

0722639-1

На правах рукописи

Лазар

Лазарева Людмила Валерьевна

**ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ СТРЕСС - ФАКТОРОВ НА
АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНУЮ СИГНАЛЬНУЮ СИСТЕМУ РАСТЕНИЙ,
СОДЕРЖАНИЕ И СЕКРЕЦИЮ ЦИКЛОНУКЛЕОТИДОВ.**

03.00.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

**НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА
КФУ**



0000975578

Казань 2001

Работа выполнена в лаборатории метаболизма белков Казанского института биохимии
и биофизики Казанского Научного Центра Российской Академии Наук

Научные руководители:

академик РАН, профессор Тарчевский И.А

доктор биологических наук,
профессор Каримова Ф.Г.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор Хохлова Л.П.

доктор биологических наук,
профессор Гордон Л.Х.

Ведущая организация

Казанская государственная
сельскохозяйственная академия
кафедра ботаники

Защита состоится “ 29 ” июня 2001г. в 14³⁰ часов на заседании
Диссертационного Совета Д 212. 081. 08 при Казанском Государственном
Университете им. В.И. Ульянова – Ленина, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского Государственного
университета.

Автореферат разослан “ 21 ” мая 2001 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета,
кандидат биологических наук

 А. Н. Аскарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Одна из важных проблем биологии – изучение роли сигнальных систем в механизмах адаптации растений к различного рода биогенным и абиогенным стрессовым воздействиям. Данные литературы свидетельствуют о том, что любой стресс вызывает в клетках растений неспецифические ответные реакции. Например, низкотемпературный стресс кроме специфических белков криопротекторов (COR – proteins) индуцирует синтез других белков, среди которых находятся и патоген – индуцируемые белки, например, хитиназы – ферменты, разрушающие клеточную систему микроорганизмов, инфицирующих растения. Очевидно, клетки растений синтезируют эти соединения «впрок», так как часто вследствие механического повреждения кристаллами льда при низкой температуре клетки разрываются и вслед за этим растения могут инфицироваться различными патогенами. Ответная реакция растений на изменение внешних условий через сигнальные системы предполагает неспецифическую ответную реакцию клеток. Роль аденилатциклазной сигнальной системы в адаптивных реакциях растений до сих пор остается невыясненной. В качестве стрессоров нами использовалось действие на растения низкой положительной температуры и инфицирование микоплазмами.

Цель и задачи исследования. Целью работы было изучение роли аденилатциклазной сигнальной системы в адаптивных реакциях растений к абиотическому и биотическому стрессорам (гипотермии и инфицированию растений микоплазмами).

В задачи исследования входило:

- определить содержание циклических нуклеотидов цАМФ и цГМФ в тканях растений и их секрецию в среду;
- изучить влияние гипотермии и обычно сопровождающего низкие температуры стрессового фитогормона абсцизовой кислоты на содержание циклических нуклеотидов в клетках растений и их секрецию;
- изучить влияние микоплазменной инфекции (микоплазмами *Acholeplasma laidlawii* 118) на цАМФ – и Ca^{2+} - зависимую протеинкиназную активность и уровень фосфорилированности белков растений.

Научная новизна. Гипотермия (4°C) индуцировала повышение содержания цГМФ в клетках растений, что для цАМФ было показано ранее. Впервые показаны

АБК - и Ca^{2+} - индуцированные изменения содержания эндогенного цГМФ и секреции циклонуклеотидов из тканей при гипотермии и инфицировании микоплазмами. Впервые показаны микоплазма-индуцированные изменения цАМФ - и Ca^{2+} - зависимой протеинкиназной активности растворимых белков листьев гороха. Впервые найдено, что инфицирование и этиоляция проростков гороха индуцировали изменение профиля фосфорилированности полипептидов.

Практическая значимость работы. Выявленные нами изменения в клетке под влиянием неблагоприятных факторов внешней среды могут быть полезны для понимания особенностей формирования процессов адаптации и могут служить основой для разработки приемов повышения устойчивости сельскохозяйственных растений к действию неблагоприятных факторов среды и в биотехнологии.

Полученные результаты можно использовать в учебном процессе, при чтении лекций по физиологии, биохимии и биотехнологии растений.

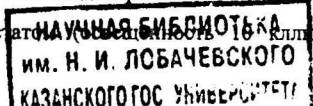
Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на 10-м международном конгрессе микоплазмалогов (Париж, 1994), отчетных конференциях КНЦ РАН (Казань, 1994 - 1995), конференции, посвященной 50-летию КНЦ РАН (Казань, 1995), II-ой Республиканской научной экологической конференции (Казань, 1995), на симпозиуме Всероссийского общества физиологов растений (Пенза, 1996), международной конференции «Сигнальные системы растений» (Москва, 2001).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 работы, подана в печать 1.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 121 странице машинописного текста, содержит 30 рисунков, 2 схемы, 3 таблицы. Список использованной литературы состоит из 260 наименований, из них 170 на иностранном языке.

1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В опытах использовались растения гороха *Pisum sativum* L., кукурузы *Zea mays* L., пшеницы *Triticum vulgare* L., бобов *Vicia faba* L., выращенные на 1/4 среды Хогланда-Арнона I при 25°C. Зеленые растения выращивались под люминесцентными лампами (16 кллоркс), а этиолированные проростки - в термостате.



Гомогенизацию тканей проводили в среде, состоящей из 50 мМ трис-буфера pH 7,5; 1 мМ ДТТ (дитиотреитол); 1 мМ PMSF (фенилметилсульфонилфторид - ингибитор сериновых протеаз); 250 мМ сахарозы; 0,1 мМ теофилина - ингибитора ФДЭ цАМФ; 10 мМ ЭДТА; 3% ПВП (поливинилпирролидон) в ступке, замороженной в лед.

В опытах по влиянию фитогормонов, экзогенного цАМФ, а также различных агентов на содержание циклических нуклеотидов в тканях растений, проростки перед гомогенизацией инкубировались в растворах в течение разного времени в зависимости от условий опыта. В опытах с гипотермией проростки выдерживались при температуре 4°C в холодильной камере.

Инфицирование растений микоплазмами (*Acholeplasma laidlawii* 118) проводили инъектированием суспензии культуры клеток, выращенной на среде Эдварда в течение 5 суток в нижний участок стебля проростков гороха. В качестве контроля на механическое повреждение был введен дополнительный вариант, где использовались растения с инъекцией среды культивирования. Процент заражения определялся методом ДНК - гибридизации в лаборатории д.б.н. Чернова В.М.

