



УДК 577.152.344

ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТА ИОНОЛА НА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЙ АППАРАТ СТАРЕЮЩИХ КОЛЕОПТИЛЕЙ ВЫРАЩИВАЕМЫХ НА СВЕТУ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

© 2003 г. Я. Е. Дунаевский, Н. И. Александрович, Т. А. Смирнова,
Г. Я. Коломийцева, Б. Ф. Ванюшин, М. А. Белозерский[#]

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119992, Москва, Воробьевы горы,
МГУ им. М.В. Ломоносова

Поступила в редакцию 17.09.2002 г. Принята к печати 21.09.2002 г.

Исследована динамика изменений общей протеолитической активности и активности разных групп протеаз в колеоптилях 3–12-дневных проростков пшеницы, выращенных на свету как в присутствии антиоксиданта ионола (2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол, ВНТ), так и в его отсутствие. Установлено, что в молодых колеоптилях у 3–4-дневных проростков преобладают более специализированные хорошо гидролизующие специфические синтетические субстраты протеазы, а также ферменты, гидролизующие активно гистон Н1. В клетках старых колеоптилей у 11–12-дневных проростков накапливаются протеазы, одинаково хорошо деградирующие большинство использованных белковых субстратов. Под влиянием ВНТ при выращивании растений на свету (по сравнению с этиолированными проростками) несколько изменялась динамика протеолитической активности в молодых колеоптилях и наблюдалось исчезновение в них протеаз, активных по отношению к гистону Н1. Ингибиторный анализ выявил относительное преобладание цистеиновых протеаз в молодых колеоптилях на начальной стадии развития проростка, тогда как в старых колеоптилях заметно увеличена доля сериновых протеаз. Предполагается, что выявленные индуцированные ВНТ количественные и качественные изменения в протеолитическом аппарате клеток колеоптиля пшеницы могут в значительной мере отвечать за ретардантное и геропротекторное действие этого антиоксиданта у растений.

Ключевые слова: антиоксидант ионол, 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол; апоптоз, протеазы пшеницы, свет, старение.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что старение растительных клеток и органов сопровождается активным метаболизмом в них разнообразных соединений и утилизацией возникших при этом продуктов другими органами [1]. В ряде работ было показано, что и старение и запрограммированная гибель клеток (апоптоз) могут регулироваться определенными сигналами, такими, как гормоны и свет [2–4]. Естественное старение подавляется мутациями в этиленвосприимчивых генах [5] или введением генов синтеза цитокинина [3]. Тем самым, процесс старения и гибели клеток в течение старения находятся под контролем хорошо скоординированных сигнальных путей, и старение может включать в себя запрограммированную гибель клеток [6, 7].

Интенсивные метаболические процессы в стареющих клетках и органах предполагают наличие активно работающих ферментных систем, среди которых большой интерес привлекают

протеазы как задействованные в запуске процесса апоптоза, так и участвующие в мобилизации клеточного содержимого. Однако данные о природе и свойствах протеаз, а также факторов, регулирующих их активность в процессе старения, все еще фрагментарны и не позволяют создать целостную картину их роли в стареющих органах растений.

Характер изменений протеолитической активности в клетках колеоптилей этиолированных проростков пшеницы, служащих удобной моделью быстро стареющего и отмирающего растительного органа (органоптоза) [8], изучен нами ранее [9].

В настоящей работе мы попытались выяснить, как антиоксидант ВНТ, снижающий скорость генерации супероксида [10] и блокирующий апоптозную фрагментацию ДНК [7, 11] в этиолированных проростках пшеницы, влияет на динамику и спектр протеолитических активностей в колеоптилях проростков пшеницы, выращенных на свету, и сопоставить эти данные со сведениями о протеазах у этиолированных проростков.

Сокращения: ВНТ – 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол; DFP – диизопротилфторфосфат; IAA – йодацетамид.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 939-55-51; факс: (095) 939-31-81; эл. почта: mbeloz@belozersky.msu.ru).

