

В.И. ЕМЕЛЬЯНОВ, А.П. ДМИТРИЕВ
Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, 03143, Киев-143, ул. Заболотного, 148
E-mail: vldemi@rambler.ru

ИНДУЦИРОВАННОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ ХИТИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В КЛЕТКАХ ТОМАТА (*LYCOPERSICON ESCULENTUM* L.)



Определена величина индуцированной элиситорами хитиназной активности в клетках томата. Показана зависимость величины ферментативной активности клеток от размера и концентрации биотических элиситоров.

© В.И. ЕМЕЛЬЯНОВ, А.П. ДМИТРИЕВ, 2007

Введение. При изучении особенностей взаимодействия в системе растение — патоген в тканях растений интенсивно накапливаются индуцируемые патогеном полипептиды, так называемые PR-белки. Различают несколько групп PR-белков по их функциональным особенностям: белки, которые принимают участие в опосредованной передаче элиситорного сигнала, белки — катализаторы стрессовых фитогормонов, ферменты синтеза фитоалексинов, а также белки, способные разрушать клеточную стенку патогенов. Последние являются белками прямого действия. К этой группе относятся гидролитические ферменты класса — β -1,3-глюканазы и хитиназы. Они способны разрушать основные компоненты клеточной стенки грибов, таким образом препятствуя прорастанию гиф и распространению гриба [1].

Наличие хитиназ присуще широкому кругу организмов, включая бактерии, грибы, высшие растения. Они играют важную роль в защитных реакциях, направленных на подавление роста фитопатогенных грибов, в состав структуры клеточной стенки которых входит хитин [2].

Растительные хитиназы активируются различными факторами, включая инфицирование патогенами, обработку биотическими элиситорами, фитогормонами и другими веществами. Результаты исследований, проведенных *in vitro*, продемонстрировали ингибирующий эффект растительных хитиназ на рост грибов, которые содержат хитин в составе своих клеточных стенок [3]. *In planta* фермент локализуется непосредственно около клеточных стенок гриба. Хитиназы связываются в основном с уже измененными клеточными стенками [4, 5].

В растительных клетках выделяют два типа хитиназ в зависимости от их пространственной локализации — экзо- и эндохитиназы. Они могут влиять непосредственно на грибы, блокируя рост проникающей в клетку гифы, или опосредованно, путем высвобождения элиситоров из клеточной стенки гриба. Такие вторичные элиситоры, в свою очередь, индуцируют дополнительную хитиназную активность и, возможно, другие защитные реакции у растения-хозяина [6]. Уровень индуцируемой экстрацеллюлярной хитиназной активности до прорастания гиф патогенного гриба в клетку составляет более 80 % общего уровня [7–9]. Внутриклеточная активность этого фермента уве-

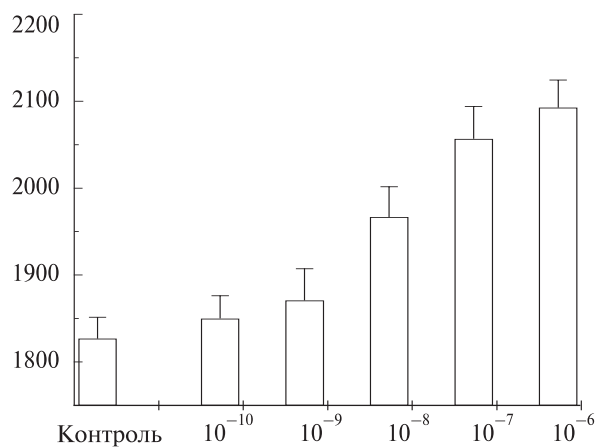


Рис. 1. Индукция хитиназной активности Хт₂-элиситором в суспензионной культуре клеток томата: по вертикали — хитиназная активность, СРМ/мг белка; по горизонтали — концентрация элиситора, М

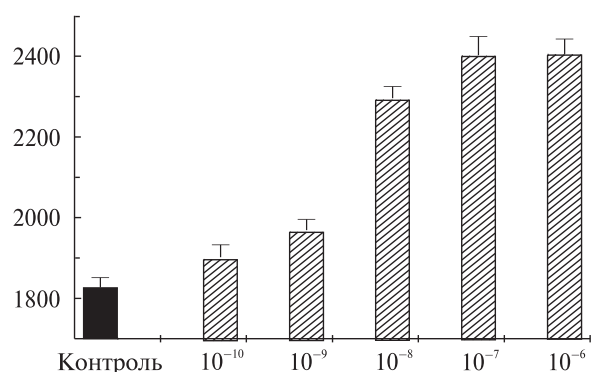


Рис. 2. Индукция хитиназной активности Хт₃-элиситором в суспензионной культуре клеток томата: по вертикали — хитиназная активность, СРМ/мг белка; по горизонтали — концентрация элиситора, М

личивается только после проникновения фитопатогена в клетки и осуществляется за счет вакуолярных хитиназ. Этот процесс происходит при разрушении клетки, когда ее вакуолярное содержимое выделяется в периплазматическое пространство [10].

