

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ЗАКАЛИВАНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ИХ ИНГИБИТОРОВ В ЛИСТЯХ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ И ОГУРЦА

© 2011 г. С. А. Фролова, А. Ф. Титов, В. В. Таланова

Учреждение Российской академии наук Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск
Поступила в редакцию 30.04.2010 г.

На проростках озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и огурца (*Cucumis sativus* L.) изучали динамику активности цистеиновых и сериновых трипсиноподобных (амидаз) протеиназ, а также ингибиторов трипсина при холодом закаливании (5°C для пшеницы, 10°C для огурца). Усиление активности протеиназ и ингибиторов по времени совпадало или предшествовало повышению устойчивости проростков пшеницы и огурца в начальный период их закаливания. При достижении максимальной устойчивости у пшеницы активность амидаз снижалась, в то время как повышенный уровень активности цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина сохранялся на протяжении всего процесса закаливания. У огурца в этот период активность амидаз и ингибиторов трипсина снижалась, а активность цистеиновых протеиназ поддерживалась на уровне, близком к исходному. Высказано предположение об участии цистеиновых протеиназ, амидаз и ингибиторов трипсина в адаптации растений к холоду.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* – *Cucumis sativus* – холодоустойчивость – амидазы – цистеиновые протеиназы – ингибиторы трипсина

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что под влиянием неблагоприятных, но не повреждающих температур в клетках и тканях растений происходят многочисленные физиолого-биохимические изменения, большая часть из которых прямо или косвенно вовлечена в процесс формирования повышенной устойчивости [1, с. 122; 2, с. 15–32]. Однако имеющиеся данные касаются, главным образом, анаболических процессов и, прежде всего, синтеза стрессовых (шоковых) белков [3, с. 90–127], в то время как роль катаболических процессов практически не изучена. Между тем, важную роль в обмене веществ живого организма и защите его от повреждения играют протеолитические ферменты, участвуя не только в деградации белковых молекул, но и в регуляции различных физиолого-биохимических процессов посредством реакций ограниченного протеолиза [4, с. 211]. Основными регуляторами активности протеиназ являются белки-ингибиторы, способные образовывать с ними стабильные комплексы и приводить к обратимому подавлению активности протеолитических ферментов. В настоящее время установлено,

что в процессах защиты растений от действия различных неблагоприятных факторов (главным образом, биотической природы) важная роль принадлежит системе протеиназа–ингибитор [5]. Однако участие протеиназно–ингибиторной системы в низкотемпературной адаптации растений и формировании повышенной холодоустойчивости почти не исследовано. В связи с этим, целью нашей работы стало изучение активности протеиназ и их ингибиторов в процессе повышения устойчивости, индуцированного действием на растения пшеницы и огурца низкой закаливающей температуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводили с контрастными по отношению к низкой температуре объектами: холодоустойчивой озимой пшеницей (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39 и теплолюбивым огурцом (*Cucumis sativus* L.) сорта Зозуля. Растения обоих видов в течение 7 суток выращивали в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе Кнопа в камере искусственного климата при температуре воздуха 25°C, его относительной влажности 60–70%, освещенности около 10 клк и фотопериоде 14 ч. В дальнейшем недельные проростки подвергали действию низкой закаливающей температуры (5°C – для пшеницы и 10°C – для огурца), сохраняя при этом неизменными прочие условия.

Сокращение: БАПА – N_α-бензоил-DL-аргинин-4-нитроанилид гидрохлорид.

Адрес для корреспонденции: Таланова Вера Викторовна. 185910 Петрозаводск, Пушкинская ул., 11. Институт биологии Карельского научного центра РАН. Электронная почта: talanova@krc.karelia.ru

Контрольные растения оставались при температуре 25°C.

О холодоустойчивости проростков судили по реакции клеток листа на 5-минутное тестирующее промораживание в термоэлектрическом микрохолодильнике (ТЖР–02/–20, “Интерм”, Россия), при этом в качестве показателя устойчивости была выбрана температура (LT_{50}), вызывающая гибель 50% палисадных клеток листовых высечек [6], а уровень устойчивости, достигнутый в ходе закаливания, оценивали по ее приросту, т.е. разнице между величиной LT_{50} у контрольных и опытных растений.

