

АКТИВНОСТЬ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ТАЛЛОМЕ *Anthoceros natalensis**

© 2015 А.В. Часов^{1**}, Р.П. Бекетт², Ф.В. Минибаева¹

¹ Казанский институт биохимии и биофизики, Казанский научный центр РАН, 420111 Казань, а/я 30; факс: +7(843)292-7347, электронная почта: chasov@kibb.knc.ru

² School of Life Sciences, University of KwaZulu-Natal, Private Bag X01, Pietermaritzburg, Scottsville 3209, South Africa; fax: +27(33)260-5105

Поступила в редакцию 16.01.15

После доработки 15.04.15

Антоцеротовидные (Anthocerotophyta), одни из древнейших несосудистых наземных растений, происходят от общего предка с современными сосудистыми растениями. Благодаря своей высокой устойчивости к действию неблагоприятных факторов среды, антоцеротовидные представляют собой уникальную модель для изучения механизмов формирования устойчивости высших растений. В настоящей работе показано, что таллом *Anthoceros natalensis* характеризуется высокой редокс-активностью, изменяющейся при стрессе. Обезвоживание таллома сопровождается снижением активности внутриклеточных пероксидаз, ДОФА-пероксидаз, тирозиназ и повышением активности каталаз. При последующей регидратации активность пероксидаз и тирозиназ повышается. Охарактеризованы кинетические особенности пероксидаз и тирозиназ и изоферментный состав пероксидаз из различных фракций белков клеточной стенки антоцероса. Показано, что пероксидазы антоцероса по своей функциональной активности, в том числе способности к образованию супероксидного анион-радикала, имеют сходство с пероксидазами высших сосудистых растений. Выявлен биохимический механизм, подтверждающий возможное участие пероксидаз в образовании активных форм кислорода (АФК) посредством субстрат-субстратного взаимодействия в талломе антоцероса. Предполагается, что образование АФК пероксидазами – эволюционно древний процесс, возникший как защитный механизм с целью повышения адаптационных механизмов наземного существования высших растений, их приспособления к меняющимся условиям среды и успешной колонизации различных экологических ниш.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антоцерос, пероксидаза, супероксид, каталаза, тирозиназа, обезвоживание, регидратация.

Антоцеротовидные (Anthocerotophyta) – одни из древнейших наземных растений, появившиеся около 450 млн лет назад и насчитывающиеся по разным источникам от 200 до 300 видов [1]. До недавнего времени антоцеротовидных рассматривали как один из классов моховидных [2], однако в настоящее время они выделены в самостоятельный отдел в систематике растений [3, 4]. Благодаря своему цитологическому и морфологическому сходству как с водорослями,

так и с высшими растениями антоцеротовидные стали объектом пристального внимания молекулярных биологов и генетиков [3, 5]. Например, антоцеротовидные имеют характерный для водорослей хлоропласт с центральным пиреноидом, содержащим рибулозобисфосфаткарбоксилазу, поэтому обладают уникальным для наземных растений механизмом усвоения углерода [1]. В отличие от печеночников, где только в четырех родах (из более чем 340) обнаруживается симбиоз с сине-зелеными водорослями, у антоцеротовидных он обнаруживается у представителей всех 14 родов [1, 6]. С практической точки зрения, антоцеротовидные изучаются как источники розмариновой кислоты или других биологически активных веществ [2]. Филогенетический и структурный анализы позволяют предположить, что в эволюционном плане антоцеротовидные являются сестринской группой для современных сосудистых растений [3, 5]. Вероятно, древние антоцеротовидноподобные

Принятые сокращения: O_2^- – супероксидный анион-радикал, ХГТ – 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфопенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамид, АФК – активные формы кислорода, БПИ – буфер постинфильтрационный, ДОФА – 3,4-дигидроксифенилаланин, КС – клеточная стенка, СОД – супероксиддисмутаза, ЭКР – экстракционный раствор.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM 15-017, 21.06.2015.

** Адресат для корреспонденции.

явились промежуточным звеном при переходе от организмов, где в жизненном цикле доминирует поколение с гаплоидным гаметофитом, к организмам с диплоидным спорофитом [5].

Большинство антоцеротовидных является обитателями нарушенных и незадернованных местообитаний, выступая пионерами при заселении обнаженной влажной почвы. В то же время известно, что антоцеротовидные являются чрезвычайно засухоустойчивыми. В отличие от вегетативных органов высших сосудистых растений, являющихся чрезвычайно чувствительными к обезвоживанию, таллом антоцероса обладает феноменальной особенностью сохранять жизнеспособность при потере 95% воды [7, 8]. Благодаря своей высокой устойчивости к действию неблагоприятных факторов среды, антоцеротовидные представляют собой уникальную модель для изучения механизмов формирования устойчивости высших растений. Несмотря на очевидную важность, биохимические механизмы устойчивости, в том числе кинетические характеристики окислительно-восстановительных реакций, в растениях остаются предметом дискуссий. В частности, острым вопросом является выявление двойственной роли пероксидаз и переключение режимов функционирования с антиоксидантного на прооксидантный. В клетках сосудистых растений, например, в корнях пшеницы, одними из ключевых ферментов редокс-метаболизма при стрессе являются апопластные пероксидазы, обладающие способностью как к разложению H_2O_2 , так и образованию активных форм кислорода (АФК) [9, 10]. Эта многофункциональность пероксидаз, а также множественность изоформ и кодирующих их генов детерминируют важную роль пероксидаз в формировании устойчивости растений. Несмотря на интенсивное изучение химизма реакций и эволюции структуры пероксидаз [11–13], возможные механизмы и факторы, способствующие стимулированию АФК-образующей активности пероксидазы, остаются неразрешенными. Перспективным приемом решения этой проблемы может стать изучение неизвестных до настоящего времени особенностей функционирования пероксидаз антоцеротовидных, стоящих на более низкой в сравнении с сосудистыми растениями эволюционной ступени.

При стрессе в клетках бриофитов так же, как и у большинства растений, может происходить повышение уровня АФК. Ранее нами впервые было показано, что ряд лишайников, мхов, а также печеночник и антоцерос обладают высокой редокс-активностью, в частности, по образованию супероксидных анион-радикалов (O_2^-) [8]. Примечательно, что самая высокая актив-

ность наблюдалась именно в талломе *Anthoceros natalensis* S. Несмотря на очевидную важность, биохимические механизмы устойчивости, опосредованные окислительно-восстановительными ферментами, в том числе пероксидазами, в клетках антоцеротовидных практически не изучены. В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования был анализ кинетических характеристик редокс-ферментов антоцеротовидных. Особое внимание было уделено изучению изменений активности пероксидаз при стрессе, индуцированном обезвоживанием и последующей регидратацией таллома антоцероса, а также возможного участия пероксидаз в образовании АФК.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования, приготовление образцов для измерения ферментативной активности. Эксперименты проводили на талломе *Anthoceros natalensis* S., собранном в Ботаническом саду Университета КваЗулу-Натал, ЮАР. В экспериментах по изучению активности редокс-ферментов в стрессовых условиях таллом антоцероса подвергали обезвоживанию с последующей регидратацией [8, 14]. Образцы таллома (содержание воды – 30 г H_2O на 1 г сухой массы) навеской 0,5 г помещали в стаканчики для взвешивания. Обезвоживание таллома проводили в эксикаторе путем выдерживания образцов над насыщенным раствором $CaCl_2$ от 0 до 68 ч. Взвешивание материала для расчета относительного содержания воды (ОСВ) в талломе осуществляли в следующие интервалы: 2,5, 20, 23,5, 24, 44, 48, 67, 68 ч. Для определения ферментативной активности отбор материала проводили через 24, 48 и 68 ч. Дальнейшую регидратацию таллома после обезвоживания выполняли в дистиллированной H_2O в течение 1 и 3 ч. Анализ активности окислительно-восстановительных ферментов был проведен во внутриклеточной фракции и экстраклеточном растворе (ЭКР). После регидратации таллома антоцероса в дистиллированной H_2O таллом гомогенизировали в 5 мл 0,05 М фосфатного буфера Соренсена (Na_2HPO_4/KH_2PO_4), pH 7,0, центрифугировали при 4300 g 15 мин при 5°, определение внутриклеточной ферментативной активности проводили в супернанте. Раствор, в котором осуществляли регидратацию таллома (ЭКР), использовали для исследования экстраклеточной ферментативной активности.

Для изучения редокс-активности внутри клеток и в апопласте таллома антоцероса в зависимости от степени связывания ферментов со

структурными элементами клеточной стенки (КС) анализ активности окислительно-восстановительных ферментов был проведен во внутриклеточной растворимой фракции и фракциях белков КС. С этой целью белки из таллома антоцера экстрагировали, последовательно используя: Tris-HCl-буфер, фосфатный буфер Соренсена, дигитонин и NaCl [15]. В результате получали: внутриклеточную растворимую фракцию (С) и фракции белков, связанных с КС: В₁ – водородными связями, В₂ – ван-дер-ваальсовыми силами и гидрофобными взаимодействиями, В₃ – ионными связями.