В последнее время было показано, что кислые эндохитиназы играют важную роль на ранних этапах развития зародышей у моркови [11]. Поскольку хитиназы синтезируются конституционно в определенных органах растений, предполагают, что они могут принимать участие в генерации сигнальных молекул, регулирующих органогенез [12].

Несмотря на интенсивные исследования роли хитиназ, вопрос регуляции хитиназной активности и участия этого фермента в формировании иммунного ответа у растений до сих пор остается невыясненным.

Материалы и методы. В литературе встречаются лишь методы определения ферментативной активности «чистого фермента», выделенного из клеток. Это автоматически исключает все сопутствующие молекулярные взаимодействия вторичных метаболитов, которые имеют место в природных взаимодействиях растений с микроорганизмами. Разработанный нами метод [9] позволяет изучать активность фермента хитиназы в суспензии активно метаболизирующих растительных клеток. Такая модельная система дает возможность изучать процессы изменения ферментативной активности в условиях, наиболее приближенных к онтогенезу растений в природной среде.

Хитиназную активность индуцировали путем добавления наномолярных концентраций олигомеров хитина с разной длиной цепи. Активность фермента определяли в относительных единицах β -распадов ³H-хитина в минуту на 1 мг белка [9]. Белок определяли по методу Лоури [12].

Результаты исследований и их обсуждение. При добавлении олигомера хитина с двумя остатками N-ацетилглюкозамина (Хт₂) к суспензионной культуре клеток томата происходило незначительное увеличение хитиназной актив-

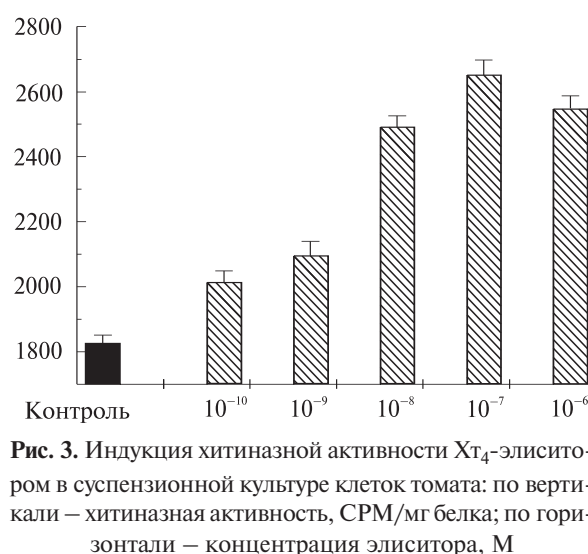


Рис. 3. Индукция хитиназной активности Хт₄-элиситором в суспензионной культуре клеток томата: по вертикали — хитиназная активность, СРМ/мг белка; по горизонтали — концентрация элиситора, М

ности от 1850 до 2090 СРМ/мг белка. ХТ₂-фрагменты вызывали повышение хитиназной активности в концентрациях от 10⁻¹⁰ до 10⁻⁶ М. Результаты экспериментов приведены на рис. 1.

Следует отметить, что хитиназная активность увеличивалась постепенно при повышении концентрации элиситора. Прибавление ХТ₂-элиситора в концентрациях 10⁻⁷ и 10⁻⁶ М стимулировало увеличение ферментативной активности до 2057 и 2090 СРМ/мг белка соответственно, а при концентрациях элиситора 10⁻¹⁰ и 10⁻⁹ М – до 1850 и 1871 СРМ/мг белка. В контрольных, не обработанных элиситором пробах, величина хитиназной активности составляла 1827 СРМ/мг белка. Прибавление элиситора с тремя остатками N-ацетилглюкозамина (ХТ₃-) также приводило к постепенному повышению уровня хитиназной активности (рис. 2).

Максимальную хитиназную активность наблюдали в клетках томата, к которым прибавляли элиситор в концентрации 10⁻⁶ М – 2405 СРМ/мг белка, а минимальную – 1902 СРМ/мг белка при концентрации элиситора 10⁻¹⁰ М. В контроле уровень ферментативной активности оставался неизменным.

Обработка клеток томата хитиновыми фрагментами с четырьмя остатками N-ацетилглюкозамина (ХТ₄-) показала такую же закономерность. Максимальный уровень индуцированной хитиназной активности составлял 2652 СРМ/мг белка при обработке суспензии клеток ХТ₄-элиситором в концентрации 10⁻⁷ (рис. 3). Увеличение концентрации ХТ₄-элиситора до 10⁻⁶ М стимулировало уменьшение уровня ферментативной активности до 2549 СРМ/мг белка. Вероятно, что ХТ₄-элиситор в концентрации 10⁻⁶ М явился максимальным пороговым импульсом для исследованной защитной реакции [9].