Определение содержания циклических нуклеотидов. Гомогенаты тканей и инкубационные среды предварительно очищались по помощи колоночной хроматографии с применением ионообменной смолы Дауэкс (50W x 8 или 1 x 8, 200-400 меш) и высушенной окиси алюминия, нейтральной по Брокману II.

Анализ содержания циклонуклеотидов проводили методом изотопного разведения (Gilman, 1970) с использованием циклонуклеотид-связывающих белков фирм "Амершам" (Великобритания) и "Алга" (С.-Петербург); для определения цГМФ дополнительно использовали антитело, которое имеет высокую специфичность и сродство к цГМФ (cGMP RIA kit «ЧССР»). Радиоактивность проб измеряли на жидкостном спинтillationном счётчике "Дельта-300" (США). Белок определяли по методу Лоури в ТХУ-осадках или осадке при кипячении проб (Lowry et al., 1951). Результаты опытов обработаны статистически.

Определение протеинкиназной активности. Активность протеинкиназ определяли по методу Kikkawa et al. (1983) с модификациями (Каримова и др., 1991) во фракции растворимых белков гомогената, отделенной центрифугированием при 20000 g в течение 5 минут. Удельную активность фермента выражали в пикомолях ^{32}P на мг белка в мин.

Фосфорилирование белков in vivo проводилось в течение 2-х часов путём инкубации при освещенности 10 кллюкс или на слабом рассеянном свете целых

проростков, либо отделённых стеблей с листьями в растворах с ^{32}P -ортофосфорной кислотой и эффекторами. Ткани гомогенизировались в среде, содержащей ингибиторы фосфатаз для предотвращения дефосфорилирования белков; фосфорилирование белков определялось в надосадочной жидкости, полученной центрифугированием гомогената при 20000g. Проводилось также определение поглощения ^{32}P -ортофосфата проростками. Электрофорез фосфорилированных белков проводили по Laemmli (1970) в ПААГ с 0,1%-ным ДДС-Na с линейным градиентом 6-16% акриламида с последующей экспозицией геля 14 дней при температуре -20°C . Гели и радиоавтографы сканировали на денситографе ИФО-450 (Казань).

Эксперименты проводились в трёх биологических повторностях 2-9 раз. В таблицах и рисунках приведены средние арифметические значения и средние квадратичные ошибки.

В работе использовали (гамма- ^{32}P)-АТФ (удельная активность 1000 Кюри/ммоль) Ташкентского ПО "Изотоп", ^{32}P -ортофосфорную кислоту (удельная активность 5000 Кюри/ммоль, ПО "Изотоп", Mg_2Cl_2 фирмы "ВДН"(Англия), PIPES, ДТТ, ЭГТА, цАМФ, SDS, акриламид и бис-акриламид, Кумасси R-250, PMSF фирмы "Sigma". Соли вольфрамата, молибдата и ванадата отечественные, марки "ХЧ".

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Действие низкотемпературного стресса на содержание цАМФ в клетках растений; влияние АБК и Ca^{2+}

Двухчасовая инкубация отделённых стеблей гороха при 4°C вызывала в листьях увеличение содержания эндогенного цАМФ в разных опытах на 30 - 50% (рис. 1, оп. 1). Добавление фитогормона АБК, содержание которого в растениях в условиях низкотемпературного стресса повышается, вызывало уменьшение содержания эндогенного цАМФ в листьях гороха (рис. 1, оп. 2).

Результаты эксперимента, где сопоставлялись эффекты экзогенных АБК и Ca^{2+} в отдельности и совместно показали, что они действуют на содержание цАМФ сходным образом (рис. 2). Повышение эндогенного уровня цАМФ в клетках растений в ответ на низкотемпературный стресс свидетельствует о том, что одним из этапов развития адаптивных реакций растений на стрессор является повышение эндогенного уровня цАМФ в клетках необходимого для запуска реакций адаптации, возможно, в результате

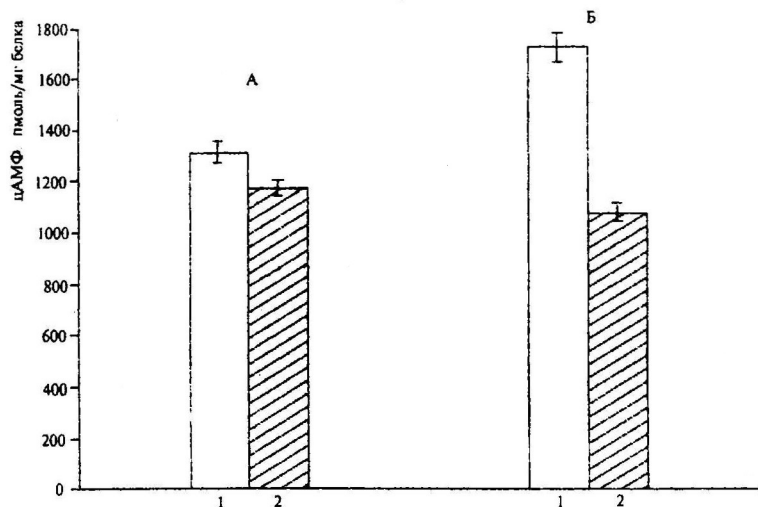


Рис. 1. Влияние низкой положительной температуры 4°C и экзогенного АБК (10⁻⁶ М) за два часа инкубации на содержание эндогенного цАМФ в листьях 3-дневных этиолированных проростков гороха, отделенных от корней: А - при 25°C; Б - при 4°C. 1 - контроль, вода; 2 - АБК.