Для сравнения спектральных характеристик окисления субстратов пероксидаз антоцера и корней пшеницы использовали буфер постинфильтрационный (БПИ) корней пшеницы, содержащий апопластные пероксидазы. Для этого проводили вакуумную инфильтрацию отсеченных корней пятидневных проростков яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Казанская юбилейная в 0,1 М Na-цитратном буфере, pH 7,0 [16].

Определение активности окислительно-восстановительных ферментов. Активность перечисленных ниже ферментов определяли спектрофотометрически по образованию соответствующего продукта или расходованию соответствующего субстрата на спектрофотометре Lambda 25 («Perkin Elmer», США) и выражали в нмоль/(с × г сухой массы). Во всех случаях реакцию инициировали добавлением субстрата к реакционной среде (общий объем 0,5 мл). Об активности тирозиназы (3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА) оксидазы) (КФ 1.14.18.1) судили по образованию ДОФАхрома ($\epsilon_{475} = 3,6 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). Реакционная среда содержала 0,08 М Na-цитратный буфер, pH 7,0, 1 мМ ДОФА и 0,05 мл ферментативной вытяжки. Активность аскорбатпероксидазы (КФ 1.11.1.11) и аскорбатоксидазы (КФ 1.10.3.3) определяли по убыли аскорбиновой кислоты в реакционной среде согласно описанным ранее методам [9, 17], каталазу (КФ 1.11.1.6) – по убыли H₂O₂ в реакционной среде [17]. При исследовании активности пероксидазы (КФ 1.11.1.7) в качестве субстрата использовали 1 мМ *o*-дианизидин ($\epsilon_{460} = 30,0 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) или 1 мМ ДОФА в 0,07 М Na-цитратном буфере, pH 5,5, с добавлением 1 мМ H₂O₂ [9].

При определении оптимума pH тирозиназы и пероксидазы применяли 0,08 М Na-цитратный буфер со значениями pH от 2,5 до 8,0 в остальной реакционной среде не отличалась от выше описанной для данных ферментов.

При определении субстратной специфичности пероксидазы фракции В₁ реакционная среда содержала: 50 мкл субстрата в соответствующей

концентрации, 5 мкл фракции В₁, 0,1 мМ H₂O₂, 0,07 М Na-цитратный буфер pH 5,5. В качестве субстратов использовали *o*-дианизидин, аскорбиновую, синаповую ($\epsilon_{305} = 10,61 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), хлорогеновую ($\epsilon_{323} = 16,90 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), *p*-кумаровую ($\epsilon_{285} = 17,21 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), кофейную ($\epsilon_{311} = 9,91 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) и феруловую ($\epsilon_{310} = 13,74 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) кислоты.

Спектральный анализ. Спектры поглощения различных веществ исследовали в диапазоне от 1100 до 190 нм. Использованы различные концентрации NADH и феруловой кислоты. Исследование изменения спектра поглощения смеси веществ, содержащей 50 мкл ферментативной вытяжки соответствующей фракции из таллома антоцера, 0,11 мМ NADH и 0,1 мМ феруловой кислоты в 0,73 мМ Na-цитратном буфере, pH 5,5 или pH 7,0, проводилось в течение 20 мин в присутствии или в отсутствие 1 мМ KCN при скорости сканирования 1920 нм/мин с периодом в 1 мин. Общий объем реакционной среды составлял 0,5 мл, в качестве кюветы сравнения использовалась кювета с дистиллированной H₂O.

Интенсивность образования супероксидного анион-радикала. Сканирование оптической плотности смеси веществ, содержащей 100 мкл соответствующей фракции из таллома антоцера, 0,1 мМ NADH, 0,1 мМ 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфопенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамид (ХТТ) в 0,08 М Na-цитратном буфере, pH 5,5 или pH 7,0, в присутствии или в отсутствие 250 ед/мл супероксиддисмутазы (СОД) проводили со скоростью 1920 нм/мин в течение 50 мин. ХТТ в присутствии O₂ превращался в ХТТ формазан, который детектировали по разнице оптической плотности ($\epsilon_{470} = 21,6 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) [18].

Электрофоретическое разделение белков. Электрофорез проводили в 10%-ном ПААГ в модифицированной системе Laemmli [19] на Mini-PROTEAN Tetra Cell («Bio-Rad», США) в нативных условиях без добавления Ds-Na, меркаптоэтанола и нагревания образцов. Визуализацию пероксидазной активности проводили с помощью 5 мМ *o*-дианизидина, приготовленного на Na-цитратном буфере, pH 5,5, с добавлением 1 мМ H₂O₂.

Изоэлектрофокусирование проводили на приборе («Хийу-Каллур», Эстония) в 5%-ном ПААГ с добавлением амфолинов pH 3,5–10 («LKB», Швеция). Для определения изоэлектрической точки белков использовали набор стандартов IEF-M1A (3,6–9,3) («Sigma», США). После обратного диализа в лунку загружали по 25 мкл образца. Активность пероксидазы в загруженных образцах составляла 1,0, 0,3, 0,3 и 1,2 ммоль *o*-дианизидина окисленного/(мин · л) во фракциях

С, В₁, В₂ и В₃ соответственно. Активность изоферментов пероксидазы в геле визуализировали как описано выше.

Опыты проводили минимум в трех биологических повторностях. Приведены репрезентативные результаты каждой серии экспериментов. Все экспериментальные данные имеют нормальное распределение признака. В табл. 1 и на рис. 1 и 2 представлены среднеарифметические значения и их стандартное отклонение, *n* – число значений, использовавшихся для подсчета среднего. Данные на рис. 2 были статистически обработаны с помощью Microsoft Excel (*t*-критерий Стьюдента).

Использованные реактивы: ХТТ («Alfa Aesar», Великобритания); NADH («Reanal», Венгрия); СОД («Serva», Германия); феруловая кислота («Fluka», Швейцария); ДОФА, *o*-дианизидин, N,N'-метилен-*bis*-акриламид («Acros Organics», Бельгия); кофейная и *p*-кумаровая кислоты («Ferak», Германия); акриламид («Sigma», США); все остальные реактивы марки х.ч. или ч.д.а. («Реахим», Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Активность ферментов. Среди редокс-ферментов внутриклеточной фракции таллома антоцероса наименьшей активностью обладала

Таблица 1. Активность ферментов внутриклеточной фракции таллома *A. natalensis*, выраженная в скорости разложения субстрата (S) или образования продукта (P)

Ферменты	S, нмоль/(с × г сухой массы)
Каталаза	10,6 ± 0,3 (3)
Аскорбатоксидаза	44,0 ± 4,9 (3)
Аскорбатпероксидаза	50,5 ± 4,1 (3)
	P, нмоль/(с × г сухой массы)
ДОФА-оксидаза	114,6 ± 9,9 (3)
ДОФА-пероксидаза	129,0 ± 8,8 (3)
Пероксидаза	3314,8 ± 366,5 (3)

каталаза (табл. 1). Активность аскорбатоксидазы и аскорбатпероксидазы была выше активности каталазы в несколько раз, а активности ДОФА-оксидазы и ДОФА-пероксидазы превосходили эту активность на порядок. В свою очередь активность *o*-дианизидинпероксидазы была выше ДОФА-пероксидазной активности, более чем в 25 раз (табл. 1). Максимальная активность внутриклеточной пероксидазы наблюдалась при pH 5,5 (рис. 1, а), а оптимум активности внутриклеточной тирозиназы – в области pH от 6 до 7 (рис. 1, б). Кинетический анализ активности пероксидаз в различных фракциях белков

