

УДК 577.15:581.143

А.А. АМБАРЦУМЯН, П.В. ТОЗАЛАКЯН, А.Н. АРЗУМАНЯН, Д.Ж. А. АГАДЖАНЯН,
М.Т. ПЕТРОСЯН, Ю.Г. ПОПОВ

ИЗУЧЕНИЕ ФЕНИЛАЛАНИН–АММИАК-ЛИАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР *hieracium cincinnatum* FRIES И *HELIANTHUS TUBEROSUS* L.

Изучена экспрессия ферментативной активности L-фенилаланин–аммиак-лиазы (ФАЛ) в каллусных культурах ястребинки и топинамбура в зависимости от возраста, механических повреждений и действия света. Показано, что оптимальным для экстракции ФАЛ является рН 8,3. Под действием света в неповрежденных каллусах ястребинки и топинамбура наблюдается повышение ФАЛ активности по сравнению с контролем. Механическое повреждение каллусов ястребинки приводит к четырехкратному повышению активности ФАЛ 10-17 дневной культуры и к двухкратному ее повышению у 30-100-дневной культуры. Под действием света на фоне механического повреждения активность ФАЛ достоверно увеличивается еще на 10-20%. Показано также, что у каллусов ястребинки 100-дневного возраста, визуально отличающихся интенсивной бурой окраской, при механических повреждениях, как при дополнительной обработке светом, так и без нее, в гомогенатах наблюдается лишь 50% полной активности ФАЛ, выявляемой после осаждения белков сульфатом аммония. Аналогичный эффект у молодых 10-дневных каллусов отсутствует.

Фенилаланин – аммиак-лиаза (ФАЛ) катализирует первую реакцию в сложной цепи биосинтеза фенилпропаноидов и полифенольных компонентов, включая лигнин, коричные эфиры и флавоноиды и является одним из ключевых ферментов в метаболизме указанных веществ [1]. Активность ФАЛ у растений сильно увеличивается под действием различных стимулов, таких, как механические повреждения и свет [2-7], регуляторы роста [8-10], заражение патогенами [11-12] и т.д. Молекулярный механизм регуляции экспрессии генов ФАЛ, представленный в каждом специально изученном случае мультигенным семейством дифференциально регулируемых генов [1, 13-15], в настоящее время интенсивно изучается [16-18].

В представленной работе приводятся данные по изучению обычных стимулов – механического повреждения и света – на активность ФАЛ каллусных культур ястребинки (*Hieracium cincinnatum* Fries) и топинамбура (*Helianthus tuberosus* L.). Изолированные культуры указанных растений позволяют изучать в регулируемых условиях влияние различных стрессовых факторов. Выбор этих растений для изучения активности ФАЛ диктуется тем, что ястребинка богата эфирными маслами и другими производными коричной кислоты [19], ключевым ферментом в метаболизме которых является ФАЛ. Неприхотливый же к условиям возделывания топинамбур может оказаться хорошей моделью для изучения роли ФАЛ и образующихся под ее воздействием продуктов в устойчивости растений к стрессам.

Методы исследований. Каллусные культуры ястребинки и топинамбура выращивали на плотной агаризованной среде Мурасиге и Скуга [20]. Культуры выращивались при температуре 27° С в темноте. Для изучения действия механического повреждения на активность ФАЛ каллусы разрезали на пластинки толщиной в 1-2 мм, помещали в чашки Петри, заливали дистиллированной водой и инкубировали

24 часа при температуре 27° С. Для изучения действия света на активность ФАЛ каллусы (нативные и поврежденные) помещались под люминесцентными лампами на расстоянии 20-25 см при температуре 27° С на 24 часа.

Для определения активности фермента к навеске каллуса добавляли буфер А, содержащий 25 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 1 мМ этилендиамин-тетрауксусной кислоты (ЭДТА), 1 мМ фенолметилсульфонилфторида (ФМСФ), 10 мМ меркаптоэтанол и 25% (V/V) глицерина. В экспериментах по влиянию рН на активность ФАЛ Трис-НСl заменяли на 25 мМ фосфата калия-натрия (рН 7) или на 25 мМ ацетата Na (рН 6). Во всех случаях к N мг навески добавляли 2N мкл буфера А. Затем смесь гомогенизировали в гомогенизаторе со стеклянным пестиком при температуре +4°С. Остатки клеток удаляли центрифугированием и грубый ферментный экстракт хранили при температуре 4°С до использования.

