

В.А. КОВАЛЬОВА, Р.Т. ГУТ

Національний лісотехнічний університет МОН України, Львів

E-mail: romangout@yahoo.com

МОЛЕКУЛЯРНЕ КЛОНУВАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕФЕНЗИНУ 2 СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ



З кДНК бібліотеки семиденних проростків *Pinus sylvestris* L. ампліфіковано кДНК дефензину 2 (PsDef2) довжиною 252 п.н., що кодує білок з 83 амінокислотних залишків, до складу якого входить N-кінцевий сигнальний пептид з 33 амінокислот. Зріла форма дефензину 2 сосни звичайної містить домен *gamma-thionin* і характеризується наявністю специфічних консервативних залишків, які властиві всім рослинним дефензинам.

© В.А. КОВАЛЬОВА, Р.Т. ГУТ, 2008

Вступ. Підвищення продуктивності та біологічної стійкості хвойних деревних порід гальмується негативним впливом низки абіотичних та біотичних чинників, серед яких одним з найбільш вагомих є фітопатогенні мікроорганізми, що викликають лісові інфекції та епіфітотії. Більшість патогенів хвойних порід належать до некротрофних організмів, стійкість рослин до яких забезпечується кількома механізмами [1]. Одним з найбільш потужних з них є ушкодження клітинних стінок фітопатогену антимікробними білками – хітиназами, глюканазами і дефензинами [2].

Рослинні дефензини – це група невеликих (45–54 а.з.) основних білків з високим вмістом цистеїну, яким властивий широкий спектр активностей – антифунгальна [3], антибактеріальна [4], інсектицидна [5]. Крім того, вони здатні інгібувати протеїнази [6]. Локалізація дефензинів у поверхневих шарах клітин різних органів та в клітинах продохів, тобто в найбільш ймовірних місцях проникнення патогенів, свідчить про стратегічну роль цих білків у захисті рослинних організмів, що також підтверджується підвищенням стійкості трансгенних рослин з надекспресією дефензину до фітозахворювань [7].

Нещодавно нами ідентифіковано новий рослинний дефензин – дефензин 1 сосни звичайної (PsDef1) і клоновано його кДНК [8, 9]. Очищений препарат ендегенного PsDef1 виявив високу активність щодо низки фітопатогенних грибів, що дало підстави розглядати його як потенційний фунгістатичний препарат.

У даній роботі представлено молекулярне клонування кДНК ще одного представника групи рослинних дефензинів у *Pinus sylvestris* L. – дефензину 2 (PsDef2).

Матеріали і методи. У роботі використовували клітини *Escherichia coli*: штамів XL-1-Blue та BL21(DE3), а також плазмиду рЕТ23d (+) («Novagen», США).

Послідовність праймерів для ампліфікації кДНК повнорозмірної форми добиралась з використанням даних про нуклеотидні послідовності гомологічних EST клонів з бібліотек кДНК *Pinus pinaster* та *P. taeda*. Одержали кДНК дефензину в полімеразно-ланцюговій реакції з використанням як матриці 1 мкл первинної бібліотеки кДНК *P. sylvestris* ($1,2 \cdot 10^6$ БУО/мл), яка була створена нами на основі мРНК із коренів проростків сосни звичайної [10]. Прямим

