

БИОХИМИЯ

УДК 577.15

САЛИЦИЛГИДРОКСАМАТ УСИЛИВАЕТ НАДН-ОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ В СУСПЕНЗИЯХ МИТОХОНДРИЙ И ХЛОРОПЛАСТОВ ГОРОХА

В.Д. Самуилов*, Д.Б. Киселевский

Кафедра иммунологии, биологический факультет,
 Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
 Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
 * e-mail: vdsamuilov@mail.ru

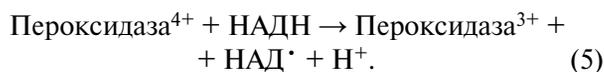
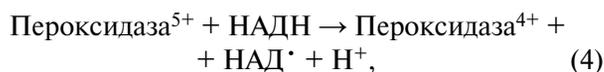
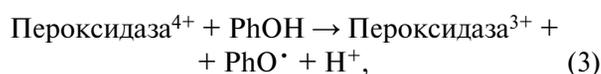
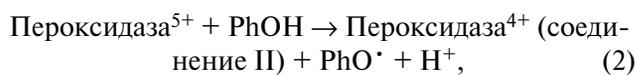
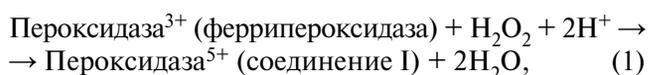
Салицилгидроксиамат (СГ), ингибитор альтернативной оксидазы митохондрий растений, усиливает НАДН-оксидазную активность в суспензиях митохондрий и хлоропластов, полученных при их выделении из корней или листьев гороха, соответственно. Реакция подавляется при отмывании митохондрий и хлоропластов и проявляется в надосадочных растворах, полученных при их удалении центрифугированием. Реакция чувствительна к CN^- и антиоксиданту пропилгаллату. Окисление НАДН, наряду с СГ, стимулируется 2,4-дихлорфенолом или фенолом, но не салициловой кислотой. Ускорение окисления НАДН фенольными соединениями наблюдается с коммерческой пероксидазой хрена, оно связано с участием этих соединений в НАДН-зависимой пероксидазной реакции. 2,4-Дихлорфенол и СГ значительно усиливают разрушение ядер устьичных клеток в эпидермисе из листьев гороха, вызванное образованием активных форм кислорода при окислении добавленного НАДН с участием апопластной пероксидазы.

Ключевые слова: дыхательная цепь, альтернативная оксидаза, пероксидазная активность, митохондрии, хлоропласты, пероксидаза хрена, фенольные соединения, салицилгидроксиамат.

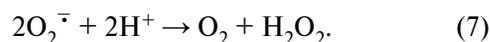
Убихинон в митохондриях животных и растений восстанавливается НАДН с помощью комплекса I или сукцинатом с помощью комплекса II дыхательной цепи. В митохондриях растений имеются дополнительные пути восстановления убихинона: внутри- и внемитохондриальными НАДН и НАДФН посредством соответствующих (четырех) дегидрогеназ, устойчивых к ротенону и не генерирующих $\Delta\mu$ — трансмембранную разность электрохимических потенциалов H^+ . Окисление убихинола в митохондриях растений происходит через цитохромный путь (комплексы III и IV дыхательной цепи) и с помощью альтернативной оксидазы, не генерирующей $\Delta\mu$, устойчивой к CN^- и чувствительной к гидроксиаматам (салицилгидроксиамату или бензилгидроксиамату) и пропилгаллату (рис. 1, а, см. обзоры [1, 2]). Пропилгаллат — антиоксидант, нашедший применение в защите пищевых продуктов от окислительной порчи.

Добавленный НАДН окисляется через главный (цитохромный) путь дыхательной цепи, минуя альтернативную оксидазу [1], поэтому процесс полностью ингибируется KCN [3]. Салицилгидроксиамат тормозит окисление сукцината, но ускоряет окисление НАДН [3]. Возникают вопросы о том, как добавленный НАДН окисляется O_2 , минуя альтернативную оксидазу, почему окисление НАДН стимулируется салицилгидроксиаматом, каков механизм наблюдаемой оксидазной реакции.