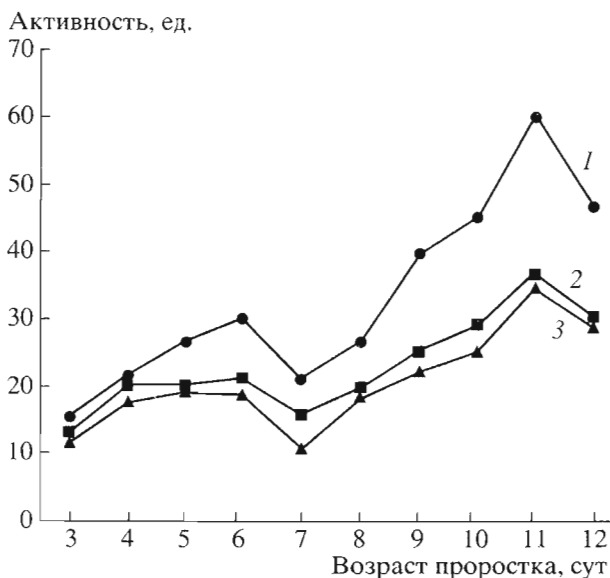


Рис. 1. Динамика изменений протеолитической активности в клетках coleoptiles растущих на свету проростков пшеницы по гидролизу белковых субстратов: казеина (1); желатины (2); гистона тимуса телят (3).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из рис. 1, в coleoptiles растущих на свету проростков пшеницы протеолитические активности, измеренные по отношению к различным белковым субстратам, имеют два явно выраженных максимума – на 6-е и 11-е сутки жизни проростков. Это в целом хорошо коррелирует с изменениями протеолитической активности в coleoptiles этиолированных растений [9]. Однако в отличие от этиолированных проростков в coleoptiles выращенных на свету растений отсутствует небольшой пик активности (по крайней мере, по казеину) на 3-и сутки жизни. Выявленные в выращенных на свету coleoptiles пики протеолитической активности совпадают по времени с такими этапами развития coleoptilia как старение и, соответственно, включение программы апоптоза (5–6-е сутки жизни проростка) и массивная гибель клеток на завершающей стадии апоптоза (после 8 суток жизни проростка).

При выращивании проростков на свету в присутствии в среде антиоксиданта ВНТ сохранялась сходная тенденция в изменении протеолитической активности (рис. 2), хотя при этом обнаруживалась большая размытость первого пика активности, а также сдвиг второго пика активности к 12-м суткам жизни проростка.

Следует отметить, что при использовании в качестве субстрата растительного гистона Н1 динамика изменения протеолитической активности в coleoptile выглядит иначе (рис. 3). Фактически наблюдается только один максимум этой активности, он приходится на 3–4-е сутки жизни

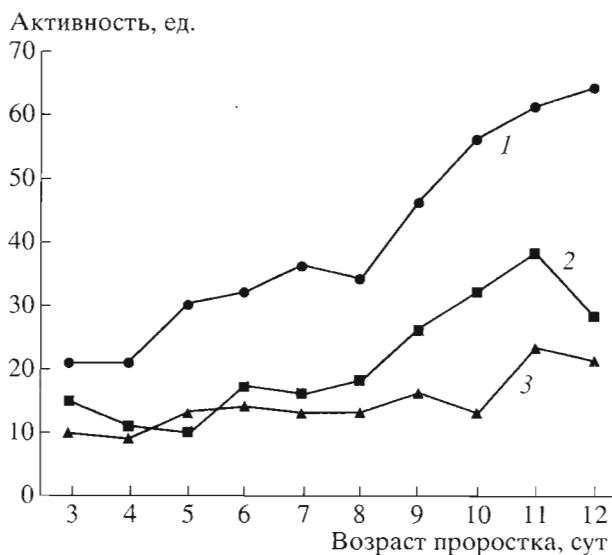


Рис. 2. Динамика изменений протеолитической активности в клетках coleoptiles растущих на свету в присутствии ВНТ проростков пшеницы по гидролизу белковых субстратов: казеина (1); желатины (2); гистона тимуса телят (3).