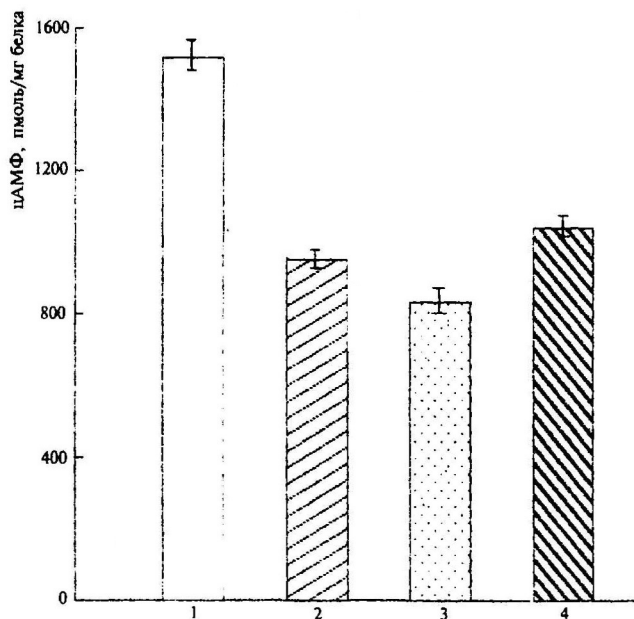


Рис. 2. Влияние АБК (10⁻⁶ М) и Ca²⁺ (10⁻³ М) на содержание эндогенного цАМФ в листьях 7-дневных зеленых листьев гороха, инкубированных в течение 2-х часов при температуре 4°C. 1 - контроль, вода; 2 - АБК; 3 - Ca²⁺; 4 - АБК + Ca²⁺.

цАМФ - зависимого фосфорилирования ключевых белков метаболизма. Это положение подтверждаются нашими данными (рис. 1) и данными Яворской и Драговоз (1994) об увеличении содержания эндогенного цАМФ в листьях ржи под влиянием низкой положительной температуры (20°C): на 25% - за 2 часа и на 92% - за 3 часа. О необходимости цАМФ для адаптивных реакций на низкотемпературный стресс в клетках растений гороха свидетельствуют также данные о цАМФ - зависимом фосфорилировании белков при гипотермии (Каримова, Жуков, 1991; Ягушева, 2000).

Изменение уровня эндогенного цАМФ под действием гормона АБК может быть вызвано изменением гормоном активности двух ферментов цАМФ - мессенджерной системы: аденилатциклазы, катализирующей образование цАМФ, и фосфодиэстеразы, гидролизующей цАМФ (ФДЭ цАМФ).

Известно, что ФДЭ цАМФ активируется при повышении содержания свободных ионов кальция (Ca^{2+}), которые в комплексе " Ca^{2+} - кальмодулин" являются активатором ФДЭ цАМФ (Радченко, 1991). Известно также, что АБК увеличивает содержание Ca^{2+} в клетках растений (Owen, 1988; Ягушева, 2000). Исходя из этих сведений можно полагать, что АБК мог индуцировать повышение активности ФДЭ через комплекс " Ca^{2+} - кальмодулин". Подтверждением этому косвенно могут служить данные Ягушевой (2000) о значительном увеличении уровня фосфорилированности полипептида 10 кД экзогенными АБК и цАМФ за 2 часа инкубации растений гороха при 4°C. Автор полагает (согласно данным литературы), что белок 10 кД мог быть белковым регулятором ФДЭ цАМФ, стимулирующимся Ca^{2+} и АБК.

АБК в первый момент действия мог, активируя аденилатциклазу, увеличить уровень цАМФ внутри клетки, который, связываясь с белками Ca^{2+} - каналов, способен индуцировать увеличение содержания Ca^{2+} в клетке (Volotovskiy et al., 1998): далее Ca^{2+} в комплексе с кальмодулином мог активировать ФДЭ цАМФ, тем самым индуцируя снижение уровня цАМФ в клетках.

Таким образом, зарегистрированное в наших опытах уменьшение содержания эндогенного цАМФ за 2 часа действия АБК и Ca^{2+} , вместе и отдельно, может быть обусловлено усилением гидролиза цАМФ фосфодиэстеразой вследствие активации комплексом Ca^{2+} - кальмодулин ее белкового регулятора, стимулирующегося АБК и Ca^{2+} или же прямой активацией комплексом Ca^{2+} - кальмодулин ФДЭ цАМФ.

2.2. Влияние различных условий на содержание цГМФ в клетках растений

Уровень другого циклического нуклеотида - цГМФ также контролирует метаболические пути в тканях высших растений (Bowler et al., 1994).

При инкубации этиолированных проростков гороха в течение 2-х часов в условиях гипотермии (4°C) уровень эндогенного цГМФ повышался по сравнению с контролем (рис.3, оп. 1). Изменение содержания цГМФ в тканях гороха под действием низкой температуры направлено в ту же сторону (повышение), что и изменение цАМФ (рис. 1, оп. 1).

Учитывая роль АБК при стресс - реакциях в качестве первичного сигнала (посредника), нами изучалось действие экзогенного АБК (рис. 3 - 4) и вторичного мессенджера цАМФ (рис. 4) на содержание цГМФ в тканях растений. За 2 часа АБК индуцировал повышение уровня цГМФ в листьях гороха по сравнению с контрольным вариантом как в оптимальных условиях, так и при гипотермии. Напомним, что уровень цАМФ в этих условиях понижался абсцизовой кислотой (рис. 1, 2). Повышение уровня цГМФ в клетках, по современным представлениям, связывают с активацией растворимой гуанилатциклазы под влиянием вторичного мессенджера NO, синтезируемого ферментом NO - синтазой. Наши результаты свидетельствуют, что АБК "включает" NO – синтазную сигнальную систему.

Под действием экзогенного цАМФ (рис. 4) также наблюдалось увеличение содержания цГМФ в тканях гороха при гипотермии. Однако, эффект цАМФ был несколько меньше эффекта АБК. Сходное действие АБК и цАМФ на содержание цГМФ в наших опытах можно объяснить согласно представлениям об активации абсцизовой кислотой аденилатциклазы и повышении уровня цАМФ, который может, связываясь с белками Ca^{2+} - каналов; индуцировать повышение содержания Ca^{2+} в клетке. С описанных позиций возможно объяснить воспроизведение в наших опытах эффекта АБК вторичным мессенджером цАМФ. Данные наших опытов (рис. 3 – 4) свидетельствуют о том, что содержание цГМФ в растениях находится под гормональным контролем и участвует в реализации адаптивных реакций растений на неблагоприятные условия среды.

