

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 1, Number 319 (2017), 118 – 126

**O. A. Sapko, O. V. Chebonenko, A. K. Tursunova, A. O. Abaildayev,
Zh. D. Beskempirova, B. Tilegen, Y. M. Dyo, A. Sh. Utarbayeva**

M. A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, CS MES RK, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: olessjachebonenko@mail.ru

AN ISOENZYME COMPOSITION AND SOME PROPERTIES OF POTATO CHITINASE

Abstract. Chitinase (EC 3.2.1.14) belong to the family of PR-proteins and they are important component of the protective mechanism in plant pathogenic attack and other stress. Despite intensive research and achievements, the role of chitinase in normal plant metabolism still remains unknown. The aim of this paper is to study the isoenzyme composition, localization and some physical and chemical properties of chitinase potato *Solanum tuberosum*, a significant level of constitutive activity of chitinase and polymorphism. It shows specificity of the localization of various isoforms of the enzyme. It has been established that extracellular acidic chitinase presented (pI 3,6–4,4) and alkaline (pI 8,2–7,5) isoforms. Using specific affinity sorbent installed isoenzymes containing chitin-binding domain (pI 8,7; 8,0; 6,5 and 5,8), predominantly localized intracellularly. Exochitinase identified potatoes having acidic pI (3,6–4,9), localized in the extracellular space and inside the cells. There has been determined thermal stability of chitinase isoforms. The most thermolabile attributed acidic apoplast exochitinases (pI 3,6–4,4). The maximal thermostability alkaline isoforms (pI 7,7–8,2) was characterized. The obtained data can be used as identification markers enzymatic stability *S. tuberosum* to pathogens and other stress conditions.

Keywords: *Solanum tuberosum*, chitinase, isoenzymes, localization, exochitinase, chitin-binding domain.

УДК 581.143.6; 547.9; 581.19

**О. А. Сапко, О. В. Чебоненко, А. К. Турсунова, А. О. Абайлдаев,
Ж. Д. Бескемпирова, Б. Тилеген, Ю. М. Де, А. Ш. Утарбаева**

РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина» КН МОН РК,
Алматы, Казахстан

ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СОСТАВ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ХИТИНАЗЫ КАРТОФЕЛЯ

Аннотация. Хитиназы (EC 3.2.1.14) принадлежат к семейству PR-белков и являются важным компонентом защитного механизма растений при патогенной атаке и других стрессах. Несмотря на интенсивные исследования и достигнутые успехи, по-прежнему остается невыясненной роль хитиназы в нормальном метаболизме растений. Целью исследования было изучение изоферментного состава, локализации и некоторых физико-химических свойств хитиназы картофеля *Solanum tuberosum*. Установлен значительный уровень конститутивной активности и полиморфизма хитиназы. Показана специфичность локализации различных изоформ фермента. Установлено, что внеклеточные хитиназы представлены кислыми (pI 3,6–4,4) и щелочными (pI 8,2–7,5) изоформами. С использованием специфического аффинного сорбента установлены изоферменты, содержащие хитин-связывающий домен (pI 8,7; 8,0; 6,5 и 5,8), локализованные преимущественно внутри клетки. Идентифицированы экзохитиназы картофеля, имеющие кислые ИЭТ (3,6–4,9), локализованные как в межклеточном пространстве, так и внутри клеток. Определена термостабильность изоформ хитиназы. К наиболее термолабильным отнесены кислые апопластные экзохитиназы (pI 3,6–4,4). Максимальной термостабильностью характеризовались щелочные изоформы (pI 7,7–8,2). Полученные данные могут быть

использованы в идентификации ферментативных маркеров устойчивости *S.tuberosum* к патогенам и другим стрессовым условиям.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, хитиназа, изоферменты, локализация, экзохитиназы, хитин-связывающий домен.

Растения реагируют на стрессовые воздействия окружающей среды активацией множества генов, кодирующих различные белки. Среди них накопление связанных с патогенезом (PR) белков в ответ на атаку патогена и/или другой стресс играет важную роль. Особым звеном защитного механизма являются хитиназы, группа семейства PR-белков, изучению которых уделяется большое внимание [1-3]. Хитиназы (ЕС 3.2.1.14) катализируют гидролитическое расщепление β -1,4-гликозидной связи хитина, который является основным структурным компонентом клеточных стенок многих грибов и экзоскелета членистоногих. Хитиназы широко распространены в природе, включая бактерии, грибы, животных и растения. Растительные хитиназы характеризуются множественностью изоформ, которые различаются по локализации, молекулярной структуре и субстратной специфичности [4-6]. Ферменты могут быть представлены конститутивно на низких уровнях, но их активность резко повышается в ответ на многие абиотические и биотические стрессы [5-7].

