

УДК 581.1

## ВЛИЯНИЕ АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ЦИСТЕИНОВОЙ ПРОТЕИНАЗЫ И ЕЕ ИНГИБИТОРА ПРИ ХОЛОДОВОЙ АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ

© 2012 г. В. В. Таланова, А. Ф. Титов, Л. В. Топчиева, С. А. Фролова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии  
Карельского научного центра РАН, Петрозаводск

Поступила в редакцию 30.06.2011 г.

Изучено влияние экзогенной АБК на экспрессию генов, кодирующих цистеиновую протеиназу (СР) и ее ингибитор цистатин (WC3), в листьях проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), находящихся 7 суток в условиях закалывающей температуры (5°C). Холодоустойчивость проростков оценивали по температуре, вызывающей гибель 50% палисадных клеток (ЛТ<sub>50</sub>), после 5-минутного промораживания при температурах от –5°C до –10°C. В начальный период действия низкой температуры, когда холодоустойчивость закаленных проростков заметно возрастала, отмечали усиление экспрессии генов СР и WC3, а при достижении максимальной устойчивости содержание в листьях транскриптов этих генов возвращалось к исходному уровню. Под влиянием экзогенной АБК уже через 1–5 ч от начала действия низкой температуры уровень экспрессии гена СР повышался в десятки раз, затем происходило его резкое снижение, но и в дальнейшем накопление транскриптов этого гена поддерживалось на высоком уровне. Экспрессия гена WC3 у обработанных АБК проростков в начальный период действия холода снижалась, однако через 3–7 суток заметно возрастала. Сделан вывод, что формирование повышенной холодоустойчивости у пшеницы связано с регулируемым АБК изменением экспрессии генов СР и WC3.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum* – холодное закалывание – экспрессия генов – цистеиновая протеиназа – ингибитор цистеиновой протеиназы (цистатин) – АБК

### ВВЕДЕНИЕ

Абсцизовая кислота (АБК), которую часто называют “гормоном стресса”, играет важную роль в защитно-приспособительных реакциях растений, обеспечивающих их выживание в неблагоприятных условиях, включая низкие температуры [1]. Помимо влияния на многие физиолого-биохимические процессы, АБК способна регулировать экспрессию ряда *COR*-генов (от *cold regulated*), в том числе *RAB* (от *ABA-responsive*) и *DHN* (от *dehydrins*) семейства *LEA* (от *late embryogenesis abundant*) и ряд других [1–3], продукты которых непосредственно участвуют в формировании повышенной устойчивости растений к низким температурам [1]. При этом в АБК-зависимые пути трансдукции низкотемпературного сигнала и регуляции экспрессии *COR*-генов вовлечены транскрипционные факторы семейств bZIP и MYB/MYC [4–6].

С другой стороны, известно, что одной из неспецифических реакций растений на действие стресс-факторов разной природы выступает усиление процессов биодegradации, среди которых особое место занимает протеолиз – ферментативный гидролиз белков и пептидов, катализируе-

мый протеолитическими ферментами [7]. В этом случае протеолитические ферменты, участвуя в процессах дегradации белковых молекул, препятствующей накоплению поврежденных белков и пептидов в клетках, а также в регуляции многих физиолого-биохимических процессов [8, 9], играют важную роль в реакциях растений на действие неблагоприятных температур. Учитывая, что действие низких температур на растения сопровождается значительными изменениями в активности протеолитических ферментов [10], логично ожидать, что в этом случае могут происходить определенные изменения в экспрессии кодирующих их генов. Однако такого рода данные носят фрагментарный характер, а имеющиеся единичные сведения о влиянии АБК на экспрессию протеиназ и их ингибиторов противоречивы [11–13].

