

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ ДИНАТРИЕВОЙ СОЛИ ЦИКЛОПЕНТЕНОВОГО β, β' -ТРИКЕТОНА НА АКТИВНОСТЬ ГИДРОЛАЗ И СОСТОЯНИЕ ЧАСТИЦ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ В ЛИСТЬЯХ ТАБАКА

© 2013 г. Л. А. Лапшина, А. В. Реунов, В. П. Нагорская, О. П. Шестак, В. Л. Новиков

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток, 690022

e-mail: antreunov@mail.ru

Поступила в редакцию 18.11.2011 г.

Определена активность гидролаз (протеазы, РНКазы) в незараженных и зараженных вирусом табачной мозаики листьях табака сорта Самсун, не обработанных и обработанных динатриевой солью 2-ацетил-4-гидроксикарбонил-метилтио-5-хлороциклопент-4-ен-1,3-диона (ДС). Показано, что обработка листьев этим соединением существенно повышала в них активность гидролаз по сравнению с необработанными листьями. В инфицированных листьях, обработанных за 1 сут до заражения ДС, наряду с повышенным уровнем гидролаз, выявлено большее количество подвергнутых деструктивным изменениям вирусных частиц, чем в зараженных необработанных листьях. Предполагается, что обусловленная ДС активация гидролаз способствует деструкции вирусных частиц и, таким образом, является одним из индуцированных этим соединением защитных механизмов клеток, препятствующих внутриклеточному накоплению вируса.

DOI: 10.7868/S055510991301011X

Важную роль в защите растений от вирусных заболеваний может играть применение биологически активных веществ, способных индуцировать устойчивость растений к вирусам [1]. Поэтому усилия многих исследователей направлены на выявление природных индукторов устойчивости растений, а также на синтез подобных соединений. Показано, что свойствами индукторов вирусостойчивости у растений обладают такие природные соединения, как фитогормоны [1], стероидные гликозиды [2], 1,3; 1,6- β -D-глюканы из грибов [3] и бурых водорослей [4], 1,3; 1,4- β -D-глюкан из лишайника [5], хитозан [6], олигосахариды, полученные из галактоглоукоманнана [7] и ксилоглюкана [8], каррагинаны из красных водорослей [9, 10], фукоидан из бурой водоросли [11], арахионовая кислота [12]. Также сообщалось, что антивирусную активность могут проявлять некоторые синтетические, преимущественно гетероциклические соединения [13–15].

Нами впервые проведены исследования по изучению фитовирусной активности синтетических циклопентеновых β, β' -трикетонов, являющихся структурно родственными редким вторичным метаболитам высших растений семейств Lauraceae, Myrtaceae и Piperaceae, таким, как калитрон [16], линдерон [17], луцидон [18] и корусканон В [19], а также метаболитам высших грибов, таким, как хризотрионы А и В из семейства Nuytorophoraceae [20]. Было установлено [21], что из 22 исследованных циклопентеновых трикетонов и их производных наибольшим антивирус-

ным эффектом в отношении вируса табачной мозаики (ВТМ) обладает динатриевая соль 2-ацетил-4-гидроксикарбонилметилтио-5-хлороциклопент-4-ен-1,3-диона (ДС). Однако механизмы антивирусного действия этого соединения остаются малоизученными.

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что существенную роль в защите растений от патогенов играют гидролазы, такие, как хитиназы и 1,3- β -глюканазы [22], протеазы [23] и РНКазы [24]. Хитиназы и 1,3- β -глюканазы обуславливают деградацию клеточных стенок патогенных грибов и бактерий [22]. Их антивирусное действие может быть связано с образованием олигосахаридов, функционирующих как сигнальные молекулы, запускающие различные защитные механизмы клеток [25]. Эндопроtease Р-69, индуцированная вироидом экзокортиса в растениях томатов, является одним из основных PR белков этого хозяина [26]. Вакуолярный процессирующий фермент, обнаруженный в зараженных ВТМ растениях табака, несущих ген устойчивости *N*, предположительно, играет первостепенную роль в вирус-индуцированном сверхчувствительном ответе [27]. РНКазы могут вовлекаться в противовирусную устойчивость растений, обусловленную различными факторами (действие гиббереллина, стероидных гликозидов, вакцинация слабыми штаммами и др.) [28]. PR белок-10, изолированный из растений *Capsicum annuum* L., обладает антивирусной и РНКазной активностями [29]. Антиви-

