

Д. В. Галиновский, мл. науч. сотрудник ИГиЦ НАН Беларуси; В. Н. Леонтьев, доцент;
Т. В. Никитинская, аспирант ИГиЦ НАН Беларуси; А. П. Райский, мл. науч. сотрудник;
Л. В. Хотылева, гл. науч. сотрудник ИГиЦ НАН Беларуси;
В. В. Титок, зав. лабораторией ИГиЦ НАН Беларуси

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗОСИНТАЗ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ РАСТЕНИЙ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА

Phylogenetic analysis of 56 HVRII *CesA* genes showed that HVRII gene region of cellulose synthase was a class-specific region. We have used the approaches, developed by X. Liang and C. P. Joshi, with some modifications for analysing *CesA* genes in fiber flax, cultivar Blakit (Belarus). We used stems of fiber flax in rapid growth phase as a plant material. We amplified fragment of HVRII about 600 b.p. on cDNA matrix, which we synthesized on RNA from fiber flax. Afterwards we cloned the fragment into the plasmid vector in *E. coli*. 113 strains, which carried a required insertion, were selected for sequencing. Of these 113 variants we have sequenced some plasmids which showed 80% of homology to the HVRII of *CesA1* gene *Populus tremula* × *Populus tremuloides* (gb[AY573571.1]) and 67% homology to the HVRII of *CesA4* gene *Arabidopsis thaliana* (NM123770.3). Thus, one may speak of the possibility to use this approach to fiber flax plants.

Введение. Целлюлозосинтазы являются ферментами, участвующими в биогенезе клеточной стенки растительных волокон. Объединенные в целлюлозосинтезирующую «розетку» по 36 полипептидов, они синтезируют микрофибриллы целлюлозы, состоящей из 36 глюкановых цепей. В итоге получается, что один полипептид синтезируют одну глюкановую цепочку, хотя ферментативной активностью обладает только ферментативный комплекс, связанный с клеточной мембраной.

Особенностью развития растительных клеток является появление вторичной клеточной стенки, которая существенно отличается по структурным и механическим свойствам от первичной. Структурные различия клеточных стенок связаны и со структурными различиями полимеров, входящих в состав первичной и вторичной клеточных стенок. Указывается на различие в степени полимеризации целлюлозы, входящей в состав первичной и вторичной клеточной стенки [1], а также на особенности пространственной ориентации целлюлозных микрофибрилл в структурах клеточной стенки. Это явление коррелирует с данными молекулярно-генетических исследований, в которых четко показаны две группы генов ферментов целлюлозосинтаз, специфически экспрессирующихся при биогенезе первичной или вторичной клеточной стенки [2]. На генном уровне различия связаны с экспрессией разных генов целлюлозосинтаз (*CesA*-генов), продукты которых формируют различные «розетки». Поэтому от того, какие именно целлюлозосинтазы вовлечены в процесс биогенеза клеточной стенки, зависят и физико-химические свойства полимера и качество технического волокна, которое напрямую связано с удлинением лубяных клеток и динамикой утолщения вторичной клеточной стенки у этих клеток.

На рис. 1 представлена микрофотография поперечного среза стебля льна-долгунца, на которой хорошо видны клетки луба.

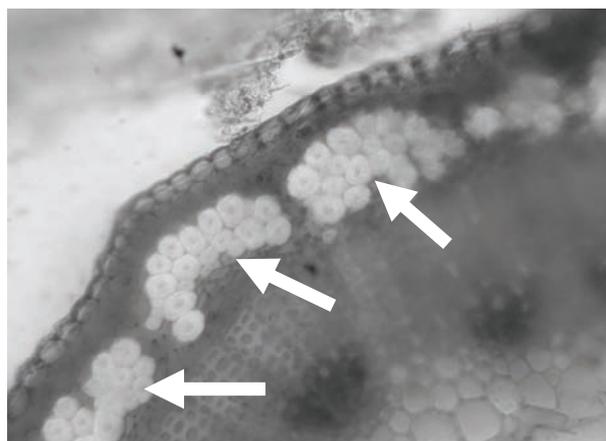


Рис. 1. Поперечный срез стебля льна-долгунца (сорт Блакит, Беларусь).
Стрелками обозначены пучки клеток лубяных волокон