Оксидазные реакции свойственны не только дыхательным цепям, но и пероксидазам. Пероксидазная реакция в присутствии H_2O_2 и доноров электронов, например, фенола, фенольных соединений или НАДН, включает следующие стадии (цифры при пероксидазе отражают степень окисления фермента — подробнее см. [4–8], PhOH — фенол или фенольные соединения):

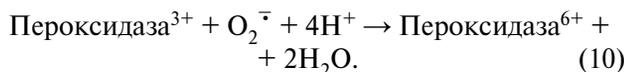
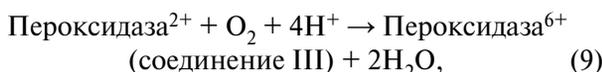
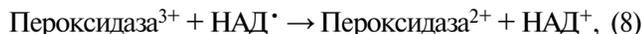


Радикал НАД^\bullet , реагируя с O_2 , дает $\text{O}_2^{\bullet-}$, который в супероксиддисмутазной реакции превращается в H_2O_2 :

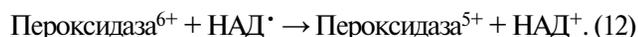


В оксидазных реакциях, называемых пероксидазно-оксидазными, пригодны немногие доноры

электронов: НАДН, дигидроксифумарат, индол-3-ацетат или нафтогидрохиноны [4, 9]. Фермент участвует в формах пероксидазы²⁺ (ферропероксидаза) и пероксидазы³⁺:



Пероксидаза⁶⁺ — каталитически неактивная форма фермента. Фенольные соединения в сочетании с НАДН переводят пероксидазу в активную форму [5–7] и ведут также, продуцируя радикал НАД[•], к образованию O₂^{•-} и H₂O₂ (см. уравнения 6, 7):



Цель настоящей работы — выяснить, какой фермент осуществляет НАДН-зависимую оксидазную реакцию, которая стимулируется салицилгидроксаматом и наблюдается в изолированных митохондриях или хлоропластах. Наряду с салицилгидроксаматом, испытаны фенол и другие фенольные соединения: 2,4-дихлорфенол и салициловая кислота, представленные на рис. 1, б.

Материалы и методы

Проростки гороха (*Pisum sativum* L. сорта Альфа) выращивали 7–15 сут при периодическом освещении светом металлогалогеновой лампы ДРиЗ (250 Вт) интенсивностью ~100 мкЕ·м⁻²·с⁻¹ (свет — 16 ч, темнота — 8 ч) при 20–24 °С.

Хлоропласты выделяли, как описано ранее [10], из листьев проростков растиранием в фарфоровой ступке в среде, содержащей 50 мМ трицин–КОН, рН 7,8, 35 мМ NaCl, 0,4 М сахарозы и 1 мМ MgCl₂, центрифугированием при 500 g в течение 5 мин при 4 °С. Хлоропласты осаждали из полученной надосадочной жидкости центрифугированием при 2000 g 5 мин и суспендировали в той же среде. Митохондрии выделяли, руководствуясь описанием в работе [11]. Корни проростков гороха растирали в ступке в среде того же состава, что и для хлоропластов. Полученный гомогенат центрифугировали при 5000 g 5 мин при 4 °С. Из надосадочной жидкости митохондрии осаждали центрифугированием при 15000 g 15 мин при 4 °С. При необходимости хлоропласты и митохондрии отмывали раствором 50 мМ трицин–КОН, рН 7,8, 35 мМ NaCl, 0,4 М сахарозы и 1 мМ MgCl₂ и осаждали центрифугированием в тех же условиях. Хлоропласты и митохондрии хранили в среде того же состава при 4 °С и использовали в течение 3–4 ч после выделения. Содержание белка в хлоропластах, митохондриях

