

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ИХ ИНГИБИТОРОВ У ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

В. В. Таланова, А. Ф. Титов, Л. В. Топчиева, Н. С. Репкина

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Изучено влияние кадмия (100 мкМ) на экспрессию генов, кодирующих АТФ-зависимые сериновые протеиназы хлоропластов и митохондрий (*ClpP*, *Lon1*), цистеиновую протеиназу (*Cys*), а также ингибитор цистеиновой протеиназы (*inCys*), в листьях проростков яровой пшеницы (с. Ленинградская 97). Установлено, что в начальный период (5 ч) его действия на растения происходит усиление экспрессии генов протеолитических ферментов *ClpP* и *Lon1*, однако в дальнейшем (3–4 сут) уровень транскриптов этих генов снижается до исходных значений. Содержание транскриптов гена ингибитора протеиназ *inCys* также резко повышалось в первые часы действия кадмия, а затем возвращалось к исходному уровню. В отличие от этого экспрессия гена *Cys* была снижена в течение всего периода действия кадмия. Полученные данные рассматриваются как свидетельство участия протеолитических ферментов и их ингибиторов в неспецифических защитно-приспособительных реакциях растений пшеницы.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., кадмий, экспрессия генов, протеолитические ферменты, ингибитор протеиназ.

V. V. Talanova, A. F. Titov, L. V. Topchieva, N. S. Repkina. EFFECT OF CADMIUM ON GENE EXPRESSION OF PROTEOLYTIC ENZYMES AND THEIR INHIBITORS IN WHEAT SPROUTS

We studied the effect of cadmium (100 μ M) on the expression of the genes encoding ATP-dependent serine proteinases of chloroplasts and mitochondria (*ClpP*, *Lon1*), cysteine proteinase (*Cys*), as well as the inhibitor of cysteine proteinase (*inCys*) in the leaves of spring wheat sprouts (Leningradskaya 97 var.). In the early period (5 h) of the exposure the expression of the genes of proteolytic enzymes *ClpP* & *Lon1* is intensified, but the content of the transcripts of these genes decreases further on (3–4 days) to the original values. The content of the proteinase inhibitor gene *inCys* transcripts also dropped sharply in the early period (first hours) of exposure to cadmium, and then returned to the initial level. In contrast, *Cys* gene expressions remained lowered throughout the exposure. The resultant data are regarded as evidence for participation of proteolytic enzymes and their inhibitors in non-specific protective-adaptive responses of wheat plants.

Key words: *Triticum aestivum* L., cadmium, gene expression, proteolytic enzymes, proteinase inhibitor.

Введение

В последние десятилетия в связи с быстрым развитием промышленности во многих регионах мира наблюдается возрастающее загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами. К их числу относится кадмий, который, являясь высокотоксичным металлом, оказывает негативное влияние на многие стороны жизнедеятельности растений [Титов и др., 2007; Dong et al., 2007]. Его токсическое действие прежде всего связано со способностью взаимодействовать с SH-группами белков, что приводит к инактивации ферментов и изменению биологических свойств белков и сопровождается различными нарушениями метаболизма и физиологических процессов [Sanità di Torpi, Gabrielli, 1999].

Как известно, одной из ранних неспецифических реакций растений на действие стресс-факторов разной природы выступает усиление процессов биодegradации, среди которых особое место занимает протеолиз – ферментативный гидролиз белков и пептидов, катализируемый протеолитическими ферментами [Блехман, Шеламова, 1992]. В этом случае протеолитические ферменты и их ингибиторы, контролируя процессы деградации и модификации белков, препятствуют накоплению неактивных ферментов или поврежденных белков и пептидов в клетках растений [Мосолов и др., 2001]. Помимо этого, протеолитические ферменты участвуют в регуляции многих физиолого-биохимических процессов посредством реакций ограниченного протеолиза [Валуева, Мосолов, 2002], что также имеет определенное значение для защитно-приспособительных реакций растений.

Учитывая то, что воздействие тяжелых металлов на растения сопровождается значительными изменениями в активности протеолитических ферментов [Shah, Dubey, 1998; Pena et al., 2006; Домаш и др., 2008], логично ожидать, что в этом случае могут происходить определенные изменения и в экспрессии кодирующих их генов, однако сведения об этом в известной нам литературе практически отсутствуют. Исходя из этого, цель нашей работы – изучение экспрессии генов, кодирующих АТФ-зависимые сериновые протеиназы, цистеиновые протеиназы и их ингибиторы, в условиях действия кадмия на проростки пшеницы.

