

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.112.382 : 577.152.2

ВИВЧЕННЯ АМІНОТРАНСФЕРАЗ ТОМАТА *Solanum lycopersicum*, ЗАДІЯНИХ У БІОСИНТЕЗІ АМІНОКИСЛОТ ІЗ РОЗГАЛУЖЕНИМ ЛАНЦЮГОМ

© А. С. КОЧЕВЕНКО^{1,2}, А. Р. ФЕРНІ²

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ;

²Макс-Планк-Інститут молекулярної фізіології рослин, Гольм, Німеччина;
e-mail: andkochevenko@gmail.com

У дослідженні наведені дані щодо ролі протеїнів томата *Solanum lycopersicum* BCAT3 і BCAT4 у біосинтетичному шляху амінокислот із розгалуженим ланцюгом. Шляхом аналізу ПДРФ (поліморфізму домену рестрикційних фрагментів) проведено картування генів BCAT3 та BCAT4. За допомогою скануючої мікроскопії продемонстровано, що GFP-мічені протеїни, які кодуються цими генами, локалізовані у хлоропластах. Встановлено, що дві ізоформи амінотрансфераз демонструють різні кінетичні характеристики та відрізняються за рівнем експресії їхніх мРНК у різних типах тканин томата.

Ключові слова: *Solanum lycopersicum*, амінокислоти з розгалуженим ланцюгом, амінотрансферази, зелений флуоресцентний протеїн, рекомбінантний протеїн.

Рослини і бактерії здатні синтезувати всі двадцять стандартних амінокислот, тоді як організм людини не може синтезувати дев'ять із них через відсутність необхідних ензимів. Ці дев'ять амінокислот, а саме: гістидин, лейцин, валін, ізолейцин, лізин, метіонін, фенілаланін, треонін і триптофан, одержали назву незамінні. Три аліфатичні амінокислоти лейцин (Leu), валін (Val) і ізолейцин (Ile), які утворюють групу амінокислот із розгалуженим ланцюгом (branched-chain amino acids, ВСАА), відіграють дуже важливу роль в організмі людини. Ці амінокислоти не тільки виконують функцію будівельних блоків у синтезі протеїнів, але й мають стимулюючий ефект на секрецію інсуліну, регенераційні властивості печінки та процес синтезу протеїнів у цілому. Окрім цього встановлено, що порушення функції ензимів катаболічного шляху ВСАА призводить до виникнення атрофії або тремтіння м'язів, гіпоглікемії та різного роду неврологічних дефектів [1]. Рослини є одним із основних джерел забезпечення потреб організму людини у ВСАА, тому вивчення генів, задіяних у їх біосинтезі та деградації, а також регуляції їх метаболізму в цілому є дуже актуальним.

Біосинтез Leu, Val і Ile відбувається двома паралельними шляхами за участю чотирьох

ензимів: ацетолактат синтази (ALS, 2.2.1.6), редуктоізомерази кетокислот (KARI, 1.1.1.86), дегідратази дегідроксикислот (DHAD, 4.2.1.9), а також амінотрансaminaзи амінокислот з розгалуженим ланцюгом (BCATs, 2.6.1.42), які здатні каталізувати реакції із різними субстратами. BCATs є важливим, але, на жаль, недостатньо вивченим класом ензимів, що задіяні не тільки у біосинтезі, але й в деградації ВСАА. Ці піридоксаль-5'-фосфатзалежні трансaminaзи каталізують фінальний або перший крок відповідно біосинтетичного та катаболічного шляху, забезпечуючи взаємоконвертацію альфа-кетокислот попередників у відповідні амінокислоти. Рослинні BCATs було ідентифіковано і виділено в однодольних, дводольних та голонасінних рослин [2–5]. У томата BCATs кодуються невеликим сімейством генів, що налічує шість членів [6].

Метою роботи було ізолювати та картувати два гени томата (BCAT3, BCAT4), вивчити їх експресію та охарактеризувати амінотрансферази, що ними кодуються.

Матеріали і методи

Картування генів здійснювали шляхом аналізу ПДРФ у популяції інтрогресивних ліній томата, одержаних від схрещування *Solanum lycopersicum* і *S. pennellii*. Тотальну

ДНК екстрагували із листкової тканини за методом Doyle J. J. [7]. Ізольовану ДНК (10–15 мкг) обробляли рестрикційними ендонуклеазами *Hind*III або *Bfr*I за рекомендаціями фірми-виробника (Roche, Німеччина). Одержані рестрикційні фрагменти розділяли шляхом електрофорезу в 0,8%-й агарозі та переносили на мембрану *Roablot* (Macherey Nagel, Німеччина) за допомогою капілярного методу [8]. ДНК-вставки з EST (expressed sequence tag) клонів *cTOF24N6*, *cLEC37H2* використовували як зонди для саузерн-блот-гібридизації. Мічення зондів радіоактивним фосфором ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP) проводили за допомогою довільного гексамерного методу [9] із використанням набору *Rediprime II DNA Labeling System* (Amersham Pharmacia Biotech, Німеччина). Всі операції проводили згідно з протоколом фірми виробника. Гібридизацію проводили за жорстких умов (65 °C) у розчині, який містив 0,9 М NaCl, 0,05 М NaH_2PO_4 , рН 7,7, 0,5 мМ $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 1% SDS, 100 мкг/мл денатурованої ДНК лосося та 50–100 нг радіоактивно міченого зонда. Сигнал реєстрували за допомогою фосфоіміджера *Fuji BAS2000* (*Fuji Photo Film*).

