

УДК 581.1

## РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИЯ ТИРОЗИНОВОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ В ОТВЕТНЫХ РЕАКЦИЯХ РАСТЕНИЙ НА РАЗЛИЧНЫЕ СТРЕССЫ И СОЕДИНЕНИЯ

Н.В. Петрова, А.Р. Мухитов, Ф.Г. Каримова

### Аннотация

При действии *in vivo* экзогенных соединений, вызывающих повышение содержания внутриклеточной перекиси водорода, и модификатора тиоловых групп белков показано изменение уровня тирозинового фосфорилирования полипептидов корней гороха. Приведена динамика изменения внутриклеточного содержания  $H_2O_2$  при действии на растения различных стрессоров, а также ингибитора каталазы аминотриазола и активатора НАДФН-оксидазы форболового эфира. Полученные результаты свидетельствуют о редокс-регуляции уровня тирозинового фосфорилирования белков растений.

**Ключевые слова:** тирозинное фосфорилирование белков, редокс-регуляция, горох.

### Введение

В ответ на различные стимулы или стрессы клетка отвечает повышением продукции активных форм кислорода (АФК), источниками которых могут быть мембраны и внутриклеточные компартменты. Из всех форм АФК наиболее стабильной является перекись водорода  $H_2O_2$ , которая способна проникать через мембраны и окислять тиоловые группы цистеина белков в цитозоле клеток. Известно, что в цитоплазме поддерживаются восстанавливающие условия, в то время как в апопласте и внутриклеточных компартментах поддерживаются более окисляющие условия. Показано, что на поверхности клеток *Arabidopsis thaliana* стимул вызывает «окислительный взрыв» через гетеротримерный G-белок [1]. Полагают, что продукция АФК внутриклеточными ферментными системами – необходимая компонента ответных реакций клеток всех уровней организации, принципы организации которых высококонсервативны и присутствуют как у позвоночных, так и в растениях, отличаясь в деталях у разных организмов для каждой системы [2]. Редокс-чувствительными клеточными белками являются белки с низким  $pK_a$ , к которым относятся ферменты фосфорилирования-дефосфорилирования белков – протеинкиназы (ПТК) и протеинфосфатазы (ПТФ), которые прямо взаимодействуют с  $H_2O_2$ . На клетках позвоночных найдено, что окисление SH-групп существенного остатка цистеина в каталитическом центре ПТФ подавляет активность ПТФ [3, 4]. Для растений редокс-регуляция активности дефосфорилирующего белка фермента ПТФ была показана на изолированной и очищенной из *Arabidopsis thaliana* AtPTP1 в работе Гупты и Луана [5].

Ранее нами было показано влияние экзогенной  $H_2O_2$  на фосфорилирование по тирозину белков корней гороха и обращение ее эффекта аскорбатом и восстанавливающим агентом ДТТ [6]. В настоящей работе представлены данные по влиянию экзогенных соединений, вызывающих повышение внутриклеточного содержания  $H_2O_2$ , а также модифицирующих SH-группы белков, на уровень тирозинового фосфорилирования белков корней гороха и эндогенное содержание  $H_2O_2$ .

### 1. Материалы и методы

Растения гороха (*Pisum sativum* L.) выращивали в условиях 10-часового фотопериода на 0.25 нормы питательной среды Хогланда – Арнона I при интенсивности освещения 10 кЛюкс в течение 7 дней. После отделения от побегов корни инкубировали в среде роста (контроль) или в среде с добавлением эффекторов. Следует заметить, что отделение побегов от корней вызывает стресс, сопровождающийся повышением внутриклеточного содержания АФК. Для характеристики стресса измеряли эндогенное содержание  $H_2O_2$  методом FOX1 [7]. Кончики корней гороха длиной 1 см гомогенизировали в ледяном ацетоне ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ) (300 мг корней в 1 мл ацетона). Гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 12000 g. Супернатант использовали для анализа. Среда состояла из равных объемов супернатанта и реактива, содержащего 500 мкМ аммоний-сернокислого железа(II) ( $FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ ), 50 мМ ксиленолового оранжевого, 200 мМ сорбитола, 50 мМ  $H_2SO_4$ , которую оставляли на 1 ч при комнатной температуре в плотно закрытой колбе в темноте. Измерение проводили при длине волны 560 нм, используя в качестве контроля смесь, состоящую из равных частей реактива и ацетона.

Детекцию фосфорилированных белков проводили при помощи иммуноблоттинга после разделения растворимых белков методом электрофореза и переноса белков на ПВДФ-мембраны. После инкубации с эффекторами кончики корней фиксировали в жидком азоте и гомогенизировали в среде (1 : 2), содержащей: 50 мМ Трис-НСl, pH 7.5; 1 мМ ДТТ; 1 мМ фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ); 1 мМ ЭГТА; 0.1 мМ ортованадат; 1 мМ теофиллин; 3% (m/V) поливинилпирролидон. Гомогенат центрифуговали в течение 10 мин при  $5\text{ }^\circ\text{C}$  и 14000 g. Приготовление образца для одномерного электрофореза проводили смешиванием буфера, содержащего 187.5 мМ Трис-НСl, pH 8.0, 6% ДДС, 15% меркаптоэтанола, 30% глицерина, 0.004% бромфенолового синего с супернатантом, в соотношении 1 : 3.

Белки разделяли методом одномерного электрофореза [8] в 6–20%-ном ПААГ. Количество белка на трек составляло 25 мкг.