Для осаждения ФАЛ к 500 мкл грубого ферментного экстракта добавляли 200 мг кристаллического сульфата аммония и после полного растворения соли раствор инкубировали 30 мин. при температуре 4°С. Затем белок осаждали центрифугированием и после удаления надосадочной жидкости растворяли в свежем буфере А(+4°С).

Активность измеряли модифицированным методом Зукера [5] по накоплению коричной кислоты, принимая миллимолярный коэффициент поглощения при 290 нм за 10. Для этого к 50 мкл белкового препарата добавляли 50 мкл 1% L-фенилаланина (в контрольных пробах вместо L-фенилаланина добавляли 50 мкл воды) и 100 мкл 0.2 М Трис-НСl буфера (рН 8,8) и инкубировали 10-15 часов при 30°С. После инкубирования к 50 мкл реакционной смеси добавляли 2500 мкл дистиллированной воды и измеряли поглощение против воды. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмольа коричной кислоты за 1 мин. при температуре реакции 30°С. Концентрацию белка измеряли методом Гровса и Дейвиса [21].

В таблицах представлены средние данные 2-4 опытов. Среднестатистическое отклонение не превышало 15%.

Результаты и их обсуждение. Первая серия экспериментов была направлена на модификацию методики определения активности ФАЛ в каллусах. Это связано с низкой ферментативной активностью препаратов при низкой стабильности фермента [4]. Для повышения стабильности был подобран буфер А, включающий глицерин в качестве стабилизатора, ЭДТА – в качестве хелатирующего агента, ФМСФ – ингибитора сериновых протеиназ и меркаптоэтанол – восстановителя SH-групп белков. Выбор рН среды был проведен на основании данных, представленных в табл. 1.

Таблица 1

Влияние рН экстракционного буфера на активность ФАЛ каллусов ястребинки

рН буфера	Активность ФАЛ, мU/mg			
	в темноте		на свету (24 часа)	
	свежий	суточный	свежий	суточный
6	0.34	0.037	1.24	0.14
7	0.81	0.32	0.84	0.33
8.3	0.51	0.28	1.11	0.57

Как видно из табл. 1, после суточного выдерживания экстрактов при 4°С ФАЛ при рН 6 самая нестабильная. Наибольшая стабильность наблюдалась при рН 8,3. Поэтому дальнейшие эксперименты проводились при этом значении рН. Результаты табл. 1 указывают также на значительное повышение активности ФАЛ у каллусов, подвергнутых 24-часовой световой обработке.

В следующей серии опытов нами изучалось изменение активности ФАЛ у ястребинки и топинамбура в зависимости от возраста и освещенности каллуса (табл. 2).

Воздействие света и возраста каллуса на активность ФАЛ ястребинки и топинамбура

Каллус	Стимул	Неделя				
		I	II	III	IV	V
ястребинка	-	0.61	0.42	0.61 (2.2)* 77%**	1.22 (2.4) 61%	0.77 (1.9) 78%
	свет, 24 часа	1.13	1.06	0.98 (1.8) 71%	0.6 (1.5) 58%	0.56 (1.7) 70%
топинамбур	-			0.33 (1.4) 161%	0.25 (1.4) 125%	0.22 (0.8) 111%
	свет, 24 часа			0.29 (1.4) 164%	0.61 (1.6) 111%	0.35 (0.96) 62%

*В скобках указаны активности ФАЛ, осажденной сульфатом аммония 64%-ного насыщения.

