

УДК 581.1.

## **ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ПОВРЕЖДАЮЩИХ И ЗАКАЛИВАЮЩИХ ТЕМПЕРАТУР НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНАЗ В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА**

**А. Ф. Титов, С. А. Фролова, В. В. Таланова**

*Институт биологии Карельского научного центра РАН*

В листьях проростков огурца (*Cucumis sativus* L.), подвергнутых действию низких повреждающих и закаливающих температур, изучали активность сериновых протеиназ (амидаз), цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина. Показано, что под влиянием повреждающей температуры (5 °С) происходит быстрое и значительное увеличение активности амидаз, цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина. При действии закаливающей температуры (10 °С) также отмечено некоторое усиление активности протеиназ и ингибиторов, которое предшествует во времени повышению холодоустойчивости проростков. Однако при достижении максимальной устойчивости активность амидаз и ингибиторов трипсина снижается, в то время как активность цистеиновых протеиназ сохраняется на достигнутом уровне в течение всего процесса закаливания растений. Полученные результаты свидетельствуют об участии цистеиновых протеиназ, амидаз и ингибиторов трипсина в защитно-приспособительных реакциях растений огурца на действие как повреждающих, так и закаливающих температур.

**Ключевые слова:** *Cucumis sativus* L., амидазы, цистеиновые протеиназы, ингибиторы трипсина, низкие закаливающие и повреждающие температуры.

### **A. F. Titov, S. A. Frolova, V. V. Talanova. EFFECT OF LOW DAMAGING AND HARDENING TEMPERATURES ON THE ACTIVITY OF PROTEOLYTIC ENZYMES AND PROTEINASE INHIBITORS IN CUCUMBER LEAVES**

The activity of serine proteinases (amidases), cysteine proteinases and trypsin inhibitors was studied in the leaves of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plantlets exposed to low damaging and hardening temperatures. Exposure to a damaging temperature (5 °C) causes rapid and significant rise in the activity of amidases, cysteine proteinases and trypsin inhibitors. During exposure to a hardening temperature (10 °C) we also noted some intensification of the proteinase and inhibitor activity, preceding the rise in the plants' cold resistance. After maximum resistance had been reached however, the activity of amidases and trypsin inhibitors decreases, whereas cysteine proteinase activity remains at the same high level throughout the hardening process. The results suggest cysteine proteinases, amidases and trypsin inhibitors participate in the protective and adaptive response of cucumber plants to both damaging and hardening temperatures.

**Key words:** *Cucumis sativus* L., amidases, cysteine proteinases, trypsin inhibitors, low hardening and damaging temperatures.

## Введение

Как известно, в защитно-приспособительные реакции растений на действие неблагоприятных факторов внешней среды вовлечены многие физиологические и биохимические процессы [Тарчевский, 2001; Чиркова, 2002; Войников и др., 2004; Титов и др., 2006; Трунова, 2007]. Среди участников последних важную роль играют протеолитические ферменты, которые участвуют не только в деградации белковых молекул, но и в регуляции многих внутриклеточных процессов посредством реакций ограниченного протеолиза [Тарчевский, 2001]. Увеличение активности различных классов протеолитических ферментов отмечено при воздействии на растения биотических [Мосолов, Валуева, 2006; Домаш и др., 2008] и абиотических факторов, таких как тепловой стресс [Александрова и др., 1999], засоление [Parida et al., 2004; Домаш и др., 2008], водный дефицит [Cruz de Cavalho et al., 2001; Wisniewski, Zagdanska, 2001; Heing et al., 2004], тяжелые металлы [Домаш и др., 2008]. Что касается аккумуляции в растениях ингибиторов протеолитических ферментов, выступающих в качестве регуляторов активности протеиназ, то их защитная роль хорошо изучена только в отношении биотических факторов [Валуева, Мосолов, 2002; Мосолов, Валуева, 2005, 2008]. Участие же ингибиторов протеиназ в реакции растений на действие абиотических факторов изучено слабо, и имеются лишь единичные сведения, касающиеся засоления и водного стресса [Dowling et al., 1992; Dombrowski, 2003]. Роль протеолитических ферментов и ингибиторов протеиназ в реакции растений на действие низких повреждающих и закалывающих температур также почти не исследована, поэтому целью нашей работы стало изучение активности протеиназ и их ингибиторов в листьях проростков огурца, подвергнутых действию указанных температур.