Для определения активности протеиназ и их ингибиторов листья измельчали в ступке с водой. Полученный гомогенат отжимали и центрифугировали при 6000 g. Содержащиеся в супернатанте белки осаждали сульфатом аммония при 80% насыщении. Полученный преципитат отделяли центрифугированием при 12000 g в течение 30 мин. Концентрацию белка определяли по Bradford [7], используя в качестве стандарта БСА.

Активность сериновых трипсиноподобных протеиназ (амидаз) определяли с использованием синтетического субстрата – N_{α} -бензоил-DL-аргинин-4-нитроанилида гидрохлорида (БАПА) [8]. В кювету с увеличивающимся объемом раствора фермента вносили 0.1 М фосфатный буфер (рН 8.0) и 0.1 мл БАПА. Общий объем смеси составлял 2.5 мл. Смесь выдерживали при температуре 37°C в течение 30 мин. Затем в кювету для остановки реакции добавляли 0.3 мл 30% уксусной кислоты и регистрировали оптическую плотность при длине волны 410 нм на спектрофотометре СФ-2000 (“Спектр”, Россия). За единицу амидазной активности принимали количество фермента, гидролизующего при описанных условиях 1 нмоль субстрата за 1 мин.

Активность цистеиновых протеиназ определяли по модифицированному методу Кунитца [9]. В кювету с раствором фермента и активирующих добавок (ЭДТА и L-цистеин гидрохлорид) вносили 1 мл 2% казеина в 0.2 М фосфатном буфере (рН 7.6), предварительно выдержанном в течение 5 мин при 37°C. Смесь выдерживали при температуре 37°C, а затем для остановки реакции вносили 3 мл 5% ТХУ и регистрировали оптическую плотность при 280 нм на спектрофотометре СФ-2000. За единицу протеолитической активности принимали то количество фермента, которое в данных условиях определения активности приводит к увеличению оптической плотности на 0.1 при 280 нм в течение 1 мин гидролиза.

Ингибиторную активность оценивали по подавлению активности ферментов [10]. Для этого смеси, содержащие постоянное количество фермента и разное количество ингибитора (общий объем 1 мл), инкубировали 5 мин при 37°C в 0.1 М

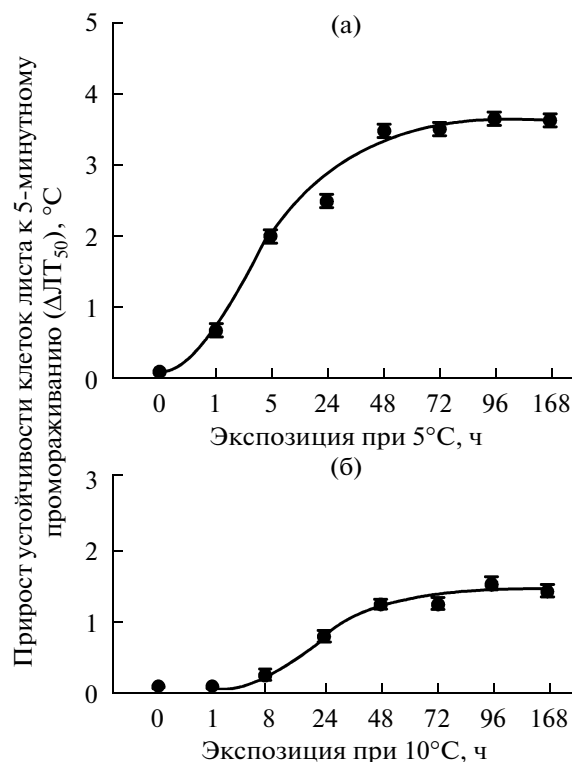


Рис. 1. Влияние холодого закаливания на устойчивость проростков пшеницы (а) и огурца (б).

фосфатном буфере (рН 8.0), затем вносили 1 мл 2% казеина, выдерживали 20 мин, осаждали 3 мл 5% ТХУ, через 0.5 ч фильтровали и определяли оптическую плотность при 280 нм. За единицу ингибиторной активности принимали такое количество ингибитора, которое вызывало 100% подавление активности 1 мг трипсина.