Хитиназы подразделяются на две категории, экзо- и эндохитиназы. Эндохитиназы расщепляют хитин случайным образом внутри полимера с образованием растворимых, низкомолекулярных олигомеров N-ацетилглюкозамина, таких как хитотриоза, хитотетроза и диацетилхитобиоза. Экзохитиназы разделяются на две группы: хитобиозидаз, катализирующих высвобождение диацетилхитобиоз от невозстанавливающегося конца микрофибриллы хитина и β -1,4-N-ацетилглюкозаминидаз, которые расщепляют олигомерные продукты эндохитиназ и хитобиозидаз с образованием мономера N-ацетилглюкозамина [8]. На основании их первичных структур хитиназы растений были разделены на семь классов, I-VII [2-4]. Различные классы хитиназ не имеют явной корреляции с присутствием в конкретных видах растений, органах или тканях. I-VII классы хитиназ, в настоящее время классифицированы в 4 группы, что соответствует 4-м семействам PR-белков, а именно Chia, Chib, Chic и Chid. Эта классификация основана на наличии или отсутствии N-концевого домена и сходства аминокислотных последовательностей в архетипических каталитических доменах [9].

Общая индукция хитиназ в растениях, подвергающихся различным стрессовым факторам, может свидетельствовать о том, что хитиназы являются частью неспецифического общего ответа на стресс. Тем не менее, это не исключает их значения в системе специфической защиты растений от патогенов, в частности дифференциально регулируемых изоформ фермента, имеющих разные роли. Роль растительных хитиназ в защите против патогенов была показана на многих примерах [4-6, 10]. Растительные хитиназы способны разлагать хитин и тормозить рост грибов [11, 12]. Некоторые хитиназы класса I локализованы в вакуоле, другие хитиназы, в том числе хитиназы III класса, находятся вне клетки [13]. Внеклеточные хитиназы могут непосредственно блокировать вторжение и рост грибов в межклеточное пространство и, возможно, высвобождать грибковые элиситоры, которые вызывают дальнейшие защитные реакции в организме хозяина [14, 15]. Наряду с многочисленными данными участия хитиназ в стрессовых ответах, установлено, что хитиназы вовлечены в процессы регуляции роста и развития растений [1, 3]. Растительные гликопротеины клеточной стенки, содержащие N-ацетилглюкозамин, считаются эндогенным субстратом для хитиназы растений [16]. Хитиназы играют роль в прорастании, воздействуя на хитоолигосахариды в клеточных стенках оболочек семян, и могут участвовать в генерации сигнальных молекул, которые регулируют процесс органогенеза [10].

Картофель – одна из важнейших продовольственных культур в мире, восприимчивая ко многим патогенным микроорганизмам и другим стрессовым факторам, ведущим к значительным потерям урожайности и качества продукции. Изучение механизмов его устойчивости является актуальным направлением исследований. Во всех растениях, проанализированных на сегодняшний день, хитиназы представлены множественными изоформами, для многих из которых молекулярная структура была установлена [7]. В листьях картофеля хитиназы также представлены множественными изоформами и их активность сильно увеличивалась после заражения *Phytophthora infestans* [17, 18]. Мажорные изоформы, которые обуславливают большую часть соответствующей

ферментативной активности в инфицированных листьях, являются основными хитиназами с М.м. от 32 кДа до 34 кДа (класс I), хотя незначительные количества кислых (класс II) изоферментов также были обнаружены. Основные хитиназы являются группой изоферментов, которые преимущественно локализованы внутриклеточно, но также были обнаружены в значительных количествах во внеклеточном пространстве зараженного или обработанного элиситором листа картофеля [17, 18].

Несмотря на интенсивные исследования растительных хитиназ и достигнутые успехи, по-прежнему остается невыясненной роль хитиназы в метаболизме растений в норме. Неоднозначной остается роль фермента в устойчивости растений [19, 20]. Разнообразие изоформ хитиназы, а также специфическая экспрессия, зависящая от стадии развития растения, органо- и клеточной локализации, может означать, что хитиназы имеют дополнительные, пока еще неизвестные биологические функции в процессе роста и развития растений.

Целью исследования было изучение изоферментного состава, локализации и некоторых физико-химических свойств хитиназы картофеля *S. tuberosum* в норме.

Объекты и методы исследований

Объектами исследования служили клубни и 4-х недельные проростки картофеля сорта Ушканыр. Активность хитиназы определяли с помощью субстрата коллоидного хитина (Sigma-Aldrich, США) по методу [21] с модификациями. Для этого к 0,1 мл растительного экстракта добавляли 0,2 мл коллоидного хитина и инкубировали при 37 °С в термостате 4 часа. Реакцию останавливали добавлением 1 мл ДНС. Пробирки кипятили 5 мин. Образцы центрифугировали 10 мин при 5000 об./мин для осветления образца и измеряли оптическую плотность при 545 нм. Активность фермента рассчитывали по калибровочной кривой с N-ацетилглюкозамином (20–500 мкг/мл).

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 500 V. Окрашивание пластины ПААГ на хитиназную активность проводили по методу [22]. Субстратом являлась полиакриламидная «реплика» с заподимеризованным 0,02% гликоль хитином (Sigma-Aldrich, США).

Внутриклеточную (вакуолярную) и внеклеточную (апопластную) хитиназу выделяли одним из общепринятых способов [23]. Для получения апопластной фракции в колбу Бунзена помещали 250–300 мл дистиллированной воды и 15–20 г листьев картофеля. Содержимое колбы выдерживали при вакуумном разряжении (20 мбар) 30 мин. После этого листья картофеля помещали в 50 мл пробирки и центрифугировали 20 мин при 4 °С со скоростью не выше 3000 г. Жидкость, скапливающаяся на дне пробирок, содержала апопластный фермент, а экстракт из «выжатых» листьев – вакуолярный фермент.

