

На правах рукописи



ЧЕРЕПАНОВА ЕКАТЕРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

ХИТИН-СПЕЦИФИЧНЫЕ ПЕРОКСИДАЗЫ РАСТЕНИЙ

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Уфа - 2005

Работа выполнена в Институте биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук

Научный руководитель: кандидат биологических наук, с.н.с.
Максимов Игорь Владимирович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Ибрагимов Ринат Исмагилович

кандидат биологических наук
Басченко Игорь Анагольевич

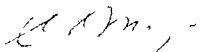
Ведущая организация: Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Защита диссертации состоится «16» июня 2005 г. в 14 часов на заседании Регионального диссертационного совета КМ 002 133 01, при Институте биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, Уфа, проспект Октября, 71.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Уфимского научного центра РАН

Автореферат разослан «16» мая 2005 г.

Ученый секретарь

Регионального диссертационного совета  Бикбулатова С. М.

2006-4
4366

2133957

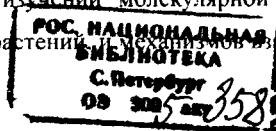
3

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследований. Определение механизмов взаимодействия между молекулярными компонентами растений и патогенов, ведущих к формированию совместимых или несовместимых отношений между партнерами, является одной из наиболее актуальных задач современной биохимии. В связи с открытием сигнальной и защитной роли активных форм кислорода (АФК), большое внимание стали уделять оксидоредуктазам, регулирующим их уровень в клетке [Hippeli et al., 1999; Droge, 2002]. Среди этого обширного класса ферментов особый интерес представляет пероксидаза, участвующая во многих биохимических реакциях, происходящих в живом организме [Савич, 1989; Passardi et al., 2004]. Основная функция этого фермента состоит в детоксикации H_2O_2 [Gechev et al., 2002] и окислении фенольных соединений с образованием лигнина и суберина [Hawkins, Boudet, 2003; Kawano, 2003], однако роль отдельных изопероксидаз в биохимических процессах, происходящих в растениях, до конца не ясна.

Активность пероксидазы коррелирует с развитием устойчивости растений как к абиотическим, так и биотическим стрессам. Лигнификация, осуществляемая пероксидазой, играет чрезвычайно важную роль в защите растительных тканей от фитопатогенов. Образовавшийся при этом механический барьер ограничивает водный обмен и поступление питательных веществ в зону проникновения патогенных микроорганизмов [Denny et al., 2003]. К сожалению, не известно, какие силы формируют вокруг места инфицирования лигнин, и почему эта зона характеризуется активной генерацией АФК [Zhou et al., 2000; Heitefuss, 2001]. Существуют данные о лигнификации не только растительных тканей, но и гиф патогена [Milosevic, Slusarenko, 1996; Denny et al., 2003], хотя этот факт остается мало изученным. В нашей лаборатории ранее была выявлена способность анионной пероксидазы пшеницы с изоэлектрической точкой (pI) ~ 3.5 к сорбции на хитин [Максимов, 1994] и показано ее участие в защитных реакциях растений против грибных патогенов [Хайруллин и др., 2000]. Раскрытие механизмов, лежащих в основе формирования устойчивости растений к болезням, является важным шагом в поиске путей ее повышения.

Цель данной работы состояла в изучении молекулярной гетерогенности пероксидазы, выделенной из разных видов растений, и механизмов взаимодействия ее



изоформ с компонентами клеточных стенок грибов

Задачи исследований:

- 1 Определить распространенность среди различных видов растений изопероксидаз, способных связываться с хитином
- 2 Определить возможность связывания растительных изопероксидаз с компонентами клеточной стенки фитопатогенных грибов.
- 3 Выделить анионную пероксидазу из проростков пшеницы и охарактеризовать биохимические механизмы ее связывания с хитином
- 4 Получить антитела против анионной пероксидазы мягкой пшеницы и провести ее иммунохимическое сравнение с белками из других видов растений
- 5 Выявить механизмы вовлечения анионной пероксидазы в развитие индуцированных хитоолигосахаридами, салициловой кислотой и освещением защитных реакций каллусов пшеницы в совместной культуре с грибом *T. caries*.

Научная новизна Впервые из различных видов растений были выделены и охарактеризованы изопероксидазы, специфически взаимодействующие с хитином и мицелием патогенных грибов. Выявлено иммунохимическое сходство анионной пероксидазы пшеницы с белками из других видов растений. Изучена динамика активности пероксидазы и её изоформ различной локализации в каллусах пшеницы при их инфицировании возбудителем твердой головни и воздействии света, хитоолигосахаридов и салициловой кислоты.

Практическая значимость работы. Разработан способ выделения и очистки отдельных изоформ пероксидазы растений с использованием хитина и хитозана. Активация анионной пероксидазы в ответ на добавление индукторов устойчивости в среду культивирования совместных культур клеток пшеницы с возбудителем твердой головни может служить в качестве маркера для эффективного отбора препаратов с иммуностимулирующей активностью.

Апробация работы Основные результаты работы докладывались на Всероссийских съездах общества физиологов растений (Пенза, 2003), общества биохимиков и молекулярных биологов (С.-Петербург, 2002), общества генетиков и селекционеров (Москва, 2004), конференции по защите и иммунитету растений (С.-Петербург - Пушкин, 2002), "Актуальные проблемы биологии" (Сыктывкар, 1999), "Биология - наука 21 века" (Пушино, 2001), "Молодые ученые Волго-Уральского

региона на рубеже веков" (Уфа, 2001), на международном конгрессе FESPB (Краков, 2004). Международных конференциях "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана" (Москва, 2001; С.-Петербург, 2003). "Molecular Plant – Microbe Interactions" (С.-Петербург, 2003). "Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология" (Москва, 2001). "Иenom растений" (Одесса, 2003)

Конкурсная поддержка работы. Исследования были поддержаны грантами РФФИ (№ 01-04-48495) "Хитин-специфичные" пероксидазы как регуляторы интенсивности элиситорных сигналов при грибном патогенезе", РФФИ (№ 05-04-48310) "Хитин-специфичные" оксидоредуктазы в сигнальной регуляции устойчивости растений к фитопатогенным грибам". РФФИ-Агидель (№ 02-04-97923) "Совместные культуры клеток пшеницы с фитопатогенами как модель для скрининга средств защиты растений с иммуностимулирующими свойствами" и грантом №207 6-го конкурса экспертизы молодых ученых РАН "Активация анионных пероксидаз как показатель неспецифической ответной реакции пшеницы против фитопатогенных грибов"

Публикации. Список основных публикаций по материалам диссертации включает 18 работ, включающий 5 статей в рецензируемых журналах

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Общий объем работы составляет 114 страниц, включая 4 таблицы и 43 рисунка. Список использованной литературы включает 187 работ, в том числе 133 зарубежных авторов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работы проводились на растениях различных видов однодольных и двудольных высших растений, всего 22 вида. В отдельных опытах использовали разновозрастные проростки мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*) сорта Жница Каллусы мягкой пшеницы (*T. aestivum*, сорт Жница) и пшеницы однозернянки (*T. urartu* Thum Ex Gandil, Образец ВИР к-58498), а также их совместные культуры с грибом *Tilletia caries* (ДС) Tul., были любезно предоставлены к.б.н. О.Б. Суриной. В качестве индукторов устойчивости использовали салициловую кислоту (СК, "Реахим", Россия) и

хитинолигосахариды (ХОС), полученные к.б.н И.У. Ахметовой. Мицелий и споры грибов *T. caries*, *Ustilago tritici*, *Septoria nodorum* Berk. и *Bipolaris sorokiniana* были отобраны из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений (ИБГ УНЦ РАН). Хитин с различной степенью ацетилирования (СА) получали реакцией химического щелочного дезацетилирования хитина [Плискин и др., 1977]. Хитин-глюкановый комплекс из спор и мицелия фитопатогенных грибов получали согласно рекомендациям [Феофилова, 2002].

