



УДК 577.152.344.042

ИНГИБИТОРЫ ХИМОТРИПСИНА В КЛУБНЯХ КАРТОФЕЛЯ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕМ ФИТОФТОРОЗА

© 1998 г. Т. А. Валуева[#], Г. В. Кладницкая, Л. И. Ильинская, Н. Г. Герасимова, О. Л. Озерецковская, В. В. Мосолов

Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, 117071, Москва, Ленинский просп., 33

Поступила в редакцию 25.08.97 г. Принята к печати 19.01.98 г.

Исследованы белки-ингибиторы химотрипсина, накапливающиеся в диффузатах клубней картофеля, инфицированных зооспорами возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans*. Ингибиторы выделяли с помощью аффинной хроматографии на химотрипсин-сефарозе. Показано, что выделенные белки-ингибиторы подавляли рост гиф и прорастание зооспор гриба *Ph. infestans*. Анализ N-концевых последовательностей ингибиторов, преобладающих в диффузатах инфицированных клубней, позволил сделать заключение, что присутствующие в здоровых клубнях 22-кДа белок и 21-кДа белок, состоящий из двух полипептидных цепей с молекулярными массами 16.5 и 4.5 кДа, способны накапливаться в клубнях картофеля при поражении грибом.

Ключевые слова: ингибиторы протеиназ, клубни картофеля, *Phytophthora infestans*.

В предыдущей работе [1] мы показали, что белки-ингибиторы химотрипсина накапливаются в диффузатах клубней картофеля (*Solanum tuberosum* L.) при поражении возбудителем фитофтороза *Phytophthora infestans*. Результаты электрофоретических исследований свидетельствовали о том, что в диффузатах, полученных после инкубации клубней с зооспорами гриба, преимущественно накапливались ингибиторы химотрипсина, среди которых преобладали белки с M 22000, 16600 и 5000 Да [1].

Цель настоящей работы – дальнейшая характеристика ингибиторов химотрипсина, накапливающихся в диффузатах в процессе инфицирования клубней картофеля зооспорами *Ph. infestans*.

Клубни картофеля сорта Истринский инфицировали расой 1,3 *Ph. infestans* Mont. De Vary, которая совместима с данным сортом. Изучали белки-ингибиторы химотрипсина в диффузатах, полученных к 72 ч инкубации клубней с зооспорами гриба, поскольку ранее было показано, что максимальная ингибиторная активность в диффузатах достигается через 72 ч после инокуляции [1]. Контрольные клубни инкубировали без зооспор.

Результаты типичного опыта по выделению белковых ингибиторов химотрипсина из диффузатов методом аффинной хроматографии на иммобилизованном химотрипсине (рис. 1а) свидетельствуют о том, что в диффузатах в присутст-

вии гриба накапливается значительное количество белков, проявляющих ингибиторную активность, которые практически отсутствуют в контрольном опыте (рис. 1б). Согласно полученным данным, накопление белков-ингибиторов в диффузате клубней картофеля связано именно с воздействием фитопатогена, а не является следствием диффузии из клубней в результате механического повреждения клеток картофеля.

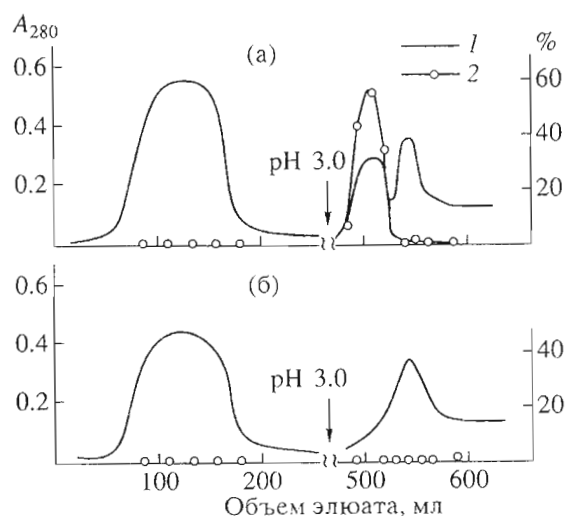


Рис. 1. Аффинная хроматография на химотрипсин-сефарозе диффузата, полученного после 72 ч инкубации клубней картофеля с зооспорами гриба *Ph. infestans* (а) и в отсутствие зооспор гриба (б). 1 – A_{280} , 2 – активность ингибитора (%) по отношению к химотрипсину (субстрат – казеин). Стрелкой отмечена смена pH элюирующего раствора.