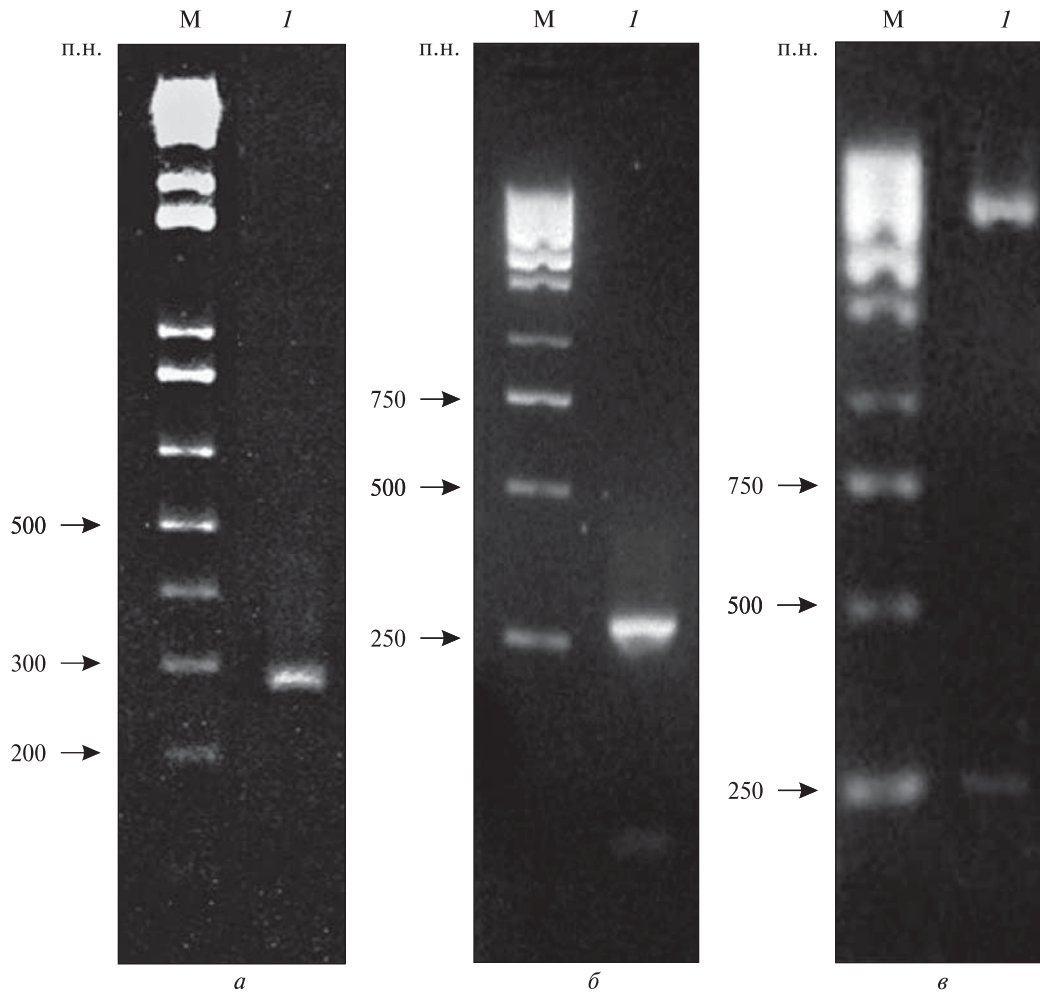


Рис. 1. Клонування кДНК дефензину 2 сосни звичайної: *а* – продукт ПЛР, який одержано ампліфікацією бібліотеки кДНК (доріжка *І*), М – 1 тис.п.н. Plus DNA Ladder «GibcoBRL»; *б* – аналіз плазміди рЕТ23d/PsDef2 полімеразно-ланцюговою реакцією (доріжка *І*), М – 1 тис.п.н. DNA Ladder «Fermentas»; *в* – рестрикційний аналіз плазміди рЕТ23d/PsDef2 за допомогою ендонуклеаз EcoR1 та Nco1 (доріжка *І*). М – 1 тис.п.н. DNA Ladder «Fermentas»

праймером слугував олігонуклеотид CR 763 (5'-CCATTCCATGGCGGGCAAGGGAGT-3'), що вміщував сайт рестрикції ендонуклеази Nco1, ініціюючий метіонін та 5'-кінцеву послідовність відкритої рамки зчитування кДНК клону BX 678613. Обернений праймер CR 764 (5'-CATGAGAATTCTCAAGGGCAGGGTTT-GTA-3') включає послідовності для ендонуклеази рестрикції EcoR1, стоп-кодону та 3'-кінцевого кодуєчого фрагменту вищезгаданого клону.

