

ПРОТЕОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЕЙСТВИЯ ХИТОЗАНА И N-КАРБОКСИМЕТИЛХИТОЗАНА НА КОРНИ ГОРОХА

В.Г. Яковлева*, И.А. Тарчевский*, А.Н. Левов**

*Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН, Казань,
E-mail: yakovleva@mail.knc.ru

**Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, E-mail: enzyme@bioengi.ac.ru

PROTEOMIC INVESTIGATION OF THE EFFECT OF CHITOSAN AND N-CARBOXYMETHYLCHITOSAN ON PEA ROOTS

V.G. Yakovleva*, I.A. Tarchevsky*, A.N. Levov**

*Kazan Institute of biochemistry and biophysics of RAS, Kazan,
E-mail: yakovleva@mail.knc.ru

**Centre bioengineering RAS, Moscow, E-mail: enzyme@bioengi.ac.ru

ABSTRACT

Proteomic investigation of the effect of chitosan 3,5 kD and N-carboxymethylchitosan revealed that both these compounds induced similar and distinct changes in the content of the pea root proteins. A part of these proteins was identified including those which increased the resistance to pathogens. N-carboxymethylchitosan caused an intensive branching of the lateral roots.

Внимание исследователей всегда привлекала проблема управления иммунитетом растений. Было обнаружено, что соединения, которыми «обмениваются» при контакте, с одной стороны, патогенные грибы и бактерии, а с другой — растения, могут вызывать стимуляцию фитоиммунитета. К числу таких соединений (элисаторов) относятся олигосахариды, освобождающиеся из полисахаридов клеточных стенок патогенов и растений под воздействием ферментов, продуцируемых растениями при их инфицировании патогенами. Данные о физиологически активных хитоолигосахаридов были получены давно [1], но имеется мало сведений о природе ответных реакций растений на их действие.

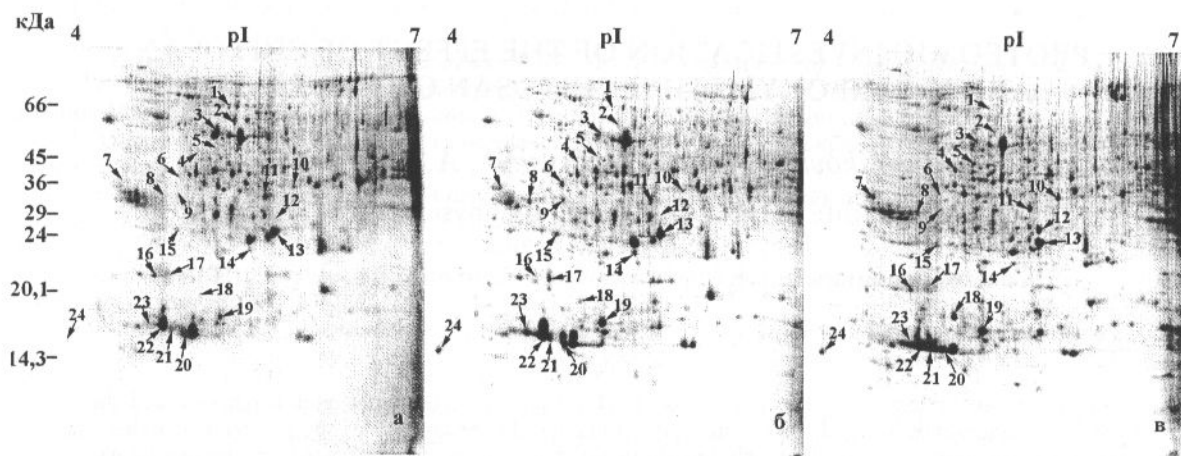
Оказалось, что элиситорная активность олигосахаридов из клеточных стенок растений намного меньшая, чем хитоолигосахаридов из клеточных стенок грибов [2]. Это заставило обратить на последние особое внимание как на потенциальных эффективных составляющих антигрибных и антибактериальных препаратов, способных повышать устойчивость растений. Были также предприняты попытки получения более активных форм хитоолигосахаридов с помощью их химической модификации с целью использования образующихся продуктов для повышения эффективности выработки системного иммунитета у сельскохозяйственных растений [3, 4].

