

Н. С. МАМЫТОВА¹, К. К. БОГУСПАЕВ², О. В. ФУРСОВ¹

¹РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина», Алматы, Казахстан,
e-mail: n_mamytova@mail.ru,

²Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан)

ОСОБЕННОСТИ СЕКРЕЦИИ α -АМИЛАЗЫ АЛЕЙРОНОВОГО СЛОЯ ПШЕНИЦЫ

Аннотация. Исследована активность и электрофоретический спектр внутриклеточной (синтезированной) и внеклеточной (секретируемой) α -амилазы пшеничного алейронового слоя с помощью двух типов субстрата – растворимого крахмала и β -лимит декстрина. Установлены существенные различия в термостабильности изоформ фермента, продуцируемого изолированным и интактным алейроном. На основе экспериментальных данных с применением ингибиторов гликозилирования моненсина и туникамицина делается заключение о важности этапа постсинтетической модификации изоферментов пшеничной α -амилазы в придании термостабильности зрелым формам фермента.

Ключевые слова: алейрон, α -амилаза, изоферменты, секреция, синтез.

Тірек сөздер: алейрон, α -амилаза, изоферменттер, секреция, синтез.

Keywords: aleurone, α -amylase isozymes, secretion, synthesis.

Изучение растительной секреции это новая область протеомного исследования, посвященная глобальному исследованию реализации функций синтезированных белков, путем включения различных секреторных механизмов [1]. Алейроновый слой злаковых весьма значим в формировании как питательных свойств продуктов переработки и эффективности промышленного солодоращения, так и семенных показателей зерновки. Прорастание семян определяется способностью мобилизации запасных веществ эндосперма. В ответ на действие синтезируемого в зародыше гормона гибберелловой кислоты ($ГК_3$) алейроновый слой синтезирует гидролазы, секретирующиеся в эндосперм для деградации запасных веществ. Одним из превалирующих ферментов, синтезируемых алейроновым слоем является α -амилаза (3.2.1.1, или 1,4-глюкан-4-глюкогидролаза), участвующая в мобилизации резервного полисахарида – крахмала [2]. На сегодняшний день активно исследуются протеомы алейронового слоя ячменя, как модельные системы растительной сигнальной трансдукции и секреции белков, в частности, α -амилазы [3].

Показано, что максимум секреции, синтезированной алейроном под действием ГК₃ α-амилазы, достигается через 10-12 часов от начала индукции и зависит от наличия ионов Ca²⁺ [2]. В процессе созревания способность алейронового слоя ячменя к синтезу и секреции α-амилазы резко возрастает после 30 дня после цветения и стимулируется подсушиванием зерновки [4]. Особых успехов в изучении механизмов постсинтетической модификации α-амилазы и секреции изоферментов алейронового слоя ячменя добились Р.Л. Джонс и его коллеги.

Ими выявлены не секретируемые предшественники «зрелой» α-амилазы, с уменьшением изоэлектрических точек которых связан их переход в экстрацеллюлярные, т.е. секретируемые изоферменты [5]. При этом отмечена термостабильность секретируемых ферментов в сравнении с внутриклеточными. Этими же авторами использован ионофор моненсин, ингибирующий секрецию α-амилазы, а также выявлен и частично очищен белковый фактор модификации предшественников α-амилазы [6].

В более ранней работе [7] показано ингибирующее влияние антибиотика туникамицина (ТМ) на секрецию α-амилазы алейронового слоя зерна ячменя. Авторы считают, что ТМ препятствует гликозилированию фермента, подавляя его секрецию. В то же время Р.Л. Джонс и соавторы [8] отрицают наличие карбогидратных компонентов в структуре «зрелой» (процессированной) α-амилазы.

Имеются сведения об ингибировании ионофором моненсином секреции α-амилазы щитка зерновки кукурузы [9]. Значительное количество работ посвящено вторичной модификации и секреции α-амилаз риса. Установлено наличие двух различных по структуре гликозидной связи форм α-амилазы секретируемой щитком зерна риса [10]. Как и на ячмене, продемонстрирована стимулирующая роль ионов Ca²⁺ в синтезе и секреции α-амилаз щитка риса.

