



УДК 577.23

Влияние нарушений в функционировании дыхательного комплекса I на уровень активных форм кислорода в клетках арабидопсиса

В. И. Тарасенко¹, Е. Ю. Гарник¹, В. Н. Шмаков¹,
Г. А. Невинский², Ю. М. Константинов¹

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

E-mail: vslav@irk.ru

Аннотация. Исследовали уровень активных форм кислорода (АФК) в клетках суспензионной культуры арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heun), обработанных ингибиторами различных комплексов дыхательной цепи митохондрий. Показано повышение уровня АФК при ингибировании переноса электронов через комплексы III и IV. В то же время подавление активности комплекса I, напротив, приводило к снижению уровня АФК. Кроме того, уровень АФК был снижен и в клетках мутантной линии арабидопсиса с нарушенным функционированием комплекса I. Таким образом, дисфункция дыхательного комплекса I в растительных митохондриях сопровождается существенным снижением уровня АФК, что принципиальным образом отличает реакцию растительных клеток от таковой животных клеток.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, электрон-транспортная цепь, активные формы кислорода, ротенон, дыхательный комплекс I.

Введение

Активные формы кислорода играют значительную роль в функционировании клеток: будучи чрезвычайно высокорекреационноспособными соединениями, они, с одной стороны, оказывают повреждающее воздействие на клеточные структуры, а с другой – могут выступать в роли физиологических регуляторов важнейших клеточных процессов. Согласно общепринятому взгляду, митохондрии являются одним из основных источников активных форм кислорода в живых клетках [13]. В свою очередь, главным производителем АФК в митохондрии служит электрон-транспортная цепь (ЭТЦ). Около 1 % электронов, проходящих через ЭТЦ, расходуется на образование супероксидного радикала, дисмутирующего в дальнейшем в перекись водорода. Основными источниками образования АФК в дыхательной цепи принято считать комплекс I и комплекс III [11]. Подавление транспорта электронов при воздействии специфических ингибиторов обычно приводит к повышению уровня образования АФК. Данное явление связано с возникновением сверхвосстановленного состояния определенного участка ЭТЦ, что повышает вероятность «утечки» электронов из дыхательной

цепи с последующим образованием активных форм кислорода [11; 13].

Для животных клеток продемонстрировано повышение внутриклеточного уровня АФК при воздействии ингибиторов каждого из дыхательных комплексов – ротенона (комплекс I), антимицина А (комплекс III), цианида калия (комплекс IV) [6]. У млекопитающих ингибирование первого комплекса вызывает значительное повышение уровня АФК, а мутации, приводящие к нарушению его функционирования, приводят к тяжелым патологиям [10]. Ротенон подавляет работу комплекса I и в клетках растений [14]. Показано, что обработка суспензионной культуры клеток модельного растения арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heun) ротеноном ведет к изменениям в концентрациях клеточных метаболитов, модуляции экспрессии ряда генов и другим биохимическим последствиям. Однако соотношение восстановленной и окисленной форм основных клеточных антиоксидантов (глутатиона и аскорбата) остается неизменным, косвенно свидетельствуя об отсутствии в этих клетках жесткого окислительного стресса [4]. Следует отметить, что комплекс I имеет наиболее сложную структуру среди всех дыхательных комплексов. На настоящий момент в составе NADH-дегидрогеназного комплекса высших

растений идентифицировано более чем 40 субъединиц, среди которых имеются уникальные для растений; некоторые из них выполняют дополнительные, помимо участия в переносе электронов, функции [7]. Кроме того, у растений в переносе электронов могут участвовать альтернативные NAD(P)H-зависимые ротенон-устойчивые дегидрогеназы [12]. Таким образом, последствия дисфункции комплекса I у животных и растений могут быть различными.

В настоящей работе мы непосредственно определяли внутриклеточный уровень АФК в клетках арабидопсиса, обработанных ингибиторами трех комплексов дыхательной цепи. Кроме того, был определен уровень супероксида в клетках полученной нами ранее мутантной линии арабидопсиса с инактивированным комплексом I. В результате нами установлено, что подавление активности комплекса I в растительных клетках приводит не к возрастанию, а к снижению уровня АФК.