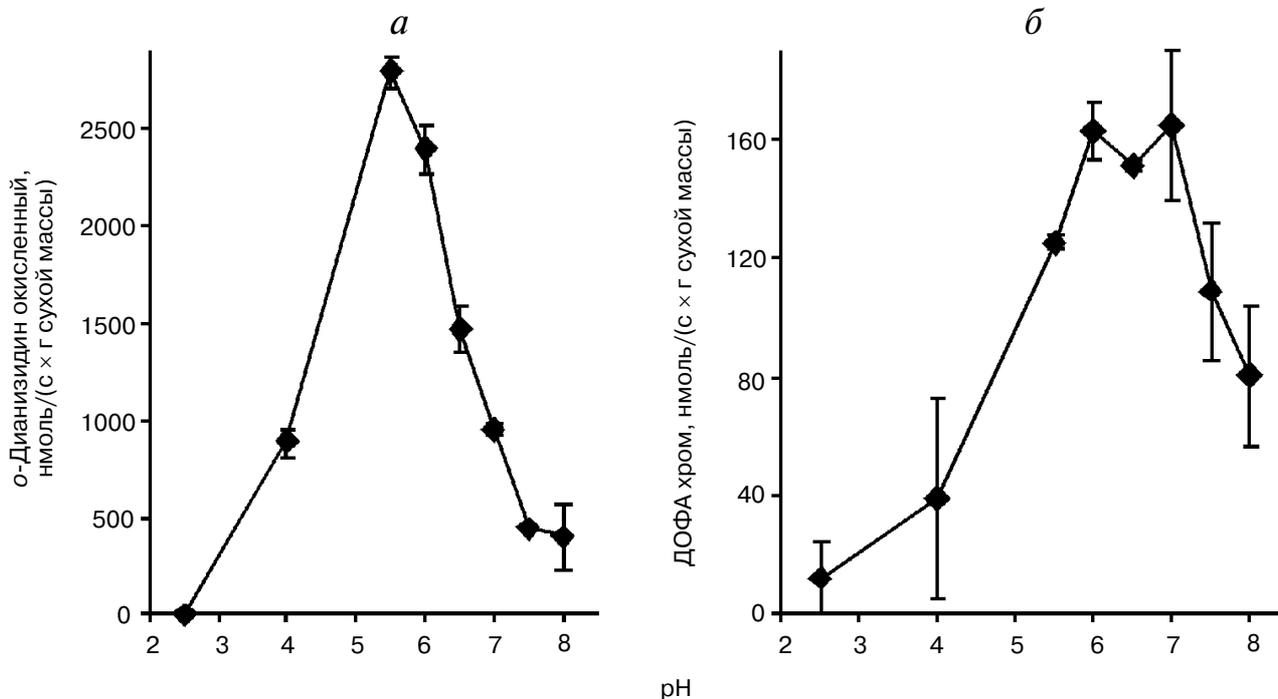


Рис. 1. Активность пероксидазы (а) и тирозиназы (б) из внутриклеточной фракции таллома *A. natalensis* в зависимости от pH (*n* = 3)

таллома показал, что максимальной скоростью реакции обладают внутриклеточные пероксидазы и тирозиназы (табл. 2). Наибольшим сродством к субстрату характеризовались апопластные пероксидазы из фракций V_1 – V_3 , поскольку они имели наименьшую константу Михаэлиса (табл. 2). Константа Михаэлиса тирозиназы повышалась в ряду $V_1 < V_2 < C < V_3$ (табл. 2).

Наибольшим сродством к апопластной пероксидазе (V_1) обладала аскорбиновая кислота. Константа Михаэлиса повышалась в ряду аскорбиновая кислота < *o*-дианизидин < синапо-

вая кислота < кофейная кислота < феруловая кислота < хлорогеновая кислота < *p*-кумаровая кислота (табл. 3). Максимальная скорость реакции увеличивалась в ряду синаповая кислота < аскорбиновая кислота < *o*-дианизидин < *p*-кумаровая кислота < кофейная кислота < феруловая кислота < хлорогеновая кислота (табл. 3). Среди естественных фенольных субстратов наибольшую чувствительность пероксидазы проявляли по отношению к синаповой кислоте (табл. 3).

Показано, что при обезвоживании антоцера над насыщенным раствором $CaCl_2$ относи-

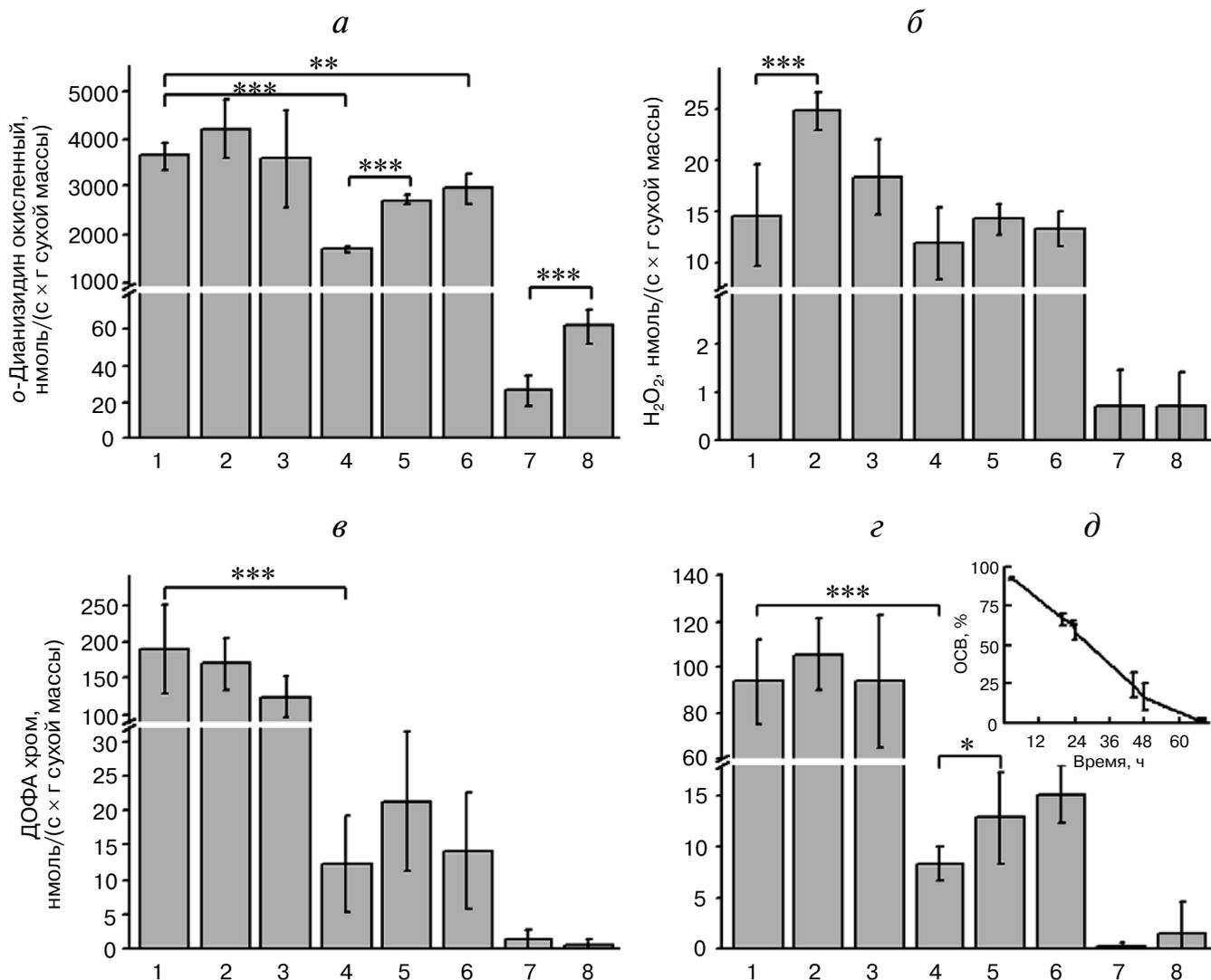


Рис. 2. Активность окислительно-восстановительных ферментов: *а* – пероксидазы; *б* – каталазы; *в* – ДОФА-пероксидазы; *з* – тирозиназы во внутриклеточной фракции таллома *A. natalensis*; *д* – относительное содержание воды (ОСВ) в талломе растения. 1 – до обезвоживания (контроль); 2–4 – после обезвоживания в течение 24, 48 и 68 ч соответственно; 5–6 – после регидратации в течение 1 и 3 ч; 7–8 – экстраклеточный раствор, полученный соответственно после 1 и 3 ч инкубации и извлечения таллома из раствора регидратации. Разница достоверна при $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**), $P \leq 0,001$ (***), $n = 6$

Таблица 2. Максимальная скорость (V_{\max}) и константа Михаэлиса (K_m) реакции окисления *o*-дианизидина пероксидазами и 3,4-дигидроксифенилаланина тирозиназами из различных фракций таллома *A. natalensis*. С — внутриклеточная фракция. Фракции белков, связанных с клеточной стенкой: В₁ — водородными связями, В₂ — ван-дер-ваальсовыми силами и гидрофобными взаимодействиями, В₃ — ионными связями

Фракции	Пероксидаза		ДОФА-оксидаза (тирозидаза)	
	V_{\max} , нмоль <i>o</i> -дианизидина окисленного/(с × г сухой массы)	K_m , мМ	V_{\max} , нмоль ДОФАхрома/(с × г сухой массы)	K_m , мМ
С	4163	0,20	651	3,01
В ₁	674	0,12	111	1,81
В ₂	732	0,14	117	2,89
В ₃	344	0,13	49	4,50

тельное содержание воды в талломе растения постепенно снижалось, через 24 ч оно составляло 58%, через 48 ч — 17%, а к 68 ч — всего 2% (рис. 2, д). Активности внутриклеточных пероксидазы, тирозиназы и ДОФА-пероксидазы к этому времени достоверно снижались (рис. 2, а, в, з). В ходе последующей регидратации активность пероксидазы достоверно повышалась через 1 ч и имела тенденцию к повышению через 3 ч, но оставалась меньше начального уровня, наблюдаемого до обезвоживания таллома (рис. 2, а). Интересно, что активность пероксидазы обнаруживалась и в растворе, в котором проводилась регидратация (ЭКР). Активность пероксидазы в ЭКР достоверно повышалась к 3 ч, в сравнении с уровнем в ЭКР после 1 ч регидратации (рис. 2, а). Активность внутриклеточной тирозиназы незначительно, но достоверно повышалась после регидратации (рис. 2, з). В ЭКР обнаруживались лишь следовые количества ДОФА-пероксидазы, тирозиназы и каталазы (рис. 2, б–з). Активность каталазы достоверно повышалась через 24 ч обезвоживания, снижалась через 48 ч и оставалась на уровне, близком к уровню, наблюдаемому до обезвоживания, даже после 68 ч инкубации и регидратации (рис. 2, б).