проростка. При выращивании проростков в присутствии ВНТ наблюдались существенные изменения в этой картине. Практически полностью исчезала протеолитическая активность к гистону Н1, выявляемая в coleoptiles на ранней стадии развития растущих в отсутствие ВНТ (контрольных) проростков пшеницы (рис. 3). Это может быть обусловлено ингибированием ВНТ развития специфической (к гистону Н1) протеолитической активности. Не исключено, что с этим ингибирующим действием ВНТ на протеазы в известной мере связано выраженное ретардантное действие этого антиоксиданта на рост растений [12] и блокирование им апоптоза [11].

Динамика изменений активности протеаз по отношению к специфическим синтетическим субстратам, таким, как $Bz\text{-Arg-pNa}$ (для трипсиноподобных протеаз), $Z\text{-Ala-Ala-Leu-pNa}$ (для субтилизиноподобных протеаз), а также $Leu\text{-pNa}$ и $Phe\text{-pNa}$ (для аминокатализаторов) представлена на рис. 4. Видно, что эти активности преобладают на начальных стадиях развития coleoptilia (3–4-е сутки жизни проростка), а затем они постепенно снижаются по мере его старения (примерно в 2 раза к 11–12-м суткам жизни проростка). Присутствие ВНТ в ростовой среде проростков заметно влияло только на одну активность, измеряемую по отношению к $Z\text{-Ala-Ala-Leu-pNa}$ (рис. 5, кривая 2), которая почти полностью исчезала в присутствии антиоксиданта.

На основании полученных данных можно предполагать, что в молодом coleoptile функционально активны более специализированные про-

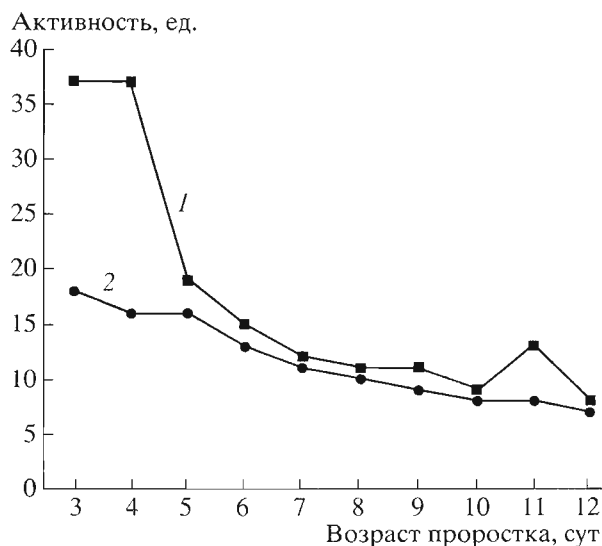


Рис. 3. Динамика изменений протеолитической активности в клетках coleoptилей растущих на свету проростков пшеницы по гидролизу гистона Н1 в отсутствие (1) и в присутствии ВНТ (2).

теазы, которые могут как регулировать внутриклеточный метаболизм, так и участвовать в запуске апоптозного процесса (в частности, протеазы, гидролизующие гистон Н1 [13]), тогда как в стареющем coleoptиле накапливаются протеазы, ответственные за деградацию более широкого спектра белков. Исчезновение активности к гистону Н1 и субтилизиноподобной активности по отношению к Z-Ala-Ala-Leu-pNa в присутствии ВНТ может быть одной из причин ретардантного действия этого антиоксиданта.

С помощью ингибиторного анализа мы определили вклад (долю) активности протеаз различных групп в общую протеолитическую активность, определяемую в развивающихся coleoptилях проростков пшеницы в дни, соответствующие ее максимумам (таблица). В молодых coleoptилях (4 суток) относительно преобладают активности цистеиновых протеаз и их доля постепенно снижается (до 50%) у старых coleoptилей; напротив, доля сериновых протеаз в общей протеолитической активности увеличивается (на 72%) в течение этого же промежутка времени. Доля металлопротеаз в процессе старения coleoptилей у росших на свету проростков снижалась незначительно (примерно на 17%). Надо отметить, что сходная тенденция в изменении вклада различных протеаз в общую протеолитическую активность наблюдалась и в coleoptилях этиолированных проростков [9], хотя темп этих изменений у них несколько иной (особенно это касается цистеиновых и металлопротеаз). Сходная тенденция сохранялась и при выращивании проростков в присутствии ВНТ, однако при этом выявляется более

