

Дмитрюкова М.Ю.¹, Баймиев А.Х.², Рахманкулова З.Ф.¹

¹Башкирский государственный университет

²Учреждение Российской академии наук Институт биохимии
и генетики Уфимского научного центра РАН

E-mail: zilyaver@mail.ru

ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ЛЕГГЕМОГЛОБИНА СОИ НА АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА

Для изучения влияния синтеза леггемоглобина А сои на антиоксидантную систему тканей растения нами были созданы трансгенные растения табака (*Nicotiana tabacum*, сем. *Solanaceae*) сорта Samsun. Для изучения антиоксидантного статуса тканей были измерены содержание мевалонового диальдегида, уровень активности каталазы и гваяколпероксидазы. Обнаружено, что трансгенные растения табака накапливали меньшую сухую биомассу и характеризовались сниженным уровнем перекисного окисления липидов и активности гваяколпероксидазы по сравнению с контрольными нетрансгенными растениями.

Ключевые слова: леггемоглобин, мевалоновый диальдегид, гваяколпероксидаза.

Введение

Леггемоглобины (легоглобины, Lb) – миоглобин-подобные белки с молекулярным весом около 16 кДа, обладающие высоким сродством к кислороду. В среднем содержание Lb в клубеньках бобовых велико и составляет до 30–40% всех растворимых белков цитозоля растительной клетки [1].

Леггемоглобины играют важную роль в процессе фиксации азота, поддерживая концентрацию кислорода на низком, но постоянном уровне, достаточном для дыхания бактериоидов, но не ингибирующем нитрогеназу.

Леггемоглобины – белки, содержащие в качестве простетической группы Fe-протопорфирин IX (гем). Для переноса кислорода железо гема должно находиться в восстановленном (Lb²⁺) состоянии. В ходе некоторых процессов левоглобин может окисляться до неактивной формы (Lb³⁺), при этом образуются активные формы кислорода. Однако в нормально функционирующих клубеньках содержится около 80% Lb²⁺, около 20% оксиLb²⁺ и отсутствует Lb³⁺, поскольку имеются механизмы поддержания левоглобина в восстановленном состоянии [2].

Обычно гемовая составляющая левоглобина синтезируется бактерией, но митохондрии растений могут участвовать в синтезе гема в случае неинфицированных клубеньков или когда бактерия не способна к синтезу [3].

Интенсивное образование активных форм кислорода (АФК) и, как следствие, активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) являются одной из ранних неспецифических реакций растительных клеток на действие стрессоров [4].

В нормальных условиях жизнедеятельности клетки постоянно присутствует определенный уровень перекисного окисления липидов, индуцированный образованием активных форм кислорода. Перекисное окисление липидов в клетке поддерживается на постоянном уровне благодаря многоуровневой антиоксидантной системе защиты [5].

Кислород в клетках участвует в качестве кофактора или субстрата во многих биохимических процессах. В целях стимулирования кислородзависимых реакций предпринимались попытки повысить доступность кислорода в клетках за счет экспрессии кислородсвязывающих белков.

Было показано, что экспрессия гена гемоглобина *Vitreoscilla* (грамотрицательная бактерия) в пластидах увеличивает рост и вызывает изменения в метаболизме трансгенных табаков [6]. Напротив, экспрессия гена леггемоглобина сои в хлоропластах не вызывала значительных изменений в первичном и вторичном метаболизме трансгенных растений [7].

Для изучения взаимодействия леггемоглобина с кислородзависимым метаболизмом нами были созданы трансгенные растения табака, несущие ген леггемоглобина А сои. Целью данной работы явилось исследование влияния экспрессии гена леггемоглобина А сои на ростовые параметры, уровень ПОЛ, активность антиоксидантных ферментов растений табака.

Материалы и методы

Получение растительного материала.

В работе были использованы растения табака (*Nicotiana tabacum*, сем. *Solanaceae*), сорт

Samsun. Трансформированные растения были получены методом листовых дисков с помощью *Agrobacterium tumefaciens* [8] с небольшими модификациями. Для трансформации была использована плаزمида pCambia 1301, любезно предоставленная фирмой «Cambia» (Австралия) [http://www.cambia.org.au]. Данный вектор, способный реплицироваться в клетках и *E. coli*, и *Agrobacterium* sp., содержит в области Т-ДНК репортерный ген *gus* с каталазным интроном, ответственный за расщепление β-D-глюкуроноидов, и селективный ген *hptII* гигромицинофосфотрансферазы, придающей устойчивость к гигромицину.