После проведения электрофореза белки переносили на ПВДФ мембраны в течение 60 мин при постоянной величине электрического тока 150 мА, используя прибор для полусухого блоттинга. Затем мембраны в течение ночи блокировали 1% (m/V) БСА, растворённым в ТБСТ (10 мМ Трис-НСl, pH 7.5; 100 мМ NaCl; 0.05% Твин-20) при  $5\text{ }^\circ\text{C}$ . Блоты инкубировали 1 ч при комнатной температуре с антителами к фосфотирозину PY20 (Amersham, Англия), конъюгированными с пероксидазой хрена, в разведении 1 : 1000 в солевом трис-буфере с Твин-20 (pH 7.5) (высокая специфичность использованных нами монокло-

нальных антител PY20, показанная в специальных исследованиях [9], подтверждена в наших экспериментах с белками растений [6]). Для визуализации тирозинового фосфорилирования белков блоты инкубировали 1 мин в ECL – реагенте (Amersham) и экспонировали на рентгеновской пленке.

Для визуализации белков мембраны окрашивали 0.1%-ным спиртовым раствором Кумасси R-250 10 мин, затем отмывали 50%-ным этанолом. Для вычисления удельного тирозинового фосфорилирования белков, разделённых электрофоретически, мембраны, окрашенные Кумасси R-250, и рентгеновские плёнки сканировали при помощи Epson Perfection 3170 Photo, и данные переводили в числовые значения оптической плотности при помощи программы Scion Image (Великобритания).

Удельное тирозинное фосфорилирование выражали в относительных единицах (отн. ед.) как отношение оптической плотности фосфорилированного белка (хемилюминесценции) на плёнке к оптической плотности белка на мембране, окрашенной Кумасси R-250. Количество белка измеряли согласно методу Bradford [10] с БСА в качестве стандарта.

Эксперименты проводились в двух-трех повторностях. Приведены результаты типичного опыта 3–4 серий.

В работе использованы: Трис, глицин, ДТТ, поливинилпирролидон, ДДС, ТЕМЕД, бромфеноловый синий, персульфат аммония, акриламид, Кумасси R-250 и G-250, а также метилен-бис-акриламид фирмы «Bio-Rad» (США). Моноклональные антитела против фосфотирозина (клон PY20), ПВДФ мембраны, хемилюминесцентный реагент (ECL-реагент), Твин-20 и БСА были получены от Amersham Pharmacia Biotech (Великобритания). ФМСФ, ЭДТА, фосфотирозин, теofilлин, аминотриазол, форболовый эфир и йодуксусная кислота были поставлены фирмой «Sigma» (США). Остальные реактивы – NaCl, перекись водорода, ортованадат натрия, глицерин, аммоний сернокислородное железо, ксиленоловый оранжевый, сорбитол, серная кислота, рентгеновская пленка – отечественного производства. Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду, дополнительно очищенную на установке Fistream Cyclon (Англия).

## 2. Результаты и обсуждение

Тирозинное фосфорилирование белков играет важную роль в процессах передачи сигнала внутрь клетки и регуляции клеточного метаболизма в норме. Изучение влияния генерации АФК при стрессе на уровень тирозинового фосфорилирования белков актуально в свете конкурентных отношений различных посттрансляционных модификаций белков в регуляции их активности, в частности посттрансляционного окисления/восстановления. Окисление белков, участвующих в регуляции уровня тирозинового фосфорилирования белков, вызывали *in vivo* действием агентов, повышающих внутриклеточное содержание АФК (наиболее стабильный из них  $H_2O_2$ ).

На рис. 1 приведены данные по изменению уровня тирозинового фосфорилирования спектра полипептидов (ПП) корней гороха при действии ингибитора каталазы аминотриазола.

Каталаза – один из основных ферментов антиоксидантной защиты растений. Подавление активности каталазы ее ингибитором должно вызвать повышение