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

Хитиназы, содержащие хитин-связывающий центр, очищали аффинной хроматографией на нерастворимом хитине (New England's BioLabs, США) по методу [25]. Для этого белки из экстракта листьев осаждали сульфатом аммония (от 30 до 70%), диализовали против 0,05 М фосфатного буфера pH 7,4 и наносили на колонку размером 1,2x4 см со специфическим сорбентом. Несвязавшиеся белки промывали сначала стартовым буфером, затем 0,05 М ацетатным буфером pH 5,1. Связавшийся белок элюировали 20 мМ уксусной кислотой (pH 3,0), которую быстро нейтрализовали 0,5 М фосфатным буфером до нейтрального pH.

Результаты и их обсуждение

Изучали конститутивный состав хитиназ картофеля. Хитиназа картофеля характеризовалась высоким уровнем исходной активности и множественностью изоформ, имеющих различную тканевую и субклеточную локализацию. Хитиназный комплекс был представлен 12–14 изоформами фермента с ИЭТ от 3,5 до 9,4. Тканевая и клеточная локализация изоформ фермента и уровень удельной активности приведены на рисунке 1.

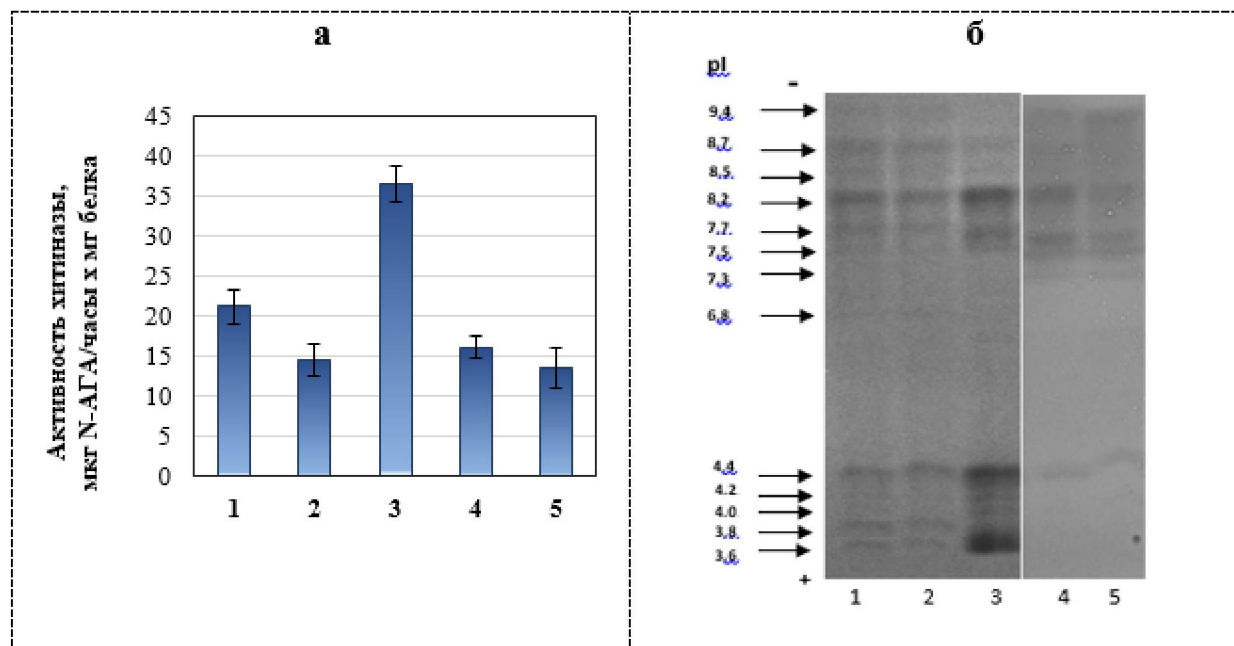


Рисунок 1 – Удельная активность (а) и локализация изоформ хитиназы (б) в картофеле (сорт Ушконьор).
1-3 – лист: 1 – общий спектр; 2 – внутриклеточные хитиназы; 3 – апопластные хитиназы; 4 – стебель; 5 – клубень

