

REPORTS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ISSN 2224-5227

Volume 6, Number 310 (2016), 85 – 93

UDC 581.19:633.1

**A.A. Khakimzhanov, N.S. Mamytova, Zh.D., Beskempirova, B. Tilegen,
A. Dalelhankhyzy, V.A. Kuzovlev, N.A. Aitkhozhina**

M.A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry of CS MES RK, Almaty
e-mail: a.khakimzhanov@mail.ru

WHEAT CHITINASE COMPLEX AND SOME OF ITS PROPERTIES

Abstract. Chitinolytic enzymes are essential components of plants defense system against various pathogens. In higher plants the presence of substrate for this enzyme has not been found. The question of its physiological role for the plant organism in normal state remains open. Chitinase hydrolyzes N-acetyl- β -glucosamine-containing polymeric substrates (chitin, chitooligosaccharides) that included in the cell walls of fungi, nematodes and insects.

High polymorphism chitinase in cereals, including wheat, is poorly studied isoenzymes, their properties and regulation of activity are major obstacles in the understanding of the function of enzyme system.

The aim of this work is to study the cellular localization and some physical and chemical characteristics of wheat chitinase isoforms.

It is found that in the wheat seedling enzyme localizes intra- and extracellularly. Intracellular (vacuolar) chitinase is presented only by basic and extracellular (apoplast) – by acidic isoenzymes. Based on the chromatography on specific affinity sorbent the isoforms with chitin-binding domain, i.e. chitinase class I were determined. These components have pI values 9.0, 8.7, 8.2, 8.0, 7.6, 5.6, 4.3 and located in basic and acidic pH ranges. The main pool of chitinase with CB-domain is localized inside the cells. Less amount of enzyme (one component) is shown outside of cells (apoplast).

In the IEF spectrum of chitinase there were identified the exochitinase that had values IEP entirely in the acidic range of the pH ~4.0-5.0. The differences in the thermal stability of wheat chitinases were established. Basic isoforms showed a high stability to temperature increase.

The results can be used in enzymology of plants and pathogenic fungi interactions.

Keywords: wheat, chitinase, isoenzymes, apoplast, chitin-binding domain, endochitinase, exochitinase.

УДК 581.19:633.1

**А.А. Хакимжанов, Н.С. Мамытова, Ж.Д. Бескемпинова,
Б. Тилеген, А. Далелханкызы, В.А. Кузовлев, Н.А. Айтхожина**

РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина», г. Алматы

ХИТИНАЗНЫЙ КОМПЛЕКС ПШЕНИЦЫ И НЕКОТОРЫЕ ЕГО СВОЙСТВА

Аннотация. Хитинолитические ферменты являются важнейшими компонентами защитной системы растений против различных патогенов. В высших растениях не установлено наличие субстрата для этого фермента, что оставляет открытым вопрос о его физиологической роли для растительного организма в норме. Хитиназы гидролизуют N-ацетил- β -глюкозамин содержащие полимерные субстраты (хитин, хитоолигосахариды), входящие в состав клеточных стенок грибов, нематод и насекомых.

Высокая полиморфность хитиназ у злаковых, в т.ч. пшеницы, слабая изученность изоферментов, их свойств и регуляции активности является одним из основных препятствий в понимании функционирования этой ферментной системы.

Целью работы явилось исследование клеточной локализации и некоторых физико-химических особенностей изоформ хитиназы пшеницы.

Установлено, что в проростке пшеницы фермент сосредоточен как внутри, так и вне клеток. Внутриклеточная (вакуолярная) хитиназа представлена только щелочными, а внеклеточная (апопласт) – кислыми изоферментами. С помощью хроматографии на специфичном аффинном сорбенте определены изоформы с хитин-связывающим доменом, т. е. хитиназы класса I. Эти компоненты имели значения ИЭТ 9.0, 8.7, 8.2, 8.0, 7.6, 5.6, 4.3 и располагались как в щелочной, так и кислой области рН. Выявлено, что основной пул хитиназ с ХС-доменом сосредоточен внутри клеток, в то время как снаружи клеток (апопласт) количество этого фермента (1 компонент) оказалось гораздо меньше.

В ИЭФ спектре хитиназ идентифицированы экзохитиназы, которые имели значения ИЭТ исключительно в кислом диапазоне рН~4.0-5.0. Установлены различия в термоустойчивости хитиназ пшеницы. Наибольшую стабильность к повышенной температуре проявляли щелочные, а наименьшую – кислые изоформы.

Результаты могут быть использованы в энзимологии взаимодействия растений и фитопатогенных грибов.

Ключевые слова: пшеница, хитиназа, изоферменты, апопласт, хитин-связывающий домен, эндохитиназа, экзохитиназа.