Материалы и методы

Эксперименты проводили с проростками яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с. Ленинградская 97, выращенными в рулонах фильтровальной бумаги на питательном рас-

творе Кнопа с добавлением микроэлементов (рН 6,2–6,4) в камере искусственного климата при температуре воздуха 22°C, его относительной влажности 60–70%, освещенности 10 клк и фотопериоде 14 ч. По достижении недельного возраста проростки в течение 4 сут подвергали воздействию кадмия (100 мкМ) в форме сульфата, сохраняя прочие условия неизменными.

Тотальную РНК выделяли с помощью набора YellowSolve (Clonogene, Россия). Качество и количество выделенной РНК определяли методом капиллярного электрофореза на микрочипах (Experion, «Био-Рад»). Для удаления остатков ДНК препарат РНК обрабатывали ДНКазой («Силекс»). Уровень экспрессии генов оценивали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Флуорофором для детекции продуктов служил интеркалирующий краситель SYBR Green. Амплификацию проводили в приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 («Био-Рад»), используя наборы для амплификации, совмещенные с обратной транскрипцией. Для ПЦР в режиме реального времени применяли праймеры («Синтол»), представленные в таблице. В качестве референтного гена использовали актин. Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР фрагментов. На рисунке приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

Праймеры для проведения ПЦР в режиме реального времени

Ген	Нуклеотидная последовательность 5'...3'	
	прямого праймера	обратного праймера
<i>ClpP</i>	GTGGCTAATCTCAGGAA	GCCCGATAATAAGCACATA
<i>Lon1</i>	TCGCCATACTGCCGTTCC	CCTGAATCACTGCCAC
<i>Cys</i>	CACCCAGACAAGCAACCA	GCGTCCCTGTAGGTCCTCC
<i>inCys</i>	CGTCGTGCCGTTTACTC	AGTCCCTGATGCCTCCC
<i>actin</i>	GGGACCTCACGGATAATCTAATG	AACCTCCACTGAGAACAACATTAC

Результаты и обсуждение

Установлено, что в начальный период (через 1 ч) действия кадмия экспрессия генов *ClpP* и *Lon1*, кодирующих АТФ-зависимые сериновые протеиназы хлоропластов и митохондрий, не изменяется (см. рис.), однако уже через 5 ч отмечено значительное увеличение уровня экспрессии генов *ClpP* и *Lon1* (в 2 и 4 раза соответственно). В последующие 3–4 сут действия кадмия экспрессия гена *ClpP* возвращалась к исходным значениям. Содержание транскриптов гена *Lon1* в клетках листа через 3 сут от начала действия кадмия несколько снижалось по сравнению с максимумом, но даже через 4 сут почти в 2 раза превышало исходный уровень.

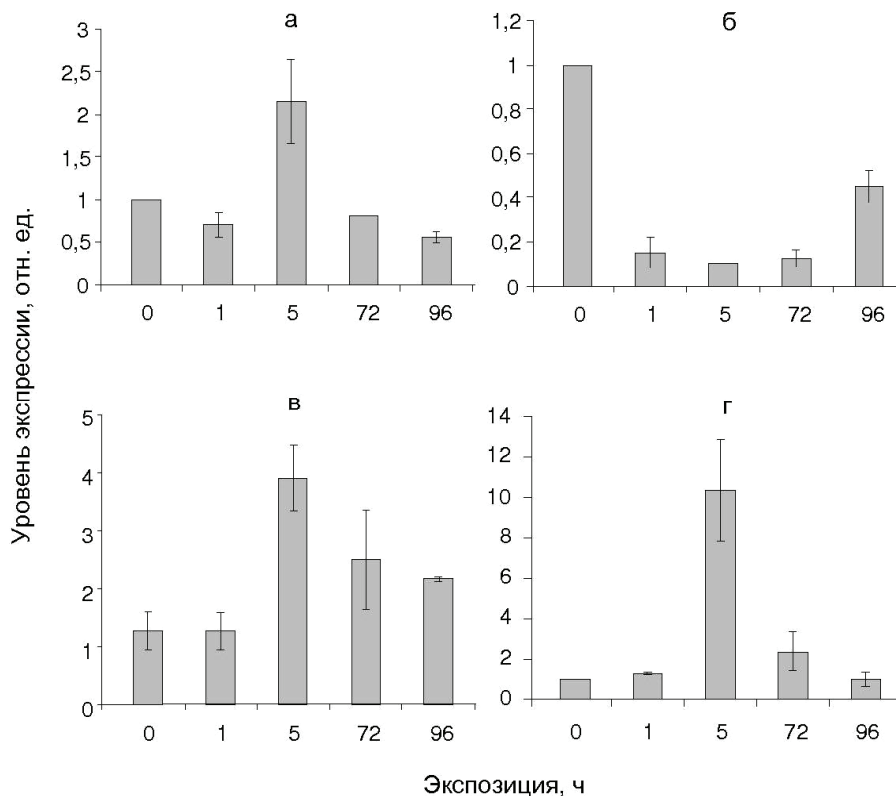
В отличие от этого количество транскриптов гена *Cys*, кодирующего цистеиновую протеиназу, резко падало по сравнению с исходным уровнем уже через 1 ч от начала действия кадмия и оставалось пониженным в течение всего периода действия металла (см. рис.). В то же время экспрессия гена *inCys*, кодирующего ингибитор цистеиновой протеиназы, не изменялась в начальный период (1 ч) воздействия кадмия на проростки, резко (в 10 раз) повышалась через 5 ч, а затем снижалась и на 4 сут возвращалась к исходным значениям.