По данным ИЭФ в норме максимальное количество изоформ фермента детектируется в тканях листа (12-14). Мажорными являются две щелочные (pI 7,7 и 8,2) и две кислые изоформы (pI 3,6 и 4,4). Ткани стебля и клубня не отличались от листьев изоферментным составом, но имели меньшую суммарную удельную активность и отличия в активности отдельных представленных изоформ. В спектре стебля мажорными были изоформы с pI 8,2 и 7,7, в клубне – изоформы с pI 9,4; 8,2 и 7,7. Внеклеточные (апопластные) хитиназы были представлены двумя мажорными кислыми (pI 3,6 и 4,4) и щелочными (pI 8,2; 7,7 и 7,5) изоформами. Внутриклеточные хитиназы листьев картофеля содержали не менее 8 кислых и щелочных изоформ с преобладанием последних. Хитиназы найдены в здоровых листьях многих других растений. Предполагается, что хитиназы в норме могут участвовать в регуляции роста и развития растений [16, 26], хотя сегодня общепринятой считается их защитная функция [1, 6]. Клеточные и секреторные хитиназы предположительно имеют разные роли в защитных реакциях. Апопластные хитиназы считаются частью ранней, индуцированной реакции, так как эти хитиназы действуют непосредственно, блокируя рост гиф, вторгшихся в межклеточное пространство. Кроме того, указывается, что апопластные хитиназы, возможно, действуют косвенно, высвобождая грибковые элиситоры, которые, в свою очередь, способны вызывать каскад других защитных ответов. При дальнейшем развитии инфекционного процесса, когда гифы проникают внутрь клеток, высвобождаются внутриклеточные хитиназы [3]. Установлено, что вакуолярные хитиназы более эффективно подавляют рост болезнетворных микроорганизмов [5].

Для выявления изоформ хитиназ картофеля с ХСД использовали аффинную хроматографию с нерастворимым коммерческим хитином (chitin resin). На рисунке 2 представлены спектры изоформ фермента, связавшихся и не связавшихся с хитином. На основании сродства к аффинному сорбенту в листьях картофеля были установлены изоформы хитиназы, имеющие ХСД, с ИЭТ в щелочной и нейтральной области (pI 8,5; 8,0; 6,8 и 6,0). Мажорные конститутивные кислые (pI 3,6 и 4,4) и щелочные (pI 7,7 и 8,2) изоформы, накапливающиеся в листьях картофеля, не содержали ХСД.

Установлено, что самую высокую противогрибковую активность проявляют хитиназы класса I, что, возможно, связано с наличием в их структуре ХСД [27]. Класс I хитиназ встречается только в растениях. Большинство хитиназ класса I синтезируется с С-концевым расширением, обеспечивающим их локализацию в вакуоле. В то время как хитиназы I класса встречаются только в растениях, класс II также встречается у грибов и бактерий. Они аналогичны классу I, но не

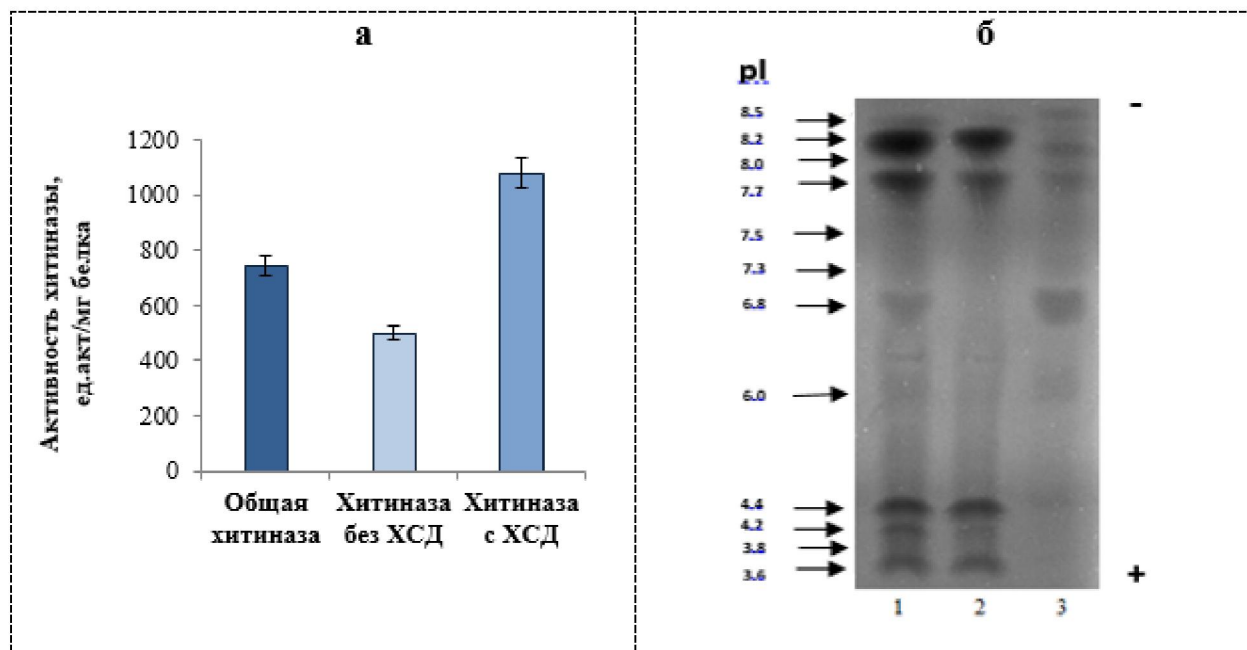


Рисунок 2 – Удельная активность (а) и ИЭФ спектр (б) хитиназ листа картофеля, содержащих и не содержащих ХСД; 1 – общий спектр хитиназы; 2 – хитиназа без ХСД; 3 – хитиназа с ХСД

имеют N-концевого ХСД и шарнирной области и имеют кислые свойства. Оба I и II класса индуцируются как часть местной гиперчувствительной реакции. С другой стороны, хитиназы класса II индуцируются при системном ответе [1].

