



УДК 581.13.04

## Исследование электрофоретических свойств и роли митохондриальной липоксигеназы растений гороха

Ершова А.Н., Бердникова О.С.

*Воронежский государственный педагогический университет, Воронеж*

Поступила в редакцию 29.09.2017 г.

С использованием электрофореза в ПААГ и специфического проявления доказано присутствие липоксигеназы (КФ 1.13.11.12) в митохондриях клеток растений гороха. Установлено, что величина электрофоретической подвижности этой молекулярной формы фермента составила 0.72, а рассчитанная по белкам-маркерам молекулярная масса  $99 \pm 2$  кДа. При действии факторов среды (гипоксия) не изменялись электрофоретические свойства, но увеличивается активность липоксигеназы. С использованием специфических ингибиторов SHAM и пропилгаллата доказано участие этой молекулярной формы фермента в процессах накопления АФК в митохондриях проростков в условиях кратковременной гипоксии и  $\text{CO}_2$  – среды.

**Ключевые слова:** липоксигеназа, митохондрии, горох, электрофоретические свойства, гипоксия,  $\text{CO}_2$ -среда.

## Investigation of electrophoretic properties and role of mitochondrial lipoxygenase of pea plants

Ershova A.N., Berdnikova O.S.

*Voronezh State Pedagogical University, Voronezh*

Using specific staining of proteins after electrophoretic separation of mitochondrial fraction proteins the investigations of lipoxygenase, its properties and activity in pea plant cells under various aerations were taken. Aims of the work were to prove the presence of lipoxygenase in mitochondria of seedlings, to determine electrophoretic mobility of enzyme and molecular mass, to study diverse aeration impact on properties and activity of this enzyme. As a study object two-week old hydroponically grown pea seedlings were used. Aerial part of seedlings was placed in different gas media for 3h. Cell compartments isolation was done by differential centrifugation method accompanied by fraction purity determination by appropriate markers. Presence of lipoxygenase was proved by specific staining of electrophoregrams with linoleate as a substrate, enzyme activity was estimated spectrophotometrically. Applianse of native PAGE in mitochondria of studied plants showed occurrence of only one molecular form of lipoxygenase. Increase of enzyme activity in mitochondria of seedlings under oxygen deficit was not linked to appearance of new enzyme isoforms or change of properties, including electrophoretic mobility. This may suggest that under hypoxic stress and high concentrations of  $\text{CO}_2$  we observe an activity change of same molecular form of mitochondrial lipoxygenase. Herewith high concentrations of  $\text{CO}_2$  increased also the activity of mitochondrial lipoxygenase in the studied plant that is evidenced by using specific inhibitors of this enzyme.

Supposed that enzymatic lipoxygenase path of hydroperoxide radicals in plant mitochondria makes significant contribution into processes of lipid peroxidation in plants under hypoxia but it is definitive only for rather small expositions (3-6 h).

**Keywords:** lipoxygenase, mitochondria, pea, hypoxia,  $\text{CO}_2$ -media, electrophoretic analysis.

## Введение

Липоксигеназы (линолеат: кислород-оксидоредуктаза КФ 1.13.11.12) принадлежат к классу диоксигеназ, которые обнаружены в грибах, цианобактериях, водорослях и высших растениях. Фермент катализирует реакцию окисления полиненасыщенных высших жирных кислот, как свободных, так связанных в фосфолипидах, с образованием гидропероксидных производных [1]. При этом основными субстратами растительных липоксигеназ являются линолевая и линоленовая кислоты. В клетках растений выделяют несколько типов липоксигеназ, различающихся как по локализации, субстратной специфичности, так и по стерео- и региоспецифичности формируемых продуктов [2]. Растительные липоксигеназы обычно представлены мономерными белками с молекулярной массой 94-104 кДа, содержащие негеминное железо. Локализуются липоксигеназы в цитоплазме, вакуолях, хлоропластах и липидных телах. Присутствие этого фермента в митохондриях растений остается дискуссионным вопросом [3]. Липоксигеназы вносят значительный вклад в накопления гидропероксидов жирных кислот, запускающих процессы свободнорадикального окисления в клетках. Ранее, нами было установлено, что гидропероксиды, как и другие типы АФК, могут накапливаться в клетках растений, как при нормальной аэрации, так и в условиях дефицита кислорода. При этом высокие концентрации  $\text{CO}_2$  вызывали даже большее, чем обычная гипоксия, образование пероксидов и супероксид-аниона в митохондриях растений кукурузы и сои [4].