Ферментные экстракты свободной (цитоплазматической), ионно- и ковалентно-связанной с клеточной стенкой растений пероксидазы получали по методике Birgeska и Miller [1974]. Все образцы перед анализами подвергались диализу против 0.01 М фосфатного буфера pH 6.0 (ФБ).

При проведении хроматографии растительный экстракт наносили на колонку, наполненную соответствующим носителем и уравновешенную против ФБ. Аликвоты не связывающихся белков отбирали при установлении самого высокого уровня белков. На солевую фракцию отбиралась проба, элюирующаяся с матрицы раствором 1 М NaCl в ФБ. Активность пероксидазы определяли по методу Бояркина [Ермаков и др., 1987]. Концентрацию белка определяли по Bradford.

Изоэлектрофокусирование (ИЭФ) проводили с использованием 7%-ного ПААГ и 2% изолигов pH 3.0-10.0 ("ISN"), а электрофорез - по методу Лэммли в камере Стадиера с использованием SDS-Na в градиентальном ПААГ [Остерман, 1981]. Препаративный электрофорез проводили аналогично, но без добавления SDS-Na. Пероксидазы в ПААГ выявляли с использованием 0.01% 3,3-диаминобензидина солянокислого (ДАБ) в присутствии 0.001 % H_2O_2 в 0.1 М ФБ. На оксалаксоксидазу гель проявляли, используя 0.01% раствор ДАБ в 0.05 М сукцинатном буфере pH 3.8 – 4.0 с добавлением 2.5 мМ плавиковой кислоты и пероксидазы хрена.

Кроличьи антитела против выделенных нами хитин-специфичных белков и анионной пероксидазы пшеницы получали согласно [Бейлез и др., 1990] и использовали для двойной иммунодиффузии в агарозном геле и определения содержания анионной пероксидазы методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА).

Опыты проводили в лаборатории при комнатной температуре. Эксперименты включали не менее 3-х биологических повторов. Статобработка результатов проводилась с использованием компьютерных программ StatSoft (Statistica 6.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Выделение хитин-специфичной анионной пероксидазы пшеницы и изучение её свойств

Значительную роль в связывании анионной пероксидазы пшеницы с хитином играют специфичные участки в ее белковой молекуле, ионообменно взаимодействующие с ацетильными остатками хитина (рис. 1). Важность присутствия ацетильных групп в структуре хитина при взаимодействии этой изоформы доказывается ее связыванием с ацетилцеллюлозой (рис. 2). Обнаруженное свойство использовалось нами для получения гомогенного препарата анионной пероксидазы.

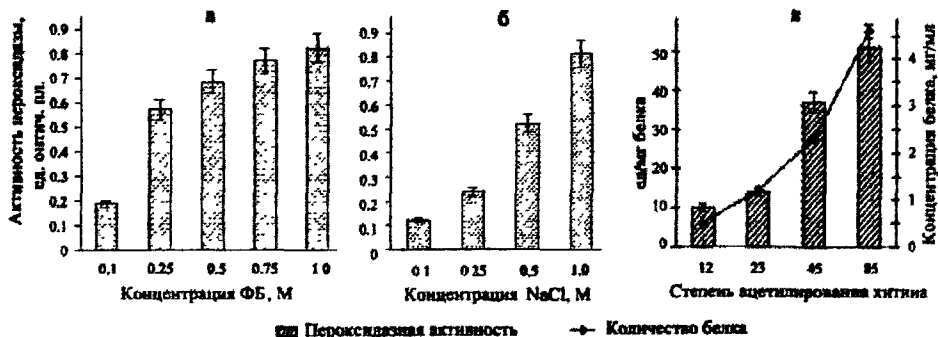


Рис. 1. Зависимость десорбции пероксидазы с хитина от концентрации фосфатного буфера (а), NaCl (б) в растворе и степени ацетилирования хитина (в)

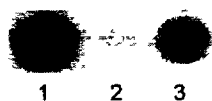


Рис. 2. Сорбция пероксидазы пшеницы из полученных после хроматографии на хитине фракций белка на ацетилцеллюлозу: 1) грубый экстракт, 2) фракция, не связывающаяся с хитином, 3) элюент с хитина.

Для этого белки из корней 4-х суточных проростков пшеницы экстрагировали в ФБ с добавлением 1 мкМ PMSF, 1 мкМ дитиотрейтола (ДТТ) ("Loba", Австрия) и 3% поливинилпирролидона ("Reseach organics", США) и после центрифугирования, фракцию, высаливающуюся 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, диализовали. Затем пероксидазу выделяли на последовательных колонках с хитозаном и хитином, уравновешенных ФБ. Сорбирующиеся на хитин белки элюировали с хитиновой колонки раствором 1 М раствором NaCl в ФБ и концентрировали.

Во фракции белков, элюирующихся с хитина, кроме пероксидазы с молекулярной массой около 37 кДа, были идентифицированы белки с оксалаксоксидазной активностью (мол. масса ~ 26 кДа и ~ 100 кДа) (рис. 3). Вероятно, высоко-молекулярная форма этого фермента является тетрамером [Gane et al., 1998].

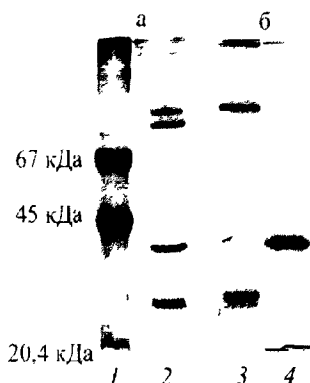


Рис. 3. Профили спектров белков после SDS-Na-электрофореза (а) и электрофореза без добавления SDS-Na (б).

1 – маркерные белки;
2 – белки, элюирующиеся с хитина 1 М NaCl;
3 – оксалактоксидаза;
4 – анионная пероксидаза.