Для встановлення 5'- і 3'-кінцевої нуклеотидної послідовності генів *BCAT3*, *BCAT4* використовували набір реактивів *Gene Racer Kit* (*Invitrogen*, Німеччина). Ізольовану із

листіків томата мРНК було використано як матрицю. Продукти 5'-, 3'-RACE ампліфікували у наступних комбінаціях праймерів: *GeneRacer 5'* і *5RaceReBCAT3* (364 п.н.), *3RaceFrBCAT3* і *GeneRacer 3'* (437 п.н.), *GeneRacer 5'* і *5RaceReBCAT4* (439 п.н.), *3RaceFrBCAT4* і *GeneRacer 3'* (1155 п.н.), послідовності яких наведено у табл. 1. Після електрофорезу в 1%-му агарозному гелі продукти ПЛР було очищено за допомогою набору реактивів *NucleoSpin® Extract II* (*Macherey Nagel*, Німеччина) і клонувано у вектор *pCR4Blunt-TOPO*. Нуклеотидну послідовність кДНК-вставки визначали з використанням набору *Big Due Terminator Cycle Sequencing Kit* на автоматичному секвенаторі *ABI PRISM® 310* (*PE Applied Biosystems*, Німеччина).

Експресію генів у різних типах тканин аналізували за допомогою ПЛР у реальному часі (qRT-PCR). Сумарну РНК із окремих органів, як то стебел, квіток, листків та плодів на стадії 10, 20, 30 і 40 днів після розкриття квітки (д.п.р.к.) ізолювали за допомогою *Trizol* реагенту (*Invitrogen*, Німеччина). Перший ланцюг кДНК синтезували з 3 мкг сумарної РНК із використанням оліго(dT)-праймера (0,5 мг), зворотної транскриптази *SuperScript III* (200 одиниць) (*Invitrogen*, Німеччина) за рекомендаціями фірми виробника. Аналіз qRT-PCR проводили, застосову-

Таблиця 1. Праймери, використані в дослідженні

Назва праймера	Нуклеотидна послідовність
<i>GeneRacer 5'</i>	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA
<i>5RaceReBCAT3</i>	AAAGCCAAAGCCAAGGTTATC
<i>5RaceReBCAT4</i>	GCTCAACTCAATATGCCAAAAC
<i>GeneRacer 3'</i>	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG
<i>3RaceFrBCAT3</i>	TCTACCTGGAATTACGCGAAAAAG
<i>3RaceFrBCAT4</i>	GTTTTGGGAATATTGAGTTGAGCC
<i>FrqRTUBI3</i>	GGTTAAGCTCGCTGTGTTGCA
<i>ReqRTUBI3</i>	CGAAGCCTCTGAACCTTTCCA
<i>FrqRTBCAT3</i>	ACTGGAGGCGTTAAGACTATTGGA
<i>ReqRTBCAT3</i>	TAGCAGCACTCTGTGCCTTCAG
<i>FrqRTBCAT4</i>	TTCAGGTGGCGAGTTCTGCTAG
<i>ReqRTBCAT4</i>	CCAATGTTGTCCCAATCGATGT
<i>FrGFPBCAT3</i>	CACCATGGAGAGCGCCGCCGTATTT
<i>ReGFPBCAT3</i>	TTTGAGCTCAACAATCCAACCCAT
<i>FrGFPBCAT4</i>	CACCATGGAGAGCGGCCGGCGTAT
<i>ReGFPBCAT4</i>	TCCGTTGCTAGTCCCATTTGT

ючи інтеркалюючий флуоресцентний барвник SYBR Green. Реакційна суміш для qRT-PCR (10 мкл) містила 1x Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, США), 50 нг кДНК і 500 нМ кожного ген-специфічного праймера. Внутрішній ампліфікаційний стандарт, UBI3, було ампліфіковано з праймерами FrqRTUBI3 і ReqRTUBI3. Для ампліфікації *BCAT3* і *BCAT4* використовували наступні комбінації праймерів: FrqRTBCAT3 і ReqRTBCAT3, FrqRTBCAT4 і ReqRTBCAT4 (табл. 1). Аналіз qRT-PCR виконували на приладі ABI7000 Real Time PCR System (Applied Biosystems, США) за наступним протоколом: 2 хв, 50 °С; 10 хв, 95 °С; 15 с, 95 °С; 1 хв, 60 °С, 40 циклів; 15 с, 95 °С; 20 с, 60 °С; 15 с, 95 °С. Одержані дані аналізували за допомогою програми SDS 2.2.1.

