 kDa. An increase of enzyme activity under hypoxia and CO₂-media was noted but only during first 3-6 hr of gas media influence. Kinetic parameters K_M and V_{max} of mitochondrial lipoxygenase were determined in plants under normal aeration, hypoxia and high concentrations of carbon dioxide.

Keywords: *pea, lipoxygenase, mitochondria, physical and chemical properties, hypoxia*