На рисунках приведены средние арифметические значения из 2–3 независимых опытов, проведенных в 5–10-кратной биологической повторности, и их стандартные ошибки. Обсуждаются только различия, достоверные при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенные исследования показали, что воздействие температуры 5°C на проростки пшеницы уже через 1 ч вызывало увеличение устойчивости клеток листьев, а через двое суток она достигала максимума, сохраняясь в дальнейшем неизменной (рис. 1а). В отличие от этого, у проростков огурца холодоустойчивость при 10°C повышалась значительно медленнее, достигала максимума только через 4 суток закаливания, а ее прирост по сравнению с исходным уровнем был значительно меньше, чем у пшеницы (рис. 1б).

Наряду с изменением устойчивости под влиянием холода в листьях проростков пшеницы и

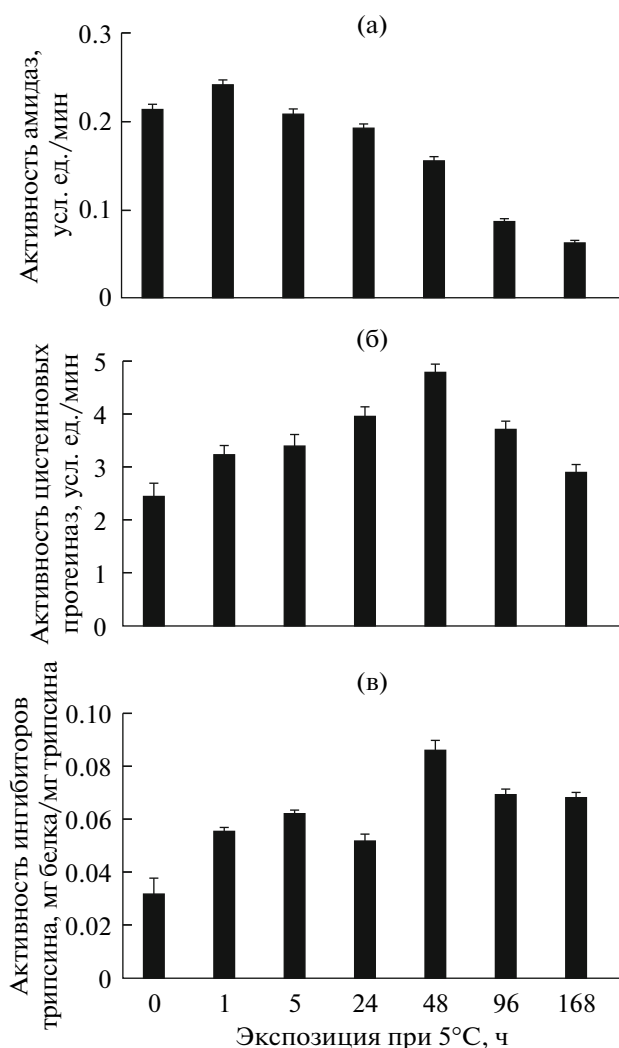


Рис. 2. Влияние холодого закаливания на активность амидаз (а), цистеиновых протеиназ (б) и ингибиторов трипсина (в) в листьях проростков пшеницы.

огурца происходили определенные сдвиги в активности протеиназ и ингибиторов трипсина. В частности, в начальный период действия низкой температуры (через 1 ч) активность амидаз в листьях пшеницы несколько увеличивалась по сравнению с исходным уровнем (рис. 2а), а затем в процессе закаливания наблюдалось ее значительное снижение. Активность цистеиновых протеиназ у пшеницы также увеличивалась в начальный период закаливания и достигала максимума через 2 суток (рис. 2б). Затем происходило некоторое ее снижение, однако и к концу закаливания, когда холодоустойчивость была максимальной, она сохранялась на повышенном уровне. Сходные изменения в ходе холодого закаливания отмечены и в отношении активности ингибиторов трипсина, причем ее уровень в конце закаливания был довольно высоким (рис. 2в).