Электрофоретическое разделение белков и изоэлектрофокусирование. Анализ электрофоретического разделения белков с помощью гелеэлектрофореза в нативных условиях выявил наличие во внутриклеточной фракции антоцероса 5 изоферментов пероксидаз с Rf 0,99, 0,82, 0,54, 0,53 и 0,52 (данные не представлены). С помощью изофокусирования было детектировано 14 различных изоферментов, которые в основном представлены катионными формами (рис. 3). Во фракции С обнаруживалось 12 изоферментов с pI: 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 5,9, 6,2, 6,5, 7,4, 8,7, 8,9, 9,0,

9,1, во фракции В₁ — 7 изоферментов с pI: 3,4, 5,9, 7,4, 8,5, 8,7, 8,9, 9,0, во фракции В₂ — 6 изоферментов с pI: 3,7, 7,4, 8,5, 8,7, 8,9, 9,0, во фракции В₃ — 10 изоферментов с pI: 3,4, 3,7, 6,2, 6,3, 6,5, 7,4, 8,5, 8,9, 9,0, 9,1 (рис. 3).

Спектральный анализ. Исследовали изменения оптической плотности в смеси, содержащей NADH, феруловую кислоту в присутствии или в отсутствие растительного экстракта из антоцероса или пшеницы. Экзогенная H₂O₂ не добавлялась. NADH имеет два максимума на спектре поглощения при 260 и 338 нм (рис. 4, а, кривая 4). При внесении к 0,11 мМ NADH 50 мкл БПИ корней пшеницы наблюдалось падение оптической плотности в области 338 нм и незначительный рост оптической плотности в области 260 нм, что обусловлено окислением NADH и

Таблица 3. Максимальная скорость (V_{\max}) и константа Михаэлиса (K_m) реакции окисления различных субстратов апопластными пероксидазами фракции В₁ таллома *A. natalensis*. Стандартная реакционная среда общим объемом 0,5 мл содержала: 50 мкл субстрата в соответствующей концентрации, 5 мкл фракции В₁, 0,1 мМ H₂O₂, 0,07 М Na-цитратный буфер pH 5,5

Субстрат	V_{\max} , мкМ/мин	K_m , мкМ
Аскорбиновая кислота	2,4	2
<i>o</i> -Дианизидин	4,9	17
Кофейная кислота	15,8	33
<i>p</i> -Кумаровая кислота	15,3	114
Синаповая кислота	2,0	28
Феруловая кислота	23,4	43
Хлорогеновая кислота	32,2	111

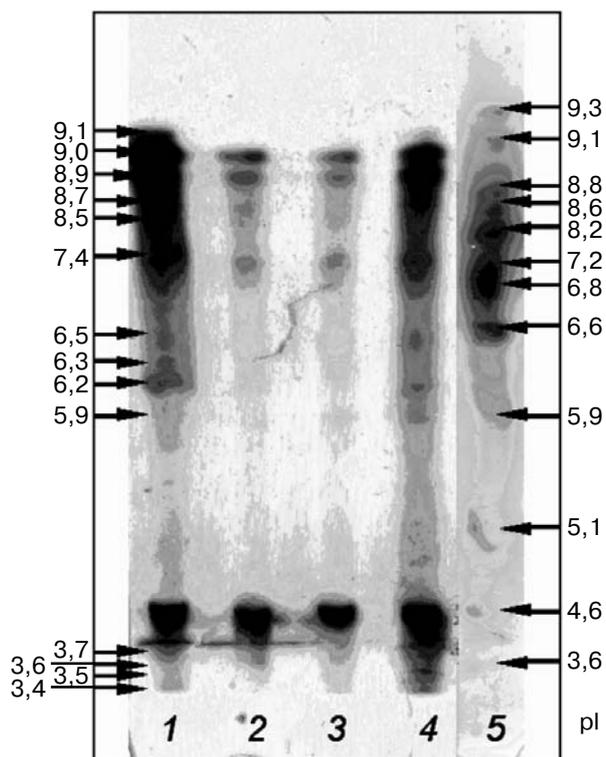


Рис. 3. Изоэлектрические точки изоферментов пероксидазы *A. natalensis*. Фракции белков клеточной стенки: 1, 2, 3 — B_3 , B_2 , B_1 соответственно; 4 — внутриклеточная фракция; 5 — маркеры

образованием NAD^+ (данные не представлены). Феруловая кислота имеет два максимума на спектре поглощения при 287 и 310 нм (рис. 4, а, кривая 3), а кофейная кислота 288 и 311 нм (рис. 4, б, кривая 5). При внесении к 0,1 мМ феруловой кислоты 50 мкл фракции С, B_1 , B_2 , B_3 антоцера или БПИ пшеницы не происходило изменение спектров в течение 20 мин, аналогичные результаты были получены при взаимодействии 0,1 мМ кофейной кислоты и 50 мкл БПИ (данные не представлены). Таким образом, без добавления $NADH$ не наблюдалось окисление фенолов, что говорит об отсутствии полифенолоксидазной активности в этих условиях.

При проведении периодического сканирования оптической плотности смеси веществ при рН 5,5 в течение 20 мин нами обнаружено, что в смеси, содержащей 50 мкл фракции B_1 (рис. 4, а, кривые 1, 2) или B_3 (рис. 4, в, кривые 1–3), 0,11 мМ $NADH$ и 0,1 мМ феруловую кислоту, наибольшее падение оптической плотности наблюдалось в области 310 нм, что соответствует окислению феруловой кислоты. Аналогичные результаты были получены и с образцами из фракций С, B_2 антоцера (данные не представлены) и с

БПИ корней пшеницы (рис. 4, б, кривые 1, 2). Не наблюдалось изменений в спектре поглощения, если в реакционной среде 0,11 мМ $NADH$ заменялось на 0,11 мМ NAD^+ (данные не представлены). Падение оптической плотности в области 310 нм в смеси, содержащей 50 мкл фракции B_3 , 0,11 мМ $NADH$ и 0,1 мМ феруловую кислоту, в значительной степени подавлялось при добавлении в реакционную среду 1 мМ KCN (рис. 4, в, г, кривые 1–3). Аналогичные результаты были получены и с другими фракциями белка из таллома антоцера (данные не представлены).

Показано, что окисление пероксидазой из БПИ корней пшеницы 0,1 мМ феруловой кислоты в присутствии 0,11 мМ $NADH$ при рН 5,5 происходит значительно сильнее, чем окисление 0,1 мМ кофейной кислоты, так как падение оптической плотности в области 310 нм при окислении феруловой кислоты намного превосходит падение оптической плотности в области 311 нм при окислении кофейной кислоты (рис. 4, б, кривые 1–4). При окислении кофейной кислоты также наблюдается рост пика в области 260 нм.

При проведении периодического сканирования оптической плотности смеси веществ при рН 7,0 нами обнаружено, что, в отличие от фракций белков КС таллома антоцера B_1 , B_2 , B_3 , во фракции С при окислении 0,1 мМ $NADH$ и 0,1 мМ феруловой кислоты наибольшее падение оптической плотности наблюдается в области 338 нм, а не 310 нм (рис. 5). Падение оптической плотности в области 310 нм усиливается в ряду $B_3 < B_2 < B_1 < C$. Добавление к фракции B_3 феруловой кислоты большей концентрации (0,2 мМ) приводило к почти двукратному усилению окисления феруловой кислоты и двукратному ингибированию окисления $NADH$, о чем свидетельствует увеличение падения оптической плотности в области 310 нм и снижение падения оптической плотности в области 338 нм соответственно (рис. 5).

Показано, что во фракциях белков КС таллома антоцера B_1 , B_2 , B_3 не происходит образование ХТТ формазана при окислении 0,1 мМ $NADH$ в присутствии 0,1 мМ ХТТ при рН 5,5 (рис. 6, а). Во фракции С происходило образование ХТТ формазана, которое ингибировалось почти на 70% после внесения 250 ед/мл СОД. При рН 7,0 образование ХТТ формазана наблюдалось во всех фракциях, выделенных из таллома антоцера, кроме фракции B_3 , и усиливалось в ряду $B_2 < B_1 < C$ (рис. 6, б). Образование ХТТ формазана ингибировалось после внесения 250 ед/мл СОД на 55, 100 и 25% во фракциях С, B_1 и B_2 соответственно.