Таким образом, из результатов следует, что экспрессия генов *ClpP*, *Lon1* и *inCys* в условиях действия кадмия носит транзиторный характер: содержание их транскриптов значительно повышается через 5 ч от его начала, а затем снижается до исходных значений. В связи с этим можно предположить, что реакция растений пшеницы в начальный период (первые часы) действия этого металла была связана с активацией экспрессии указанных генов, которая, вероятнее всего, направлена на увеличение активности протеолитических ферментов, участвующих в деградации и модификации поврежденных белков, а также

белков, уже не выполняющих свои функции (или выполняющих их не в полном объеме) в изменившихся условиях.

Сопоставление полученных данных с имеющимися в литературе указывает на сходство в изменении экспрессии генов протеиназ у растений при действии на них тяжелых металлов и других стресс-факторов. Так, под влиянием низкой закалывающей температуры отмечено усиление экспрессии генов *Lon1* и *ClpP* в листьях проростков озимой пшеницы [Фролова и др., 2009]. Также усиление экспрессии генов цистеиновых протеиназ обнаружено под влиянием низкой температуры у томата [Schaffer, Fisher, 1988] и пшеницы [Фролова, 2008], в условиях засухи – у арахиса [Koizumi et al., 1993], при засолении – у гороха [Jones et al., 1995], при аноксии – у кукурузы [Subbaiah et al., 2000]. В листьях каштана повышенный уровень транскриптов фитоцистатинов (ингибиторов цистеиновых протеиназ) отмечен при действии низкой и высокой температуры, а также избыточного засоления [Pernas et al., 2000].

Наши результаты показывают, что реакция растений пшеницы на действие кадмия сопровождается быстрой экспрессией гена *Lon1*,



Влияние кадмия (100 мкМ) на экспрессию генов протеолитических ферментов *ClpP* (а), *Cys* (б), *Lon1* (в) и гена ингибитора цистеиновых протеиназ *inCys* (г) в листьях проростков яровой пшеницы (с. Ленинградская 97).

Уровень экспрессии генов у растений контрольного варианта (при 22°C) принят за единицу

кодирующего АТФ-зависимую Lon протеиназу, локализованную в мембранах митохондрий и тилакоидах хлоропластов и участвующую в деградации белков [Sonezaki et al., 1995]. Вместе с тем повышенная продукция этого фермента может вызывать деградацию нормальных белков и в итоге летальна для клетки [Goff, Goldberg, 1987]. Вероятно, отмеченное нами снижение экспрессии этого гена до исходного уровня через 3–4 сут действия кадмия свидетельствует о стабилизации белковых комплексов в органеллах и завершении процесса адаптации растения в целом. Характер изменений экспрессии гена *ClpP*, кодирующего Clp протеиназу хлоропластов, также подтверждает его возможное участие в регуляции протеолиза белков хлоропластов в первые часы воздействия кадмия.

Наши данные об усилении экспрессии гена ингибитора цистеиновых протеиназ указывают на их важную роль в регуляции активности протеолитических ферментов и предотвращении распада вновь синтезированных белков на начальных этапах адаптации пшеницы к действию кадмия. Наряду с этим исследование показало, что изменения в экспрессии генов протеиназ и их ингибиторов с увеличением периода действия кадмия на растения становятся менее выраженными. Отсюда следует, что наиболее важные изменения в экспрессии данной группы генов происходят именно в первые часы действия стрессора и, очевидно, они являются частью тех неспецифических изменений в метаболизме, которые должны обеспечить время, необходимое для разворачивания долговременных специализированных адаптивных программ [Кузнецов, 1992], направленных на повышение устойчивости растений, что в итоге предопределяет возможность их выживания в условиях стресса, обусловленного действием кадмия.