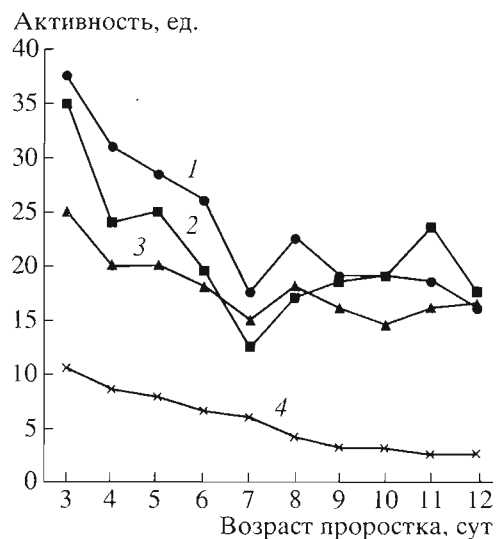


Рис. 4. Динамика изменений активности протеаз в клетках coleoptилей растущих на свету проростков пшеницы, измеренной по гидролизу синтетических субстратов: Bz-Arg-pNa (1); Z-Ala-Ala-Leu-pNa (2); Leu-pNa (3); Phe-pNa (4).

резкое снижение уровня активности металлопротеаз. Следует отметить, что общая протеолитическая активность в coleoptилях проростков пшеницы оказалась нечувствительной к действию ингибитора аспартильных протеаз пепстатина (50 мкМ).

Таким образом, при выращивании проростков пшеницы на свету возрастная динамика изменений протеолитической активности существенно

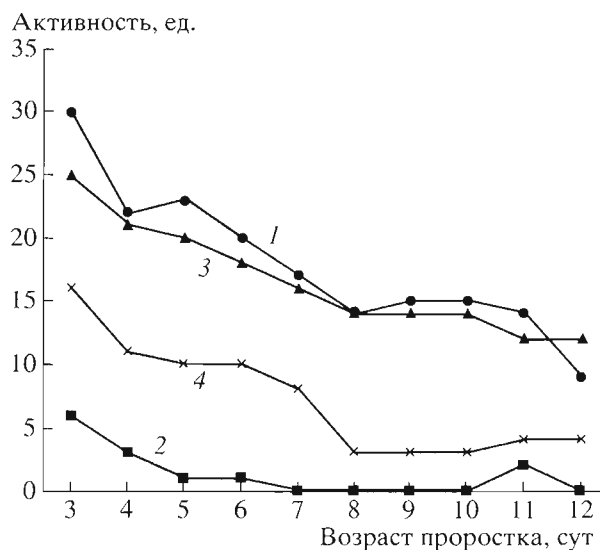


Рис. 5. Динамика изменений активности протеаз в клетках coleoptилей растущих на свету в присутствии ВНТ проростков пшеницы, измеренной по гидролизу синтетических субстратов: Bz-Arg-pNa (1); Z-Ala-Ala-Leu-pNa (2); Leu-pNa (3); Phe-pNa (4).

Вклад протеаз различных групп в общую протеолитическую активность, определяемую по гидролизу казеина на различных стадиях развития coleoptилей пшеницы (определение с помощью ингибиторного анализа)

Ингибиторы	Концентрация ингибитора, мМ	Ингибирование активности в экстрактах из coleoptилей разного возраста (сут), %					
		4		6		11	
		К	ВНТ	К	ВНТ	К	ВНТ
DFP	0.05	36	32	44	47	62	66
IAA	5	46	45	38	38	23	30
EDTA	10	18	23	18	15	15	4

К – контрольные (выращенные в воде) проростки, ВНТ – проростки, выращенные в присутствии 0.23 мМ ВНТ.