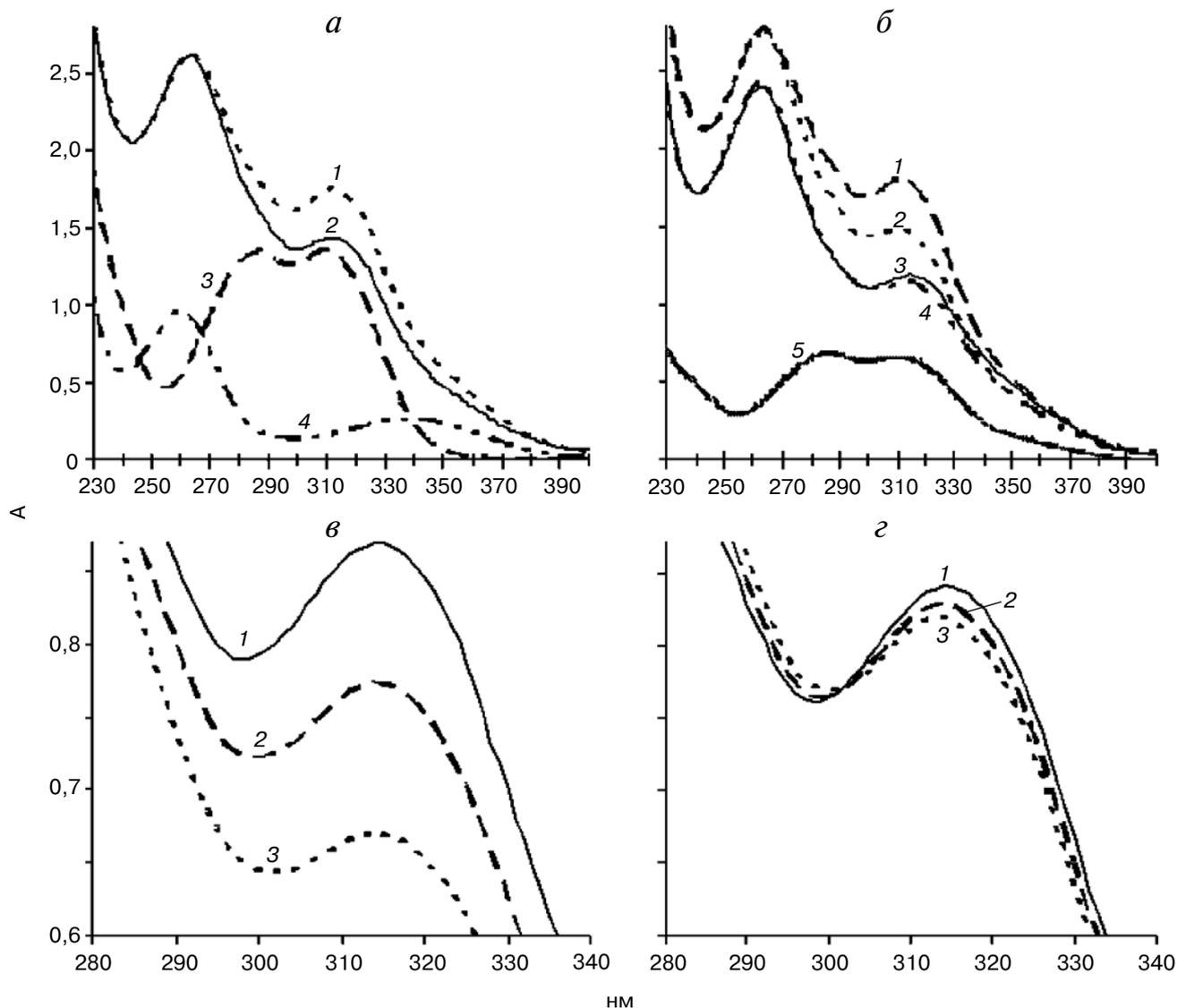


Рис. 4. Спектры поглощения: *a* – 1 и 2 – реакционная смесь, содержащая 0,11 мМ NADH и 0,1 мМ феруловой кислоты в 0,73 мкМ Na-цитратном буфере, pH 5,5, в присутствии 50 мкл фракции В₁ таллома антоцера в начале реакции и через 20 мин после начала реакции соответственно; 3 – 0,1 мМ феруловая кислота; 4 – 55 мкМ NADH; *б* – 1 и 2 аналогично *a* 1 и 2, но в присутствии 50 мкл БПИ из корней пшеницы; 3 и 4 – реакции окисления 0,11 мМ NADH и 0,1 мМ кофейной кислоты в 0,73 мкМ Na-цитратном буфере, pH 5,5, в присутствии 50 мкл БПИ из корней пшеницы в начале реакции и через 20 мин после начала реакции соответственно; 5 – 62,5 мкМ кофейная кислота; *в*, *г* – 1, 2 и 3 – реакции окисления 0,11 мМ NADH и 0,1 мМ феруловой кислоты в 0,73 мкМ Na-цитратном буфере, pH 5,5, в присутствии 50 мкл фракции В₃ таллома антоцера без KCN (*в*) и при добавлении 1 мМ KCN (*г*) в начале реакции (1), через 10 мин (2) и 20 мин (3) соответственно. Скорость сканирования 1920 нм/мин

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе показано, что таллом *A. natalensis* характеризуется высокой активностью редокс-ферментов, в первую очередь, пероксидазы (табл. 1). Обнаружено, что пероксидазы несосудистых высших растений, подобно пероксидазам сосудистых высших растений, в частности, пероксидазам пшеницы [9], акти-

вируются при стрессе. Так, активность пероксидазы антоцера значительно уменьшалась при обезвоживании, а затем достоверно повышалась после регидратации обезвоженного таллома (рис. 2, *a*). Кроме того, активность пероксидазы антоцера была детектирована в растворе, в котором проводили регидратацию (рис. 2, *a*), что, вероятно, обусловлено вымыванием с клеточной поверхности в раствор слабосвязанных изо-

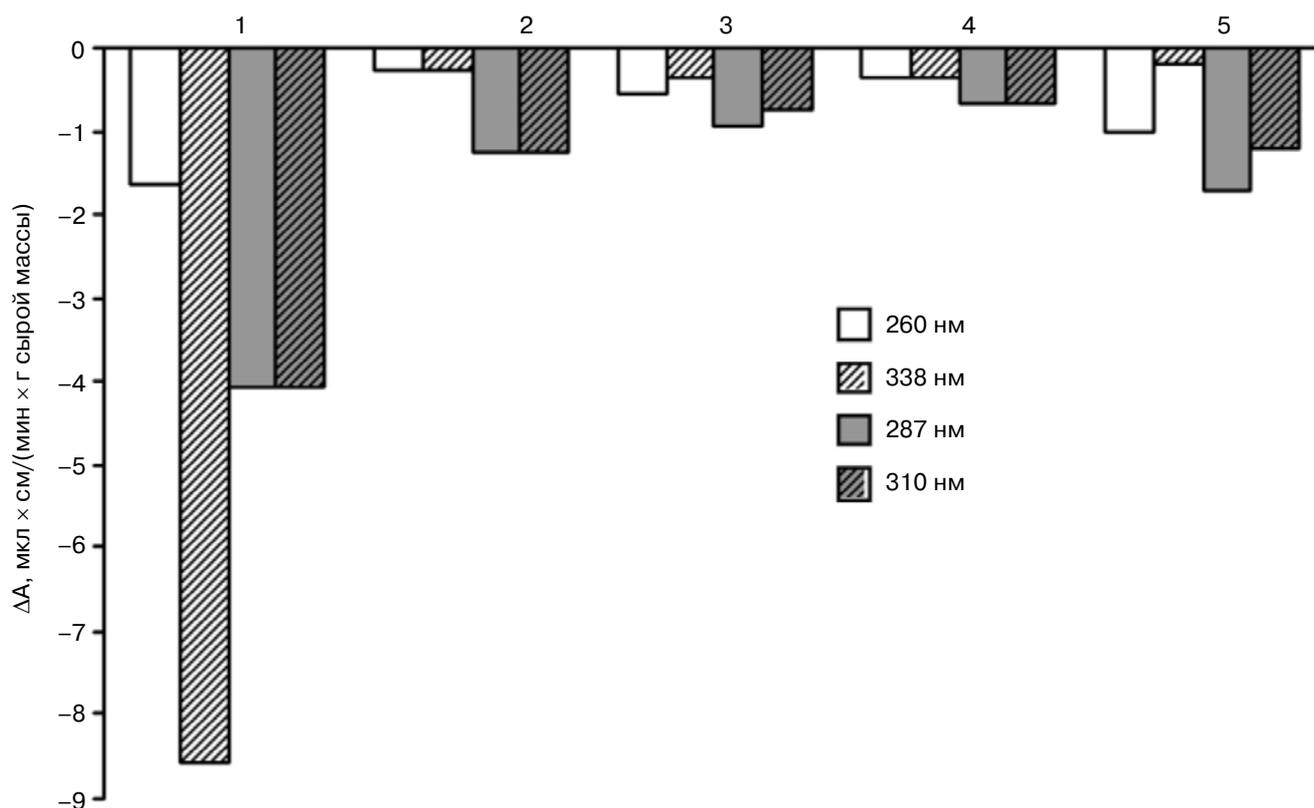


Рис. 5. Разница, рассчитанная из спектров поглощения при пероксидазной реакции окисления субстратов: 0,1 мМ NADH и феруловой кислоты в 0,73 мкМ Na-цитратном буфере, pH 7,0, в течение 20 мин в присутствии различных фракций антоцероса. Скорость сканирования 1920 нм/мин. 1–4 – фракции C, B₁, B₂ и B₃ соответственно с 0,1 мМ феруловой кислотой; 5 – фракция B₃ с 0,2 мМ феруловой кислотой. 260 и 338 нм – максимумы спектра поглощения NADH, 287 и 310 нм – максимумы спектра поглощения феруловой кислоты