Введение. В связи с важной ролью в защите растений от патогенных бактерий и грибов изучению хитинолитических ферментов в последнее время уделяется большое внимание, о чем свидетельствует ряд обзоров [1,2,3,4]. Хитиназы (ЕС 3.2.1.14) входят в обширную группу т.н. PR (связанных с патогенезом) белков и формируют 4 семейства из 17 [5]. У растений хитиназа, как и большинство гидролаз полимеров представлен множественными молекулярными формами (изоферментами) и кодируется мультисемейством генов. Электрофоретически хитиназа весьма гетерогенна, и в настоящее время нет четкой классификации ее генов.

Дополнительные сложности при изучении накладываются существованием конститутивных и индуцибельных форм фермента, а также тканевой специфичности их экспрессии. Значительная полиморфность энзима обусловлена в первую очередь сложной организацией естественных субстратов – хитина и его разнообразных производных олигосахаридов, предполагающей различия в структуре изоферментов, их субстратной специфичности и кинетических характеристиках [6,7].

По типу действия на субстрат в составе хитиназ различают эндохитиназы и экзохитиназы. Первые расщепляют хитин случайным образом внутри полимера, продуцируя растворимые мультимеры N-ацетилглюкозамина с низким молекулярным весом, такие как хитотриоза, хитотетраоза и димер диацетилхитобиоза. Вторые способны отщеплять только концевой углеводный остаток полимера [8,9].

На основе первичной структуры растительные хитиназы разделены на 7 классов (I–VII). Показано, что нет определенной корреляции в распространении хитиназ по видам растений, их органам и тканям. Однако установлено, что только некоторые хитиназы обладают антифунгальными свойствами [10,11]. Хитиназы 7 классов входят в 4 семейства PR белков: Chi-a, Chi-b, Chi-c и Chi-d. Эта классификация основана на присутствии или отсутствии N-терминального сигнального домена и сходства последовательности архетипического каталитического домена [3].

Хитиназы класса I встречаются только у растений и индуцируются в ответ на патоген. Они имеют полноценные N- и C-терминальные домены, при биосинтезе большинство направлено в вакуоль [12,13,14]. Эти хитиназы, как правило, обладают высокой противогрибковой активностью. В своей структуре они содержат хитин-связывающий домен (ХСД), за счет которого предположительно и обеспечивается антифунгальность. Рядом находится т.н. спейсерный (шарнирный) регион и каталитический домен. Хитиназы этого класса подразделяют на 2 субкласса – I а (кислые формы) и II б (щелочные формы).

Представители класса II хитиназ встречаются не только у растений, но и у бактерий и грибов. По своей структуре они подобны хитиназам класса I, но у них отсутствует ХСД и спейсерный регион [15]. Ферменты этого класса проявляют кислые свойства. Хитиназы класса III обладают

уникальной структурой и отличаются от всех других хитиназ. Они проявляют в основном лизоцимную (экзохитиназную) активность и похожи на бактериальную хитиназу. В их структуре отсутствует ХСД. Эти ферменты имеют широкий диапазон ИЭТ, рН-оптимумов, термостабильны при 60-70°C. Некоторые представители выдерживают температуру 80°C. Классы IV, V, VI, VII хитиназ практически не встречаются у зерновых культур [5].

К настоящему времени хитиназный комплекс наиболее изучен в табаке, а среди злаковых растений - у ячменя и ржи. В составе хитиназы пшеницы насчитывается порядка 10 изоформ, имеющих широкий диапазон ИЭТ - в кислой, щелочной и нейтральной области рН от 3,1 до 9,7 [16]. Это предполагает различие в рН-оптимумах действия изоферментов, что весьма значимо для проявления их активности и функционирования в условиях грибной патогенной атаки. Несмотря на определенные успехи, хитиназный комплекс пшеницы до сих пор остается слабоизученным. В этой работе приведены новые данные по свойствам хитиназы из пшеницы, имеющие важное значение для лучшего понимания функционирования фермента у этой зерновой культуры.

Материалы и методы

Объектами исследования служили зерновки, корни и стебли 7-ти дневных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Шортандинская.

Активность хитиназы определяли с помощью субстрата коллоидного хитина (Sigma-Aldrich, США) по методу [17]. Количественное содержание фермента измеряли по образованию продукта гидролиза N-ацетилглюкозамина (N-АГА) и его окрашиванию 3,5-динитросалициловой кислотой. Удельную активность рассчитывали в единицах активности на 1 мг белка.

Нативное изоэлектрофокусирование (ИЭФ) хитиназы проводили в пластинах 5% ПААГ толщиной 1 мм с помощью прибора Multiphor II (LKB, Швеция). В качестве амфолитов использовали Servalyt 3-10 (Serva, Германия). Время фокусирования 5 часов при конечном напряжении 500V. Окрашивание пластины ПААГ на хитиназную активность проводили по методу [18]. Субстратом являлась полиакриламидная «реплика» с заполимеризованным 0,02% гликоль хитином (Sigma-Aldrich, США).

Внутриклеточную (вакуолярную) и внеклеточную (апопластную) хитиназу выделяли одним из общепринятых способов [19]. Для инфильтрации межклетника в 300 мл колбу Бунзена помещали 100-150 мл дистиллированной воды с 8-10 г стеблей. Содержимое колбы подвергали давлению 10 мбар в течение 30-40 мин. После этого стебли помещали в 50 мл пробирки и центрифугировали 15 мин при 4°C со скоростью не выше 3000g. Жидкость, скапливаемая на дне пробирки, содержала апопластный фермент, а экстракт из «выжатых» стеблей – вакуолярный фермент.