отличается от таковой у этиолированных проростков. По-видимому, под действием света у зеленых фотосинтезирующих проростков происходят заметные изменения в протеолитическом аппарате в клетках coleoptиля. Антиоксидант ВНТ вызывает существенные качественные изменения в активности и, по-видимому, в наборе протеаз в coleoptиле растущих на свету проростков пшеницы. Совокупность этих вызванных ВНТ изменений, возможно, в значительной мере ответственна за способность антиоксиданта тормозить рост и старение растений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Семена озимой пшеницы сорта Мироновская 808 проращивали в течение 24 ч в кликамере на влажной фильтровальной бумаге, помещенной в пластиковые кюветы; одинаково проклюнувшиеся семена отбирали и продолжали выращивать проростки в течение нескольких дней в тех же условиях при искусственном освещении (продолжительность светового дня 16 ч) в кюветах на фильтровальной бумаге, края которой погружены в воду (контроль) или в раствор ВНТ (0.23 мМ, Aldrich, США). Раствор и воду в кюветах заменяли каждый день на свежеприготовленные. Для приготовления водного раствора ВНТ в кипящую воду добавляли раствор ВНТ в этаноле, затем полученный слабо опалесцирующий раствор охлаждали до комнатной температуры. В воду для контрольных проростков добавляли эквивалентное количество этанола.

Собранные проростки определенного возраста (возраст проростков исчисляли с момента замачивания семян) тщательно промывали водой, вычленили из них coleoptили и использовали их для определения активностей протеолитических ферментов. Каждый опыт осуществляли не менее чем в двух повторях и каждый раз со своим собственным независимым контролем (выращивание проростков в воде в тех же условиях).

Для получения белковых экстрактов и определения в них активности coleoptили пшеницы

(200 мкг) гомогенизировали при 4°C в 50 мМ Трис-НСI-буфере, рН 7.5, содержащем 0.8 М сахарозу и 0.35 М NaCl. Неразрушенные фрагменты растительного материала отделяли центрифугированием и отбрасывали, а супернатант диализовали против 50 мМ Трис-НСI-буфера, рН 7.5.

Протеолитическую активность определяли спектрофотометрически при 410 нм по методу Эрлангера и др. [14], используя 5 мМ синтетические субстраты трипсиноподобных протеаз (Bz-Arg-pNa), субтилизиноподобных протеаз (Z-Ala-Ala-Leu-pNa) и аминопептидаз (Leu-pNa, Phe-pNa), а также при 420 нм с помощью тринитрофенилирования [15], используя 1%-ные растворы белковых субстратов (казеин, желатину и суммарный гистон тимуса телят) при рН 7.0. В первом случае за единицу ферментативной активности принимали такое количество фермента в анализируемом образце, которое при гидролизе субстрата в указанных условиях инкубации [1 ч (4 ч для Z-Ala-Ala-Leu-pNa), 37°C, 0.1 М фосфатный буфер, рН 8.0] вызывало увеличение оптического поглощения раствора на 0.01 ОЕ₄₁₀. Во втором случае единица ферментативной активности соответствовала количеству фермента, освобождающего в указанных условиях 1 нмоль аминокрупп (в качестве стандарта использовался глицин).

Гистон Н1 был получен из хроматина проростков пшеницы посредством экстракции 0.74 М НСIО₄ и последующего осаждения на холоду трихлоруксусной кислотой при конечной концентрации 20%. Осажденный гистон Н1 был собран центрифугированием при 12000 g в течение 30 мин и ресуспендирован в воде. После диализа против воды в течение 48 ч он был лиофильно высушен и хранился при 4°C. Электрофорез в 15% ПААГ с SDS был использован для анализа чистоты полученного препарата.

В работе были использованы специфические ингибиторы протеолитических ферментов – DFP (50 мкМ, Fluka, Швейцария) для сериновых протеаз, IAA (5 мМ, Sigma, США) для цистеиновых протеаз, EDTA (10 мМ, Sigma, США) для металлопротеаз и пепстатин (50 мкМ, ICN, США) для

аспартильных протеаз. Препараты ферментов в 0.1 М фосфатном буфере, рН 8.0 предынкубировали с ингибиторами в течение 1 ч при 20°C, затем приливали раствор субстрата и определяли остаточную активность. Если ингибиторы растворяли в изопропанол или метаноле (DFP, пепстатин), то в качестве контроля использовали активность, определяемую в реакционной смеси, содержащей 5% органического растворителя.