Аналогичную картину наблюдали и в случае прибавления хитинового фрагмента с пятью остатками N-ацетилглюкозамина (ХТ₅). При обработке клеток томата ХТ₅-элиситором в концентрации 10⁻⁷ М максимальный уровень хитиназной активности составлял 3135 СРМ/мг белка (рис. 4).

Анализ индуцирующей активности хитиновых фрагментов показал, что использованные элиситоры стимулируют увеличение хитиназной активности в суспензионной культуре клеток томата, при этом увеличение фер-

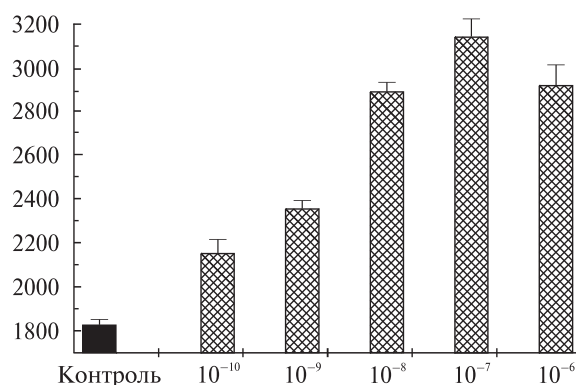


Рис. 4. Индукция хитиназной активности ХТ₅-элиситором в суспензионной культуре клеток томата: по вертикали – хитиназная активность, СРМ/мг белка; по горизонтали – концентрация элиситора, М

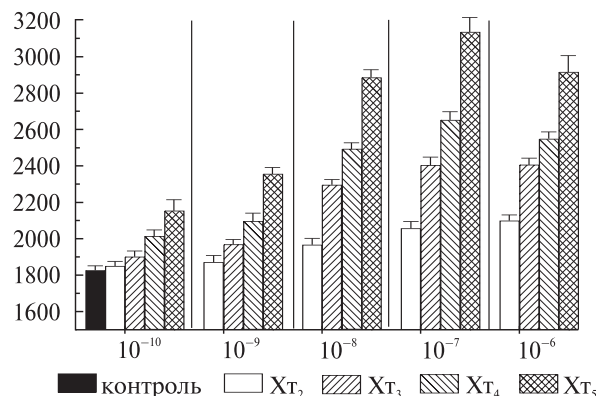


Рис. 5. Сравнительная характеристика хитиназной активности в клетках томата в зависимости от концентрации прибавленного элиситора: по вертикали – хитиназная активность, СРМ/мг белка; по горизонтали – концентрация элиситоров, М

ментативной активности зависит от химического строения и концентрации индукторов.

На рис. 5 показано динамику увеличения индуцированной хитиназной активности в зависимости от концентрации элиситоров. Ферментативная активность в клетках томата повышалась при увеличении длины хитиновых фрагментов. Например, при концентрации элиситоров 10⁻⁹ М уровень хитиназной активности в экспериментальных образцах составлял 1871 СРМ/мг при добавлении ХТ₂-фрагмента, 1969 СРМ/мг – ХТ₃-фрагмента, 2095 СРМ/мг – ХТ₄-фрагмента и 2355 СРМ/мг – ХТ₅-фрагмента. Сходные закономерности в индуцирующей

активности хитиновых фрагментов наблюдали для всего диапазона концентраций исследуемой защитной реакции. Практически во всех случаях повышение концентрации элиситоров выше 10^{-7} М не приводило к дальнейшему увеличению хитиназной активности. В пробах, обработанных X_{T_4} - и X_{T_5} -фрагментами, ферментативная активность даже уменьшалась.

Таким образом, можно сделать вывод, что каждый из использованных нами биотических элиситоров имеет свой порог в индукции хитиназной активности в клетках томата, после достижения которого не происходит дальнейшего увеличения ферментативной активности. Для X_{T_3} -, X_{T_4} -, X_{T_5} -фрагментов он составил 10^{-7} М. Исключением стал олигомер хитина с двумя остатками N-ацетилглюкозамина, который продемонстрировал минимальную элиситорную активность в индукции исследуемой защитной реакции. В концентрации 10^{-6} М этот элиситор стимулировал незначительное увеличение хитиназной активности в культуре клеток томата. Его элиситорная активность была на порядок меньше, чем индуцирующая активность других хитиновых фрагментов. Подобные результаты в индуцирующей активности этого элиситора были показаны в ряде работ Боллера, на примере других защитных реакций, в растительных клетках [13–15].