русным белкам из некоторых растений присуща высокая РНКазная активность [30, 31].

Нами развивается представление [1, 28], что важную роль в защите клеток от вирусов играет литический компартмент; сущность защиты состоит в деструкции вирусных частиц гидролазами (протеазы, РНКазы), в результате чего появляются “тонкие” и поперечно “разрезанные” вирионы.

Цель работы — исследование влияния ДС на активность гидролаз (протеазы, РНКазы) в здоровых и инфицированных ВТМ листьях табака, а также состояние вирусных частиц в листьях.

МЕТОДИКА

Получение вирусного препарата. Использовали обычный штамм ВТМ, поддерживаемый на растениях табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Самсун, выращиваемых в теплице. Очищенный препарат ВТМ получали по методике, разработанной ранее [32].

Определение активности гидролаз в листьях. Работа выполнена на 4-недельных растениях *N. tabacum* L. сорта Самсун, выращенных в теплице. Молодые листья (длина 5–6 см) разрезали по средней жилке и напыляли карборундом. Левые (опытные) половинки листьев натирали ДС в концентрации 2 мг/мл, а правые (контрольные) — водой, после чего промывали проточной водой и помещали во влажную камеру. Через 1 сут опытные и контрольные половинки листьев вновь напыляли карборундом и половину из них натирали суспензией ВТМ (1 мг/мл), а остальные водой. Затем их промывали и возвращали во влажную камеру. Активность ферментов определяли в 50 дисках диаметром 4 мм, выбитых через 4 сут из здоровых и зараженных листьев, и выражали в единицах оптической плотности. Опыты выполнены в 5-кратной повторности. Статистическую обработку результатов проводили, используя *t*-критерий Стьюдента.

Активность протеаз. Для определения использовали метод, приведенный в работе [33]. Диски растирали в 5 мл 0.1 М Na-фосфатного буфера (рН 5.7), и гомогенаты центрифугировали 15 мин при 7300 g. Каждую пробу разливали в две пробирки по 2 мл, в одну из которых добавляли 1 мл 1%-ного казеина, а в другую (контрольную) — 1 мл дистиллированной воды. Реакцию останавливали путем добавления в пробирки по 2 мл 10%-ной ТХУ. Пробы выдерживали 15 мин на холоду, фильтровали и измеряли в них поглощение при 280 нм.

Активность РНКаз. Активность определяли, основываясь на методике [34]. Диски из листьев растирали в 1.5 мл дистиллированной воды и гомогенаты центрифугировали 30 мин при 6000 g. Супернатант (0.1 мл) добавляли в реакционную смесь, содержащую 0.5 мл 0.1 М Na-ацетатного буфера (рН 5.6) и 0.4 мл раствора дрожжевой РНК

(3 мг/мл). Аналогичные пробы, но без РНК, служили контролем. Полученные смеси выдерживали в течение 1 ч при 37°C. Реакцию останавливали, добавляя 1 мл 0.75%-ного раствора уранилацетата в 25%-ной хлорной кислоте. После 15-минутной инкубации при 2°C осадок удаляли центрифугированием при 6000 g. Затем 0.2 мл супернатанта вносили в 5 мл буфера и измеряли поглощение раствора при 260 нм.