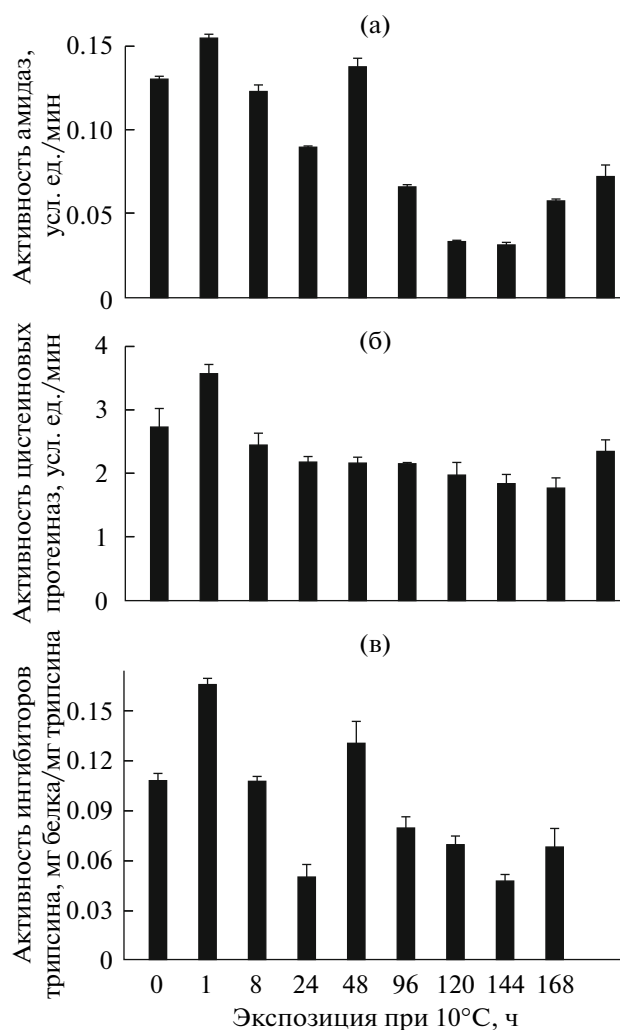


Рис. 3. Влияние холодого закаливания на активность амидаз (а), цистеиновых протеиназ (б) и ингибиторов трипсина (в) в листьях проростков огурца.

У проростков огурца активность амидаз после кратковременного повышения через 1 ч действия холода, когда холодоустойчивость растений еще не изменялась, в дальнейшем в течение первых суток закаливания заметно снижалась, еще через сутки возвращалась к исходным значениям (до начала закаливания), а затем резко падала (рис. 3а). Важно, что активность цистеиновых протеиназ у огурца также повышалась в начальный период действия (1 ч) температуры 10°C (рис. 3б). В дальнейшем она в течение всего холодого воздействия сохранялась у закаленных растений на уровне, близком к исходному. Активность ингибиторов трипсина в листьях огурца повышалась через 1 ч и 2 суток действия холода, а затем с момента выхода холодоустойчивости на постоянный уровень — заметно снижалась (рис. 3в).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты показали, что динамика формирования устойчивости у холодостойкого и теплолюбивого видов растений под влиянием температуры, близкой к оптимальной для их закаливания, существенным образом зависела от видовых особенностей объекта. Так, у пшеницы увеличение холодоустойчивости происходило уже в течение первого часа закаливания, тогда как у огурца — через 8 ч от его начала. Помимо этого, скорость и величина прироста устойчивости у холодостойкой пшеницы были существенно выше, чем у теплолюбивого огурца.

Важно, что проведенные исследования выявили определенные особенности и в динамике активности протеолитических ферментов в процессе холодовой адаптации пшеницы и огурца. В частности, в начальный период действия холода у обоих объектов было отмечено увеличение амидазной активности, в то время как при достижении максимума холодоустойчивости активность указанных ферментов снижалась по сравнению с исходным уровнем.

В отличие от этого, повышенный уровень активности цистеиновых протеиназ наблюдался у пшеницы на протяжении всего процесса закаливания, что, вероятнее всего, свидетельствует об их участии как в процессах, связанных с ростом холодоустойчивости растений, так и с поддержанием ее на повышенном уровне. У огурца, напротив, повышение активности этих ферментов было отмечено только в начальной фазе закаливания, когда устойчивость еще не изменялась, а ее заметный рост наблюдался лишь спустя несколько часов. По-видимому, цистеиновые протеиназы участвуют только в ответных реакциях растений огурца, предшествующих росту устойчивости.