Ген леггемоглобина А сои был вставлен под 35S промотор вируса табачной мозаики.

Наличие экспрессии гена было подтверждено ОТ-ПЦР с РНК, выделенной из трансгенных растений с праймерами, фланкирующими ген леггемоглобина.

Для опытов были использованы растения первого поколения. Расщепление по признаку устойчивости к гигромицину и *gus*-окрашиванию составило 3:1.

В качестве контроля использовались не-трансгенные растения табака.

Для изучения перекисного состояния тканей были измерены содержание мевалонового диальдегида (МДА), уровни активности каталазы и пероксидазы.

Определение активности ПОЛ по содержанию МДА. Об изменении активности ПОЛ судили по содержанию вторичного продукта ПОЛ – МДА с помощью метода Health, Packer, 1968 [9]. Метод определения основан на том, что при высокой температуре в кислой среде МДА реагирует с тиобарбитуровой кислотой, образуя розовый триметиловый комплекс с максимумом поглощения при 532 нм [10].

Образцы листьев (500 мг) гомогенизировали с 2 мл 0,1%-ной ТХУ. Гомогенат центрифугировали при 10 000 г в течение 10 мин. К 1 мл супернатанта добавляли 4 мл 0,5%-ной тиобарбитуровой кислоты в 20%-ной ТХУ. Смесь нагревали 30 мин. при 95 °С и быстро охлаждали в ледяной бане. После центрифугирования при 10 000 г в течение 10 мин. было измерено поглощение супернатанта при 532 нм. Из этого значения вычитали значение неспецифического поглощения при 600 нм.

Концентрацию МДА определяли по формуле:

$$C = \frac{A_{532} - A_{600}}{k},$$

где С – концентрация МДА, A532 – оптическая плотность раствора при 532 нм, A600 – оптическая плотность при 600 нм, k – коэффициент молярной экстинкции МДА (155 мМ⁻¹ * см⁻¹).

Определение активности каталазы.

Для определения активности каталазы использовали метод М.А. Королюк, основанный на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс [11].

Навеску растительного материала (100 мг) растирали в 5 мл смеси Серенсена с добавлением ЭДТА (0,1 мМ) и тритона X-100 (0,1%), инкубировали при +4° в течение 15 минут и центрифугировали 20 мин. при 10 000 оборотах. Полученный супернатант использовали для определения активности каталазы и гваяколпероксидазы.

Для определения каталазы реакцию запускали добавлением 0,1 мл растительного гомогената к 2 мл 0,03% раствора перекиси водорода. В качестве контрольной пробы использовали 0,1 мл дистиллированной воды. Реакцию останавливали через 10 мин. добавлением 4% молибдата аммония. Затем измеряли интенсивность развившейся окраски на спектрофотометре при длине волны 410 нм против контрольной пробы, в которой вместо перекиси водорода вносили 2 мл воды. Расчет измерений проводили следующим образом:

$$E = (A_x - A_o) * V * t * k,$$

где E – активность каталазы в мкат/л, A_x – оптическая плотность холостой пробы, A_o – оптическая плотность опытной пробы, k – коэффициент миллимолярной экстинкции перекиси водорода (22,2 * 10³ мМ⁻¹ * см⁻¹).

Определение активности гваяколпероксидазы. Определение пероксидазной активности проводили кинетическим методом по А.И. Ермакову [12].

Для этого 4,8 мл смеси Серенсена смешивали с 0,5 мл 10% гваякола, затем добавляли 0,05 мл экстракта. Реакцию запускали добавлением 0,15% раствора пероксида водорода. Измерение проводилось в течение 2 минут с шагом 20 секунд при длине волны 436 нм.

Расчет проводился по формуле:

$$E = \frac{(A1 - A2) * V * V2 * 60}{(t2 - t1) * V1 * H}$$

где E – активность гваяколпероксидазы в мкат/л, A1 – оптическая плотность в начале, A2 – в конце, V – общий объем вытяжки (см³), V1 – объем, взятый для реакции, V2 – общий объем жидкости, взятый для реакции, t1 – начало опыта (сек.), t2 – время конца опыта (сек.), H – масса навески (г).

Все измерения проводились не менее чем в 10 повторностях. Математическая обработка данных проводилась с помощью статистического пакета Microsoft Excel 2007.

Результаты и обсуждение

Для изучения влияния экспрессии гена леггемоглобина A сои на ростовые параметры было измерено накопление сухой биомассы растений в возрасте 1 месяца.