При расшифровке механизмов защитного действия олигосахаридов было обнаружено, что они способны «включать» некоторые сигнальные системы клеток растений, что, как известно, приводит к репрограммированию экспрессии генов и синтеза белков [5]. Действительно, было обнаружено изменение активности некоторых защитных белков — ферментов под влиянием этих элисаторов, но анализ их влияния на всю совокупность белков (на протеом) растений до сих пор не проводился. В связи с этим нами были проведены протеомные исследования действия хитозана и N-карбоксиметилхитозана на растения гороха (*Pisum sativum* L.).

В работе использовали низкомолекулярный хитозан 3,5 кДа и N-карбоксиметилхитозан в концентрации 0,07 мг/мл. 8-дневные проростки ставили на растворы этих соединений, через 5 дней корни отделяли от остального растения и фиксировали жидким азотом. Экстракцию и осаждение растворимых белков проводили 0,025 М Трис-НСl буфером рН 8,0 [6]. Белки растворяли в буфере, содержащем 6 М мочевины, 2 М тиомо-

чевины, 2% Chaps и 2% тритона X-100, 50 мМ ДТТ и 0,5% амфолинов рН 3–10. Разделение белков осуществляли с помощью двумерного электрофореза с использованием стрипов (17 см) с иммобилизованным линейным градиентом рН 4–7 («Bio-Rad», США).

Пластины геля окрашивали Кумасси G-250. Белковые пятна вырезали и проводили триптический гидролиз белка. Масс-спектры фрагментов белков получали на тандемном MALDI-TOF-TOF скоростном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия). Идентификацию белков проводили при помощи программы Mascot (www.matrix-science.com). Поиск белков проводился по базе данных NCBI, (подбаза — растения).



Влияние хитозана и N-карбоксиметилхитозана на набор и содержание растворимых белков в корнях гороха. Окрашивание белков на 2Д-электрофореграммах производилось с помощью Кумасси G-250: а — контроль; б — действие хитозана 3,5 кДа; в — действие N-карбоксиметилхитозана

Проведенные протеомные исследования показали, что оба исследовавшихся хитозана изменяли набор и содержание растворимых белков корней гороха (рис.). Разделение белков 2Д-электрофорезом в диапазоне рН 4–7 выявило, что обработка низкомолекулярным хитозаном 3,5 кДа повлияла на содержание 19 белков, N-карбоксиметилхитозаном — 21 белка (см. рис. б, в). Оба исследовавшихся элиситора вызывали изменение содержания 13 одних и тех же растворимых белков корней. Усиливалась окраска белковых пятен в низкомолекулярной области (пятна 19–24), а также окраска пятен 7, 13, 14, 15, но ослаблялась интенсивность окраски 3 белковых пятен (№ 1, 2, 3), по сравнению с контролем (см. рис. а, б, в). Была выявлена и специфика действия исследуемых элиситоров на белковый спектр корней. Только низкомолекулярный хитозан индуцировал синтез 2 новых белков с молекулярной массой 37,3 кДа, рI 5,0 и 33,8 кДа, рI 5,0 (пятна 6, 9) и повышал содержание белка № 8, кроме того наблюдалось исчезновение белка (пятно 16) с М.м 21,4 кДа, рI 4,74 (см. рис. б).

В отличие от низкомолекулярного хитозана N-карбоксиметилхитозан индуцировал синтез двух мажорных белков с м.м 27,9 кДа, рI 5,75 и 19,3 кДа, рI 5,1 (пятна 12, 18) и усиливал окраску 4 белковых пятен (4, 5, 10, 11) (см. рис. в).

