

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ГРИБНОЙ КСИЛОГЛЮКАНАЗЫ НА БЕЛКОВЫЙ ПРОФИЛЬ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ОСИНЫ

Логинов Д.С., Васина Д.В., Ковалицкая Ю.А., Королева О.В., Шестибратов К.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А.Н.Баха Российской академии наук, Москва; Филиал института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пуццино

Процесс формирования клеточной стенки – один из важнейших этапов в жизни растений. Природные полимеры гемицеллюлозы и лигнин выступают в качестве связующего вещества между микрофибриллами целлюлозы, регулируя растяжение растительной клетки и механические свойства стеблей. Основным компонентом гемицеллюлоз первичной клеточной стенки древесных растений служит ксилоглюкан, гидролиз которого приводит к растяжению клетки. Ксилоглюканаза sp-Xeg из *Penicillium canescens*, фермент способный с высокой активностью и субстратной специфичностью расщеплять ксилоглюкан [1]. Гетерологичная экспрессия этого фермента в растениях может привести к модификации путей биосинтеза полимеров клеточной стенки и изменению их качественного и количественного соотношения. Целью данной работы было изучение влияния экспрессии гена sp-Xeg ксилоглюканазы из *Penicillium canescens* на белковый профиль трансгенных растений осины *Populus tremula*.

Конститутивная экспрессия гена sp-Xeg в гетерологичном окружении на уровне транскрипции подтверждена методом ОТ-ПЦР у 26 линий трансформантов. Все растения были подвергнуты биометрическим измерениям, измерению содержания пентозанов в древесине и изучению активности рекомбинантной ксилоглюканазы. На основании результатов проведенных исследований были выбраны следующие генотипы растений для изучения экспрессии белкового профиля: Pt XV Xeg 1b, Pt XV Xeg 3a и XV Xeg 4a. Для данных генотипов были показаны следующие изменения: Pt XV Xeg 1b – увеличение высоты растений по сравнению с контролем на 27 %, максимальное снижение количества пентозанов в древесине растений, на 23 %; Pt XV Xeg 3a – высота растений превышает контрольные показатели на 15%, снижение количества пентозанов на 14 %, Pt XV Xeg 4a – недостоверное отличие исследованных показателей от контрольных значений. Активность ксилоглюканазы в листьях тепличных растений линии Pt XV Xeg 3a была на 7 % выше уровня контроля, в остальных линиях ниже контрольных значений на 54% и на 46 % соответственно.

Изучение белковых профилей растений проводили методом двумерного электрофореза. Выделение белков из стеблей и листьев проводили с помощью оптимизированного протокола [2]. Двумерный электрофорез проводили как описано [3]. Анализ фореграмм осуществляли с помощью программы ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare). В результате на электрофореграммах растений генотипов Pt XV Xeg 1b, Pt XV Xeg 3a и Pt XV Xeg 4a было визуализировано 468, 305 и 306 белковых компонентов соответственно, что превышает значение контрольного образца (246 компонентов). Сравнительный анализ протеомных карт показал, что 132 белковых компонента совпадали для всех образцов, включая контроль. Вероятнее всего данные белки являются консервативными белками основных метаболических путей растений. Также на протеомных картах было выявлено несколько областей наиболее подверженных изменениям. В основном это низкомолекулярные и средномолекулярные белки (диапазон Mr = 17-55кДа). Кроме того, отдельно стоит выделить область с Mr около 30 кДа и pI 4 – 6, т.к. данные значения соответствуют ксилоглюканазе из *P. canescens*. Для всех генотипов в данной области было отмечено значительное число белков, отсутствующих на контрольной электрофореграмме.

В результате проведенного анализа было установлено, что наиболее отличающейся от контрольных растений является линия Pt XV Xeg 1b. Данные растения характеризовались максимальной высотой побега и минимальным содержанием пентозанов. Полученные данные, а также данные об увеличении активности ксилоглюканазы, свидетельствуют о встройке и успешной работе целевого гена в геноме растения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках Государственных контрактов № 14.740.11.0795 от 30.11.2010г. и № 16.М04.12.0009 от 14.04.2011г.

Список литературы

1. Сеницына О.А., Федорова Е.А., Правильников А.Г., Рожкова А.М., Скомаровский А.А., Матыс В.Ю., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Винецкий Ю.П., Сеницын А.П. Выделение и свойства ксилоглюканаз *Penicillium* sp. Биохимия. 2010. Т. 75. В. 1. С. 52 – 62.
2. Ramu S.Saravanan, K.C. Rose. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics*. 2004. Vol. 4. p. 2522–2532
3. H. O'Farrell. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *The journal of biological chemistry*. 1975. 10. Vol.25, 4007-4021