В связи со сказанным выше, а также значимостью пшеницы как основного хлебопекарного злака нами предпринято исследование особенностей секреции различных форм α-амилазы зерна пшеницы.

Материалы и методы

Объектами исследования служили изолированные алейроновые слои зерновок мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Казахстанская 10.

Алейроновые слои, свободные от крахмала, выделяли в асептических условиях из предварительно замоченных в течение суток семян с удаленными зародышами и инкубировали в лунках 6-гнездных плашек на средах небольшого объема. При изучении влияния продолжительности инкубации на синтез и секрецию α-амилазы изолированные алейроновые слои инкубировали в 5 мМ растворе CaCl₂, содержащем 1 мкМ ГК₃ («Sigma», США) в течение 36 часов.

Амилазную активность определяли крахмал-йодным методом с использованием 0,02 %-го крахмала в качестве субстрата и выражали в единицах активности на 1 мл за 1 час [11]. Для определения активности термолabileной α-амилазы алейронового слоя в качестве субстрата использовался β-ограниченный декстрин («Megazyme», Ирландия), специфичный для α-амилазы, что позволяет исключить предварительный прогрев ферментного образца при 65°C.

Изоэлектрофокусирование (ИЭФ) α-амилазы проводили на приборе Мультифор («ЛКВ», Швеция) в 1 мм пластинах 5% ПААГ в градиенте амфолинов рН 4-9 («Sigma», США). По окончании ИЭФ гели инкубировали в 1% растворе крахмала в течение 1 часа при +4°C с последующим проявлением зон активности фермента раствором J₂/KJ.

Ферментную активность измеряли в трех аналитических повторностях. Результаты обработаны статистически с вычислением стандартной погрешности среднего.

Результаты и обсуждение

Как отмечалось выше, в литературе практически отсутствуют сведения о секретируемых формах α-амилазы алейронового слоя зерна пшеницы. Имеются лишь сведения о том, что в отсутствие ГК₃ секретируемая беззародышевыми половинками зерна α-амилаза, была термолabileна. Добавленный в среду инкубации гормон придавал ферменту свойственную α-амилазе стабильность [12].

В наших исследованиях, проведенных на изолированном алейроне в присутствии гормона, показано, что независимо от сроков инкубации (от 24 до 72 часов) в среде отсутствовала термостабильная α -амилаза (рисунок 1 А, Б). Для того чтобы выяснить происходит ли секреция α -амилазы изолированным алейроном под действием ГК₃, были проведены эксперименты с использованием специфичным только для α -амилазы субстратом β -ограниченным декстрином, который позволяет избежать процедуру прогрева (65°C, 15 минут), необходимую для инактивации β -амилазы.