Однако вопрос об участии липоксигеназ, включая и митохондриальную молекулярную форму, в процессы накопления АФК в растительных клетках в условиях дефицита кислорода до конца не выяснен, так как для процессов окисления этому ферменту, как и другим диоксигеназам, требуется присутствие кислорода. В связи с этим целью работы являлось изучение с использованием методов дифференциального центрифугирования, электрофореза в ПААГ и ингибиторного анализа присутствия в митохондриях одной из молекулярных форм липоксигеназ, установление ее электрофоретической подвижности, молекулярной массы у растений, которые находились в условиях как обычной аэрации, или подвергались действию гипоксического стресса.

## Эксперимент

Объектом исследования служили 10-дневные растения гороха (*Pisum sativum* L.) сорта «Рамонский 77», выращенные на свету методом гидропоники при 25°C. В отдельных опытах надземную часть проростков помещали на 3-24 часа в затененные вакуум-эксикаторы, через которые пропускали различные газовые среды: воздух (контроль), азот (гипоксия) и  $\text{CO}_2$  (100%) из баллонов. Отдельные клеточные фракции выделяли методом дифференциального центрифугирования, определяя чистоту митохондрий по активности маркерного фермента сукцинатдегидрогеназы и содержанию хлорофилла [4].

Присутствие в митохондриях липоксигеназы доказывали с использованием нативного электрофореза в ПААГ, определяя локализацию молекулярных форм липоксигеназ с использованием специфического проявления [6], основанному на образовании йод-крахмального комплекса в присутствии гидроперекисей линолевой кислоты и йодистого калия. В связи с этим перед полимеризацией в нижний гель вносился водорастворимый крахмал («Медлекс», Россия) до концентрации 1%. Для электрофоретического разделения использовали 0.5 см<sup>3</sup> выделенных фракций, содержащих

не менее 200 мкг белка, что устанавливалось в предварительных опытах. Электрофорез проводили при температуре 0...+4°C в течение 2-3 часов при силе тока 12 мА. Пластинки проявляли, выдерживая 30 мин в растворе 0.5% линолевой кислоты в 0.1 М трис-НСI-буфере (рН 6.8). Липоксигеназы проявлялись в виде коричневых пятен на желтоватом фоне пластинок. Отцифровку проявленных липоксигеназ на пластинках проводили через 15-20 минут. Для определения молекулярной массы липоксигеназ митохондрий рядом наносились белки маркеры (каталаза и альбумин бычий сывороточный), которые проявлялись кумасси R-250.

Активность липоксигеназы в митохондриях определяли спектрофотометрически при 234 нм, используя в качестве субстрата линолевую кислоту [7]. Стандартный раствор субстрата содержал 99% линолевую кислоту и Твин-20 в 0.05 М К-фосфатном буфере (рН 7.0). Для определения активности фермента смешивали 1 см<sup>3</sup> стандартного раствора и 2 см<sup>3</sup> буфера. Активность рассчитывали с использованием  $\epsilon=25000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Для определения удельной активности фермента определяли содержание белка по Lowry.

В отдельном опыте использовались специфические ингибиторы липоксигеназ SHAM (1 мМ) и пропилгаллат (1 мМ) [8], которые предварительно вносились в среду инкубации фермента митохондриальной фракции. Концентрации используемых ингибиторов подбирались экспериментальным путем в предварительных опытах с использованием от 0.1 до 1 мМ ингибиторов. Были выбраны те концентрации, которые вызывали блокирование активности фермента не менее чем на 50%.

Все исследования проводились в двух биологических и двух аналитических повторностях. В таблицах и на графиках представлены данные одного из типичных опытов в виде средних арифметических значений и их стандартных отклонений.

## Обсуждение результатов

Считается, что дыхательная цепь митохондрий вносит меньший вклад в процессы образования АФК по сравнению с хлоропластами и пероксисомами. Однако в темноте или в нефотосинтезирующих тканях именно митохондрии могут выступать главным источником образования различных типов АФК. В связи с этим предполагается, что в митохондриях растений должна соблюдаться определенная концентрация АФК, необходимая как для осуществления сигнальных реакций так и не приводящая к клеточным повреждениям [4].