## Материалы и методы

Эксперименты проводили с проростками огурца (*Cucumis sativus* L.) сорта Зозуля, выращенными в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе Кнопа в камере искусственного климата при температуре воздуха 25 °С, его относительной влажности 60–70 %, освещенности около 10 клк и фотопериоде 14 ч. По достижении недельного возраста проростки подвергали действию повреждающей (5 °С) или закалывающей (10 °С) температуры при неизменных прочих условиях.

Активность сериновых протеиназ (амидаз) определяли с помощью метода Эрлангера с

соавт. [Erlanger et al., 1961] с использованием синтетического субстрата – N<sub>α</sub>-бензоил-DL-аргинин-4-нитроанилида гидрохлорида (БАПА). Активность цистеиновых протеиназ определяли по модифицированному методу Кунитца [Sgarbieri et al., 1964]. Ингибиторную активность оценивали по подавлению активности протеолитических ферментов [Morichara et al., 1967]. Концентрацию белка определяли по Брэдфорду [Bradford, 1976], используя в качестве контроля бычий сывороточный альбумин.

На рисунках приведены средние арифметические значения по 2–3 независимым опытам, проведенным в 5–10-кратной биологической повторности, и их стандартные ошибки. В статье обсуждаются величины, достоверные при  $P \leq 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Установлено, что уже в первые минуты и часы действия повреждающей температуры 5 °С на проростки огурца в их листьях происходит значительное (в 2–2,5 раза) увеличение активности цистеиновых протеиназ и амидаз (рис. 1). Активность ингибиторов трипсина уже через 15 мин экспонирования проростков огурца при 5 °С также возросла в 2,5 раза, а в следующие 5 ч действия холода постепенно снижалась (рис. 1). Существенно, что под влиянием указанного низкотемпературного воздействия холодоустойчивость проростков огурца снижалась [Фролова, 2008].

В начальный период действия на проростки закалывающей (10 °С) температуры также происходило повышение активности протеолитических ферментов и ингибиторов трипсина, хотя амплитуда этих изменений была заметно меньше, чем в условиях холодного повреждения (рис. 1). Тем не менее увеличение активности амидаз отмечено в течение первого часа действия закалывающей температуры, а усиление активности цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина – через 0,5–5 ч от начала закалывания.

Необходимо подчеркнуть, что в период существенного повышения активности протеолитических ферментов (первые 5 ч действия температуры 10 °С) холодоустойчивость проростков еще не изменялась, а ее заметный рост начался только через 8 ч от начала температурного воздействия [Фролова, 2008]. Последующее действие температуры 10 °С вызывало дальнейшее возрастание устойчивости, которая достигала своего максимума на 4-е сутки закалывания. В связи с этим представляло интерес проследить характер изменения протеолитической активности в период повышения холодоустойчивости растений.