Повнорозмірні кодуючі послідовності генів *BCAT3*, *BCAT4* без стоп-кодона було ампліфіковано в наступних комбінаціях праймерів FrGFPBCAT3 і ReGFPBCAT3, або FrGFPBCAT4 і ReGFPBCAT4 (табл. 1). Ампліфіковані продукти розміром 1251 п.н. і 1227 п.н., відповідно, спочатку клонували у проміжний вектор pENTR-SD-D-TOPO, після чого їх було субклонувано у вектор pK7FWG2 з використанням GatewayR LR Recombinase (Invitrogen, Німеччина). Таким чином, повнорозмірна кодуюча послідовність *BCATs* була злита з послідовністю гену зеленого флуоресцентного протеїну (*GFP*). Конструкції *BCAT3-GFP*, *BCAT4-GFP* було введено в мезофільні протопласти тютюну за допомогою методу ПЕГ-обумовленої трансформації [10]. Аналіз тимчасової експресії химерних протеїнів проводили на конфокальному лазерному скануючому мікроскопі (DM IRB, Leica, Bensheim, Німеччина). Для збудження *GFP* флуоресценції використовували аргонний лазер з довжиною хвилі 488 нм, флуоресценцію реєстрували в межах 505–530 нм. Флуоресцентний барвник MitoTracker (Invitrogen, Німеччина) використовували для специфічного фарбування мітохондрій. Детекцію сигналу проводили в межах 585–605 нм при збудженні гелій-неоновим лазером з довжиною хвилі 543 нм.

Для комплементарного аналізу повнорозмірні кодуючі послідовності генів *BCAT3*, *BCAT4* із стоп-кодоном, що знаходилися у проміжному векторі pENTR-SD-D-TOPO, було субклонувано у вектор pAG426GPD з використанням GatewayR LR Recombinase (Invitrogen, Німеччина). Трансформацію клітин мутанта $\Delta bat1/\Delta bat2$ *Saccharomyces*

cerevisiae конструкціями pAG426GPD-*BCAT3*, pAG426GPD-*BCAT4* проводили згідно з протоколом [11]. Культивування здійснювали при 30 °С на мінімальному середовищі YNB, яке містило 2% агару, 2% сахарози і по 0,002% аденіну, His та Lys. Оцінку проводили на 7-й день культивування.

Для одержання генетичних конструкцій, які кодуєть *BCAT3-His6*, *BCAT4-His6* рекомбінантні протеїни, кодуєчі нуклеотидні послідовності генів *BCAT3*, *BCAT4* без стоп-кодонів, що знаходились у векторі pENTR/D-TOPO, було субклонувано у вектор pYES-DEST52. Плазмиди pYES-DEST52-*BCAT3*, pYES-DEST52-*BCAT4* вводили у штам $\Delta bat1/\Delta bat2$ *S. cerevisiae* за допомогою літєвого методу. Дріжджову культуру на-рошували при 30 °С до показника абсорбції 0,5–0,7 (600 нм) в мінімальному середовищі SC, яке містило 2% глюкози як джерело вуглецю. Експресію цільового протеїну індукували шляхом заміни джерела вуглецю у поживному середовищі, тобто замість глюкози використовували галактозу, кінцева концентрація якої в індукційному середовищі становила 2 г/л. Після індукції експресії культуру інкубували ще 12–18 год при 30 °С. Після цього клітини осаджували центрифугуванням (5000 g, 10 хв) і лізували у буфері YeastBusterTM (Novagen, Німеччина). Залишки клітин осаджували центрифугуванням при 12 000 g, 10 хв. *BCATs-His6* виділяли із дріжджового лізату методом металоафінної хроматографії на Ni^{2+} -NTA-агарозі (Qiagen, Німеччина) в нативних умовах згідно з рекомендаціями фірми виробника. Очистку контролювали методом електрофорезу в поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах [12]. Елюйований протеїн концентрували ультрафільтрацією через мембрану Amicon Filter (MWCO 3 kDa). Після діалізу проти розчину, що містив 20% гліцерол, 50 мМ трис-НCl, рН 8,0 препарат ензиму одразу використовували для вимірювання активності або заморожували та зберігали при -80 °С.

Активність *BCAT* вимірювали спектрофотометрично за методом [13]. Альфа-кето-кислотозалежне трансамінування глутамінової кислоти було сполучено через 2-оксоглутарат із аспартатамінотрансферазою і малатдегідрогеназою. *BCAT*-ну активність визначали, вимірюючи зниження NADH абсорбції при 340 нм. Реакційний буфер містив 100 мМ трис-НCl-буфер, рН 8,3; 300 мМ глутамінової кислоти, 0,2 мМ NADH, 0,1 мМ піридоксаль-фосфату, 0,5–4 мМ відповідної кетокислоти (КІС, кетоізокапронової кислоти; КМВ, кетометилвалеріаної кислоти;

KIV, кетозовалеріанової кислоти), 200 мМ аспарагінової кислоти, 500 мкМ·хв⁻¹·л⁻¹ аспартатамінотрансферази, 1000 мкМ·хв⁻¹·л⁻¹ малатдегідрогенази та 20 мкг очищеного рекомбінантного протеїну ВСАТ. Концентрацію протеїну визначали за методом Бредфорд [14] із використанням як стандарт-реагенту Quick Start Bradford Dye (Bio-Rad, Німеччина) і БСА (Sigma-Aldrich). Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми GraphPad Prism5.