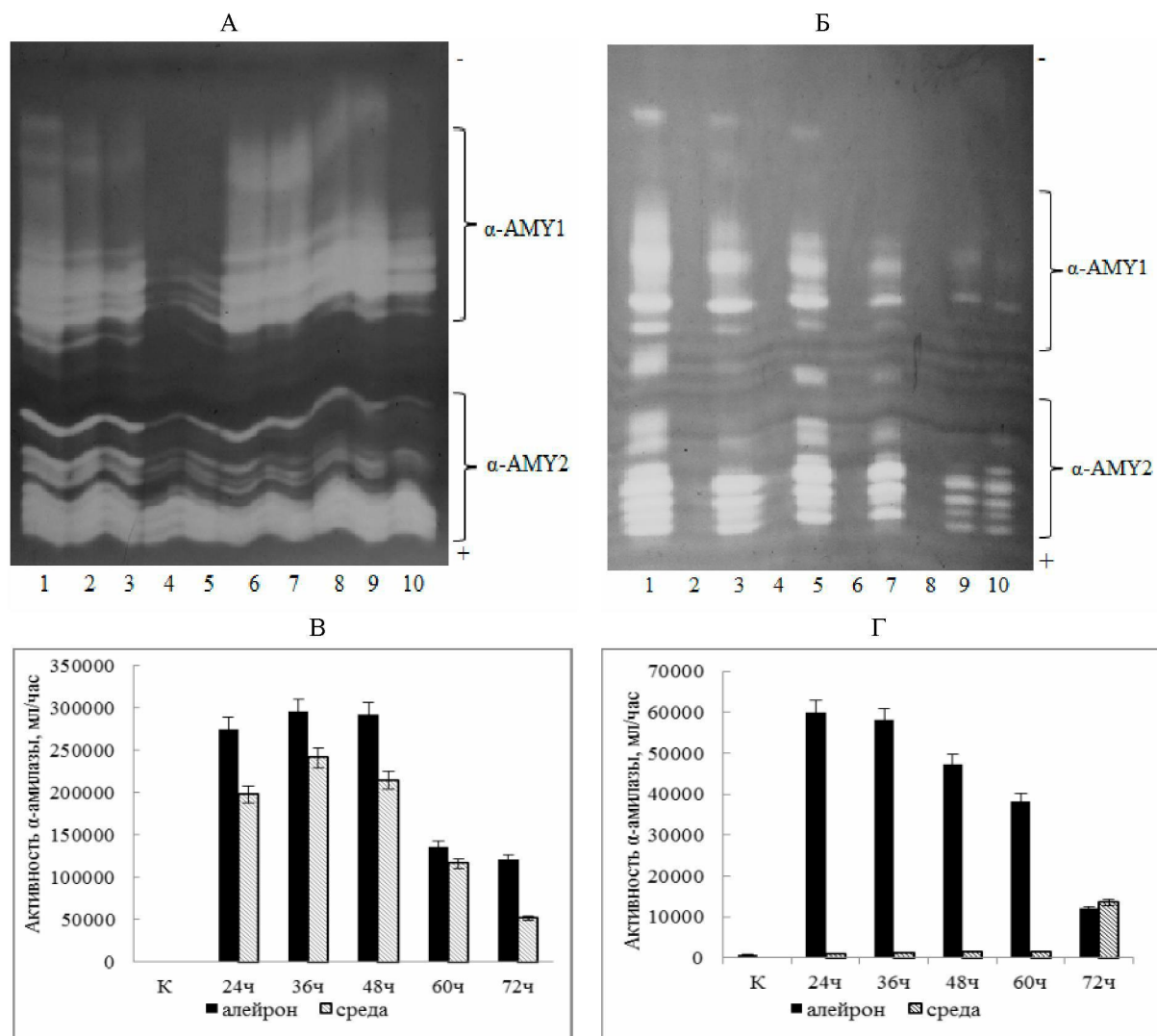


Рисунок 1 – Временная динамика α -амилазы

в изолированном алейроновом слое и инкубационной среде (5 мМ CaCl₂, 1 мкМ ГК₃):

А – изоферментный состав α -амилазы (субстрат 5% β -лимит декстрин); Б – изоферментный состав α -амилазы (прогрев при 65°C 15 мин, субстрат 1,5% крахмал); 1 – алейрон без инкубации (контроль); 2–6 – алейрон после 24, 36, 48, 60 и 72 часов инкубации; 7–11 – среда после 24, 36, 48, 60 и 72 часов инкубации;

В – активность α -амилазы (субстрат 5% β -лимит декстрин); Г – активность α -амилазы (прогрев при 65°C 15 мин, субстрат 1,5% крахмал)

В последующем на изолированных алейроновых слоях было изучено влияние классического ингибитора секреции – ионофора моненсина на α -амилазу внутриклеточных структур и секретуемый фермент при оптимальном времени инкубации – 36 часов (рисунок 2 А, Б). Можно утверждать, что при концентрациях моненсина 2,5-5 мкМ этот ионофор стимулировал как внутриклеточную, так и внеклеточную α -амилазу (рисунок 2 А, Б). Увеличение концентрации ионофора от 10 до 50 мкМ приводило к подавлению обеих формы фермента. Изучено влияние моненсина на термостабильность α -амилазы алейронового слоя при 15 минутном прогреве при 65°C (рисунок 2 А, Б).

