

УДК 581.143.577

## АКТИВНІСТЬ НІТРАТРЕДУКТАЗИ У БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ РОСЛИН ТЮТЮНУ ЗА ДІЇ ІНГІБІТОРІВ ФЕРМЕНТУ

Л.Є. СЕРГЄЄВА

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України  
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17*

Нітрати в рослинах можуть відновлюватись лише за участі ферменту нітратредуктази (НР). Методом клітинної селекції із застосуванням летальних доз вольфрамату й ванадату, що пригнічують активність НР, отримано стійкі клітинні лінії тютюну та регенеровано рослини. Визначено активність НР у листках. За нормальних умов активність НР у регенерантів була в 2–3 рази вищою, ніж у рослин дикого типу, а також проявлялася на досить високому рівні за культивування їх за наявності у поживному середовищі аніонів вольфраму і ванадію. Обговорено можливі причини отриманих ефектів.

*Ключові слова:* тютюн, клітинна селекція, вольфрамат, ванадат, нітратредуктаза.

Об'єктами прискіпливої наукової уваги є та завжди будуть форми рослин, що вирізняються особливими показниками. Вивчатимуть окремі параметри і навіть цілі комплекси реакцій, пов'язані з ними. Очевидно, що такі події насамперед стосуватимуться фундаментальних процесів обміну. Наступним етапом досліджень обов'язково буде завдання експериментального отримання рослинних форм зі зміненим характером метаболізму.

Активний розвиток рослин у стресових (критичних) умовах можуть підтримувати лише функціональні ферменти різного спрямування, оскільки в разі мінімізації метаболізму в кращому випадку можливе лише пасивне виживання. Передусім це стосується метаболізму азоту, бо цей елемент необхідний будь-якій живій системі в першу чергу для створення власних структурних і функціональних білків.

Серед усіх природних форм азоту рослинному організму доступна нітратна форма ( $\text{NO}_3^-$ ;  $\text{N}^{5+}$ ). Ланцюг засвоєння азоту такий:  $\text{N}^{5+} \rightarrow \text{N}^{3+} \rightarrow \text{N}^+ \rightarrow \text{N}^- \rightarrow \text{N}^{3-}$ . Зрозуміло, що дефіцит азоту зростатиме зі скороченням (втрачанням) ланок. Тому першу ланку, а саме перетворення нітрату  $\rightarrow$  нітриту ( $\text{N}^{5+} \rightarrow \text{N}^{3+}$ ), вважають ключовою. Цю реакцію каталізує фермент нітратредуктаза (КФ 1.6.6.1).

Ферментний комплекс НР складається з двох частин — діафразної і термінальної — які послідовно беруть участь у перенесенні електронів від НАД(Ф)Н до нітрату. Діафразна частина, що містить ФАД, каталізує передачу електронів від НАД(Ф)Н до цитохрому *c* або інших акцепторів, термінальна (редуктазна) містить молібден і переносить електрони на нітрат. Обидві частини істотно відрізняються й піддаються різним впливам, які можуть значно знизити нітратредуктазну активність (НРА) [1].

Виходячи з особливостей будови молекули НР, отримано дефектні за НР рослинні форми (із частковою активністю НР або з повною її відсутністю). Це мутанти двох типів: *spx* — дефектні за молібденовим кофактором і *nia* — дефектні за апобілком [8, 11, 12]. Активність ферменту знижувалась через модифікації структури його молекул. Обидва типи виділено методом непрямой клітинної селекції з використанням хлорату ( $\text{ClO}_3^-$ ), який для НР є аналогом  $\text{NO}_3^-$ .

Крім іонів  $\text{ClO}_3^-$  іонами-блокаторами активності НР є  $\text{WO}_4^{2-}$  (вольфрамат) і  $\text{VO}_3^-$  (ванадат).  $\text{W(VI)}$  у складі вольфрамату — біологічний антагоніст молібдену  $\text{Mo(VI)}$ , що заміщує його у кофакторі,  $\text{V(V)}$  — впливає на ланцюг транспорту електронів без вбудовування в молекулу НР. Однак в обох випадках НРА знижується, внаслідок чого обмежується засвоєння нітратів.