Результати та обговорення

Для клонування і ізолювання генів, які кодують ВСАТs томата було використано наступний підхід: спочатку після аналізу кДНК бібліотеки томата було ідентифіковано декілька клонів, що згідно з анотацією кодують ВСАТs. Вставку кДНК відібраних EST-клонів було

проаналізовано сиквенуванням. За результатами аналізу було ідентифіковано два клони (сТОF24N6, сLEC37H2), що дійсно містили різні нуклеотидні послідовності гомологічні послідовностям амінотрансферази амінокислот із розгалуженим ланцюгом *Arabidopsis thaliana*. Наявність цих кДНК послідовностей дозволила локалізувати гени *ВСАТ3*, *ВСАТ4* на хромосомній карті томата. Картування здійснювали шляхом аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ) у популяції інтрогресивних ліній томата, одержаних від схрещування культурного томата *S. lycopersicum* (сорту М82) з його диким родичем *S. pennellii* (LA 716). Поліморфізм між батьківськими видами кожного із генів *ВСАТ3* і *ВСАТ4* було знайдено з використанням ендонуклеаз *HindIII* і *BfrI* відповідно. Внаслідок саузерн-блот-гібридації ген *ВСАТ3* було

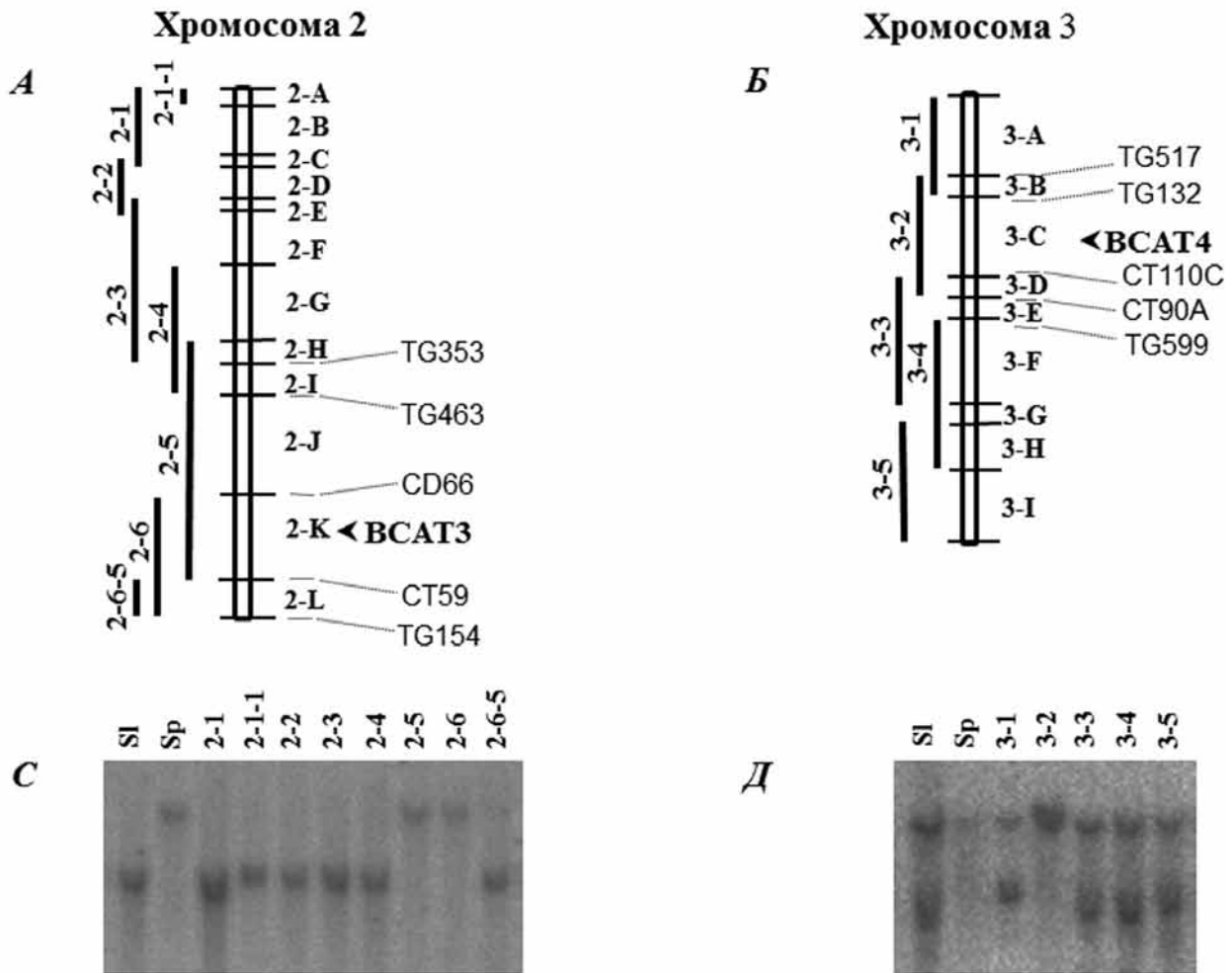


Рис. 1. Картування генів *ВСАТ3* і *ВСАТ4*. А, Б – локалізація на хромосомній карті; С, Д – результати блотингу за Саузерном; 2-1 – 2-6-5; 3-1 – 3-5 інтрогресивні лінії томата; Sl – *S. lycopersicum*; Sp – *S. pennellii*

локалізовано на хромосомі 2 між маркерами CD66 і СТ59 (рис. 1, А, С). Також було встановлено, що ген *BCAT4* знаходиться на хромосомі 3 між маркерами TG517 і СТ110С (рис. 1, Б, Д).