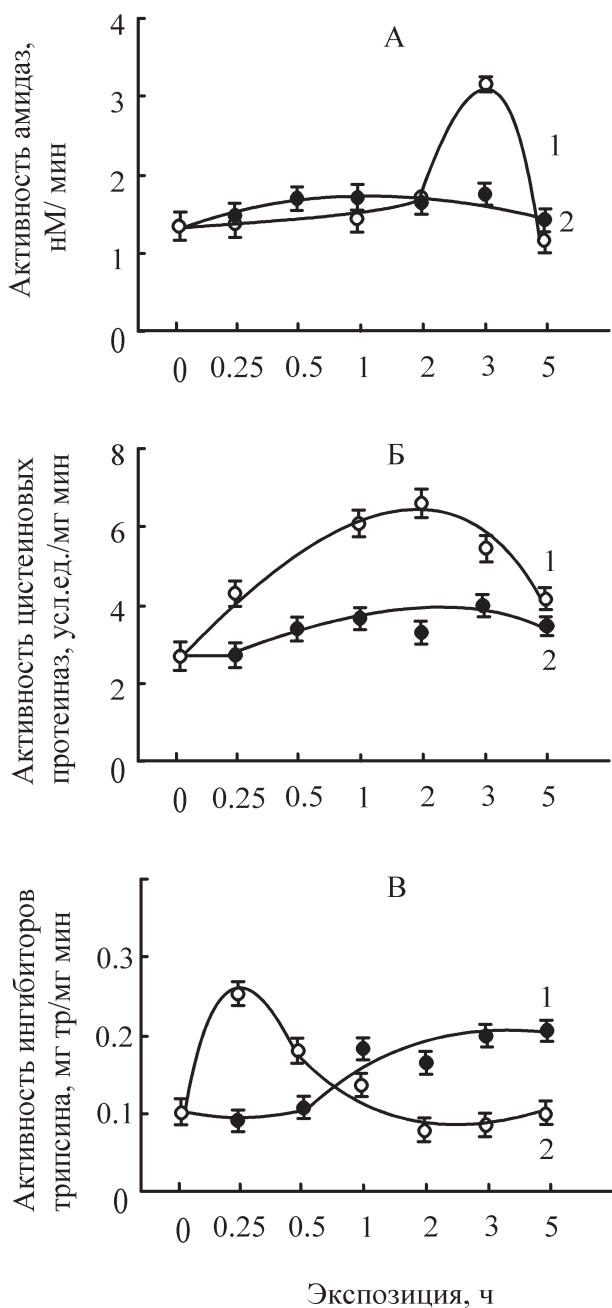


Рис. 1. Динамика активности амидаз (А), цистеиновых протеиназ (Б) и ингибиторов трипсина (В) в листьях проростков огурца в начальный период действия низкой повреждающей (5 °С) и закаливающей (10 °С) температуры:

1 – действие температуры 5 °С, 2 – действие температуры 10 °С

Установлено, что в условиях действия закаливающей температуры 10 °С активность цистеиновых протеиназ у огурца в течение 7 сут сохранялась на уровне, близком к исходному, т. е. характерному для проростков, не подвергавшихся холодovому закаливанию (рис. 2). Изменения активности амидаз и ингибиторов трипсина у проростков огурца в целом имели

сходную динамику: в течение первых суток закаливания их активность резко снижалась (в 1,5 раза – для амидаз и в 2 раза – для ингибиторов трипсина) (рис. 2). Еще через сутки протеолитическая активность возвращалась к исходным значениям (амидазы) или несколько превышала их (ингибиторы трипсина), а затем, до момента выхода устойчивости на постоянный уровень, активность амидаз и ингибиторов трипсина снижалась (рис. 2).

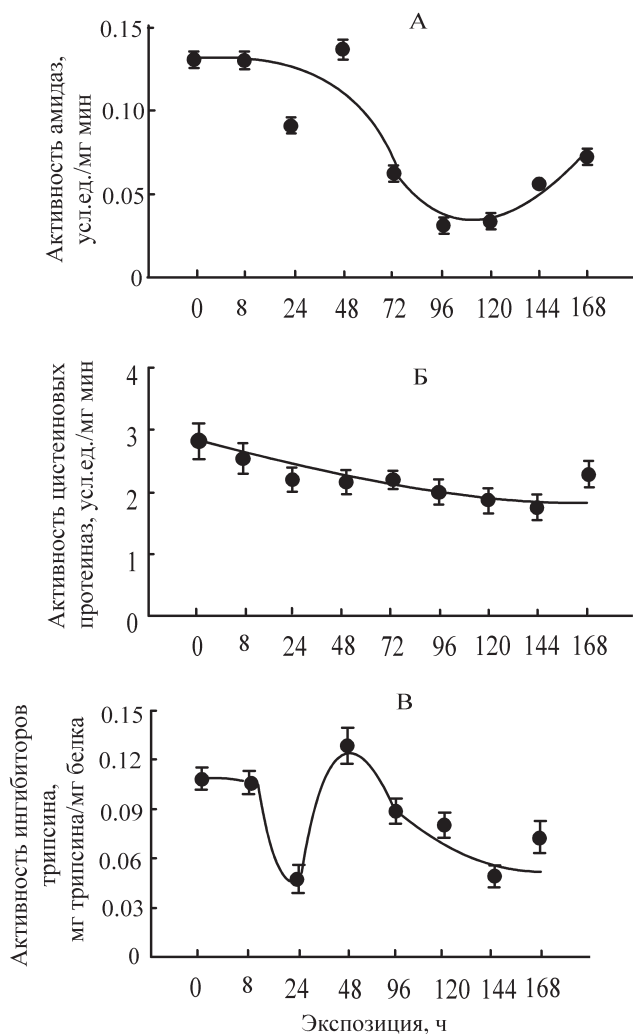


Рис. 2. Влияние закаливающей температуры (10 °С) на активность амидаз (А), цистеиновых протеиназ (Б) и ингибиторов трипсина (В) в листьях проростков огурца