2.3. Секретция циклических нуклеотидов тканями растений, влияние гормонов и гипотермии

Известно, что долгосрочное увеличение содержания циклонуклеотидов опасно для клеток, поэтому существуют механизмы, понижающие их содержание в клетках,

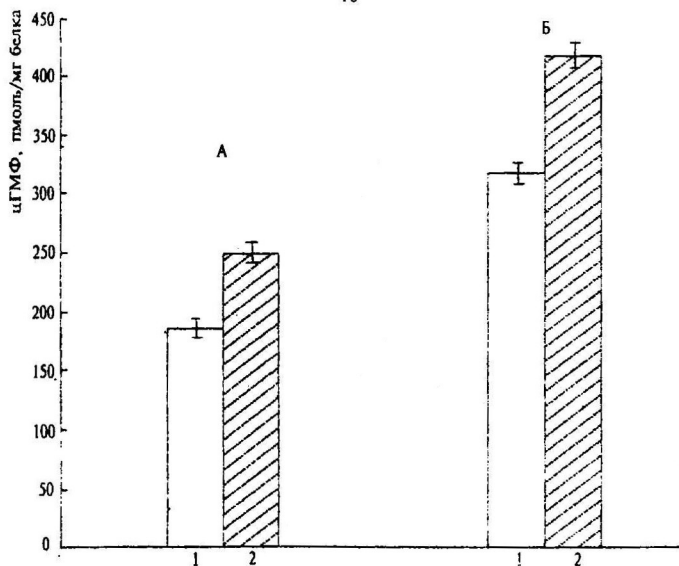


Рис. 3. Влияние АБК (10^{-6} М) на содержание цГМФ в листьях 4-дневных зеленых проростков гороха, отделенных от корней при низкотемпературном стрессе в течении 2-х часов:

А - 25°C ; Б - при 4°C . 1 - контроль, вода; 2 - АБК.

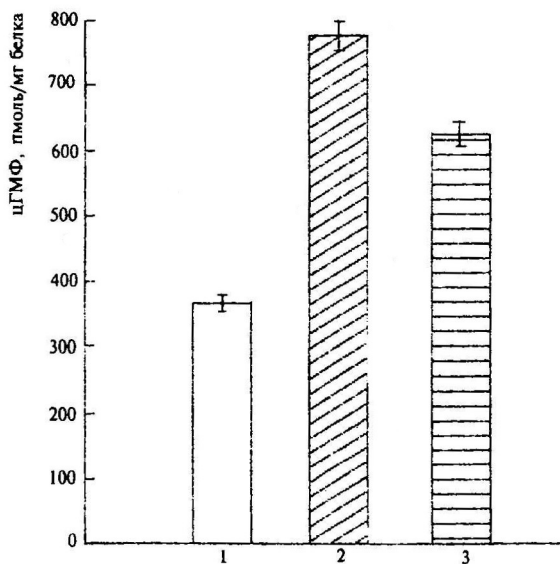


Рис. 4. Влияние АБК (10^{-6} М) и цАМФ (10^{-6} М) на содержание цГМФ в листьях 7-дневных этилированных проростков гороха при низкотемпературном стрессе (2 часа, 4°C).

1 - контроль, вода; 2 - АБК; 3 - цАМФ.

один из которых - выделение циклонуклеотида в среду, окружающую клетку, что сначала было обнаружено у животных объектов. (Makman, Sutherland, 1965). Секреция цАМФ была также показана на клетках *E. coli* (Goldenbaum, Hall, 1979); на клетках водорослей и высших растений (Franko, 1983; Ashton, Polya, 1977, 1978; Lin, Varner, 1972; Brewin, Northcote, 1973; Каримова, Гордон и др., 1993).

Наши исследования секреции цАМФ проводились на разных видах высших растений (горох, кукуруза, пшеница), выращенных в разных условиях.

Данные опытов свидетельствуют о значительном содержании цАМФ в инкубационных растворах, которое составляло от 22 до 55% от его эндогенного содержания (табл 1). Фитогормон ИУК за 30 минут повысил содержание эндогенного цАМФ и его секрецию, что согласуется с полученными ранее в нашей лаборатории данными (Тарчевская, 1989). Экзогенные Ca^{2+} уменьшили содержание эндогенного цАМФ на 40%, но одновременно увеличили его секрецию до 55% по сравнению с контролем. ИУК совместно с Ca^{2+} понизили содержание эндогенного цАМФ в сравнении с ИУК, однако наблюдалось значительное усиление секреции цАМФ. Увеличение содержания эндогенного цАМФ и его секреции в инкубационную среду, очевидно, было вызвано активацией аденилатциклазы фитогормоном ИУК, т.к. в наших опытах в среде всегда присутствовал ингибитор фосфоэстеразы цАМФ - теофиллин.

Большая часть другого циклонуклеотида - цГМФ, образованного в клетках листьев гороха за 2 часа после отделения от корней, также секретировалась в среду инкубации (рис. 5А, оп. 1). Экзогенная АБК понизила содержание всего наработанного в листьях цГМФ за 2 часа при 25°C на 69%, секреция цГМФ понижалась гормоном на 30%. Эти результаты свидетельствуют о том, что как образование, так и секреция цГМФ клетками растений находится под контролем фитогормонов. 2-х часовая гипотермия (4°C) не изменила общего количества цГМФ, наработанного клетками растений, однако снизила его секрецию (рис.5Б, оп. 2). При гипотермии экзогенная АБК индуцировала повышение как содержания цГМФ в клетках, так и его секрецию в среду (рис. 5Б). Заметим, что в этих условиях АБК понижала содержание и секрецию другого циклонуклеотида цАМФ.

Таблица 1

Влияние Ca^{2+} , ИУК, а также совместного действия Ca^{2+} и ИУК на секрецию цАМФ отсеченными колеоптилями кукурузы, время инкубации 30 мин.