Анионную пероксидазу выделяли методом электрофореза в ПААГ и последующей электроэлюцией из него [Остерман, 1985]. Препарат содержал единственную изоформу пероксидазы с $pI \sim 3.5$. Сравнивали pH оптимум работы суммарной цитоплазматической пероксидазы пшеницы и выделенной нами анионной

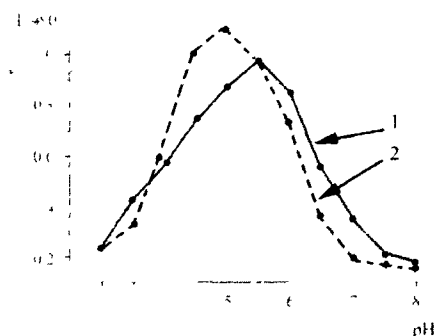


Рис. 4. pH оптимум общей пероксидазной активности грубого экстракта (1) и очищенной анионной пероксидазы пшеницы

изоформы (рис. 4). Показано, что пероксидаза из грубого растительного экстракта имеет pH оптимум работы в пределах 4.5 – 6.0, как это было определено в работе [Minibayeva et al., 2003]. pH оптимум анионной пероксидазы сдвинут относительно pH оптимума пероксидазной активности грубого экстракта на 0.5 ед в

кислую сторону, подобно сдвигу, характерному и для анионной пероксидазы табака [Gazarian et al., 1996]

Препараты хитин-специфичных белков и анионной пероксидазы пшеницы использовались для получения против них антител и определения их иммунохимического сходства с другими хитин-специфичными белками. Иммуноспецифичность полученных антител по отношению к анионной пероксидазе пшеницы оказалась высокой (рис. 5). Поскольку эти антитела не взаимодействовали с пероксидазами пшеницы, не сорбирующимися на хитин, можно предположить, что структура анионной изоформы иммунохимически отличается от других изопероксидаз этой культуры.

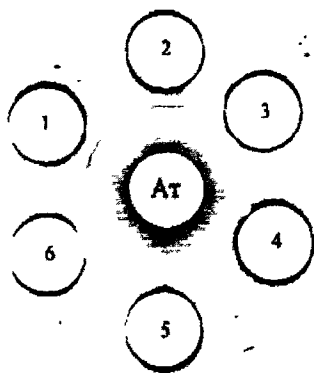


Рис. 5. Полосы преципитации кроличьих антител, полученных против анионной пероксидазы, с белками грубого экстракта из корней пшеницы (1), белками, связывающимися с хитином (2), белками, не сорбирующимися на хитин (3), агглютинином зародышей пшеницы (4), конканавалином А (5), бычьим сывороточным альбумином (6).

2. Способность пероксидаз из различных видов растений взаимодействовать с хитином.

В связи с обнаруженным свойством анионной пероксидазы пшеницы сорбироваться на хитин, интерес представляет то, насколько характерно для изопероксидаз других видов растений подобное свойство. Обнаружено, что после хроматографии растительных экстрактов на хитине, у одних видов происходит многократное повышение активности пероксидазы во фракции белков, не сорбирующихся на хитин, а у других - во фракции, элюирующейся с хитина 1 М раствором NaCl (таблица 1). Например, активность пероксидазы картофеля (*S. tuberosum*) и лагенарии (*L. siceraria*) после контакта с этим биополимером увеличивается более чем в 2 раза. А у капусты, гороха и петунии более чем в 3 раза возрастает пероксидазная активность в солевом элюенте.

Анализ изоферментного состава пероксидаз, связывающихся с хитином, выявил как сходства, так и различия между видами растений. У представителей семейства злаков была отмечена сорбция на хитин анионных изоферментов, а у других видов растений способностью связываться с хитином обладали и катионные изоформы. Эти данные позволили причислить сорбирующиеся на хитин пероксидазы к хитин-специфичным, аналогично анионной пероксидазе пшеницы.

Иммунохимический анализ белков основан на реакции специфического взаимодействия антиген-антитело. В этой реакции проявляется одна из элементарных биологических функций белка - способность к избирательному взаимодействию по принципу "узнавания", поэтому "иммунохимический метод следует рассматривать как биологический метод идентификации белков, позволяющий оценивать не простое

Таблица 1

Пероксидазная активность при хроматографии белковых экстрактов из проростков различных видов растений на хитине
(ед./мг белка)

Вид растения	Грубый экстракт		Пероксидазная активность во фракции белков, не связывающихся с хитином	Солевой элюент с хитина	
	Пероксидазная активность	Количество изопероксидаз		Пероксидазная активность	~ pI пероксидаз
<i>Triticum aestivum</i>	10.5±1.2	9	4.3±0.5	11.0±3.0	3.5
<i>Avena sativa</i>	3.6±0.5	11	3.1±0.1	11.1±2.5	3.3 и 3.4
<i>Oryza sativum</i>	1.7±0.2	15	4.9±0.6	0.5±0.1	3.7 и 4.8
<i>Zea mays</i>	1.5±0.3	7	2.9±0.7	0.3±0.1	3.6
<i>Allium cepa</i>	1.7±0.2	7	0.5±0.1	0.4±0.1	5.8; 6.8 и 8.3
<i>Allium porrum</i>	1.4±0.2	6	1.2±0.2	следы	-
<i>Allium sativum</i>	2.3±0.5	7	0.4±0.1	1.8±0.4	4.2; 5.8; 6.5; 7.2; 8.1; 8.8
<i>Aloe vera</i>	1.0±0.3	4	1.6±0.2	0.7±0.3	5.5
<i>Hosta glauca</i>	2.6±0.5	8	2.8±0.3	0.2±0.1	4.2; 6.8 и 7.0
<i>Lilium regale</i>	2.5±0.5	11	2.2±0.3	следы	-
<i>Raphanus sativus</i>	9.0±0.7	6	11.3±0.9	2.9±0.3	3.8
<i>Brassica oleraceae</i>	5.6±0.2	6	6.2±0.3	15.5±0.8	7.2 и 7.8
<i>Armoracia rusticana</i>	7±1.0	8	19.2±2.3	2.0±0.4	3.8 и 4.0
<i>Petunia hybrida</i>	5.2±0.5	6	3.7±0.6	23.9±2.2	3.5; 3.7; 7.2 и 7.5
<i>Solanum tuberosum</i>	1.9±0.2	19	6.8±1.1	1.6±0.9	4.2 и 4.3
<i>Nicotiana tabacum</i>	24.0±0.9	6	9.0±0.9	13.7±2.0	3.7
<i>Lagenaria siceraria</i>	2.4±0.3	8	4.6±0.4	следы	-
<i>Cucurbita pepo</i>	6.2±0.6	4	1.7±0.2	5.1±0.8	3.7; 3.8; 8.8 и 9.0
<i>Cucumis sativus</i>	9.8±0.5	8	1.9±0.1	13.5±0.9	3.4; 3.5; 3.7 и 3.8
<i>Galega orientalis</i>	3.9±0.3	8	4.3±0.2	4.2±0.2	3.5; 7.1; 8.2; 9.0; 9.2 и 9.3
<i>Arachis hypogaea</i>	8.2±1.1	13	1.3±0.1	6.1±0.9	от 3.6 до 6.0
<i>Pisum sativum</i>	3.8±0.3	11	2.9±0.5	26.1±3.9	3.5; 3.7; 5.0 и 8.1