В целом обнаруженное нами быстрое повышение уровня экспрессии генов протеиназ и их ингибиторов под влиянием кадмия делает вероятным предположение об их непосредственном участии в защитно-приспособительных реакциях растений яровой пшеницы, происходящих на первом этапе процесса их адаптации к ионам кадмия и носящих неспецифический характер.

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

Литература

Блехман Г. И., Шеламова Н. А. Синтез и распад макромолекул в условиях стресса // Успехи современной биологии. 1992. Т. 112, № 2. С. 281–297.

Валуева Т. А., Мосолов В. В. Роль ингибиторов протеолитических ферментов в защите растений // Успехи биологической химии. 2002. Т. 42. С. 193–216.

Домаш В. И., Шарпио Т. П., Забрейко С. А., Сосновская Т. Ф. Протеолитические ферменты и ингибиторы трипсина высших растений в условиях стресса // Биоорг. химия. 2008. Т. 34, № 3. С. 353–357.

Кузнецов Вл. В. Индуцибельные системы и их роль при адаптации растений к стрессорным факторам: автореф. дис. ... докт. биол. наук. Кишинев, 1992. 74 с.

Мосолов В. В., Григорьева Л. И., Валуева Т. А. Ингибиторы протеиназ из растений как полифункциональные белки (обзор) // Прикладная биохимия и микробиол. 2001. Т. 37, № 6. С. 643–650.

Титов А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. 170 с.

Фролова С. А. Влияние низкой температуры на активность протеиназно-ингибиторной системы растений: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2008. 28 с.

Фролова С. А., Титов А. Ф., Топчиева Л. В. и др. Экспрессия генов протеолитических ферментов и их ингибиторов при холодовом закаливании пшеницы // Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды: мат-лы Всерос. науч. конф. 24–28 августа 2009 г. Иркутск, 2009. С. 496–499.

Dong J., Mao W. H., Zhang G. P. et al. Root excretion and plant tolerance to cadmium toxicity – a review // Plant Soil Environ. 2007. Vol. 53, N 5. P. 193–200.

Goff S. A., Goldberg A. L. An increased content of protease La, the *lon* gene product, increases protein degradation and block growth in *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. 1987. Vol. 262. P. 4508–4515.

Jones J. T., Mullet J. E. A salt- and dehydration-inducible pea gene, *Cyp15a*, encode a cell-wall protein with sequence similarity to cysteine proteases // Plant Mol. Biol. 1995. Vol. 28. P. 1055–1063.

Koizumi M., Yamaguchi-Shonozaki K., Tsuji H., Shinozaki K. Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana* // Gene. 1993. Vol. 129. P. 175–182.

Pena L. B., Tomaro M. L., Gallego S. M. Effect of different metals on protease activity in sunflower cotyledons // Electronic J. Biotech. 2006. Vol. 9, N 3. P. 258–262.

Pernas M., Sanches-Monge R., Salcedo G. Biotic and abiotic stress induce cystatine expression in chestnut // FEBS Letter. 2000. Vol. 467, N 2–3. P. 206–210.

Sanità di Toppi L., Gabbrielli R. Response to cadmium in higher plants // Environ. Exp. Bot. 1999. Vol. 41. P. 105–130.

Schaffer M. A., Fisher R. L. Analysis of mRNA that accumulate in response to low temperature identifies a thiol protease in tomato // Plant Physiol. 1988. Vol. 87. P. 431–436.

Shah K., Dubey R. S. Cadmium elevates level of protein, amino acid and alters activity of proteolytic enzymes in germinating rice seeds // *Acta Physiol. Plant.* 1998. Vol. 20, N 2. P. 189–196.

Sonezaki S., Okita K., Oba T. et al. Protein substrates and heat shock reduce the DNA-binding

ability of *Esherichia coli* Lon protease // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995. Vol. 44. P. 484–488.

Subbaiah C. C., Kollipara K. P., Sachs M. M. A Ca²⁺-dependent cysteine protease is associated with anoxia-induced root tip death in maize // *J. Exp. Bot.* 2000. Vol. 51, N 345. P. 721–730.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Таланова Вера Викторовна

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

Титов Александр Федорович

Председатель КарНЦ РАН, д.б.н., проф., чл.-корр. РАН
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: titov@krc.karelia.ru

Топчиева Людмила Владимировна

старший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: topchieva@krc.karelia.ru
тел. (8142) 571879

Репкина Наталья Сергеевна

аспирант
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: ntr9@ya.ru
тел. (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

Titov, Aleksandr

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: titov@krc.karelia.ru

Topchieva, Lyudmila

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: topchieva@krc.karelia.ru
tel. (8142) 571879

Repkina, Natalia

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: ntr9@ya.ru
tel. (8142) 762712