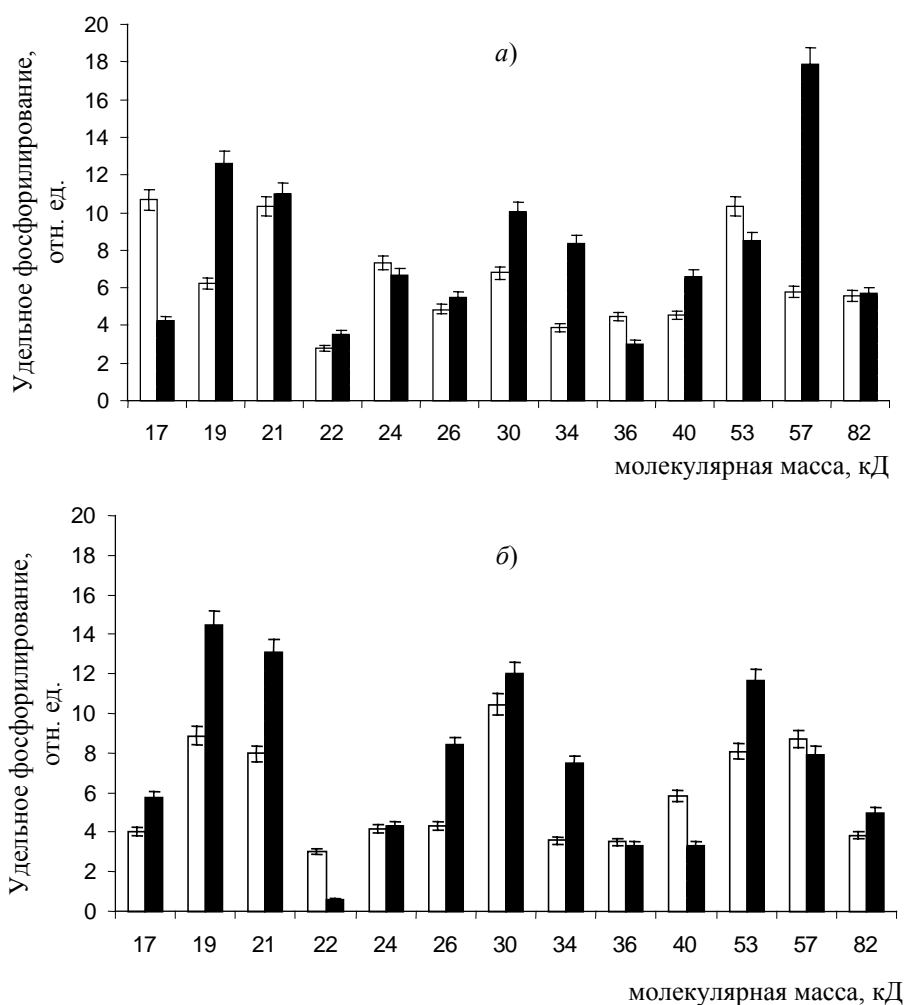


Рис. 1. Влияние аминотриазола (10 мМ) *in vivo* за 5 (а) и 10 (б) мин на тирозиновое фосфорилирование полипептидов корней 7-ми дневных растений гороха. □ – контроль, ■ – аминотриазол

внутриклеточного содержания  $H_2O_2$ , осуществляющего окисление SH-групп активных центров ПТФ, тем самым ингибируя их активность. Подавление активности ПТФ влечет значительное повышение содержания фосфотирозиновых белков в связи с тем, что активность ПТФ выше активности ПТК, по крайней мере, в 10 раз [11], что согласуется с полученными нами ранее данными [12] о повышении уровня тирозинового фосфорилирования белков *Dunaliella maritima* в 10–12 раз специфическим ингибитором ПТФ ортованадатом натрия. Действительно, ингибитор каталазы аминотриазол (рис. 1) вызывал повышение уровня тирозинового фосфорилирования большинства ПП в сравнении с контролем за наблюдаемые времена. За 5 мин действия аминотриазола повышение фосфорилирования наблюдалось у 6 полос ПП: 19, 22, 30, 34, 40 и 57 кД, практически не изменялся уровень тирозинового фосфорилирования у 4-х ПП: 21, 24, 26 и 82 кД и снижался у 3-х полос ПП: 17, 36 и 53 кД.

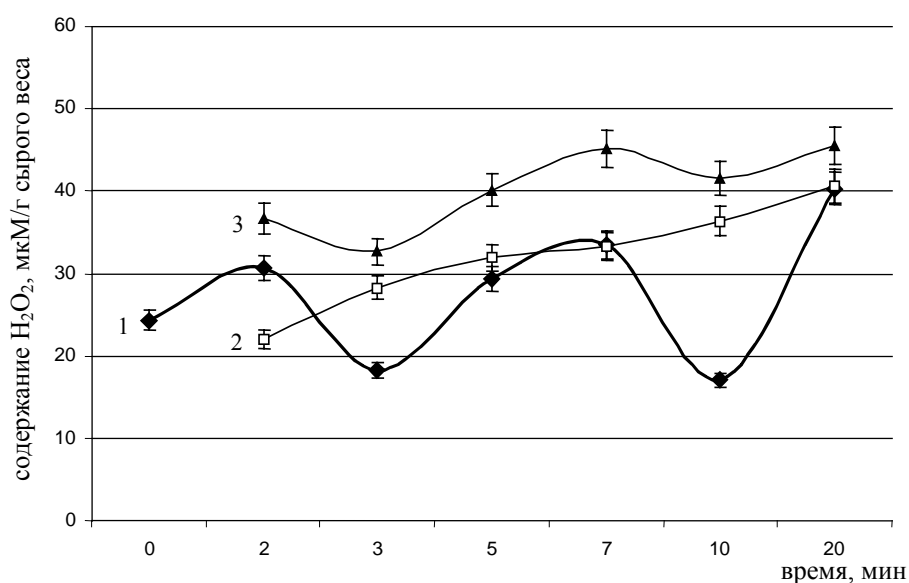


Рис. 2. Динамика изменения внутриклеточного содержания  $H_2O_2$  в корнях гороха под действием аминотриазола (10 мМ) и фурболового эфира (2 мкМ). 1 – контроль, 2 – фурболовый эфир, 3 – аминотриазол

Увеличение времени действия аминотриазола до 10 мин вызывало повышение уровня тирозинового фосфорилирования в сравнении с контролем у восьми из 13-ти ПП: 17, 19, 21, 26, 30, 34, 53 и 82 кД. Снижение тирозинового фосфорилирования в сравнении с контролем за 10 мин наблюдалось только у ПП 22 и 40 кД.

Наиболее выраженное повышение уровня тирозинового фосфорилирования наблюдалось у 3-х ПП 19, 30 и 57 кД за 5 мин и у 5-ти ПП 19, 21, 26, 34, 53 кД за 10 мин действия ингибитора каталазы. Из литературы известно, что длительная обработка растений аминотриазолом приводит к развитию постоянного окислительного стресса [13], это согласуется с полученными нами данными (рис. 1) и подтверждено в наших экспериментах с прямым определением каталазной активности (подавление при действии аминотриазола, данные не опубликованы).

Связь изменений уровня тирозинового фосфорилирования белков с повышением внутриклеточного содержания  $H_2O_2$  под действием ингибитора каталазы подтверждают наши данные по определению эндогенного содержания  $H_2O_2$ , вызванное аминотриазолом (рис. 2).