По способу действия на субстрат хитиназы подразделяются на 2 типа: экзохитиназы и эндохитиназы. Экзохитиназы детектировали с использованием хромогенного субстрата 4-метилумбеллиферил-N-ацетил-глюкозаминада. Спектр общей хитиназы выявляли гелем-репликацией с гликоль хитином (рисунок 3). Полученные результаты показывают, что экзохитиназы картофеля представлены кислыми изоформами (pI 3,6–4,9), локализованными в апопласте и в незначительном количестве – внутриклеточно.

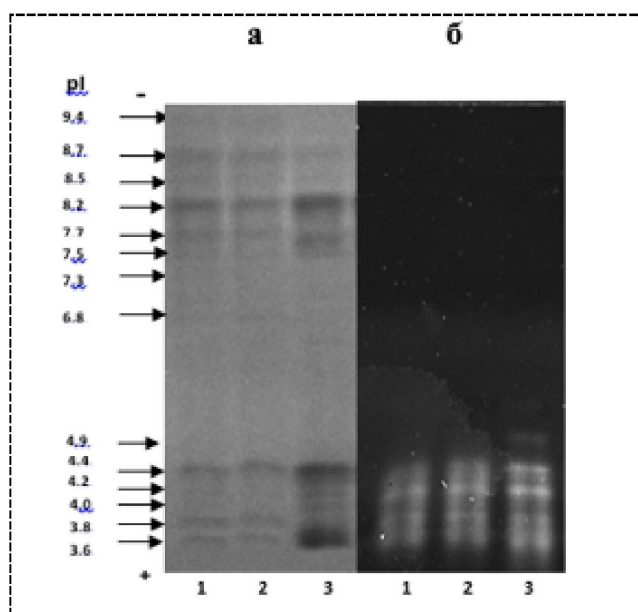


Рисунок 3 – ИЭФ спектр общей хитиназы (а) и экзохитиназы (б) 4-х недельных листьев картофеля; 1 – общий спектр; 2 – внутриклеточные хитиназы, 3 – апопластные хитиназы

Большинство установленных в картофеле индуцированных хитиназ являются эндохитиназами с молекулярной массой 32–38 кДа и ИЭТ выше 7 [28], хотя незначительные количества кислых (класс II) изоформ также были обнаружены [17].

Важной характеристикой ферментных белков является их термостабильность. Растительные хитиназы показывают широкий диапазон изоэлектрических точек, активности pH и температурной стабильности. Термоустойчивость хитиназы и ее отдельных изоформ определяли 10-минутным прогревом тотального фермента при 50, 60 и 70 °C с 1мМ Ca²⁺. После прогрева образцы быстро охлаждали и центрифугировали для удаления денатурированных белков. Контролем являлся непрогретый фермент (рисунок 4). ИЭФ и анализ активности позволил установить в составе хитиназ картофеля относительно термостабильные и термолабильные изоферменты (рисунок 4).

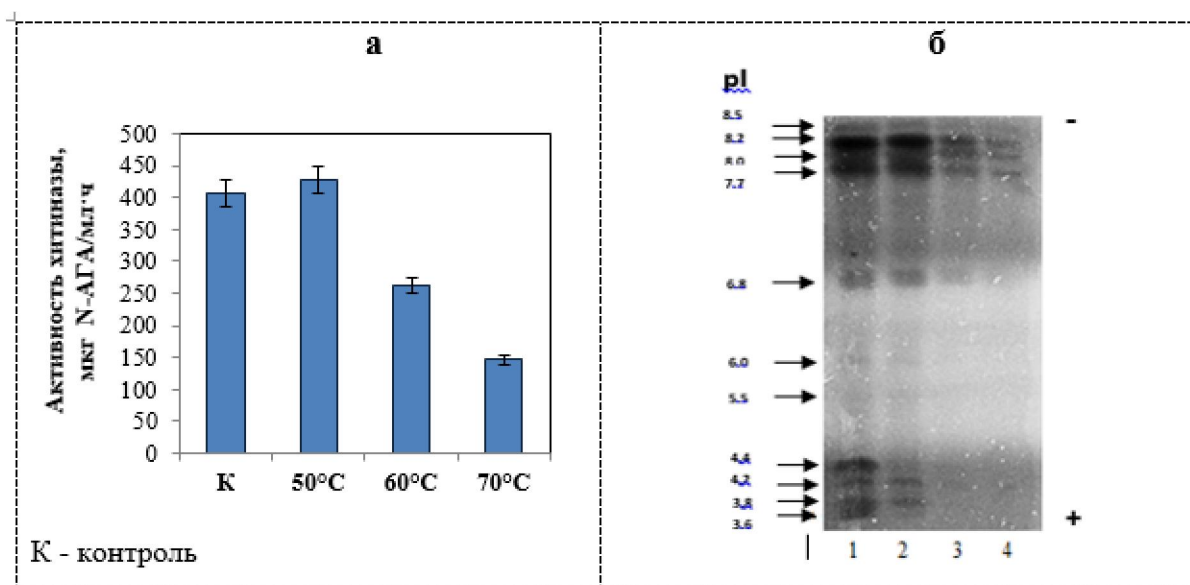


Рисунок 4 – Влияние температуры на активность (а) и ИЭФ спектр (б) хитиназы листа картофеля. б: 1 – исходная хитиназа (контроль); 2-4 – после 10 мин прогрева при 50°C (1), 60°C (2) и 70°C (3)