Попутно укажем, что увеличение активности различных групп протеиназ в растениях происходит не только под влиянием низкой закаливающей температуры, но и в результате воздействия ряда других стресс-факторов абиотической природы. Например, значительные изменения в активности цистеиновых протеиназ наблюдали у растений пшеницы при действии высокой температуры (40–42°C) [11] и под влиянием обезвоживания [12]. Тепловой стресс также вызывал увеличение активности сериновых протеиназ в корнях проростков пшеницы [13]. При засолении почвы увеличивается активность кислых и щелочных протеиназ у растений *Bruguiera palviflora* [14], а в период водного дефицита — активность сериновых [15] и аспартильных протеиназ [16] у фасоли и АТФ-зависимых протеиназ у чувствительных к засухе сортов пшеницы [17].

В целом, полученные нами результаты соответствуют представлениям о том, что те или иные отклонения от нормальных условий жизнедея-

тельности растений сопровождаются, наряду с другими изменениями, усилением протеолитических процессов [4, с. 191], один из механизмов которого связан с изменением проницаемости тонопласта и выходом в цитозоль протеолитических ферментов, которыми богата вакуоль [18]. Вероятно, контролируя концентрацию белков и липидов, амидазы и цистеиновые протеиназы участвуют в модификации и устранении биополимеров, уже не выполняющих (или выполняющих не в полной мере) необходимые организму функции, а также обеспечивают клетку мономерными субстратами для синтеза стрессовых (шоковых) белков, которые, как показано многими авторами [2, с. 27], играют важную роль в формировании повышенной холодоустойчивости клеток.

Отмеченное нами в процессе повышения устойчивости усиление активности ингибиторов трипсина, которое происходит на фоне снижения активности трипсиноподобных протеиназ (на заключительном этапе адаптации), очевидно, вызвано их способностью обратимо связывать ферменты и переводить их в неактивное состояние. Например, аккумуляция ингибиторов протеиназ зафиксирована при механическом повреждении и засолении томата [19]. Белок, относящийся к семейству ингибиторов Кунитца, синтезируется в ответ на действие водного стресса и засоления у рапса [20]. В клетках сои вызываемое окислительным стрессом увеличение активности ингибиторов цистеиновых протеиназ подавляет активность последних и блокирует, тем самым, программируемую гибель клеток [21]. Следовательно, выступая в качестве регуляторов активности протеиназ, ингибиторы протеолитических ферментов предотвращают преждевременный распад вновь синтезированных белков, тем самым способствуя формированию и поддержанию повышенной устойчивости.

Вместе с тем, обнаруженное нами одновременное возрастание активности протеолитических ферментов и увеличение активности ингибиторов протеиназ в начальный период холодового воздействия можно объяснить тем, что в стрессовых условиях функции ингибиторов протеиназ у растений не ограничиваются их способностью подавлять активность протеолитических ферментов [22]. Например, действие ингибиторов протеиназ может быть связано с их ферментативной активностью, а также со стабилизирующим влиянием на глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу [22].

Таким образом, полученные нами результаты и анализ литературы позволяют заключить, что изменение протеолитической активности является одним из механизмов, участвующих в процессе адаптации растений к неблагоприятным факторам среды. В частности, формирование повышенной устойчивости у холодостойкого (пшени-