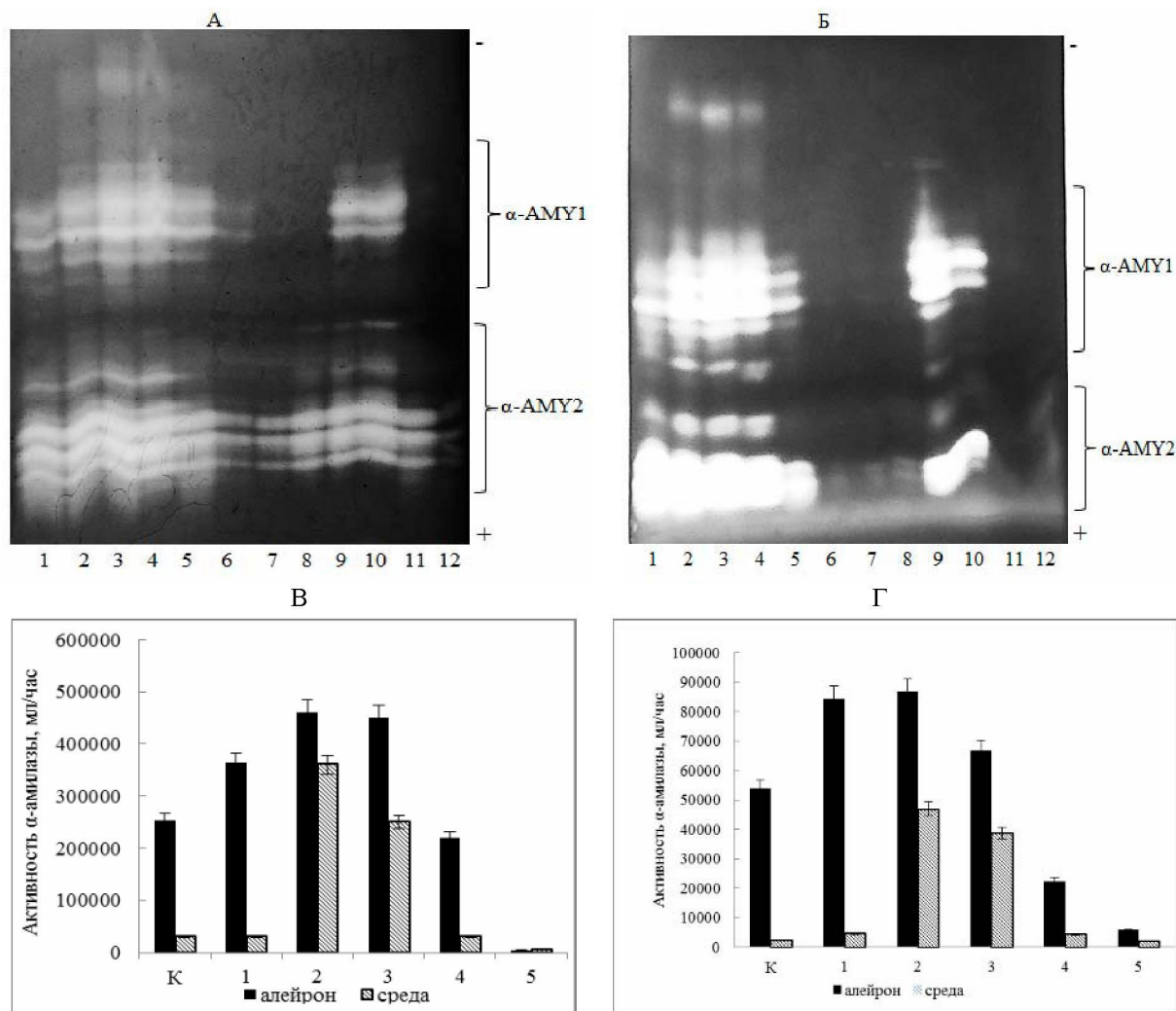


Рисунок 2 – Влияние моненсина на изоферментный состав (А, Б) и активность (В, Г) α -амилазы в изолированном алейроне:

А – ИЭФ α -амилазы (без прогрева, 5% β -лимит декстрин), Б – ИЭФ α -амилазы (прогрев 65° 15 мин, 1,5% крахмал); 1 – инкубация алейрона 36 часов без моненсина, 2–6 – инкубация алейрона 36 часов в присутствии 1, 2,5, 5, 10 и 50 мкМ моненсина; 7 – среда без моненсина, 8–12 – среда с 1, 2,5, 5, 10 и 50 мкМ моненсина; В – активность α -амилазы с β -лимит декстрином; Г – активность α -амилазы (прогрев при 65° 15 мин) с крахмалом; К – алейрон после 36 часов инкубации (контроль), 1–5 – алейрон после 36 часов инкубации в присутствии 1, 2,5, 5, 10 и 50 мкМ моненсина

Наши результаты по изоэлектрофокусированию α -амилазы с использованием субстратов β -ограниченного декстрина и растворимого крахмала наглядно демонстрируют, что ионофор в значительно большей мере действует на термостабильность α -амилазы изолированного алейрона зерна, что еще раз указывает на какие то структурные нарушения, имеющие место при отделении этой ткани от эндосперма.

Вторым общепризнанным ингибитором секреции является антибиотик туникамицин [7–9]. Установлено, что ТМ блокирует первый в формировании долинхольсвязанного предшественника N-связанных олигосахаридов, т.е. является ингибитором гликозилирования по N-типу связывания [1]. Наши эксперименты с ТМ проводились с использованием одной (50 мкг/1 мл среды) концентрации этого агента. Для определения эффективности действия ТМ использовали три варианта его внесения в инкубационную среду: 1 – с самого начала инкубации и до конца (36 часов), 2 – ТМ вносили после 15 часов инкубации с ГК₃, 3 – ТМ после 15 часов инкубации с ГК₃ вносили в свежей порции среды (рисунок 3 А, Б).

Наглядно видно, что туникамицин при изначальном внесении в среду инкубации заметно влиял на активность и термостабильность изоферментов как внутриклеточной, так и секретируемой α -амилазы (рисунок 3 А, 2,6; В 1).