Аминотриазол (рис. 2) вызывал повышение внутриклеточного содержания перекиси водорода в клетках корней гороха уже в самом начале инкубации (за 2 мин). Наблюдаемые в наших экспериментах колебания содержания эндогенной перекиси водорода в контроле и при действии аминотриазола, по всей видимости, связаны с функционированием в клетках мощной антиоксидантной системы.

Повышение внутриклеточного содержания  $H_2O_2$ , под действием *in vivo* фурболового эфира – активатора НАДФН-оксидазы (рис. 2), основного фермента

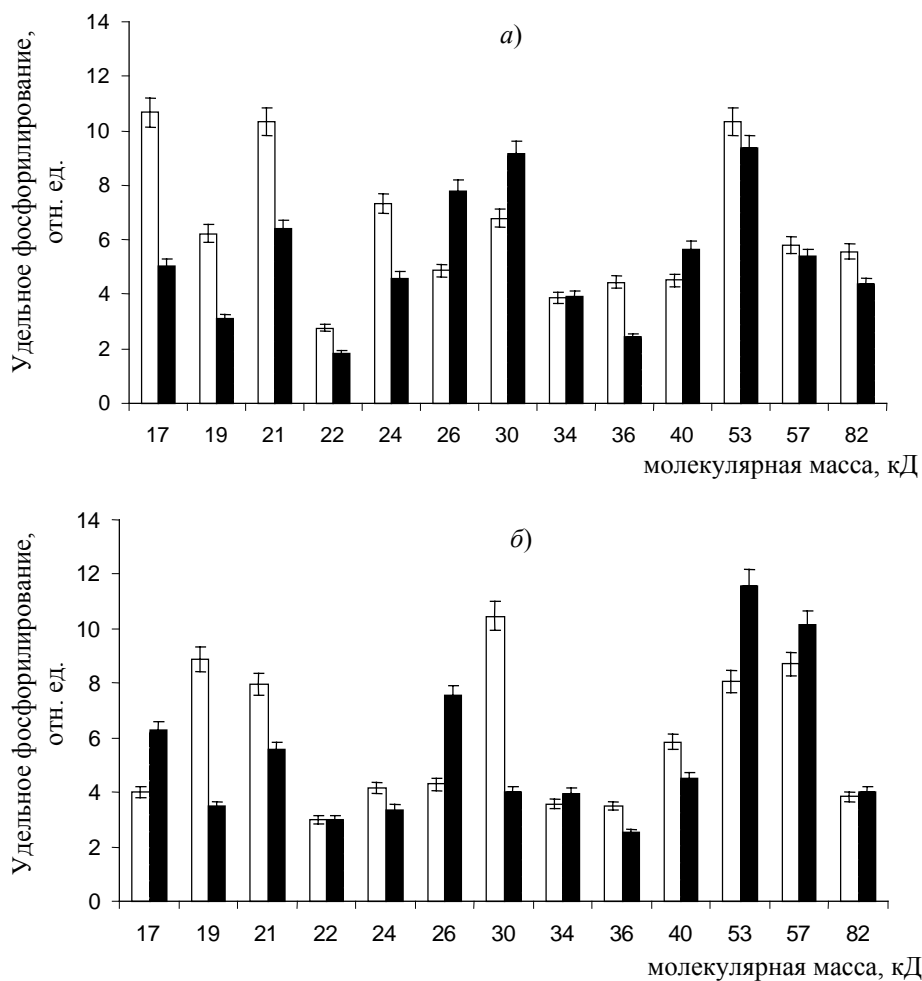


Рис. 3. Влияние форболового эфира (2 мкМ) *in vivo* за 5 (а) и 10 (б) мин на тирозиновое фосфорилирование полипептидов корней 7-ми дневных растений гороха. □ – контроль, ■ – ФМА

супероксидсинтазной сигнальной системы, катализирующего образование внутриклеточной перекиси водорода в физиологических концентрациях (мкМ), вызывало изменение уровня тирозинового фосфорилирования полипептидов (рис. 3) в динамике, отличное от действия ингибитора каталазы (рис. 1).

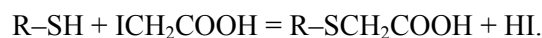
По нашим данным (рис. 3) за 5 мин из 13-ти выявленных в контроле фосфорилированных по тирозину полос ПП форболовый эфир вызывал снижение уровня тирозинового фосфорилирования 7 полос ПП: 17, 19, 21, 22, 24, 36 и 82 кД; практически не изменялся уровень фосфорилирования 3-х полос: 34, 53 и 57 кД и только у 3-х полос наблюдалось повышение уровня тирозинового фосфорилирования: 26, 30 и 40 кД (в сравнении с контролем). Напомним, что длительное повышение уровня тирозинового фосфорилирования белков – негативное событие для организмов [11]. Увеличение времени действия форболового эфира до 10 минут вызывало заметное изменение уровня тирозинового фосфори-

лирования ПП 53 и 57 кД, для которых за 5 мин не наблюдалось изменения уровня тирозинового фосфорилирования, он был повышен в сравнении с контролем. За это время повышение фосфорилирования наблюдалось еще у 2-х полос (17 и 26 кД); у ПП 19, 21, 24, 30, 36, 40 кД форболовый эфир за 10 мин вызывал снижение их фосфорилирования.