Наименьшей устойчивостью к нагреванию характеризовались кислые экзохитиназы картофеля, локализованные в апопласте, активность которых значительно снизилась уже при 50 °C. Максимальной термоустойчивостью характеризовались щелочные изоформы фермента (pI 7,7–8,2), частично сохранившие свою активность и после прогрева при 70 °C.

Таким образом, проведенные исследования позволили установить, что конститутивный пул хитиназ картофеля включает не менее 14 изоформ фермента. В составе хитиназ были идентифицированы изоформы, различающиеся по структуре (содержащие и не содержащие ХСД), локализации (апопластные и внутриклеточные), субстратной специфичности (экзо- и эндохитиназы) и термостабильности. Полученные данные могут быть использованы в идентификации белковых маркеров устойчивости *S.tuberosum* к патогенам и другим стрессовым условиям.

Источник финансирования исследований. НТП О.0657 МОН РК «Разработка научных основ повышения устойчивости пшеницы и картофеля к фузариозу и вирусам на основе методов молекулярной и клеточной биологии и создание на их основе исходных линий и диагностикумов для ускоренной селекции». Задание: Биохимические показатели устойчивости пшеницы и картофеля к фузариозу для создания улучшенных линий.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Grover A. Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles // Crit. Rev. Plant Sci. – 2012. – Vol. 31. – P. 57-73.
- [2] Saboki Ebrahim, K. Usha, Bhupinder Singh. Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism // Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. A. Méndez-Vilas (Ed.). – 2011. – Vol. 2(3). – P. 1043-1054.

- [3] Sharma V. Pathogenesis related defence functions of plant chitinases and β -1,3-glucanases // *Vegetos.* – 2013. – Vol. 26. – P. 205-218.
- [4] Collinge D.B., Kragh K.M., Mikkelsen J.D., Nielsen K.K., Rasmussen U. Vad K. Plant chitinases // *Plant J.* – 1993. – Vol. 3(1). – P. 31-40.
- [5] Kasprzewska A. Plant chitinases – regulation and function // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 2003. – Vol. 8(3). – P. 809-824.
- [6] Sharma N., Sharma K.P., Gaur R.K., Gupta V.K. Role of chitinase in plant defense // *Asian J. Biochem.* – 2011. – Vol. 6(1). – P. 29-37.
- [7] Graham L.S., Sticklen M.B. Plant chitinases // *Can J. Bot.* – 1994. – Vol. 72(8). – P. 1057-1083.
- [8] Cohen-Kupiec R., Chet I. The molecular biology of chitin digestion // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 1998. – Vol. 9. – P. 270-277.
- [9] Neuhaus J.M. Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). In: Datta S.K., Mathukrishnan S., eds. Pathogenesis related proteins in plants // CRC Press, Boca Raton, FL. – 1999. – P. 77-105.
- [10] Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2006. – Vol. 44. – P. 135-162.
- [11] Broekaert W.F., Van Parijs J., Allen A.K., Peumans W.J. Comparison of some molecular, enzymatic and antifungal properties of chitinases from thorn-apple, tobacco and wheat // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 1988. – Vol. 33. – P. 319-331.
- [12] Schlumbaum A., Mauch F., Vogeli U., Boller T. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth // *Nature.* – 1986. – Vol. 324. – P. 365-367.
- [13] Neuhaus J.M., Frutig B., Linthorst H.J.M., Meins F., Mikkelsen J.D., Ryals J. A revised nomenclature for chitinase genes // *Plant Mol. Biol. Reporter.* – 1996. – Vol. 14. – P. 102-104.
- [14] Barber M.S., Bertram R.E., Ride J.P. Chitin oligosaccharides elicit lignifications in wounded wheat leaves // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 1989. – Vol. 34. – P. 3-12.
- [15] Mauch F., Staehelin L.A. Functional implication of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves // *Plant Cell.* – 1989. – Vol. 1. – P. 447-457.
- [16] Dyachok J.V., Wiweger M., Kenne L., Von Arnold S. Endogenous Nod-factor-like signal molecules promote early somatic embryo development in Norway spruce // *Plant Physiol.* – 2002. – Vol. 128. – P. 523-533.
- [17] Beerhues L., Kombrink E. Primary structure and expression of mRNAs encoding basic chitinase and 1,3- β -glucanase in potato // *Plant Mol. Biol.* – 1994. – Vol. 24. – P. 353-367.
- [18] Schroder M., Hahlbrock K., Kombrink E. Temporal and spatial patterns of 1,3- β -glucanase and chitinase induction in potato leaves infected by *Phytophthora infestans* // *Plant J.* – 1992. – Vol. 2. – P. 161-172.
- [19] Broglie K., Chet I., Holliday M., Cressnan R., Biddle P., Knowlton S., Mauvais C.J., Broglie R. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* // *Science.* – 1991. – Vol. 254. – P. 1194-1197.
- [20] Neuhaus J.M., Ahl-Goy P., Hint U., Flores S., Meins F. High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana sylvestris*. Susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection // *Plant Mol. Biol.* – 1991. – Vol. 16(1). – P. 141-151.
- [21] Fink W., Liefland M., Mendgen K. Chitinases and β -1,3-glucanases in the apoplastic compartment of oat leaves (*Avena sativa* L.) // *Plant Physiol.* – 1988. – Vol. 88. – P. 270-275.
- [22] Trudel J., Asselin A. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis // *Anal. Biochem.* – 1989. – Vol. 178. – P. 362-366.
- [23] Rohringer R., Ebrahim-Nesbat F., Wolf G. Proteins in intercellular washing fluids from leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.) // *J. Exp. Bot.* – 1983. – Vol. 34. – P. 1589-1605.
- [24] 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. – Vol. 58(2). – P. 261-263.
- [25] Sorensen 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. – Vol. 160. – P. 1573-1584.
- [26] Jitonom J., Lee V.S., Nimmanpipug P., Rowlands H.A., Mulholl A.J. Quantum mechanics/molecular mechanics modeling of substrate assisted catalysis in family 18 chitinases: conformational changes and the role of Asp142 in catalysis in ChiB // *Biochemistry.* – 2011. – Vol. 50. – P. 4697-4711.
- [27] Sela-Buurlage M.B., Ponstein A.S., Bres-Vloemans S.A., Melchers L.S., Van Den Elzen P.J.M., Cornelissen B.J.C. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity // *Plant Physiol.* – 1993. – Vol. 101. – P. 857-863.
- [28] Kombrink E., Schroder M., Hahlbrock K. Several pathogenesis-related proteins in potato are 1,3- β -glucanases and chitinases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1988. – Vol. 85. – P. 782-786.