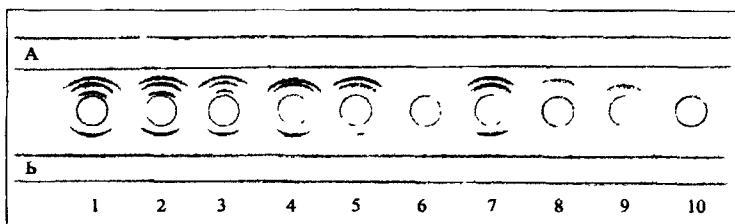


Рис. 6. Схема перекрестов, образуемых экстрактами однодольных растений с антителами против хитин-специфичных белков (А) и против анионной пероксидазы (Б) пшеницы. 1 – пшеница мягкая, 2 – овес посевной, 3 – рис культурный, 4 – кукуруза, 5 – лук репчатый, 6 – лук – порей, 7 – чеснок посевной, 8 – алоэ, 9 – лилия царственная, 10 – хоста.

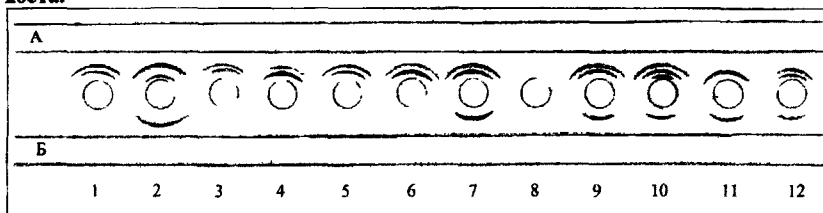


Рис. 7. Схема перекрестов, образуемых экстрактами двудольных растений с антителами против хитин-специфичных белков (А) и против анионной пероксидазы (Б) пшеницы. 1 – хрен деревенский, 2 – редис посевной, 3 – капуста белокочанная, 4 – табак курительный, 5 – петуния садовая, 6 – картофель, 7 – огурец посевной, 8 – лагенария, 9 – кабачок, 10 – горох посевной, 11 – арахис подземный, 12 – козлятник восточный.

сходство, а биологическую гомологию белка" [Конарев и др., 1993]. Образование преципитата между антителами против анионной пероксидазы пшеницы и белками некоторых видов растений различных семейств, например, мятликовых и бобовых (рис. 6, 7), свидетельствует о сходстве их антигенных детерминант. Белки практически всех видов растений реагировали с антителами против хитин-специфичных белков, что предполагает их эволюционно раннее, в сравнении с пероксидазами, происхождение.

3. Сорбция изопероксидаз пшеницы на клеточные стенки фитопатогенных грибов и микроорганизмов

Для проверки предположения о прямом взаимодействии пероксидаз с компонентами клеточных стенок грибов использовали хитин-глюкановый комплекс, выделенный из мицелия и спор фитопатогенных грибов – возбудителей твердой головни, пыльной головни, септориоза и корневой гнили пшеницы. Обнаружено, что из множества пероксидаз у пшеницы к сорбции на компоненты клеточных стенок грибов способны изоформы с $pI \sim 3.5$ и катионная с $pI \sim 9.7$ (рис. 8).

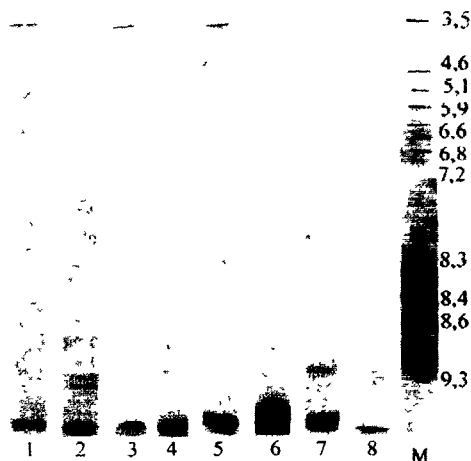


Рис. 8. Изоферменты пероксидазы пшеницы, сорбирующиеся на мицелий (1, 3, 5, 7) и проросшие споры (2, 4, 6, 8) фитопатогенных грибов *T. caries* (1, 2), *U. tritici* (3, 4), *B. sorokiniana* (5, 6) и *S. nodorum* (7, 8).

М – маркерные белки

Поскольку клеточная стенка грибов состоит из хитина и глюканов, то, вероятно, анионные пероксидазы пшеницы сорбировались на поверхность мицелия именно по хитиновым сайтам. Природа сорбции на мицелий гриба катионных изопероксидаз нам не известна, но можно предположить, что они сорбируются на другой компонент мицелия гриба - глюканы, подобно сорбции катионных пероксидаз цуккини и арабидопсиса на пектины [Carpin et al., 2001. Shah et al., 2004]. Однако данное предположение нуждается в экспериментальной проверке. Из литературы известно, что споры грибов полностью покрыты слоем глюканов и лишь при прорастании в апикальной части клеточной стенки мицелия часть хитина обнажается [Santiago et al., 2000]. Таким образом, сорбция пероксидаз на клеточные стенки фитопатогенных грибов и хитин может являться одним из необходимых условий проявления в последующем защитных реакций растения-хозяина на внедрение в их ткани паразитических микроорганизмов.

4. Влияние хитоолигосахаридов, салициловой кислоты и освещения на устойчивость каллусов пшеницы к возбудителю твердой головни

Широко известно вовлечение анионных пероксидаз в защитные реакции растений [Lagrimini et al., 1997; Bernards et al., 1999; Kaothien et al., 2000], что предполагает возможность под влиянием различных индукторов устойчивости, в том числе олигомеров хитина и салициловой кислоты (СК), накопления и активации пероксидазы пшеницы, способной сорбироваться на хитин.