Условия выращивания, объект, возраст		^3H , пмоль цАМФ/мг белка			
		Контроль, вода	Ca^{2+} 10^{-3}M	ИУК 10^{-9}M	Ca^{2+} + ИУК
Кукуруза, На 1/4 раствора Хогланда- Арнона I, 4 дня	Колеоптиль	1	2	3	4
		4244±94	2555±105	5977±92	5214±20
	Инкубацион- ный раствор	966±10	1409±15	1334±29	2235±28

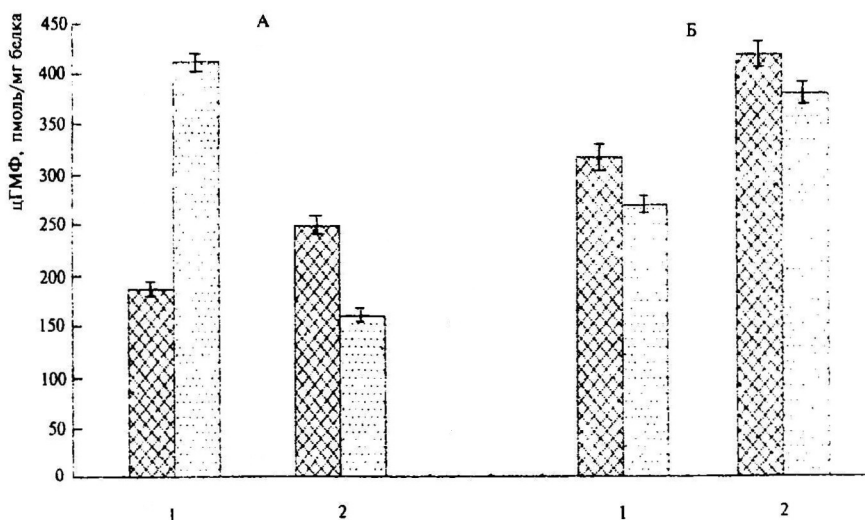


Рис. 5. Влияние АБК (10^{-6}M) и гипотермии за 2 часа на содержание и секрецию цГМФ клетками листьев 4-дневных зеленых проростков гороха, отделенных от корней: А - при температуре 25°C ; Б - при температуре 4°C . 1 - контроль, вода; 2 - АБК.

▨ - в ткани

□ - в инкубационном растворе

Результаты наших опытов показывают, что секретируемое в инкубационный раствор количество цАМФ и цГМФ было сопоставимо, а порой и несколько выше, чем его содержание в тканях. Содержание и секреция цАМФ и цГМФ из клеток растений зависели от условий среды (гипотермии), а также от присутствия фитогормонов АБК и ИУК.

Наличие данных о секреции циклонуклеотидов в окружающую среду клетками ставит вопрос о целесообразности этого процесса и роли циклонуклеотидов в межклеточном пространстве. Полагают, что внеклеточный цАМФ принимает участие в регуляции внеклеточных процессов (Шиян, Лазарева, 1988) и выполняет роль межклеточного посредника (Федоров, 1990). Кроме того полагают, что вынос цАМФ из клеток может осуществляться для его экстраклеточного гидролиза ФДЭ цАМФ (Franco, 1983).

Таким образом, секреция цАМФ и цГМФ в окружающую среду принадлежит важная роль в регуляции их концентрации в клетках, наряду с активностью аденилатциклазы, гуанилатциклазы и фосфодиэстераз циклических нуклеотидов. Это явление, по всей видимости, характерно для клеток всех ступеней развития: от прокариот до высших эукариот.

2.4. Влияние микоплазменной инфекции на содержание цАМФ и его выход в среду.

Изменение характера колебания содержания эндогенного цАМФ при инфицировании (от 30 минут до 7 суток) интактных этиолированных проростков гороха микоплазмами выражалось в изменении фазности колебания в начальный период инфицирования и на 4 - 5-е сутки (рис. 6). Колебание содержания цАМФ во времени наблюдалось и в тканях контрольных растений, что согласуется с данными, полученными ранее в нашей лаборатории (Каримова, Гордон и др., 1993), а также данными литературы (Franko, 1983). Содержание цАМФ в клетках инфицированных растений мало менялось по сравнению с контрольным вариантом, за исключением 0.5 и 4-го часа. Изменение содержания цАМФ в начальный период инфицирования проростков может быть опосредовано изменением как гормонального статуса растений, так и действием токсинов микоплазм или других соединений, образование которых индуцируется при взаимодействии "патоген – хозяин" (Dixon, Lamb, 1990). Изменение содержания эндогенного цАМФ при патогенезе было показано Ту (1979) при инфицировании белого клевера вирусом GYMV в течение 3 – х недель; обработка

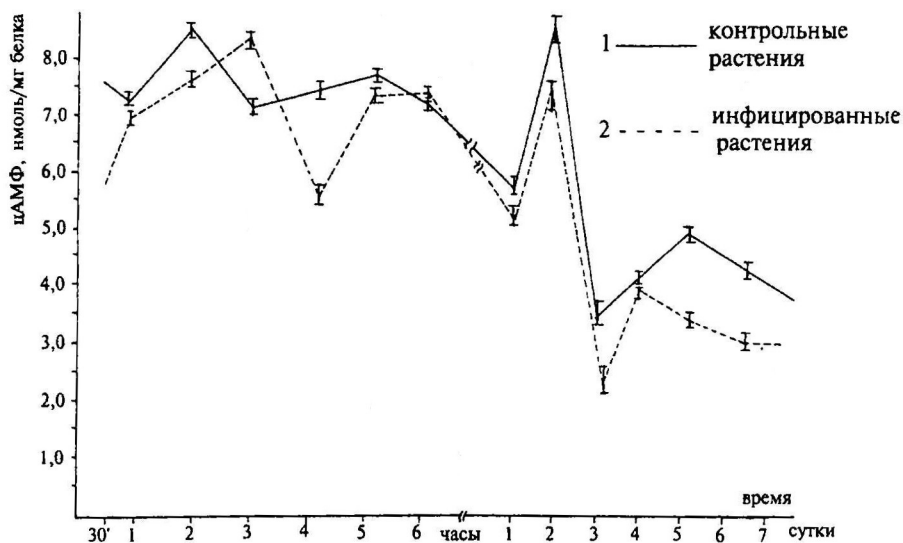


Рис. 6. Влияние инфицированных интактных 3-дневных этилированных проростков гороха микоплазмами на содержание цАМФ в зависимости от времени.

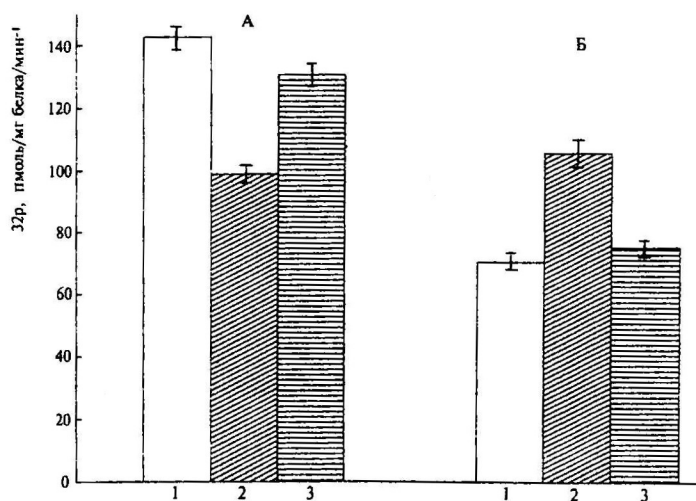


Рис. 7. Влияние микоплазменной инфекции (30 минут) на протеинкиназную активность этилированных листьев 3-дневных проростков гороха: А - во фракции растворимых белков; Б - в осадочной фракции белка (20000g).