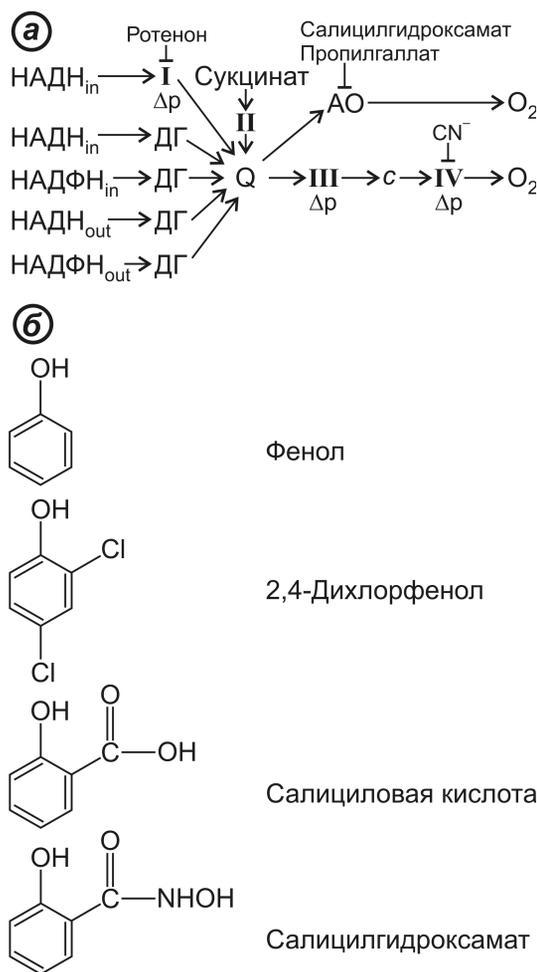


Рис. 1. Дыхательная цепь митохондрий растений (а) и структура испытанных соединений (б). а — НАДН_{in} и НАДФН_{in}, внутримитохондриальные НАДН и НАДФН; НАДН_{out} и НАДФН_{out}, немитохондриальные НАДН и НАДФН; I–IV, комплексы дыхательной цепи; Q, убихинон; c, цитохром c; ДГ, дегидрогеназы; АО, альтернативная оксидаза; Δp, протондвижущая сила, равная сумме трансмембранной разности электрических потенциалов (ΔΨ) и трансмембранной разности рН (ΔpH)

и надосадочной жидкости от них определяли с помощью бицинониновой кислоты и сульфата меди [12]. Разрушение ядер устьичных клеток в пленках эпидермиса, изолированных с нижней поверхности листьев гороха, регистрировали, как описано ранее [8].

НАДН-оксидазную активность хлоропластов, митохондрий и надосадочной жидкости от них, а также активность коммерческой пероксидазы хрена (ICN Biomedicals Inc., США) определяли оксиметрически по поглощению O₂ в расчете мкмоль O₂/ч на 1 мг белка.