** В процентах указаны активности после осаждения фермента сульфатом аммония.

Из табл. 2 следует, что в гомогенатах каллусов ястребинки и топинамбура под действием света наблюдается повышение активности фермента. Однако у ястребинки со старением (III-V недель роста после пересева) этот эффект уменьшается и инвертирует, причем он четко коррелирует с усилением бурой пигментации каллусов (к концу пассажа IV-V-недельные каллусы ястребинки интенсивно окрашивались в бурый цвет). На каллусах топинамбура тенденция к повышению активности ФАЛ под действием света стабильно сохраняется как в случае гомогенатов, так и в случае сульфатных осадков. Однако, как следует из табл. 2, в случае топинамбура наблюдается повышение общей активности ФАЛ после осаждения сульфатом аммония, что не исключает возможности наличия у каллусов ингибирующего фактора, который не осаждается сульфатом аммония и удаляется с надосадочной жидкостью.

На препаратах ястребинки и топинамбура нами проводились также электрофорез в 10%-ном полиакриламидном геле и изоэлектрофокусировка в 5% полиакриламидном геле с градиентом pH 3-9 с последующим измерением активности ФАЛ непосредственно в геле для выявления изоферментов. Во всех опытах был получен только один пик.

Наряду с действием света было изучено также влияние более сильного индуктора ФАЛ – механического повреждения. Результаты этих опытов представлены в табл. 3 и 4.

Таблица 3

Изменение активности ФАЛ у каллусов ястребинки под действием механических повреждений и света

Факторы, индуцирующие ФАЛ	Активность ФАЛ, mU/mg	
	возраст каллуса	
	10-17 дней	30-100 дней
контроль	0.23	0.19
механическое повреждение	0.87	0.44
мех. повреждение и свет	1.05	0.50

Как следует из табл. 3, механическое повреждение каллусов приводит к резко достоверному увеличению активности ФАЛ, что более выражено на молодых каллусах. Так, если ФАЛ активность у молодых каллусов увеличивается в 4 раза, то у старых – в 2. На фоне механического повреждения свет увеличивает эффект стимуляции активности еще на 10-20%.

В табл. 4 представлены данные по активности ФАЛ в зависимости от возраста каллусной ткани после осаждения сульфатом аммония.

Таблица 4

Активность ФАЛ у "молодых" и "старых" каллусов ястребинки после осаждения сульфатом аммония

Факторы, индуцирующие ФАЛ	Возраст каллуса					
	10 дней			100 дней		
	активность					
	гомогенат	сульф. осадок	R %	гомогенат	сульф. осадок	R %
контроль	0.27	2.59	95.6	0.14	0.71	89
мех. повреждение	1.47	4.00	69.7	0.23	1.82	224.8
Мех. повреждение + свет	1.47	5.06	72.7	0.29	3.27	181.9

Из табл. 4 следует, что у старых каллусов ястребинки при механическом повреждении, независимо от световой обработки, общая активность ФАЛ увеличивается вдвое после осаждения (удаления низкомолекулярных веществ) сульфатом аммония. Этот эффект отсутствует в контроле и у молодых каллусов.

Полученные данные позволяют предположить существование низкомолекулярных веществ, снижающих стимулирующий эффект механических повреждений и света при старении каллуса (табл. 3) и удаляемых после осаждения фермента сульфатом аммония (табл. 4). Изучение механизма этого эффекта является предметом дальнейших исследований.

Выполнение работы частично финансировалось за счет гранта Ассоциации ИНТАС ЕС.

ЕГУ, НИИ "Биотехнология"