Для выявления экзохитиназ в составе хитиназы проводили ИЭФ экстракта стебля с последующим обнаружением зон активности в геле с помощью специфического хромогенового субстрата 4-метиллумбеллиферил-N-ацетил-глюкозаминида (Sigma-Aldrich, США) по методу [20].

Хитиназы класса I с хитин-связывающим центром очищали аффинной хроматографией на нерастворимом хитине (New England Biolabs, США) по методу [21]. Для этого белок экстракта из растительного материала после осаждения сульфатом аммония от 30 до 70% диализовали против 0,05 М фосфатного буфера рН 7,4 и наносили на колонку размером 1,2 x 4 см с сорбентом. Не связавшиеся белки промывали сначала стартовым буфером, затем 0,05 М ацетатным буфером рН 5,1. Связавшийся белок элюировали 20 мМ уксусной кислотой (рН 3,0), которую быстро нейтрализовали 0,5 М фосфатным буфером до нейтрального рН.

Результаты исследований

Изоформы хитиназы отличаются по своей тканевой и клеточной локализации. Существуют внутри- и внеклеточные формы фермента. Согласно некоторым источникам в количественном отношении внутриклеточная (вакуолярная) хитиназа превосходит внеклеточный (апопластный) фермент приблизительно в 10 раз. Более того, у некоторых растений, например, в листьях табака, в норме хитиназа практически не обнаруживается. Накопление фермента в межклеточной жидкости наблюдалось при внешних воздействиях, в частности, при грибном патогенезе. Эти особенности

по клеточной локализации и количественному распределению предполагают различия в защитных функциях хитиназы.

В нашей работе определены уровни абсолютной и удельной (в пересчете на общий белок) внеклеточной (апопласт) и внутриклеточной (вакуоль) хитиназной активности 7-дневного ростка пшеницы. В количественном отношении вакуолярный фермент на порядок превышал апопластный, однако удельная активность последнего (на единицу белка) была выше почти в 2 раза (рисунок 1а,б). По данным ИЭФ апопласт содержал только кислые изоферменты с ИЭТ от 3.6 до 4.6. Внутриклеточная хитиназа была представлена нейтральными и щелочными компонентами с ИЭТ от 6.6 до 9.3 (рисунок 1в).

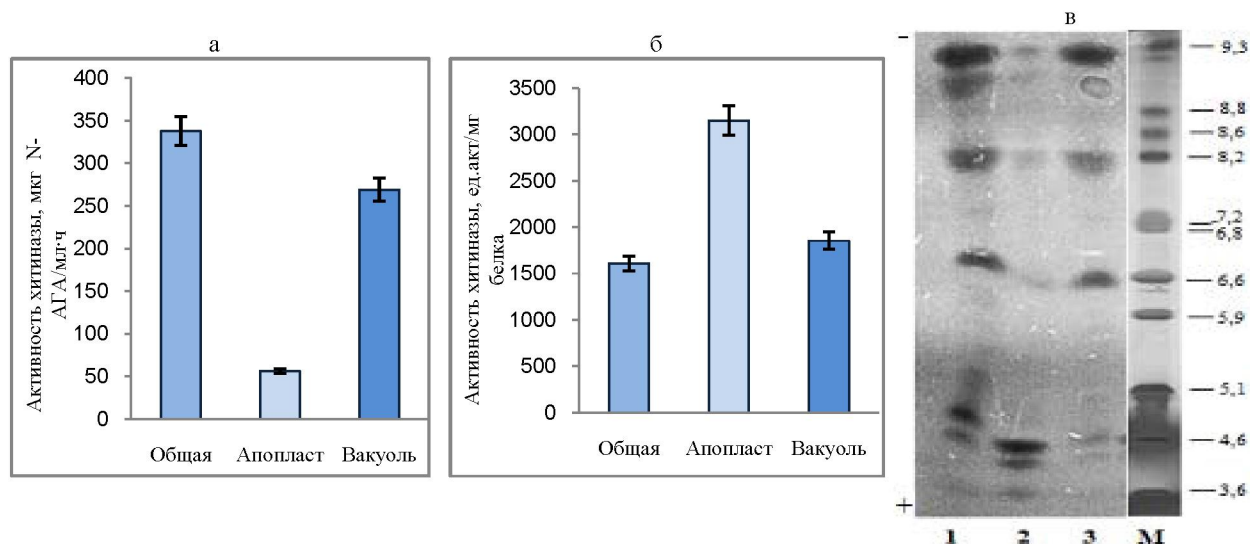


Рисунок 1 - Активность (а,б) и ИЭФ спектр (в) внутри- и внеклеточной хитиназы 7-дневного проростка пшеницы:
в: 1 – общий спектр, 2 – апопласт, 3 – вакуоль, м – маркеры ИЭТ

По своей структуре хитиназы подразделяются на формы, содержащие хитин-связывающий домен (главным образом, класс I хитиназы) и не содержащие этот домен (классы II и III). Наличие или отсутствие ХСД, как полагают некоторые авторы, является важной характеристикой и играет принципиальную роль в проявлении защитных свойств фермента.