ПЛР проводили в ампліфікаторі «Proteus» («Helena BioSciences», Велика Британія) з використанням реактивів виробництва «Fermentas» (Литва) у такому режимі: 94 °С, 3 хв та 30 цик-

лів (94 °С, 1 хв; 60 °С, 1 хв; 72 °С, 1 хв) і після останнього циклу 5 хв при 72 °С. Продукти ПЛР аналізували в 1,5%-ному агарозному гелі в трис-боратному буфері рН 8,3 (50 мМ трис-Н₃ВО₃, 2 мМ ЕДТА) за напруги 20 В/см². Специфічний продукт елюювали з гелю за допомогою набору для екстракції ДНК («Qiagen», Німеччина). Одержану ДНК та вектори гідролізували рестриктазами Nco1/EcoR1 та осаджували ДНК за стандартною методикою [11].

Осади ДНК розчиняли в 10 мкл ТЕ буфера (20 мМ трис-НСІ рН 8,0, 1 мМ ЕДТА). Для лігування застосовували молярне співвідношення між вектором і вставкою 1 : 3. Реакцію лігуван-

EF455617.1 PsDef2

ATG GCGGGCAAGGGAGTTGGCACTCCACTCAGTGCCTTTTTCTGCTGGTGCCTGCTCGTTATAACC
 ATCGGGATGATGGAAGTTCAAGTGGCAGAGGGTCGAATGTGCAAAACCCCAAGTGGCAAGTTCAAA
 GGGTACTGCGTGAGTAGCACCAACTGCAAAAATGTTTCCGAAACGGAGGGATTTCCAACGGGAAGC
 TGCGATTTCCACATCACCAGCCGAAAGTGCTACTGCTACAAACCTGCCCTTGA

a

PsDef1	ATG GCGGGCAAGGGAGTTGGCACTCCACTCAGTGCCTTTTTCTGCTGGTGCCTGCTCGTT	60
PsDef2	ATG GCGGGCAAGGGAGTTGGCAGTCCACTCAGCACTCTTTTTCTGCTCGTGCCTGCTTGT	60
PsDef1	GTAACCATTTGGGATGATGGAAGTTCAAGTGGCAGAGGGTCGAATGTGCAAAACCCCAAGT	120
PsDef2	ATAACCATTTGGGATGATGAGGTTCAAGTTGCAGAGGGCCGAAATGTGCAAAACCCCGAGC	120
PsDef1	GCCAAAGTTCAAAAGGTACTGCGTGAGTAGCACCAACTGCAAAAATGTTTCCGAACTGAG	180
PsDef2	GGCAAGTTCAAAAGGTATTGTGTGAACAACCAACTGCAAAAATGTTTCCGCACTGAG	180
PsDef1	GGATTTCCAACGGGAAGCTGCGATTTCCACATCACCCAGCCGAAAGTGCTACTGCTACAAA	240
PsDef2	GGATTTCCAACGGGAAGTTGCGATTTCCATGTGGCTGGCAGAAAATGTTACTGTACAAA	240
PsDef1	CCCTGCCCTTGA	252
PsDef2	CCCTGCCCTTGA	252

b

Рис. 2. Нуклеотидна послідовність кДНК дефензину 2 сосни звичайної (a) та порівняльний аналіз ДНК послідовності PsDef1 та PsDef2 (b)

ня проводили впродовж 2 год при кімнатній температурі в буфері, що містив 30 мМ трис-НСІ рН 7,8, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ ДТТ, 1 мМ АТФ за присутності 2 U T4 ДНК-лігази («Fermetas»). Для інактивації лігази реакційну суміш прогрівали 10 хв при 65 °С. Половину (10 мкл) суміші використовували для трансформації клітин *E. coli* штаму XL-1 Blue.