форм пероксидазы. Известно, что пероксидазы несосудистых растений из других отделов, в частности, печеночников и мохообразных, также активируются при стрессовых воздействиях и высококомобильны [20, 21]. Например, пероксидаза суспензионной культуры *Marchantia polymorpha* L. секретируется в культуральную среду в ответ на воздействие химического стрессора – борнилацетата [20], а пероксидазы суспензионной культуры мхов *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. и *Racomitrium japonicum* Dozy и Molk. в ответ на воздействие грибного элиситора – хитозана также активировались в культуральной среде [21]. Мобильность апопластных пероксидаз объясняется тем, что эти ферменты присутствуют на клеточной поверхности [11], откуда они могут быстро высвободиться в стрессовых условиях еще до того момента, когда начнется их индуцированный стрессом синтез [12, 21, 22].

Известно, что пероксидаза в сосудах растений является одним из основных адаптационных компонентов, вовлеченных в формиро-

вание устойчивости при различных стрессах [12, 23, 24]. По-видимому, пероксидаза настолько важна для растений, что процесс эволюции привел к образованию большого числа генов, кодирующих этот фермент. Так, в рисе (*Oryza sativa* L.) было идентифицировано 138 генов, содержащихся в 12 хромосомах [11], в резуховидке (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) – 73 [25], во мхе *P. patens* – 48 [21]. Вероятно, что наличие такого большого числа генов и обуславливает присутствие в растительных объектах нескольких изоформ фермента [10, 15]. Известно, что у более устойчивых к воздействию стресса растений активность пероксидазы повышена [23]. Вероятно, что у растений существует как минимум две стратегии «использования» защитных свойств пероксидазы: поддерживать постоянно активность этого фермента на высоком уровне или при изменении условий среды увеличивать активность пероксидазы с низкого до высокого уровня за короткий промежуток времени в необходимом для растения месте.

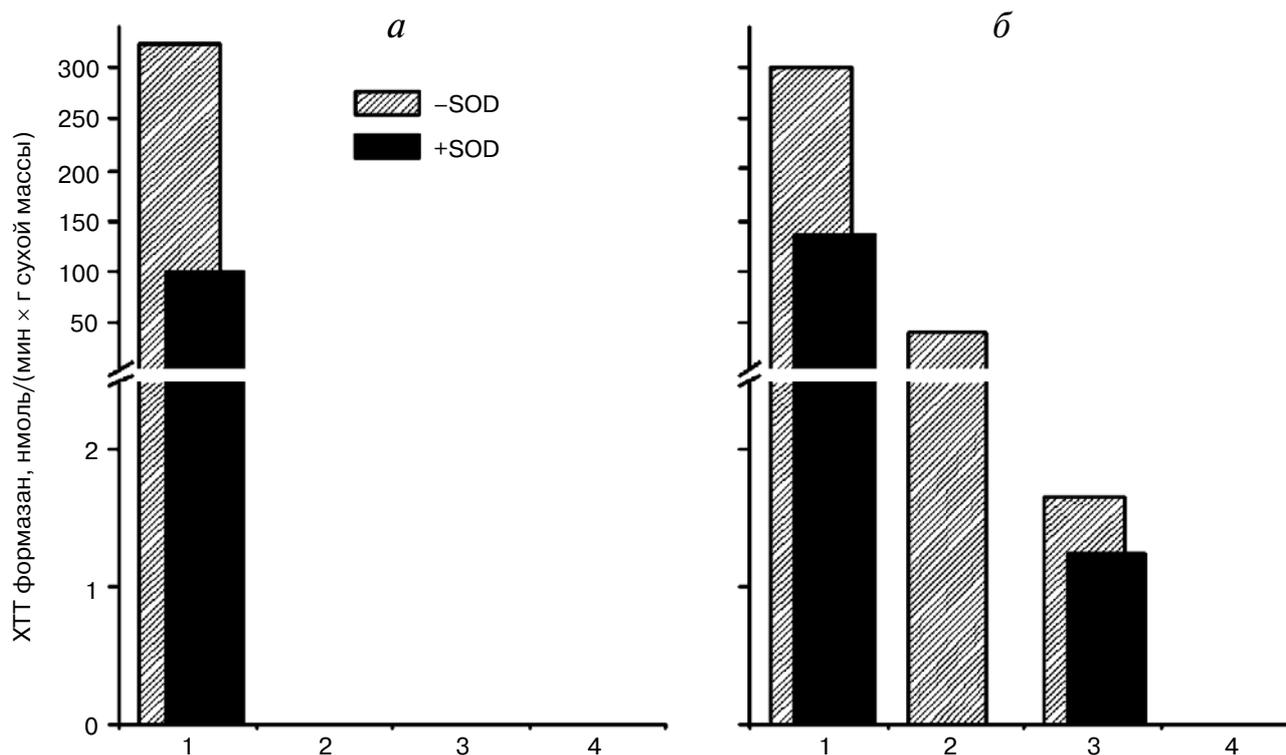


Рис. 6. Интенсивность образования супероксидного анион-радикала при pH 5,5 (а) и pH 7,0 (б), рассчитанное из изменения спектров поглощения при сканировании различных фракций из таллома антоцероса в присутствии 0,1 мМ ХТТ и 0,1 мМ NADH в течение 40 мин в присутствии или в отсутствие 250 ед/мл СОД. Скорость сканирования 1920 нм/мин; 1–4 – фракции С, В₁, В₂ и В₃ соответственно

Кинетический анализ активности пероксидаз из внутриклеточной фракции и различных фракций белков КС таллома антоцероса показал, что максимальной скоростью реакции обладают внутриклеточные пероксидазы, а наибольшим сродством к субстрату характеризуются апопластные пероксидазы, поскольку они имеют наименьшую константу Михаэлиса (табл. 2). Таким образом, для активации пероксидаз апопласта достаточно небольшого количества субстрата. Известно, что быстрое активирование апопластной пероксидазы в стрессовых условиях может быть ключевым компонентом окислительного взрыва в клетках растений [26, 27] и играть важную роль в запуске сигнальных каскадов и последующем формировании иммунитета у растений [28]. Субстрат-зависимая активация пероксидазы подтверждается также тем, что секреция пероксидазы в стрессовых условиях может сопутствовать секреции субстрата, как это показано, например, для луналарина в суспензионной культуре *M. polymorpha* [20].

Наличие в апопласте растений разнообразных редокс-ферментов обуславливает их комплементарные [29] или конкурентные взаимоот-

ношения, например, конкуренцию за субстраты. В частности, учитывая, что с фенольными соединениями реагируют не только пероксидазы, но и тирозиназы, не исключено, что активирование тирозиназы может отрицательно влиять на активность пероксидазы вследствие их конкуренции за субстраты. Известно, что тирозиназы, как и пероксидазы, являются компонентами иммунитета живых организмов [30]. В наших экспериментах внутриклеточные тирозиназы, подобно внутриклеточным пероксидазам, были наиболее активны, а наибольшим сродством к субстратам характеризовались апопластные ферменты (табл. 2). Сходство кинетических характеристик предполагает, что оба фермента могут активироваться в одинаковых условиях, что и подтверждается в наших опытах. Нами показано, что при стрессе, вызванном обезвоживанием, происходит активирование тирозиназ, но в отличие от пероксидаз они менее мобильны, так как в ЭКР были обнаружены лишь следовые их количества (рис. 2, з).

В роли еще одного конкурента пероксидазы за субстрат (H₂O₂) может выступать каталаза. Показано, что через сутки после начала обезво-

живания активность каталазы возрастала почти в два раза, тогда как активность пероксидазы и тирозиназы имела лишь тенденцию к повышению (рис. 2, *а, б, в*). Возможно, что повышение активности каталазы связано со значительным повышением уровня H_2O_2 при обезвоживании, что описано в ряде работ [31, 32]. Снижение активности каталазы ко вторым суткам обезвоживания до первоначального уровня (до воздействия) и отсутствие изменения на следующий день, а также после регидратации свидетельствует о том, что уровень H_2O_2 был также понижен и не претерпевал существенных изменений.