Для идентификации хитиназ с ХС-центром из различных органов растения пшеницы использовали колонку с нерастворимым коммерческим хитином (chitin resin). ИЭФ спектр фракций связавшегося и не связавшегося фермента представлен на рисунке 2. Хитиназы с ХСД, проявляющие сродство к аффинному сорбенту, присутствовали как в кислой, так и щелочной области. Большинство из них имели ИЭТ в щелочной области (9.0, 8.7, 8.2, 8.0, 7.6). Следовательно, у изоформ с ИЭТ 9.1, 8.9, 4.0, 3.5 этот регион в структуре отсутствует, т.е. они не относятся к классу I хитиназ. Следует отметить, что спектр хитиназ с ХС центром в вегетативных органах (корень, стебель) и в зерновке в целом похож. Это изоферменты с ИЭТ 9.0, 8.7, 8.2. Однако в прорастающем зерне хитиназ с ХСД больше в щелочной области, в районе pH 8.0-9.0. Мажорными изоформами с ХСД и без этого домена являются – 9.0, 5.6, 4.3. и 9.1, 4.0, соответственно.

Данные по активности хитиназ с ХС центром и без него представлены на рисунке 3, из которого видно, что удельная активность хитиназ с ХСД намного выше в вегетативных органах, чем в зерне.

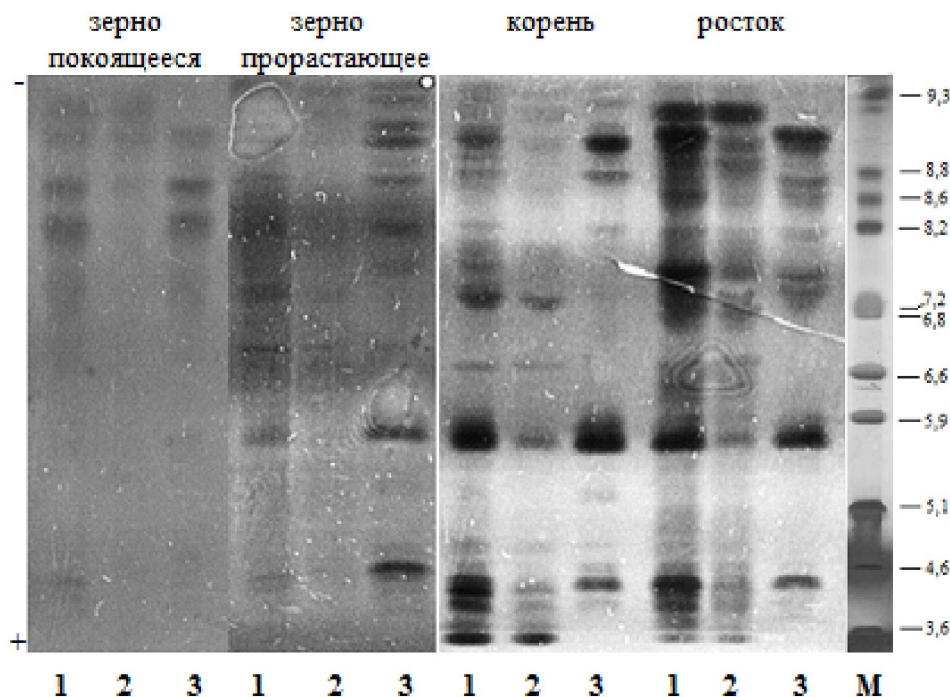


Рисунок 2 – ИЭФ спектр хитиназ проростка, содержащих и не содержащих ХСД:
1 – спектр общей хитиназы, 2 – хитиназа без ХСД, 3 – хитиназа с ХСД, м – маркеры ИЭТ