Вес сухой биомассы трансгенных растений составил 50% от биомассы контрольных растений (рис. 1).

Другими авторами было показано увеличение роста и накопление сухой массы транс-

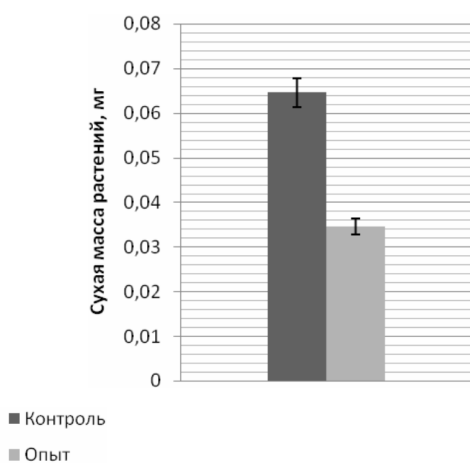


Рисунок 1. Накопление сухой биомассы опытными (трансгенными) и контрольными (нетрансгенными) растениями в возрасте 1 месяца

Таблица 1. Константы скорости ассоциации (k) и диссоциации O₂ (k') и константы равновесия (k'/k) при физиологических pH (по: [3])

Вид гемоглобина	K' O ₂ (мкМ ⁻¹ C ⁻¹)	K O ₂ (C ⁻¹)	k'/k (мкМ ⁻¹)
Vgb (гемоглобин <i>Vitreoscilla</i>)	118	0,3	390
(Lb) <i>Glycine max</i> (соя)	120	5,6	21

генными растениями, несущими ген гемоглобина *Vitreoscilla* (vgb) [6].

Подобное расхождение, вероятно, можно объяснить, рассмотрев константы диссоциации этих гемоглобинов (табл. 1).

Из таблицы следует, что леггемоглобин обладает большим сродством к кислороду, т.е. освобождение кислорода происходит при более низком парциальном давлении кислорода в окружающей среде.

Торможение роста также наблюдалось и у растений картофеля, несущих трансгенные по гену леггемоглобина A сои пластыды [13]. В этом случае снижение роста авторы объясняли нарушением биосинтеза гиббереллина, первые стадии которого происходят непосредственно в пластидах.

К настоящему времени имеется большое число публикаций, в которых показано, что первичная функция гемоглобинов, вероятно, заключается в защите клеток от нитрозативного стресса и модулировании сигнальной функции NO [3]. В растениях NO участвует в различных физиологических процессах, таких как рост и развитие, формирование устойчивости к болезням, ответ на абиотический стресс [14]. Связываясь с NO с образованием нитрозильного комплекса, леггемоглобин, вероятно, нарушает систему передачи сигнала в клетке, что вызывает торможение роста трансгенных растений.

Для гемоглобина витреосциллы предполагается наличие функции детоксикации NO. Однако индукция экспрессии vgb при нитрозативном стрессе не наблюдается, хотя Vgb проявляет незначительную NO-диоксигеназную активность [15].

Для изучения уровня перекисного окисления липидов было измерено содержание мевалонового диальдегида. МДА образуется при деградации полиненасыщенных жиров активными формами кислорода и служит маркером перекиснокисления жиров и оксидативного стресса [15].

Содержание мевалонового диальдегида в опытных образцах было снижено на 20% по сравнению с контрольными нетрансгенными растениями.

Вероятно, в тканях трансгенных растений за счет пероксидазных свойств окисленного леггемоглобина снижается содержание активных форм кислорода, что ведет к снижению уровня МДА.

Для изучения эффекта накопления леггемоглобина на активность ферментов окислительного стресса была изучена активность пероксидазы и каталазы.

Пероксидаза (ПО) является одним из маркерных ферментов и практически первой активируется в ответ на стресс [17].

Активность гваяколпероксидазы в трансгенных растениях, несущих ген леггемоглобина А сои, была снижена на 19% по сравнению с контрольными нетрансгенными растениями (рис. 3).

Активность каталазы в опытных и контрольных образцах статистически не различалась, хотя и была ниже в опытных трансгенных образцах. Подобные результаты были получены и на растениях картофеля [18], и на растениях табака [7], несущих трансгенные по гену леггемоглобина А сои пластыды.