REFERENCES

- [1] Grover A. Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2012. Vol. 31. P. 57-73 (in Eng.)
- [2] Saboki Ebrahim, K. Usha, Bhupinder Singh. Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. A. Méndez-Vilas (Ed.)*. 2011. Vol. 2(3). P. 1043-1054 (in Eng.)
- [3] Sharma V. Pathogenesis related defence functions of plant chitinases and β -1,3-glucanases. *Vegetos*. 2013. Vol. 26. P. 205-218 (in Eng.)
- [4] Collinge D.B., Kragh K.M., Mikkelsen J.D., Nielsen K.K., Rasmussen U. Vad K. Plant chitinases. *Plant J.* 1993. Vol. 3(1). P. 31-40 (in Eng.)
- [5] Kasprzewska A. Plant chitinases – regulation and function. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2003. Vol. 8(3). P. 809-824 (in Eng.)
- [6] Sharma N., Sharma K.P., Gaur R.K., Gupta V.K. Role of chitinase in plant defense. *Asian J. Biochem.* 2011. Vol. 6(1). P. 29-37 (in Eng.)
- [7] Graham L.S., Sticklen M.B. Plant chitinases. *Can J. Bot.* 1994. Vol. 72(8). P. 1057-1083 (in Eng.)
- [8] Cohen-Kupiec R., Chet I. The molecular biology of chitin digestion. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1998. Vol. 9. P. 270-277 (in Eng.)
- [9] Neuhaus J.M. Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). In: Datta S.K., Mathukrishnan S., eds. Pathogenesis related proteins in plants. *CRC Press, Boca Raton, Fl.* 1999. P. 77-105 (in Eng.)
- [10] Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006. Vol. 44. P. 135-162 (in Eng.)
- [11] Broekaert W.F., Van Parijs J., Allen A.K., Peumans W.J. Comparison of some molecular, enzymatic and antifungal properties of chitinases from thorn-apple, tobacco and wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1988. Vol. 33. P. 319-331 (in Eng.)
- [12] Schlumbaum A., Mauch F., Vogeli U., Boller T. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature*. 1986. Vol. 324. P. 365-367 (in Eng.)
- [13] Neuhaus J.M., Fritig B., Linthorst H.J.M., Meins F., Mikkelsen J.D., Ryals J. A revised nomenclature for chitinase genes. *Plant Mol. Biol. Reporter*. 1996. Vol. 14. P. 102-104 (in Eng.)
- [14] Barber M.S., Bertram R.E., Ride J.P. Chitin oligosaccharides elicit lignifications in wounded wheat leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1989. Vol. 34. P. 3-12 (in Eng.)
- [15] Mauch F., Staehelin L.A. Functional implication of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. *Plant Cell*. 1989. Vol. 1. P. 447-457 (in Eng.)
- [16] Dyachok J.V., Wiweger M., Kenne L., Von Arnold S. Endogenous Nod-factor-like signal molecules promote early somatic embryo development in Norway spruce. *Plant Physiol.* 2002. Vol. 128. P. 523-533 (in Eng.)
- [17] Beerhues L., Kombrink E. Primary structure and expression of mRNAs encoding basic chitinase and 1,3- β -glucanase in potato. *Plant Mol. Biol.* 1994. Vol. 24. P. 353-367 (in Eng.)
- [18] Schroder M., Hahlbrock K., Kombrink E. Temporal and spatial patterns of 1,3- β -glucanase and chitinase induction in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. *Plant J.* 1992. Vol. 2. P. 161-172 (in Eng.)
- [19] Broglie K., Chet I., Holliday M., Cressman R., Biddle P., Knowlton S., Mauvais C.J., Broglie R. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science*. 1991. Vol. 254. P. 1194-1197 (in Eng.)
- [20] Neuhaus J.M., Ahl-Goy P., Hint U., Flores S., Meins F. High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana glauca*. Susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection. *Plant Mol. Biol.* 1991. Vol. 16(1). P. 141-151 (in Eng.)
- [21] Fink W., Liefland M., Mendgen K. Chitinases and β -1,3-glucanases in the apoplastic compartment of oat leaves (*Avena sativa* L.). *Plant Physiol.* 1988. Vol. 88. P. 270-275 (in Eng.)
- [22] Trudel J., Asselin A. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 1989. Vol. 178. P. 362-366 (in Eng.)
- [23] Rohringer R., Ebrahim-Nesbat F., Wolf G. Proteins in intercellular washing fluids from leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.* 1983. Vol. 34. P. 1589-1605 (in Eng.)
- [24] 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. Vol. 58(2). P. 261-263 (in Eng.)
- [25] Sørensen 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. Vol. 160. P. 1573-1584 (in Eng.)
- [26] Jitnom J., Lee V.S., Nimmanpipug P., Rowlands H.A., Mulholl A.J. Quantum mechanics/molecular mechanics modeling of substrate assisted catalysis in family 18 chitinases: conformational changes and the role of Asp142 in catalysis in ChiB. *Biochemistry*. 2011. Vol. 50. P. 4697-4711 (in Eng.)
- [27] Sela-Buurlage M.B., Ponstein A.S., Bres-Vloemans S.A., Melchers L.S., Van Den Elzen P.J.M., Cornelissen B.J.C. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol.* 1993. Vol. 101. P. 857-863 (in Eng.)
- [28] Kombrink E., Schroder M., Hahlbrock K. Several pathogenesis-related proteins in potato are 1,3- β -glucanases and chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988. Vol. 85. P. 782-786 (in Eng.)