Обработка каллусов хитоолигосахаридами приводила к повышению активности

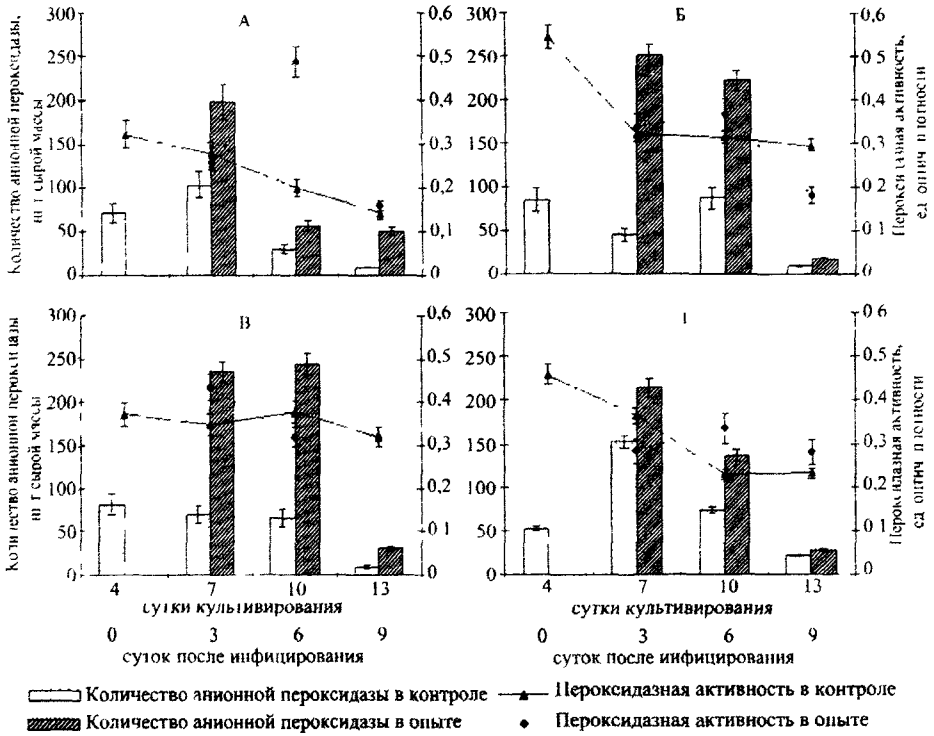
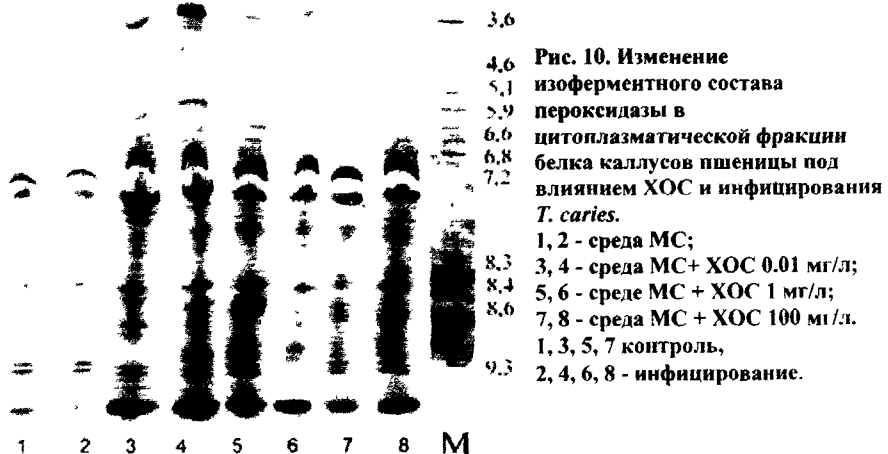


Рис. 9. Влияние различных концентраций ХОС на активность пероксидазы (в ед. оптич. плотности при 470 нм) и количество анионного изофермента (в нг/г сырой массы) в совместных культурах каллусов. А – культивирование на среде МС; Б – культивирование на среде МС+0.01 мг/л ХОС; В – культивирование на среде МС+1 мг/л ХОС; Г – культивирование на среде МС + 100 мг/л ХОС



и количества изопероксидаз в каллусах пшеницы (рис 9, 10). Высокие концентрации ХОС (более 1 мг/л) приводили к активации щелочных изопероксидаз, тогда как низкие – избирательно увеличивали активность пероксидаз с $pI \sim 7.5$ и ~ 9.7 и анионных с $pI \sim 3.5$, ~ 4.3 , ~ 4.5 и ~ 5.2 (рис. 10).

Проведенный ИФА выявил значительное увеличение содержания анионной пероксидазы в свободно-растворимой фракции белков под влиянием 1 и 0.01 мг/л ХОС на 3 сут совместного культивирования (рис. 9). В дальнейшем в этой фракции наблюдается тенденция снижения как общей активности пероксидазы, так и количества анионной пероксидазы, что может быть связано с перераспределением изоферментов в клетке, например, их переходом в зону, прилежащую к клеточным стенкам [Комизерко и др., 1988; Газарян, 1992] и/или связыванием с компонентами клеточных стенок патогена [Milosevic, Slusarenko, 1996; Denny et al., 2003]. Действительно, под влиянием ХОС во фракции ковалентно-связанных с клеточной стенкой белков происходила активация пероксидазы с $pI \sim 3.5$ (рис. 11 А), где она, как известно, может активно вовлекаться в процессы укрепления межмолекулярных связей и лигнификации [Lagrimini, 1996; McDougall, 2001]. Вероятно, присутствие в среде культивирования препарата ХОС усиливает эти процессы, вследствие чего фермент оказывается более прочно связан с клеточной стенкой.

Пероксидазы, секретирующиеся во внеклеточную среду, принимают непосредственное участие в защите растительных тканей от фитопатогенов [Hiraga et al., 2001; Bolwell et al., 2002; Минибаева, Гордон, 2003].

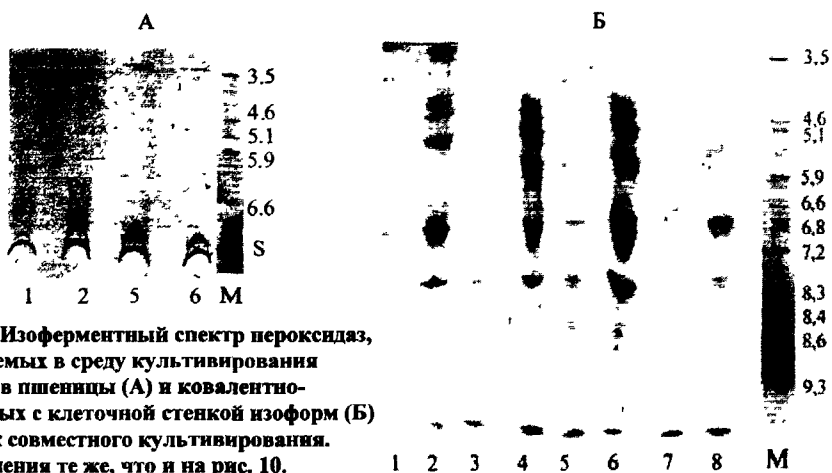


Рис. 11. Изоферментный спектр пероксидаз, выделяемых в среду культивирования каллусов пшеницы (А) и ковалентно-связанных с клеточной стенкой изоформ (Б) 20 суток совместного культивирования. Обозначения те же, что и на рис. 10.

Под влиянием инфицирования и ХОС пероксидазная активность в этой фракции многократно повышалась (рис. 11, Б). Интересно, что в среде культивирования каллусов, выращенных на среде МС, была обнаружена только пероксидаза с $pI \sim 3.5$, а под влиянием инфицирования - и с более основными pI . Препарат ХОС индуцировал выход во внесклеточную среду изопероксидазы (с $pI \sim 9.7$), способной сорбироваться на мицелий грибов. В то же время пероксидаза с $pI \sim 3.5$ накапливалась в клеточно-стеночной фракции, что, вероятно, сопряжено с ее способностью к кросс-связыванию с клеточной стенкой растения [Denny et al., 2002] и хитином.