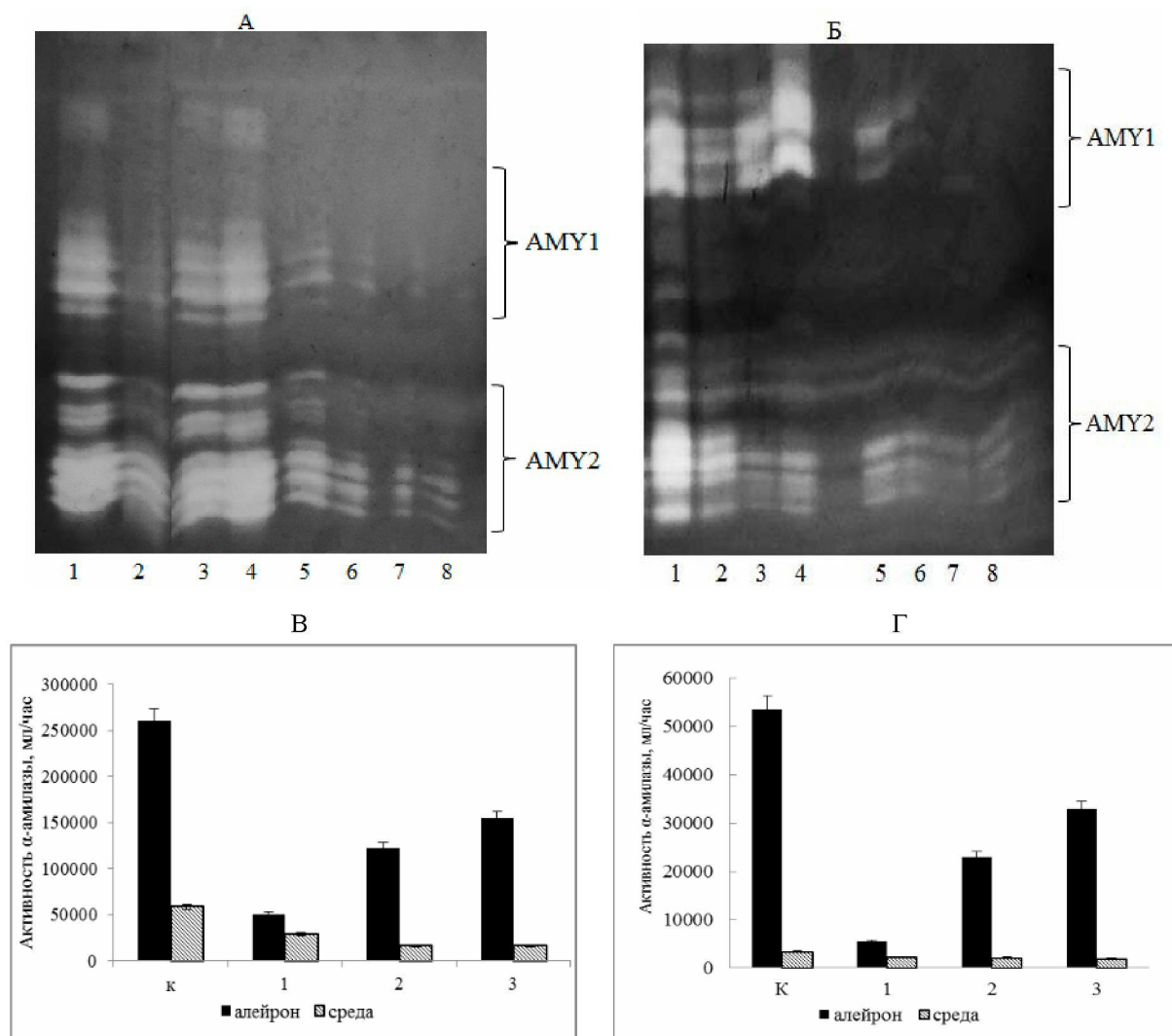


Рисунок 3 – Влияние туникамицина на изоферментный состав (А, Б) и активность (В, Г) α -амилазы в изолированном алейроне пшеницы:

А – ИЭФ α -амилазы (без прогрева, 5% β -лимит декстрин); Б – ИЭФ α -амилазы (прогрев при 65° 15 мин, 1,5% крахмал); 1 – инкубация алейрона 36 часов в отсутствии ТМ; 2 – инкубация алейрона с ТМ 30 часов; 3 – добавление ТМ после 15 часов инкубации алейрона с ГК₃; 4 – добавление ТМ со свежей средой после 15 часов инкубации алейрона с ГК₃; В – активность α -амилазы с β -лимит декстрином; Г – активность α -амилазы (прогрев 65° 15 мин) с крахмалом; К – алейрон (контроль), 1 – алейрон после 30 часов инкубации; 2 – внесение ТМ после 15 часов инкубации алейрона с ГК₃; 3 – внесение ТМ в свежей среде после 15 часов инкубации алейрона с ГК₃

Внесение этого фактора, после 15 часовой инкубации с заменой среды (рисунок 3 А3, В) и без его замены (рисунок 3 А4 и В) несколько подавляло активность внутриклеточного фермента и значительно ингибировало секретируемую α -амилазу. Таким образом варианты с внесением антибиотика в среду инкубации после 15 часов синтеза α -амилазы, указывает на особую эффективность ингибирующего действия этого агента на уже синтезированный в клетках фермент.