Изменения уровня тирозинового фосфорилирования белков, вызываемые форболовым эфиром, связаны с функционированием НАДФН-оксидазной сигнальной системы клеток и реализуется через протеинкиназу С. Форболовый эфир широко используется как агонист ПКС. Показано, что при действии форболового эфира происходит фосфорилирование р47<sup>phox</sup> субъединицы фермента НАДФН-оксидазы [14] (на растениях была продемонстрирована кросс-реактивность антител к этой субъединице с белками той же массы). Именно эта субъединица играет ключевую роль в процессе генерации АФК ферментом в ответ на стимуляцию форболовым эфиром, что было показано с использованием р47<sup>phox</sup>(-)-мутантов [15]. При действии форболового эфира происходит прямое взаимодействие ПКС и компонентов НАДФН-оксидазы. Субъединица р47<sup>phox</sup> НАДФН-оксидазы имеет 2 SH3 домена и сериновые остатки, которые могут распознаваться ПКС. После стимуляции форболовым эфиром ПКС фосфорилирует р47<sup>phox</sup> по множеству сериновых остатков, что вызывает процесс сборки комплекса НАДФН-оксидазы (в неактивном состоянии НАДФН-оксидаза существует в виде отдельных субъединиц, часть которых расположена в цитозоле, а часть ассоциирована с плазматической мембраной).

ПКС помимо активации НАДФН-оксидазы может изменять содержание свободных ионов кальция ( $Ca^{2+}$ ) в клетках. В связи с этим изменения уровня тирозинового фосфорилирования полипептидов, наблюдаемые нами при его действии, могут быть связаны с регуляцией тирозиновых киназ и фосфатаз компонентами сигнальной сети, чувствительными к изменению содержания  $Ca^{2+}$  в клетке [16].

Для выявления вклада тирозиновых фосфатаз в изменение уровня тирозинового фосфорилирования белков и непосредственного участия SH-групп цистеиновых остатков в функционировании этих ферментов был применен специфический алкилирующий агент – йодуксусная кислота, которая модифицирует цистеиновые остатки белковых молекул [17]. Реакция алкилирования идет по следующей схеме:



В случае тирозинфосфатаз эта модификация должна привести к ингибированию ПТФ и, соответственно, к повышению уровня тирозинового фосфорилирования белков.

Действительно, приведенные данные (рис. 4) указывают, что при действии *in vivo* 50 мМ йодуксусной кислоты в течение 5 мин наблюдалось повышение уровня тирозинового фосфорилирования большинства полипептидов (в 1.2–3 раза). Лишь у двух полос ПП (17 и 82 кД) наблюдалось небольшое снижение уровня тирозинового фосфорилирования в сравнении с контролем. У ПП 36, 40 и 53 кД существенной разницы с контролем не наблюдалось.

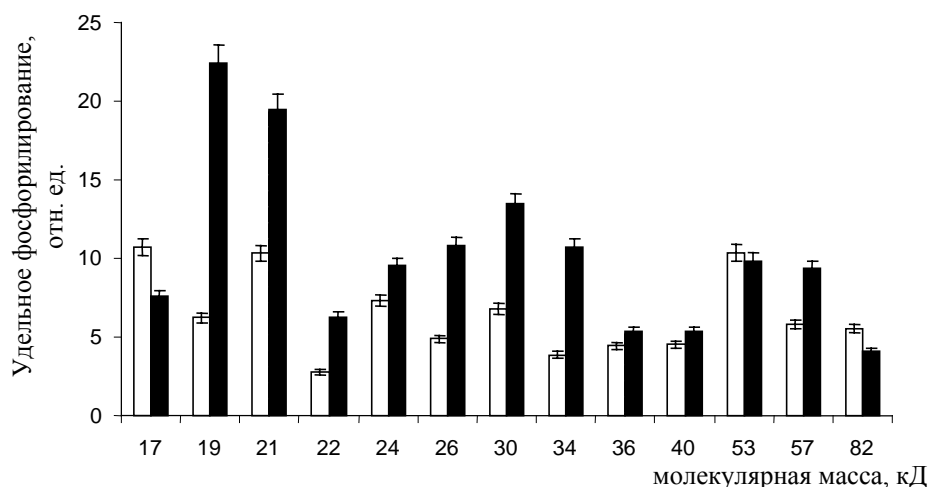


Рис. 4. Влияние йодуксусной кислоты (50 мМ) *in vivo* за 5 мин на тирозиновое фосфорилирование полипептидов корней 7-ми дневных растений гороха. □ – контроль, ■ – йодуксусная кислота

Результаты экспериментов с йодуксусной кислотой (см. рис. 4) однозначно указывают на непосредственную роль тиоловых групп в регуляции активности ферментов дефосфорилирования фосфотирозиновых белков – ПТФ.

Данные, приведенные на рис. 1–4, указывают на незамедлительную реакцию растений на действие испытанных соединений, выражающуюся в быстром и иногда неоднозначном изменении внутриклеточного содержания перекиси водорода (рис. 2). Это влекло изменение уровня тирозинового фосфорилирования белков (рис. 3, 4). Различные стрессовые воздействия на растения (отсечение корней от целого растения, дефицит кальция в среде роста, засоление и низкая температура) также изменяли внутриклеточное содержание перекиси водорода (рис. 5). Результаты, приведенные на рис. 5, свидетельствуют о различной динамике внутриклеточного содержания  $H_2O_2$  в зависимости от вида стресса, сходство проявлялось в колебательном характере изменений.

Согласно данным литературы [18], в оптимальных условиях роста продукция внутриклеточных АФК остается на низком уровне –  $240 \text{ мкМ с}^{-1} O_2^-$ , и постоянный уровень  $H_2O_2$  в хлоропластах – порядка  $0.5 \text{ мкМ}$  [18]. Равновесие между продукцией и улавливанием АФК антиоксидантами может быть нарушено рядом неблагоприятных внешних факторов, в результате чего быстро возрастают внутриклеточные уровни АФК (до  $240\text{--}720 \text{ мкМ с}^{-1} O_2^-$  и уровень перекиси водорода в хлоропластах до  $5\text{--}15 \text{ мкМ}$ ) [18]. Условия наших экспериментов включали стресс: отделение корней от побегов и инкубирование с эффекторами.