В наших опытах во фракции митохондрий с использованием электрофореза в ПААГ и специфического проявления было показано присутствие только одной, четко окрашенной полосы липоксигеназной активности (рис. 1а). Величина Rf митохондриальной липоксигеназы составила 0.72, что отличалось от хлоропластной и цитоплазматической форм. Величина Rf липоксигеназы хлоропластов составила 0.80, а цитоплазмы 0.66. С использованием маркерных ферментов рассчитали молекулярную массу липоксигеназы митохондрий, которая составила  $99\pm 2 \text{ кДа}$  (рис. 1б).

Действие на растения условий кратковременной (3-часовой) гипоксии не приводило к появлению новых молекулярных форм фермента во всех клеточных компартментах, включая и митохондрии. Наличие достаточно высокой чистоты выделенных фракций митохондрий и хлоропластов было подтверждено ранее с помощью соответствующих маркеров, где перекрестное загрязнение фракций составляло не более 1-3%. Во всех вариантах опыта в клетках проростков гороха величина электрофоретической подвижности митохондриальной липоксигеназы не изменялась.

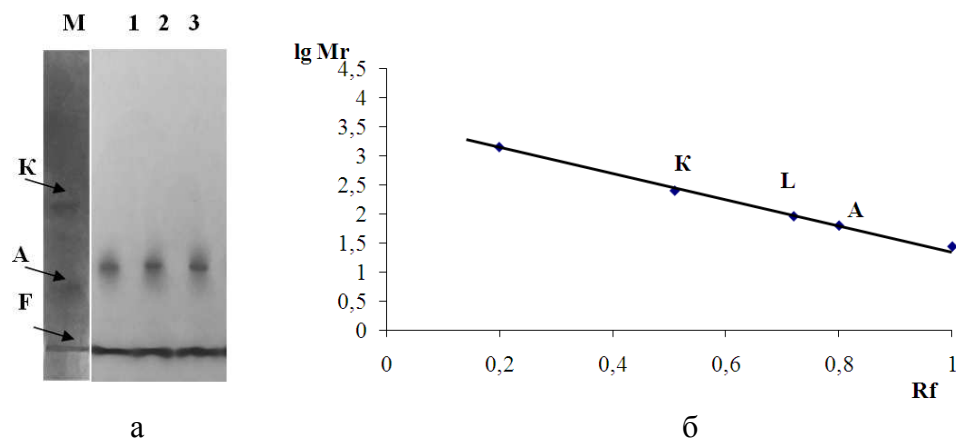


Рис. 1. Специфическое проявление липоксигеназы на электрофореграммах белковой фракции митохондрий растений, находящихся в разных условиях аэрации (а), графическое определение молекулярной массы фермента липоксигеназы (б)

1 – воздух; 2 – гипоксия; 3 –  $\text{CO}_2$ -среда; F – фронт красителя метиленовый синий; М - белки маркеры, проявленные кумасси R-250: К - каталаза (250 кДа), А - альбумин бычий сывороточный (66 кДа), L – липоксигеназы

По результатам визуализации окраски пятен липоксигеназы на электрофоретических пластинках можно предположить, что в митохондриях проростков гороха, подвергнутых действию гипоксического стресса и  $\text{CO}_2$ -среды активность липоксигеназы несколько возростала. В связи с этим в следующих опытах было проведено определение методом спектрофотометрии активности липоксигеназы в разных клеточных компартментах, включая и митохондрии. Было обнаружено, что в митохондриальной фракции клеток проростков гороха присутствует до 21.2% активности липоксигеназы от суммарной клеточной активности фермента. При действии на растения гипоксии и  $\text{CO}_2$ -среды активность митохондриальной липоксигеназы возростала на 50-70% по сравнению с аэрируемыми растениями (таблица 1).