Морфолого-анатомические особенности данных клеток заключаются в гипертрофированном развитии вторичной клеточной стенки. Хорошо видно, что клеточная стенка составляет основную часть клетки, только маленький просвет внутри массивной оболочки занимает собственно содержимое клетки. Такая структурная организация связана с функциональной ориентацией клеток луба на синтез компонентов клеточной стенки, в том числе и целлюлозы. На наш взгляд, такой массивный синтез целлюлозы может обеспечиваться двумя вариантами:

- 1) благодаря гиперактивности неспецифических целлюлозосинтаз;
- 2) за счет экспрессии специфических целлюлозосинтаз, обеспечивающих сборку специфических для луба «розеток».

Косвенно в пользу второго варианта говорит то, что целлюлозосинтазы составляют обширное мультигенное семейство. У арабидопсиса, например, обнаружено 10 различных целлюлозосинтаз, а у растений, которые ориентированы на синтез целлюлозы, например древесные растения, их количество еще больше (у тополя, например, 17). Также в пользу специфических целлюлозосинтаз луба говорят литературные данные, обобщенные, например, в [3], о том, что целлюлозосинтазы дифференцированно экспрессируются в тканях, выполняющих разную функцию.

Мы в своей работе исходили из гипотезы о том, что существуют *CesA*-гены, которые специфически экспрессируются в клетках лубяных волокон, что и обуславливает их структурные особенности.

Поэтому цель настоящей работы заключалась в идентификации *CesA*-генов, экспрессирующихся в стеблях растений льна-долгунца и обеспечивающих формирование вторичной клеточной стенки лубяных волокон.

Материалы и методы. В качестве растительного материала отбирали стебли растений льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L., сорт Блакит, Беларусь) на стадии быстрого роста. Общую растительную РНК выделяли по методике с использованием тризола. Синтез кДНК осуществляли с помощью набора «RevertAid H Minus First Stand cDNA Synthesis Kit» фирмы Fermentas (Литва). Для амплификации HVRII-региона использовали праймеры, предложенные в [4]. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили при следующих условиях: после 4 мин при 95°C выполняли 30 циклов – 60 с при 94°C, 90 с при 41°C и 120 с при 72°C, затем финальную элонгацию – 10 мин при 72°C.

Амплифицированные фрагменты клонировали в плазмидный вектор pTZ57R в бактерии *E. coli* XL1-Blue с использованием «InsTAclone™ PCR Cloning Kit» фирмы Fermentas (Литва). Проверку на наличие необходимой вставки осуществляли с помощью ПЦР со стандартными праймерами к полилинкеру данной плазмиды при следующих условиях: после 4 мин при 95°C выполняли 25 циклов – 60 с при 94°C, 60 с при 51°C и 60 с при 72°C, финальную стадию – 10 мин при 72°C.

Последующее разделение продуктов ПЦР-реакции осуществляли при помощи электрофореза. В работе использовали метод горизонтального электрофореза в 1%-ном агарозном геле с использованием ТАЕ-буфера.

Секвенирующие реакции проводили с применением «Big Dye™ Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems). Очистку продуктов реакции осуществляли путем переосаждения с 96%-ным этанолом и ЭДТА, согласно рекомендациям фирмы-изготовителя. Секвенирующий

электрофорез проводили на «ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer» (Applied Biosystems).

Сопоставление полученных нами последовательностей с данными, содержащимися в базах данных, осуществляли при помощи программы Nucleotide blast с использованием алгоритма Discontiguous megablas.