Взявши до уваги чутливість НР до вольфрамату й ванадату та врахувавши успіхи й потенційні можливості клітинної селекції, ми висунули та апробували гіпотезу щодо ймовірності отримання клітинних варіантів зі зміненою НРА, створили експериментальну селективну систему *in vitro*, що відповідала низці умов одночасно (А, Б, В). Середовище відбору містило: виключно нітрати як джерело азоту та субстрат для активної НР (А); вольфрамат і ванадат як інгібітори нативної НР у концентраціях, летальних для клітинних культур дикого типу (Б); середовище не містило молібден (В). Таким способом було отримано стійкі клітинні лінії тютюну та сої [5, 7], які засвоювали нітрати й росли за наявності аніонів-інгібіторів. Із деяких стійких клітинних ліній тютюну регенеровано рослини.

Метою цієї роботи було визначення активності нітратредуктази в експериментальних рослин тютюну за різних умов їх культивування.

## Методика

Рослини тютюну культивували *in vitro* на середовищі Мурасиге—Скуга [10]. Укорінені рослини відмивали від агару і вміщували у водну культуру на 7 діб. Поживний розчин містив нітрат калію (єдине джерело азоту) та решту макроелементів відповідно до складу середовища Мурасиге—Скуга. Після стабілізації метаболізму рослини ділили на три групи і переносили в експериментальні умови на 5 діб. Контрольні умови створювали поновленням поживного розчину, стресові — додаванням ванадату чи вольфрамату (1 мМ).

Активність НР визначали в листках рослин. Для цього свіжу тканину гомогенізували у середовищі рідкого азоту в 0,05 М натрій-фосфатному буфері (рН 7,0) і центрифугували при 20 000 об/хв упродовж 20 хв (клітинний екстракт). Співвідношення буфер : зразок становило 3 : 1. В отриманій надосадовій рідині визначали НРА. Реакційна суміш містила 100 мМ натрій-фосфатний буфер (рН 7,0), 10 мМ  $\text{NaNO}_3$ , 0,7 мМ метилвіологен, дослідний препарат (0,01—0,10 мл). Реакцію починали з додавання дитіоніту, проводили її при 70 °С; зупиняли додаванням 500 мкл розчину 0,6 %-ї сульфанілової кислоти у 20 %-ї соляній кислоті та 500 мкл 2 мМ розчину N-1-нафтилетилендіаміну. Через 15 хв, які необхідні для розвитку забарвлення, визначали поглинання за 548 нм. Контролем слугували проби (100 мкл), які кип'ятили й інкубували впродовж 30 хв в умовах, аналогічних дослідним. Отримані дані оброблено статистично.

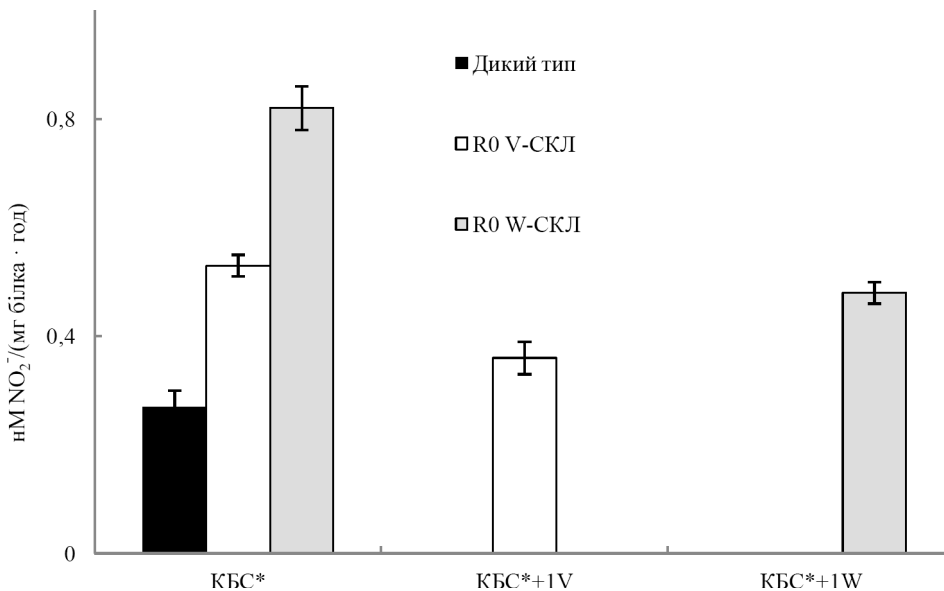
**Результати та обговорення**

Стійкі клітинні лінії, отримані в результаті клітинної селекції, розвивались за стресових умов. Система *in vitro* вирізняється низкою особливостей, які можуть істотно ускладнювати аналіз активності НР. Тому при дослідженні клітинних культур ми скористались адекватними підходами, а функціонування ферменту оцінювали за динамікою синтезу ендогенних протеїнів [6].