ца) и теплолюбивого (огурец) видов растений под влиянием низкотемпературного закалывания сопровождается увеличением активности цистеиновых протеиназ, амидаз и ингибиторов трипсина, которое предшествует росту их устойчивости. При этом наиболее значительные и четко фиксируемые изменения в активности протеиназ и ингибиторов трипсина происходили у холодостойкой пшеницы. Очевидно, возрастающая активность протеолитических ферментов в начальный период холодого воздействия обуславливает распад белков в клетках растений и, вероятно, протеиназы, участвуя в модификации белков и пептидов, контролируют концентрацию биополимеров, необходимых для жизнедеятельности растений в новых температурных условиях. Усиление активности ингибиторов протеиназ, регулирующих активность ферментов, в свою очередь, предотвращает преждевременный распад белков, синтезированных *de novo*, тем самым способствуя поддержанию повышенного уровня холодоустойчивости.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 10-04-00650а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Титов А.Ф., Акимова Т.В., Таланова В.В., Топчиева Л.В.* Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. М.: Наука, 2006. 143 с.
2. *Трунова Т.И.* Растение и низкотемпературный стресс. 64-е Тимирязевское чтение. М.: Наука, 2007. Т. 64. 54 с.
3. *Колесниченко А.В., Войников В.К.* Белки низкотемпературного стресса у растений. Иркутск: Арт-пресс, 2003. 196 с.
4. *Тарчевский И.А.* Метаболизм растений при стрессе. Казань: Фэн, 2001. 448 с.
5. *Мосолов В.В., Валуева Т.А.* Ингибиторы протеиназ в биотехнологии растений (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. С. 261–269.
6. *Балагурова Н.И., Дроздов С.Н., Хилков Н.И.* Метод определения устойчивости растительных тканей к замораживанию. Петрозаводск: Кар. ф-л АН СССР, 1982. 6 с.
7. *Bradford M.M.* Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein–Dye Binding // *Ann. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
8. *Erlanger D.F., Kokowski N., Cohen W.* Proteinases Activity in Biological Substrates // *Arch. Biochem. Biophys.* 1961. V. 95. P. 271–278.
9. *Sgarbieri V.C., Gupte S.M., Kramer D.E., Whitaker J.R.* Ficus Enzymes. I. Separation of the Proteolytic Enzymes of *Ficus carica* and *Ficus glabrata* Latexes // *J. Biol. Chem.* 1964. V. 239. P. 2170–2177.
10. *Morichara K., Oka T., Tsuzuki H.* Proteases Activity // *Biochem. Biophys. Acta.* 1967. V. 139. P. 382–397.
11. *Александрова И.Ф., Веселов А.П., Ефременко Ю.Р.* Протеолитическая активность прорастающих семян пшеницы при тепловом стрессе // Физиология растений. 1999. Т. 46. С. 223–225.
12. *Martinez D.E., Bartoli C.G., Grbic V., Guamet J.J.* Vacuolar Cysteine Proteases of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Are Common to Leaf Senescence Induced by Different Factors // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. P. 1099–1107.
13. *Веселов А.П.* Гормональная и антиоксидантные системы при ответе растения на тепловой шок: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. М.: ИФР РАН, 2001. 39 с.
14. *Parida A.K., Das A.B., Mittra B., Mohanty P.* Salt-Stress Induced Alterations in Protein Profile and Protease Activity in the Mangrove *Bruguiera parviflora* // *Z. Naturforsch.* 2004. V. 59. P. 408–414.
15. *Heing B., Ugrinovic K., Sustar-Vozlic J., Kidric M.* Different Classes of Proteases Are Involved in the Response to Drought of *Phaseolus vulgaris* L. Cultivars Differing in Sensitivity // *J. Plant Physiol.* 2004. V. 161. P. 519–530.
16. *Cruz de Cavalho M.H., d'Arcy-Lameta A., Roy-Macaulley H., Gareil M., El Maarouf H., Pham-Thi A.-T., Zuilly-Fodil Y.* Aspartic Protease in Leaves of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and Cowpea (*Vigna unguiculata* L.): Enzymatic Activity, Gene Expression, and Relation to Drought Susceptibility // *FEBS Lett.* 2001. V. 492. P. 242–246.
17. *Wisniewski K., Zagdanska B.* Genotype-Dependent Proteolytic Response of Spring Wheat to Water Deficiency // *J. Exp. Bot.* 2001. V. 52. P. 1455–1463.
18. *Блехман Г.И., Шеламова Н.А.* Синтез и распад макромолекул в условиях стресса // Успехи соврем. биологии. 1992. Т. 112. С. 281–297.
19. *Dombrowski J.E.* Salt Stress Activation of Wound-Related Genes in Tomato Plants // *Plant Physiol.* 2003. V. 132. P. 2098–2107.
20. *Dowling W.L., Mauxion F., Fauvarque M.O., Reviron M.P., Vienne D., Vartanian N., Giraudat J.A.* *Brassica napus* Transcript Encoding a Protein Related to the Kunitz Protease Inhibitor Family Accumulates upon Water Stress in Leaves, Not in Seeds // *Plant J.* 1992. V. 2. P. 658–693.
21. *Solomon M., Belenhi B., Delledonne M., Menachem E., Levine A.* The Involvement of Cysteine Proteases and Protease Inhibitor Genes in the Regulation of Programmed Cell Death // *Plant Cell.* 1999. V. 11. P. 431–443.
22. *Мосолов В.В., Григорьева Л.И., Валуева Т.А.* Ингибиторы протеиназ из растений как полифункциональные белки (обзор) // Прикл. биохимия и микробиол. 2001. Т. 37. С. 643–650.