Результаты и их обсуждение. Для того чтобы идентифицировать *CesA*-гены, мы использовали известные особенности структуры CESA-белков, входящих в полигенное семейство целлюлозосинтаз (рис. 2).

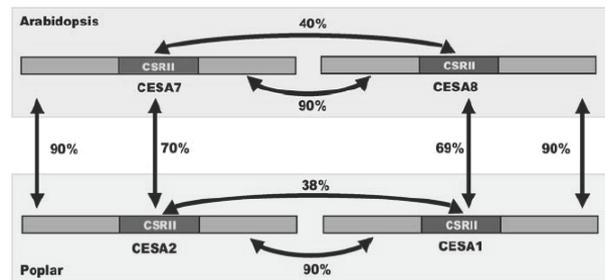


Рис. 2. Схематическое изображение CSRII (HVRII)-области у CESA-белков высших растений [5]

Эта особенность заключается в наличии классоспецифической гипервариабельной области (HVRII-области), фланкированной консервативными доменами (рис. 2). HVRII-область вариабельна у CESA, относящихся к разным классам ферментов, даже если это белки в пределах одного протеома, но в то же время эта область обнаруживает высокую степень сходства при сравнении CESA, относящихся к одному классу ферментов, даже если эти белки были исследованы у разных видов растений (рис. 2). Используя пример, приведенный на рис. 2, к одному классу целлюлозосинтаз мы отнесем CESA7 арабидопсиса и CESA2 тополя, а также CESA8 арабидопсиса и CESA1 тополя.

Особенности структуры указанных белков обуславливаются нуклеотидной последовательностью генов, в строении которых тоже можно выделить HVRII-области. Мы полагаем, что сравнение полученных нуклеотидных последовательностей HVRII-областей генов целлюлозосинтаз, которые экспрессируются в стебле растений льна-долгунца, с таковыми арабидопсиса позволяет идентифицировать целлюлозосинтазы из стебля льна-долгунца. Поэтому ключевым моментом для идентификации *CesA*-генов в данной работе является получение нуклеотидных последовательностей HVRII-областей генов целлюлозосинтаз. В своих экспериментах мы руководствовались схемой, приведенной на рис. 3. Из растительного материала мы выделяли общую РНК, затем с помощью ОТ-ПЦР и праймеров к консервативным доменам, фланкирующим HVRII-область, синтезировали кДНК.