клубней картофеля арахидоновой кислотой, способной индуцировать в них защитные реакции, вызывала краткосрочное увеличение содержания цАМФ в течение 2 – 4 часов. Однако через 24 часа эффект уменьшался, и содержание циклонуклеотида приближалось к контрольному (Очеретина, Озерцовская и др., 1990).

В наших экспериментах через 2 часа после инфицирования содержание АМФ было практически одинаковым в листьях контрольного варианта и инфицированных микоплазмами растений. За это время выход циклонуклеотида в среду инкубации растений у инфицированных проростков был несколько выше по сравнению с контрольными при действии абсцизовой кислоты (данные не приведены), что свидетельствует о роли фитогормона АБК в реакциях «патоген - хозяин».

На основании полученных нами данных можно сделать вывод, что микоплазменная инфекция при коротких экспозициях (30 минут) уменьшала содержание цАМФ, что могло быть обусловлено тратой его на фосфорилирование белков или его усиленным гидролизом в процессе адаптации растений. При инфицировании выход циклонуклеотида в окружающую среду находился под контролем АБК.

2.5. Влияние микоплазменной инфекции на протеинкиназную активность и фосфорилирование белков листьев гороха

Изменение фосфорилирования белков при инфицировании растений патогенами может быть следствием изменения активности как протеинкиназ, так и протеинфосфатаз.

За 30 минут инфицирования базальная протеинкиназная активность во фракции растворимых белков (20 000 g) этилированных проростков гороха уменьшилась на 31% (рис. 7А). В то же время инфицирование увеличило активность белков осадка на 49% (рис. 7Б). Увеличение времени инфицирования до 60 минут индуцировало еще большее уменьшение активности растворимых белков (на 45%), тогда как вклад цАМФ – и Ca^{2+} - зависимой протеинкиназной активности повысился, особенно заметно в осадочной фракции (табл. 2, гр. 3, 5), что согласуется с данными литературы о важной роли цАМФ – системы в стресс-реакциях клеток (Дорофеев и др., 1978).

Чтобы судить о влиянии инфицирования на протеинфосфатазную активность. наряду с определением протеинкиназной активности одновременно в эксперименте учитывался уровень фосфорилированности белков. Изменение уровня фосфорилированности растворимых белков (рис. 8) и протеинкиназной активности

(рис. 7А) за 30 минут инфицирования было однонаправленным (уменьшение фосфорилированности белков при инфицировании на 35%, протеинкиназной активности - на 31%), что позволяет сделать вывод о том, что при инфицировании подавлялась активность протеинкиназ в растворимой фракции гомогената. В тоже время микоплазменная инфекция увеличивала протеинкиназную активность мембраносвязанных белков (осадок 20 000 g) на 49% (рис. 7 Б). Сравнение этих данных с уровнем фосфорилированности белков осадка за 30 минут инфицирования (увеличение в 2 раза, данные не приведены) свидетельствует, что их изменение при инфицировании объясняется не только повышением активности протеинкиназ, но и одновременным увеличением активности протеинфосфатаз в этой фракции, что согласуется с данными литературы о том, что мишенью действия патогенов часто бывают именно протеинфосфатазы (Hunter, 1995).

Итак, результаты наших опытов по влиянию инфицирования проростков гороха микоплазмами на фосфорилирование белков и протеинкиназную активность в проростках гороха свидетельствуют об изменении соотношения активностей как протеинкиназ (рис. 7), так и протеинфосфатаз, что в конечном итоге определяло наблюдаемый уровень фосфорилированности белков.

Наблюдаемое в наших опытах изменение базальной протеинкиназной активности (рис. 7, табл. 2) и фосфорилирования белков гороха во времени по мере инфицирования (рис. 8, табл. 2) определяется развертыванием во времени каскада ответных реакций клеток растений на стресс. Одной из ранних реакций растений на действие патогена, по данным литературы, является индуцирование синтеза вторичных элиситоров, которые затем вызывают реакцию гиперчувствительности клеток хозяина и других защитных реакций клеток растения. Очевидно, каждая из стадий этих ответных реакций определяется уровнем фосфорилирования конкретного регуляторного белка специфической протеинкиназой, и этим определяется неоднозначность изменения протеинкиназной активности клеток проростков гороха при их инфицировании микоплазмами за разное время наблюдения. Нужно отметить, что каждая стадия каскада ответных реакций растений предполагает фосфорилирование определенных белков, участвующих в адаптивных реакциях.

Таблица 2

Влияние инфицирования микоплазмами этиолированных 7-дневных проростков гороха в течении 1 часа на удельную протеинкиназную активность фракций гомогената (20000g).

Вариант	Фракции Гомогената	^{32}P , пмоль/мг белка, мин ⁻¹					
		Базальная	БИ, 10 мг	цАМФ 10 ⁻⁶ М	цАМФ+ БИ	ЭГТА, 5x10 ⁻³ М	Ca ²⁺ , 10 ⁻⁵ М
		1	2	3	4	5	6
Контроль	А Супернатант	260±4	208±4	*259±7	200±3	125±10	272±1
Инфицирование		143±3	123±2	164±3	123±3	30±3	*136±10
Контроль	Б Осадок	169±3	*188±7	303±6	-	70±4	*191±7
Инфицирование		101±3	*117±11	219±12	-	14±1	198±8

* - разница с контролем недостоверна при $P < 0,01$.

