

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
ОТДЕЛ БИОХИМИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

**КЛЕТОЧНЫЕ ЯДРА И ПЛАСТИДЫ
РАСТЕНИЙ:
БИОХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ**

Сборник материалов Международной конференции,
г. Минск,
26-28 мая 2004 г.

Минск
УП «ТЕХНОПРИНТ»
2004

**Клеточные
ядра
и пластиды
растений:**

биохимия и биотехнология

26-28
Май 2004 МИНСК



ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО МОДИФИЦИРОВАННОГО ГЕНА *CEL7* В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ *NICOTIANA TABACUM*

Ленец А.А., Шабуня П.С., Бердичевец Л.Г., Фоменко Т.И.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси,
220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2В,
e-mail: annalenets@nm.ru

Введение. В настоящее время уделяется особое внимание изучению молекулярных механизмов защиты растений от действия неблагоприятных стрессовых факторов окружающей среды. Исследования защитных реакций растений против фитопатогенов значительно продвинулись, благодаря использованию мутантных и трансгенных растений, представляющих собой удобную модель в изучении механизмов индукции защитных генов растений. Известно, что в процессе стрессового ответа в растениях происходит активизация некоторых форм глюканаз, обладающих полиглюкангидролазной активностью и расщепляющих основные углеводные компоненты клеточных стенок фитопатогенов, что свидетельствует о важной функции этих ферментов в защитных реакциях растения. В связи с этим перспективным представляется использование модельных трансгенных растений табака с экспрессирующимся бактериальным геном β -1,4-глюканазы для анализа дифференциальной экспрессии защитных генов в растениях.

Ген, кодирующий фермент β -1,4-эндоглюканазу (ЕС 3.2.1.4), клонирован из анаэробной грамположительной термофильной бактерии *Clostridium thermocellum*. Фрагмент длиной 3,4 т.п.о., содержащий часть гена *cel7*, находился в составе плазмиды pCU110. Для достижения максимальной экспрессии бактериального гена в растениях с целью делеции участка гена, кодирующего синтез лидерного пептида, была проведена модификация фрагмента ДНК, включающего ген β -1,4-глюканазы. Минимизация размера клонированного фрагмента для интеграции его в вектор для бактериальной экспрессии была осуществлена через клонирование HindIII-HindIII фрагмента

величиной 1250 п.о., содержащего N-концевую часть *cel7* без бактериальной сигнальной последовательности, а кодирующего только часть «зрелого» белка, в плазмиду pUC19 под контроль *LacZ* промотора. Слияние части гена и бактериального промотора было проведено с сохранением рамки считывания. Полученной плазмидой pCUC1 с гибридным геном *LacZ-cel7mod* трансформировали клетки *E.coli* с целью изучения свойств ферментативной активности модифицированного белка β -1,4-глюканазы [1].

При тестировании модифицированной β -1,4-глюканазы, синтезируемой в клетках *E.coli*, было установлено, что термостабильность и активность данного фермента сохраняется практически на исходном уровне, однако меняются температурный и рН оптимумы действия фермента. Оптимум температуры для модифицированного фермента сместился с 65 °С, характерных для исходной глюканазы из *C.thermocellum*, до 60 °С, оптимум рН – с 5,5-6,0 в область 6,5 [1].

Для агробактериальной трансформации растений табака были сконструированы 4 векторные плазмиды широкого круга хозяев (p1P1-*cel7*, p2TSl-*cel7*, p3Tl-*cel7*, p4T-*cel7*), несущие ген *cel7*, кодирующий фермент β -1,4-глюканазу, с разными структурными элементами. В **векторе p1P1-*cel7*** ген *cel7* контролируется индуцибельным промотором гена экстенсина моркови и содержит последовательность, кодирующую сигнальный пептид экстенсина моркови. Лидерный пептид экстенсина моркови способен направлять транспорт синтезированного белка в гранулы эндоплазматического ретикулума, где он подвергается матурации и секретируется в матрикс клеточной стенки. Промотор гена экстенсина моркови в нормальных условиях роста растения активен лишь в небольшой степени. Его активность сильно увеличивается (до 200 раз) при механическом поранении растения вследствие повреждения, например, насекомыми. В **векторе p2TSl-*cel7*** ген *cel7* находится под контролем 2-х конститутивных промоторов: сильного промотора 35S вируса мозаики цветной капусты и слабого промотора Tr2' гена нопалинсинтетазы, а также содержит последовательность, кодирующую сигнальный пептид экстенсина мор-

кови. В **векторе p3Tl-*cel7*** ген *cel7* контролируется только слабым конститутивным промотором Tr2' гена нопалинсинтетазы и обладает последовательностью, кодирующей сигнальный пептид экстенсина моркови. Промотор Tr2' позволяет добиться стабильной, но невысокой экспрессии чужеродного гена в эукариотическом организме. Промотор 35S вируса мозаики цветной капусты в несколько раз активнее промотора Tr2' и обеспечивает высокую экспрессию бактериальной глюканазы. **Вектор p4T-*cel7*** несет ген *cel7* под контролем конститутивного промотора Tr2' гена нопалинсинтетазы [1].

В итоге, после трансформации листовых дисков *Nicotiana tabacum* агробактериями с описанными выше векторами, проведения каллусогенеза на селективной среде с канамицином, переноса отобранных каллусов на среду для индуцирования органогенеза были получены 4 линии трансгенных растений табака. Используя ПЦР, было доказано, что все 4 линии содержат в своем геноме ген *cel7* с разными структурными элементами. В соответствии с названием векторов для трансформации рекомбинантные растения табака получили название **pe1**, **pe2**, **pe3** и **pe4** [1].

Все описанные выше манипуляции с геном *cel7*, создание векторов для агробактериальной трансформации, получение трансгенных растений проводилось к.б.н. Василевко В.Т. на базе лаборатории молекулярной генетики растений Института молекулярной генетики РАН (г. Москва).

Цель нижепредставленной работы заключалась в оценке экспрессии в геноме табака бактериального гена *cel7* под контролем различных структурных элементов по уровню ферментативной активности белкового продукта данного гена методом выявления в полиакриламидном геле изоформ глюканаз.

Методы исследования. Растения *Nicotiana tabacum* сорта Samsun выращивали в условиях *in vitro* на среде ½ MS в стерильных условиях при 25 °С, освещенности 5-6 тыс. люкс, в режиме 16 часов день – 8 часов ночь. Для биохимического анализа использовали листья 40-дневных растений.

Экстракцию глюканаз из листьев осуществляли 0,1 М ацетатным буфером (рН 5,6) в соотношении навеска:буфер=1:3 в тече-

ние 2 ч при +4 °С. Центрифугировали в течение 1 ч при 18000 g. Супернатант I отбирали для анализа изоформ цитоплазматических глюканаз. К осадку добавляли 0,1М ацетатный буфер (рН 5,6) с 1% тритоном X-100, экстрагировали мембраносвязанные глюканазы в течение ночи при +4 °С, далее центрифугировали в течение 1 ч при 18000 g. Супернатант II отбирали для анализа изоформ мембраносвязанных глюканаз. Для концентрирования в 20 раз белка в образце из части супернатанта I (из 1 мл) высаливали белки добавлением сульфата аммония до 80% насыщения, центрифугировали 20 мин при 18000 g и растворяли осадок в 50 мкл 50 мМ трис-НСl буфером (рН 8,5).

Разделение изоформ глюканаз проводили в 10% ПААГе в денатурирующих условиях в щелочной системе по Laemmli [2]. Перед добавлением персульфата аммония и полимеризацией в разделяющий гель вносили 0,1% лихенан – полиглюкан со смешанными β -1,3 и β -1,4-гликозидными связями, как описано у Schwarz et al. [3]. Белковые пробы предварительно смешивали 1:1 с 50 мМ трис-НСl буфером (рН 8,5) с добавлением сигнального красителя и уравнивали их по содержанию белка. Концентрацию белка определяли по Bredford [4]. Электрофорез проводили в комнатных условиях при постоянном токе 30 мА до тех пор, пока сигнальный краситель не достигнет нижнего края геля (~3 ч). Выявление изоформ глюканаз проводили по Schwarz et al. [3] с собственными модификациями. По окончании электрофореза гель инкубировали 1 ч в 0,1 М ацетатном буфере (рН 5,6) с 2% тритоном X-100, затем – дважды по 15 мин в чистом 0,1 М ацетатном буфере (рН 5,6). Далее вели инкубацию геля в 0,1 М ацетатном буфере (рН 5,6) с 1% тритоном X-100 в течение ночи в термостате при 30 °С, 60 °С, или 80 °С. Затем гель помещали на 30 мин в 0,1 М трис-НСl буфером (рН 8,0) и окрашивали в течение 15 мин 0,5% раствором Congo Red. Гель отмывали 1 М NaCl до выявления желтых полос (соответствуют изоформам глюканаз) на красном фоне.

Результаты исследований и их обсуждение. Проведенное нами электрофоретическое разделение в денатурирующих условиях белков из листьев трансгенных растений табака, содержащих в своем геноме ген *cel7*, и последующая окраска геля на

выявление изоформ глюканаз, показало, что в данных условиях только в 2 линиях трансгенных растений идет активная экспрессия гена *cel7* и осуществляется синтез его белкового продукта β -1,4-глюканазы. В линиях табака **pe2** и **pe3** обнаружены глюканазы, способные проявлять свою активность при +60 °С (рис. 1), что характерно исключительно для термостабильного бактериального модифицированного фермента. Причем высокая активность β -1,4-глюканазы выявляется в цитоплазматической фракции белков табака, тогда как в мембраносвязанной фракции обнаружены только следы данного фермента.

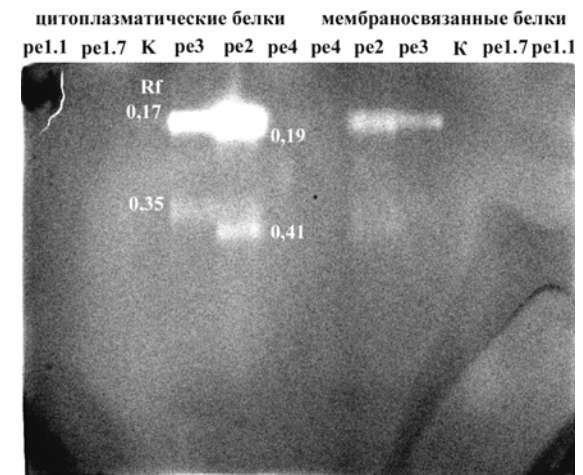


Рис. 1. Зимограммы бактериальной β -1,4-глюканазы из листьев трансгенных и контрольных растений табака (инкубация при + 60 °С): **pe1.1, pe1.7, pe2, pe3, pe4** – линии трансгенных растений; **K** – контрольные растения.

Видно, что активность глюканазы на мг внесенного в гель белка в линии **pe2** существенно выше, чем у рекомбинантов **pe3**. Различаются данные линии и по глюканазным зонам, образованным при денатурации белков: 4 зоны с относительной подвижностью (R_f) 0,17; 0,19; 0,35 и 0,41 выявлены в линии **pe2** и 2 зоны с R_f 0,17 и 0,35 – в **pe3**. Полученная картина объясняется

неодинаковыми уровнями экспрессии гена *cel7* под контролем различных промоторов. В линии **pe2** исследуемый ген контролируется как сильным промотором 35S вируса мозаики цветной капусты, позволяющим гену *cel7* экспрессироваться на высоком уровне, так и слабым промотором Tr2' гена нопалинсинтетазы. Таким образом транскрипция гена *cel7* может идти параллельно с двух промоторов, и, в итоге, может образовываться два белка с β -1,4-глюканазной активностью, но несколько различающихся по молекулярной массе, что и показано на рис. 1. В линии **pe3** бактериальный ген контролируется только слабым промотором Tr2' гена нопалинсинтетазы, обеспечивающим его стабильную, но невысокую экспрессию.

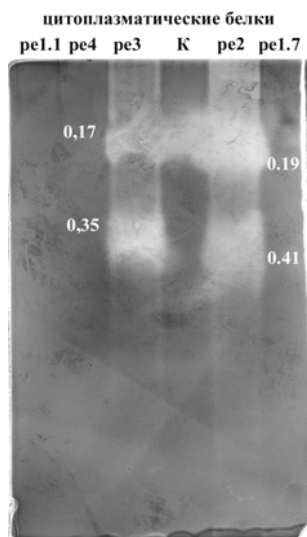


Рис. 2. Зимограммы бактериальной β -1,4-глюканазы из листьев трансгенных и контрольных растений табака при 20-кратном увеличении концентрации белка в пробах (инкубация при +60 °С): **pe1.1, pe1.7, pe2, pe3, pe4** – линии трансгенных растений; **К** – контрольные растения.

Контрольные растения, а также рекомбинанты **pe1** (**pe1.1** и **pe1.7**) и **pe4** не проявляют глюканазную активность при температуре +60 °С в данных условиях экстракции ферментов и разделения изоформ глюканаз (рис. 1).

Для повышения концентрации белка в исследуемых пробах, и, таким образом, исключения возможной невысокой чувствительности используемого нами метода разделения изоформ глюканаз, белки из супернатанта I высаливались добавлением сульфата аммония до 80% насыщения. Проведенное электрофоретическое разделение полученных белковых проб показало, что даже 20-кратное увеличение концентрации белка в пробе не позволило выявить бактериальную глюканазную активность в контрольных растениях и рекомбинантах **pe1** и **pe4** (рис. 2).

Понятно, что контрольные растения табака не должны обладать бактериальной термостабильной глюканазной активностью, а растительные глюканазы при данной температуре полностью ингибируются. Отсутствие же данного фермента в линиях **pe1** может объясняться свойством индуцибельного промотора, контролирующего в этих линиях ген *cel7*: активность промотора гена экстенсина моркови низка в нормальных условиях произрастания растений и многократно индуцируется биотическим стрессом – пораниением насекомыми. В растениях линии **pe4**, видимо, не образуется зрелого белка β -1,4-глюканазы из-за отсутствия в гене *cel7* как собственной сигнальной последовательности вследствие проведенной модификации гена, так и чужой, например, лидерной последовательности экстенсина моркови, присутствующей в рекомбинантах **pe2** и **pe3**.

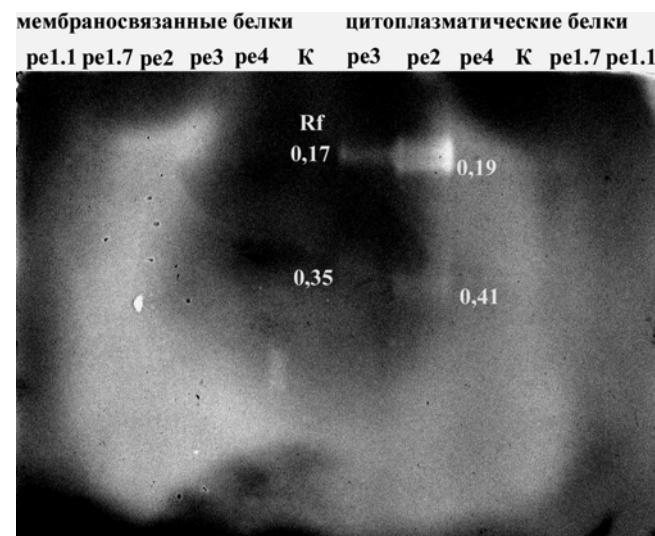


Рис. 3. Зимограммы бактериальной β -1,4-глюканазы из листьев трансгенных и контрольных растений табака (инкубация при +80 °С): **pe1.1, pe1.7, pe2, pe3, pe4** – линии трансгенных растений; **К** – контрольные растения

Для исследования термостабильности бактериальной глюконазы в листьях табака температура инкубации разделенных в ПААГе с субстратом ферментов была повышена до +80 °С. Полученные результаты (рис. 3) показали, что бактериальная β -1,4-глюконаза сохраняет активность в линиях **pe2** и **pe3** при данной температуре, но ее уровень значительно ниже, чем при оптимальной +60 °С.

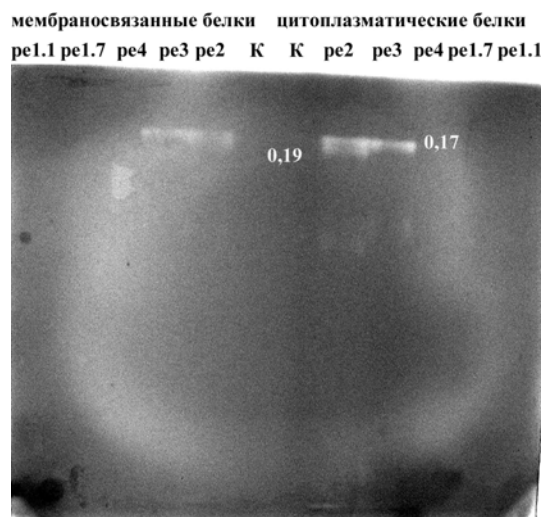


Рис. 4. Зимограммы растительных β -1,4-глюконаз листьев трансгенных и контрольных растений табака (инкубация при +30 °С):
pe1.1, pe1.7, pe2, pe3, pe4 – линии трансгенных растений;
К – контрольные растения.

Установлено, что многие виды растений (томат, горох, фасоль, соя, арабидопсис, авокадо, злаковые) обладают собственными β -1,4-глюконазами (β -(1,4)-глюкан-4-глюкогидролазами или целлюлазами (ЕС 3.2.1.4)) [5,6]. Данные ферменты гидролизуют гликозидные связи ...-D-глюкопиранозил- β -(1-4)-глюкопиранозил... в таких компонентах первичной клеточной стенки растений, как ксилоглюкан из класса гемицеллюлоз,

полиглюканы со смешанными β -(1-3),(1-4)-гликозидными связями, пектины с остатками р-D-галактозилуроновой кислоты, связанными 1,4-связью. При этом целлюлоза – главный структурный полимер клеточной стенки – не является основным субстратом для растительных β -1,4-глюконаз.

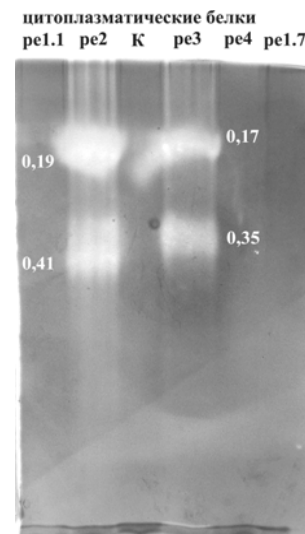


Рис. 5. Зимограммы растительных β -1,4-глюконаз листьев трансгенных и контрольных растений табака при 20-кратном увеличении концентрации белка в пробах (инкубация при +30 °С):
pe1.1, pe1.7, pe2, pe3, pe4 – линии трансгенных растений;
К – контрольные растения.

Однако, используя метод выявления глюконаз в ПААГе с лихенаном при +30 °С, нам не удалось обнаружить активность растительных β -1,4-глюконаз в листьях табака (рис.4 и 5). В данных условиях ферментативная активность тестировалась только в рекомбинантах **pe2** и **pe3**. Выявленные в трансгенных линиях табака глюконазные зоны – бактериальной природы, поскольку их R_f совпадают с таковыми в выше описанном эксперименте при +60 °С.

Отсутствие собственной глюконазной активности в листьях табака может объясняться тканеспецифичностью данных ферментов и их индукцией гормонами. Ряд β -1,4-глюконаз сильно реагируют на обработку растений этиленом [7] и связаны с созреванием фруктов [6], процессом опадания листьев, цветов и фруктов [8]. Другие являются ауксининдуцибельными и сопряжены с процессами активного роста и растяжения тканей и обнаруживаются только в молодых быстрорастущих тканях [9]. Тканеспецифичность и конкретные механизмы действия β -1,4-глюконаз до сих пор изучены крайне мало.

Таким образом, бактериальный ген *cel7* активно экспрессируется только в геноме двух линий табака: в линии **pe2** он обладает лидерной последовательностью экстенсина и 2-мя промоторами (сильным – 35S вируса мозаики цветной капусты и слабым – Tr2' гена нопалинсинтетазы), а в линии **pe3** – той же лидерной последовательностью, но контролируется только слабым промотором Tr2' гена нопалинсинтетазы. Данные исследования подтверждают, что белковый продукт гена *cel7* – фермент β -1,4-глюканаза – термостабилен и имеет оптимум температуры +60 °C, как и при его экспрессии в *E.coli*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Василевко В.Т. Модель переноса гена бактериальной полиглюкангидролазы (β -1,4-глюканаза) в растения табака как способ защиты растений от фитопатогенов / Диссерт. на соискан. уч. степ. канд. био. наук.- Минск, 2002.- 84 с.
2. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.-1970.-V.227.-P.680-685.
3. Schwarz W.H., Bronnenmeier K., Grabnitz F., Staudenbauer W.L. Activity staining of cellulases in polyacrylamide gels containing mixed linkage β -glucans // Analytical biochemistry.- 1987.- V.164.- P.72-77.
4. Bredford M.M. A rapid sensitive method for the action of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding // Anal. Biochem.- 1976.-V.72.- P.248-254.
5. Lashbrook C.C., Gonzalez-Bosch C., Bennett A.B. Two divergent endo-beta-1,4-glucanases exhibit overlapping expression in ripening fruit and abscission flowers.// Plant Cell.-1994.-V.6.-P.1485-1493.
6. Wu S.C., Blumer J.M., Darvill A.G., Albersheim P. Characterization of an endo-1,4-beta-glucanase gene induced by auxin in elongating pea epicotyls // Plant Physiol.-1996.-V.10.-P.163-170.
7. del Campillo E., Durbin N., Lewis L.N. Changes in two forms of membrane-associated cellulase during ethylene-induced abscission // Plant Physiol. -1988.-V.88.-P.904-909.
8. Kemmerer E.C., Tucker M.L. Comparative study of cellulases associated with adventitious root initiation, apical buds, and leaf, flower, and pod abscission zones in soybean// Plant Physiol.-1994.-V.104.-P.557-562.
9. Milligan S.B., Gasser C.S. Nature and regulation of pistil-expressed genes in tomato // Plant Mol.Biol.-1995.-V.28.-P.691-711.