Исходя из сказанного выше, целью нашей работы явилось изучение влияния экзогенной АБК на экспрессию генов, кодирующих цистеиновую протеиназу и ее ингибитор цистатин, у проростков пшеницы в условиях действия низкой закалывающей температуры.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на проростках озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39, которые в течение 7 суток выращивали на

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

Праймеры для проведения ПЦР в режиме реального времени

Ген	Прямой и обратный праймеры	Нуклеотидная последовательность праймера 5'... 3'	Температура отжига, °С	Номер доступа в базе данных NCBI
<i>CP</i>	прямой	CACCCAGACAAGCAACCA	60	AY841792
	обратный	GCGTCCCTGTAGGTCT		
<i>WC3</i>	прямой	CGTCGTGCCGTTACTC	56	ABO38394
	обратный	AGTCCTTGATGCCTCCC		
<i>Actin</i>	прямой	GGGACCTCACGGATAATCTAATG	56–60	AB181991
	обратный	AACCTCCACTGAGAACAACATTAC		

питательном растворе Кнопа с добавлением микроэлементов (рН 6.2) в камере искусственного климата при температуре воздуха 22°C, его относительной влажности 60–70%, освещенности 10 клк, фотопериоде 14 ч, а затем в течение 7 суток подвергали воздействию закаливающей температуры 5°C, сохраняя прочие условия неизменными. Часть проростков за сутки до начала закаливания помешали на 0.1 мМ раствор АБК (“ICN”, США).

Холодоустойчивость проростков оценивали по температуре, вызывающей гибель 50% палисадных клеток паренхимы высечек из листа (ЛТ<sub>50</sub>), после 5-минутного тестирующего промораживания в термоэлектрическом микрохолодильнике ТЖР–02/–20 (“Интерм”, Россия) при ряде температур (от –5°C до –10°C) с интервалом 0.4°C [14]. Заданную температуру поддерживали с точностью ±0.1°C. Жизнеспособность клеток оценивали визуально по деструкции хлоропластов и коагуляции цитоплазмы с помощью светового микроскопа Микмед-2 (“ЛОМО”, Россия) с объективом 40×.

Для выделения РНК навеску листьев пшеницы (50 мг) растирали в жидком азоте. Тотальную РНК выделяли с использованием набора Yellow Solve (“Clonogene”). Качество и количество выделенной РНК оценивали с помощью капиллярного электрофореза на микрочипах (Exregion, “BioRad”, США). Для удаления остатков ДНК препарат РНК обрабатывали ДНКазой (10 ед./мл, “Силекс”, Россия), свободной от РНКазы. Уровень экспрессии генов оценивали методом ПЦР в режиме реального времени. В качестве флуорофора для обнаружения продуктов использовали интеркалирующий краситель SYBR Green. Амплификацию проводили в приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 (“BioRad”), используя наборы для амплификации, совмещенные с обратной транскрипцией. Смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала 100 нг тотальной РНК, 0.5 мкл обратной транскриптазы iScript MMLV, 12.5 мкл реакционной смеси 2xSYBR Green RT-PCR Reaction Mix, по 0.8 мкл прямого и обратного праймеров (10 мкМ), 9.5 мкл воды, свободной от нуклеаз. Для ПЦР в режиме реального времени использовали праймеры (“Синтол”, Россия), представленные в таблице. В качестве референсного гена использовали ген актина.

Протокол ПЦР: синтез кДНК – 10 мин при 50°C; инактивация обратной транскриптазы – 5 мин при 95°C; циклы ПЦР: 10 с при 95°C, 30 с при 56–60°C (в зависимости от температуры отжига, оптимальной для каждой пары праймеров), 30 с при 72°C (40 циклов). Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР-фрагментов. Уровень экспрессии генов растений, подвергнутых низкотемпературному воздействию, был нормализован по уровню экспрессии генов контрольного варианта (не подвергнутых низкотемпературному воздействию).

Для определения активности цистеиновых протеиназ листья измельчали в ступке с водой при 4°C. Полученный гомогенат отжимали и центрифугировали при 6000 g. Содержащиеся в супернатанте белки осаждали сульфатом аммония при 80% насыщении. Полученный осадок отделяли центрифугированием при 12000 g в течение 30 мин при 4°C. Концентрацию белка определяли по Bradford [15], используя в качестве контроля бычий сывороточный альбумин. Активность цистеиновых протеиназ определяли по модифицированному методу Kunitz [16]. В кювету с раствором фермента и активирующими добавками (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 (“Спектр”, Россия). За единицу протеолитической активности принимали то количество фермента, которое в данных условиях определения активности приводит к увеличению оптической плотности при 280 нм на 0.1 ед. в течение 1 мин гидролиза.