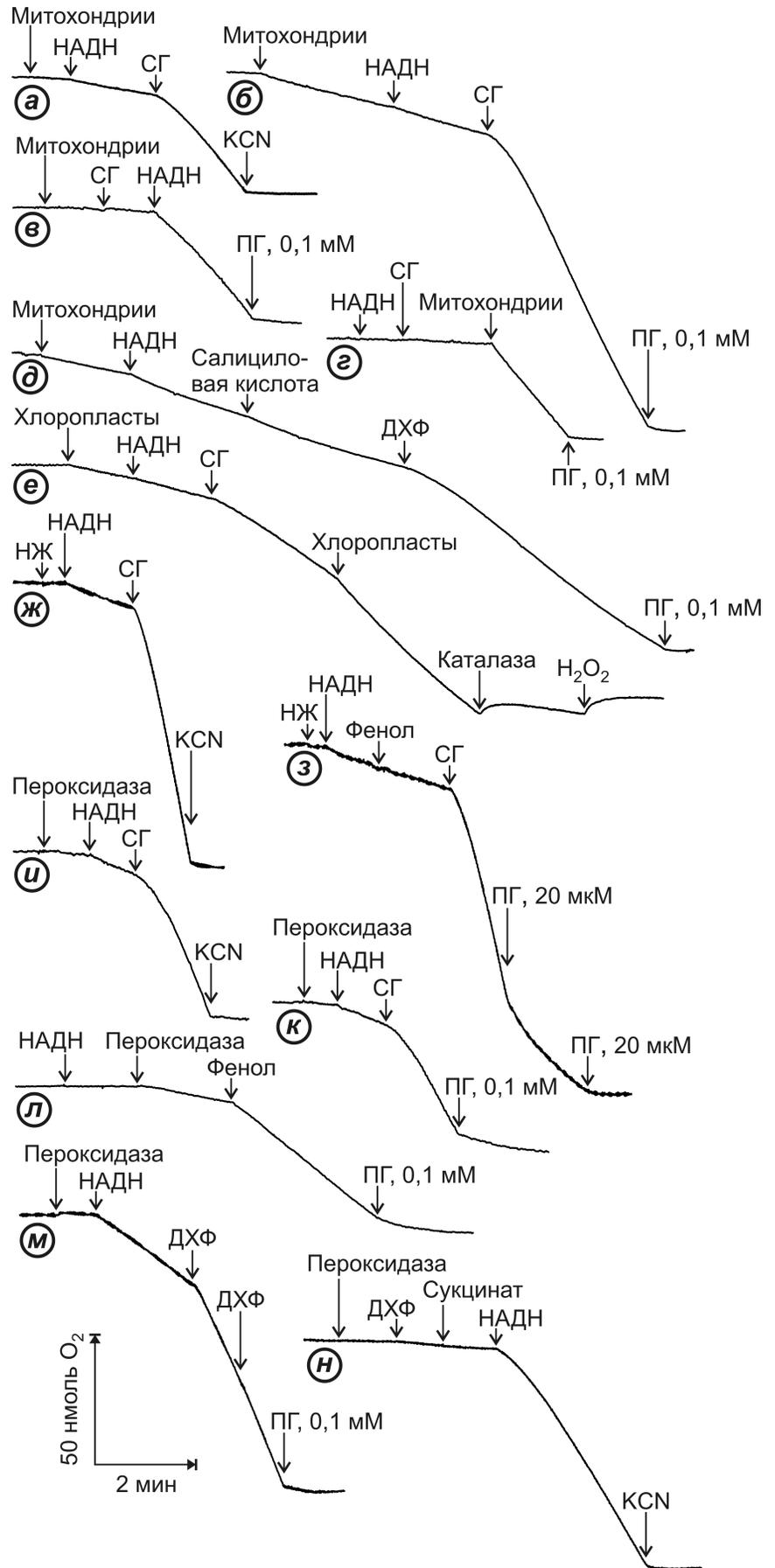
Гибель клеток регистрировали по разрушению клеточных ядер. Определяли долю клеток с разрушенными ядрами и лишенных ядер в расчете на 250–600 обследованных клеток (в 2–3 пленках эпидермиса) в каждом из вариантов опыта. Приведены доверительные интервалы (α = 0,05).

Результаты и обсуждение

Данные рис. 2, а–г показывают стимуляцию окисления НАДН салицилгидроксаматом (СГ) в митохондриях из корней гороха. CN⁻ или пропилгаллат (ПГ), добавленные вслед за СГ, подавляют окисление НАДН (рис. 2, а, б). Рис. 2, в иллюстрирует окисление НАДН на фоне добавленного СГ. Сам по себе СГ не окисляет НАДН — реакция включается только после добавки митохондрий (рис. 2, г). Салициловая кислота не влияет на НАДН-оксидазную активность митохондрий, реакция активируется при последующем добавлении 2,4-дихлорфенола (ДХФ) и тоже ингибируется ПГ (рис. 2, д). Окисление НАДН, стимулированное СГ, протекает и в хлоропластах из листьев гороха (рис. 2, е), процесс подавляется каталазой, вызывающей распад H₂O₂ на H₂O и O₂. Зависимое от НАДН и СГ поглощение O₂ снижается в 1,5–3 раза при отмывании митохондрий и хлоропластов и проявляется в надосадочных жидкостях, полученных после их отмывания, сохраняя чувствительность к CN⁻ (рис. 2, ж) и ПГ (рис. 2, з).

Эти данные свидетельствуют о том, что наблюдаемое окисление НАДН катализируется немембранным ферментом. По ряду признаков — это пероксидаза: фермент чувствителен к ингибитору гемовых ферментов CN⁻, подавляется

Рис. 2. НАДН-оксидазная активность митохондрий из корней гороха (а–д), хлоропластов из листьев гороха (е), надосадочной жидкости (НЖ), полученной при промывании митохондрий (ж, з) и коммерческой пероксидазы хрена (и–н). В оксиметрическую ячейку (1,5 мл) со средой, содержащей 50 мМ трицин-КОН, рН 7,8, 35 мМ NaCl, 0,4 М сахарозу и 1 мМ MgCl₂, добавляли митохондрии с содержанием белка 0,12–0,22 мг/мл, 1 мМ НАДН, 2 мМ СГ, 2,5 мМ KCN, ПГ, 1 мМ салициловую кислоту, 1 мМ ДХФ, хлоропласты с содержанием белка 0,31 мг/мл, 100 ед. активности/мл каталазы, 20 мкМ H₂O₂, НЖ с содержанием белка 0,27 мг/мл, 0,5 мМ фенол, 40 ед. активности/мл пероксидазы хрена, 2 мМ сукцинат