Электронная микроскопия. Для электронно-микроскопического исследования частиц ВТМ в соке из обработанных и необработанных ДС инфицированных листьев применяли метод негативного контрастирования фосфорновольфрамовой кислотой (ФВК) [35]. Использовали те же зараженные ВТМ листья табака, в которых определялась активность гидролаз. На вольфрамовые сеточки, покрытые укрепленной углем формваровой пленкой-подложкой, наносили суспензию сока, полученного из листьев через 4 сут после заражения, и добавляли к ней каплю 2%-ной ФВК, рН 7.0. Через 2 мин образцы осторожно высушивали кусочком фильтровальной бумаги и просматривали в электронном микроскопе LIBRA-120 (“Carl Zeiss”, Германия). В отдельных опытах кусочки зараженных листьев, предназначенные для получения контрастированных ФВК препаратов сока, предварительно фиксировали 3 ч в 6.5%-ном растворе глутарового альдегида, приготовленном на Na-фосфатном буфере, рН 7.4. Измерение диаметра и длины негативно окрашенных ФВК вирусных частиц проводили на 20 произвольно выбранных полях электронного микроскопа при общем увеличении 150000. Были измерены диаметр и длина 300 вирусных частиц из опытных и 300 частиц из контрольных препаратов.

Иммуно-электронномикроскопические исследования частиц ВТМ в соке из инфицированных листьев проводили, используя антисыворотки, полученные в Биолого-почвенном институте ДВО РАН. Применяли метод, получивший название техники декорирования [35]. Кусочки зараженных листьев, обработанных либо не обработанных ДС, измельчали лезвием в капле дистиллированной воды, и на каплю помещали сеточку, покрытую напыленной углем формваровой пленкой-подложкой. Через 1 мин сеточку просушивали кусочком фильтровальной бумаги, помещали на каплю ВТМ-специфической антисыворотки и инкубировали во влажной камере в течение 15 мин при 37°C. В некоторых экспериментах использовали антисыворотку к X-вирусу картофеля (ХВК) или контрольную сыворотку. Приготовленные образцы тщательно промывали дистиллированной водой, просушивали фильтровальной бумагой, контрастировали 3–5 мин 2%-ной ФВК (рН 7.0) и исследовали в электронном микроскопе.

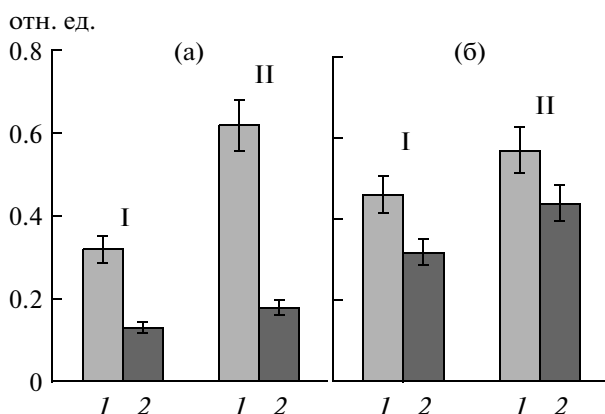


Рис. 1. Активность протеаз (а) и РНКаз (б) в здоровых (I) и зараженных ВТМ (II) листьях табака, обработанных ДС (1) и необработанных (2). Значимость различий при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Действие ДС на активность гидролаз в листьях. Данные, представленные на рис. 1а, 1б, свидетельствуют о том, что обработка листьев табака сорта Самсун (как здоровых, так и зараженных ВТМ) ДС сопровождается существенным увеличением в них, в сравнении с необработанным контролем, активности гидролитических ферментов (протеазы, РНКазы). В здоровых листьях, обработанных ДС в концентрации 2 мг/мл, активность протеаз была в 2.46 (рис. 1а), а РНКаз — в 1.44 (рис. 1б) раза выше, чем в контроле. При заражении не обработанных ДС листьев ВТМ активность протеаз в них была выше, чем в незараженном контроле, в 1.38 (рис. 1а), а РНКаз — в 1.37 (рис. 1б) раз. Заражение обработанных ДС листьев ВТМ вызывало повышение в них активности протеаз в 3.44 раза (рис. 1а), в сравнении с зараженными необработанными листьями, а РНКаз — в 1.3 раза (рис. 1б).