На рисунках приведены средние арифметические значения из двух независимых опытов, проведенных в 2–6-кратной биологической повторности, и их стандартные отклонения. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Microsoft Excel, достоверность различий между вариантами оценивали по *t*-критерию Стьюдента. В статье обсуждаются величины, достоверные при  $P \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Под влиянием пониженной температуры (5°C) холодоустойчивость проростков пшеницы воз-

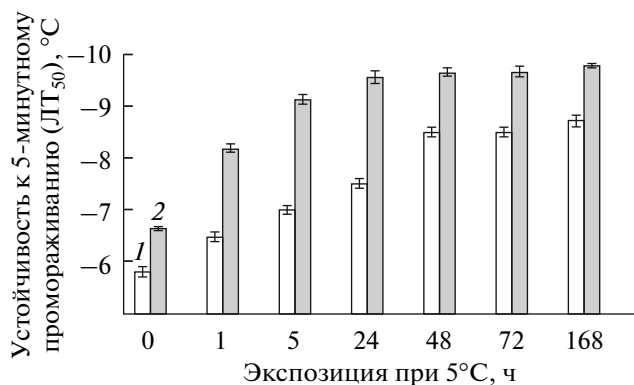


Рис. 1. Влияние экзогенной АБК на холодоустойчивость проростков пшеницы после закаливания при температуре 5°C.

1 – 5°C; 2 – 5°C + АБК.

растала уже через 1–5 ч от начала охлаждения, на вторые–третьи сутки она достигала максимума и в дальнейшем не изменялась (рис. 1). Обработка проростков экзогенной АБК индуцировала увеличение их холодоустойчивости еще до начала закаливания. При переносе проростков, обработанных АБК, в условия пониженной температуры уже в течение первых часов отмечали значительный дополнительный прирост устойчивости, через 1 сутки ее уровень достигал максимального значения и в дальнейшем практически не изменялся до конца эксперимента (7 суток).

Наряду с повышением холодоустойчивости в листьях проростков под влиянием закаливающей температуры происходили значительные изменения в экспрессии гена *CP*, кодирующего цистеиновую протеиназу. Так, в начальный период действия низкой температуры (первые 1–5 ч) в листьях пшеницы отмечали усиление (в 4.3–4.4 раза) экспрессии гена *CP* (рис. 2а). При более продолжительном воздействии холода (1–3 суток) содержание мРНК гена *CP* постепенно снижалось, а через 7 суток возвращалось к исходному уровню. При нормальной температуре (22°C) обработка проростков АБК не влияла на экспрессию гена *CP*: в ее присутствии уровень мРНК гена *CP* перед началом действия холода составил  $2.0 \pm 0.2$  мкг/г сырого веса, в то время как в контроле –  $1.9 \pm 0.2$  мкг/г сырого веса. При пониженной температуре (5°C) под влиянием экзогенной АБК происходило резкое усиление накопления транскриптов гена *CP* (в 25–61 раз), причем максимум был отмечен через 5 ч, затем происходило снижение уровня, но и в конце опыта уровень транскриптов значительно (в 11.6–17.3 раз) превышал исходные значения (рис. 2б). Существенно, что в течение всего периода закаливания уровень транскрипции гена в листьях растений, обработанных АБК, был значительно выше, чем у растений, не подвергавшихся подобной обработке.

Необходимо отметить, что уже в начальный период (1–5 ч) действия температуры 5°C в ли-

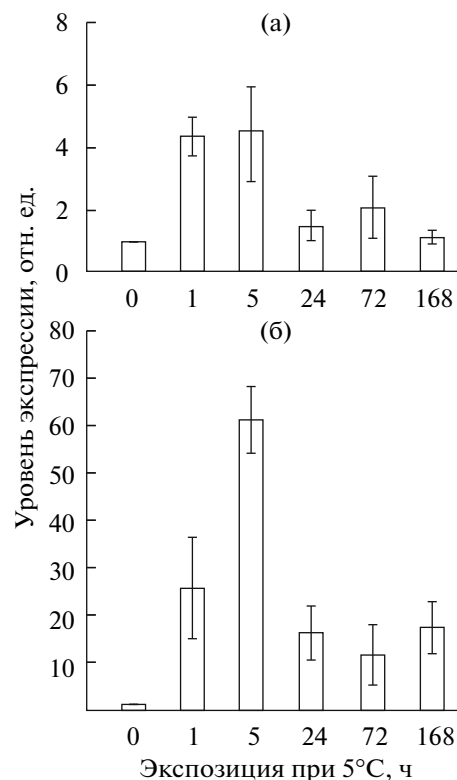
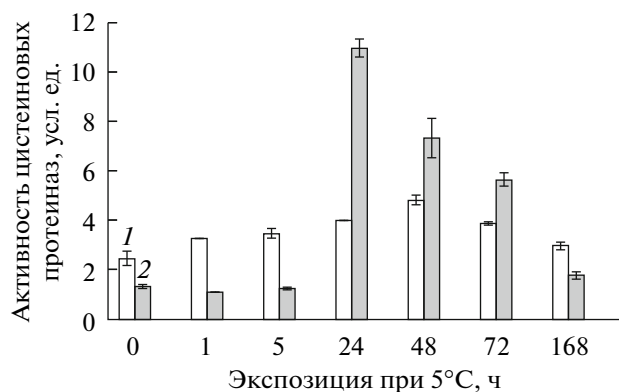