НРА рослин-регенерантів визначали безпосередньо (рисунок). Рослини R<sub>0</sub> тютюну засвоювали нітрати за будь-яких умов, що свідчило про активність ферменту. При цьому за нормальних умов активність НР у листках рослини, отриманої з V-стійкої клітинної лінії, перевищувала показники рослин дикого типу в 2,2 раза, а в листках регенеранту, отриманого з W-стійкої клітинної лінії — в 3,4 раза. За наявності у поживному розчині аніонів-інгібіторів у рослин-регенерантів, отриманих зі стійких клітинних ліній, також спостерігали активність ферменту, хоча й нижчу, ніж за нормальних умов.

Отже, за допомогою клітинної селекції з використанням аніонів вольфраму (WO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), ванадію (VO<sub>3</sub><sup>-</sup>) та ClO<sub>3</sub><sup>-</sup> отримано форми рослин зі зміненим характером НРА. Слід зазначити, що в разі застосування хлорат-аніонів виділялись виключно НР-дефектні типи. Тут йдеться про форми з активним ферментом.

Це припущення підтримується такими фактами. По-перше, наявністю іонів-інгібіторів у клітині, оскільки вони можуть переноситись разом із нітратами [1]. По-друге, малоімовірністю створення (у нашому випадку) передумов для блокування стресорів, бо останні застосовували у летальних дозах, що призводило до елімінації нормальних варіантів.



Активність нітратредуктази у листках рослин тютюну на 5-ту добу тестування:

СКЛ — стійка клітинна лінія; КБС — поживне середовище, яке містило лише нітрати як джерело азоту

Отже, можлива причина — модифікація самого ферменту, яка забезпечує його функціонування за наявності аніонів-інгібіторів. Змінені форми ферментів, як правило, отримують шляхом сайт-спрямованого мутагенезу *in vitro*. Це один із біотехнологічних прийомів внесення в бажаний ген потрібних змін ДНК, унаслідок чого в продуктах експресії цих генів відбуваються зміни. Із використанням сайтспрямованого мутагенезу отримано змінені форми низки ферментів [2—4].

Так, заміна залишків лізину в положеннях 146, 147 на аспарагін і тирозин призвела до повної інактивації ферменту в реакції аміноацилювання тРНК бика [3]. Деякі мутантні форми (всього отримано 27 мутантів) ферменту пеніцилінацилази (есПА) підвищували ефективність ацилювання 6-амінопеніциланової кислоти в реакції синтезу β-лактамічних антибіотиків більш як у 20 разів. Інші мутантні форми виявились стійкішими до лужного середовища [4]. У численних публікаціях описано отримання ферментів із поліпшеними характеристиками. Складніша справа з нітратредуктазою через низку обставин.

По-перше, НР — цитозольний фермент, що кодується двома ядерними гомологічними генами — *Nia1* і *Nia2*, експресію яких регулює низка чинників, а саме: нітрат, світло, відновлені метаболіти, цукри, гормони, що діють на рівні транскрипції [13]. По-друге, активність НР залежить від функціональності складових, яка, у свою чергу, обмежується різними чинниками. По-третє, діяльність ферменту як такого регулюється багатьма чинниками на різних рівнях; функціональна НР зазвичай перебуває у трьох активних станах: вільна НР, фосфорильована НР (pNR) та NR:14-3-3 білковий комплекс [9, 14]. Тому досі не повідомлялось про виділення змінених форм НР.

У нашому досліді рослини з підвищеною НРА були регенеровані з двох стійких клітинних ліній, виділених на селективних середовищах. Частота їх появи становила  $10^{-6}$ , тобто відповідала частоті виникнення спонтанних мутантів. Отже, логічно припустити такий розвиток подій: у геномі рослини тютюну дикого типу стали певні зміни. Із тканин мезофілу було ініційовано клітинну культуру, а потім на селективних середовищах, які містили летальні концентрації аніонів-інгібіторів НР, відібрано стійкі клітинні лінії. Ознака стійкості безпосередньо корелювала з явищем редукції нітратів.

Таким чином, вперше отримано мутантні форми рослин із підвищеним рівнем активності НР за нормальних умов та функціональною активністю за наявності інгібіторів.