Повнорозмірну кДНК для *BCAT3* і *BCAT4* (1400 і 1512 п.н відповідно) було встановлено за допомогою 5'-, 3'-RACE PCR. У разі з геном *BCAT3* вона складалась із 58 п.н. 5'-UTR із наступною кодуючою послідовністю розміром 1254 п.н., а також 88 п.н. 3'-UTR. Ген *BCAT4* мав 64 п.н. 5'-UTR, кодуючу послідовність довжиною 1230 п.н. і 218 п.н. 3'-UTR.

Для підтвердження *in vivo* трансаміназної активності протеїнів, що кодується генами *BCAT3*, *BCAT4* було проведено комплементарний аналіз ауксотрофного за ВСАА мутанта дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*) $\Delta bat1/\Delta bat2$. Цей мутантний штам дріжджів є дефектним відразу за двома амінотрансферазами і тому не здатний рости на мінімальному поживному середовищі за відсутності ВСАА [15]. Кодуючі послідовності цих генів було клоновано у вектор pAG426GPD під контролем конститутивного гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогеназного (GPD) промотору. Клітини мутанта $\Delta bat1/\Delta bat2$, що експресували конструкції pAG426GPD-*BCAT3* та pAG426GPD-*BCAT4* здатні рости на мінімальному середовищі без додавання ВСАА. Трансформація ж клітин мутанта порожнім вектором pAG426GPD не призводить до комплементарії ауксотрофного фенотипу

(рис. 2). Таким чином, клоновані нуклеотидні послідовності були здатні ефективно комплементувати мутації структурних генів *BAT1*, *BAT2* метаболізму ВСАА *S. cerevisiae*, вказуючи на те, що протеїни SIBCAT3 і SIBCAT4 мають амінотрансферазну активність.

Зелений флуоресцентний протеїн було використано як маркер для виявлення субклітинної локалізації протеїнів та встановлення їхньої можливої функції. Було синтезовано дві конструкції SIBCAT3-GFP і SIBCAT4-GFP, які містили химерні гени, одержані внаслідок злиття послідовності гену *GFP* із кодуючою послідовністю відповідного гену амінотрансферази, під контролем промотору 35S. Конструкції було введено в протопласти тютюну за допомогою ПЕГ-обумовленої трансформації. Оцінка транзйентної експресії SIBCAT3-GFP і SIBCAT4-GFP протеїнів, проведена за допомогою конфокальної мікроскопії, виявила, що в обох випадках GFP сигнал локалізований у хлоропластах (рис. 3). Дослідження, проведені раніше на *Spinacia oleracea* і *Arabidopsis thaliana* показали, що ВСАА синтезуються у хлоропластах, тоді як деградація їх відбувається в мітохондріях [16, 17]. Таким чином, внутрішньоклітинна локалізація *BCAT3* та *BCAT4* амінотрансфераз томата у хлоропластах вказує на можливу участь їх у процесі біосинтезу ВСАА.

Для подальшого розуміння ролі генів *BCAT3* та *BCAT4* в метаболізмі ВСАА було

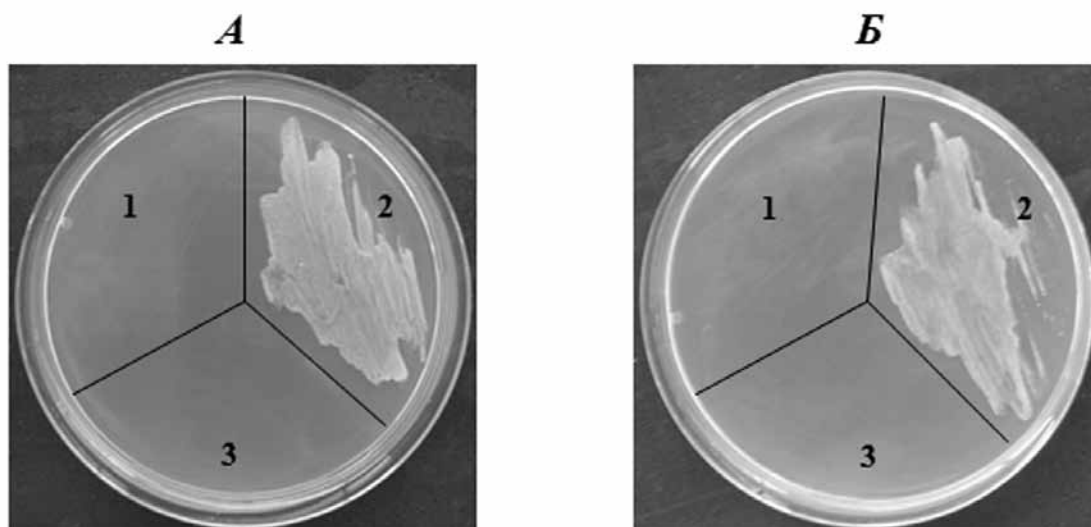


Рис. 2. Комплементарний аналіз SIBCATs у мутанті дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* – $\Delta bat1/\Delta bat2$, дефектному за амінотрансферазною активністю. А, Б – комплементарний тест *BCAT3* та *BCAT4* відповідно. 1 – нетрансформовані клітини мутанта $\Delta bat1/\Delta bat2$; 2 – трансформація вектором pAG426GPD, що містив послідовність *BCAT3*; 3 – трансформація порожнім вектором pAG426GPD