Таблица 1. Влияние гипоксии и  $\text{CO}_2$ -среды на активность липоксигеназы в митохондриях растений гороха (ФЕ – мкМоль/мг белка)

вариант	ФЕ	% от контроля
3 часа		
воздух	96.0±10.2	100
гипоксия	170.1±15.0	177
$\text{CO}_2$ -среда	145.8±15.1	152
6 часов		
воздух	158.5±7.6	100
гипоксия	156.2±9.1	99
$\text{CO}_2$ -среда	163.2±7.0	103
24 часа		
воздух	105.6±10.9	100
гипоксия	87.9±9.2	83
$\text{CO}_2$ -среда	55.8±6.11	53

Для доказательства участия митохондриальной молекулярной формы липоксигеназы в процессах накопления свободных радикалов при действии на растения гипоксии использовали специфические ингибиторы данного фермента SHAM и пропилгаллат в концентрации 1 мМ (рис. 2). Данные ингибиторы существенно снижали активность липоксигеназы митохондрий у растений, находящихся как в условиях

аэрации, так в условиях гипоксии и среды  $\text{CO}_2$ . Так, при использовании ингибитора SHAM активность митохондриальной липоксигеназы растений гороха в условиях высоких концентраций  $\text{CO}_2$  снижалась почти в 6 раз, а при действии гипоксии – более чем в 2 раза.

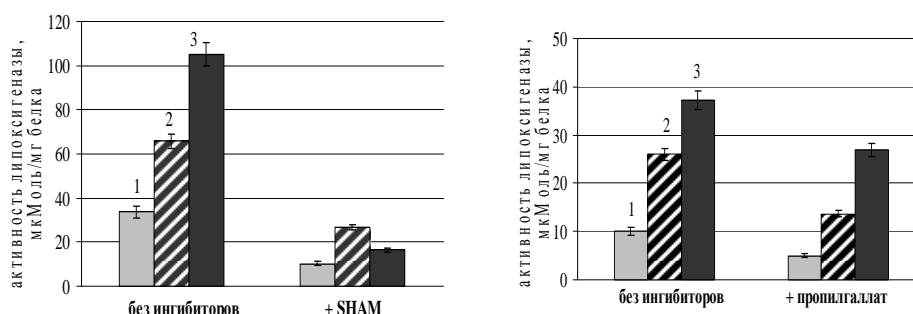


Рис. 2. Влияние специфических ингибиторов SHAM (1 мМоль) и пропилгаллата (1 мМоль) на активность липоксигеназы митохондрий растений гороха при действии газовых сред (1- воздух, 2 – гипоксия, 3 –  $\text{CO}_2$ )

## Заключение

Известно, что в митохондриях образование супероксидрадикала, а затем и перекиси водорода сопряжено с функционированием дыхательной электроно-транспортной цепи, которая локализуется во внутренней мембране [3]. При этом митохондриальные АФК могут выступать в качестве важных сигнальных молекул в растениях, передавая информацию в другие клеточные компартменты, например, в хлоропласты, и данный процесс может рассматриваться как митохондриальная обратная регуляция [10].

Проведенные нами исследования с использованием методов дифференциального центрифугирования и электрофореза в ПААГ доказали не только присутствие липоксигеназы в митохондриях проростков гороха, но и изменение ее активности в клетках растений при кратковременной гипоксии и действии  $\text{CO}_2$ -среды. Рассчитана электрофоретическая подвижность молекулярных форм липоксигеназы митохондрий. С помощью белков маркеров и электрофоретической подвижности рассчитана молекулярная масса фермента, которая составила 99 кДа. Предполагается, что митохондриальная липоксигеназа является мономером и появление новых изоформ ее не наблюдалось, если на проростки действовали условия гипоксии и  $\text{CO}_2$ -среды. При этом было установлено, что при действии гипоксии активность митохондриальной липоксигеназы могла значительно (1.5-2.0 раза) возрастать, но только в первые часы действия гипоксического стресса. При дальнейшем увеличении экспозиции этого эффекта не наблюдалось. Вероятно, при действии гипоксического стресса и высоких концентраций  $\text{CO}_2$  у растений наблюдалось изменение активности одной и той же молекулярной формы митохондриальной липоксигеназы.

Обнаружено, что высокие концентрации  $\text{CO}_2$  более значительно повышали активность митохондриальных липоксигеназ, чем условия обычной гипоксии. Это способствовало увеличению в митохондриях растений фонда свободных радикалов, образующихся при дефиците кислорода [7]. Участие митохондриальной липоксигеназы в процессах накопления АФК как в условиях аэрации, так и при гипоксическом стрессе, было доказано и с использованием специфических ингибиторов данного фермента SHAM и пропилгаллата.

