

На правах рукописи



Барташевич Дарья Александровна

**Характеристика белка, кодируемого АБК-регулируемым геном
*At4g01870 Arabidopsis thaliana***

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2014

Работа выполнена в лаборатории экспрессии генома растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва.

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

Кузнецов Виктор Васильевич

Официальные оппоненты:

Соловьев Александр Александрович,

доктор биологических наук, профессор,

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева,
заведующий кафедрой генетики и сельскохозяйственной биотехнологии.

Шепеляковская Анна Олеговна,

кандидат биологических наук,

филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, г. Пущино,
старший научный сотрудник.

Ведущая организация:

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, биологический факультет, г. Москва

Защита состоится 21 октября 2014 г. в 11.00 ч. на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 002.210.01 по специальности 03.01.05 – “Физиология и биохимия растений” (Биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (495)9778018, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва.

Автореферат разослан «__» сентября 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Абсцизовая кислота (АБК) регулирует многие аспекты роста и развития растений, в том числе опадание листьев, клубнеобразование, повышение устойчивости семян к высушиванию и переходу к состоянию покоя, синтез запасных белков и липидов семян, процесс старения и многие другие. Помимо функционирования в нормальных условиях, АБК вовлечена в формирование ответа растений на действие различных стрессовых факторов, таких как засуха, засоление, пониженная температура (Finkelstein et al., 2002). К настоящему времени выявлено большое количество АБК-связывающих белков, вовлеченных в сигналинг и метаболизм гормона, а признанными рецепторами АБК являются белки семейства PYR/PYL/RCAR (Joshi-Saha et al., 2011). Однако, несмотря на обилие данных, до сих пор окончательно не изучен механизм действия АБК, в частности, при формировании ответных реакций при действии неблагоприятных внешних факторов. Очевидно, что в основе физиологических ответов лежат изменения в экспрессии стресс-регулируемых генов, участвующих в адаптации растений к неблагоприятным факторам. Важная роль АБК показана в контроле пост-транскрипционного метаболизма РНК (Kuhn and Schroeder, 2003). Установлена ключевая роль РНК-связывающих белков (РСБ) в регуляции экспрессии генов и адаптации растений к стрессам (Ambrosone et al., 2012; Lorcović, 2009), Причем, некоторые гены, кодирующие РСБ, являются АБК-регулируемыми (Li et al., 2002; Riera et al., 2006). В нормальных условиях РСБ участвуют в контроле различных физиологических процессов и вовлечены в процессинг пре-мРНК, транспорт, стабильность и деградацию транскриптов, а также их трансляцию (Macknight et al., 1997; Jung et al., 2013). У *Arabidopsis thaliana* обнаружено более 200 РНК-связывающих белков, некоторые из них могут оказывать влияние на биосинтез АБК посредством участия в регуляции синтеза или метаболизма мРНК, другие РСБ вовлечены в сигналинг АБК (Xiong et al., 2001). Однако, несмотря на большой объем имеющихся данных, изучение новых РНК-связывающих белков, которые, в частности, могут иметь отношение к метаболизму или сигналингу АБК, представляет значительный интерес.

Цели и задачи исследования. Цель настоящей работы заключалась в изучении свойств белка, кодируемого АБК-регулируемым геном *At4g01870 Arabidopsis thaliana*. Для достижения этой цели были поставлены следующие основные **задачи**:

1. Получить полноразмерный рекомбинантный белок At4g01870 и поликлональные антитела к нему
2. Изучить экспрессию гена *At4g01870* у растений *A. thaliana* при оптимальных условиях роста и развития, а также при действии экзогенной АБК и абиотических стрессов
3. Исследовать АБК-связывающие свойства белка At4g01870 и определить положение сайта связывания с гормоном
4. Получить и отобрать чистые линии растений *A. thaliana*, несущие инсерцию в гене *At4g01870*, и провести их морфофизиологический анализ
5. Изучить РНК-связывающие свойства белка At4g01870
6. Изучить способность At4g01870 к образованию белковых комплексов
7. Определить внутриклеточную локализацию белка At4g01870

Научная новизна работы. Впервые охарактеризован ранее неизвестный белок, кодируемый АБК-регулируемым геном *At4g01870* у *Arabidopsis thaliana*.

Впервые была изучена экспрессия гена *At4g01870* у *A. thaliana* и продемонстрирована положительная регуляция экспрессии *At4g01870* на уровне мРНК и белка в ответ на действие экзогенной АБК и абиотических стрессоров (гипотермия и засоление).

Впервые показано наличие у белка At4g01870 АБК-связывающих свойств *in vitro* и определено положение сайта связывания АБК. С помощью биоинформационных подходов предсказана пространственная структура белка, установлено, что At4g01870 не имеет структурного сходства с некоторыми известными АБК-связывающими белками (PYR1, FCA и CHLH).

Впервые охарактеризован инсерционный мутант *A. thaliana* по гену *At4g01870*. Показано, что мутация не влияет на рост и развитие растений и на их чувствительность к экзогенной АБК.

Установлено наличие у белка At4g01870 РНК-связывающих свойств *in vitro*.

Показано, что белок At4g01870 функционирует в цитоплазме клетки и не является компонентом белкового комплекса, АБК не влияет на его формирование в выбранных условиях проведения эксперимента.

Практическое значение работы. Результаты, полученные в диссертационной работе, имеют фундаментальное и прикладное значение. Данные могут быть использованы при подготовке лекционного материала по курсам физиологии и биохимии растений. Обнаружение новых РНК-связывающих белков, которые, в частности, могут иметь отношение к метаболизму или сигналингу АБК, а также участвовать в контроле стрессового ответа, позволит углубить понимание механизмов регуляции экспрессии генов и формирования устойчивости растений к абиотическим стрессорам. Полученные данные в дальнейшем могут быть полезны при создании растений, устойчивых к неблагоприятным внешним факторам, с применением генно-инженерных подходов.

Апробация работы. Результаты исследований по теме диссертации были представлены на III Всероссийском симпозиуме «Физиология трансгенного растения и фундаментальные основы биобезопасности» (Москва, 2010), VII Съезде Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» и Международной научной школе «Инновации в биологии для развития биоиндустрии сельскохозяйственной продукции» (Нижний Новгород, 2011), Международной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Томск, 2011), Plant Biology Congress 2012 (Фрайбург, Германия, 2012), II(X) Международной Ботанической конференции молодых ученых (Санкт-Петербург, 2012), Международной конференции студентов, аспирантов, молодых ученых «Ломоносов 2013» (Москва, 2013).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, из которых 2 – статьи в рецензируемых журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их

обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 118 страницах машинописного текста, содержит 5 таблиц и 28 рисунков; список литературы включает 228 наименований, из которых 220 – на иностранном языке.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследований являлись растения дикого типа *Arabidopsis thaliana* экотипа Columbia-0 и инсерционный мутант *A. thaliana* по гену *At4g01870*.

Условия выращивания растений. Растения выращивались в климатической камере при +23⁰С, интенсивности освещения 100 мкмоль квантов/(м·с) и фотопериоде 16 ч – день, 8 ч – ночь в почве, смешанной с перлитом, либо в стерильных условиях на агаризованной среде ½ Мурасиге-Скуга. Перед посадкой семена стратифицировали в течение 3 суток при +4⁰С, возраст растений определяли в сутках с момента прорастания. Для проведения экспериментов по изучению экспрессии гена *At4g01870* в условиях абиотических стрессов и при обработке гормоном растения выращивали до возраста 7 дней, после чего проростки переносили на свежую среду, содержащую АБК (10⁻⁷ М) или NaCl (100 мМ), либо выращивали при +4⁰С.

Морфофизиологический анализ мутантных растений. Анализировали следующие морфофизиологические показатели: скорость прорастания семян, продолжительность основных стадий жизненного цикла, диаметр розетки, количество листьев на растение, длина корней, длина цветоноса, количество стручков на растение. Также оценивали прорастание семян, рост гипокотилей и удлинение корней мутантных растений в присутствии АБК (10⁻⁵, 10⁻⁶ и 10⁻⁷ М).

Выделение ДНК из растительных тканей и ПЦР проводили в соответствии с (Маниатис и др., 1984).

Выделение суммарной РНК проводили с помощью TRIZOL (Life Technologies, www.lifetechnologies.com). Качество РНК оценивали спектрофотометрически по соотношению показателей OD_{260/280} и OD_{260/230}, а также с помощью электрофореза в агарозном геле в денатурирующих условиях.

Содержание транскриптов определяли с помощью ПЦР после обратной транскрипции. Синтез кДНК осуществляли согласно рекомендациям фирмы-производителя (Fermentas).

Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот проводили в агарозном геле в соответствии с (Маниатис и др., 1984). Результаты визуализировали с помощью сканирования гелей на Phosphoimager Typhoon Trio+ (GE HealthCare, США).

Выделение суммарного белка из растений *A. thaliana* проводили с использованием экстракционного буфера, содержащего 100 мМ NaCl, 50 мМ трис-HCl (pH 7.4), 1 мМ ФМСФ и 2 мМ βМЕ. Концентрацию белка определяли методом с использованием бицинхониновой кислоты (Stoscheck, 1990).

Электрофоретическое разделение белков проводили в 10% ПАА-геле согласно (Laemmli, 1970), разделение белковых комплексов в нативных условиях осуществляли в градиенте плотности ПААГ в соответствии с системой Орнштейна-Дэвиса (Davis, 1964, Ornstein, 1964).

Иммунизацию кролика и получение поликлональных антител против полноразмерного рекомбинантного белка проводили в соответствии с (Егоров, 1991). Выделение IgG из полученной сыворотки осуществляли на ProteinG-Sepharose (Sigma-Aldrich, США). Фракцию специфических к At4g01870 IgG выделяли с использованием CNBr-активированной сефарозы 4В (Sigma-Aldrich, США), конъюгированной с очищенным рекомбинантным белком.

Вестерн-блот проводили согласно Timmons and Dunbar (1990), содержание белка At4g01870 анализировали с помощью первичных поликлональных антител против At4g01870 и вторичных коммерческих антител, конъюгированных с флуоресцентным красителем (Медгамал, Россия). Полученные результаты визуализировали посредством сканирования мембран на Phosphoimager Typhoon Trio+ (GE Healthcare, США).

Иммуноферментный анализ проводили в соответствии с (Егоров, 1991).

Выделение протопластов из суспензионной культуры клеток *A. thaliana* осуществляли согласно (Cocking, 1960).

Трансформацию протопластов проводили в соответствии с (Chen et al., 2006).

Флуоресцентная микроскопия. Использовали люминесцентный микроскоп Karl Zeiss (Германия). Для детекции GFP использовали эмиссионный фильтр 508 нм, для детекции автофлуоресценции протопластов - 560 нм.

Биоинформационные методы. Последовательность гена и используемых векторов были получены из базы данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Подбор праймеров, поиск открытых рамок считывания и их трансляцию, а также моделирование экспрессионных векторных конструкций осуществляли с помощью программы VectorNTI (Invitrogen). Поиск РНК-связывающих последовательностей осуществляли с использованием Интернет-ресурса www.bioinfo.ggc.org. Изучение доменной структуры белка, определение его внутриклеточной локализации и физико-химических характеристик проводили с помощью Интернет-ресурса EXPASY (www.expasy.org). Предсказание третичной структуры белка проводили с помощью веб-сервера Phyre2 (www.sbg.bio.ic.ac.uk), для сравнительного анализа пространственных структур белков использовали сервер iРВА (www.dsimb.inserm.fr).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Биоинформационный анализ. Было показано, что в геноме *A. thaliana* ген *At4g01870* представлен одной копией и не содержит интронов. Размер гена составляет 2071 п.о., длина кодирующей области – 1956 п.о. (www.ncbi.nlm.nih.gov). Нуклеотидная последовательность гена была транслирована с помощью программы VectorNTI, размер белка составлял 652 а.о., его молекулярный вес – 72,81 кДа. Анализ профиля гидропатии *At4g01870* (Kyte, Doolittle, 1982) показал, что исследуемый белок не содержит гидрофобных регионов и характеризуется как растворимый. Кроме того, было обнаружено, что *At4g01870* не содержит последовательности сигнального пептида, биоинформационный анализ показал вероятность (80%) цитоплазматической локализации изучаемого белка (www.expasy.org), что согласуется с полученными экспериментальными данными.

Было также показано, что для белка At4g01870 высока вероятность фосфорилирования и N-ацилирования (www.exrasy.org), важнейших биохимических реакций, влияющих на структуру белка, функциональную активность и способность взаимодействовать с другими белками.

Показано, что At4g01870 содержит TolB-домены, характерные для бактериальных белков, являющихся частью Tol-Pal системы и вовлеченных в поддержание целостности внешней мембраны и транспорт токсинов белковой природы – колицинов (Cao Z., Klebba, 2002; Walburger, 2002). Кроме того, белок содержит N-концевой домен DPPIV – сериновой экзопептидазы человека, вовлеченной в иммунную регуляцию, передачу сигналов и апоптоз.

2. Получение полноразмерного рекомбинантного белка и поликлональных антител к нему. С целью получения поликлональных антител к белку At4g01870 и изучения его свойств была создана экспрессионная конструкция на основе вектора pQE32 (Qiagen), содержащая полную последовательность гена и последовательность 6×His, необходимую для последующей очистки рекомбинантного полипептида от бактериальных белков.

Рекомбинантный белок был получен с помощью гетерологической системы экспрессии в клетках *E. coli* (штамм M15). Очистку белка проводили на Ni-NTA сефарозе (Qiagen) в нативных условиях. Молекулярный вес полученного белкового продукта гена At4g01870 составлял около 72 кДа, что соответствовало расчетному (рис. 1).

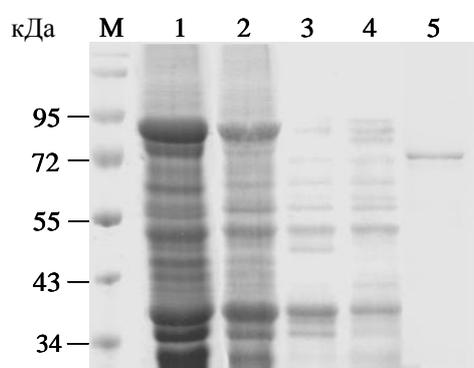


Рис. 1. ДСН-ПААГ фракций после хроматографической очистки рекомбинантного белка на Ni-NTA сефарозе: М – маркер, 1 – неочищенный лизат, 2 – фракция несвязавшегося со смолой белка, 3,4 – отмывка, 5 – элюция.

Были получены поликлональные антитела против At4g01870 с помощью иммунизации кроликов. С применением аффинной хроматографии была выделена фракция IgG, специфически взаимодействующая с белком At4g01870.

3. Экспрессии гена *At4g01870* у растений *A. thaliana*. Изучение экспрессии гена на уровне мРНК проводили с помощью метода ОТ-ПЦР, на уровне белка – вестерн-блот анализа с полученными антителами против At4g01870.

С целью изучения динамики содержания мРНК и белка у растений *A. thaliana* в онтогенезе суммарные РНК и белок выделяли из листьев 1, 2, 3, 4 и 5-недельных растений *A. thaliana*. Было показано, что на уровне мРНК у растений в изучаемом возрастном диапазоне экспрессия гена *At4g01870* не изменяется. Также не было обнаружено достоверных отличий в содержании белка At4g01870 (рис. 2а).

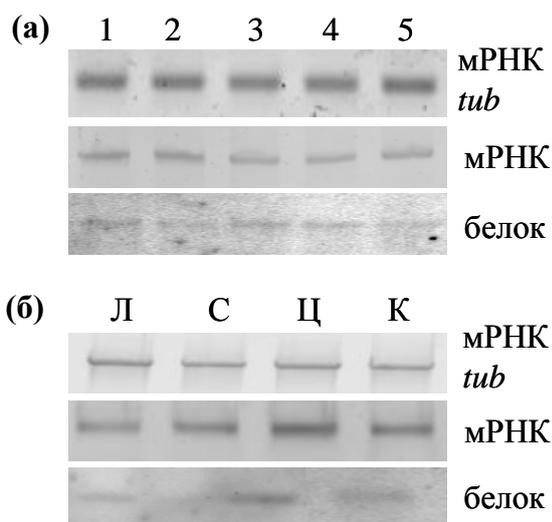


Рис. 2. Экспрессия гена *At4g01870*: **а** – динамика накопления мРНК и белка, кодируемых геном *At4g01870*, в онтогенезе, где 1-5 – возраст растений, недели; **б** – распределение мРНК и белка *At4g01870* в различных органах *A. thaliana*: Л – лист, С – стебель, Ц – цветок, К – корень.

Для изучения экспрессии гена *At4g01870* в различных органах *A. thaliana* суммарные РНК и белок выделяли из листьев, стеблей, цветков и корней 4-недельных растений, выращенных в почве. Было обнаружено, что мРНК и белок преимущественно накапливались в корнях и цветках, их содержание в листьях и стебле было значительно ниже (рис. 2б). Вполне вероятно, что подобное распределение продуктов гена *At4g01870* может быть связано с возможным участием белка At4g01870 в регуляции процессов, связанных с ростом и развитием растений.

В экспериментах по изучению суточной динамики накопления мРНК и белка, кодируемых геном *At4g01870*, использовали 7-дневные проростки *A. thaliana*. Расте-

ния выращивали в стерильных условиях в течение 16 ч на свету при +22⁰С, после чего в одном случае растения в течение 8 ч находились в темноте при той же температуре

(контроль), в другом – темновой период проходил при +12⁰С.

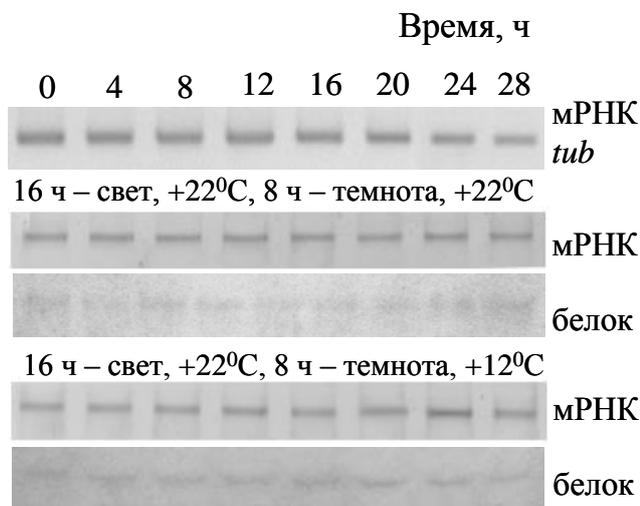


Рис. 3. Суточная динамика содержания мРНК и белка, кодируемых геном *At4g01870*.

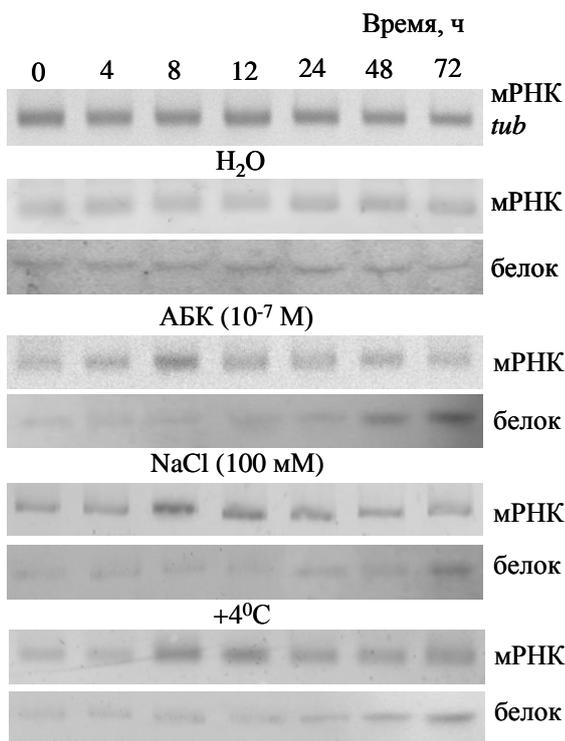


Рис. 4. Влияние АБК и абиотических стрессов (засоление, гипотермия) на экспрессию гена *At4g01870* у 7-дневных проростков *A. thaliana*.

Было обнаружено, что на уровне белка в обоих вариантах изменений не наблюдалось. Содержание мРНК незначительно повышалось после 8 ч инкубации растений в темноте, после чего возвращалось к исходному уровню у контрольных растений. При сочетании темноты и пониженной температуры наблюдалась сходная тенденция, однако в этом случае содержание транскриптов было выше, чем в первом (рис. 3), действие пониженной температуры приводило к активации экспрессии гена *At4g01870*.

При обработке растений абсцизовой кислотой наблюдалось повышение содержания транскриптов гена *At4g01870*, которое достигало максимального значения спустя 8 ч инкубации, а затем постепенно снижалось. Однако в течение первых 24 ч инкубации растений на АБК-содержащей среде изменений содержания белка не происходило. Белок

начинал накапливаться на вторые сутки после обработки гормоном, и его накопление продолжалось до 72 ч (рис. 4).

В условиях засоления и при действии пониженной температуры также наблюдалась сходная тенденция – содержание мРНК увеличивалось спустя 8 ч после начала действия стрессоров и затем возвращалось к исходному уровню. Аккумуляция белка происходила только на вторые сутки у растений в условиях засоления и на третьи – при действии пониженной температуры (рис. 4).

4. АБК-связывающие свойства белка At4g01870. Для изучения способности At4g01870 связывать АБК использовали два подхода – аффинную хроматографию и иммуноферментный анализ (ИФА). Полученный с помощью экспрессии в клетках *E. coli* полноразмерный очищенный рекомбинантный белок был нанесен на колонку, содержащую АБК-сефарозу. После инкубации смолу промывали 20 мМ ФСБ, после чего проводили элюцию 0,2 М NaOH. Все полученные фракции наносили в лунки полистеролового планшета для проведения прямого ИФА с антиидиотипическими антителами против АБК (АТа-и против АБК), узнающими белки, которые способны связывать АБК. В качестве отрицательного контроля использовали неиммунную сыворотку.

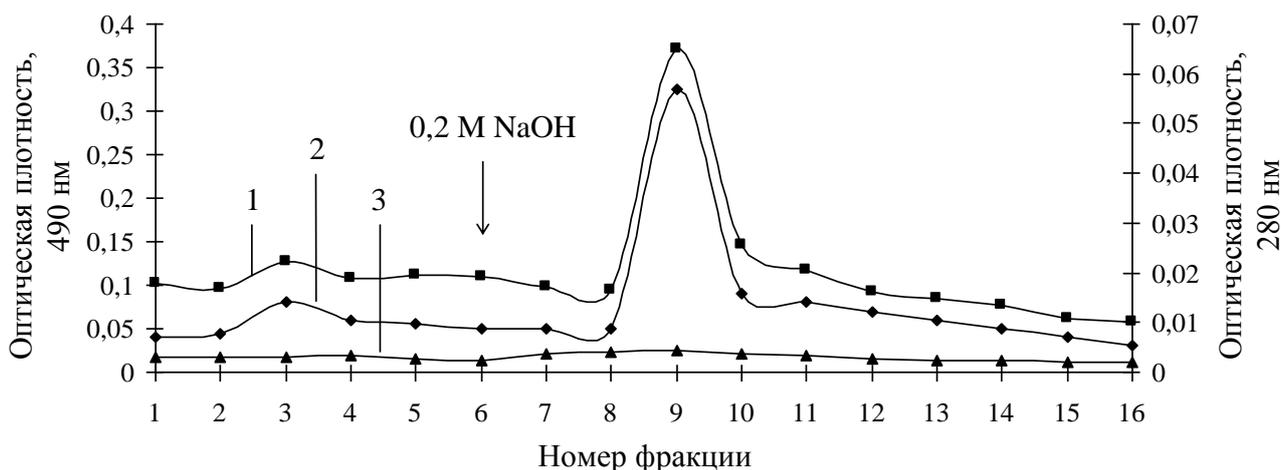


Рис. 5. АБК-связывающие свойства белка At4g01870. Аффинная хроматография и иммуноферментный анализ с использованием АТа-и против АБК. 1 – АТа-и против АБК, 2 – профиль элюции, ОП 280 нм, 3 – неиммунная сыворотка. Левая ось ординат: результаты ИФА с АТа-и к АБК (ОП 490 нм). Правая ось ординат: профиль элюции с АБК-сефарозы (ОП 280 нм). Ось абсцисс: номера фракций, собранных после проведения аффинной хроматографии. 1 – 6 фракции – промывка смолы 20 мМ фосфатным буфером (рН 7.2), 7 – 16 фракции – элюция 0.2 М NaOH.

ку. Белок, связавшийся с АБК-сефарозой, элюировался щелочью практически в одной фракции и узнавался АТа-и против АБК (рис. 5), что говорит об его обратимом связывании с АБК. Неиммунная сыворотка не взаимодействовала с элюированным с колонки белком. Полученный результат говорит о том, что происходило специфичное связывание АБК с белком.

Специфичность связывания рекомбинантного белка с АБК доказывали также экспериментами с использованием конкурентной системы ИФА.

Очищенный рекомбинантный белок был иммобилизован на планшете, к нему добавляли АТа-и против АБК и свободный гормон в разных концентрациях – от 10^{-7} до 10^{-5} М. АТа-и и АБК конкурировали за связывание с иммобилизованным на план-

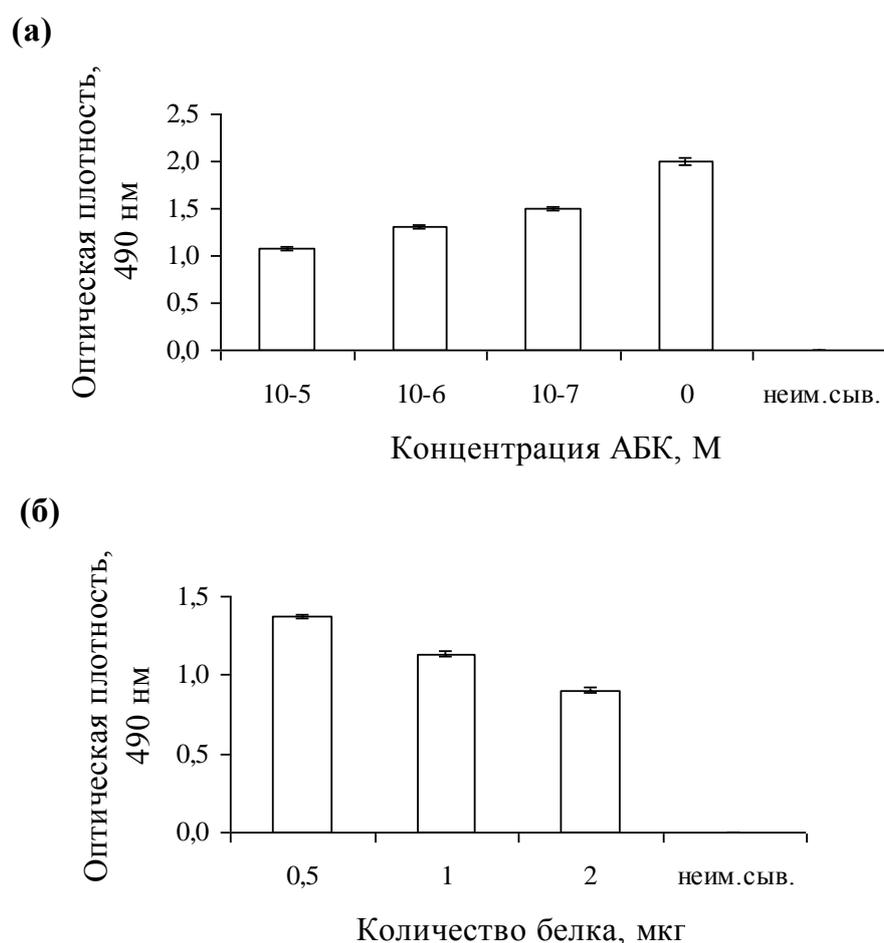


Рис. 6. АБК-связывающие свойства белка At4g01870. Конкурентная система вытеснения: **а** – белок сорбирован на планшете для ИФА, за взаимодействие с ним конкурируют АТа-и против АБК и абсцизовая кислота; **б** – комплекс АБК-овальбумин сорбирован на планшете, за связывание с АБК конкурируют рекомбинантный белок At4g01870 с антителами против АБК.

жете белком. На это указывает уменьшение взаимодействия белка с АТа-и против АБК в присутствии АБК, причем это уменьшение было пропорционально концентрации гормона, что говорит о специфичности связывания белка с АБК (рис. 6а).

В другой постановке эксперимента с иммобилизованной на планшете АБК, связанной с овальбумином, взаимодействовали антитела против АБК и рекомбинантный белок At4g01870, очищенный на Ni-NTA сефарозе (рис. 6б). Увеличение количества белка от 0,5 до 2 мкг вызывало уменьшение взаимодействия антител с АБК вследствие конкурентного взаимодействия АБК с белком, и степень уменьшения этого взаимодействия зависела от концентрации белка. Это также подтверждает специфичность взаимодействия белка и АБК. Полученные результаты свидетельствуют о том, что белок At4g01870 является АБК-связывающим.

5. Локализация АБК-связывающего сайта белка At4g01870. Были получены N-, C-концевые и центральная области белка (18, 17 и 38 кДа соответственно) с помощью гетерологической системы экспрессии в клетках *E. coli*. Положение сайта связывания белка с гормоном определяли с помощью вестерн-блот анализа с АТа-и против АБК. Было показано, что антитела взаимодействуют только с N-концевой областью белка, при этом положительных сигналов в вариантах, соответствующих C-концевому и центральному регионам не наблюдалось. В вариантах с отрицательными контролями, в качестве которых использовали неиммунную сыворотку и АТа-и против зеатина, также взаимодействие с полипептидами обнаружено не было (рис. 7), что доказывает специфичность связывания АТа-и против АБК с N-концевой областью



Рис. 7. Определение положения АБК-связывающего сайта белка At4g01870. Вестерн-блот анализ с АТа-и против АБК: 1 - N-концевая область белка, 2 – центральная область белка, 3 – C-концевая область белка.

белка и позволяет сделать вывод о том, что за связывание белка с АБК отвечает N-концевая область.

6. Пространственная модель белка At4g01870. Предсказание третичной структуры белка At4g01870 проводили с помощью гомологического моделирования на основе множественного выравнивания с использованием сервера Phyre2 (www.sbg.bio.ic.ac.uk).

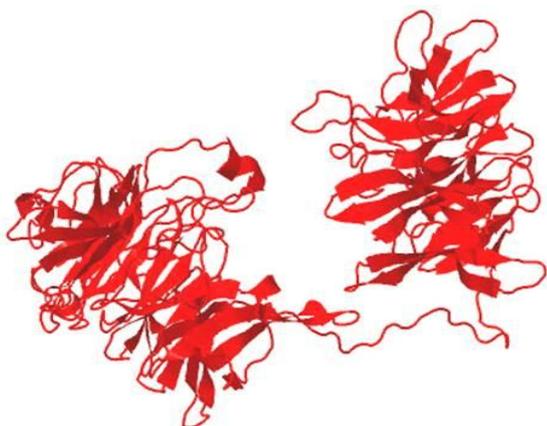


Рис. 8. Пространственная структура At4g01870.

Модель At4g01870 была построена для 93% аминокислотных остатков белка с достоверностью предсказания 90% и представляла собой структуру, подобную двум шестилопастным β -пропеллерам, образованным N- и C-концевыми областями белка, соединенных центральным регионом (рис. 8).

7. Сравнительный анализ пространственных структур At4g01870 и АБК-связывающих белков - PYR1, FCA и CHLH *in silico*. Для выяснения того, является ли At4g01870 новым АБК-связывающим белком, не имеющим сходства с известными АБК-связывающими белками, был проведен биоинформационный анализ по сравнению пространственных структур At4g01870 и одного из белков – рецепторов АБК PYR1, а также РНК-связывающего белка FCA и Н-субъединицы Mg- хелатазы CHLH, для которых ранее было продемонстрировано наличие АБК-связывающих свойств.

Данные о структуре рецептора АБК PYR1 были получены из Protein Data Base (PDB code 3k90). В связи с тем, что для других АБК-связывающих белков, выбранных для анализа, кристаллографические работы не проводились, и в PDB отсутствует информация об их структурах, для FCA и CHLH были спроектированы модели их белковых молекул. Сравнительный анализ третичных структур белков проводили с помощью сервера iPVA (www.dsimb.inserm.fr). Применяемый подход основан на сравнении локальных конформаций двух белков, структурно сходные участки оцениваются с помощью выравнивания их структур. На основании полученных данных по срав-

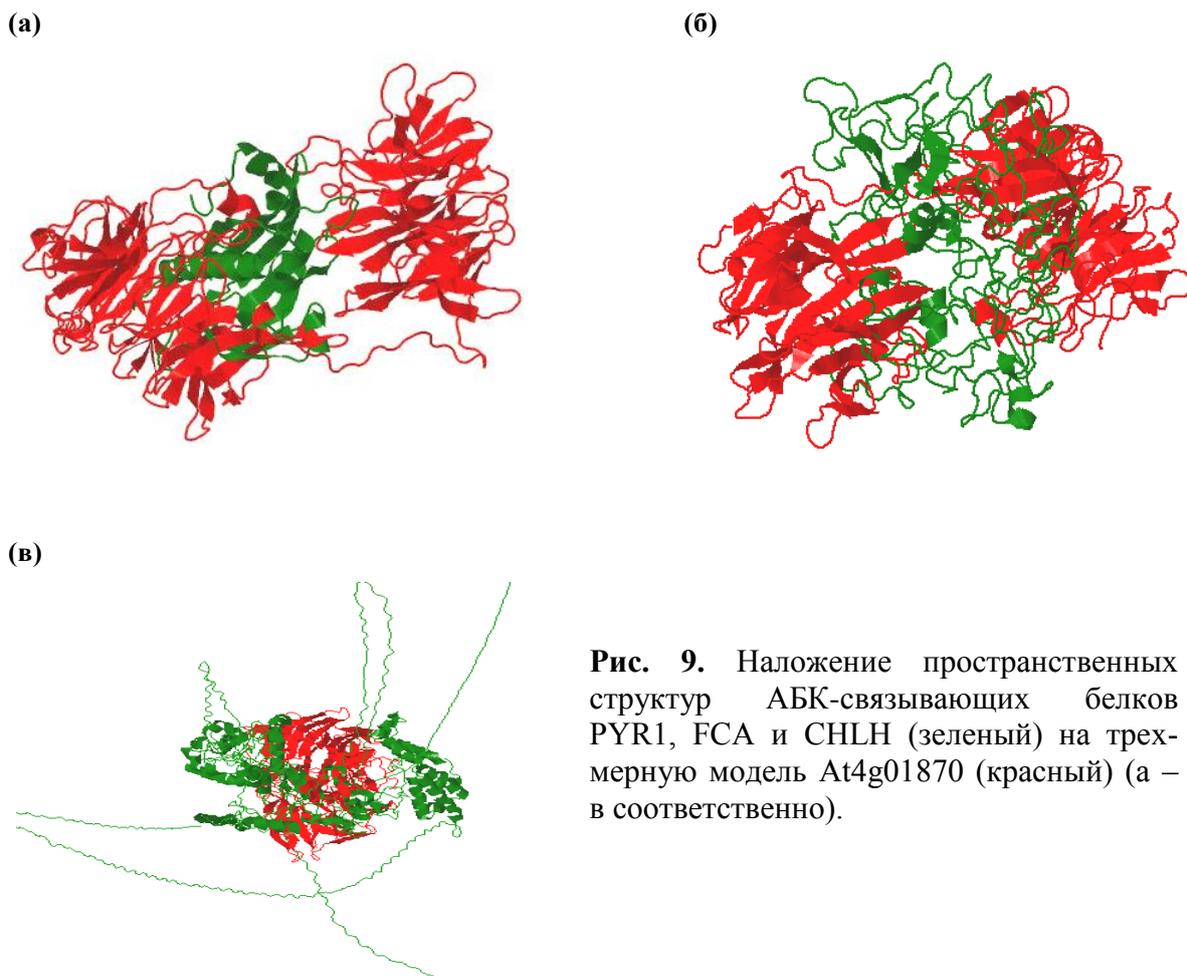


Рис. 9. Наложение пространственных структур АБК-связывающих белков PYR1, FCA и CHLH (зеленый) на трехмерную модель At4g01870 (красный) (а – в соответственно).

нению структур At4g01870 и PYR1, FCA, CHLH можно заключить, что At4g01870 не имеет структурного сходства с этими АБК-связывающими белками (рис. 9) и является новым, уникальным АБК-связывающим белком.

8. Морфофизиологические характеристики инсерционного мутанта по гену *At4g01870*. Семена растений, несущих вставку Т-ДНК в гене *At4g01870*, были получены из банка семян ABRC (США). Были отобраны растения, гомозиготные по вставке, отбор чистых линий мутантных растений проводили с помощью ПЦР с использованием праймеров, приходящихся на область гена, зону слияния Т-ДНК и гена, а также на область Т-ДНК.

Анализ растений показал, что инсерционный мутант не имеет фенотипических нарушений и не отличается от растений дикого типа в росте и развитии. В биологических тестах по изучению определяемых АБК физиологических ответов, таких как удлинение корней, рост гипокотилей и прорастание семян, достоверных отличий в ре-

акции на АБК у мутантных и контрольных растений также обнаружено не было, что делает маловероятным участие белка At4g01870 в передаче сигнала АБК. Однако наличие еще двух генов-гомологов At4g01870 у *A. thaliana* – At1g21670 и At1g21680, белковые продукты которых, возможно, выполняют сходную функцию, может вызывать компенсаторный эффект, чем и может быть объяснено отсутствие различий у контрольных и мутантных растений.

9. РНК-связывающие свойства белка At4g01870. Биоинформационный анализ позволил выявить в аминокислотной последовательности At4g01870 области, потенциально способные связываться с РНК. Наличие РНК-связывающих свойств у белка At4g01870 доказывали с помощью аффинной хроматографии и метода с применением вестерн-блота. Суммарную РНК *A. thaliana* (10 мг) иммобилизовали на 1 мл CNBr-активированной 4В-сефарозы (Sigma-Aldrich, США). Очищенный рекомбинантный белок At4g01870 инкубировали с «пришитой» к смоле РНК в течение ночи при +4⁰С и постоянном перемешивании, после чего колонку трижды промывали 5 объемами 20 мМ фосфатного буфера (рН 7.2) и проводили элюцию 1 объемом 1 М NaCl. Полученные фракции были проанализированы с помощью электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях (рис. 10а). При этом было обнаружено, что ре-

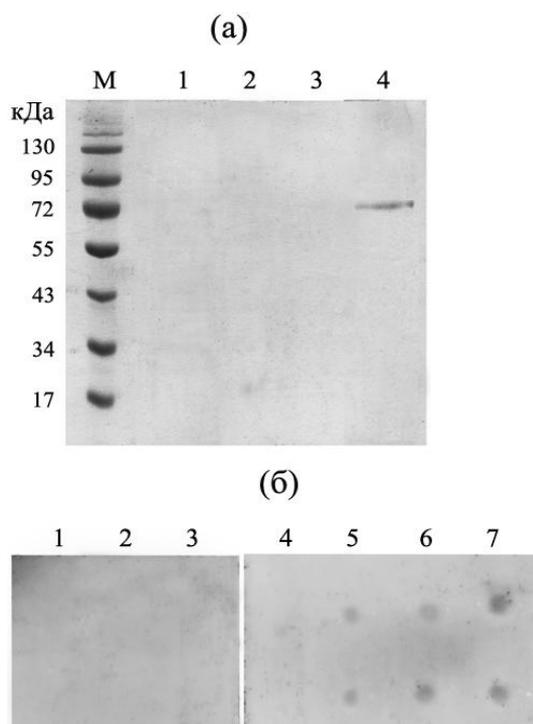


Рис. 10. РНК-связывающие свойства белка At4g01870: **а** – ДСН-ПААГ фракций белка, собранных после аффинной хроматографии на РНК-сефарозе: М – маркер, 1 – фракция несвязавшегося с РНК белка, 2, 3 – отмывка, 4 – элюция; **б** – вестерн-блот анализ после проведения реакции связывания рекомбинантного белка At4g01870 с суммарной РНК, выделенной из листьев *A. thaliana*: 1 – К- (отрицательный контроль) ДНК, выделенная из листьев арабидопсис, 2 – К-ТРНК дрожжей, 3 – К- овальбумин, 4 – 7 – суммарная РНК *A. thaliana* – 1, 5, 10, 20 мкг соответственно.

комбинантный белок связывается с РНК.

Для подтверждения этого результата был применен другой подход. Суммарную РНК *A. thaliana* наносили на нитроцеллюлозную мембрану в количестве 1, 5, 10 и 20 мкг, мембрану инкубировали с очищенным рекомбинантным белком в буфере, содержащем 20 мМ Трис (рН 7.4), 50 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT и 100 мкг/мл овальбумин, затем трижды промывали тем же буфером и проводили вестерн-блот анализ с поликлональными антителами против At4g01870. В качестве контролей использовали ДНК *A. thaliana*, тРНК дрожжей (*Serva*) и овальбумин. Для дополнительного контроля специфичности связывания мембрана с нанесенной РНК была проинкубирована непосредственно с антителами без инкубации с белком. Положительные сигналы наблюдались только в вариантах, соответствующих РНК *A. thaliana*, что доказывает специфичность связывания белка с РНК (рис. 10б), в совокупности полученные результаты свидетельствуют о наличии у белка At4g01870 РНК-связывающих свойств.

10. Способность белка At4g01870 к комплексообразованию изучали с помощью вестерн-блот анализа с антителами против At4g01870 после электрофоретического разделения белковых комплексов в нативных условиях.

Было показано, что антитела взаимодействуют с белковым продуктом, молекулярный вес которого составляет около 72 кДа, что соответствует мономерной форме белка At4g01870 (рис. 11).

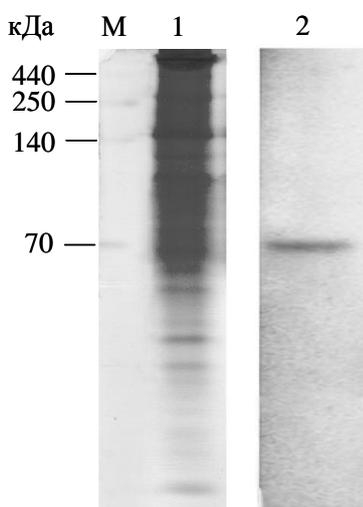


Рис. 11. Способность белка At4g01870 к образованию белкового комплекса: М – маркер, 1 – растворимая фракция суммарного белка *A. thaliana*, ПАА-гель (5 – 15%), окрашенный Coomassie-R250, после электрофоретического разделения белковых комплексов в нативных условиях (система Орнштейна-Дэвиса), 2 – вестерн-блот с антителами против At4g01870 после электрофоретического разделения белковых комплексов в нативных условиях.

В связи с наличием у белка АБК-связывающих свойств и АБК-регулируемой природой кодирующего его гена было предположено, что АБК может являться фактором, необходимым для формирования белкового комплекса.

Для выяснения этого в эксперимент были включены образцы белка, выделенные из предварительно обработанных гормоном растений *A. thaliana*. При этом, однако, наблюдалось только количественное изменение содержания белка в ответ на обработку растений АБК, в выбранных условиях проведения эксперимента сборки комплекса не происходило (рис. 12).

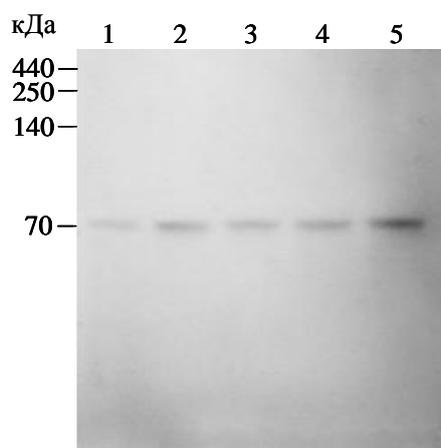


Рис. 12. Влияние АБК на способность белка At4g01870 к образованию белкового комплекса: 1 – контроль - без обработки растений АБК, 2-5 – 8, 24, 48 и 72 ч инкубации 7-дневных растений *A. thaliana* на АБК-содержащей среде (10^{-7} М) соответственно.

11. Внутриклеточная локализация белка At4g01870. Была получена экспрессионная конструкция на основе вектора pCX-DG серии Zebata, содержащая последовательности генов *At4g01870* и *GFP*, которую использовали для транзientной трансформации этиолированных протопластов, выделенных из суспензии клеток *A. thali-*

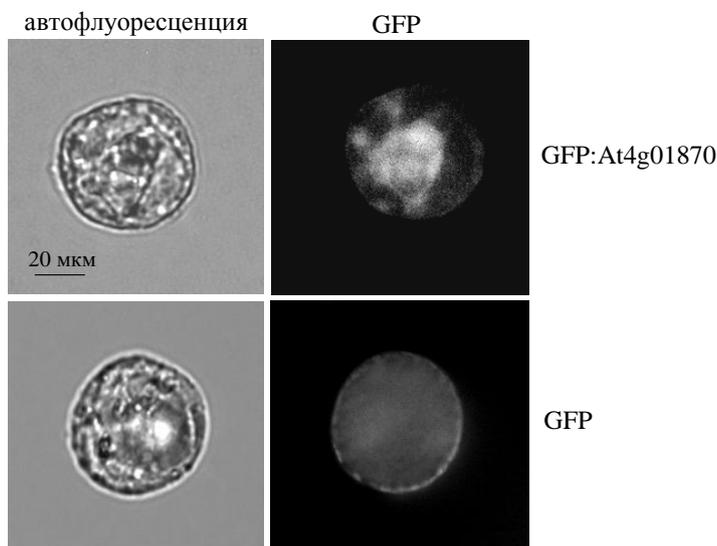


Рис. 13. Внутриклеточная локализация белка At4g01870.

ana. Визуализацию результатов проводили с помощью флуоресцентной микроскопии. Было обнаружено, что белок At4g01870 преимущественно локализован в цитоплазме клетки (рис. 13). Результаты проведенного биоинформационного анализа подтверждают полученные экспериментальные данные, отсутствие в последовательности белка сигнального пептида и трансмембранных регионов также свидетельствуют о цитоплазматической локализации At4g01870.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе впервые охарактеризован неизвестный ранее белок At4g01870 *A. thaliana*, кодируемый геном-гомологом АБК-регулируемого *AA1* (*L. luteus*). С применением гетерологичной системы экспрессии в клетках *E. coli* был получен полноразмерный рекомбинантный белок *At4g01870* и высокоспецифические поликлональные антитела к нему.

Было обнаружено, что экспрессия гена *At4g01870* положительно регулируется абсцизовой кислотой и индуцируется абиотическими стрессорами (гипотермия, засоление) как на уровне мРНК, так и белка.

Показано, что белок At4g01870 способен связываться с АБК *in vitro*. С применением аффинной хроматографии, а также прямой и конкурентной систем ИФА было продемонстрировано, что At4g01870 обратимо и специфически взаимодействует с АБК, причем за связывание с гормоном отвечает его N-концевая область. С применением биоинформационных подходов была предсказана третичная структура белка At4g01870. Сравнительный анализ пространственных моделей At4g01870 и АБК-связывающих белков PYR1, FCA и CHLH показал, что At4g01870 не имеет структурного сходства с этими белками, на основании чего было сделано заключение о том, что At4g01870 является новым, уникальным АБК-связывающим белком.

АБК-регулируемая природа гена *At4g01870* и наличие у кодируемого им белка АБК-связывающих свойств позволяет предполагать возможное участие At4g01870 в сигналинге гормона. Однако поздняя аккумуляция белка при действии экзогенной АБК и стрессовых факторов, в ответе на которые принимает участие гормон, а также

отсутствие различий у инсерционного мутанта по гену *At4g01870* и растений дикого типа в реакциях на АБК делают маловероятным участие белка, по крайней мере, в первых этапах передачи гормонального сигнала. В то же время важно отметить, что фенотипическое проявление инактивации гена *At4g01870* может маскироваться присутствием у *A. thaliana* двух других гомологов – *At1g21670* и *At1g21680* при условии, что белковые продукты этих генов выполняют сходные с *At4g01870* функции. По-видимому, *At4g01870* вовлечен в формирование ответных реакций растений на действие абиотических стрессоров.

Было продемонстрировано, что белок *At4g01870* способен связываться с РНК. С помощью двух различных подходов было доказано специфическое взаимодействие *At4g01870* с суммарной РНК *A. thaliana*, что дает основание для предположения о возможном участии *At4g01870* в регуляции пост-транскрипционного метаболизма РНК в качестве РСБ.

Обнаружено, что белок *At4g01870* локализован в цитозоле клетки и функционирует в форме мономера. Кроме того, показано, что АБК не является фактором, необходимым для сборки белкового комплекса, в выбранных условиях проведения эксперимента, вероятно, взаимодействие белка с АБК требуется для иного проявления его функциональной активности.

На основании приведенных в данной работе результатов можно заключить, что белок, кодируемый АБК-регулируемым геном *At4g01870*, участвует в пост-транскрипционном контроле экспрессии генов посредством регуляции метаболизма РНК и вовлечен в формирование ответных реакций растений на действие стрессовых факторов.

ВЫВОДЫ

1. Экспрессия гена *At4g01870* положительно регулируется АБК и индуцируется абиотическими стрессами. Активация экспрессии как на уровне мРНК, так и белка предполагает возможное участие продукта гена *At4g01870* в формировании ответных реакций на действие стрессоров, в ответе на которые принимает участие АБК

2. Белок At4g01870 способен специфически связывать АБК *in vitro*. Он является новым АБК-связывающим белком, поскольку не имеет структурного сходства с известными АБК-связывающими белками

3. Инактивация гена *At4g01870* у *A. thaliana* не приводила к морфофизиологическим нарушениям, мутанты не отличались по реакции на АБК от растений дикого типа, на основании чего можно предположить, что белок At4g01870, вероятно, не принимает участия в передаче сигнала АБК. Однако наличие еще двух генов-гомологов *At4g01870* у *A. thaliana* – *At1g21670* и *At1g21680*, белковые продукты которых, возможно, выполняют сходную функцию, может вызывать компенсаторный эффект

4. Наличие РНК-связывающих свойств у At4g01870 делает вероятным участие белка в регуляции пост-транскрипционного метаболизма РНК

5. Белок At4g01870 функционирует в цитоплазме клетки в форме мономера, АБК не влияет на его способность к комплексообразованию в выбранных условиях проведения эксперимента

6. Совокупность полученных данных позволяет заключить, что белок At4g01870, вероятно, принимает участие в пост-транскрипционном контроле экспрессии генов посредством регуляции метаболизма РНК и формировании ответных реакций растений на действие стрессовых факторов

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. **Барташевич Д.А.** Влияние теплового стресса на экспрессию генов пластома ячменя. Сборник тезисов 61-й студенческой научной конференции им. Н.И.Вавилова, Москва, 2008, с. 24.

2. Гущин В.А., Корнеева В.А., Филиппенко Е.В., **Барташевич Д.А.**, Кузьменков П.В., Зубкова Н.К. Мелафен – нанорегулятор роста, влияющий на интенсивность транскрипции генов пластома при деэтиоляции. Сборник тезисов 61-й студенческой научной конференции им. Н.И.Вавилова, Москва, 2008, с. 52.

3. **Барташевич Д.А.** Молекулярные механизмы адаптации хлоропластов к тепловому шоку: экспрессия генов пластома. Тезисы Международной конференции студентов, аспирантов, молодых ученых «Ломоносов 2008», Москва, 2008, с. 180.

4. **Барташевич Д.А.**, Демиденко А.В., Кузнецов В.В. Разработка гетерологической системы для экспрессии генов-гомологов *CIP2.1* из *A. thaliana* - *At4g01870* и *At1g21670* и получение полноразмерных белковых продуктов. Тезисы докладов III-го Всероссийского симпозиума «Физиология трансгенного растения и фундаментальные основы биобезопасности», Москва, 2010, с. 21.

5. **Барташевич Д.А.**, Демиденко А.В. Использование транзientной экспрессионной системы в листьях *Nicotiana tabacum* L. для экспрессии гомолога *CIP2.1* из *A. thaliana* (*At1g21670*). Материалы докладов VII Съезда Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» и Международной научной школы «Инновации в биологии для развития биоиндустрии сельскохозяйственной продукции», Нижний Новгород, 2011, ч. I, с. 77.

6. Ефимова М.В., Кравцов А.К., **Барташевич Д.А.**, Карначук Р.А., Ковтун И.С., Кузнецов В.В. Сравнительный анализ транскрипции хлоропластного генома *Arabidopsis thaliana* зависимости от эндогенного уровня брассиностероидов. Материалы докладов VII Съезда Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» и Международной научной школы «Инновации в биологии для развития биоиндустрии сельскохозяйственной продукции», Нижний Новгород, 2011, ч. I, с. 247.

7. Демиденко А.В., **Барташевич Д.А.** Продукты генов *At1g21670* и *At4g01870* *A. thaliana* – возможные участники передачи сигнала фитогормона АБК. Тезисы докладов Международной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Томск, 2011, с. 56.

8. Демиденко А.В., **Барташевич Д.А.** Продукты генов *At1g21670* и *At4g01870* *A. thaliana* – возможные участники передачи сигнала фитогормона АБК. Вестник ТГУ, 2011, № 3 (15), с. 143 – 146.

9. Ефимова М.В., Кузнецов В.В., Кравцов А.К., **Барташевич Д.А.**, Карначук Р.А., Ковтун И.С., Кузнецов Вл.В. Особенности экспрессии пластидного генома и развития растений *Arabidopsis thaliana* с нарушенным синтезом брассиностероидов. Физиология растений, 2012, т. 59, № 1, с. 1–8.

10. **D.Bartashevich**, N.Karavaiko, A.Demidenko, E.Pojidaeva, V.Kusnetsov. The study of ABA-binding proteins from *Arabidopsis thaliana* encoded by homologues of CIP2.1 gene from *Lupinus luteus*. Plant Biology Congress 2012 abstract book, Freiburg, Germany, 2012, p.760.

11. **Барташевич Д.А.**, Каравайко Н.Н., Кудрякова Н.В. Новые АБК-связывающие белки у *Arabidopsis thaliana*. Тезисы II(X) Международной Ботанической конференции молодых ученых, Санкт-Петербург, 2012, с. 57.

12. **Барташевич Д.А.** Выяснение роли АБК-связывающих белков, кодируемых генами-гомологами CIP2.1 из генома *Arabidopsis thaliana*, в ответе растений на стрессовое воздействие. Тезисы Международной конференции студентов, аспирантов, молодых ученых «Ломоносов 2013», Москва, 2013, с. 299.