Сокращения: PVDF – поливинилиденфторид.

[#] Автор для переписки (факс: (095) 954-27-32; e-mail: inbio@glas.apc.org).

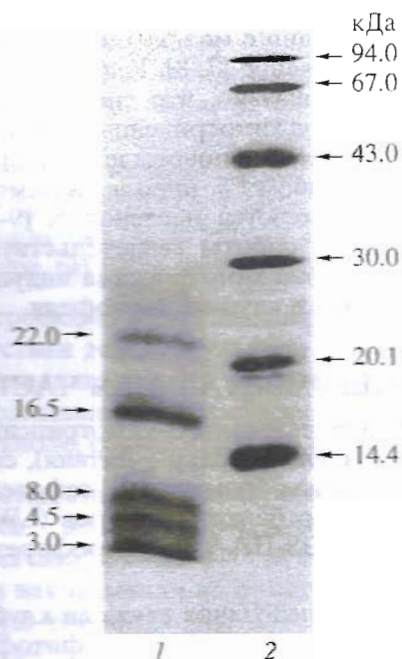


Рис. 2. SDS-ПААГ-электрофорез препарата ингибиторов, выделенных с помощью аффинной хроматографии (1); 2 – белки-маркеры (сверху вниз) – фосфоорилаза b, бычий сывороточный альбумин, яичный альбумин, карбамидраза, соевый ингибитор трипсина, лактальбумин.

Выделенный комплексный препарат белков-ингибиторов химотрипсина в условиях SDS-ПААГ-электрофореза (рис. 2) разделяется по крайней мере на 8 белковых зон, среди которых преобладают белки с $M \sim 22000$, 16500, 8000, 4500 и 3000 Да.

Для определения N-концевых последовательностей отдельные белки после SDS-ПААГ-электрофореза переносили с окрашенной гелевой пластины на PVDF-мембрану с помощью электроблоттинга. Количество перенесенного таким образом белка (начальный выход) оценивали фенолсульфогидантоиновым методом по количеству N-концевой аминокислоты. Начальный выход отдельных белков был равен 0.1–0.2 нмоль (из 30 мкл дифузата) и составлял около 75–80% от количества, нанесенного на гель. Было осуществлено 10 стадий прямой деградации по Эдману, которые позволили реконструировать N-концевую последовательность для всех исследованных белков, преимущественно накапливающихся в дифузате.

Следует отметить, что белковая зона, соответствующая M 3000 Да, содержала набор низкомолекулярных пептидов, N-концевые последовательности которых не поддавались расшифровке. Наличие таких пептидов в клубнях картофеля было обнаружено нами ранее [2], и было показано, что они способны достаточно прочно связываться с химотрипсином-сефарозой [2].