Рис. 2. Влияние экзогенной АБК на экспрессию гена *CP* в листьях проростков пшеницы после закаливания при температуре 5°C.

а – 5°C; б – 5°C + АБК. Здесь и на рис. 4 за единицу принят уровень экспрессии генов при температуре 22°C.

стьях проростков пшеницы увеличивалась активность цистеиновых протеиназ. Она достигала максимума (в 1.9 раза выше исходного уровня) через 2 суток, затем происходило некоторое ее снижение, однако и к концу периода закаливания, когда холодоустойчивость была наибольшей, активность сохранялась на повышенном уровне (рис. 3). Под влиянием экзогенной АБК в первые часы действия охлаждения активность цистеиновых протеиназ снижалась на 66–70%, но через 1 сутки резко увеличивалась (в 9.2 раза), но затем снова постепенно снижалась до исходного уровня.

Содержание транскриптов гена *WC3*, кодирующего цистатин (ингибитор цистеиновой протеиназы), увеличивалось через 1 ч воздействия температуры 5°C, достигая своего максимального значения (в 3 раза выше исходного уровня) через 5 ч холодного воздействия, а через 1 сутки снижалось практически до исходного уровня и в дальнейшем не изменялось (рис. 4а). Суточная предобработка проростков АБК до начала действия низкой температуры вызывала повышение содержания мРНК гена *WC3* в 15.8 раз. При дальнейшем холодном воздействии экзогенная АБК вызывала значительное повышение (в 8.2 раза)



**Рис. 3.** Влияние экзогенной АБК на активность цистеиновых протеиназ в листьях проростков пшеницы после закаливания при температуре 5°C.

1 – 5°C; 2 – 5°C + АБК.

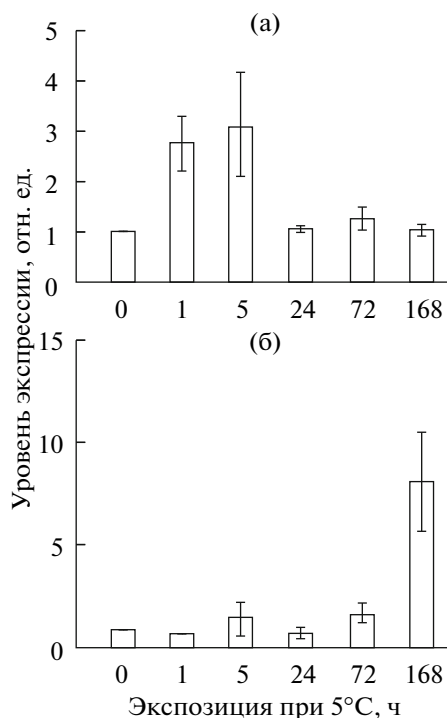
уровня экспрессии этого гена только на заключительном этапе этого воздействия (рис. 4б).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования позволили установить, что в условиях действия низкой закалывающей температуры происходило достаточно быстрое и значительное увеличение уровня экспрессии гена *CP* цистеиновой протеиназы в листьях проростков пшеницы, которое коррелировало с ростом холодоустойчивости. Однако экспрессия гена *CP* носила транзитный характер: ее уровень снижался, когда устойчивость достигала максимальных значений. Отметим, что при действии низких температур происходили изменения экспрессии ряда генов цистеиновых протеиназ и у других растений. Так, под влиянием пониженной температуры было обнаружено усиление накопления мРНК генов *CatB* у растений ячменя [13], *C14* и *C17* у томата [17] и *A1494* у арабидопсиса [12]. Следовательно, повышение устойчивости растений в начальный период действия холода связано с усилением экспрессии гена *CP*, которое направлено на увеличение активности цистеиновых протеиназ, участвующих в деградации и модификации поврежденных белков, а также белков, уже не выполняющих свои функции в изменившихся условиях.