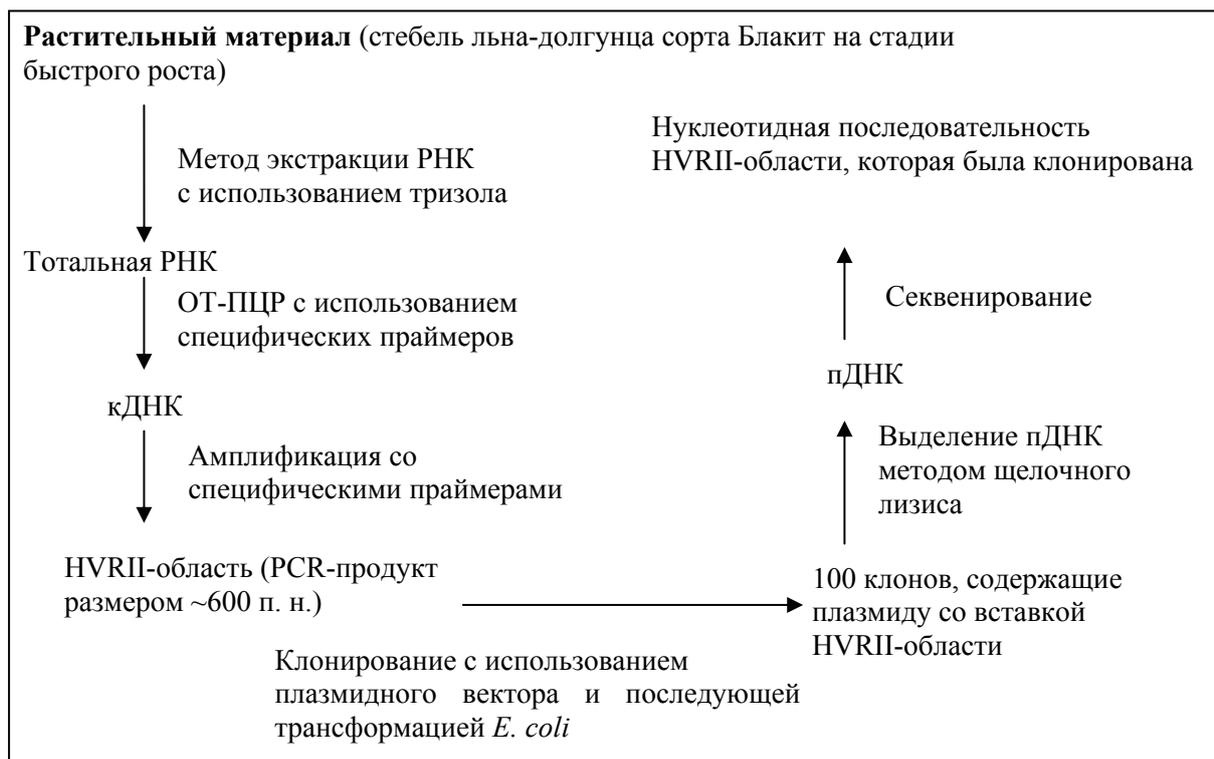


Рис. 3. Общая схема эксперимента

Используя в качестве матрицы полученную кДНК, амплифицировали HVRII-область и получили ПЦР-продукт размером ~600 пар нуклеотидов (п. н.) (рис. 4). Однако чтобы достигнуть такого результата, нам пришлось снизить температуру отжига по сравнению с предложенной в [4]. После проведения ПЦР-реакции полученный фрагмент переосаждали холодным этанолом.

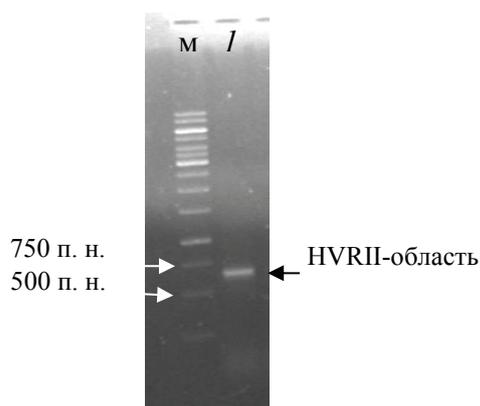


Рис. 4. Электрофореграмма, демонстрирующая фрагмент HVRII-области, полученный в результате ОТ-ПЦР: м – маркерные фрагменты (GeneRuler 1kb DNA Lader, Fermentas); l – HVRII-область целлюлозосинтаз из стебля льна-долгунца

Полученный нами ПЦР-продукт содержал «смесь» из всех HVRII-областей целлюлозосинтаз, которые экспрессировались в стебле

в тот момент, когда мы срезали растение. Мы не могли секвенировать амплифицированный фрагмент на этой стадии, а нам необходимо было разделить «смесь» до «индивидуальных» продуктов. Поэтому следующим шагом мы клонировали ПЦР-продукт в плазмидный вектор с последующей трансформацией.

В процессе клонирования лигирование вектора и вставки осуществляется в эквимольных количествах, а при трансформации считают, что в одну бактериальную клетку попадает одна химерная плаزمиды. В итоге каждая бактериальная колония, которая является потомком одной клетки, несет плазмиду с «индивидуальной» HVRII-областью. И на этой стадии выделенные плазмиды можно использовать в качестве матрицы для проведения секвенирующих реакций. После трансформации мы отобрали 113 клонов, которые несли вставку в плазмидный вектор. Одна из электрофореграмм с результатами ПЦР представлена на рис. 5.