Концентрацию белка в растворах определяли с помощью метода Лоури [16] или спектрофотометрически при 280 нм.

Разбавленные белковые растворы концентрировали в ячейках "Амикон" (Голландия) с использованием фильтров УМ-10 (США).

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 01-04-48646).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bleecker A.B., Patterson S.E.* // *Plant Cell*. 1997. V. 9. P. 1169–1179.
2. *Thomas H., Stoddart J.L.* // *Annu. Rev. Plant Physiol*. 1980. V. 31. P. 83–111.
3. *Gan S., Amasino R.M.* // *Science*. 1995. V. 270. P. 1986–1988.
4. *Grbic V., Bleecker A.B.* // *Plant J*. 1995. V. 8. P. 595–602.
5. *Bleecker A.B., Estelle M.A., Somerville C., Kende H.* // *Science*. 1988. V. 241. P. 1086–1089.
6. *Gan S., Amasino R.M.* // *Plant Physiol*. 1997. V. 113. P. 313–319.
7. *Ванюшин Б.Ф.* // *Успехи биол. химии*. 2001. Т. 41. С. 3–38.
8. *Skulachev V.P.* // *Exp. Gerontol*. 2001. V. 36. P. 995–1024.
9. *Федореева Л.И., Александрюшкина Н.И., Дунаевский Я.Е., Белозерский М.А., Ванюшин Б.Ф.* // *Биохимия*. 2002. Т. 68. С. 570–576.
10. *Шорнинг Б.Ю., Смирнова Е.Г., Ягузинский Л.С., Ванюшин Б.Ф.* // *Биохимия*. 2000. Т. 65. С. 1612–1617.
11. *Бакеева Л.Е., Замятина В.А., Шорнинг Б.Ю., Александрюшкина Н.И., Ванюшин Б.Ф.* // *Биохимия*. 2001. Т. 66. С. 1048–1059.
12. *Шорнинг Б.Ю., Полещук С.В., Горбатенко И.Ю., Ванюшин Б.Ф.* // *Изв. АН. Сер. биол.* 1999. № 1. С. 30–38.
13. *Kaufmann S.H.* // *Cancer Res*. 1989. V. 49. P. 5870–5878.
14. *Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W.* // *Arch. Biochem. Biophys*. 1961. V. 95. P. 271–278.
15. *Habeeb T.S.* // *Anal. Biochem*. 1966. V. 14. P. 328–336.
16. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* // *J. Biol. Chem*. 1957. V. 193. P. 265–275.

Effect of Antioxidant BHT on the Proteolytic Apparatus of Aging Coleoptiles of Wheat Seedlings Grown in Light

Ya. E. Dunaevskii, N. I. Aleksandrushkina, T. A. Smirnova,
G. Ya. Kolomiitseva, B. F. Vanyushin, and M. A. Belozersky[#]

[#]Phone: +7 (095) 939-5551; fax: +7 (095) 939-3181; e-mail: mbeloz@belozersky.msu.ru
Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119992 Russia

The dynamics of changes in total proteolytic activity and activities of various groups of proteases in the coleoptiles of 3- to 12-day-old wheat seedlings grown in light with and without antioxidant BHT (2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol) was studied. It was established that the specialized proteases that easily hydrolyze specific synthetic substrates and the enzymes actively hydrolyzing histone H1 dominate in young coleoptiles of 3- to 4-day-old seedlings. Proteases that degrade equally well the majority of the studied substrates are accumulated in the cells of old coleoptiles of 11- to 12-day-old seedlings. Under the effect of BHT, the plants grown in light (in comparison with etiolated seedlings) demonstrated a somewhat changed dynamics of proteolytic activity in young coleoptiles and the disappearance of proteases active toward histone H1. An inhibitory analysis revealed a relative domination of cysteine proteases in young coleoptiles at the initial development stage of seedlings, whereas the fraction of serine proteases markedly increased in old coleoptiles. We presume that the revealed quantitative and qualitative changes in the proteolytic apparatus of the coleoptile cells induced by BHT may be largely responsible for the retardant and geroprotective effect of this antioxidant in plants. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: aging, antioxidant BHT, apoptosis, 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol, light, wheat proteases