Наявність вставки у векторі визначали рестрикцією ендонуклеазами NcoI та EcoRI і полімеразно-ланцюговою реакцією з праймерами CR763 та CR764. Нуклеотидну послідовність клонуваних фрагментів отримали за допомогою автоматичного ДНК секвенатора ABI 73™.

Результати досліджень та їх обговорення. Для молекулярного клонування дефензину 2 використали бібліотеку кДНК семиденних проростків сосни звичайної [10], клони якої слугували матрицями у полімеразно-ланцюговій реакції за присутності специфічних праймерів CR

763 та CR 764. Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР показав наявність ампліфікованої ДНК очікуваної довжини – 270 п.н. (рис. 1, a).

Ампліфіковані кДНК вирізали з гелю, елювали, гідролізували рестриктазами NcoI та EcoRI та зшивали з рестрикованим вектором рЕТ 23d (+). Лігазною сумішшю трансформували клітини *E. coli* штаму XL-1 Blue, селекцію трансформантів проводили на середовищі з ампіциліном. Ефективність лігазної реакції оцінювали за співвідношенням клітин, трансформованих лігазною сумішшю із вставкою (дослід) і без неї (контроль). У досліді виявлено 146 колоній, в контролі – 105. З 10 дослідних колоній, вирощених у селективному середовищі, виділено плазмідну ДНК. ПЛР з праймерами CR763 та CR764 (рис. 1, б) і рестрикцією ендонуклеазами NcoI та EcoRI (рис. 1, в) визначено наявність клонованого фрагменту ДНК у трьох клонах.

PsDef2

```

atggcgggcaagggagt tggcactccactcagt gccctttttctgctgggtgctgctcgtt
M A G K G V G T P L S A L F L L V L L V
ataaccatcgggatgatggaagttcaagtggcagaggggtcgaatgtgcaaaacccaagt
I T I G M M E V Q V A E G R M C K T P S
ggcaagttcaaagggtagctgcytgagtagcaccactgcataaatgtttgccgaacggag
G K F K G Y C V S S T N C K N V C R T E
ggatttccaacgggaagctgcygatttccacatcaccagccgaaagtgctactgctacaaa
G F P T G S C D F H I T S R K C Y C Y K
ccctgcccttga
P C P -
    
```

a

```

PsDef1  MAGKGVGSRLSTLFLLVLLVITIGMMQVQVAEGRMCKTPSGKFKGYCVNNTNCKNVC RTE 60
MAGKGVG+ LS LFLLVLLV+TIGMM+VQVAEGRMCKTPS KFKGYCV++TNCKNVC RTE
PsDef2  MAGKGVGTPLSALFLLVLLVVTIGMMEVQVAEGRMCKTPSAKFKGYCVSSTNCKNVC RTE 60

PsDef1  GFPTGSCDFHVAGRKCYCYKPCP 83
GFPTGSCDFH+ RKCVCYKPCP
PsDef2  GFPTGSCDFHITSRKCYCYKPCP 83
    
```

b

Рис. 3. Дедукована амінокислотна послідовність дефензину 2 сосни звичайної (a) та порівняльний аналіз первинних структур PsDef1 та PsDef2 (б). У прямокутнику послідовність сигнального пептиду

У результаті секвенування клонуваних ділянок ДНК отримано нуклеотидну послідовність довжиною 252 п.н., ідентичність якої з кДНК дефензину 1 сосни звичайної (PsDef1) склала 87 %. Послідовність було названо PsDef2 і депоновано до GenBank під номером EF455617.1 (рис. 2).

Для порівняння послідовності кДНК PsDef2 з послідовностями, які кодують відомі рослини дефензини, використовували електронну пошукову службу BLAST 2.0 Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) США. Встановлено, що кДНК PsDef2 на 84 % ідентична з іншими дефензинами рослин з роду *Picea* і на 77 % з представником родини *Ginkgoaceae*. Аналіз EST бази даних дозволив виявити клон DR389152 з бібліотеки кДНК *P. taeda*, який на 98 % ідентичний до нуклеотидної послідовності PsDef2. Отже у результаті клонування фрагментів ДНК, ампліфікованих з кДНК бібліотеки сосни звичайної, нами отримано нуклеотидну послідовність, яка кодує новий дефензин сосни – PsDef2.