В сосудистых растениях существенное влияние на активность пероксидазы оказывает также наличие и количественное соотношение различных субстратов [9, 17]. Можно полагать, что активирование пероксидазы антоцера при регидратации таллома связано не с повышением уровня H_2O_2 , а высвобождением каких-либо субстратов, индукторов или кофакторов. При этом происходит повышение оксидазной активности пероксидазы, что приводит не к утилизации H_2O_2 , а наоборот, к образованию O_2^- и H_2O_2 [33], как это происходит, например, при патоген-индуцированном окислительном взрыве в клетках сосудистых растений [24]. При этом, вероятно, для активирования пероксидазой окисления фенольных субстратов с последующим быстрым образованием АФК (окислительным взрывом) при стрессе необходимо появление на клеточной поверхности какого-либо компонента, служащего катализатором. Показано, что одним из таких компонентов должен быть восстановитель [26], например, NADH. Предполагается, что в апопласте сосудистых растений NADH может появиться в результате активности малат- или лактатдегидрогеназы плазмалеммы или КС, а его взаимодействие с пероксидазой может приводить к образованию АФК [10, 24, 33]. Как известно, пероксидаза обладает NADH-оксидазной функцией, при этом в результате взаимодействия этого фермента с кислородом образуются радикальная форма NAD^{\cdot} и H_2O_2 [24, 33, 34]. В дальнейшем может происходить цепь взаимных превращений. Известно, что при совместном окислении пероксидазой субстратов с резко различающейся реакционной способностью наблюдаются эффекты их взаимной активации или ингибирования [35]. По мнению авторов, происходит активация окисления медленно окисляемого субстрата и частичное или полное ингибирование превращения быстро окисляемого субстрата (активатора). Таким образом, фенольные радикалы и/или радикальная форма восстановителя могут взаимодействовать между собой и с кислородом, образуя O_2^- [33–35].

Для выявления возможного функционирования данного редокс-механизма в клетках несосудистых высших растений мы проанализировали особенности совместного окисления пероксидазой таллома антоцера NADH и феруловой кислоты, естественного фенольного субстрата пероксидазы. Как известно, в антоцеротвидных обнаруживаются различные производные оксикоричных кислот [2]. Обнаружено, что при pH 5,5 в присутствии NADH и феруловой кислоты и в отсутствие экзогенной H_2O_2 наибольшее падение оптической плотности наблюдалось в области 310 нм, что, вероятно, обусловлено окислением феруловой кислоты, а не NADH (рис. 4, *а*). Значительное ингибирование этой реакции при добавлении цианида, например, во фракции B_3 (рис. 4, *в, г*) косвенно подтверждает вовлечение в этот процесс пероксидаз. Несмотря на то, что NADH может являться медленно окисляемым субстратом пероксидазы [35], возможно, что в наших экспериментах он выступал в качестве активатора окисления фенольных кислот. Для подтверждения этого был использован фермент сосудистых растений – экстраклеточная пероксидаза пшеницы из БПИ. Было показано, что при pH 5,5 пероксидаза из пшеницы, аналогично пероксидазам антоцера, окисляла феруловую кислоту в присутствии NADH и феруловой кислоты и в отсутствие экзогенной H_2O_2 , причем в большей степени, чем кофейную кислоту (рис. 4, *б*). Известно, что для окислительного взрыва, в котором участвует пероксидаза, помимо восстановителей, необходимо изменение pH в щелочную сторону [26], поэтому важно было проверить, будет ли зависеть от pH реакционной среды окисление феруловой кислоты в присутствии NADH пероксидазами антоцера. Обнаружено, что при pH 7,0, так же, как и при pH 5,5, во всех фракциях антоцера, за исключением фракции С, окисление феруловой кислоты происходит в большей степени, чем окисление NADH, о чем можно судить по большему падению оптической плотности при 310 нм, чем при 338 нм (рис. 5). В цитоплазматической фракции присутствуют все растворимые вещества, в том числе эндогенные фенолы и другие субстраты пероксидазы, возможно, поэтому здесь в большей степени окисляется NADH, чем экзогенная феруловая кислота. Менее всего феруловая кислота окислялась пероксидазами из фракции B_3 антоцера, однако при увеличении концентрации феруловой кислоты в два раза (0,2 мМ) ее окисление увеличилось почти вдвое, а окисление NADH уменьшилось в 2 раза (рис. 5). Это, вероятно, свидетельствует о конкурентных взаимоотношениях этих субстратов при окислении пероксидазой.

Нами показано, что пероксидазы антоцероса способны к образованию O_2^- (рис. 6), и этот процесс является рН-зависимым. Акцептор O_2^- ХТТ [18] в присутствии 0,1 мМ NADH превращался в ХТТ формазан при рН 5,5 только во внутриклеточной фракции антоцероса, данная реакция была чувствительна к СОД (рис. 6, а). При рН 7,0 СОД-чувствительное образование ХТТ формазана свидетельствует о том, что O_2^- образовывался во всех фракциях, кроме фракции В₃ (рис. 6, б). Такое значительное различие в данной реакции при кислом и нейтральном рН, вероятно, обусловлено тем, что как для образования O_2^- пероксидазой, так и для акцептирования O_2^- с помощью ХТТ нужна более щелочная среда [18, 26]. При этом различия в ингибировании образования ХТТ формазана фракциями С, В₁ и В₂ после внесения СОД и отсутствие окисления ХТТ пероксидазами из фракции В₃ (рис. 6, б), по-видимому, обусловлены различной способностью изоформ пероксидаз из различных фракций к образованию O_2^- . Нами обнаружено, что фракции различаются по изоферментному составу пероксидаз (рис. 3). Вероятно, во фракции В₃ отсутствуют пероксидазы, способные к образованию O_2^- , в частности, во фракции В₃ отсутствует изоформа с рI 8,7, присутствующая в других фракциях. Во фракции С присутствуют две анионные изоформы с рI 3,5, 3,6, отсутствующие в других фракциях. Изоформа пероксидазы с рI 5,9 присутствует только во фракциях С и В₁ (рис. 3), и именно в этих фракциях образование ХТТ формазана на порядок превосходит образование во фракции В₂ (рис. 3). Таким образом, можно говорить о различной способности изоферментов пероксидаз антоцероса к образованию O_2^- . В перспективе детальный анализ специфичности O_2^- -образующей активности отдельных изоформ пероксидаз позволит выявить их вклад в окислительный взрыв при стрессе.

Таким образом, если предположить, что в стрессовых условиях происходит высвобождение в апопласт NADH или какого-либо другого восстановителя, то для запуска окислительного взрыва потребуется совсем небольшое его количество. В результате дифференцированного окисления субстратов пероксидазой такой восстановитель может выступать в качестве индуктора, стимулируя превращение других субстратов, например, фенолов, выделяемых при стрессе в апопласт. Поскольку в апопласте всегда

присутствует пул растворимых пероксидаз и, вероятно, медленно окисляемых субстратов, можно полагать, что для мгновенного ответа достаточно высвобождения небольшого количества быстро окисляемого субстрата или какого-либо кофактора. Последующее нарастание ответа может осуществляться как за счет высвобождения дополнительного количества фермента, так и за счет появления субстратов. Таким образом, ключевая роль экстраклеточной пероксидазы заключается в регуляции баланса АФК в апопласте растительных клеток и обусловлена конкурентными и комплементарными взаимоотношениями различных субстратов пероксидазы.