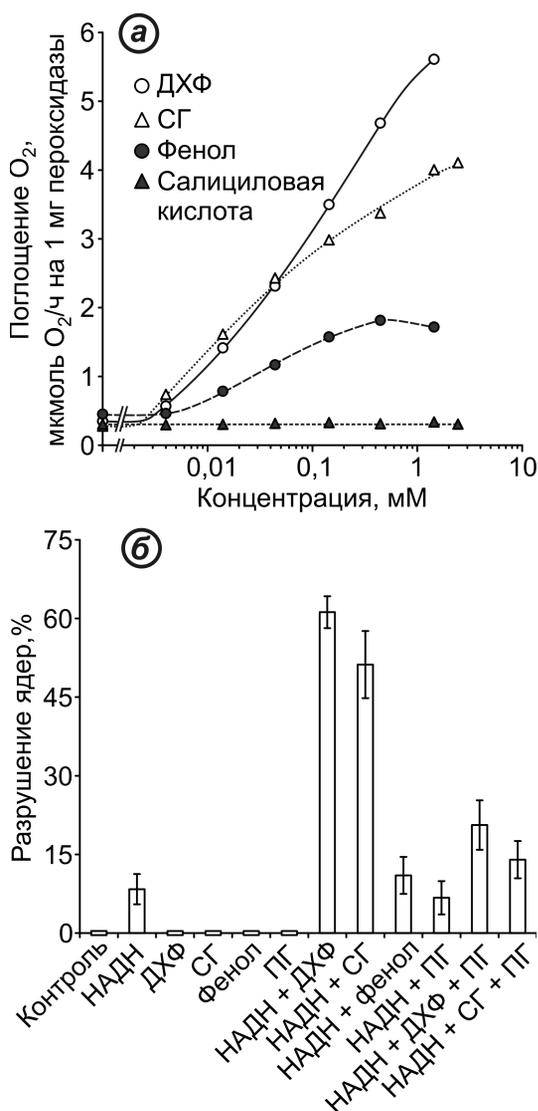


Рис. 3. НАДН-оксидазная активность пероксидазы как функция концентрации ДХФ, СГ, фенола и салициловой кислоты (а) и разрушение ядер устьичных клеток в эпидермисе из листьев гороха в условиях НАДН-оксидазной реакции пероксидазы (б). а — Условия инкубации, как на рис. 2. Добавки: 40 ед. активности/мл пероксидазы хрена, 1 мМ НАДН, ДХФ, СГ, фенол и салициловая кислота. б — К пленкам эпидермиса, инкубируемым в дистиллированной воде, добавляли 1 мМ НАДН, 1 мМ ДХФ, 2 мМ СГ и 0,1 мМ ПГ, инкубировали 23 ч в темноте

каталазой, т.е. зависит от H_2O_2 , и подавляется антиоксидантом ПГ, который также ингибирует альтернативную оксидазу митохондрий растений [1, 2]. Полученные результаты согласуются с данными литературы: СГ в концентрациях ниже 15 мМ стимулировал поглощение O_2 корнями гороха, которое, по-видимому, не было обусловлено взаимодействием СГ с компонентами дыхательной цепи митохондрий, в частности, стимуляцией ее цитохромной ветви, и связано с СГ-зависимой активацией пероксидазы [13, 14].

Данные рис. 2, и–н иллюстрируют НАДН-оксидазную активность пероксидазы хрена. Реакция

активируется СГ и подавляется CN^- (рис. 2, и) или ПГ (рис. 2, к). СГ может быть заменен на фенол (рис. 2, л) или ДХФ (рис. 2, м), в обоих вариантах реакция чувствительна к ПГ. В отличие от НАДН, сукцинат не влияет на пероксидазную активность (рис. 2, н). Активность пероксидазы хрена зависит от природы субстрата и снижается в ряду: ДХФ, СГ, фенол (рис. 3, а). Салициловая кислота не поддерживает реакцию. Известно, что пероксидаза хрена, находясь в форме соединения III (Per^{6+}), быстро и необратимо инактивируется салициловой кислотой в присутствии H_2O_2 , превращаясь в вердогеомпротейн [15].