Нами была проведена частичная идентификация по «пептидному фингерпринту» некоторых белков, индуцированных обоими хитозанами: L-аскорбатпероксидазы (пятно 13), глутатион-S-трансферазы (пятно 15), белка 14-3-3 (пятно 8), бета-субъединицы В трансляционного фактора I элонгации (пятно 7), АВА-responsive proteins (пятна 20, 22).

По данным авторов [7], в низкомолекулярной области вместе с АВА responsive protein на геле располагаются PR10-белки. Мы обнаружили в этой области повышение содержания нескольких белков, среди которых, вероятно, могут содержаться и PR10-белки. Значительная часть из перечисленных выше белков относится к защитным белкам (аскорбатпероксидаза, глутатион-S-трансфераза, АВА-responsive protein), повышающим устойчивость растений к патогенам и абиотическим стрессорам. Адапторный белок 14-3-3 участвует в функционировании сигнальных систем и деградации белков, а трансляционный фактор I элонгации принимает участие в их синтезе. В настоящее время нами осуществляется идентификация других хитозан-индуцированных белков.

Маркерным белком N-карбоксиметилхитозана можно считать мажорный белок (№ 12), который появлялся в большом количестве только при действии этого соединения, но не индуцировался изученными нами ранее стрессовыми фитогормонами и медиаторами сигнальных систем. Хитозан 3,5 кДа хотя и вызывал изменение набора белков, но их нельзя отнести к маркерным, так как они были нами обнаружены и при действии стрессовых фитогормонов.

Особо следует отметить необычный ростстимулирующий эффект N-карбоксиметилхитозана. Помещение проростков гороха на раствор N-карбоксиметилхитозана привело к сильному ветвлению боковых корней гороха, совершенно отсутствовавшему в контрольном варианте и в варианте с хитозаном 3,5 кДа. В связи с этим представляет интерес обнаруженный нами факт аналогичного ветвления у растений гороха боковых корней, вызванного нитропруссидом (продуцентом NO).

Ранее был выявлен факт активации образования, но не ветвления боковых корней у гороха под влиянием индолилбутириловой кислоты (ИБК), вызвавшей накопление NO в местах закладки боковых корней [8]. По всей вероятности, N-карбоксиметилхитозан, подобно ИБК, способен вызывать активацию образования NO вследствие активации NO-сигнальной системы.

Работа поддержана грантом РФФИ № 07-04-12051-офи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Roberts W.K., Selitrennikof C.P. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity // J. Gen Microbiol. 1988. V. 134. N. 1. P. 169–176.
2. Inui H., Yamaguchi Y., Hirano S. Elicitor actions of N-acetylchitooligosaccharides and laminarioligosaccharides for chitinase and L-phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1997. V. 61. N. 6. P. 975–978.
3. Ильина А.В., Варламов В.П. Галактозилированные производные низкомолекулярного хитозана // Прикл. биохим. и микробиол. 2007. Т. 43. № 1. С. 82–87.
4. Озерецковская О.А., Васюкова Н.И., Зиновьева С.В. Хитозан как элиситор индуцированной устойчивости растений // Хитин и хитозан.— М.: Наука, 2002. С. 339–345.
5. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений.— М.: Наука, 2002. 294 с.
6. Яковлева В.Г., Тарчевский И.А., Егорова А.М. Салицилатиндуцированное изменение набора и содержания белков в корнях гороха // ДАН. 2007. Т. 415. № 6. С. 832–836.
7. Colditz F., Nyamsuren O., Niehaus K. et al. Identification of *Medicago truncatula* proteins induced in roots after infection with the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiche* // Plant Mol. Biol. 2004. V. 55. P. 109–120.
8. Kolbert Z., Bartba B., Erdei L. Osmotic stress- and indole-3- butyric acid induced NO generation are partially distinct processes in root growth and development in *Pisum sativum* // Physiol. Plant. 2008. V. 133. N. 2. P. 406–416.