Влияние ДС на состояние вирусных частиц в листьях. Параллельно с определением активности гидролитических ферментов в не обработанных и обработанных ДС инфицированных ВТМ листьях мы исследовали состояние вирионов в негативно окрашенных ФВК препаратах, приготовленных из этих листьев.

Получены данные, что в таких препаратах, наряду с нормальными частицами ВТМ (диаметр 18 нм и длина 300 нм), наблюдались аномальные вирионы, диаметр и длина которых были существенно больше или меньше нормальных значений (рис. 2). В контрастированных ФВК препаратах, приготовленных из зараженных листьев, предварительно фиксированных глутаровым альдегидом, пропорция нормальных и аномальных вирионов существенно не отличалась в сравнении с препаратами из не фиксированных глутаро-

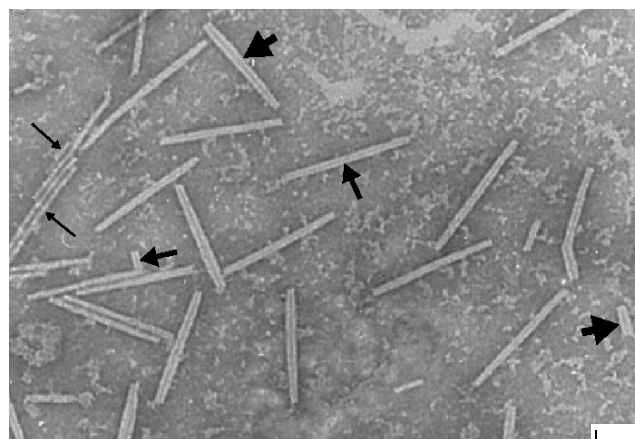


Рис. 2. Контрастированные ФВК частицы ВТМ из обработанных ДС листьев табака через 4 сут после заражения. Средние, толстые и тонкие стрелки показывают соответственно нормальные, набухшие и “тонкие” вирионы. Масштаб: 100 нм.

вым альдегидом листьев. Поэтому наличие аномальных вирусных частиц в исследованных препаратах не является артефактом.

Проведенные иммуно-электронномикроскопические исследования показали, что вирионы нормального диаметра, а также набухшие вирусные частицы полностью декорируются специфической антисывороткой (рис. 3). “Тонкие” частицы ВТМ утрачивали способность покрываться антителами, и лишь в некоторых участках, в которых диаметр вириона был сравнительно большим, могли быть ассоциированы с антисыворот-

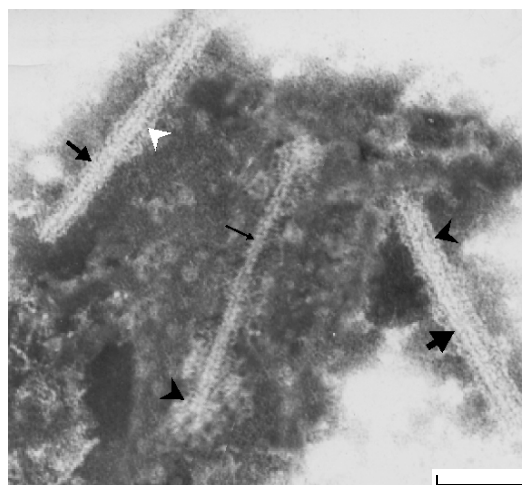


Рис. 3. Обработанные специфической антисывороткой и контрастированные ФВК частицы ВТМ из обработанных ДС листьев табака через 4 сут после заражения. Средние, толстые и тонкие стрелки показывают соответственно нормальные, набухшие и “тонкие” вирионы. Головки стрелок показывают ВТМ-специфическую антисыворотку. Масштаб: 100 нм.