Таким образом, нами показано, что ХОС влияют на активность изопероксидаз, играющих важную роль в защитном ответе растительных клеток на инфицирование и усиливают выделение патоген- и хитин-специфичных изоформ пероксидазы во внесклеточное пространство, где последние могут выполнять свои функции эффективнее [Минибасва, Гордон, 2003].

Воздействие СК на активность пероксидазы в целом отличалось от действия ХОС. В начальный срок опыта у совместных культур, растущих на СК с патогеном, активность цитоплазматической пероксидазы была ниже, чем в контроле (рис. 12). Под влиянием СК, на фоне снижения активности многих изоформ, многократно активировались пероксидазы с $pI \sim 3.5$, а также с $pI \sim 4.8$, ~ 7.5 и 9.7 (рис. 12).

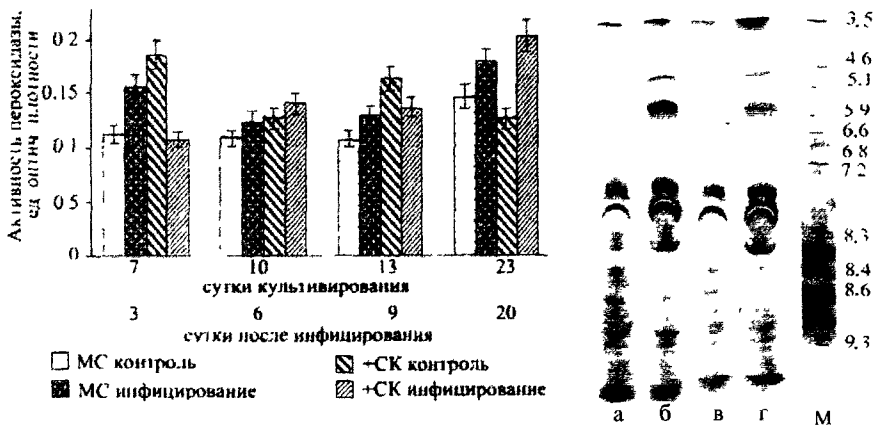


Рис. 12. Изменение активности (слева) и изоферментного спектра пероксидазы (справа, 20 сутки совместного культивирования) под влиянием СК в цитоплазматической фракции белков совместной культуры каллусов *T. aestivum* с *T. caries*. М - маркерные белки. МС контроль(а); МС инфицирование (б); +СК контроль (в); +СК инфицирование (г).

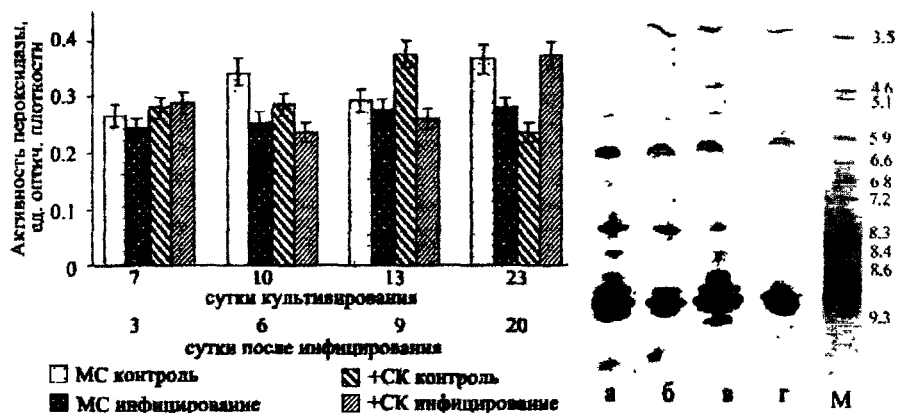


Рис. 13. Изменение активности (в ед. оптической плотности при 470 нм) (слева) и изоферментного спектра пероксидазы (справа) в ионно-связанной с клеточными стенками фракции белков совместной культуры каллусов *T. aestivum* с *T. caries* под влиянием СК. Обозначения те же, что и на рис. 12

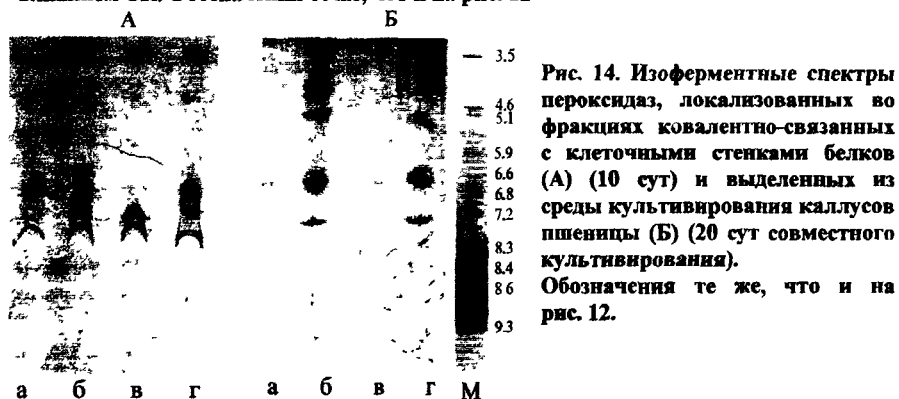


Рис. 14. Изоферментные спектры пероксидаз, локализованных во фракциях ковалентно-связанных с клеточными стенками белков (А) (10 сут) и выделенных из среды культивирования каллусов пшеницы (Б) (20 сут совместного культивирования). Обозначения те же, что и на рис. 12.

Во фракциях ионно- и ковалентно-связанных с клеточными стенками белков СК активировала изоформу с $pI \sim 3.5$ (рис. 13, 14). Причем в зараженных *T. caries* каллусах пероксидазы не только концентрировались в клеточно-стеночной фракции, но и выделялись в среду культивирования, где нами обнаружены пероксидазы с pI от 3.5 до 4.8, а также изоформа с $pI \sim 7.5$, антифунгальное свойство которой описано в работе С. Caruso с соавторами [2001].

Важно отметить, что СК, снижая активность многих изоформ пероксидаз, способствовала активации изоформ, задействованных в защите от патогенов. Это предполагает модулирующее влияние данного соединения на активность пероксидаз, благодаря чему в клетках может поддерживаться определенный про-/анти-оксидантный статус, способствующий усилению защитных свойств клеток.

Известно, что свет может влиять на активность некоторых ферментов [Asselin et al., 1985; Александрушкина и др., 2004] и вызывать экспрессию PR-белков [Genoud et al., 2002], в том числе и пероксидазы [Boeuf et al., 1999; Agrawal et al., 2003]. Это означает, что и в совместных культурах каллусов пшеницы с возбудителем твердой головни свет может изменять активность пероксидазы, повышая тем самым их устойчивость к патогену.