Аналогичное исследование по действию ТМ на секрецию α -амилазы алейронового слоя зерна пшеницы проведено с использованием β -лимит декстрина – субстрата специфичного для α -амилазы, что позволяет исключить процедуру прогрева при 65°С 15 минут. Показано (рисунок 3 Б,Г), что в случае использования специфичного субстрата, во всех вариантах опыта секретиrowались практически все синтезированные (внутриклеточные) изоферменты α -амилазы.

Таким образом, очевидно, что туникамицин подавлял постсинтетическую модификацию фермента, что приводило к снижению его термостабильности. При этом количество секретируемой α -амилазы снижалось незначительно. Наши данные показывают, что в отличие от ячменной [7, 8], пшеничная α -амилаза в процессе секреции претерпевает какие-то модификационные изменения,

связанные с гликозилированием и придающие ферменту термостабильность, что косвенно подтверждается исследованиями А. Хадера и соавторов [12].

Таким образом нами установлено наличие модификационных изменений свойственных секретируемой α -амилазе алейронового слоя зерна пшеницы. При этом показано, что немодифицированный фермент обладал способностью секретироваться, но терял характерную для «зрелой» α -амилазы термостабильность. Кроме того продемонстрировано, что нарушение каких-то структурных взаимодействий между алейроновым слоем и эндоспермом влияет на свойства фермента: α -амилаза теряет термостабильность, т.е. нарушается процесс посттрансляционной модификации. Впервые для злаковых культур установлено положительное влияние некоторых концентраций ионофора моненсина на термостабильность α -амилазы.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Ganesh K.A., Nam-Soo J., Marc-Henri L., Dominique J., Randeep R. Plant secretome: Unlocking secrets of the secreted proteins // *Proteomics*. – 2010. – Vol. 10. – P. 799-827.
- 2 Moll B.A., Jones R.L. α -amylase secretion by single barley aleurone layers // *Plant Physiol.* – 1982. – Vol. 70. – P. 1149-1155.
- 3 Finnie C., Andersen B., Shahpiri A., Svensson B. Proteomes of the barley aleurone layer: A model system for plant signalling and protein secretion // *Proteomics*. – 2011. – Vol. 11. – P. 1595-1605.
- 4 Jiang L., Kermode A.R., Jones R.L. Premature drying increases the GA-responsiveness of developing aleurone layers of barley (*Hordeum vulgare* L.) grain // *Plant Cell Physiol.* – 1996. – Vol. 37(8). – P. 116-1125.
- 5 Jacobsen J.V., Bush D.S., Sticher L., Jones R.L. Evidence for precursor forms of the low isoelectric point α -amylase isozymes secreted by aleurone cells // *Plant Physiol.* – 1988. – Vol. 88. – P. 1168-1174.
- 6 Sticher L., Jones R.L. Isolation and partial characterization of a factor from barley aleurone that modifies α -amylase *in vitro* // *Plant Physiol.* – 1991. – Vol. 97. – P. 936-942.
- 7 Jones R.L., Bush D.S. Gibberellic acid regulates the level of a BIP cognate in the endoplasmic reticulum of barley aleurone cells // *Plant Physiol.* – 1991. – Vol. 97. – P. 456-459.
- 8 Sticher L., Jones R.L. α -amylase isoforms are posttranslationally modified in the endomembrane system of the barley aleurone layer // *Plant Physiol.* – 1992. – Vol. 98. – P. 1080-1086.
- 9 Stisher L., Jones R.L. Monensin inhibits the secretion of α -amylase but not polysaccharide slime from seedling tissues of *Zea mays* // *Protoplasma*. – 1988. – Vol. 142. – P. 36-45.
- 10 Mitsui T. and Akazawa T. Secondary modification of carbohydrate chains in α -amylase molecules synthesized in rice scutellum // *Physiol. vegetale*. – 1986. – Vol. 24(6). – P. 629-638.
- 11 Гильманов М.К., Фурсов О.В., Францев А.П. Методы очистки и изучения ферментов растений. – Алма-Ата: Наука, 1981. – С. 91.
- 12 Hader A., Rikiishi K., Nisar A., Noda K. Characteristics of α -amylase induced in distal half-grains of wheat // *Breeding Sci.* – 2003. – Vol. 53. – P. 119-124.