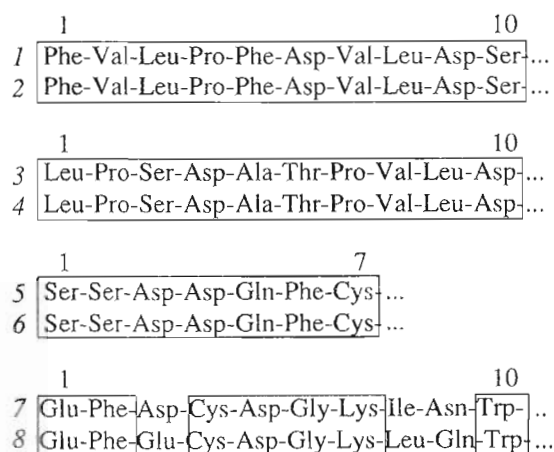


Рис. 3. Сравнение N-концевых аминокислотных последовательностей отдельных ингибиторов химотрипсина, выделенных из дифузатов, полученных после инкубации клубней картофеля с зооспорами *Ph. infestans* (1, 3, 5, 7), и ингибиторов с близкой молекулярной массой, обнаруженных ранее в здоровых клубнях (2, 4, 6, 8). Белки-ингибиторы из дифузатов с M 22000 (1), 16500 (3), 4500 (5), 8000 Да (7); белки-ингибиторы из здоровых клубней: 22-кДа белок [3] (2), А-цепь (M_r 16500) двухцепочечного 21-кДа белка [3] (4), Б-цепь (M_r 4500) двухцепочечного 21-кДа белка [3] (6), субъединица А ингибитора химотрипсина I [4] (8). Идентичные остатки заключены в рамки.

N-Концевой анализ белков с M 22000, 16500, 8000 и 4500 Да (рис. 3) показал, что последовательность первых 10 а.о. белка с M 22000 Да полностью совпадает с соответствующей последовательностью 22-кДа ингибитора трипсина, выделенного нами ранее из здоровых клубней картофеля [3]. Первые 10 а.о. белка с M 16500 Да идентичны соответствующей последовательности А-цепи, а первые семь остатков белка с M 4500 Да – Б-цепи двухцепочечного 21-кДа ингибитора сериновых протеиназ, обнаруженного нами ранее в здоровых клубнях картофеля [3]. N-Концевая последовательность белка с M 8000 Да характеризуется высокой степенью подобия соответствующей последовательности субъединицы А, входящей в состав олигомерной молекулы ингибитора химотрипсина I [4], который обнаружен рядом исследователей в здоровых клубнях картофеля [4–6].

Таким образом, можно сделать заключение, что при поражении клубней картофеля сорта Истринский грибом *Ph. infestans* индуцируется накопление 21- и 22-кДа белков-ингибиторов химотрипсина, отнесенных ранее к семейству соевого ингибитора Кунитца, а также 8-кДа белка, который является субъединицей ингибитора химотрипсина I. Следует отметить, что в здоровых клубнях картофеля сорта Истринский практически отсутствует ингибитор химотрипсина I [1] и

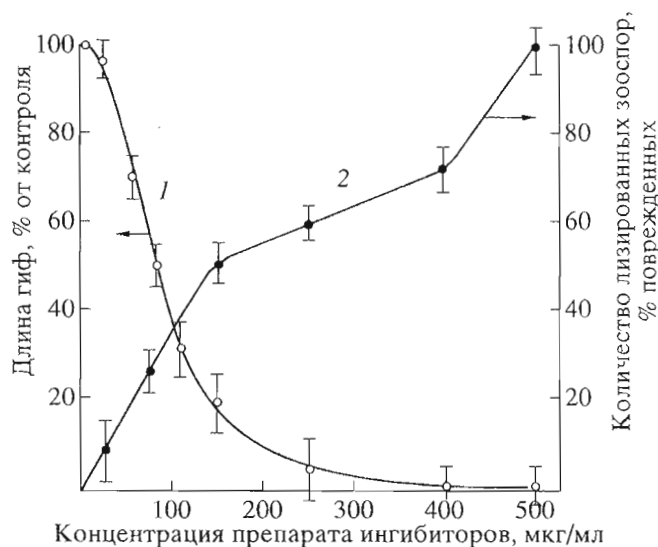


Рис. 4. Зависимость длины гиф (1) и количества лизированных спор (2) гриба *Ph. infestans* от концентрации суммарного препарата ингибиторов химотрипсина из диффузатов клубней картофеля, зараженных зооспорами гриба. Представлены средние значения трех независимых экспериментов со стандартной ошибкой от 2 до 10%.

его накопление индуцируется в ответ на действие патогена.

На следующем этапе исследования изучали действие суммарного препарата ингибиторов химотрипсина, выделенных из диффузатов инфицированных клубней, на рост и развитие гриба *Ph. infestans*. Из рис. 4 видно, что при концентрации ингибиторов, равной 80 мкг/мл, длина прорастающих гиф уменьшается на 50% по сравнению с контролем, а при концентрации 500 мкг/мл обнаруживалось полное подавление прорастания спор гриба. Таким образом, ингибиторы химотрипсина, накапливающиеся в диффузатах клубней при инфицировании *Ph. infestans*, обладают высокой активностью по отношению к микроорганизму, влияя не только на рост гиф гриба, но и на прорастание зооспор.