Для виведення амінокислотної послідовності PsDef2, яку представлено на рис. 3, a, ми скористалися сервісною програмою Translate Tool

(http://www.expasy.org/cgi-bin/dna_aa). За допомогою програми SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) виявлено, що первинна структура PsDef2 містить N-кінцевий сигнальний пептид, відщеплення якого відбувається між 33 і 34 а.з. Наявність сигнального пептиду – це характерна ознака рослинних дефензинів, які є секреторними білками і синтезуються у вигляді попередників [12]. Зріла форма PsDef2, як і інших дефензинів голонасінних, складається з 50 амінокислот [13]. Пошук відомих доменів у амінокислотній послідовності PsDef2 з використанням програми Motif Scan (<http://scansite.mit.edu/motifscan>) виявив, що амінокислоти з 35 по 83 утворюють структуру, відому як gamma-thionin, звідси і походить перша назва рослинних дефензинів – γ-тіоніни. Цей домен складається з α-спіралі та трьох антипаралельних β-шарів, які з'єднані чотирма дисульфідними мостиками [12]. Характерною особливістю цього домену є те, що тільки 23 % амінокислот є консервативними – це 8 цистеїнів (позиції 3, 14, 20, 24, 34, 43, 45 та 49), два гліцини (12 та 32), серин (7), ароматичний залишок на 10-й позиції та глутамінова кислота на 27-й (відлік відносно основ-

ного домену — зрілої форми). Консервативність згаданих амінокислотних залишків спостерігається і в дефензину 2 сосни звичайної.

Використавши програму рI/Mw, ми визначили, що розрахункова молекулярна маса PsDef2 — 5635,6 Да, ізоелектрична точка — 8,9 і заряд при рН 7,0 становить +6,7. Ці значення відповідають характеристикам рослинних дефензинів.

У попередніх роботах нами було показано, що препарат ендogenous PsDef1 за концентрації <1 мкМ пригнічував ріст низки фітопатогенних грибів та спричиняв морфологічні зміни їх міцелію. За структурною та функціональною подібністю цей білок віднесено до першої (морфогенної) групи рослинних дефензинів [9]. Детальний аналіз первинних структур PsDef1 та PsDef2 виявив 86%-ну ідентичність та 93%-ну подібність їх амінокислотних послідовностей, які відрізняються за 11 а.з., з яких 5 а.з. є подібними, збігаються локалізація та розмір триптичних пептидів (рис. 3, б). Беручи до уваги високий ступінь гомології амінокислотних послідовностей обох дефензинів сосни звичайної, однаковий високий позитивний заряд при нейтральному рН, а також ідентичність амінокислотних залишків, які є критичними для активності рослинних дефензинів першої групи [14], можна припустити і подібність біологічної активності PsDef1 та PsDef2.

Отже, отримані нами результати свідчать про існування у сосни звичайної мультигенної родини дефензинів, подібно до покритонасінних [15]. Чи належить виявлений нами дефензин 2 сосни звичайної до однієї функціональної групи з PsDef1 і як впливають їх структурні відмінності на спектр біологічної активності? Виділення ендogenous або отримання рекомбінантного PsDef2 дозволило б з'ясувати ці питання, а також встановити його роль у захисті хвойних дерев від фітозахворювань.

V.A. Kovalyova, R.T. Gout

MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF SCOTCH PINE DEFENSIN 2

A full length coding sequence corresponding to Scotch pine defensin 2 (PsDef2) was achieved by a PCR approach using *P. sylvestris* cDNA library as a template. It has the potential to encode a protein of 83 amino acids in length.

The first 33 amino acids correspond to the N-terminal signal peptide. The mature protein contains domain gamma-thionin and possesses conserved residues which are common to all plant defensins.