О. А. Сапко, О. В. Чебоненко, А. К. Тұрсынова, А. О. Абайлдаев,
Ж. Д. Бескемпірова, Б. Тілеген, Ю. М. Дё, А. Ш. Отарбаева

ҚР БҒМ ҒК «М. Ә. Айтқожин атындағы Молекулалық биология және биохимия институты»,
Алматы, Қазақстан

КАРТОБЫ ХИТИНАЗАСЫНЫҢ ИЗОФЕРМЕНТТІК ҚҰРАМЫ МЕН КЕЙБІР ҚАСИЕТТЕРІ

Аннотация. Хитиназалар (ЕС 3.2.1.14) PR-ақуыздар тобына жатады және патогендік шабуыл және басқа стрестік жағдайларда өсімдіктердің қорғаныс механизмінің маңызды компоненті болып табылады. Белсенді зерттеулер мен жетістіктерге қарамастан, өсімдіктердің қалыпты метаболизміндегі хитиназаның рөлі анықталмаған болып қалады. Зерттеудің мақсаты *Solanum tuberosum* картобы хитиназасының изоферменттік құрамы, локализациясы және кейбір физико-химиялық қасиеттерін зерттеу болды. Хитиназаның конститутивті белсенділігі мен полиморфизмінің айтарлықтай деңгейі анықталды. Ферменттің түрлі изоформаларының локализация арнайылығы көрсетілген. Жасушадан тыс хитиназалар қышқылдық (pI 3,5–4,4) және сілтілік (pI 8,2–7,5) изоформалармен көрінетіндігі анықталды. Арнайы аффиндік сорбентті қолдану арқылы көбіне жасуша ішінде локализован құрамы хитин-байланыстырушы доменнен (pI 8,7; 8,0; 6,5 и 5,8) тұратын изоферменттер көрсетілген. Жасушааралық кеңістікпен қатар жасуша ішінде де локализован қышқылдық ИЭН-ге ие (3,5–5,1) картоп экзохитиназалары идентификацияланған. Хитиназа изоформаларының термотұрақтылығы анықталған. Термолобильділігі жоғары болып қышқылды апопластты экзохитиназалар (pI 3,5–4,4) жатқызылды. Максималды термотұрақтылығымен жасушаішілік сілтілік изоформалар (pI 8,7–8,2) сипатталды. Алынған мәліметтерді *S.tuberosum*-ның патогендер мен басқа стрестік жағдайларға төзімділігінің ферментативті маркерлерін идентификациялауда қолдануға болады.

Түйін сөздер: *Solanum tuberosum*, хитиназа, изоферменттер, локализация, экзохитиназа, хитин-байланыстырушы домен.