Суммируя полученные данные, можно заключить, что белки-ингибиторы химотрипсина, обнаруженные нами в диффузате при поражении клубней картофеля фитопатогенным микроорганизмом *Ph. infestans*, подавляют развитие патогена.

Следует отметить, что, как показано в наших предыдущих работах [1, 3], в здоровых клубнях картофеля сорта Истринский присутствуют в основном белки-ингибиторы сериновых протеиназ с молекулярной массой 21 и 22 кДа, отнесенные к семейству ингибиторов типа ингибитора Кунитца из сои, и сравнительно невелико содержание ингибиторов химотрипсина I и II, молекулы которых обладают субъединичной структурой и со-

стоят из субъединиц с молекулярной массой 8 и 12 кДа соответственно [7, 8]. Ранее в ряде исследований было показано, что синтез описанных групп ингибиторов химотрипсина индуцируется в ответ на механическое повреждение или при инфицировании грибом *Ph. infestans* наземных частей растений семейства пасленовых [9-12]. Результаты данной работы свидетельствуют, что синтез ингибиторов химотрипсина индуцируется фитопатогеном и в клубнях картофеля.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы α -химотрипсин (Serva, Германия), казеин ("Биолар", Латвия), сефароза 4В, активированная бромцианом, сефадекс G-25, реактивы и набор белков-маркеров (LWM Calibration Kit) для SDS-ПААГ-электрофореза (Pharmacia, Швеция).

Объектом исследования служили клубни картофеля сорта Истринский с геном фитофтороустойчивости R1, которые хранили в течение 5 мес при 4°C. Для инфицирования использовали расу 1,3 *Ph. infestans* Mont de Vary, совместимую с данным сортом.

Суспензию зооспорангиев для инфицирования получали, смывая их с поверхности 11-суточного мицелия, выросшего на овсяно-агаровой среде. Стимуляцию непрямого прорастания зооспорангиев вызывали выдерживанием их при 3°C в течение 1 ч. Для инфицирования ткани картофеля использовали суспензию 5×10^4 зооспор/мл. Диффузаты (30 мл из 500 г клубней) получали по методу, описанному в работе [1]. Контрольные клубни (500 г) инкубировали без зооспор.

Аффинную хроматографию осуществляли на колонке (3.0 × 3.0 см) с химотрипсин-сефарозой 4В, уравновешенной 50 мМ трис-НСl-буфером, рН 8.0, содержащим 0.5 М NaCl. Раствор 30 мл диффузата, полученного после 72 ч инкубации клубней с зооспорами *Ph. infestans* (или 30 мл диффузата контрольных клубней), в 30 мл 0.1 М трис-НСl-буфера, рН 8.0, содержащего 0.1 М NaCl, наносили на колонку с иммобилизованным химотрипсином. Не связавшийся с аффинным сорбентом материал удаляли, промывая колонку стартовым буфером. Белки, образовавшие комплекс с химотрипсином, элюировали 7 М мочевиной при рН 3.0. Фракции, обладающие ингибиторной активностью, собирали, обессоливали на колонке (2.0 × 80.0 см) с сефадексом G-25 и лиофильно высушивали.

Активность ингибиторов оценивали по подавлению ими гидролиза химотрипсином казеина [13].

Для определения фунгитоксичности 1 мг препарата ингибиторов химотрипсина, полученных после аффинной хроматографии, растворяли в 1 мл 20 мМ фосфатного буфера, рН 6.8, и добав-

ляли к суспензии зооспор *Ph. infestans* до конечной концентрации 20–500 мкг/мл. Полученную суспензию инкубировали 24 ч при 19°C, а затем измеряли гифы гриба под микроскопом Laboval (Германия) при увеличении $\times 120$. Длину гифы выражали в процентах от контроля. Контролем служили споры, инкубированные в 20 мМ фосфатном буфере, pH 6.8, в отсутствие ингибиторов.

