

Н.П. МАЛАХОВА, Г.А. ИСМАГУЛОВА, Ю.А. СКИБА, Н.А. АЙТХОЖИНА

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОДУКТА ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ХИТИНАЗЫ ПОЛУЧЕННОГО ИЗ КАЗАХСТАНСКОГО СОРТА ПШЕНИЦЫ СТЕПНАЯ 15

Ранее из казахстанской пшеницы сорта Степная 15 нами была клонирована кДНК гена хитиназы и получен полипептид длиной 319 аминокислотных остатков. Методом биоинформационного анализа изучены особенности строения предполагаемого белка на первичном, вторичном и третичном уровнях организации. Определены основные структурные элементы белка, хитин-связывающий домен, каталитический домен и шарнирный участок. Предполагаемый белок был определен как хитиназа I класса. Этот белок принадлежит к основным формам хитиназ, относящихся к 19 семейству гликозил – гидролаз и, предположительно содержащий в своем составе 1 хитин-связывающий домен, характерный для 18 семейства хитин-связывающих модулей.

Хитиназы представляют собой большую и разнообразную группу PR-белков, которые различаются не только пространственной и временной активностью, но и структурой молекул и их специфичностью к субстрату. Растительные хитиназы обладают свойствами основных и кис-

лых белков, и были найдены во всех органах и тканях растений [1,2]. По классификационной системе гликозил – гидролаз, хитиназы принадлежат 18 и 19 семействам, на основе сходства последовательностей их каталитических доменов. Внутри этих двух семейств, хитиназы под-

разделяются на семь классов по принципу сходства их аминокислотного состава, структуры, энзиматических свойств и внутриклеточной локализации. Хитиназы I, II, IV, VI, и VII классов относятся к 19 семейству, тогда как хитиназы III и V классов составляют 18 семейство [3]. При определении класса, к которому принадлежит фермент хитиназы, учитывается наличие или отсутствие сигнального пептида на N-конце, присутствие каталитического и хитин-связывающего доменов в составе белка, а также наличие шарнирного региона, соединяющего каталитический домен с хитин-связывающим доменом. На сегодняшний день более 100 генов и белков хитиназ были идентифицированы в различных растениях [3,4].

Материалы и методы. Биоинформационный анализ полученных и предполагаемых результатов, а также выравнивание аминокислотных последовательностей проводили при помощи программы Vector NTI Suite 9.0, и в предоставляемых Интернет-ресурсами базах данных в режиме он-лайн на сайтах: BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> и <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Gen-bank>), UniProtKB (<http://www.uniprot.org>), SwissModel (<http://swissmodel.expasy.org>), ExPASy (<http://www.expasy.ch/prosite>). Анализ вторичной структуры проводили при помощи он-лайн сервисов Swiss-Model (<http://cn.expasy.org>) и PDBsum. Компьютерное моделирование трехмерной структуры клонированного белка проводилось в режиме он-лайн инструментом SwissModel с последующей визуализацией в программе WebLab ViewerLite. Построение филогенетического дерева проводили в программе CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

Результаты и обсуждение. Ранее из казахстанской пшеницы сорта Степная 15 нами был клонирован ген хитиназы *ChitSt15*, с которого был экспрессирован полипептид длиной 319 аминокислотных остатков. Нами проведен сиквенс первичной последовательности клонированного гена с последующим сравнительным анализом выравнивания нуклеотидных последовательностей генов других организмов, который показал высокую степень ее гомологии с генами хитиназ I класса, а также наличие 27 нуклеотидных замен по сравнению с исходной последова-

тельностью гена хитиназы пшеницы I класса *ChiI* (GenBank AY437443).

В программе Vector NTI Suite 9.0 нами была получена предполагаемая аминокислотная последовательность клонированного белка хитиназы *ChitSt15*. Расчетная молекулярная масса белка была определена около 34 кДа, рI=7,02. Предполагаемый заряд белка при нейтральном pH составляет 0,04. Кроме того, с помощью программы BLASTN определено местоположение пяти несинонимичных замен в аминокислотной последовательности белка *ChitSt15* по сравнению с *ChiI* (UniProtKB Q6T484_Wheat). Значимость обнаруженных аминокислотных замен была определена при изучении пространственной структуры белка.

Множественное выравнивание полных последовательностей хитиназ, представленных в базе данных NCBI с полученной аминокислотной последовательностью *ChitSt15* проводили с помощью алгоритма ClustalX. Данные выравнивания 4-х наиболее гомологичных аминокислотных последовательностей белков хитиназ разных видов растений с аминокислотной последовательностью белка *ChitSt15* приведены на рис. 1. Полученные результаты показали высокую степень внутриклассовой гомологии в консервативных участках аминокислотных последовательностей белков хитиназ I класса у разных видов растений. Как показано на рис. 1, предполагаемая аминокислотная последовательность изучаемого белка *ChitSt15* точно совпадает по составу с первичными последовательностями хитиназ I класса других растений в области участков, являющихся высоко консервативными – каталитического и хитин-связывающего доменами.