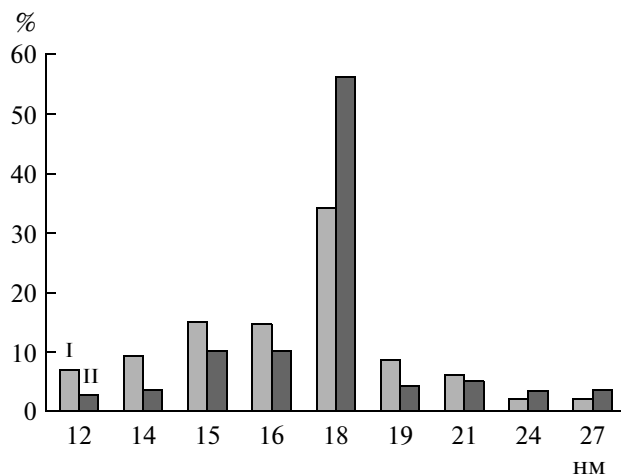


Рис. 4. Распределение частиц ВТМ по величине диаметра в препарате сока, полученного из обработанных (I) и необработанных (II) ДС листьев табака через 4 сут после заражения.

кой (рис. 3). Антисыворотка к ХВК и контрольная сыворотка не связывались с частицами ВТМ.

Присутствие в суспензиях набухших (толстых) и “тонких” вирионов можно объяснить следующим образом. После заражения в содержащих вирус участках клетки изменяются некоторые физико-химические характеристики (например, рН), в результате чего белковые субъединицы вирионов могут претерпевать конформационные модификации и подвергаться частичному разрыхлению и расплетанию. Разрыхление белковых субъединиц, вероятно, приводит к появлению набухших вирионов, а частичное расплетание полипептидных субъединиц – к “отрезанию” пептидных связей протеазами, в результате чего вирионы “истончаются”. Подобным образом объяснялась деструкция белков аденовируса 2 [36]. Тот факт, что тонкие частицы ВТМ, в отличие от вирионов нормального диаметра, утрачивают способность связываться со специфической антисывороткой, видимо, обусловливается частичным протеолизом капсидного белка, сопровождающимся элиминацией детерминантных групп, ответственных за связывание с антителами.

Проведенный анализ распределения частиц ВТМ по диаметрам показал, что препараты, приготовленные из обработанных ДС листьев, содержали значительно больше “тонких” вирионов, чем препараты, полученные из необработанных листьев (рис. 4). Так, в суспензиях из обработанных ДС листьев наблюдали 34.4% вирусных частиц нормального диаметра, 19.2% набухших и 46.4% “тонких” частиц. В суспензиях из зараженных необработанных листьев обнаружено 56.4% вирионов нормального диаметра, 16.6% набухших и 27% “тонких”.

Наличие в суспензии вирионов, длина которых превышала 300 нм, видимо, обусловлено спо-

собностью вирионов стыковаться друг с другом, что отмечалось ранее [37]. Иногда в препаратах наблюдались “короткие” вирионы, имеющие нормальный диаметр (рис. 2). Присутствие таких вирионов, по-видимому, связано с незавершенностью их сборки. Значительно чаще обнаруживались “короткие” частицы ВТМ, диаметр которых был больше или меньше нормального (рис. 2). Появление таких частиц, вероятно, можно объяснить тем, что вследствие нарушения стабильности белковой оболочки вирусная РНК становится доступной действию РНКаз, в результате чего происходит фрагментирование (поперечное “разрезание”) вирионов. Получены данные, что обработка листьев ДС способствует образованию подобных фрагментированных вирионов. Так, в суспензиях из листьев, обработанных ДС, содержится 55.15%, а в суспензиях из необработанных листьев – 40.14% “коротких” частиц.