Выводы. В результате работы была изучена индуцированная хитиназная активность в суспензионной культуре клеток томатов. Определены основные закономерности экзохитиназной активности в растительных клетках. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о наличии концентрационного порога индуцирующего воздействия элиситоров в реакции увеличения хитиназной активности. Наличие такого порога, на наш взгляд, может быть обусловлено лимитом рецепторных участков для использованных в работе индукторов. Такие рецепторные участки расположены на плазматической мембране клеток и имеют сайт-специфическое связывание с сигнальными молекулами разной химической природы [17]. После узнавания элиситоров рецепторами происходит дальнейшая передача сигнала внутрь клетки при помощи системы вторичных мессенджеров [1, 18], чем обеспечивается дальнейшая экспрессия генов защитных реакций.

Поэтому изучение системы вторичных мессенджеров, безусловно, является перспективным направлением наших дальнейших научных исследований. Предложенную модельную систему можно использовать для определения ферментативной активности других экстрацеллюлярных ферментов, исследовать их комбинированную активность в культуре клеток любых видов растений. При помощи ингибиторного анализа можно изучать роль сигнальных систем в формировании защитных реакций растений в ответ на стрессы. Используемая модельная система позволяет также проводить изучение модуляторных эффектов, связанных с высвобождением растительных гидролаз.

SUMMARY. The levels of chitinase activity induced with elicitors in tomato cells have been detected. It was shown that enzymatic activity depended on degree of polymerization and concentration of biotic elicitors.

РЕЗЮМЕ. Визначено величину хітиназної активності, індукованої в суспензійній культурі клітин томата. Показана залежність зростання ферментативної активності від розміру та концентрації доданих до клітин біотичних еліситорів.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Тарчевский И.А.* Сигнальные системы клеток растений. – М.: Наука, 2002. – 290 с.
2. *Melchers L., Apotheker-de Groot M., Knaap J., Ponstein A., Sela-Buurlage M., Bol J., Cornelissen B., Elzen P., Lithorst H.* A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity // *Plant J.* – 1994. – 5. – P. 469–480.
3. *Broekaert W.F., Parijs J.V., Allen A.K., Peumans W.J.* Comparison of some molecular, enzymatic and antifungal properties of chitinases from thorn-apple, tobacco and wheat // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 1988. – 33. – P. 319–331.
4. *Mauch F., Mauch-Mani B., Boller T.* Antifungal hydrolases in pea tissue. 2. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase // *Plant Physiol.* – 1988. – 88. – P. 936–942.
5. *Schneider-Muller S., Kurosaki F., Nishi A.* Role of salicylic acid and intracellular Ca^{2+} in the induction of chitinase activity in carrot suspension culture // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 1994. – 45. – P. 101–109.
6. *Barber M.S., Bertram R.E., Ride J.P.* Chitin oligosaccharides elicit lignification in wounded wheat leaves // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 1989. – 34. – P. 3–12.
7. *Spanu P., Boller T., Ludwig A., Wiemken A., Faccio A., Bonfante-Fasolo P.* Chitinase in roots of mycorrhizal

- Allium porrum*: regulation and localization // *Planta*. — 1989. — **177**. — P. 447–455.
8. Benhamou N., Joosten M., De Wit P.J.G.M. Subcellular localization of chitinase and of its potential substrate in tomato root tissue infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* // *Plant Physiol.* — 1990. — **92**. — P. 1108–1120.
9. Ємельянов В.І., Дмитрієв О.П., Гродзінський Д.М. Індукція хітиназної активності хітиновими фрагментами різної довжини в суспензійній культурі клітин томата (*Lycopersicon esculentum*) // Доп. НАН України. — 1999. — № 11. — С. 156–158.
10. Mauch F., Staehelin L.A. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves // *Plant Cell*. — 1989. — **1**. — P. 447–457.
11. Jong A., Cordewener J., Lo Schiavo F., Terzi M., Vandekerckhove J., Kammen A., De Vries S.C. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase // *Plant Cell*. — 1992. — **4**. — P. 425–433.
12. Collinge D.B., Kragh K.M., Mikkelsen J.D., Nielsen K.K., Rasmussen U., Vad K. Plant chitinases // *Plant J.* — 1993. — **3**. — P. 31–40.
13. Скоупс Р. Методы очистки белков : Пер. с англ. — М.: Мир, 1985. — 260 с.
14. Boller T. Chitinase : A defense of higher plants against pathogens // Plenum publishing corporation, 1986.
15. Boller T., Metraux J.P. Extracellular localization of chitinase in cucumber // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* — 1988. — **33**. — P. 11–16
16. Boller T., Gehri A., Mauch F., Vogeli U. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function // *Planta*. — 1983. — **157**. — P. 22–31.
17. Boller T. Chemoperception of microbial signals in plant cells // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* — 1995. — **46**. — P. 189–214.
18. Дмитрієв А.П. Фитоалексины и их роль в устойчивости растений. — К.: Наук. думка, 1999. — 209 с.

Поступила 21.09.06