Представленные на рис. 5 результаты говорят о высоком внутриклеточном содержании  $H_2O_2$  в корнях, в том числе и за «нулевое» время, то есть через 30 с после отрезания. По абсолютным значениям внутриклеточное содержание  $H_2O_2$  в наших экспериментах (рис. 5) сопоставимо с данными литературы [7, 19].



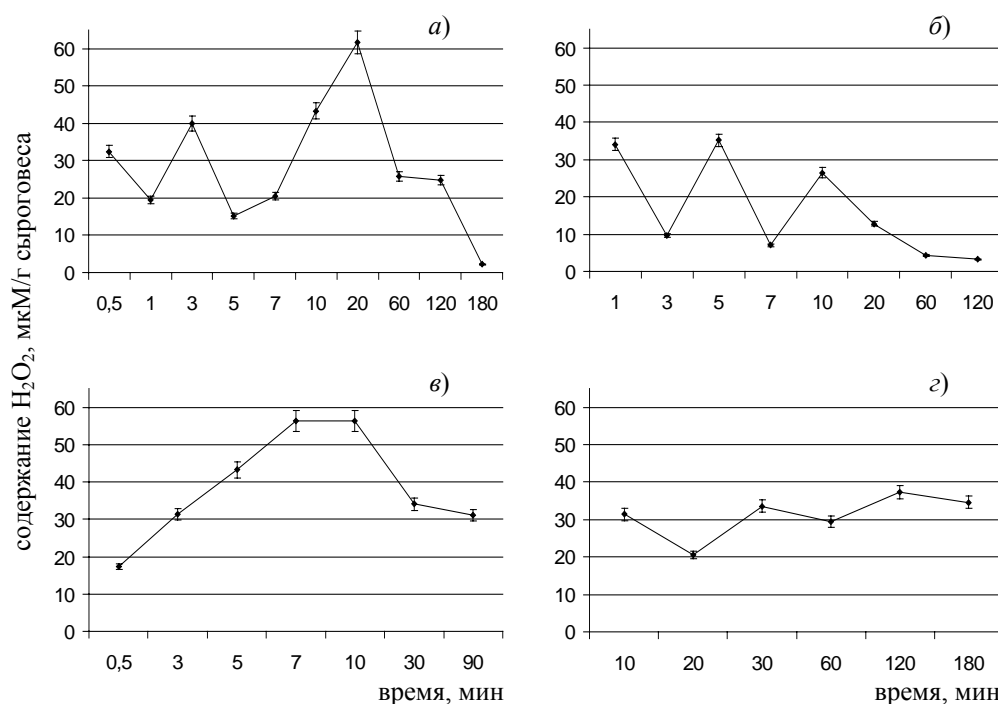


Рис. 5. Влияние различных видов стресса на содержание эндогенной перекиси водорода в клетках корней гороха: *а* – механический стресс (отрезание), *б* – механический стресс на фоне дефицита  $Ca^{2+}$ , *в* – засоление (150 мМ NaCl) на фоне механического стресса, *з* – действие низкой положительной температуры (4 °С) на фоне механического стресса

Из результатов наших экспериментов видно, что за 0.5–60 мин содержание эндогенной  $H_2O_2$  колебалось в пределах десятков микромолей/г сырого веса. Согласно данным литературы, в более ранние промежутки времени (до 1 мин) могло наблюдаться еще большее повышение содержания эндогенной  $H_2O_2$ . Мощная антиоксидантная система клеток растений могла быстро понизить высокое содержание  $H_2O_2$ , образование которого было вызвано в состоянии механического стресса. Колебания внутриклеточного содержания  $H_2O_2$  в динамике (рис. 5), очевидно, объясняются балансом генерации АФК и мощности антиоксидантной системы клеток. О мощности систем регуляции редокс-статуса нативных клеток растений можно судить по данным работы [20], в которой добавление 20 мМ  $H_2O_2$  к суспензионной культуре клеток *Arabidopsis thaliana* вызывало его деградацию за 10–15 мин, тогда как при добавлении такого же количества  $H_2O_2$  к протопластам, изолированным из этой же культуры,  $H_2O_2$  обнаруживался в течение 3 ч.

Имеется ряд работ, в которых показана тесная взаимосвязь между продукцией АФК и изменением содержания  $Ca^{2+}$  в клетке [21]. В связи с этим нами были проведены эксперименты по определению содержания перекиси водорода в клетках в растениях, дефицитных по  $Ca^{2+}$  (растения выращивались на среде, где  $Ca^{2+}$  был заменен на  $Na^+$  согласно ионной силе [22]). Известно, что внешние стимулы вызывают быстрое и кратковременное повышение содержания

цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ . Его концентрация после стимуляции может подняться до 100 мкМ от уровня покоя [23]. Кальциевые сигналы регулируют клеточные процессы посредством высокоаффинных, кальций-связывающих белков, таких, как кальмодулин, который в свою очередь регулирует активность белков мишеней в пути передачи сигнала. Именно за счет этих белков в ряде случаев и осуществляется взаимосвязь между внутриклеточной концентрацией  $[\text{Ca}^{2+}]$  и продукцией АФК. Предполагается, что это происходит через кальмодулин-зависимую НАД-киназу, которая запасает НАДФН в ходе сборки и активации оксидазы окислительного стресса.  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  может связываться с каталазой растений, повышая ее активность. Таким способом  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  может регулировать уровень  $\text{H}_2\text{O}_2$  в растениях [24]. В ряде исследований предполагается, что изменения во внутриклеточном редокс- и кальциевом гомеостазе являются объединенными последствиями в биотическом и абиотическом стрессе.  $\text{H}_2\text{O}_2$  может стимулировать повышение содержания цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  через активацию кальциевых каналов [21].