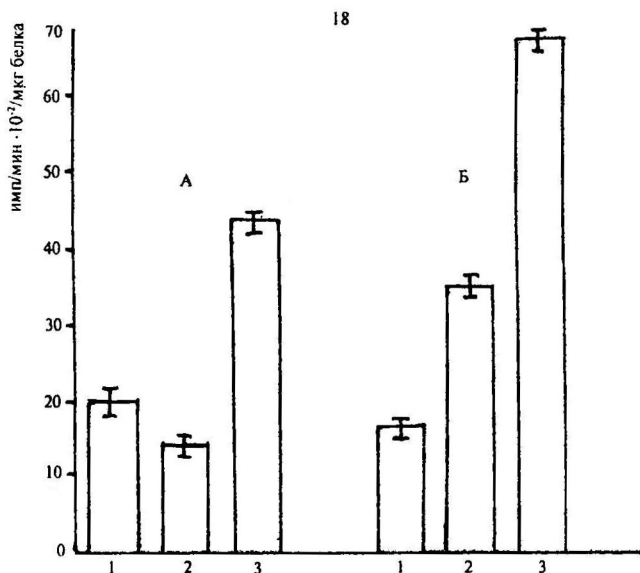


Рис. 8. Влияние времени инфицирования микоплазмами 3-х дневных этиолированных проростков гороха на фосфорилирование белков *in vivo* растворимой фракции гомогената (20 000g): А - 30 мин.; Б - 60 мин. 1 - интактные растения; 2 - инфицированные микоплазмами растения; 3 - инъекция культуральной среды.

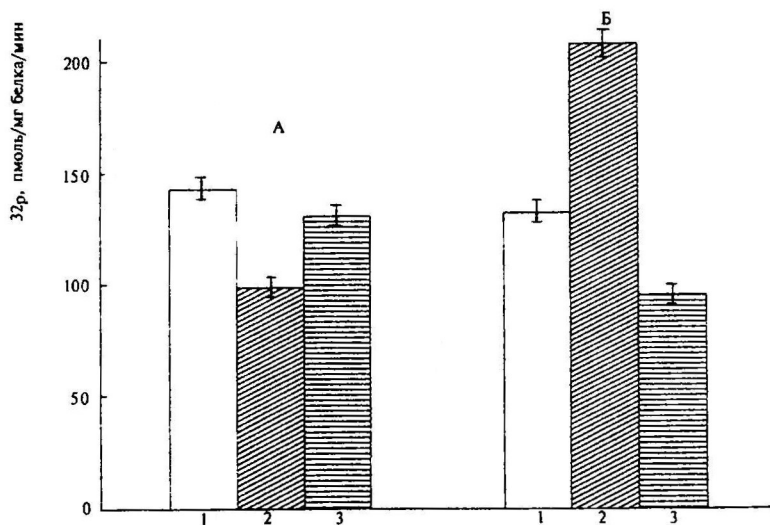


Рис. 9. Влияние освещенности на протеинкиназную активность растворимых белков 3-дневных зеленых и этиолированных листьев гороха при их инфицировании микоплазмами в течении 30 минут. А - этиолированные проростки; Б - зеленые проростки. 1 - интактные растения, контроль; 2 - инфицированные микоплазмами растения; 3 - инъекция культуральной среды.

2.6. Влияние освещенности на микоплазма - индуцированную протеинкиназную активность и профиль фосфорилированности белков растений

Реакция на инфицирование микоплазмами в этиолированных растениях была противоположной реакции в зеленых проростках: протеинкиназная активность растворимых белков этиолированных листьев гороха подавлялась при инфицировании их микоплазмами на 40 % (рис. 9А, 2). В листьях зеленых проростков гороха при их инфицировании микоплазмами наблюдалось увеличение протеинкиназной активности на 54% (рис. 9Б, 2), что следует рассматривать как усиление защитной реакции на биогенный стресс в зеленых растениях. Возможно, отсутствие фотосинтетических процессов у этиолированных растений явилось одной из причин понижения протеинкиназной активности листьев гороха в наших опытах при их инфицировании микоплазмами (рис. 9). Заметим, что инъекция культуральной среды (КС) в растения (что рассматривается как механический стресс и как контроль по влиянию среды культивирования микоплазм) вызывала у этиолятов меньшее подавление протеинкиназной активности - лишь на 8% (рис. 9А, сравнить 1, 3), в то время как у зеленых растений подавление достигало 28% (рис. 9Б, 1, 3).

Наиболее убедительными являются данные, полученные с помощью электрофореза фосфорилированных белков и последующей их радиоавтографии (рис. 10). При инфицировании **зеленых** растений в течение 30 минут во фракции растворимых белков наблюдалось небольшое уменьшение уровня фосфорилированности полипептидов (УФП) 9, 12, 20, 21, 22 кД и значительное уменьшение УФП от 26,3 до 160 кД. Наряду с этим у инфицированных проростков наблюдалось некоторое увеличение уровня фосфорилированности двух полипептидов проростков гороха: 15 и 17 кД. Можно полагать, что изменение фосфорилированности полипептидов, по-видимому, играет роль на ранних стадиях ответной реакции растений гороха на инфицирование.

Инфицирование микоплазмами **этиолированных** растений за 30 минут индуцировало увеличение фосфорилированности полипептидов 7; 8; 9; 15; 18; 21; 23,7; 26; 31; 51 и 58 кД и уменьшение - полипептидов 16 - 18 кД, по сравнению с контролем.

Объяснением повышения УФП листьев этиолированных растений при инфицировании может быть известный факт, что мишенью патогенов, в основном,