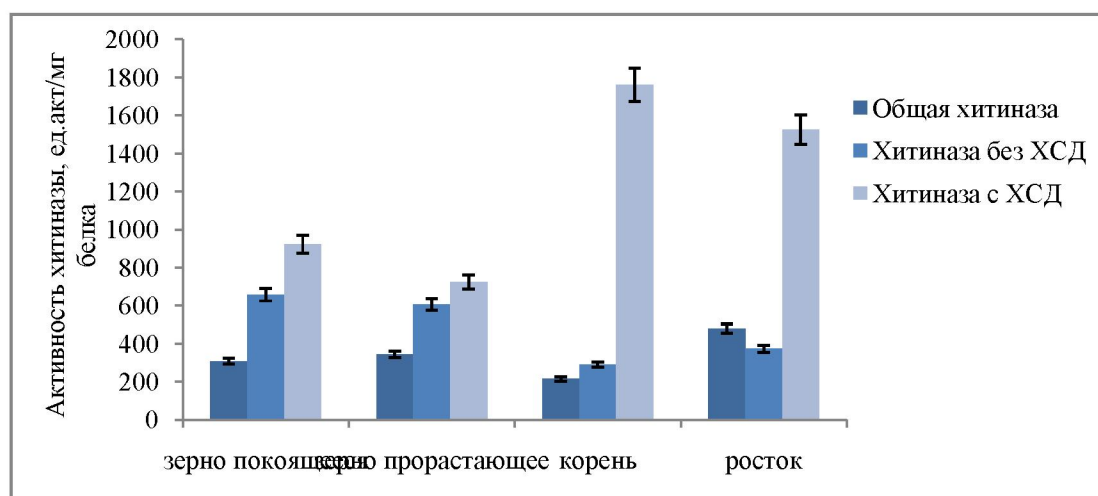


Рисунок 3 – Удельная активность хитиназ проростка, содержащих и не содержащих ХСД

По способу действия на субстрат хитиназы подразделяются на 2 типа: экзохитиназы и эндохитиназы. Кроме того, хитиназы могут проявлять N-ацетил-β-глюкозаминидазную (лизоцимную) активность. Последние также относят к хитиназам экзо-действия. Согласно литературным данным по табаку и ржи эндо/экзо- тип действия во многом предопределяет участие или степень участия фермента в защите от патогенов.

Для выявления экзохитиназы гель после ИЭФ экстракта 7-дневного ростка пропитывали специфическим хромогеновым субстратом 4-метиллумбеллиферил-N-ацетил-глюкозаминидом. Спектр общей хитиназы выявляли гель-репликой с гликолем хитином (рисунок 4). Из приведенных данных следует, что экзохитиназа представлена исключительно кислыми компонентами в области pH около 3.5-4.0.

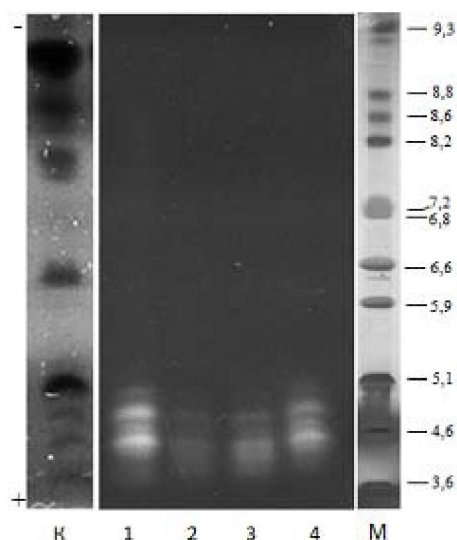


Рисунок 4 – ИЭФ спектр общей хитиназы и экзохитиназы проростка пшеницы:
к – общая хитиназа (субстрат гликоль хитин), 1-4 – экзохитиназа (субстрат МУБ-N- ацетил-глюкозаминид), 1 – зерно; 2 – корень; 3 – росток 4 дня, 4 – росток 7 дней, м – маркеры ИЭТ

Следующим этапом работы было исследование термостабильности хитиназы и ее отдельных изоформ. Для этого проводили 10 мин прогрев тотального фермента при 50, 60 и 70°C с 1мМ Ca^{2+} . После прогрева образцы быстро охлаждали и центрифугировали для удаления денатурированных белков. Контролем являлся непрогретый фермент. Измерение активности и ИЭФ показали наличие в составе хитиназы относительно термостабильных и термолабильных изоферментов (рисунок 5). После прогрева при 50°C наблюдалось некоторое повышение активности всех без исключения компонентов, однако прогрев при 60°C выдерживали только щелочные изоформы. При 70°C происходила полная инактивация хитиназы. Присутствие катионов Ca^{2+} несущественно поддерживало термостабильность фермента.