На рис. 5 видно, что размеры ПЦР-фрагментов отличаются в достаточно широких пределах: № 2, 6, 14 имели очень легкие фрагменты, а № 5 был, наоборот, тяжелее обычного. Из общего количества 113 отобранных клонов 98 имели вставку размером 600–650 п. н., 12 – 350–150 п. н. и 3 клон несли плазмиду со вставкой размером ~800 п. н.

Последующее определение нуклеотидной последовательности клонированных фрагментов позволило установить, что наиболее «типичная» вставка, содержащаяся в полученной работе плазмиде pBS58, составляет 611 нуклеотидов

Конечно, сложно рассматривать изменения в какой-то части белка в отрыве от общей структуры молекулы, но мы можем сказать, что эти изменения затрагивают как минимум четыре аминокислоты, причем наиболее существенные изменения касаются второго варианта. Здесь происходит потеря двух гидрофобных аминокислот (фенилаланин и изолейцин) и значимое изменение трех предшествующих триплетов, причем в одном случае гидрофобная аминокислота аспарагин меняется на гидрофильный лизин. Согласно данным, полученным с помощью программы Blastx, наиболее вероятное положение рамки считывания соответствует третьему из приведенных здесь вариантов. В этом случае происходит связанная с делецией потеря двух серинов и замена двух треонинов – первого на серин, а второго на аргинин.

Заключение. При сравнении фрагментов HVRII-области, амплифицированных на РНК, выделенной из стебля льна-долгунца, наибольшая идентичность (80%) была обнаружена с целлюлозосинтазой (*CesA1*) *Populus tremula* × *Populus tremuloides* (gb[AY573571.1]). При сравнении полученных нами последовательностей с генами целлюлозосинтаз *Arabidopsis thaliana* наибольшую идентичность (67%) показала HVRII-область гена *CesA4* (NM123770.3). Полученные данные позволяют нам констатировать наличие экспрессии целлюлозосинтаз этого класса *CesA4* в стебле льна-долгунца на стадии быстрого роста. Однако из-за недостатка накопленного эмпирического материала мы не можем делать выводы о специфичности *CesA*-генов в лубяных волокнах. Но все же получен-

ные результаты свидетельствуют о перспективности использования анализа гипервариабельных классоспецифических областей *CesA*-генов для льна-долгунца. В будущем мы планируем продолжить работу по секвенированию клонированных HVRII-фрагментов для поиска и изучения целлюлозосинтаз, специфично экспрессирующихся в стебле льна-долгунца. В перспективе данный подход может быть применен для других сортов льна-долгунца и представителей других подвидов льна для молекулярно-генетической идентификации факторов, определяющих качество формирующегося льноволокна.

Литература

1. Cellulose synthesis: a complex complex / M. Mutwil [et al.] // Current Opinion in Plant Biology. – 2008. – Vol. 11. – P. 252–257.
2. Plant cell wall polysaccharide biosynthesis: real progress in the identification of participating genes / A. B. Rachel [et al.] // Planta. – 2005. – Vol. 221. – P. 309–312.
3. Kanwarpal, S. D. Building the wall: genes and enzyme complexes for polysaccharide synthases / S. D. Kanwarpal // Current Opinion in Plant Biology. – 2001. – Vol. 2. – P. 488–493.
4. Liang, X. Molecular cloning of ten distinct hypervariable regions from the cellulose synthase gene superfamily in aspen trees / X. Liang, C. P. Joshi // Tree Physiology. – 2004. – Vol. 24. – P. 543–550.
5. Ranik, M. Six new cellulose synthase genes from *Eucalyptus* are associated with primary and secondary cell wall biosynthesis / M. Ranik // Tree Physiology. – 2006. – Vol. 26. – P. 545–556.