Представленные данные об увеличении в зараженных листьях под действием ДС количества “тонких” и фрагментированных вирусных частиц свидетельствуют о существовании корреляции между повышением активности гидролаз (протеазы, РНКазы) и внутриклеточной деструкцией вирионов. Мы полагаем, что повышение активности гидролаз, способствующее разрушению вирусных частиц, является одним из индуцированных ДС защитных механизмов клеток, ограничивающих, как было показано нами ранее [38], накопление в них вируса.

Следует подчеркнуть, что при обработке ДС повышается активность гидролаз в здоровых растительных тканях. Вероятно, повышение литической активности клеток под действием ДС является фактором, способствующим разрушению потенциального вирусного патогена и, таким образом, стимулирующим вирусостойчивость растительных тканей.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантом ДВО РАН № 09-111-А-05-149.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Реунов А.В. Вирусный патогенез и защитные механизмы растений. Владивосток: Дальнаука, 1999. 175 с.
2. Кинтя П.К., Лазурьевский Г.В., Балашова Н.Н., Балашова И.Т., Суружцу А.И., Лях В.А. Строение и биологическая активность стероидных гликозидов ряда спиростана и фуростана. Кишинев: Штиинца, 1987. 142 с.
3. Rouhier P., Kopp M., Begot V., Bruneteau M., Fritig B. // *Phytochemistry*. 1995. V. 39. № 1. P. 57–62.
4. Reunov A.V., Lapshina L.A., Nagorskaya V.P., Elyakova L.A. // *J. Phytopathol.* 1996. V. 144. № 1. P. 247–249.
5. Stübler D., Buchenauer H. // *J. Phytopathol.* 1996. V. 144. № 1. P. 37–43.
6. Чирков С.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. № 1. С. 5–13.