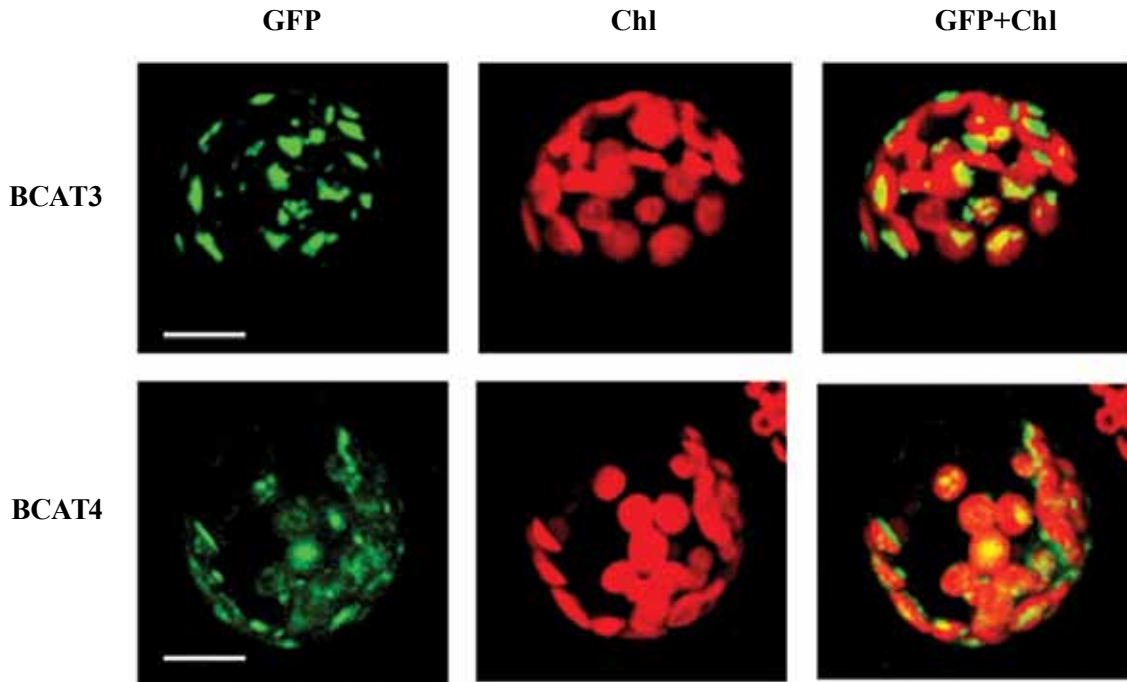


Рис. 3. Конфокальномікроскопічний аналіз мезофільних протопластів тютюну, що експресують химерні протеїни *BCAT3-GFP*, *BCAT4-GFP*. *GFP* – зелений флуоресцентний протеїн. *Chl* – автофлуоресценція хлорофілу, *GFP+Chl*-об'єднане зображення автофлуоресценції хлорофілу і *GFP*. Масштаб – 10 мкм

проведено аналіз їх експресії в окремих органах томата та на різних стадіях розвитку плодів шляхом ПЛР в реальному часі (qRT-PCR). Було встановлено, що гени *BCAT3* і *BCAT4* мРНК, присутні в усіх типах тканин, які вивчалися, значно варіювали за рівнем експресії. В цілому рівень експресії *BCAT3* був значно вищим порівняно з рівнем експресії *BCAT4*. Якщо експресія *BCAT3* не зазнавала значних коливань і була практично однаковою в листках, стеблах, квітках чи плодах, то експресія *BCAT4* істотно змінювалася залежно від типу тканини. Найменшу кількість транскрипту *BCAT4* було знайдено в плодах на стадії 30 д.п.р.к., а найвищий рівень експресії було знайдено в квітках і плодах через 40 д.п.р.к. (рис. 4). Виявлені відмінності в експресії цих двох генів вказують на те, що амінотрансферази, які ними кодуються, можуть мати різну субстратну специфічність та відігравати різну роль у процесі розвитку рослин та в інших фізіологічних процесах. Наприклад, в *Arabidopsis thaliana* існує три ізоформи амінотрансфераз (*AtBCAT-2*, *-3* та *-5*), які локалізовано у хлоропластах і задіяно в біосинтезі амінокислот з розгалуженим ланцюгом [3]. Було встановлено, що експресійний профіль гену *AtBCAT-3* значно відрізняється від таких для генів *AtBCAT-2* та

AtBCAT-3 [18]. Подальші дослідження довели, що ензим, який кодується *AtBCAT-3*, виконує подвійну функцію: він задіяний не тільки в біосинтезі ВСАА, але й бере участь у синтезі глюкозинолатів [17].