Очевидно, что увеличение активности амидаз и цистеиновых протеиназ в листьях проростков огурца, отмеченное уже в первые минуты и часы действия повреждающей температуры (5 °С), свидетельствует о начавшихся деструктивных процессах, которые необходимо блокировать и обеспечить восстановление нарушенных или поврежденных структур и функций. Вероятно, именно на это и направлено наблюдаемое в

начальный период действия холода повышение активности ингибиторов протеиназ. Последующее увеличение активности протеиназ и снижение активности ингибиторов трипсина, уже не справляющихся в данных условиях с нарастающим влиянием протеолиза, сопровождаются снижением холодоустойчивости растений, нарушением различных физиолого-биохимических процессов и повреждением различных клеточных структур, которые в конечном итоге могут приводить к гибели клеток, тканей и организма в целом.

Проведенные исследования также выявили особенности изменения активности протеолитических ферментов в процессе холодовой адаптации (закаливания) проростков огурца. В частности, в начальный ее период отмечено возрастание активности амидаз, в то время как при достижении максимального уровня устойчивости она снижалась. В отличие от этого, стабильно высокий уровень активности цистеиновых протеиназ наблюдался на протяжении всего процесса закаливания, что, вероятнее всего, свидетельствует об их участии в процессах, связанных не только с ростом холодоустойчивости растений, но и с поддержанием ее на повышенном уровне. Отметим, что ранее значительное повышение активности цистеиновых протеиназ наблюдали при действии на растения пшеницы низкой [Фролова, Титов, 2008] и высокой [Александрова и др., 1999] закаливающих температур.

В целом полученные нами результаты свидетельствуют о том, что реакция растений на действие низких повреждающих и закаливающих температур связана с усилением протеолитических процессов. В частности, возрастающая активность амидаз и цистеиновых протеиназ в начальный период воздействия холода усиливает распад белков в клетках растений. Вероятно, контролируя концентрацию белков и пептидов, протеолитические ферменты участвуют в модификации и устранении биополимеров, уже не выполняющих (или выполняющих не в полной мере) в этих условиях необходимые организму функции, а также обеспечивают клетку мономерными субстратами для синтеза стрессовых (шоковых) белков [Блехман, Шеламова, 1992; Тарчевский, 2001], которые являются важным фактором устойчивости клеток [Войников и др., 2004; Титов и др., 2006; Трунова, 2007].

Отмеченное в процессе повышения устойчивости усиление активности ингибиторов трипсина, которое происходит на фоне некоторого снижения активности трипсиноподобных протеиназ, определяется их способностью обратимо связывать ферменты и пере-

водить их в неактивное состояние [Валуева, Мосолов, 2002]. Следовательно, выступая в качестве регуляторов активности протеиназ, ингибиторы протеолитических ферментов предотвращают преждевременный распад вновь синтезированных белков, способствуя тем самым поддержанию повышенной холодоустойчивости.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют заключить, что изменения в активности цистеиновых протеиназ, амидаз и ингибиторов трипсина выступают в качестве одной из неспецифических защитно-приспособительных реакций растений в начальный период действия на них как закаливающих, так и повреждающих температур. Однако в дальнейшем в условиях холодового повреждения протеиназы и их ингибиторы играют важную роль в развитии необратимых (деструктивных) процессов, а при закаливающих температурах – способствуют долговременной адаптации растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 10-04-00650а).