Изменения в содержании перекиси водорода, которые наблюдаются в наших экспериментах с  $\text{Ca}^{2+}$ -дефицитными растениями (рис. 5, б) указывают на тесную связь между продукцией  $\text{H}_2\text{O}_2$  и содержанием  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках. Из литературы известно, что для продукции АФК при окислительном стрессе требуется поток  $\text{Ca}^{2+}$ , который активирует НАДФН-оксидазу, локализованную в цитоплазматической мембране, у которой имеются Ca-связывающие участки. Заметим, что дефицит  $\text{Ca}^{2+}$  в растениях через 60 мин вызывает резкое падение содержания внутриклеточной  $\text{H}_2\text{O}_2$  (рис. 5, б).

Засоление при инкубации отсеченных корней в среде с 150 мМ NaCl (рис. 5, в) вызывало нарастающее повышение содержания перекиси водорода в течение 7 мин (содержание  $\text{H}_2\text{O}_2$  достигло 56 мкМ/г сырого веса), через 10 мин наблюдалось снижение содержания  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Повышенное образование АФК в электрон-транспортной цепи хлоропластов при засолении, так же как и при охлаждении, согласно данным литературы, вызывается нарушением фотосинтетической фиксации  $\text{CO}_2$ . Показано, что при солевом стрессе в тканях гороха повышается содержание митохондриальной и хлоропластной супероксиддисмутазы и изоферментов аскорбатпероксидазы [25], в клетках хлопка – активность различных антиоксидантных ферментов [26], в растениях табака, выращенных на гидропонике, активируются гены каталазы [27], в листьях лимона наблюдалось АФК-индуцированное перекисное окисление липидов [28].

При охлаждении (растения выдерживались в охлажденной среде при постоянной температуре +4 °С) внутриклеточное содержание перекиси водорода колеблется в пределах 20–40 мкМ/г сырого веса (рис. 5, г), к тому же содержание перекиси водорода оставалось неизменным в течение 180 мин, в отличие от механического стресса и при дефиците  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 5, а, б), где к 180-й минуте содержание  $\text{H}_2\text{O}_2$  резко снижалось. При низкой температуре во всех клетках ткани наблюдается изменение различных параметров – снижение текучести мембран, нарушение функционирования ферментов, в число которых могут входить и ферменты антиоксидантной системы, поскольку каждый фермент имеет температурный оптимум максимальной активности. Для большинства ферментов этот оптимум находится в диапазоне 20–30 °С. При адаптации растений к низким

температурам в клетках синтезируются белки холодового шока, которые выполняют роль антифризов. Синтез белков de novo процесс длительный, очевидно, и адаптация организма более длительная, чем при механическом стрессе.

Из литературы также известно, что при низкой температуре в растениях нарушается фотосинтетическая фиксация  $\text{CO}_2$ , при этом в электрон – транспортная цепь хлоропластов образуются АФК, видимо с этим связано наблюдаемое нами содержание повышения  $\text{H}_2\text{O}_2$  через 30 мин, которое поддерживалось в течение 3 ч (рис. 5, з). Согласно литературным данным холодовое воздействие индуцировало кратковременное, но значительное повышение содержания эндогенной перекиси водорода в клетках озимой пшеницы [29] и развитие условий окислительного стресса в каллусной ткани *A. thaliana* [30]. Таким образом, данные рис. 5 согласуются с данными литературы о том, что окислительный стресс является универсальным ответом клеток растений на разные виды стресса.

Итак, полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о редокс-регуляции тирозинового фосфорилирования белков растений.

Работа поддержана грантами Президиума российской академии наук по программе «Молекулярная и клеточная биология» (№ 10002-121).

### Summary

*N.V. Petrova, A.R. Mukhitov, F.G. Karimova.* Redox-Regulation of Protein Tyrosine Phosphorylation in Adaptive Plant Cell Reaction to Different Stresses and Compounds.

In vivo application of exogenous compounds increasing intracellular hydrogen peroxide, along with a modifier of protein thiol groups caused changes in the level of polypeptide tyrosine phosphorylation in pea roots. A dynamics of changes in intracellular  $\text{H}_2\text{O}_2$  contents under the action of different stress factors as well as catalase inhibitor aminotriazole and NADPH-oxidase activator phorbol ester is presented. The results obtained indicate a redox-regulation of tyrosine phosphorylation level of plant proteins.

**Key words:** protein tyrosine phosphorylation, redox-regulation, pea.

### Литература

1. *Joo J.H., Wang S., Chen J.G., Jones A.M., Fedoroff N.V.* Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein and  $\beta$  subunits in the arabidopsis oxidative stress response to ozone // *Plant Cell.* – 2005. – V. 17. – P. 957–970.
2. *Fedoroff N.* Redox regulatory mechanisms in cellular stress responses // *Ann. Bot.* – 2006. – V. 98. – P. 289–300.
3. *Stone R.M.* Optimizing treatment of chronic myeloid leukemia: a rational approach // *Oncologist.* – 2004. – V. 9. – P. 259–270.
4. *Tonks N.K.* PTP1B: From the sidelines to the front lines! // *FEBS Lett.* – 2003. – V. 546. – P. 140–148.
5. *Gupta R., Luan S.* Redox control of protein tyrosine phosphatases and mitogen-activated protein kinases in plants // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 132. – P. 1149–1152.
6. *Каримова Ф.Г., Петрова Н.В.* Влияние  $\text{H}_2\text{O}_2$  на фосфорилирование по тирозину белков гороха // *Физиология растений.* – 2007. – Т. 54, № 3. – С. 365–372.