Материалы и методы

Суспензионную культуру клеток арабидопсиса культивировали при 26 °С в темноте на среде MS с добавлением тиамина (1 мг/л), пиридоксина (0,5 мг/л), никотиновой кислоты (0,5 мг/л), инозитола (100 мг/л), сахарозы (30 г/л), 2,4 дихлорфеноксиуксусной кислоты (0,3 мг/л). Обработку ингибиторами проводили, как описано ранее [2]. Действующие вещества добавляли растворенными в этаноле. В контрольных образцах присутствовал этанол в концентрациях, соответствующих его концентрациям в экспериментальных вариантах. Уровень АФК в клетках суспензионной культуры арабидопсиса оценивали согласно [8] по флуоресценции дихлорофлуоресцеина (длина волны поглощенного света 480 нм, длина волны испускаемого света 524 нм) при помощи спектрофлуорометра Shimadzu RF 5301 PC (Япония). Оценку жизнеспособности суспензионной культуры производили по поглощению мертвыми клетками красителя Evans Blue [3]. Содержание супероксида оценивали по окрашиванию клеток в присутствии нитросинего тетразолия с последующей экстракцией и спектрофотометрическим определением концентрации образующегося формазана [5].

Результаты и обсуждение

В начальной серии экспериментов мы определили уровень АФК через 2 ч после начала обработки суспензии клеток ротеноном, антимицином А и цианидом калия. В качестве по-

ложительного контроля производилась обработка перекисью водорода. Для демонстрации специфичности реакции дихлорофлуоресцеина с АФК был использован антиоксидант N-ацетилцистеин (сам по себе или в сочетании с антимицином А). Как видно из рис. 1, при обработке 10 мМ перекисью водорода уровень активных форм кислорода возрастал более чем в 3 раза. Обработка 10 мкМ антимицином А приводила к повышению уровня АФК почти в 3 раза, обработка 1 мМ цианидом калия – в 6–7 раз. К нашему удивлению, обработка 20 мкМ ротеноном приводила к значительному снижению уровня АФК по сравнению с уровнем в необработанных клетках.

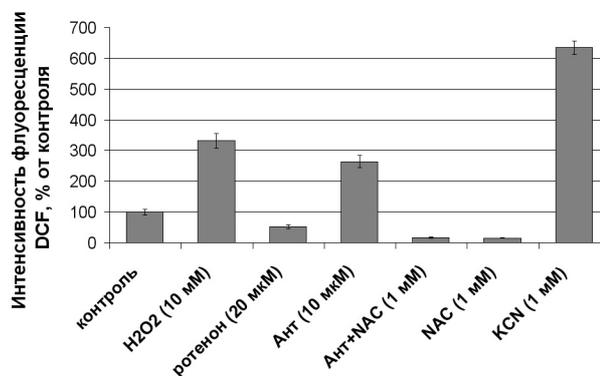


Рис. 1. Уровень АФК в клетках суспензионной культуры арабидопсиса, подвергнутых обработке (2 ч) перекисью водорода, ротеноном, антимицином А (Ант), цианидом калия и N-ацетилцистеином (НАС)

Определение динамики образования АФК в течение 5 ч показало, что снижение уровня активных форм кислорода детектируется уже через час после добавления ротенона и сохраняется на протяжении как минимум пяти часов обработки (рис. 2). Поскольку существует вероятность того, что наблюдаемое уменьшение содержания АФК связано со снижением жизнеспособности клеток в результате воздействия ротенона, мы определили жизнеспособность клеточной культуры. Как видно из рис. 3, жизнеспособность клеток, обработанных ротеноном и антимицином, сохранялась на том же уровне, что и в клетках, не подвергавшихся воздействию этих агентов.

Обнаруженное снижение уровня АФК при сравнительно кратковременном подавлении активности комплекса I под воздействием ротенона оставляет открытым вопрос, сохраняется ли этот эффект при долговременной дисфункции NADH-дегидрогеназного комплекса.

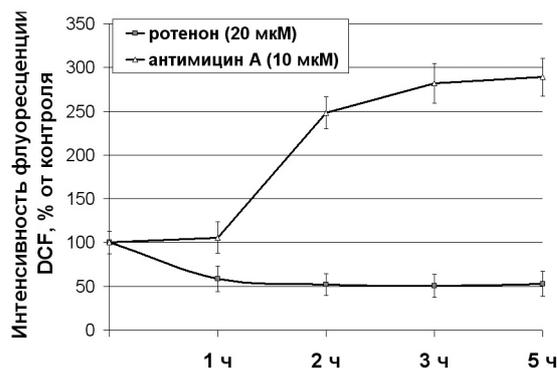


Рис. 2. Динамика изменения уровня АФК в клетках суспензионной культуры при обработках ротеноном и антимицином А