## Литература

- Александрова И. Ф., Веселов А. П., Ефременко Ю. Р. Протеолитическая активность прорастающих семян пшеницы при тепловом стрессе // Физиология растений. 1999. Т. 46, № 1. С. 223–225.
- Блехман Г. И., Шеламова Н. А. Синтез и распад макромолекул в условиях стресса // Усп. соврем. биологии. 1992. Т. 112, № 2. С. 281–297.
- Валуева Т. А., Мосолов В. В. Роль ингибиторов протеолитических ферментов в защите растений // Успехи биол. химии. 2002. Т. 42. С. 193–216.
- Войников В. К., Боровский Г. Б., Колесниченко А. В., Рихванов Е. Г. Стрессовые белки растений. Иркутск: Ин-т географии СО РАН, 2004. 129 с.
- Домаш В. И., Шарпио Т. П., Забрейко С. А., Сосновская Т. Ф. Протеолитические ферменты и ингибиторы трипсина высших растений в условиях стресса // Биоорганическая химия. 2008. Т. 34, № 3. С. 353–357.
- Мосолов В. В., Валуева Т. А. Ингибиторы протеиназ и их функции у растений // Прикл. биохим. и микробиол. 2005. Т. 41, № 3. С. 261–282.
- Мосолов В. В., Валуева Т. А. Участие протеолитических ферментов во взаимодействии растений с фитопатогенными микроорганизмами // Биохимия. 2006. Т. 71, № 8. С. 1034–1042.
- Мосолов В. В., Валуева Т. А. Ингибиторы протеиназ в биотехнологии растений (обзор) // Прикл. биохим. и микробиол. 2008. Т. 44, № 3. С. 261–269.
- Тарчевский И. А. Метаболизм растений при стрессе. Казань: Фэн, 2001. 448 с.
- 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.
- Трунова Т. И. Растение и низкотемпературный стресс. Тимирязевские чтения. М.: Наука, 2007. Т. 64. 54 с.

Фролова С. А. Влияние низкой температуры на активность протеиназно-ингибиторной системы растений: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2008. 23 с.

Фролова С. А., Титов А. Ф. Активность протеолитических ферментов и ингибиторов трипсина в листьях пшеницы в начальный период действия и в последствии низкой закалывающей температуры // Известия РАН. Сер. биол. 2008. № 5. С. 549–552.

Чиркова Т. В. Физиологические основы устойчивости растений. СПб.: СПбГУ, 2002. 244 с.

Bradford M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Annal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.

Cruz de Cavalho M. H., d'Arcy-Lameta A., Roy-Macauley H. et al. 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 Letters. 2001. Vol. 492, N 3. P. 242–246.

Dombrowski J. E. Salt stress activation of wound-related genes in tomato plants // Plant Physiol. 2003. Vol. 132, N 4. P. 2098–2107.

Dowling W. L., Mauxion F., Fauvarque M. O. et al.

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. Vol. 2. P. 658–693.

Erlanger D. F., Kokowski N., Cohen W. Proteinases activity in biological substrats // Arch. Biochem. Biophys. 1961. Vol. 95. P. 271–278.

Heing B., Ugrinovicc 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. Vol. 161, N 5. P. 519–530.

Morichara K., Oka T., Tsuzuki H. Proteases activity // Biochem. Biophys. Acta. 1967. Vol. 139. P. 382–397.

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. Vol. 59, N 5/6. P. 408–414.

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. Vol. 239, N 7. P. 2170.

Wisniewski K., Zagdanska B. Genotype-dependent proteolytic response of spring wheat to water deficiency // J. Exp. Bot. 2001. Vol. 52, N 360. P. 1455–1463.

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

##### Титов Александр Федорович

председатель КарНЦ РАН, чл.-корр. РАН, д. б. н.  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: krcras@krc.karelia.ru  
тел.: (8142) 769710

##### Фролова Светлана Анатольевна

младший научный сотрудник, к. б. н.  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: frolova@krc.karelia.ru  
тел.: (8142) 762712

##### Таланова Вера Викторовна

ведущий научный сотрудник, д. б. н.  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: talanova@krc.karelia.ru  
тел.: (8142) 762712

##### Titov, Alexandr

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy  
of Science  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: krcras@krc.karelia.ru  
tel.: (8142) 769710

##### Frolova, Svetlana

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy  
of Science  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: frolova@krc.karelia.ru  
tel.: (8142) 762712

##### Talanova, Vera

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy  
of Science  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: talanova@krc.karelia.ru  
tel. (8142) 762712