Полученные результаты расширяют представления о свойствах и роли митохондриальной липоксигеназы у растений в стрессовых условиях.

### Список литературы

1. Лемеза О.В., Зубо Я.О., Кузнецов В.В. // *Физиология растений*. 2010. Т. 57. № 5. С. 765-770.
2. Pokotylo I.V., Kolesnikov Y.S., Derevyanchuk M.V., Kharitonenko A.I. et al. // *Ukr. Biochem. J.* 2015. Vol. 87. No 2. pp. 41-55.
3. Braidot E. // *J. Exp. Bot.* 2004. Vol. 55. No 403. pp. 1655-1662.
4. Ershova A.N., Berdnikova O.S. // «Plant Biology Europe FESPB/ EPSO 2014 Congress», June 22-26, 2014, Dublin, 2014, p. 59.
5. Ершова А.Н. Метаболическая адаптация растений к гипоксии и повышенному содержанию диоксида углерода. Воронеж. Воронеж. гос. ун-т. 2007. 264 с.
6. Ershova A.N., Popova N.V., Berdnikova O.S. // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2011. Vol. 58. No 6. pp. 982-990.
7. Ильинская Л.И., Переходов Е.А., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г. и др. // *Физиология растений*. 2000. Т. 47. № 4. С. 516-523.
8. Shingles R.M., Arron G.P., Hill R.D. // *Plant Physiology*. 1982. Vol. 69. pp. 1435-1438.
9. Pavelic D., Arpagaus S., Rawyler A., Brandle R. // *Plant Physiology*. 2000. Vol. 124. pp. 1285-1292.
10. Camp R.G. // *Plant Cell*. 2006. Vol. 15. pp. 2320-2332.

### References

1. Lemeza O.V., Zubo Ja.O., Kuznecov V.V., *Fiziologija rastenij*, 2010, Vol. 57, No 5, pp. 765-770.
2. Pokotylo I.V., Kolesnikov Y.S., Derevyanchuk M.V., Kharitonenko A.I. et al., *Ukr. Biochem. J.*, 2015, Vol. 87, No 2, pp. 41-55.
3. Braidot E., *J. Exp. Bot.*, 2004, Vol. 55, No 403, pp. 1655-1662.
4. Ershova A.N., Berdnikova O.S. «Plant Biology Europe FESPB/ EPSO 2014 Congress», June 22-26, 2014, Dublin, 2014, p. 59.
5. Ershova A.N. *Metabolicae accommodatio plantarum hypoxia et augeri content of ipsum dioxide*, Voronezh, Voronezh. state University, 2007, 264 p.
6. Ershova A.N., Popova N.V., Berdnikova O.S., *Russian Journal of Plant Physiology*, 2011, Vol. 58, No 6, pp. 982-990.
7. Ilinskaya L.I., Perekhodov E.A., Chalenko G.I., Gerasimova N.G. et al., *Fiziologija rastenij*, 2000, Vol. 47, No 4, pp. 515-523.
8. Shingles R.M., Arron G.P., Hill R.D., *Plant Physiology*, 1982, Vol. 69, pp. 1435-1438.
9. Pavelic D., Arpagaus S., Rawyler A., Brandle R., *Plant Physiology*, 2000, Vol. 124, pp. 1285-1292.
10. Camp R.G., *Plant Cell*, 2006, Vol. 15, pp. 2320-2332.

**Ершова Антонина Николаевна** – доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой биологии растений и животных Воронежский государственный педагогический университет, Воронеж, тел. (473)253-29-86

**Бердникова Ольга Сергеевна** – ассистент кафедры биологии растений и животных Воронежский государственный педагогический университет, Воронеж

**Ershova Antonina N.** – doctor of biological sciences, head of plant and animal biology chair, Voronezh State Pedagogical University, Voronezh, E-mail: [aershova@vspu.ac.ru](mailto:aershova@vspu.ac.ru)

**Berdnikova Olga S.** – assistant at plant and animal biology chair, Voronezh State Pedagogical University, Voronezh, E-mail: [olgaberdn@mail.ru](mailto:olgaberdn@mail.ru)