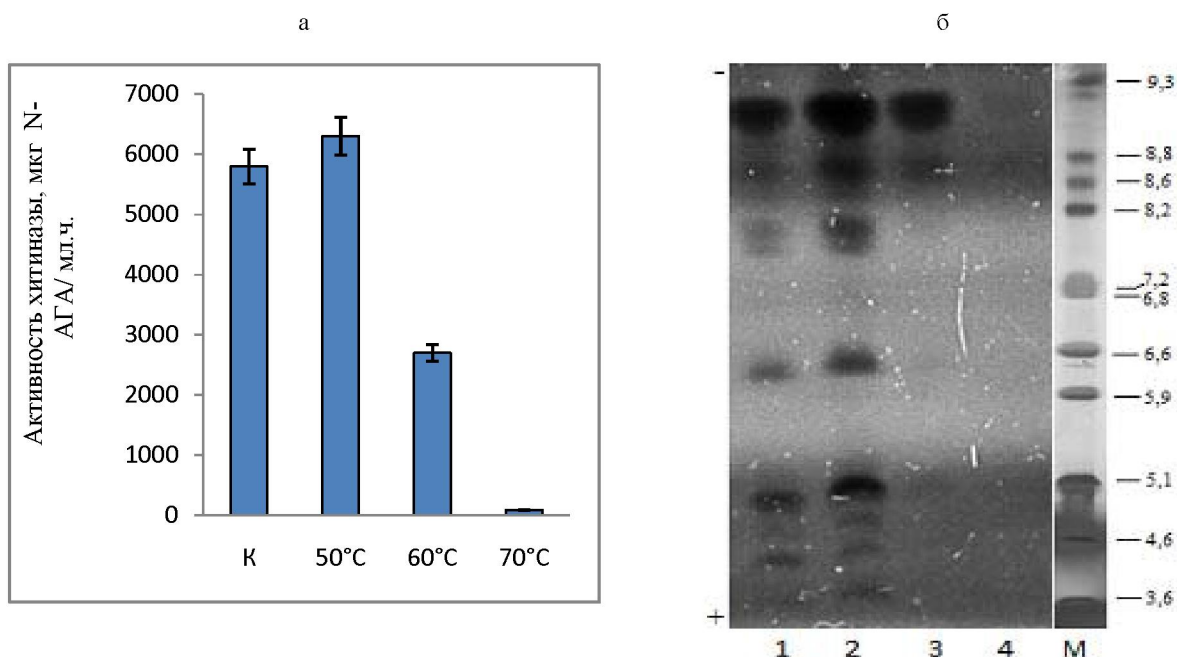


Рисунок 5 – Влияние повышенной температуры на активность (а) и ИЭФ спектр хитиназы проростка: а: к – контроль (активность до прогрева); б: 1 - контроль; 2-4 - после 10 мин прогрева при 50, 60 и 70°C; м – маркеры ИЭТ

Обсуждение результатов. Представленные результаты свидетельствуют о сложной организации и высокой степени гетерогенности хитиназного комплекса у пшеницы, насчитывающего свыше 10 изоформ. Высокая полиморфность фермента характерна как для зерна, так и вегетативных органов. Выявлена строгая компартментация хитиназы: внутри клеток фермент представлен щелочными, а вне клеток (апопласт) – кислыми изоферментами, что характерно для тканевой и клеточной локализации агрессивных гидролитических ферментов.

В ИЭФ спектре хитиназ пшеницы идентифицированы ферменты с ХС доменом, т.е. хитиназы класса I. К ним относятся компоненты с ИЭТ 9.0, 8.7, 8.2, 8.0, 7.6, 5.6, 4.3. Следует отметить, что один из этих компонентов с ИЭТ 4.3 локализован в апопласте, а остальные с ИЭТ 9.0, 8.7, 8.0 – в клеточной вакуоли. Таким образом, основной пул антифунгальных хитиназ сосредоточен внутри клеток. Однако наличие этого фермента в межклетнике свидетельствует о важной барьерной и защитной функции последнего в условиях патогенной атаки.

В составе хитиназ пшеницы установлены эндо- и экзохитиназы. Последние представлены 2-3-мя исключительно кислыми белками с ИЭТ в диапазоне от 4.0 до 5.0. Остальные хитиназы (порядка 10 изоферментов) являются истинными эндохитиназами, поскольку способны гидролизовать полимерный хитин и обладают сродством к этому субстрату.

Термоустойчивость ферментных белков является важной их характеристикой. Представленные в работе данные свидетельствуют о разной чувствительности к температуре пшеничных хитиназ. Наибольшую термостабильность проявляли самые щелочные изоформы с ИЭТ ~9.0, которые выдерживали кратковременный 10 мин прогрев при 60°C. При прогреве 70° C происходила практически полная инактивация фермента.

Таким образом, можно заключить, что хитиназный комплекс пшеницы достаточно сложен и состоит из множества изоферментов (по данным ИЭФ свыше 10 компонентов), среди которых четко идентифицированы формы, различающиеся по своей структуре и типу действия на субстрат, органной специфичности, клеточной локализации и термостабильности. Представленные в статье данные являются новыми в изучении хитиназного комплекса пшеницы и могут быть полезными в поиске и идентификации белковых (ферментных) маркеров устойчивости к патогенам.