V.A. Kovaleva, P.T. Gyt

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕФЕНЗИНА 2 СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

С кДНК библиотеки семидневных проростков *Pinus sylvestris* L. амплифицировано кДНК дефензина 2 (PsDef2) длиной 252 п.н., которая кодирует белок из 83 аминокислотных остатков, в состав которого входит N-концевой сигнальный пептид из 33 аминокислот. Зрелая форма дефензина 2 сосны обыкновенной содержит домен gamma-thionin и характеризуется наличием специфических консервативных остатков, свойственных всем дефензинам растений.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Franceschi V., Krokene P., Christiansen E., Krekling T. Anatomical and chemical defences of conifer bark beetles and other pests // *New Phytologist*. — 2005. — **167**, № 2. — P. 353–376.
2. Nagy N., Fossdal C., Krokene P., Krekling T., Lonneborg A., Solheim H. Induced responses to pathogen infection in Norway spruce phloem: changes in polyphenolic parenchyma cells, chalcone synthase transcript levels and peroxidase activity // *Tree Physiology*. — 2004. — **24**, № 3. — P. 505–515.
3. Terras F., Eggermont K., Kovaleva V., Raikhel N., Osborn R., Kester A., Rees S.B., Torrekens S., van Leuven F., Vanderleyden J. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.). Their role in host defense // *Plant Cell*. — 1995. — **7**, № 4. — P. 573–588.
4. Broekaert W., Terras F., Cammue B., Osborn R. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system // *Plant Physiol*. — 1995. — **108**, № 10. — P. 1353–1358.
5. Chen K., Lin C., Kuan C., Sung H., Chen C. A novel defensin encoded by a mungbean cDNA exhibits insecticidal activity againstbruchid // *J. Agric. Food. Chem.* — 2002. — **50**, № 12. — P. 7258–7263.
6. Wijaya R., Neumann G., Condron R., Hughes A., Polya G. Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin // *Plant Sci*. — 2000. — **159**, № 2. — P. 243–255.
7. Gao A.G., Hakimi S.M., Mittanck C.A., Wu Y., Woerner B.M., Stark D.M., Shah D.M., Liang J., Rommens C.M. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide // *Nat. Biotechnol.* — 2000. — **18**, № 10. — P. 1307–1310.
8. Ковальова В.А., Гут І.Т., Гут Р.Т. Характеристика

- двох дефензиноподібних білків з проростків сосни звичайної // Біополімери і клітина. – 2006. – **22**, № 2. – С. 126–131.
9. Ковальова В.А., Гут І.Т., Киямова Р.Г., Філоненко В.В., Гут Р.Т. Клонування та аналіз кДНК дефензину 1 сосни звичайної // Біополімери і клітина. – 2007. – **23**, № 5. – С. 398–404.
10. Ковальова В.А., Гут Р.Т. Створення та аналіз бібліотеки генів сосни звичайної // Наук. вісн. НЛТУ України. – 2007. – Вип. 17.3. – С. 65–69.
11. Sambrook J., Russell D. Molecular cloning: a laboratory manual. – Cold Spring Harbor, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – 565 p.
12. Yount N., Yeaman M. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2004. – **101**, № 21. – P. 7363–7368.
13. Sharma P., Lonneborg A. Isolation and characterization of a cDNA encoding a plant defensin-like protein from roots of Norway spruce // Plant Mol. Biol. – 1996. – **31**, № 4. – P. 707–712.
14. Thevissen K., Ferket K., François I., Cammue B. Interaction of antifungal plant defensins with fungal membrane components // Peptides. – 2003. – **24**, № 9. – P. 1705–1712.
15. Silvestein K., Graham M., Paape T., VandenBosh K. Genome organization of more 300 defensin-like genes in *Arabidopsis* // Plant Physiol. – 2005. – **138**, № 4. – P. 600–610.

Надійшла 17.03.08