В настоящей работе впервые показано, что наряду с известным цитологическим и морфологическим сходством с сосудистыми растениями, антоцеротовидные имеют также определенное сходство особенностей функционирования редокс-ферментов. Впервые проанализированы кинетические характеристики пероксидаз и тирозиназ антоцеротовидных, продемонстрирована возможность функционирования пероксидаз таллома антоцероса в анти- и прооксидантном режимах. Мы полагаем, что выявленный биохимический механизм возможного участия пероксидаз в образовании АФК посредством субстрат-субстратного взаимодействия имеет важное значение для адаптации и выживания антоцероса в стрессовых условиях, в частности, при обезвоживании/регидратации. В перспективе представляется важным расшифровать элементы сигнальных путей, опосредуемых изменениями редокс-статуса и способствующих формированию защитных ответов антоцеротовидных. Можно полагать, что образование АФК пероксидазами — эволюционно древний процесс, возникший как защитный механизм с целью повышения адаптационных механизмов наземного существования высших растений, их приспособления к меняющимся условиям среды и успешной колонизации ими различных экологических ниш.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-04-93962), программы Президента РФ для поддержки ведущих научных школ (НШ-825.2012.4), программы фундаментальных исследований Президиума РАН по «Молекулярной и клеточной биологии» (руководитель А.Н. Гречкин).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Villarreal, J.C., Cargill, D.C., Soderstrom, L., Hagborg, A., and Renzaglia, K.S. (2010) A synthesis of hornwort diversity: Patterns, causes and future work, *Phytotaxa*, **9**, 150–166.
- Asakawa, Y. (1995) In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (Herz, W., Kirby, G.W., Moore, R.E., Steglich, W., and Tamm, Ch., eds) Springer, Vienna, **65**, pp. 1–562.
- Троицкий А.В., Игнагов М.С., Боброва В.К., Милютин И.А. (2007) Вклад геносистематики в современное представление о филогении и системе моховидных, *Биохимия*, **72**, 1675–1689.
- Chang, Y., and Graham, S.W. (2011) Inferring the higher-order phylogeny of mosses (Bryophyta) and relatives using a large, multigene plastid data set, *Am. J. Bot.*, **98**, 839–849.
- Qiu, Y.-L., Li, L., Wang, B., Chen, Z., Knoop, V., Groth-Malonek, M., Dombrowska, O., Lee, J., Kent, L., Rest, J., Estabrook, G.F., Hendry, T.A., Taylor, D.W., Testa, C.M., Ambros, M., Crandall-Stotler, B., Duff, R.J., Stech, M., Frey, W., Quandt, D., and Davis, C.C. (2006) The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence, *PNAS*, **103**, 15511–15516.
- Adams, D.G., and Duggan, P.S. (2008) Cyanobacteria–bryophyte symbioses, *J. Exp. Bot.*, **59**, 1047–1058.
- Wood, A.J. (2007) The nature and distribution of vegetative desiccation-tolerance in hornworts, liverworts and mosses, *Bryologist*, **110**, 163–177.
- Minibayeva, F., and Beckett, R.P. (2001) High rates of extracellular superoxide production in bryophytes and lichens, and an oxidative burst in response to rehydration following desiccation, *New Phytol.*, **152**, 333–341.
- Часов А.В., Минибаева Ф.В. (2009) Действие экзогенных фенолов на супероксидобразующую способность экстраклеточной пероксидазы корней проростков пшеницы, *Биохимия*, **74**, 946–955.
- Minibayeva, F., Kolesnikov, O., Chasov, A., Beckett, R.P., Luthje, S., Vylegzhanina, N., Buck, F., and Bottger, M. (2009) Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species, *Plant Cell Environ.*, **32**, 497–508.
- Passardi, F., Longet, D., Penel, C., and Dunand, C. (2004) The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants, *Phytochemistry*, **65**, 1879–1893.
- Almagro, L., Gomez Ros, L.V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barcelo, A., and Pedreno, M.A. (2009) Class III peroxidases in plant defense reactions, *J. Exp. Bot.*, **60**, 377–390.
- Mathe, C., Barre, A., Jourda, C., and Dunand, C. (2010) Evolution and expression of class III peroxidases, *Arch. Biochem. Biophys.*, **500**, 58–65.
- Mayaba, N., and Beckett, R.P. (2003) Increased activities of superoxide dismutase and catalase are not the mechanism of desiccation tolerance induced by hardening in the moss *Atrichum androgynum*, *J. Bryology*, **25**, 281–286.
- Li, J.L., Sulaiman, M., Beckett, R.P., and Minibayeva, F.V. (2010) Cell wall peroxidases in the liverwort *Dumortiera hirsuta* are responsible for extracellular superoxide production, and can display tyrosinase activity, *Physiol. Plant.*, **138**, 474–484.
- Часов А.В., Минибаева Ф.В. (2014) Методические подходы к исследованию редокс-активности апопласта. 1. Механизмы высвобождения пероксидаз, *Физиол. раст.*, **61**, 594–602.
- Часов А.В., Минибаева Ф.В. (2014) Методические подходы к исследованию редокс-активности апопласта. 2. Регуляция активности пероксидаз, *Физиол. раст.*, **61**, 668–675.
- Sutherland, M.W., and Learmonth, B.A. (1997) The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase, *Free Radic. Res.*, **27**, 283–289.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680–685.
- Hirata, T., Ashida, Y., Mori, H., Yoshinaga, D., and Goad, L.J. (2000) A 37-kDa peroxidase secreted from liverworts in response to chemical stress, *Phytochemistry*, **55**, 197–202.
- Lehtonen, M.T., Akita, M., Kalkkinen, N., Ahola-Iivarinen, E., Ronnholm, G., Somervuo, P., Thelander, M., and Valkonen, J.P. (2009) Quickly-released peroxidase of moss in defense against fungal invaders, *New Phytol.*, **183**, 432–443.
- Van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J. (2006) Significance of inducible related-related proteins in infected plants, *Annu. Rev. Phytopathol.*, **44**, 135–162.
- Pshenichnov, E., Khashimova, N., Akhunov, A., Golubenko, Z., and Stipanovic, R.D. (2011) Participation of chitin-binding peroxidase isoforms in the wilt pathogenesis of cotton, *AJPS*, **2**, 43–49.
- O'Brien, J.A., Daudi, A., Butt, V.S., and Bolwell, G.P. (2012) Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism, *Planta*, **236**, 765–779.
- Tognolli, M., Penel, C., Greppin, H., and Simon, P. (2002) Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*, *Gene*, **288**, 129–138.
- Bolwell, G.P., Bindschedler, L.V., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., Gerrish, C., and Minibayeva, F. (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system, *J. Exp. Bot.*, **53**, 1367–1376.
- Lehtonen, M.T., Akita, M., Frank, W., Reski, R., and Valkonen, J.P.T. (2012) Involvement of a class III peroxidase and the mitochondrial protein TSPO in oxidative burst upon treatment of moss plants with a fungal elicitor, *MPMI*, **25**, 363–371.
- Тарчевский И.А. (2001) *Метаболизм растений при стрессе*, ФЭН, Казань.
- Roach, T., Colville, L., Beckett, R.P., Minibayeva, F.V., Navaux, M., and Kranner, I. (2015) A proposed interplay between peroxidase, amine oxidase and lipoxygenase in the wounding-induced oxidative burst in *Pisum sativum* seedlings, *Phytochemistry*, **112**, 130–138.
- Mayer, A.M. (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review, *Phytochemistry*, **67**, 2318–2331.
- Lee, B.R., Kim, K.Y., Jung, W.J., Avicé, J.C., Ourry, A., and Kim, T.H. (2007) Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.), *J. Exp. Bot.*, **58**, 1271–1279.
- Chen, Q., Yang, L., Ahmad, P., Wan, X., and Hu, X. (2011) Proteomic profiling and redox status alteration of recalcitrant tea (*Camellia sinensis*) seed in response to desiccation, *Planta*, **233**, 583–592.
- Halliwell, B. (1978) Lignin synthesis: the generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenols, *Planta*, **140**, 81–88.
- Лебедева О.В., Угарова Н.Н. (1997) Стационарная кинетика реакции окисления NADH пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена, *Биохимия*, **62**, 249–253.
- Лебедева О.В., Угарова Н.Н. (1996) Механизм пероксидазного окисления. Субстрат-субстратная активация в реакциях, катализируемых пероксидазой хрена, *Изв. АН. Сер. Хим.*, **1**, 25–32.

ACTIVITY OF REDOX ENZYMES IN THE THALLUS OF *Anthoceros natalensis*

A. V. Chasov^{1*}, R. P. Beckett², F. V. Minibayeva¹

¹ Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,
Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
P.O. Box 30, Kazan 420111, Russian Federation;
fax: +7(843)292-7347, E-mail: chasov@kibb.knc.ru

² University of KwaZulu-Natal, School of Life Sciences,
Private Bag X01, Pietermaritzburg, Scottsville 3209,
South Africa; fax: +27(33)260-5105

Received January 16, 2015

Revision received April 15, 2015

Anthocerotophyta (hornworts) belong to the ancient nonvascular land plants and originate from a common ancestor with contemporary vascular plants. Hornworts, due to their high stress tolerance, provide a unique model for studying the mechanisms of stress tolerance in higher plants. In the present work, we demonstrated that the thallus of *Anthoceros natalensis* possesses high redox activity, and it can change in response to stresses. Desiccation of the thallus reduces the activity of intracellular peroxidases, DOPA-peroxidases, and tyrosinases and increases catalase activity. Activities of peroxidases and tyrosinases tend to increase following subsequent rehydration of the thallus. Kinetic features of intracellular peroxidases and tyrosinases as well as various isoforms of peroxidases from cell wall fractions are characterized. It is shown that hornwort peroxidases resemble peroxidases from higher vascular plants in terms of their functional activity, including the ability to produce superoxide anion radical. The biochemical mechanism of the involvement of peroxidases in stress-induced production of reactive oxygen species (ROS) as a result of substrate–substrate interactions in the thallus of hornwort is proposed. It is suggested that the formation of ROS by peroxidases is an evolutionarily ancient process that appeared early as a defense mechanism that is necessary to increase resistance and adaptation of higher plants to the changing environment and their successful colonization of different ecological niches.

Key words: hornwort, peroxidase, superoxide, catalase, tyrosinase, dehydration, rehydration