Источник финансирования исследований. НТП О.0657 МОН РК.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Huynh Q.K., Hironaka C.M., Levine E.B., Smith Ch.E., Borgmeyer J. R., Shah D.M. Antifungal proteins from plants // J. Biol. Chem. 1992. V.267 (10). P.6635-6640.
- [2] Kasprzewska A. Plant chitinases – regulation and function // Cell. Mol. Biol. Lett. -2003. V.8(3). P.809-824.
- [3] Sharma N., Sharma K.P., Gaur R.K., Gupta V.K. Role of chitinase in plant defense // Asian J. Biochem. 2011. V.6 (1). P.29-37.
- [4] Grover A. Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles // Crit. Rev. Plant Sci. 2012. V.31. P.57-73.
- [5] Sharma V. Pathogenesis related defence functions of plant chitinases and β -1,3-glucanases // Vegetos. 2013. V.26. P.205-218.
- [6] Brunner F., Stintzi A., Fritting B., Legrand M. Substrate specificities of tobacco chitinases // Plant J. 1998. V.14(2). P.225-234.
- [7] Журавлева Н.В., Лукьянов П.А. Хитинолитические ферменты: источники, характеристика и применение в биотехнологии // Вестник ДВО РАН. 2004. №3. С.76-86.
- [8] Xu F., Fan Ch., He Y. Chitinases in *Oryza sativa* ssp. *japonica* and *Arabidopsis thaliana* // J. Gen. Genom. 2007. V.34 (2). P.138-150.
- [9] Taira T. Structures and antifungal activity of plant chitinases // J. Appl. Glycosci. 2010. V.57. P.167-176.
- [10] Beintema J.J. Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins // FEBS Lett. 1994. V.350. P.159-163.
- [11] Taira T., Ohnuma T., Yamagami T., Aso Y., Ishiguro M., Ishihara M. Antifungal activity of rye (secale cereale) seed chitinases: the different binding manner of class I and class II chitinases to the fungal cell walls // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2002. V.66 (5). P.970-977.
- [12] Mauch F., Staehelin L.A. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves // Plant Cell. 1989. V.1. P.447-457.
- [13] Bulcke V.D., Bauw G., Rycke R.D., Castresana C., Montagu M.V., Vandekerckhove J. The role of vacuolar and secreted pathogenesis-related β (1-3)-glucanases and chitinases in the defence response of plants // Bull. Soc. Bot. Fr. 1990. V.137. P.51-63.

- [14] Gijzen M., Kuflu K., Qutob D., Chernys J.T. A class I chitinase from soybean seed coat // J. Exp. Bot. 2001. V.52. P. 2283-2289.
- [15] Araki T., Torikata T. Structural classification of plant chitinases: two subclasses in class I and class II chitinases // Biosci. Biotech. Biochem. 1995. V.59 (2). P.336-338.
- [16] Ride J.P., Barber M.S. Purification and characterization of multiple forms of endochitinase from wheat leaves // Plant Sci. 1990. V.71(2). P.185-197.
- [17] Fink W., Liefland M., Mendgen K. Chitinases and β -1,3-glucanases in the apoplastic
- [18] compartment of oat leaves (*Avena sativa* L.) // Plant Physiol. 1988. V.88. P.270-275.
- [19] Trudel J., Asselin A. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis // Anal. Biochem. 1989. V.178. P.362-366.
- [20] Rohringer R., Ebrahim-Nesbat F., Wolf G. Proteins in intercellular washing fluids from leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.) // J. Exp. Bot. 1983. V.34. P.1589-1605.
- [21] Dušková J., Tishchenko G., Ponomareva E., Šimůnek J., Koppová I., Skálová T., Štěpánková A., Hašek J., Dohnálek J. Chitinolytic enzymes from bacterium inhabiting human gastrointestinal tract - critical parameters of protein isolation from anaerobic culture // Acta Biochim. Polonica. 2011. V.58 (2). P.261-263.
- [22] Smrensen H.P., Madsen L.S., Petersen J., Andersen J.T., Hansen A.M., Beck H.C. Oat (*Avena sativa*) seed extract as an antifungal food preservative through the catalytic activity of a highly abundant class I chitinase // Appl. Biochem. Biotechnol. 2010. V.160. P.1573-1584.

REFERENCES

- [1] Huynh Q.K., Hironaka C.M., Levine E.B., Smith Ch.E., Borgmeyer J. R., Shah D.M. J. Biol. Chem. 1992. V.267 (10). P.6635-6640.
- [2] Kasprzewska A. Cell. Mol. Biol. Lett. -2003. V.8(3). P.809-824.
- [3] Sharma N., Sharma K.P., Gaur R.K., Gupta V.K. Asian J. Biochem. 2011. V.6 (1). P.29-37.
- [4] Grover A. Crit. Rev. Plant Sci. 2012. V.31. P.57-73.
- [5] Sharma V. Vegetos. 2013. V.26. P.205-218.
- [6] Brunner F., Stintzi A., Friting B., Legrand M. Plant J. 1998. V.14(2). P.225-234.
- [7] Журавлева Н.В., Лукьянов П.А. Вестник ДВО РАН. 2004. №3. С.76-86.
- [8] Xu F., Fan Ch., He Y. J. Gen. Genom. 2007. V.34(2). P.138-150.
- [9] Taira T. J. Appl. Glycosci. 2010. V.57. P.167-176.
- [10] Beintema J.J. FEBS Lett. 1994. V.350. P.159-163.
- [11] Taira T., Ohnuma T., Yamagami T., Aso Y., Ishiguro M., Ishihara M. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2002. V.66 (5). P.970-977.
- [12] Mauch F., Staehelin L.A. Plant Cell. 1989. V.1. P.447-457.
- [13] Bulcke V.D., Bauw G., Rycke R.D., Castresana C., Montagu M.V., Vandekerckhove J. Bull. Soc. Bot. Fr. 1990. V.137. P.51-63.
- [14] Gijzen M., Kuflu K., Qutob D., Chernys J.T. J. Exp. Bot. 2001. V.52. P. 2283-2289.
- [15] Araki T., Torikata T. Biosci. Biotech. Biochem. 1995. V.59 (2). P.336-338.
- [16] Ride J.P., Barber M.S. Plant Sci. 1990. V.71(2). P.185-197.
- [17] Fink W., Liefland M., Mendgen K. Plant Physiol. 1988. V.88. P.270-275.
- [18] Trudel J., Asselin A. Anal. Biochem. 1989. V.178. P.362-366.
- [19] Rohringer R., Ebrahim-Nesbat F., Wolf G. J. Exp. Bot. 1983. V.34. P.1589-1605.
- [20] Dušková J., Tishchenko G., Ponomareva E., Šimůnek J., Koppová I., Skálová T., Štěpánková A., Hašek J., Dohnálek J. Acta Biochim. Polonica. 2011. V.58 (2). P.261-263.
- [21] Smrensen H.P., Madsen L.S., Petersen J., Andersen J.T., Hansen A.M., Beck H.C. Appl. Biochem. Biotechnol. 2010. V.160. P.1573-1584.