Поступила 03. 10. 1997

ЛИТЕРАТУРА

1. Minami E., Ozcki J., Matsuoka M., Kotzuka N., Tanaka J. - Eur. J. Biochem., 1985, v. 185, N 9, p. 19-25.
2. Hyedo H. - J. Biochem. 1976, v. 79, p. 877-282.
3. Tanaka J., Unitani I. - Eur. J. Biochem., 1977, v. 73, p. 255-260
4. Chen R., Chang T., M. Liu. - Agric. Biol. Chem., 1988, v. 52, N 9, p. 2137-2142.
5. Zucker M. - Plant Physiol., 1968, v. 43, p. 365-374.
6. Lolo R., Hahlbrock K. - Z. Naturforsch., 1992, v. 46, N 1-2, p. 90-94.
7. Dallina G., Kannellis A. - Plant. Mol. Biol., 1994, v. 26, N 1, p. 473-479.
8. Walton D., Soundhelmer E. - Plant Physiol., 1968, v. 43, p. 467-469.
9. Hyedo H., Yang Sh. - Plant Physiol., 1971, v. 47, p. 765-770.
10. Nagai N., Kojima Y., Shimosaka M. and Okazaki M. - Agric. Biol. Chem., 1988, v. 52, N 10, p. 2617-2619.
11. Lawton M., Bixon R., Hahlbrock K., Lamb C. - Eur. J. Biochem., 1983, v. 129, p. 593-601.
12. Wada M., Kato H., Malik K., Sriprasertsak P., Y. Ichinose, Skiruishi T., Yamada T. - J. Mol. Biol., 1995, v. 249, N 3, p. 513-519.
13. Bolwell G., Bell G., Chamer C., Schuch W., Lamb G., Dixon R. - Eur. J. Biochem., 1985, v. 149, p. 411-419.
14. Toos H., Hahlbrock K. - Eur. J. Biochem., 1992, v. 204, N 2, p. 621-629.
15. Wanner L., Li G, Ware D., Somssich I., Davis K. - Plant. Mol. Biol., 1995, v. 27, N 2, p. 327-338.
16. Bevan M., Shufflebotton D., Edwards K., Jeferson R., Schuch W. - The EMBO Journ., 1989, v. 8, N 7, p. 1899-1906.
17. Leyva A., Liang X., Pintor-Toro J., Dixon R., Lomb C. - Plant Cell., 1992, v. 4, N 3, p. 263-271.
18. Yamada T., Sriprasetsak P., Koto H., Hashimoto T., Shimizu H., Shoroiski T. - Plant Cell. Physiol., 1994, v. 35, N 6, p. 917-926.
19. Растительные ресурсы СССР. - Цветковые растения, их химический состав, использование. С.-П.: Наука, 1993, с. 126-128.
20. Murashige T., Skoog F. - Physiol. plant., 1962, v. 15, N 13, p. 473-497.
21. Peterson G.L. - Meth. Enzymol., 1983, v. 91, p. 95-119.

**ՃՈՒՌԱԿԱՆՈՏԻ ԵՎ ԳԵՏՆԱՏԱՆՁԻ ԿԱՆՈՒՍԱՅԻՆ ԿՈՒՏՆՈՒՐԱՆԵՐԻ
ՖԵՆԻԼԱԼԱՆԻՆ-ԱՄՈՆԻԱԿ-ԼԻԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ**

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել է գետնատանձի և ճուռակախտի կալուսային կուլտուրաների ֆենիլալանին-ամոնիակ-լիազային (ՖԱԼ) ակտիվության էքսպրեսիան՝ կախված տարիքից, մեխանիկական վնասվածքների առկայությունից և լույսի ազդեցությունից: Ցույց է տրվել, որ ՖԱԼ-ի լուծահանման համար օպտիմալ է pH 8,3: Գետնատանձի և ճուռակախտի չվնասված կալուսներում լույսի ազդեցության տակ դիտվում է ՖԱԼ-ի ակտիվության բարձրացում: Ճուռակախտի կալուսներում մեխանիկական վնասվածքները առաջացնում են ՖԱԼ-ի ակտիվության քառակի բարձրացում 10-17 օրական կուլտուրայում և կրկնակի բարձրացում՝ 30-100 օրականում: Մեխանիկական վնասվածքի ֆոնի վրա լույսի ազդեցության տակ ՖԱԼ-ի ակտիվությունը հավաստիորեն մեծանում է ևս 10-20%:

Ճուռակախտի ինտենսիվ գորշ գունավորում ունեցող 100 օրական կալուսների հոմոգենատների և սուլֆատային նստվածքի ՖԱԼ-ի ակտիվության համեմատությունը մեխանիկական վնասվածքի դեպքում ցույց է տալիս, որ հոմոգենատում այդ ակտիվությունը 2 անգամ ցածր է: Այս երևույթը տեղի ունի անկախ կալուսների լրացուցիչ լուսային ճառագայթման ենթարկված լինելուց: Նման ազդեցություն երիտասալոյ՝ 10 օրական կալուսներում չի դիտվում: