

УДК 577.152.3

## ФРАГМЕНТ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК-ИНГИБИТОР ХИМОТРИПСИНА И ТРИПСИНА В КЛУБНЯХ КАРТОФЕЛЯ

© 2011 г. И. А. Парфёнов\*, Т. А. Ревина\*, П. П. Пашковский\*\*, Н. Л. Радюкина\*\*, Т. А. Валуева\*

\*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071

e-mail: valueva@inbi.ras.ru

\*\*Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276

Поступила в редакцию 15.11.2010 г.

Из генома картофеля (*Solanum tuberosum* L. сорт Юбилей Жукова) выделен продукт полимеразной цепной реакции, амплифицированный с геномной ДНК с использованием сконструированных праймеров, обозначенный как РКР1J-B. Установлена нуклеотидная последовательность РКР1J-B и восстановлена аминокислотная последовательность кодируемого им белка. Анализ этой последовательности позволил высказать предположение, что выделенный фрагмент гена кодирует белок-ингибитор химотрипсина и трипсина (РКС1-23, potato Kunitz-type chymotrypsin inhibitor), присутствующий в клубнях.

Клубни картофеля (*Solanum tuberosum* L.) содержат значительную группу водорастворимых белков, в состав которой входят ингибиторы протеолитических ферментов различных классов [1]. В ряде сортов европейской и японской селекции в их составе присутствуют белки с молекулярной массой 20–24 кДа, структурно родственные соевому ингибитору трипсина Кунитца, которые действуют на сериновые и цистеиновые протеиназы. Эти ингибиторы выделяются в подсемейство картофельных ингибиторов протеиназ Кунитца и обозначают РКР1 (potato Kunitz-type proteinase inhibitors) [2]. На основании строения N-концевых аминокислотных последовательностей белки РКР1 разделяют на пять структурных групп, три из которых, А, В и С, наиболее изучены [2]. Физиологические функции, которые осуществляют эти ингибиторы в растениях, и пути их экспрессии *in vivo*, окончательно еще не установлены. Однако показано, что белки РКР1 участвуют в защитной реакции растения при атаке фитопатогенными микроорганизмами, подавляя не только действие секретируемых ими протеиназ, но и их рост и развитие [3, 4].

К настоящему времени описано более ста нуклеотидных последовательностей (в большинстве, кДНК), кодирующих белки РКР1 в различных сортах картофеля как европейской, так и азиатской селекции (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Предполагают, что каждый сорт картофеля содержит свой уникальный набор таких генов, при этом в процессе селекции происходит непрерывная эволюция их последовательностей [5].

В нашей предыдущей работе [6] был детально охарактеризован белок РКС1-23, выделенный из клубней картофеля сорта Юбилей Жукова, выведенного в последние годы российскими селекционерами и районированного в средней полосе России. Бе-

лок РКС1-23 действовал не только как эффективный ингибитор химотрипсина и трипсина, но и подавлял рост мицелия двух фитопатогенов *Phytophthora infestans* Mont. de Bary и *Fusarium culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc., поражающих картофель. На основании структуры N-концевой аминокислотной последовательности белок РКС1-23 был отнесен к подсемейству РКР1 и локализован в структурной группе РКР1-B [6]. В эту группу объединены родственные белки, действующие как ингибиторы сериновых протеиназ клана химотрипсина [2, 5, 7].

Цель работы – выделение, секвенирование и анализ последовательности фрагмента гена, кодирующего белок РКС1-23 в клубнях картофеля.

### МЕТОДИКА

Тотальную ДНК картофеля (*Solanum tuberosum* L. сорт Юбилей Жукова) выделяли из двухнедельных проростков в соответствии с методом, описанным в работе [8]. Клубни проращивали во влажной камере при естественном освещении и комнатной температуре.

Для создания праймеров был проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей белков РКР1-B, опубликованных в работах [2, 5, 9, 10] и базе данных NCBI. С использованием программ Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и Vector NTI (<http://www.invitrogen.com>) были сконструированы прямой и обратный праймеры:

5'-(ACCTAGTGATGCTACTCCAGTACTTGACG)-3'

и

5'-(TCTACTGGACTTGGTTGAAGGAGACATC)-3'.

Содержание идентичных остатков (%) в нуклеотидной и аминокислотной последовательностях белков РКРІ-В

	Аминокислотная последовательность									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		89.1	93.3	86.5	93.8	90.7	94.3	94.8	91.7	89.1
2	92.6		92.2	91.7	90.2	90.2	90.2	91.2	91.2	86.8
3	96.2	94.5		90	96.8	96.4	97.4	97.3	95.9	91.7
4	90.7	94.8	92.9		90	90	90.2	91	91.4	88.2
5	96	94.3	98.5	92.6		93.7	96.9	98.2	95	93.3
6	95.2	94.5	97.3	92.8	96.7		94.8	94.6	98.6	89.1
7	96.3	93.4	98.6	92.3	98.5	97.3		93.2	95.9	97.4
8	96.6	94.8	98.9	93.1	96.1	97.1	99		95.9	93.2
9	95.4	95.2	97.9	93.4	97.3	98.8	97.6	97.7		90.6
10										
	Нуклеотидная последовательность									

1 – РКСІ-23, 2 – РКТІ-22, 3 – SІC1, 4 – gCDI-B1, 5 – P4D11, 6 – PI-2, 7 – PSPI-21-6.3, 8 – KPI B-k2, 9 – PIH5, 10 – PSPI-21-5.2.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли в амплификаторе Eppendorf Mastercycler personal (США). Реакционная среда (20 мкл) содержала: Taq-полимеразу (5 ед.), специфические праймеры (прямой и обратный) (по 20 пмоль), 20 мкг ДНК, 0.2 мМ дАТФ, 0.2 мМ дГТФ, 0.2 мМ дТТФ, 0.2 мМ дЦТФ, 60 мМ Трис-НСІ рН 8.5, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 25 мМ KCl, 10 мМ меркаптоэтанол, 0.1% Тритона X-100. ПЦР проводили при следующих условиях: 95° – 5 мин, затем 94° – 30 с, 58° – 30 с, 72° – 2 мин (30 циклов) и 72° – 5 мин.

Аmplифицированные фрагменты разделяли электрофорезом в 0.8%-ном геле агарозы и экстрагировали с помощью набора для экстракции ДНК (DNA Extraction Kit, “Fermentas”, Литва). В результате были получены ПЦР-продукты, предполагаемого размера около 550–600 н.п. Полученные фрагменты секвенировали в направлениях 5' и 3' с использованием указанных выше праймеров. Нуклеотидная последовательность продуктов ПЦР была установлена в научно-производственной компании “Синтол” (Москва).

Обработку результатов секвенирования, а также их анализ и выравнивание полученных последовательностей проводили, используя программы Unipro UGENE (<http://genome.unipro.ru/>) и Vector NTI AlignX.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате ПЦР из генома картофеля был выделен продукт, амплифицированный с геномной ДНК с использованием специфических праймеров, обо-

значенный как *PKPIJ-B*, который по данным электрофореза содержал 550–600 нуклеотидных пар (н.п.). Секвенирование этого продукта показало, что фрагмент *PKPIJ-B* состоит из 582 н.п.

Как уже упоминалось, белки РКРІ разделяют на три структурные группы: РКРІ-А, РКРІ-В и РКРІ-С [2]. Анализ 3'-участков генов, кодирующих белки всех трех структурных групп позволил предположить, что выделенный фрагмент гена кодирует белок, относящийся к группе РКРІ-В. На рис. 1 приведено сравнение нуклеотидных последовательностей выделенного фрагмента *PKPIJ-B* и генов, кодирующих белки РКРІ-В в шести сортах картофеля, которые представлены в базе NCBI Gene Bank Blast. Последовательность нуклеотидов в фрагменте *PKPIJ-B* характеризовалась высокой степенью сходства (от 95.2 до 96.6% идентичных н.п.) с генами *PKPI-B9* (AY693424), *PKPI-B10* (AF536175.1) [10], *PI-2* (AY166690) [9], *KPI B-k2* (DQ168333.1) [11], *PIH5* (AF492359), *P4D11* (AF4955584) и *SIC1* (AF492769) [5], которые были обнаружены в картофеле сортов Истринский, Elkana, Kuras, Provita и Saturna соответственно. Однако она значительно отличалась от последовательности *gCDI-B1* (Q41484) из сорта Dan-shaku, содержащей только 90.7% идентичных н.п. [2]. Оценка степени сходства последовательностей генов и полученного фрагмента *PKPIJ-B*, кодирующих белки РКРІ-В в картофеле семи сортов, показала, что они содержат от 89 до 99% идентичных н.п. (таблица). Оказалось, что наиболее варибельные фрагменты последовательностей расположены в 5'-концевой части молекул. Анализируя положения замен нуклеотидов в этих последовательностях, можно сделать заключение, что они локализируются в од-

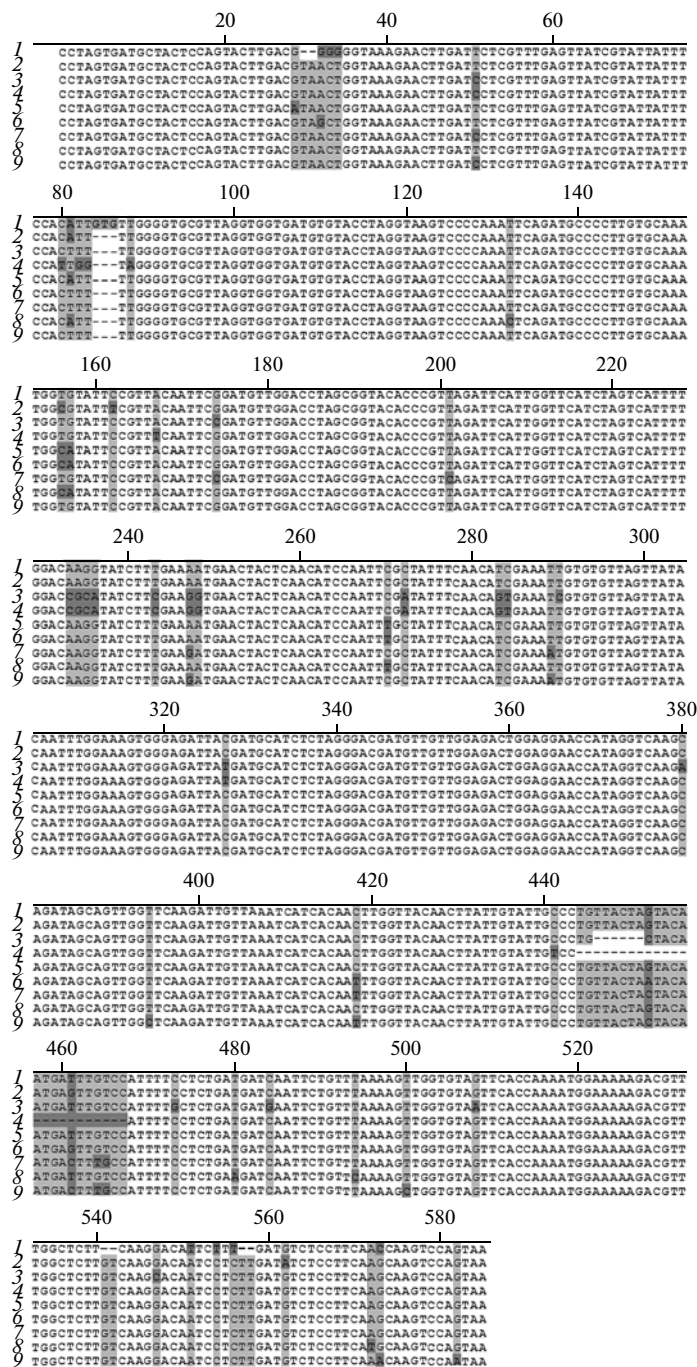
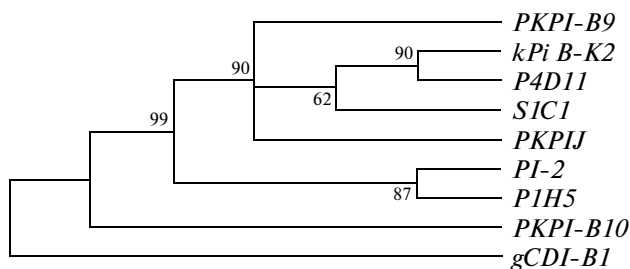


Рис. 1. Сравнение нуклеотидной последовательности, кодирующей белка РКPI-B в различных сортах картофеля. 1 – PKPIJ (данная работа), 2 и 3 PKPI-B9 и PKPI-B10 [10], 4 – gCDI-B1 [2], 5 – KPi B-k2 [11], 6, 7 и 8 – SIC1, PIH5, и P4D11 [5], 9 – PI-2 [9]. Варибельные участки окрашены серым цветом, единичные замены нуклеотидов выделены темно-серым.

них и тех же участках. Весьма вероятно, что в этих участках и происходили рекомбинации. На рис. 2 приведено филогенетическое дерево, построенное по принципу максимального подобия с помощью программ PhyML 3.0 aLRT (<http://www.phylogeny.fr/>) и MEGA 4. Видно, что сорта японской и европейской (в том числе российской) селекции находятся на разных ветвях “дерева”, что соответствует гипоте-

зе, предложенной в работе [5], о высокой внутри и межсортовой варибельности белков РКPI. Действительно, замены в нуклеотидных последовательностях могут приводить к полиморфизму аллелей одного и того же генного локуса в геноме тетраплоидного картофеля.

На основании нуклеотидной последовательности выделенного фрагмента гена PKPIJ-B была вос-

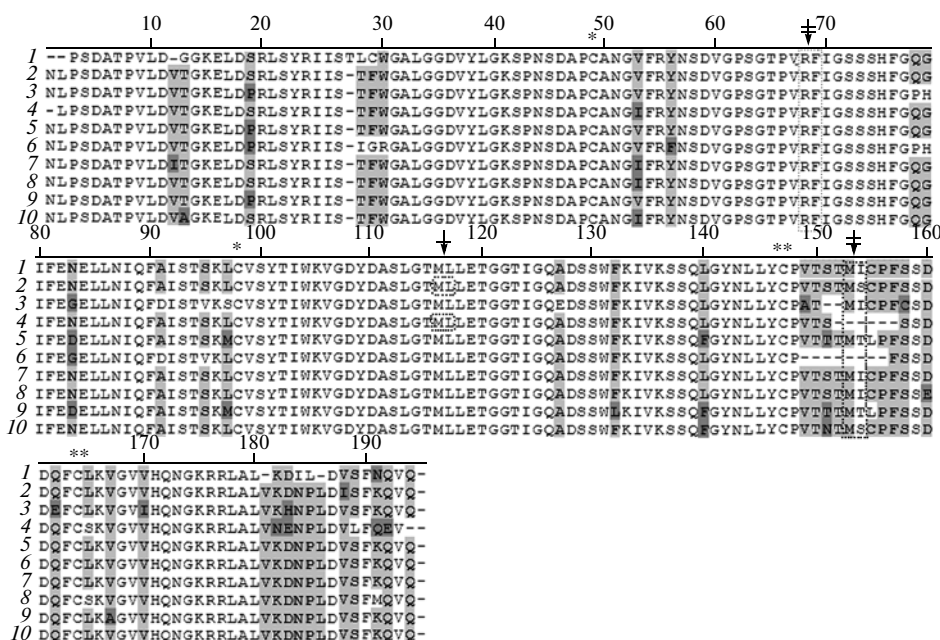


**Рис. 2.** Филогенетическое дерево генов, кодирующих белки РКРІ-В в различных сортах картофеля. Построено с использованием программы MEGA 4 по принципу максимального подобия. Числа в узлах ветвей (bootstraps) – индексы поддержки каждого узла, полученные при расчете 100-кратной повторности.

становлена аминокислотная последовательность кодируемого им белка (рис. 3). Оказалось, что последовательность первых 20 остатков полностью совпадала с N-концевой аминокислотной последовательностью белка РКСІ-23, установленной в работе [6]. Это с большой степенью вероятности указывало на то, что белок РСРІ кодируется выделенным фрагментом гена. В пользу этого свидетельствует также тот факт, что молекулярная масса белка РКРІ-В, рассчитанная из восстановленной аминокислотной последовательности, составляла 22.5 кДа и совпадала с молекулярной массой белка РКСІ-23, определенной по результатам ПААГ-электрофореза.

Итак, в геноме картофеля сорта Юбилей Жукова обнаружен и секвенирован фрагмент ДНК, который предположительно кодирует белок РКСІ-23, выделенный нами ранее из клубней и действующий как ингибитор химотрипсина и трипсина [6]. Это позволило восстановить предполагаемую полную аминокислотную последовательность этого белка.

Анализ аминокислотных последовательностей РКСІ-23 и известных белков РКРІ-В, приведенных на рис. 3, показал, что они содержат от 86.5 до 98.6% идентичных остатков (таблица), часть из которых является консервативной. Прежде всего, это два консервативных остатка цистина, образующих дисульфидные связи, соединяющие остатки Cys49–Cys98 и Cys147–Cys164, первая из которых формирует большую пептидную петлю в N-концевой части молекулы, а вторая – малую в ее С-концевой части. Следует отметить, что в последовательности белков, кодируемых генами *PKPI-B9*, *kPi B-k2*, *P4D11*, *SIC1*, а также белка РКСІ-23, в положении 155 присутствует только остаток цистеина, в то время как в молекуле белка, кодируемого геном *PKPI-B10*, – третья дополнительная дисульфидная связь между остатками Cys155–Cys158. Несмотря на высокое сходство первичных структур, рассматриваемые белки различаются по специфичности действия на химотрипсин и трипсин. Так, белок *PSPI-21-6.3*, который кодируется геном *PKPI-B9*, эффективно подавлял активность эластазы из лейкоцитов человека и значительно сла-



**Рис. 3.** Сравнение аминокислотной последовательности белков РКРІ-В из различных сортов картофеля. 1 – РКСІ-23 (данная работа), 2 – *PSPI-6.3* [12], 3 – *PKTI-22* [13], 4 – *PSPI-21-5.2* [12], 5 – *P1H5* [5], 6 – *gCDI-B1* [2], 7 – *kPi B-k2* [11], 8 – *P4D11* [5], 9 – *PI-2* [9], 10 – *SIC1* [5]. Последовательности 1, 3, 5–10 восстановлены по последовательностям кодирующих их генов. Аминокислотные остатки, идентичные во всех последовательностях, не окрашены, а различающиеся обозначены серым цветом. Реактивные центры указаны стрелками, дисульфидные связи (Cys49–Cys98 и Cys147–Cys164) обозначены звездочками.

бее трипсина и химотрипсина [12]. Такой же специфичностью действия на протеиназы характеризуется белок PSPI-21-5.2, который кодируется гибридным геном, содержащим на 3'-участке фрагмент гена *PKPI-B9*, а на 5'-участке — *PKPI-A6* [12]. Белок РКТИ-22, кодируемый геном *PKPI-B10*, является специфическим ингибитором трипсина [13], а белки РКСИ-23 и P1H5 с одинаковой эффективностью действуют на химотрипсин и трипсин [6, 14].

Все белки, аминокислотные последовательности которых представлены на рис. 3, являются ингибиторами трипсина и взаимодействуют с ферментом по “каноническому” субстратоподобному механизму. В последовательности каждого из них присутствуют консервативные остатки Arg68-Phe69, расположенные в большой пептидной петле. Показано, что они входят в состав реактивного трипсин-связывающего центра ингибиторов [12]. Участок аминокислотной последовательности, окружающий эти остатки, идентичен в структуре всех указанных белков, а в пространственной организации их молекул создаются условия для образования “канонической петли” связывания трипсина.

На участке последовательностей, локализованном вне пептидных петель, который практически также идентичен у всех рассматриваемых белков, расположены консервативные остатки Met116-Leu117. В работе [12] было показано, что белки PSPI-21-5.2 и PSPI-21-6.3 подвергаются посттрансляционному протеолизу по пептидным связям Ser151-Thr152 и Phe157-Ser158 с образованием двухцепочечных молекул. Было установлено, что остатки Met116-Leu117 входят в состав химотрипсинсвязывающего реактивного центра, расположенного в пептидной петле, формирующейся между полипептидными цепями, соединенными дисульфидной связью Cys147–Cys164. Однако молекулы других белков, структуры которых приведены на рис. 3, состоят из одной полипептидной цепи и в них не может сформироваться “каноническая петля” между остатками Ser100-Leu145. В то же время часть из них, а именно белки РСPI, P1H5, Кри В-k2, P4D11, PI-2 и S1C1, достаточно эффективно подавляют активность химотрипсина [6, 11, 14]. Вы сказано предположение, что остаток Met153 может входить в состав реактивного химотрипсинсвязывающего центра, локализованного в “канонической петле”, образующейся между остатками Cys147–Cys164 [14]. Однако в аминокислотной последовательности белка gCDI-B1 в результате делеции в нуклеотидной последовательности кодирующей его ДНК отсутствует остаток Met153. В молекуле белка РКТИ-22 также существуют препятствия для образования “канонической” петли связывания химотрипсина, поскольку между остатками Cys147–Cys164 расположена еще одна дисульфидная связь Cys155–Cys158. И, действительно, белок gCDI-B1 не действует на химотрипсин [2], а белок

РКТИ-22 очень слабо подавляет активность этого фермента [13].

Таким образом, отсутствие или присутствие определенных аминокислотных остатков в первичной структуре определяет специфичность действия ингибиторов РКPI. Высокая изменчивость в последовательностях белков РКPI-B на участке, расположенном между остатками Cys147 и Cys164, согласуется с данными об их высокой функциональной значимости для молекулы ингибитора [11]. Можно предположить, что образование замен, расположенных на этом участке, происходит в результате независимых мутаций. Вполне вероятно, что полиморфизм генов *PKPI-B* является следствием адаптивной эволюции, направленной на защиту растений от фитопатогенных микроорганизмов и насекомых-вредителей. Большой набор вариантов генов белков-ингибиторов способен привести к экспрессии их новых изоформ, которые позволяют противостоять адаптации фитопатогенов к ингибиторам.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lisinska G., Leszczynski W.* Potato Science and Technology. London: Elsevier Applied Science, 1989. 391 p.
2. *Ishikawa A., Ohta S., Matsuoka K., Hattori T., Nakamura K.* // Plant Cell Physiol. 1994. Т. 35. № 2. P. 303–312.
3. *Valueva T.A., Revina T.A., Kladnitskaya G.V., Mosolov V.V.* // FEBS Lett. 1998. V. 426. № 1. P. 131–134.
4. *Валуева Т.А., Мосолов В.В.* // Биохимия. 2004. Т. 69. № 11. С. 1600–1606.
5. *Heibges A., Glaczinski H., Ballvora A., Salamini F., Gebhardt C.* // Mol. Gen. Genomics. 2003. V. 269. № 4. P. 526–534.
6. *Ревина Т.А., Парфенов И.А., Гвоздева Е.Л., Валуева Т.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 3. С. 265–271.
7. *Barrett A. J., Rawlings N. D., O'Brien E. A.* // J. Struct. Biol. 2001. V. 134. № 2–3. P. 95–102.
8. *Ежова Т.А., Солдатова О.П., Пенин А.А., Шестаков С.В.* Молекулярно-генетическое картирование генома растений. М.: МАКС Пресс, 2002. 70 с.
9. *Pouvreau L., Gruppen H., van Koningsveld G.A., van den Broek L.A.M., Voragen A.G.J.* // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. № 17. P. 5001–5005.
10. *Сперанская А.С., Крилицына А.А., Полтроньеры П., Фазано Л., Сантино А., Шевелев А.Б., Валуева Т.А.* // Биохимия. 2005. Т. 70. № 3. С. 360–369.
11. *Bauw G., Nielsen H.V., Emmersen J., Nielsen K.L., Jorgensen M., Welinder K.G.* // FEBS J. 2006. V. 273. № 15. P. 3569–3584.
12. *Valueva T.A., Revina T.A., Mosolov V.V., Mentele R.* // Biol. Chem. 2000. V. 381. № 12. P. 1215–1221.
13. *Ревина Т.А., Кладницкая Г.В., Герасимова Н.Г., Гвоздева Е.Л., Валуева Т.А.* // Биохимия. 2010. Т. 75. № 1. С. 46–51.
14. *Heibges A., Salamini F., Gebhardt C.* // Mol. Gen. Genom. 2003. V. 269. № 4. P. 535–541.

## Fragment of the Gene Encoding Chymotrypsin and Trypsin Inhibitor Protein of Potato Tubers

I. A. Parfenov<sup>a</sup>, T. A. Revina<sup>a</sup>, P. P. Pashkovsky<sup>b</sup>, N. L. Radyukina<sup>b</sup>, and T. A. Valueva<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

<sup>b</sup> *Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia*

*e-mail: valueva@inbi.ras.ru*

Received November 15, 2010

**Abstract**—Product of polymerase chain reaction designated as *PKPIJ-B* was isolated after amplification from genomic DNA of potato (*Solanum tuberosum* L., Zhukov Jubilee cultivar) using the designed primers. Nucleotide sequence of *PKPIJ-B* was determined and amino acid sequence of protein was restored. Analysis of this sequence has allowed us to suggest that isolated gene fragment encodes chymotrypsin and trypsin inhibitor protein (PKCI-23 potato Kunitz-type chymotrypsin inhibitor) of potato tubers.