7. Slovákova L., Lišková D., Capek P., Kubačková M., Kákoniová D., Karácsonyi Š. // Eur. J. Plant Pathol. 2000. V. 106. № 6. P. 543–553.
8. Šubíková V., Slovákova L., Farkaš V. // Z. Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 1994. B. 101. № 1. S. 128–131.
9. Reunov A.V., Nagorskaya V.P., Lapshina L.A., Yermak I.M., Barabanova A.O. // J. Plant Diseases and Protection. 2004. V. 111. № 2. P. 165–172.
10. Барабанова А.О., Ермак И.М., Реунов А.В., Нагорская В.П., Соловьева Т.Ф. // Раст. ресурсы. 2006. Т. 42. № 4. С. 80–86.
11. Лапшина Л.А., Реунов А.В., Нагорская В.П., Звягинцева Т.Н., Шевченко Н.М. // Физиология растений. 2006. Т. 53. № 2. С. 274–279.
12. Рожнова Н.А., Одинцова Т.И., Геращенко Г.А. // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 6. С. 870–875.
13. Fraser R.S.S., Whenham R.J. // J. Gen. Virol. 1978. V. 39. № 1. P. 191–194.
14. Balazs E., Kiraly Z. // Phytopathol. Z. 1981. B. 100. № 4. S. 356–360.
15. Schuster G. // Phytopathol. Z. 1987. B. 119. № 3. S. 262–271.
16. Birch A.J. // J. Chem. Soc. 1951. № 11. P. 3026–3030.
17. Kiang A.K., Lee H.H., Sim K.Y. // J. Chem. Soc. 1962. № 11. P. 4338–4345.
18. Lee H.H. // Tetrahedron Lett. 1968. V. 9. № 40. P. 4243–4246.
19. Li X.-C., Ferreira D., Jacob M.R., Zhang Q., Khan S.I., ElSohly H.N., Nagle D.G., Smillie T.J., Khan I.A., Walker L.A., Clark A.M. // J. Amer. Chem. Soc. 2004. V. 126. № 22. P. 6872–6873.
20. Gilardoni G., Clericuzio M., Tosi S., Zanoni G., Vidari G. // J. Natur. Prod. 2007. V. 70. № 1. P. 137–139.
21. Лапшина Л.А., Шестак О.П., Реунов А.В., Новиков В.Л., Анисимов М.М. // Раст. ресурсы. 2006. Т. 42. № 1. С. 107–113.
22. Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M. // Annu. Rev. Phytopathol. 2006. V. 44. P. 135–162.
23. Van der Hoorn, R.A.L. // Annu. Rev. Plant Biol. 2008. V. 59. P. 191–223.
24. Трифонова Е.А., Кочетов А.В., Шумный В.К. // Усп. соврем. биол. 2007. Т. 127. № 1. С. 13–24.
25. Ryan C.A. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 25. P. 8879–8883.
26. Vera P., Conejero V. // Plant Physiol. 1988. V. 87. № 1. P. 58–63.
27. Hatsugai N., Kuroyanagi M., Yamada K., Meshi T., Tsuda S., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. // Science. 2004. V. 305. № 5685. P. 855–858.
28. Реунов А.В., Реунов А.А. Литическая функция клетки. М.: Наука, 2008. 181 с.
29. Park C.J., Kim K.J., Shin R., Park J.M., Shin Y.C., Paek K.H. // Plant J. 2004. V. 37. № 2. P. 186–198.
30. Begam M., Narwal S., Roy S., Kumar S., Lodha M.L., Kapoor H.C. // Biochemistry (Moscow) 2006. V. 71. Suppl. 1. P. S44–S48.
31. Чудхари Н.Л., Ядав О.П., Лодха М.Л. // Биохимия. 2008. Т. 73. № 3. С. 336–341.
32. Otsuki Y., Takebe I., Onho T., Fukuda M., Okada Y. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 74. № 5. P. 1913–1917.
33. Алексеенко Л.П. // Современные методы в биохимии. М., Медицина, 1968. С. 115–130.
34. Татарская Р.И., Абросимова-Амельянич Н.М., Аксельрод А.И., Корняко А.А., Ниетро Н.Я., Баев А.А. // Биохимия. 1966. Т. 31. № 5. С. 1017–1026.
35. Королев М.Б. // Электронная микроскопия вирусов и вирусных инфекций. Итоги науки и техники. Сер. Вирусология. М.: ВИНТИ, 1980. С. 114–157.
36. Everitt E., Persson M.J., Wohlfart C. // FEMS Microbiol. Lett. 1988. V. 49. № 2. P. 229–233.
37. Esau K. Viruses in Plant Hosts. Form, Distribution and Pathological Effects. Madison, Wis.: Univ. Wisconsin Press, 1967. 225 p.
38. Лапшина Л.А., Реунов А.В., Нагорская В.П., Шестак О.П., Новиков В.Л. // Изв. РАН. Сер. биол. 2010. № 5. С. 625–630.

Effect of Cyclopentene β,β' -Triketone Disodium Salt on the Activity of Hydrolases and the State of Tobacco Mosaic Virus Particles in Tobacco Leaves

L. A. Lapshina, A. V. Reunov, V. P. Nagorskaya, O. P. Shestak, and V. L. Novikov

Pacific Ocean Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

e-mail: antreunov@mail.ru

Received November 18, 2011

Abstract—The activity of hydrolases (protease, RNase) in uninfected and tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves of the Samsun variety, untreated and treated with disodium salt of 2-acetyl-4-hydroxycarbonyl-methylthio-5-chlorocyclopent-4-en-1,3-dione (DS), was determined. It was shown that treatment of leaves with this compound significantly increased the activity of hydrolases in them compared to untreated leaves. In infected leaves treated with DS one day before infection, along with an increased level of hydrolases, one revealed more viral particles exposed to destructive changes in infected, rather than untreated, leaves. It is assumed that the DS-caused activation of hydrolases promotes the destruction of viral particles and is therefore one of the cell defense mechanisms induced by this compound that prevents the intracellular accumulation of virus.