В начальный период действия низкой закалывающей температуры в листьях растений пшеницы происходило быстрое транзитное повышение уровня эндогенной АБК [18, с. 57]. Это позволяет предполагать возможность существования зависимости между экспрессией гена *CP* цистеиновой протеиназы от АБК в процессе повышения холодоустойчивости.

Как показали полученные результаты, обработка АБК в нормальных условиях (22°C) приводила к возрастанию холодоустойчивости растений пшеницы, но не вызывала усиления экспрессии гена *CP* и повышения активности цистеиновых протеи-



**Рис. 4.** Влияние экзогенной АБК на экспрессию гена *W3* в листьях проростков пшеницы после закаливания при температуре 5°C.

а – 5°C; б – 5°C + АБК.

наз. Отметим, что АБК также не влияла на экспрессию гена *Cyp15a* цистеиновой протеиназы у растений гороха [19] и гена *CatB* катепсин-В-подобной цистеиновой протеиназы у ячменя [13]. Следовательно, положительное действие экзогенной АБК на устойчивость растений пшеницы до начала холодного воздействия не связано с функционированием цистеиновых протеиназ, а определяется иными механизмами.

В отличие от этого, в условиях действия холода АБК не только повышала холодоустойчивость растений пшеницы, но и усиливала экспрессию гена *CP* (начиная с 1–5 ч) и увеличивала активность цистеиновых протеиназ (через 1 сутки). Таким образом, полученные данные указывают на то, что возрастание холодоустойчивости пшеницы при действии низкой закалывающей температуры связано с регулируемым АБК усилением экспрессии гена *CP*.

Отметим, что повышение экспрессии гена *CP* в присутствии АБК не всегда коррелирует с изменением общей активности цистеиновых протеиназ. Например, значительное увеличение экспрессии гена, наблюдаемое уже через 1 ч холодного воздействия, не приводило к повышению активности фермента даже через 5 ч от начала эксперимента. Возможно, это связано с тем, что в повышении общей активности цистеиновых протеаз наряду с протеиназой *CP* участвует довольно много других ферментов (например, в базе данных пептидаз MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) присут-

ствуют 13 цистеиновых протеиназ пшеницы). Однако в настоящее время конкретный вклад протеиназы СР в общую активность цистеиновых протеиназ пока еще не известен.

Мы установили, что только в начальный период (1–5 ч) холодового закаливания пшеницы увеличение устойчивости сопровождалось повышением накопления мРНК гена *WC3* ингибитора цистеиновых протеиназ цистатина. Усиление экспрессии этого гена в условиях низкой температуры, обнаруженное нами в листьях пшеницы, а также другими исследователями у каштана [20], указывает на его участие в повышении холодоустойчивости растений. Ингибитор протеаз *WC3*, противодействуя повышению активности протеаз, вероятно, защищает жизненно важные структуры клетки от возможного излишнего протеолиза как в условиях нормальных температур, так и при действии холода. Вместе с тем, предполагается, что в стрессовых условиях функции ингибиторов протеиназ у растений не ограничиваются способностью подавлять активность протеолитических ферментов, а связаны с их ферментативной активностью, а также с влиянием на активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [8].

Необходимо отметить, что экзогенная АБК в условиях нормальной температуры (22°C) вызывала усиление экспрессии гена цистатина *WC3*, что препятствует избыточной активности цистеиновых протеиназ. При последующем холодовом закаливании в присутствии АБК происходило снижение экспрессии этого гена по сравнению с исходным уровнем (до температурного воздействия), что коррелировало с усилением экспрессии гена цистеиновой протеазы.