1. Львов Н.П. Молибден в ассимиляции азота у растений и микроорганизмов. — М.: Наука, 1989. — 86 с.
2. Малошенко Л.Г., Упоров И.В., Угарова Н.Н. Каталитические свойства и спектры люминесценции рекомбинантной люциферазы светляков *Luciola mingrelica* с точечными мутациями вне активного центра // Вестн. Моск. ун-та. — Сер. Химия. — 2002. — 43, № 6. — С. 359—362.
3. Найденов В.Г., Вудмаска М.И., Корнелюк А.И., Мацука Г.Х. Сайт-направленный мутагенез остатков лизина, локализованных в соединительном пептиде нуклеотидсвязывающего домена (свертки Россмана) тирозил-тРНК синтетазы из печени быка // Biopolym. Cell. — 2000. — 16, № 4. — С. 275—280.
4. Панин Н.В. Направленный мутагенез пеницилинацилазы из *E. coli* для изменения каталитических свойств и стабильности: Дис. ... канд. хим. наук. — М., 2014. — 200 с.
5. Сергеева Л.Е. Изучение комплексной устойчивости ванадий- и вольфрамустойчивых клеточных линий табака // Физиология и биохимия культ. растений. — 2000. — 32, № 6. — С. 490—493.

6. *Сергеева Л.Е.* Клеточная селекция с ионами тяжелых металлов для получения генотипов растений с комплексной устойчивостью к абиотическим стрессам. — Киев: Логос, 2013. — 211 с.
7. *Сергеева Л.Е., Труханов В.А.* Получение клеточных линий растений, устойчивых к вольфраму // Физиология и биохимия культ. растений. — 1997. — **29**, № 1. — С. 51–55.
8. *Mendel R.-R.* Biochemical characterization of nitrate reductase deficient cell lines of *Nicotiana tabacum* // Erg. Exp. Med. — 1979. — **34**. — P. 95–96.
9. *Mukund S., Adams M.W.W.* Molybdenum and vanadium do not replace tungsten in the catalytically active forms of the three tungstoenzymes in the hyperthermophilic archeon *Pyrococcus furiosus* // J. Bacteriol. Jan. — 1996. — **178**. — P. 163–167.
10. *Murasige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. — 1962. — **15**, N 13. — P. 473–497.
11. *Scholten H.J., Feenstra W.J.* Expression of mutant character of chlorate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* in cell culture // J. Plant Physiol. — 1986. — **123**, N 1. — P. 45–54.
12. *Steffen A., Schieder O.* Biochemical and genetical characterization of nitrate reductase deficient mutants of *Petunia* // Plant Cell Rep. — 1984. — **3**, N 4. — P. 134–137.
13. *Vaucheret H., Palanqui J.C., Mourrain P., Elmayan T.* Nitrate reductase and nitrite reductase as a targets to study gene silencing phenomena in transgenic plants // Euphatica. — 1997. — **30**. — P. 195–200.
14. *Yang Z., Midmore D.J.* A model for the circadian oscillations in expression and activity of nitrate reductase in high plants // Ann. Bot. — 2005. — **96**, N 6. — P. 1019–1026.

Отримано 01.12.2016

АКТИВНОСТЬ НИТРАТРЕДУКТАЗЫ У БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ  
ТАБАКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТА

*Л.Е. Сергеева*

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Нитраты в растениях могут восстанавливаться только при участии фермента нитратредуктазы (НР). Методом клеточной селекции с использованием летальных доз вольфрамата и ванадата, которые ингибируют активность НР, получены устойчивые клеточные линии табака и регенерированы растения. Определена активность НР в листьях. В нормальных условиях активность НР у регенерантов была в 2–3 раза выше, чем у растений дикого типа, а также проявлялась на достаточно высоком уровне при культивировании их при наличии в питательной среде анионов вольфрама и ванадия. Обсуждены возможные причины полученных эффектов.

NITRATE REDUCTASE ACTIVITY IN BIOTECHNOLOGY TOBACCO PLANTS UNDER  
ENZYME INHIBITORS ACTION

*L.E. Sergeeva*

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine  
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

Nitrate reduction process occurs in plant only with the participation of enzyme nitrate reductase (NR). Tobacco cell lines resistant to lethal doses of the tungsten ( $WO_4^{2-}$ ) and vanadium ( $VO_3^-$ ) anions, which inhibit NR, were obtained via cell selection.  $R_0$  plants were regenerated from some lines. The NR activity was estimated in leaves. Under normal conditions the NR activity in regenerants exceeded this parameter in wild type plants at 2–3 times. Under enzyme inhibitory pressure conditions NR activity in regenerants was maintained at considerable level too. Probable causes of obtained effects are discussed.

*Key words:* tobacco, cell selection, tungstate, vanadate, nitrate reductase.