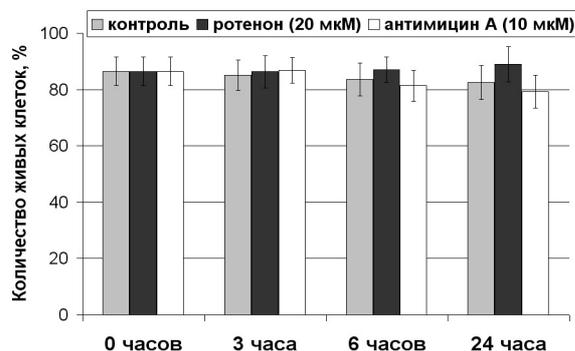


Рис. 3. Жизнеспособность клеток суспензионной культуры арабидопсиса, подвергнутых обработке ротеноном и антимицином А

Для ответа на этот вопрос мы использовали охарактеризованную нами ранее [2] линию арабидопсиса с инактивированным геном *fro*, кодирующим Fe-S-содержащую субъединицу комплекса I. Независимо эта же линия исследовалась в работе Мейера с соавторами [9], где было показано полное отсутствие у этих растений активности комплекса I. Нами были получены суспензионные культуры клеток мутантной и контрольной линии. Отмечено, что скорость роста суспензии клеток мутантной линии в существенной степени не отличается от скорости роста клеток дикого типа. Однако исследование внутриклеточного уровня активных форм кислорода выявило ощутимые различия между линиями. В экспериментах с использованием супероксид-специфичного красителя нитросинего тетразолия показано сниженное образование супероксидного радикала мутантными клетками (рис. 4). Таким образом, отсутствие активности комплекса I, вызванное инактивацией гена, кодирующего одну из его субъединиц, приводит к тем же последствиям, что и химическое ингибирование активности этого дыхательного комплекса.

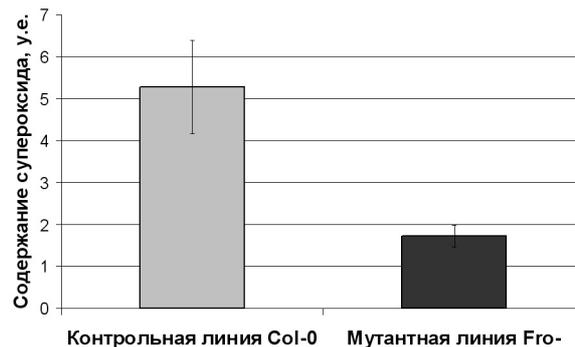


Рис. 4. Содержание супероксида в клетках суспензионных культур арабидопсиса, полученных из растений дикого типа (Col-0) и растений, мутантных по гену *fro*

Из результатов наших экспериментов следует, что подавление активности комплекса I в клетках растений в результате ингибирования или мутации ведет к снижению уровня АФК. Данный эффект диаметрально противоположен показанному ранее для клеток животных, однако хорошо соотносится с известными данными об отсутствии окислительного стресса при ингибировании комплекса I в клетках растений [4]. Причины обнаруженных различий остаются неясными, однако, по-видимому, коренятся в функциональных особенностях NADH-дегидрогеназного комплекса у растений. Таким образом, дисфункция дыхательного комплекса I в растительных митохондриях сопровождается существенным снижением уровня АФК, что принципиальным образом отличает реакцию растительных клеток от таковой животных клеток на данный вид дыхательной недостаточности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Интеграционного междисциплинарного проекта СО РАН № 98.

Литература

1. Индукция экспрессии гена *gdh2* арабидопсиса при изменении редокс-состояния митохондриальной дыхательной цепи / В. И. Тарасенко [и др.] // Биохимия. – 2009. – Т. 74. – С. 62–69.
2. Тарасенко В. И. Характеристика растений арабидопсиса с инактивированным геном Fe-S-субъединицы комплекса I дыхательной цепи митохондрий / В. И. Тарасенко, Е. Ю. Гарник, Ю. М. Константинов // Физиология растений. – 2010. – Т. 57, № 3. – С. 415–424.
3. Baker C. J. An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using evans blue / C. J. Baker, N. M. Mock // Plant. Cell, Tissue and Organ. Culture. – 1994. – Vol. 39. – P. 7–12.