Электрофорез в 20% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и β -меркаптоэтанола проводили по методу Лэммли [14]. Гели окрашивали 0.1% раствором кумасси R-250 в 20% этаноле, содержащем 5% формальдегида.

Для осуществления электроблоттинга [15] окрашенный после SDS-ПААГ-электрофореза гель вымачивали 5 мин в 0.1 М боратном буфере, pH 9.2, и накладывали на бумагу Whatman 3MM, смоченную тем же буфером. Сверху на гель помещали смоченную в буфере PVDF-мембрану и далее вновь лист бумаги. Электроблоттинг проводили с помощью прибора Megit (LKB, Швеция) в течение 2 ч при силе тока 200 мА [15].

Секвенирование белка осуществляли на газовой фазе секвенаторе 470A (Applied Biosystems, США) [16]. Фенилтиогидантоины аминокислот детектировали с использованием проточного абсорбциометра, модель 757 (Cratos, США).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 96-04-48079).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кладницкая Г.В., Валуева Т.А., Ермолова Н.В., Ильинская Л.И., Герасимова Н.Г., Мосолов В.В. // Физиол. растений. 1996. Т. 43. С. 701–706.
2. Ревина Т.А., Чередникова Т.В., Валуева Т.А., Ромашкин В.И., Мосолов В.В. // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1988. № 6. С. 866–872.
3. Валуева Т.А., Ревина Т.А., Мосолов В.В. // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 1608–1616.
4. Richardson M., Cossins L. // FEBS Lett. 1975. V. 45. P. 11–13.
5. Meilville J.G., Ryan C.A. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. P. 3445–3453.
6. Richardson M., Barker R.D.J., McMillan R.T. // Biochem. Soc. Trans. 1976. V. 4. P. 1077–1079.
7. Bryant J., Green T.R., Gurusaddaiah T., Ryan C.A. // Biochemistry. 1976. V. 15. P. 3418–3423.
8. Peng J.H., Black L.L. // Phytopathology. 1976. V. 66. P. 958–963.
9. Pautot V., Holzer F.M., Walling L.L. // Molecular Plant-Microbe Interaction. 1991. V. 4. P. 284–292.
10. Suh S.-C., Stiekema W.J., Hannapel D.J. // Planta. 1991. V. 184. P. 423–430.
11. Hildmann T., Ebner M., Pena-Cortes H., Sanchez-Serrano J.J., Willmitzer L., Prat S. // Plant Cell. 1992. V. 4. P. 1157–1170.
12. Hansen J.D., Hannapel D.J. // Plant Physiol. 1992. V. 100. P. 164–168.
13. Kunitz M. // J. Gen. Physiol. 1947. V. 30. P. 291–310.
14. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
15. Yu-Yu Xu Q., Shively J.E. // Anal. Biochem. 1988. V. 170. P. 19–30.
16. Левина Н.Б., Слепак В.З., Киселев О.Г., Шемякин В.В., Хохлачев А.А. // Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. С. 24–31.

Chymotrypsin Inhibitors in Potato Tubers Infected with *Phytophthora infestans*

T. A. Valueva*, G. B. Kladnitskaya, L. I. Il'inskaya, N. G. Gerasimova,
O. L. Ozeretskoykaya, and V. V. Mosolov

Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskiy pr. 33, Moscow, 117071 Russia

Chymotrypsin inhibitor proteins that accumulate in diffusates of potato tubers infected with *Phytophthora infestans* zoospores were studied. The inhibitors were isolated by affinity chromatography on chymotrypsin-Sepharose. It was shown that the proteins inhibit the growth of hyphae and the germination of zoospores of the *phytophthora* fungus. The N-terminal sequence analysis of the inhibitors that predominated in diffusates of infected tubers suggests that the 22-kDa protein and the 21-kDa protein (which consists of two polypeptide chains with molecular masses of 16.5 and 4.5 kDa) that are present in healthy tubers can accumulate in potato tubers infected with the fungus.

Key words: protease inhibitors, potato tubers, *Phytophthora infestans*

* To whom correspondence should be addressed (fax: +7 (095) 954-2732; e-mail: inbio@glas.apc.org).