Пероксидазные свойства Lb основаны на способности гемовой группы разлагать H_2O_2 до H_2O в присутствии донора электрона. Поскольку константа скорости пероксидазной реакции, катализируемой Lb, намного меньше констант скоростей реакций известных растительных пероксидаз, эту активность Lb обычно называют «псевдопероксидазной» [19]. Известно, что в зависимости от концентрации и состояния гемоглобина могут либо усиливать окислительное действие активных форм азота и кислорода в восстановленном состоянии (проявлять прооксидантные свойства) [20], либо подавлять эти реакции – в окисленном (антиоксидантное действие) [21].

В трансгенных растениях обнаруживается низкий уровень ПОЛ, связанный, вероятно, с антиоксидантными свойствами Lb³⁺. Можно предположить, что окисленное состояние железа гема Lb обусловлено низким уровнем восстанавливающих Lb агентов в клетках трансгенных растений. Низкий уровень ПОЛ, в свою очередь, может способствовать снижению активности эндогенной пероксидазы.

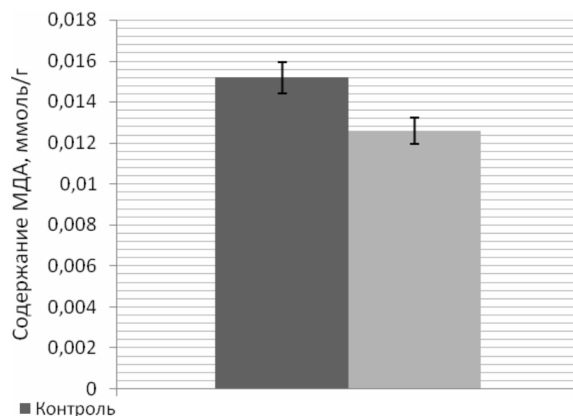


Рисунок 2. Содержание мевалонового диальдегида в опытных (трансгенных) и контрольных (нетрансгенных) растениях табака

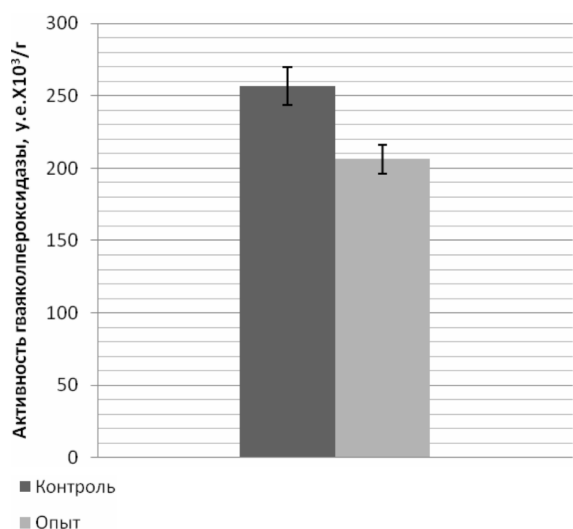


Рисунок 3. Активность гваяколпероксидазы в опытных (трансгенных) и контрольных (нетрансгенных) растениях табака

Выводы

Нами было показано участие экспрессии гена леггемоглобина А сои в антиоксидантной системе трансгенных растений табака. Накопление леггемоглобина в тканях ведет к снижению перекисного окисления липидов, снижению уровня активности гваяколпероксидазы.

18.06.2010

Список литературы:

1. Verma D.P.S., Bal A.K. Intracellular site of synthesis and localization of leghemoglobin in root nodules // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1976. Vol. 73. № 11. Pp. 3843-3847.
2. Becaena M., Moran J.F., Iturbe-Ormaeche I., Gogorcena Y., Escuredo Structure and function of leghemoglobins // An. Estac. Exp. Aula Dei (Zaragoza). 1994. Vol. 21. №3. Pp. 203-208.
3. Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Гемоглобины – разнообразие структур и функций // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 6. С. 627-653.
4. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. – М.: КДУ, 2007. - 140 с.
5. Курганова Л.Н. Перекисное окисление липидов – одна из возможных компонент быстрой реакции на стресс // СОЖ. 2001. № 6. С. 76–78.
6. Holmberg N., Lilius G., Bailey J.E., Bulow L. Transgenic tobacco expressing Vitreoscilla hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production // Nat. biotechnol. 1997. Vol. 15. Pp. 244-247.