7. *Amory A.M., Ford L., Pammenter N.W., Cresswell C.F.* The use of 3-amino-1,2,4-triazole to investigate the short-term effects of oxygen toxicity on carbon assimilation by *Pisum sativum* seedlings // *Plant, Cell and Environment*. – 1992. – V. 15. – P. 655–663.
8. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – V. 227. – P. 680–685.
9. *Ruff-Jamison S., Campos-Gonzalez R., Glenney, J.R.Jr.* Heavy and light chain variable region sequences and antibody properties of anti-phosphotyrosine antibodies reveal both common and distinct features // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V. 266. – P. 6607–6613.
10. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – V. 72. – P. 248–254.
11. *Hunter T.* Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling // *Cell*. – 1995. – V. 80. – P. 225–236.
12. *Мухитов А.Р., Петрова Н.В., Власова О.В., Каримова Ф.Г.* Метод конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в выявлении тирозинового фосфорилирования белков растений // *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки*. – 2008. – Т. 150, кн. 2. – С. 144–154.
13. *Gechev T., Gadjiev I., Van Breusegem F., Inzé D., Dukiandjiev S., Toneva V., Minkov I.* Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2002. – V. 59. – P. 708–714.
14. *Reeves E.P., Dekker L.V., Forbes L.V., Wientjes F.B., Grogan A., Pappin D.J.C., Segal A.W.* Direct interaction between p47phox and protein kinase C: evidence for targeting of protein kinase C by p47phox in neutrophils // *Biochem J.* – 1999. – V. 344. – P. 859–866.
15. *Curnutte J.T., Erickson R.W., Ding J., Badwey J.A.* Reciprocal interactions between protein kinase C and components of the NADPH oxidase complex may regulate superoxide production by neutrophils stimulated with a phorbol ester // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – P. 10813–10819.
16. *Крутецкая З.И., Лебедев О.Е.* Роль тирозинового фосфорилирования в регуляции активности ионных каналов клеточных мембран. – СПб.: Айю, 1998. – 245 с.
17. *Michaelis L., Schubert Maxwell P* The reaction of iodoacetic acid on mercaptans and amine // *J. Biol. Chem.* – 1934. – V. 106. – P. 331–341.
18. *Polle A.* Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate peroxidase-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis // *Plant Physiol.* – 2001. – V. 126. – P. 445–462.
19. *Bellincampi D., Dipierro N., Salvi G., Cervone F., de Lorenzo G.* Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated rolB gene expression in tobacco leaf explants // *Plant Physiol.* – 2000. – V. 122. – P. 1379–1385.
20. *Neill S., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Hancock J.T.* Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants // *J. Exp. Bot.* – 2002. – V. 53. – P. 1237–1247.
21. *Pei Z.-M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., Allen G.I., Grill E., Schroeder J.I.* Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells // *Nature*. – 2000. – V. 406. – P. 731–734.
22. *Karimova F.G., Kortchouganova E.E., Tarchevsky I.A., Iagoucheva M.R.* The oppositely directed Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> transmembrane transport in algal cells // *Protoplasma*. – 2000. – V. 213. – P. 93–98.
23. *White P.J., Broadley M.R.* Calcium in plants // *Ann. Botany*. – 2003. – V. 92. – P. 487–511.

24. Yang T., Poovaiah B.W. Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin // PNAS. – 2002. – V. 99. – P. 4097–4102.
25. Hernandez J.A., Olmos E., Corpas F.J., Sevilla F., Rio L.A. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants // Plant Sci. – 1995. – V. 105. – P. 151–167.
26. Gosset D.R., Banks S.W., Millhollon E.P., Lucas M.C. Antioxidant response to NaCl stress in a control and NaCl-tolerant cotton cell line grown in the presence of paraquat, buthionine sulfoximine, and exogenous glutathione // Plant Physiol. – 1996. – V. 112. – P. 803–809.
27. Savoure A., Thorin D., Davey M., Hua X.-J., Mauro S., Van Montagu M. NaCl and CuSO<sub>4</sub> treatments trigger distinct oxidative defense mechanisms in *Nicotiana plumbaginifolia* L. // Plant Cell Environ. – 1999. – V. 22. – P. 387–396.
28. Gueta-Dahan Y., Yaniv Z., Zilinskas B.A., Ben-Hayyim G. Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in citrus // Planta. – 1997. – V. 203. – P. 460–469.
29. Okuda T., Matsuda Y., Yamanaka A., Sagisaka S. Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of winter wheat is caused by cold treatment // Plant Physiol. – 1991. – V. 97. – P. 1265–1267.
30. O'Kane D., Gill V., Boyd P., Burdon R. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus // Planta. – 1996. – V. 198. – P. 371–377.

Поступила в редакцию  
14.12.07

---

**Петрова Наталья Валентиновна** – младший научный сотрудник Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН.

E-mail: [npetrova@mail.knc.ru](mailto:npetrova@mail.knc.ru)

**Мухитов Александр Ринатович** – кандидат биологических наук, научный сотрудник Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН.

E-mail: [alexmukhitov@mail.ru](mailto:alexmukhitov@mail.ru)

**Каримова Фатима Габдуллазяновна** – доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией сигнальных систем Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН.

E-mail: [karimova@mail.knc.ru](mailto:karimova@mail.knc.ru)