Действительно, при культивировании на свету каллусы оказались гораздо менее подверженными инфицированию. При этом пероксидазная активность наиболее интенсивно проявлялась в зонах заселения грибом. Окрашивание срезов флороглюцином, специфическим красителем на лигнин, показало, что при освещении процессы лигнификации клеток каллуса, контактирующих с *T. caries*, происходят интенсивнее, чем в темноте. Кроме того, у клеток каллуса пшеницы, контактирующих с мицелием гриба и находящихся под влиянием освещения, наблюдалось интенсивное образование некротических зон, подобных сверхчувствительной (СВЧ) реакции.

Под действием света в совместной культуре каллусов пшеницы с грибом происходило повышение активности большинства выявляемых изоформ пероксидазы (рис. 15). В то же время следует заметить, что в каллусах, растущих в темноте, патоген приводил к снижению активности специфичной к клеточным стенкам гриба изопероксидазы с рI ~ 9.7.

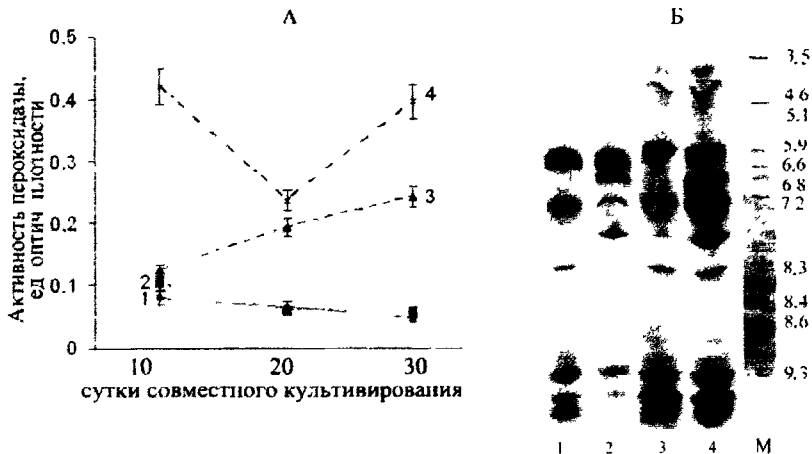


Рис. 15. Изменение активности (А) и изоферментного спектра пероксидазы (Б) (20-е сут культивирования) в каллусах *T. urartu*, инфицированных грибом *T. caries*, под влиянием освещения. 1 – темнота; 2 – темнота + инфицирование; 3 – свет; 4 – свет + инфицирование

Совокупность полученных данных указывает, что в каллусах пшеницы, культивируемых на свету и питательных средах, содержащих индукторы устойчивости, происходят значительные изменения в изоферментном составе пероксидазы. Наиболее активно реагирующими на индукторы устойчивости изоформами являются изопероксидазы с $pI \sim 3.5$ и ~ 9.7 , способные к сорбции на клеточные стенки фитопатогенных грибов.

Поскольку в иммунизированных каллусах патоген развивается слабо, можно предположить, что повышение активности пероксидаз, обладающих сродством к компонентам клеточных стенок фитопатогенных грибов и в частности к хитину, является важным механизмом формирования резистентности растений к инфицированию в спектре их защитных реакций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что одним из основных механизмов защиты растений от грибных патогенов является формирование вокруг их инфекционных структур лигнина, который представляет собой эффективный защитный барьер на пути проникновения гриба. В растениях имеются белки, способные специфически связываться с хитином и глюканом клеточной стенки фитопатогенных грибов (лектины, хитиназы и глюканазы) [Лахтин, 1987.]. Однако непосредственно в процессах лигнификации эти белки не участвуют. Способностью катализировать полимеризацию фенольных соединений в лигнин и суберин обладает активный участник системы антиоксидантной защиты клеток – фермент пероксидаза [Quiroga et al., 2000; Keren-Keiserman et al., 2004]. До наших исследований механизм направленного отложения лигнина в точках проникновения фитопатогена и концентрирования стресс-индуцируемой пероксидазы в этих зонах был неизвестен.

Полисахариды являются не просто катализаторами процесса лигнификации [Rasmussen et al., 1995], а могут также играть роль матриц для ее инициации [Liu, Kolattukudy, 1997]. Это доказывается и тем, что синтез лигнина повышается в растворе пероксидазы с эвгенолом при внесении хитозана [Siegel, 1957; Van der Westhuizen et al., 1998]. Как свидетельствуют полученные нами результаты, анионная пероксидаза с $pI \sim 3.5$ вовлекается в ответные реакции пшеницы на инфицирование посредством ее сорбции на хитин и клеточные стенки фитопатогенов. Способность

этой изопероксидазы выделяться в межклеточное пространство, закрепляться в клеточной стенке и на поверхности хитин-содержащих патогенов, позволяет считать, что она может ограничивать рост и развитие инфекции [Joseph et al., 1998; Caruso et al., 2001] посредством синтеза лигнина непосредственно на мицелии гриба. При этом ткани с высокой активностью фермента, индуцированной иммунорегуляторами (ХОС и салициловая кислота), оказываются более "подготовленными" к защите от инфицирования их фитопатогеном.

Активирование пероксидазы под влиянием хитина и сорбция ее отдельными изоферментами на нем предполагает возможность участия этого фермента в процессах, лежащих в основе двух типов защитных реакций растений против фитопатогенов. Первый включает быструю активацию фермента при его контакте с клеточными структурами гриба, что, вероятно, сравнимо с ее активированием при СВЧ-реакции [Dangl et al., 1996; Wojtaszek, 1997]. Второй тип реакции можно сравнить с постепенным накоплением молекул фермента в зоне локализации гриба, связанным с появлением своеобразного "аттрагирующего" центра, формирующего в несовместимой патогенной системе условия для лигнификации зоны проникновения фитопатогена [El Gueddari et al., 2002; Shinogi et al., 2003].

Полученные данные раскрывают новые аспекты формирования отношений паразит – хозяин, демонстрируя возможность существования систем, способных регулировать поступление сигнальных молекул в растительную клетку и участие в защитных реакциях, направленных на укрепление клеточной стенки. Следовательно, от скорости активации пероксидазы в клетках, подвергшихся инфицированию, и интенсивности сорбции этого фермента на мицелий хитин-содержащего патогена зависит судьба прохождения патологического процесса.

ВЫВОДЫ

1 У различных видов однодольных и двудольных растений выявлено семейство хитин-специфичных белков с пероксидазной активностью. Обнаружены определенные различия между видами в количестве изопероксидаз, сорбирующихся на хитин. У растений семейства мятликовых на хитин сорбировались анионные пероксидазы, тогда как у других видов сродством к нему обладали и катионные изоформы фермента.

2. Анионная пероксидаза пшеницы, специфически взаимодействующая с апетильными остатками хитина, выделена в чистом виде и изучены ее основные физико-химические свойства (молекулярная масса, изоэлектрическая точка, pH оптимум работы фермента).

3. Определено высокое иммунохимическое сходство анионной пероксидазы пшеницы с хитин-специфичными белками семейства злаков и отличие этой изоформы от других изопероксидаз пшеницы.