В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что повышение холодоустойчивости растений озимой пшеницы под влиянием экзогенной АБК в условиях действия на них низкой закалывающей температуры, помимо многих уже известных механизмов, сопряжено с изменением экспрессии генов *СР* и *WC3* и временным повышением активности протеолитических ферментов.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gusta L.V., Trischuk R., Weiser C.J.* Plant Cold Acclimation: The Role of Abscisic Acid // *J. Plant Growth Regul.* 2005. V. 24. P. 308–318.
2. *Knight H., Zarka D.G., Okamoto H., Thomashow M.F., Knight M.R.* Abscisic Acid Induces *CBF* Gene Transcription and Subsequent Induction of Cold-Regulated Genes via the CRT Promoter Element // *Plant Physiol.* 2004. V. 135. P. 1710–1717.
3. *Sun X., Hu C., Tan Q., Liu H.* Effects of Molybdenum on Expression of Cold-Responsive Genes in Abscisic Acid (ABA)-Dependent Pathways in Winter Wheat under Low-Temperature Stress // *Ann. Bot.* 2009. V. 104. P. 345–356.
4. *Chrisyemann A., Moes D., Himmelbach A., Yang Y., Tang Y., Grill E.* Integration of Abscisic Acid Signalling into Plant Responses // *Plant Biol.* 2006. V. 8. P. 314–325.
5. *Agarwal P.K., Jha B.* Transcription Factors in Plants and ABA Dependent and Independent Abiotic Stress Signaling // *Biol. Plant.* 2010. V. 54. P. 201–212.
6. *Gao S.-Q., Chen M., Xu Z.-S., Zhan C.-P., Li L., Xu H., Tan Y., Ma Y.-Z.* The Soybean *GmbZIP1* Transcription Factor Enhances Multiple Abiotic Stress Tolerance in Transgenic Plants // *Plant Mol. Biol.* 2011. V. 75. P. 537–553.
7. *Блехман Г.И., Шеламова Н.А.* Синтез и распад макромолекул в условиях стресса // *Успехи соврем. биологии.* 1992. Т. 112. С. 281–297.
8. *Мосолов В.В., Григорьева Л.И., Валуева Т.А.* Ингибиторы протеиназ из растений как полифункциональные белки (Обзор) // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2001. Т. 37. С. 643–650.
9. *Валуева Т.А., Мосолов В.В.* Роль ингибиторов протеолитических ферментов в защите растений // *Успехи биол. химии.* 2002. Т. 42. С. 193–216.
10. *Фролова С.А., Тумов А.Ф., Таланова В.В.* Влияние низкотемпературного закаливания на активность протеолитических ферментов и их ингибиторов в листьях проростков пшеницы и огурца // *Физиология растений.* 2011. Т. 58. С. 208–212.
11. *Downing 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. 685–693.
12. *Williams J., Bulman M., Huttly A., Phillips A., Neill S.* Characterization of a cDNA from *Arabidopsis thaliana* Encoding a Potential Thiol Protease Whose Expression Is Induced Independently by Wilting and Abscisic Acid // *Plant Mol. Biol.* 1994. V. 25. P. 259–270.
13. *Martinez M., Rubio-Somoza I., Carbonero P., Diaz I.* A Catepsine B-Like Protease Gene from *Hordeum vulgare* (Gene *CatB*) Induced by GA in Aleurone Cells Is under Circadian Control in Leaves // *J. Exp. Bot.* 2003. V. 54. P. 951–959.
14. *Дроздов С.Н., Курец В.К., Будыкина Н.П., Балагурова Н.И.* Определение устойчивости растений к заморозкам // *Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды. Л.: изд-во ВИР, 1976. С. 222–228.*
15. *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.
16. *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* Latices // *J. Biol. Chem.* 1964. V. 239. P. 2170–2177.
17. *Schaffer M.A., Fisher R.L.* Analysis of mRNA That Accumulates in Response to Low Temperature Identifies a Thiol Protease in Tomato // *Plant Physiol.* 1988. V. 87. P. 431–436.
18. *Тумов А.Ф., Таланова В.В.* Устойчивость растений и фитогормоны. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2009. 206 с.
19. *Jones J.T., Mullet J.E.* A Salt- and Dehydration-Inducible Pea Gene, *Cyp15a*, Encoded a Cell-Wall Protein with Sequence Similarity to Cysteine Proteases // *Plant Mol. Biol.* 1995. V. 28. P. 1055–1065.
20. *Pernas M., Sanches-Monge R., Salcedo G.* Biotic and Abiotic Stress Induce Cystatine Expression in Chestnut // *FEBS Lett.* 2000. V. 467. P. 206–210.