**А.А. Хакімжанов, Н.С. Мамытова, Ж.Д. Бескемпірова, Б. Тілеген,
А. Дәлелханқызы, В.А. Кузовлев, Н.Ә. Айтхожина**

ҚР БҒМ ҒК М.Ә. Айтхожин атындағы Молекулярлық биология және биохимия институты, Алматы қаласы

БИДАЙДЫҢ ХИТИНАЗАЛЫҚ КЕШЕНІ ЖӘНЕ ОНЫҢ КЕЙБІР ҚАСИЕТТЕРІ

Аннотация. Хитинолитикалық ферменттер өсімдіктердің қорғау жүйесіндегі әр түрлі патогендерден қорғайтын маңызды құрамдас бөлігі болып табылады. Жоғары сатыдағы өсімдіктерде бұл фермент үшін

субстраттың бар екендігі анықталмаған, сол себепті қалыпты жағдайдағы өсімдік ағзасындағы оның физиологиялық рөлі жауабын таппаған сұрақ болып қалады. Хитиназа микроорганизмдер, саңырауқұлақтар, нематодтар мен жәндіктердің жасуша қабырғасында болатын N-ацетил- β -глюкозаминді гидролиздейтін полимерлі субстрат (хитин, хитоолигосахаридтер).

Астық тұқымдастардағы хитиназаның жоғары полиморфтілігі, соның ішінде бидайдағы изоферменттердің, олардың қасиеттері мен белсенділігін реттеудің толық зерттелмеуі бұл ферменттік жүйенің қызметін түсіну үшін негізгі кедергілердің бірі болып табылады.

Жұмыстың мақсаты бидай хитиназасы изоформаларының жасушалық оқшаулауын (локализациясын) және кейбір физико-химиялық ерекшеліктерін зерттеу болып табылады.

Бидай өскінінің сабағында фермент жасуша ішінде және жасуша аралық шоғырланатындығы анықталды. Жасушаішілік (вакулярлі) хитиназа сілтілік, ал жасушааралық (апопласт) – қышқылдық изоферменттер екендігі көрсетілді. Спецификалық аффинді сорбент хроматографиясы көмегімен хитин-байланыстырушы домен арқылы хитиназаның 1-ші класс изоформасы екені анықталды. Бұл құрамдастар ИЭН 9.0, 8.7, 8.2, 8.0, 7.6, 5.6, 4.3 көрсетті және сілтілік те, қышқылдық та аудандарында орналасты. Хитиназаның негізгі хитин-байланыстырушы домен бөлігі жасушаның ішінде шоғырланған, ал бұл ферменттің (1 компонент) жасуша аралық (апопласт) мөлшері әлдеқайда аз болды.

ИЭФ спектрінде хитиназаның экзохитиназасы анықталып, оның ИЭН тек қышқыл диапазонында рН~4.0-5.0 көрсетті. Бидай хитиназасының термотұрақтылық айырмашылықтары анықталды. Жоғары температураға қышқылдық изоформаларға қарағанда сілтілік изоформалар тұрақты келетіндігі көрсетілді.

Нәтижелер өсімдіктердің өзара әсері мен фитопатогенді саңырауқұлақтар энзимологиясында қолданысқа ие болады.

Түйін сөздер: бидай, хитиназа, изоферменттер, апопласт, хитин-байланыстырушы домен, эндохитиназа, экзохитиназа.

Сведения об авторах:

Хакимжанов Айдар Атымтаевич – к.б.н., зав. лабораторией, тел. 293-71-90, эл.почта: a.khakimzhanov@mail.ru
Мамытова Нургуль Сабазбековна – PhD, снс;

Бескемпирова Жалпас – лаборант;

Тилеген Булбул – мнс;

Далелханкызы Арай – лаборант ;

Кузовлев Владимир Анатольевич – к.б.н., внс;

Айтхожина Нагима Абеновна – д.б.н., профессор, академик НАН РК