4. У пшеницы наряду с анионной пероксидазой, на хитин сорбируется оксалатоксидаза, что предполагает кооперативное участие этих ферментов в защите растений от хитин-содержащих патогенов.

5. Впервые у пшеницы обнаружены изопероксидазы (анионная с $pI \sim 3.5$ и катионная с $pI \sim 9.7$), способные сорбироваться на компоненты клеточных стенок фитопатогенных грибов - возбудителей твердой головни, пыльной головни, септориоза и корневой гнили. Предполагается, что анионная пероксидаза при этом связывается с хитином клеточных стенок грибов, а катионная - с глюканом.

6. Показано, что индукторы устойчивости (хитоолигосахариды и салициловая кислота), а также освещение, приводят к усилению устойчивости клеток каллуса пшеницы в совместной культуре с возбудителем твердой головни, что коррелирует с увеличением количества и активности изопероксидаз с $pI \sim 3.5$ и ~ 9.7 .

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Максимов И.В., Черепанова Е.А., Хайруллин Р. М. Связывание пероксидазы из разных видов растений с хитином. // Актуальные проблемы биологии: Материалы 5 молодежной конф.- Сыктывкар. 1999. - С. 132-133.

2. Максимов И.В., Черепанова Е.А., Хайруллин Р.М., Ахметова И.Э. О природе взаимодействия анионных пероксидаз с хитином. // Материалы 6 международной конференции "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана". - Москва, 2001. - С. 88-91.

3. Черепанова Е.А., Янбаева Д. Г. Максимов И.В. Взаимодействие пероксидазы с компонентами клеточных стенок фитопатогенных грибов. // Материалы юбилейной научной конференции молодых ученых "Молодые ученые Волго-Уральского региона на рубеже веков" - Уфа, 2001 - С. 155-157

4. Максимов И.В., Черепанова Е.А., Хайруллин Р.М., Ахметова И.Э. Поиск сайтов взаимодействия с хитином у растительной пероксидазы и их роль в формировании устойчивости к фитопатогенам The search for sites of interaction of plant peroxidase with chitin and their role in forming of resistance to pathogens // Материалы международного симпозиума "Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология". Москва. 2001. С. 106-107.

5. Максимов И.В., Черепанова Е.А., Ахметова И.Э., Юсупова З.Р., Хайруллин Р.М. Участвуют ли анионные пероксидазы в регуляции уровня элиситоров, поступающих в клетку? // Материалы первой всероссийской конференции по иммунитету растений к болезням и вредителям - С-Петербург. 2002 - С. 37-38.

6. Максимов И.В., Сурина О.Б., Черепанова Е.А., Трошина Н.Б. Активация анионной пероксидазы в совместной культуре каллусов пшеницы с возбудителем твердой головни под влиянием периодического освещения // Материалы 3-го съезда биохимического общества. - С-Петербург. 2002 - С. 42-43

7. Максимов И.В., Черепанова Е.А., Хайруллин Р.М. "Хитин-специфичные" пероксидазы в растениях // Биохимия 2003, т. 68 № 1. - С. 133-138

8. Черепанова Е.А., Максимов И.В., Сурина О.Б., Ахметова И.Э. Влияние хитоолигосахаридов на активность и изоферментный состав растительной пероксидазы в совместных культурах каллусов пшеницы с грибом *Tilletia caries* (DC) Tul // Материалы 5 съезда Общества физиологов растений. - Пенза 2003 - С. 196-197

9. Максимов И.В., Черепанова Е.А., Яруллина Л.Г. "Хитин-специфичные" белки пшеницы: выделение и характеристика. // Материалы 7 международной конференции "Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана". - С-Петербург. 2003, - С. 94-96.

10. Maksimov I.V., Yarulina L.G., Cherepanova E.A., Akhmetova I.E., Yusupova Z.R. "Chitin-specific" enzymes of wheat. // Molecular Plant Microbe Interactions: New bridges between Past and Future 11-th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. - St.-Pet., 2003. P. 257

11. Яруллина Л.Г., Максимов И.В., Трошина Н.Б., Черепанова Е.А., Сурина О.Б. Влияние салициловой кислоты на активность оксалаксоксидазы и генерацию

перекиси водорода в каллусных культурах пшеницы. // Материалы 4 Международной конференции "Геном растений" - Одесса (Украина). 2003 - С. 82

12 Максимов И В. **Черепанова Е.А.**, Сурина О Б., Сахабутдинова А Р Влияние салициловой кислоты на активность пероксидазы в совместных культурах каллусов пшеницы с возбудителем твердой головни *Tilletia caries*. // Физиология растений. 2004. том 51. № 4. - С. 534-540.

13 **Черепанова Е.А.**, Максимов И В Иммунохимическое сходство "хитин-специфичных" пероксидаз пшеницы с белками из других видов растений // Материалы III съезда ВОГиС "Генетика в XXI веке". – Москва. 2004 - С. 315

14 Cherepanova F A . Maksimov I V . Surina O B . Jusupova Z.R The change of peroxidase activity in the common cultures of wheat calluses and bunt pathogens under the influence of chitoooligosaccharides // Acta physiologia plantarum. 2004. V 26. No 3. P 267.

15 Максимов И В. **Черепанова Е.А.**, Ахметова И Э Хайруллин Р М. Участие хитина и его олигомеров в индуцированной устойчивости растений против фитопатогенов. // Агрохимия 2004. - №8 - С. 77-89.

16 Maksimov I V , Troshina N B . Yarullina L G.. Surina O B , Jusupova Z.R , Cherepanova E.A The co-culture of wheat callus and bunt pathogen as a suit test-system for the search of plant resistance inducers // "Biotechnology and agriculture and the food industry" ed. G.E Zaikov. New York: Nova Science Publ. 2004 P 35-41

17 Трошина Н.Б., Максимов И.В., Яруллина Л.Г., Сурина О.Б. **Черепанова Е.А.** Индукторы устойчивости растений и активные формы кислорода: 1 Влияние салициловой кислоты на генерацию перекиси водорода в клетках каллусов пшеницы при инфицировании возбудителем твердой головни. // Цитология 2004. № 11. - С 1001-1005

18 Трошина Н.Б. Максимов И В. Яруллина Л.Г. Сурина О.Б. **Черепанова Е.А.** Индукторы устойчивости растений и активные формы кислорода: 2. Влияние хитоолигосахаридов на продукцию перекиси водорода с участием оксалактоксидазы в совместных культурах каллусов пшеницы с возбудителем твердой головни // Цитология 2004. № 11 - С. 1006-1010.

Черепанова Екатерина Александровна

ХИТИН-СПЕЦИФИЧНЫЕ ПЕРОКСИДАЗЫ РАСТЕНИЙ

Специальность 03.00.04 – биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Бумага офсетная. Формат 60х84/16. Гарнитура Times

Отпечатано на ризографе. Усл.печ л 1.5

Тираж 100 экз. Заказ 155.

Отпечатано в типографии БИПУ

450000, РБ г Уфа, ул Октябрьской революции 3А

№ - 89 38

РНБ Русский фонд

2006-4

4366