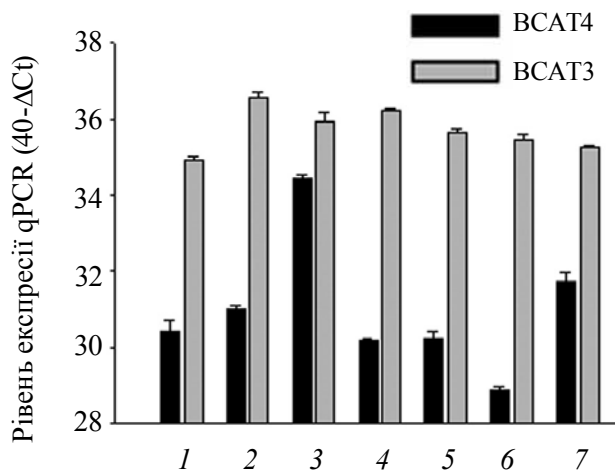


Рис. 4. Аналіз експресії генів *BCAT3* і *BCAT4* за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі (qPCR). 1 – стебла; 2 – листки; 3 – квітки; 4 – плоди через 10 днів після розкриття квітки (д.п.р.к.); 5 – через 20 д.п.р.к.; 6 – через 30 д.п.р.к.; 7 – через 40 д.п.р.к.

Для вивчення каталітичних особливостей ензимів нами були сконструйовані генетичні конструкції для експресії рекомбінантного протеїну, що містив додатково введenu гексагістидинову послідовність на С-кінці. Така генетична модифікація протеїну дозволяє його виділяти і очищати за допомогою металхелатуючої хроматографії. Експресію рекомбінантних протеїнів проводили в $\Delta bat1/\Delta bat2$ мутанті *S. cerevisiae*. Після очистки на Ni-NTA-агарозі під час електрофорезу протеїнів було виявлено одну головну смугу із Mm 43 кДа, що відповідає цільовому протеїну з гексагістидиновою послідовністю (рис. 5).

Оскільки обидві ізоформи локалізовані у хлоропластах, амінотрансферази ВСАТ3 і ВСАТ4 задіяні в біосинтезі ВСАА. У зв'язку з цим субстратну специфічність очищених рекомбінантних протеїнів у реакції трансамінації досліджували в інкубаційному середовищі, яке містило α -кетокислоти із розгалуженим ланцюгом (КІС, КМВ, КІВ), що є попередниками ВСАА. Обидві ізоформи ВСАТ3 і ВСАТ4 здатні трансамінувати всі три типи субстратів, хоча їхня трансаміназна активність істотно відрізняється. ВСАТ3 як і ВСАТ4 виявляє вищу специфічність до КМВ. ВСАТ4 майже однаково добре трансамінує КІС і КІВ, тоді як специфічність ВСАТ3 до КІС у 2 рази вища, ніж до КІВ (табл. 2).

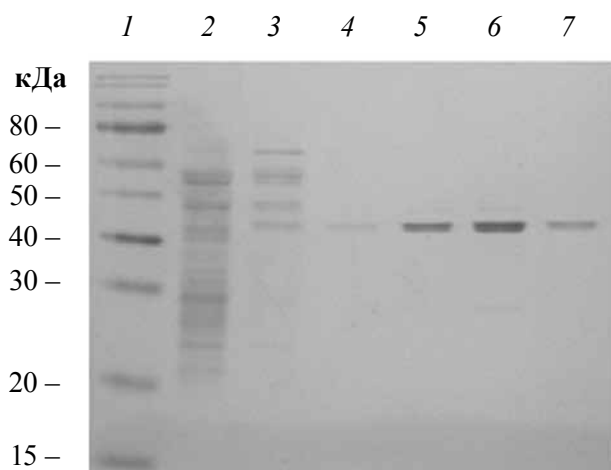


Рис. 5. Електрофореграма фракцій хроматографічного виділення ВСАТ-*His6*, розділених у 12%-му ПААГ-SDS. 1 – маркери молекулярної маси; 2 – клітинний лізат; 3 – протеїнова фракція, яка не зв'язалася з Ni-NTA-агарозою; 4 – фракція відмивання; 5, 6, 7 – очищений рекомбінантний протеїн

Таблиця 2. Кінетичні параметри ВСАТ3, ВСАТ4. Значення константи Міхаеліса (K_m) і максимальної швидкості (V_{max}) реакції амінування для очищеної амінотрансферази томата ($M \pm m, n = 5$)

Ензим	α -Кето-кислоти	K_m , мМ	V_{max} , нМ/хв·мг протеїну
ВСАТ3	КІС	$0,38 \pm 0,01$	$114,8 \pm 1,55$
	КМВ	$0,26 \pm 0,01$	$121,6 \pm 2,08$
	КІВ	$0,81 \pm 0,05$	$145,5 \pm 2,99$
ВСАТ4	КІС	$0,45 \pm 0,02$	$124,4 \pm 2,34$
	КМВ	$0,24 \pm 0,03$	$97,25 \pm 3,37$
	КІВ	$0,60 \pm 0,02$	$167,8 \pm 1,55$

КІС – кетоізокапронова кислота, КМВ – кетометилвалеріанова кислота, КІВ – кетоізовалеріанова кислота

Таким чином, одержані нами дані свідчать, що геном *S. lycopersicum* кодує дві амінотрансферази, які відіграють ключову роль у процесі біосинтезу ВСАА.