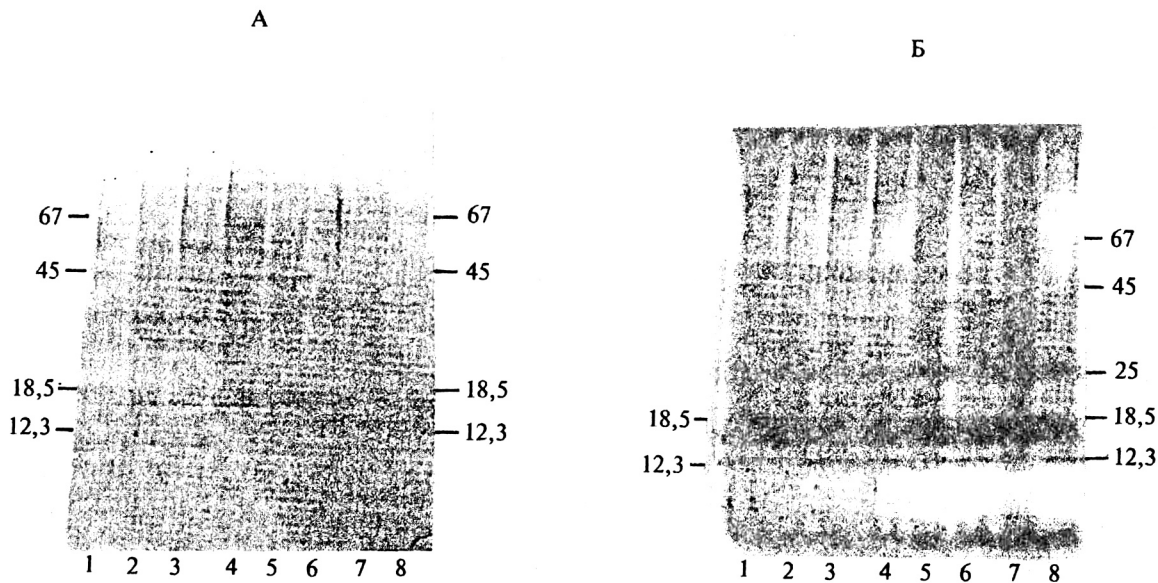


Рис. 10. Влияние освещенности на фосфорилирование белков листьев 3-х дневных этиолированных и зеленых проростков гороха, инфицированных микоплазмами в течении 30 минут: А - электрофорез; Б - радиоавтография.
 1-4 - растворимые белки (супернатант 20000g); 5-8 - мембраносвязанные белки (осадок 20000g);
 1,5 - зеленые растения, контроль; 4,8 - зеленые растения, инфицирование;
 3,7 - этиолированные растения, контроль; 4,8 - этиолированные растения, инфицирование.

входят протеинфосфатазы (Hunter, 1995), понижение активности которых индуцирует увеличение УФП. Известно, что реакции фосфорилирования - дефосфорилирования ключевых белков являются каскадными, где повышение активности самих ферментов протеинкиназ и протеинфосфатаз регулируется каскадно фосфорилированием дефосфорилированием нескольких сайтов фосфорилированных белков. Из данных рис. 10 видна разница в спектрах фосфорилирования полипептидов зеленых и этиолированных проростков, инфицированных в течение 30 минут микоплазмами. Уровень фосфорилированности полипептидов средней и низкой мол. масс у зеленых инфицированных растений: 7,1; 7,9; 10,2; 12,8; 14,4; 15; 17; 21; 21,8 и 26 – 35, 41 – 58 кД был выше, чем у этиолированных. Уровень фосфорилированности высокомолекулярных полипептидов (61 и больше) был выше у этиолированных растений. Неодинаковое изменение уровня фосфорилированности указанных полипептидов при инфицировании у этиолированных и зеленых растений, видимо, свидетельствует о специфическом эффекте инфицирования микоплазмами.

Отличие в направлении изменения уровня фосфорилированности белков зеленых и этиолированных проростков при инфицировании, возможно, объясняется разным набором полипептидов зеленых и этиолированных проростков. фосфорилированность которых определяет устойчивость их к инфицированию.

Таким образом, наши данные позволяют говорить о роли света в изменении реакций фосфорилирования - дефосфорилирования белков в адаптивных реакциях клеток растений гороха к инфицированию; у этиолированных растений при инфицировании было заметнее изменение фосфорилирования высокомолекулярных полипептидов, а у зеленых - полипептидов средней и низкой молекулярных масс.

ВЫВОДЫ

1. Гипотермия вызывала повышение содержания в тканях растений циклических нуклеотидов цАМФ и цГМФ, являющихся интермедиатами (вторичными посредниками) сигнальных систем клеток.
2. Обнаружена секреция цАМФ и цГМФ из тканей (клеток) в окружающую среду. относительная величина которой зависела от гипотермии.
3. Впервые показаны АБК- и Ca^{2+} - индуцированные изменения содержания и секреции цАМФ и цГМФ в условиях гипотермии.
4. Микоплазменная инфекция индуцировала изменение фазности колебания в содержании эндогенного цАМФ в проростках гороха. Экзогенные АБК и цАМФ

оказывали регуляторное действие на содержание эндогенного цАМФ в клетках растений при инфицировании микоплазмами *Acholeplasma laidlawii* 118 и механическом стрессе.

5. Впервые показано, что инфицирование растений микоплазмами (*Acholeplasma laidlawii* 118) индуцировало изменение профиля фосфорилированности полипептидов (о чем можно судить по изменению включения в них ^{32}P -ортофосфата), а также цАМФ и Ca^{2+} -зависимой протеникиназной активности листьев гороха.

Публикации по теме диссертации

1. Tarchevsky Igor, Chernova Olga, Chernov Vladislav, Andrianova Yuliya, Gogolev Yury, Maksutova Nailya, Yakovleva Vera, **Lazareva Ludmila**, Karimova Fatima. The Mycoplasma influence on plant metabolism // IOM Letters. 1994. V.3. Bordeaux, France. P.220.
2. Каримова Ф.Г., Чернов В.М., Максютова Н.Н., Яковлева В.Г., **Лазарева Л.В.**, Мурсалимова Н.У., Мухаметчин А.Т. Фосфорилирование и синтез белков гороха при его инфицировании микоплазмами *Acholeplasma laidlawii* 118. - II Республиканская конференция "Актуальные экологические проблемы Республики Татарстан". Казань, 1995. С.72.
3. Chernov V.M., Tarchevsky I.A., Karimova F.G., **Lazareva L.V.**, Mursalimova N.U., Belogub A.V. The effect of infection of pea seedlings by *Acholeplasma laidlawii* 118 on some aspects of metabolism in host cells. - Abst. RSPP "Physiol -chemical basis of plant physiology". Pushchino, 1996. P. 92.
4. Каримова Ф.Г., Тарчевский И.А., Ягушева М.Р., **Лазарева Л.В.** Влияние АБК на содержание и секрецию циклонуклеотидов в растениях // Доклады РАН. -2001 (в печати).
5. Gajnutdinova A.H., Iagoucheva M.R., Lasareva L.V., Karimova F.G. Time Dependence of absisic acid induced protein phosphorylation in pea leaves //Abstracts of International Symposium "Signaling systems of plants", 2001, Moscow, June, 5-7.



Подписано в печать 21.05.2001. Формат 60/84/16.

Усл. печ. л. 1,5. Договор № 9. Тираж 100.

Лаборатория оперативной печати ТГГИ.
420036, г. Казань, ул. Побежимова 47а, тел. 544373.