Как поставщик активных форм кислорода апопластная пероксидаза участвует в реализации гиперчувствительного ответа — локальной гибели клеток растений на воздействие инфекционных возбудителей или их сигнальных соединений — элиситоров [16]. Активные формы кислорода вызывают гибель клеток в эпидермисе листьев, регистрируемую по разрушению ядер устьичных и эпидермальных клеток [17]. Данные на рис. 3, б демонстрируют разрушение ядер устьичных клеток в эпидермисе из листьев гороха. Разрушение ядер, вызванное НАДН, возрастает при добавлении ДХФ или СГ, практически не меняется при добавлении фенола и подавляется ПГ (рис. 3, б).

Ускорение окисления НАДН в митохондриях посредством СГ (рис. 2, а, б) связано с его участием в НАДН-зависимой пероксидазной реакции. Уравнения, представленные во введении, позволяют объяснить стимуляцию окисления НАДН фенольными соединениями с участием пероксидазы. Пероксидаза $^{2+}$ и пероксидаза $^{3+}$, реагируя с O_2 и O_2^- (реакции 9 и 10), окисляются до пероксидазы $^{6+}$. Радикал СГ * , образующийся в реакциях 2 и 3, восстанавливается НАДН с образованием радикала НАД * (реакция 11), окисляющегося O_2 (реакция 6). Таким образом, СГ через реакции 2, 3 и 11 стимулирует поглощение O_2 через образование НАД * . Судя по данным рис. 2 и 3, а, стимулирующее действие СГ на поглощение O_2 связано с реакциями 11 и 6, но не 9 и 10, поскольку скорость поглощения O_2 в отсутствие СГ мала. Образование радикала НАД * возможно также в реакциях 4 и 5, но поглощение O_2 с НАДН значительно усиливается СГ (рис. 2 и 3, а): пероксидаза $^{5+}$, по-видимому, предпочитает восстанавливаться СГ (реакции 2 и 3), но не НАДН (реакции 4 и 5). Будучи ингибитором альтернативной оксидазы, СГ тормозит окисление сукцината [3], который не пригоден как субстрат оксидазной реакции с пероксидазой (рис. 2, н).

Полученные результаты показывают, что ингибиторы альтернативной оксидазы митохондрий растений, являющиеся производными фенола, оказывают противоположное действие на пероксидазу: СГ, подобно ДХФ и фенолу, ускоряет НАДН-оксидазную реакцию, ПГ ингибирует ее. Наблюдаемая

НАДН-оксидазная активность ведет к образованию активных форм кислорода, вызывающих разрушение клеточных ядер и гибель клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moore A.L., Siedow J.N. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria // *Biochim. Biophys. Acta*. 1991. Vol. 1059. N 2. P. 121–140.
2. Rasmussen A.G., Soole K.L., Elthon T.E. Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004. Vol. 55. P. 23–39.
3. Samuilov V.D., Kiselevsky D.B. Effect of cationic plastoquinone SkQ1 on electron transfer reactions in chloroplasts and mitochondria from pea seedlings // *Biochemistry (Mosc.)*. 2015. Vol. 80. N 4. P. 417–423.
4. Yamazaki I., Yokota K. Oxidation states of peroxidase // *Mol. Cell. Biochem.* 1973. Vol. 2. N 1. P. 39–52.
5. Halliwell B. Lignin synthesis: The generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenols // *Planta*. 1978. Vol. 140. N 1. P. 81–88.
6. Bronnikova T.V., Fed'kina V.R., Schaffer W.M., Olsen L.F. Period-doubling bifurcations and chaos in a detailed model of the peroxidase-oxidase reaction // *J. Phys. Chem.* 1995. Vol. 99. N 23. P. 9309–9312.
7. Hauser M.J.B., Olsen L.F. The role of naturally occurring phenols in inducing oscillations in the peroxidase-oxidase reaction // *Biochemistry*. 1998. Vol. 37. N 8. P. 2458–2469.
8. Samuilov V.D., Vasil'ev L.A., Dzyubinskaya E.V., Kiselevsky D.B., Nesov A.V. Programmed cell death in plants: protective effect of phenolic compounds against chitosan and H₂O₂ // *Biochemistry (Mosc.)*. 2010. Vol. 75. N 2. P. 257–263.
9. Yokota K., Yamazaki I. Analysis and computer simulation of aerobic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide catalyzed by horseradish peroxidase // *Biochemistry*. 1977. Vol. 16. N 9. P. 1913–1920.
10. Барский Е.Л., Губанова О.Н., Самуилов В.Д. Ингибирование фотосинтетического переноса электронов

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 14-04-00507а.