ИЗУЧЕНИЕ АМИНОТРАНСФЕРАЗ ТОМАТА *Solanum lycopersicum*, ЗАДЕЙСТВОВАННЫХ В БИОСИНТЕЗЕ АМИНОКИСЛОТ С РАЗВЕТВЛЕННОЙ ЦЕПЬЮ

А. С. Кочевенко^{1,2}, А. Р. Ферни²

¹Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев;

²Макс-Планк-Институт молекулярной физиологии растений, Гольм, Германия; e-mail: andkochevenko@gmail.com

В данном исследовании приведены доказательства участия ВСАТ3 и ВСАТ4 протеинов томата в биосинтетическом пути аминокислот с разветвленной цепью. С использованием ПДРФ-анализа (полиморфизма длины-рестриционных фрагментов) проведено картирование генов *ВСАТ3* и *ВСАТ4*. С помощью сканирующей микроскопии выявлено, что GFP-меченные протеины, кодируемые этими генами, локализованы в хлоропластах. Установлено, что данные изоформы аминотрансфераз демонстрируют различные кинетические характеристики и отличаются по уровню экспрессии их мРНК в разных типах тканей томата.

Ключевые слова: *Solanum lycopersicum*, аминокислоты с разветвленной цепью, аминотрансферазы, зеленый флуоресцентный белок, рекомбинантный белок.

INVESTIGATION OF TOMATO (*Solanum lycopersicum*) AMINOTRANSFERASES INVOLVED IN BIOSYNTHESIS OF BRANCHED-CHAIN-AMINO-ACIDS

A. S. Kochevenko^{1,2}, A. R. Fernie²

¹Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

²Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Golm, Germany; e-mail: andkochevenko@gmail.com

S u m m a r y

This study presents evidence for the role of BCAT3 and BCAT4 proteins in the synthesis of branched-chain-amino-acids in tomato *Solanum lycopersicum*. BCAT3 and BCAT4 genes were located on tomato chromosomal map by RFLP method (restriction fragment length polymorphism). Using confocal microscopy it was shown that BCAT3-GFP and BCAT4-GFP fusion proteins were localised in chloroplasts. It was observed that these aminotransferase isoforms exhibited distinct kinetic properties and a differential expression pattern of mRNA levels in various tomato tissues.

Key words: *Solanum lycopersicum*, branched-chain-amino-acids, aminotransferases, green fluorescent protein, recombinant protein.

1. Gibson K. M., Lee C. E., Hoffmann G. E. // Eur. J. Pediatr. – 1994. – **153**. – P. S62–S67.
2. Maltrasi M., Corradi M., Svensson J. T. et al. // Theor. Appl. Genet. – 2006. – **113**. – P. 965–976.

3. Diebold R., Schuster J., Daschner K., Binder S. // Plant Physiol. – 2002. – **129**. – P. 540–550.
4. Campbell M. A., Patel J. K., Meyers J. L. et al. // Plant Physiol. Biochem. – 2001. – **39**. – P. 855–860.
5. Chang C. S., Ha C. W. // Korean Bioch. J. – 1977. – **10**, N 153. – P. 279–288.
6. Кочевенко А. С., Ферні А. Р. // Доповіді НАН України. – 2011. – № 7. – С. 161–165.
7. Doyle J. J., Doyle J. L. // Focus. – 1990. – **12**. – P. 13–15.
8. Southern E. M. // J. Mol. Biol. – 1975. – **98**. – P. 503–517.
9. Feinberg A.P., Vogelstein B. // Anal. Biochem. – 1983. – **132**. – P. 6–13.
10. Paszkowski J., Shillito R. D., Saul M. et al. // EMBO J. – 1984. – **3**. – P. 2717–2722.
11. Gietz R. D., Schiestls R. H., Willems A. R., Woods R. A. // Yeast. – 1995. – **11**. – P. 355–360.
12. Leammli U. K. // Nature. – 1970. – **227**. – P. 680–685.
13. Schadewaldt P., Adelmeyer F. // Anal. Bioch. – 1996. – **238**. – P. 65–71.
14. Bradford M. M. // Anal. Biochem. – 1976. – **72**. – P. 289–292.
15. Kispal G., Steiner H., Court D. A. et al. // J. Biol. Chem. – 1996. – **271**, N 40. – P. 24458–24464.
16. Hagelstein P., Sieve B., Klein M. et al. // J. Plant. Phys. – 1996. – **150**. – P. 23–30.
17. Knill T., Schuster J., Reichelt M. et al. // Plant. Phys. – 2008. – **146**. – P. 1028–1039.
18. Schuster J., Binder S. // Plant. Mol. Biol. – 2005. – **57**. – P. 241–254.

Отримано 06.07.2011