REFERENCES

- 1 Ganesh K.A., Nam-Soo J., Marc-Henri L., Dominique J., Randeep R. *Proteomics*. 2010. Vol. 10. P. 799-827.
- 2 Moll B.A., Jones R.L. *Plant Physiol*, 1982, Vol. 70. P.1149-1155.
- 3 Finnie C., Andersen B., Shahpiri A., Svensson B. *Proteomics*. 2011. Vol. 11. P. 1595-1605.
- 4 Jiang L., Kermode A.R., Jones R.L. *Plant Cell Physiol*. 1996. Vol. 37(8). P. 116-1125.
- 5 Jacobsen J.V., Bush D.S., Sticher L., Jones R.L. *Plant Physiol*. 1988. Vol. 88. P. 1168-1174.
- 6 Sticher L., Jones R.L. *Plant Physiol*. 1991. Vol. 97. P. 936-942.
- 7 Jones R.L., and Bush D.S. *Plant Physiol*. 1991. Vol. 97. P. 456-459.
- 8 Sticher L., Jones R.L. *Plant Physiol*. 1992. Vol. 98. P. 1080-1086.
- 9 Stisher L., Jones R.L. *Protoplasma*. 1988. Vol. 142. P. 36-45.
- 10 Mitsui T., Akazawa T. *Physiol. vegetale*. 1986. Vol. 24(6). P. 629-638.
- 11 Gilmanov M.K., Fursov O.V., Francev A.P. *Alma-Ata: Nauka*, 1981. S. 92 (in Russ).
- 12 Hader A., Rikiishi K., Nisar A., Noda K. *Breeding Sci*. 2003. Vol. 53. P. 119-124.

Резюме

Н. С. Мамытова¹, К. Қ. Богысбаев², О. В. Фурсов¹

¹М. Ә. Айтқожин атындағы Молекулалық биология және биохимия институты, Алматы, Қазақстан,
²әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан)

БИДАЙДЫҢ АЛЕЙРОН ҚАБАТЫНДАҒЫ α -АМИЛАЗА СЕКРЕЦИЯСЫНЫҢ ЕРЕКШЕЛІКТЕРІ

Бидайдың алейрон қабатындағы жасушаішілік (синтезделген) және жасушадан тыс (секреттелген) α -амилазаның белсенділігі мен электрофоретикалық спектрін зерттеу – ерітілген крахмал және β -лимит декстрин

екі типті субстратының көмегімен жүргізілді. Жеке бөлініп алынған және интактты алейрон өндірген фермент изоформаларының термотұрақтылығының арасында айырмашылықтар анықталды. Тәжірибе нәтижелері негізінде гликолиздеу ингибиторлары моненсин және туникамицинді қолдана отырып, бидай α -амилазасы изоферментінің постсинтетикалық түрлену кезеңінің ферменттің пісіп-жетілген формаларына термотұрақтылықты беретін маңызының зор екендігіне қорытынды жасалды.

Тірек сөздер: алейрон, α -амилаза, изоферменттер, секреция, синтез.

Summary

¹N.S. Mamytova, ²K.K. Boguspayev, ¹O.V. Fursov

(¹M.A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Almaty,
²al-Farabi Kazakh National university, Almaty)

FEATURES OF α -AMYLASE SECRETION OF THE WHEAT ALEURONE LAYER

The activity and electrophoretic spectra of intracellular (synthetic) and extracellular (secreted) α -amylase of wheat aleurone layer with the two types of substrate - soluble starch and β -limit dextrin were studied. The essential differences in the thermal stability of the enzyme isoforms produced isolated and intact aleurone were established. On the basis of the experimental data with the use of inhibitors of glycosylation monensin and tunicamycin the importance step of postsynthetic modification isoenzymes of wheat α -amylase for thermal stability of mature forms of the enzyme is concluded.

Keywords: aleurone, α -amylase isozymes, secretion, synthesis.