4. Complex I dysfunction redirects cellular and mitochondrial metabolism in *Arabidopsis* / M. Garmier [et al.] // *Plant. Physiol.* – 2008. – Vol. 148. – P. 1324–1341.
5. Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets / F. Ramel [et al.] // *BMC Plant. Biology.* – 2009. – Vol. 9. – Art. N 28.
6. DiMauro S. Mitochondrial respiratory-chain diseases / S. DiMauro, E. A. Schon // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – Vol. 348. – P. 2656–2668.
7. Eukaryotic complex I: functional diversity and experimental systems to unravel the assembly process / C. Remacle [et al.] // *Mol. Genet. Genomics.* – 2008. – Vol. 280. – P. 93–110.
8. Maxwell D. P. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells / D. P. Maxwell, Y. Wang, L. McIntosh // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – Vol. 96. – P. 8271–8276.
9. Meyer E. H. Remodeled respiration in *ndufs4* with low phosphorylation efficiency suppresses *Arabidopsis* germination and growth and alters control of metabolism at night / E. H. Meyer, T. Tomaz, A. J. Carroll // *Plant. Physiol.* – 2009. – Vol. 151. – P. 603–619.
10. Mitochondrial toxins and neurodegenerative diseases / A. Ayala [et al.] // *Front. Biosci.* – 2007. – Vol. 12. – P. 986–1007.
11. Moller I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species / I. M. Moller // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 52. – P. 561–591.
12. Rasmusson A. G. Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria / A. G. Rasmusson, K. L. Soole, T. E. Elthon // *Annu. Rev. Plant. Biol.* – 2004. – Vol. 55. – P. 23–39.
13. Rhoads D. M. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling / D. M. Rhoads, A. L. Umbach, C. C. Subbaiah // *Plant. Physiol.* – 2006. – Vol. 141. – P. 357–366.
14. Zhang Q. Regulation of respiration in rotenone-treated tobacco cell suspension cultures / Q. Zhang, K. L. Soole, J. T. Wiskich // *Planta.* – 2001. – Vol. 212. – P. 765–773.

Influence of respiratory complex I dysfunctions on the reactive oxygen species level in *Arabidopsis* cells

E. Yu. Garnik¹, V. I. Tarasenko¹, V. N. Shmakov¹, G. A. Nevinsky², Yu. M. Konstantinov¹

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch RAS, Novosibirsk

Abstract: The reactive oxygen species (ROS) level was studied in the *Arabidopsis* suspension cell cultures treated with inhibitors of different respiratory complexes. The increase of ROS level upon the inhibition of electron transfer through complexes III and IV was shown. At the same time, the inhibition of complex I activity led to the decrease of ROS level. Moreover, the decreased ROS level was also detected in the cells of mutant *Arabidopsis* line with impaired functioning of complex I. Thus, the complex I dysfunction in plant mitochondria is accompanied with significant ROS decrease, which clearly differs plant cells from its animal counterpart.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, electron transport chain, reactive oxygen species, rotenone, respiratory complex I

Тарасенко Владислав Игоревич
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова 132
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
тел. (3952) 42-49-03; факс: (3952) 51-07-54
E-mail: vslav@irk.ru

Tarasenko Vladislav Igorevitch
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontova St., Irkutsk, 664033
Ph. D. of Biology.
senior research scientist
phone: (3952) 42-49-03, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: vslav@irk.ru

Гарник Елена Юрьевна
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова 132
младший научный сотрудник
тел. (3952) 42-49-03; факс: (3952) 51-07-54
E-mail: garnik@sifibr.irk.ru

Garnik Elena Yurievna
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontova St., Irkutsk, 664033
junior research scientist
phone: (3952) 42-49-03, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: garnik@sifibr.irk.ru

Шмаков Владимир Николаевич
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова 132
кандидат биологических наук,
научный сотрудник
тел. (3952) 42-49-03; факс: (3952) 51-07-54
E-mail: shmakovv@sifibr.irk.ru

Невинский Георгий Александрович,
Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН
630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8
доктор химических наук, профессор,
зав. лабораторией ферментов репарации
тел. (383) 335-62-26 факс (383) 333-36-77
E-mail: nevinisky@niboch.nsc.ru.

Константинов Юрий Михайлович
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова 132
доктор биологических наук, заведующий
лабораторией
генетической инженерии растений
тел. (3952) 42-49-03; факс: (3952) 51-07-54
E-mail: yukon@sifibr.irk.ru

Shmakov Vladimir Nikolaevitch
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontova St., Irkutsk, 664033
Ph. D. of Biology,
research scientist
phone: (3952) 42-49-03, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: shmakovv@sifibr.irk.ru

Nevinsky Georgi Aleksandrovitch
Institute of Chemical Biology
and Fundamental Medicine SB RAS
8 Lavrentiev Ave., Novosibirsk, 630090
D. Sc. in Chemistry, Prof.,
Head of Laboratory of Repair Enzymes
phone: (383) 335-62-26, fax: (383) 333-36-77
E-mail: nevinisky@niboch.nsc.ru.

Konstantinov Yuri Mikhailovitch
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontova St., Irkutsk, 664033
D. Sc. in Biology, Head of Laboratory
of Plant Genetic Engineering
phone: (3952) 42-49-03, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: yukon@sifibr.irk.ru