7. Barata R.M., Chapparro-Giraldo A., Chabregas S.M., Gonzales R., Labate C.A., Azevedo R.A., Sarath G., Lea P.J., Silva-Filho M.C. Targeting of soybean leghemoglobin to tobacco chloroplasts: effects on aerobic metabolism in transgenic plants // *Plant Sci.* 2000. Vol. 155. Pp. 193-202.
8. Horsch RB, Fraley RT, Rogers SG, Sanders PR, Lloyd A. A simple and general method for transferring genes into plants // *Science.* 1985. № 227. Pp. 1229-1231.
9. Heath RL, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // *Archives in Biochemistry and Biophysics* 1968. № 125. Pp. 189-198.
10. Hodges D.M., DeLong J.M., Forney C.F., Prange R.K. Improving the Thiobarbituric Acid-Reactive-Substances Assay for Estimating Lipid Peroxidation in Plant Tissues Containing Anthocyanin and Other Interfering Compounds // *Planta.* 1999. Vol. 207. Pp. 604-611.
11. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. (1988) Метод определения активности каталазы // *Лабораторное дело.* №1. С. 16-19.
12. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А., Иконникова М.И. Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат, 1987. С. 41-43.
13. Bonna A.L., Chaparro-Giraldo A., Appezzato-da-Gloria B., Silva-Filho M.C. Ectopic expression of soybean leghemoglobin in chloroplasts impairs gibberillin biosynthesis and induces dwarfism in transgenic potato plants // *Mol. breeding.* 2008. Vol. 22. Pp. 613-618.
14. Parani M., Rudrabhatla S., Myers R., Weirich H., Smith B., Leaman D.W., Goldman S.L. Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis* // *Plant Biotechnology Journal.* 2004. Vol. 2. Pp. 359-366.
15. Gardner P.R. Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin, hemoglobin, myoglobin and their associated reductases // *J. Inorg. Biochem.* 2005. Vol. 99. Pp. 247-266.
16. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки // *Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений.* М.: ВИНТИ. 1989. Т. 6. 168 с.
17. Шевякова Н.И., Стеценко Л.А., Мещеряков А.Б., Кузнецов Вл.В. Изменение активности пероксидазной системы в процессе стресс-индуцированного формирования САМ // *Физиология растений.* 2002. Т. 49. № 5. С. 670-677.
18. Chaparro-Giraldo A., Barata R.M., Chabregas S.M., Azevedo R.A., Silva-Filho M.C. Soybean leghemoglobin targeted to potato chloroplasts influences growth and development of transgenic plants // *Cell plant reports.* 2000. Vol.19. Pp. 961-965.
19. Sievers G., Ronnberg M. Study of pseudoperoxidatic activity of soybean leghemoglobin and sperm whale myoglobin // *Biochim. Biophys. Acta.* 1978. Vol. 533. Pp. 293-301.
20. Moreau S., Davies M.J., Mathieu C., Herouart D., Puppo A. Leghemoglobin derived radicals. Evidence for multiple protein-derived radicals and the initiations of the peribacteroid membrane damage // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. Pp. 32557-32562.
21. Puppo A. Halliwell B (1988) Generation of hydroxyl radicals by soybean nodule leghaemoglobin. // *Planta* Vol. 173. Pp. 405-410.

Сведения об авторах:

Дмитрюкова Марина Юрьевна, аспирант кафедры физиологии растений

Башкирского государственного университета

450007, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32, тел. (927)2386645, e-mail: zilyaver@mail.ru

Баймиев Алексей Ханифович, учреждение Российской академии наук Институт биохимии и

генетики Уфимского научного центра РАН, доктор биологических наук, доцент

450054, г. Уфа, пр. Октября, 71, тел. (927)2337808, факс (347)2356100, e-mail: alex@anrb.ru

Рахманкулова Зульфира Фаузиевна, кафедра физиологии растений Башкирского государственного

университета, доктор биологических наук, профессор

Тел. (347)2736712, email: zulfiraR@mail.ru

Dmitryukova M.Yu., Baimiev A.Kh., Rakhmankulova Z.F.

Influence of expression of gene of soy leghemoglobin on antioxidant system of transgenesis tobacco-plant

For studying of the influence of synthesis of soy leghemoglobin A on antioxidant system of a plant tissue we created of transgenesis tobacco-plant (*Nicotiana tabacum*, family Solanaceae) of brand Samsun. The content of mevalonic dialdehyde, the level of catalase and guaiacolperoxidase activity was measured for studying of antioxidant status of tissues. It was revealed that transgenesis tobacco-plants accumulated smaller dry biomass and were characterized with reduced level of lipid peroxidation and guaiacolperoxidase activity compared to control non-transgenesis plants.

Key words: leghemoglobin, mevalonic dialdehyde, guaiacolperoxidase.