в хлоропластах м-хлоркарбонилицианидфенилгидразоном // *Биохимия*. 1991. Т. 56. № 3. С. 434–438.

11. Millenaar F.F., Benschop J.J., Wagner A.M., Lambers H. The role of the alternative oxidase in stabilizing the in vivo reduction state of the ubiquinone pool and the activation state of the alternative oxidase // *Plant Physiol.* 1998. Vol. 118. N 2. P. 599–607.
12. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid // *Anal. Biochem.* 1985. Vol. 150. N 1. P. 76–85.
13. de Visser R., Blacquièrre T. Inhibition and stimulation of root respiration in *Pisum* and *Plantago* by hydroxamate: its consequences for the assessment of alternative pathway activity // *Plant Physiol.* 1984. Vol. 75. N 3. P. 813–817.
14. Brouwer K.S., van Valen T., Day D.A., Lambers H. Hydroxamate-stimulated O₂ uptake in roots of *Pisum sativum* and *Zea mays*, mediated by a peroxidase: its consequences for respiration measurements // *Plant Physiol.* 1986. Vol. 82. N 1. P. 236–240.
15. Kawano T., Muto S., Adachi M., Hosoya H., Lapeyrie F. Spectroscopic evidence that salicylic acid converts a temporally inactivated form of horseradish peroxidase (compound III) to the irreversibly inactivated verdohemoprotein (P-670) // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002. Vol. 66. N 3. P. 646–650.
16. Allan A.C., Fluhr R. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells // *Plant Cell*. 1997. Vol. 9. N 9. P. 1559–1572.
17. Samuilov V.D., Lagunova E.M., Beshta O.E., Kitashov A.V. CN⁻-Induced degradation of nuclei in cells of pea leaves // *Biochemistry (Mosc.)*. 2000. Vol. 65. N 6. P. 696–702.

Поступила в редакцию
20.10.15

SALICYLHYDROXAMIC ACID ACCELERATES THE NADH OXIDASE ACTIVITY OF PEROXIDASE IN SUSPENSIONS OF PEA MITOCHONDRIA AND CHLOROPLASTS

V.D. Samuilov*, D.B. Kiselevsky

Department of Immunology, School of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia;

*e-mail: vdsamuilov@mail.ru

Salicylhydroxamic acid (SHAM), an inhibitor of the alternative oxidase in plant mitochondria, accelerated the NADH-oxidase activity in suspensions of mitochondria and chloroplasts, obtained by their isolation from the roots or leaves of pea, respectively. The reaction was suppressed by washing mitochondria and chloroplasts. It also proceeded in supernatants where the organelles were removed by centrifugation. The reaction was sensitive to CN⁻ and propyl gallate, an antioxidant. In addition to SHAM, NADH oxidation was stimulated by 2,4-dichlorophenol or phenol, but not by salicylic acid. The acceleration of NADH oxidation by the phenolic compounds occurred in the presence of commercial horseradish peroxidase. It is due to the involvement of these compounds in the NADH-dependent peroxidase reaction. 2,4-Dichlorophenol and SHAM enhanced significantly destruction of nuclei in guard cells of the epidermis from pea

leaves induced by generation of reactive oxygen species under oxidation of exogenous NADH by means of the apoplastic peroxidase.

Key words: *respiratory chain, alternative oxidase, peroxidase activity, mitochondria, chloroplasts, horseradish peroxidase, phenolic compounds, salicylhydroxamate.*

Сведения об авторах:

Самуилов Виталий Дмитриевич — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-56; e-mail: vdsamuilov@mail.ru

Киселевский Дмитрий Борисович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-56; e-mail: dkiselevs@mail.ru