Анализ выравнивания аминокислотной последовательности белка *ChitSt15* позволил определить регионы гена, кодирующие основные структурные единицы белка хитиназы: N-концевая сигнальная последовательность длиной 21 а.к. (1 – 21), кодирующая сигнальный пептид, необходимый для направления белка по секреторному пути, хитин-связывающий домен длиной 29 а.к. (22 – 50), шарнирный регион длиной 34 а.к. (51 – 84) и каталитический домен, длиной 234 а.к. (85 – 319).

Шарнирный регион белка *ChitSt15* содержит 8 остатков глицина, что аналогично данным о

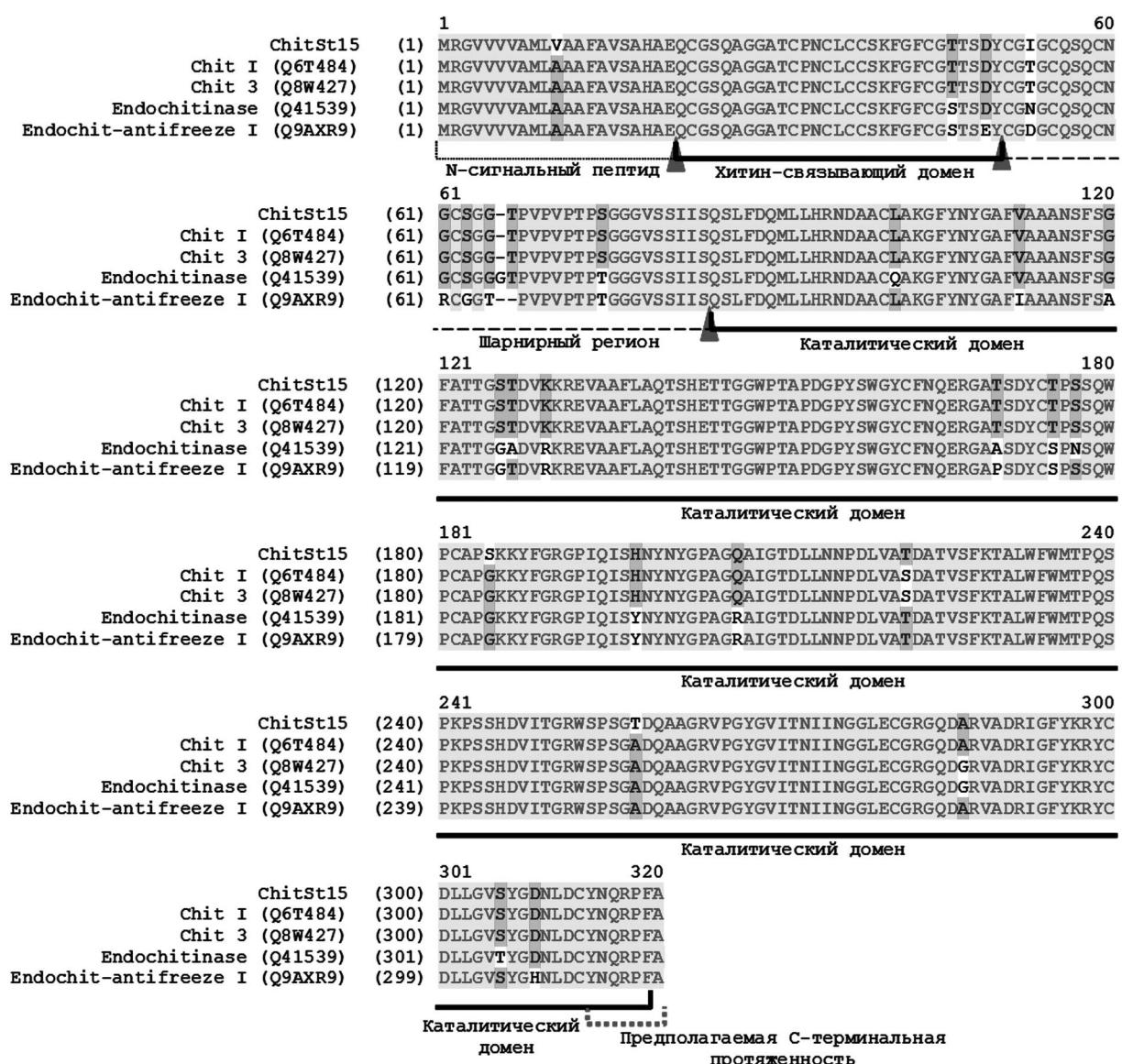


Рис. 1. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей клонированного белка ChitSt15 с последовательностями белков других организмов

строении шарнирного участка у хитиназ I класса, как показано в работе Sticher L. с сотрудниками [5]. В качестве одной из характерных особенностей в составе структуры шарнирного региона белков хитиназ I класса отмечается наличие у них большого содержания глициновых либо пролиновых остатков.

Для белков хитиназ I класса так же характерно наличие N-концевой сигнальной последовательности, хитин-связывающего домена в составе белковой молекулы, соединенного с катализитическим доменом, широко вариабельным у хитиназ разных видов растений шарнирным регионом.

Представлены аминокислотные последовательности: ChitSt15 – белка – продукта клонированного гена хитиназы сорта Степная 15; ChitI (GenBank AY437443.1) – белка хитиназы пшеницы I класса яровой пшеницы китайского сорта Ning 7840; ChitIII (GenBank BAB82473) – белка хитиназы 3 пшеницы *T. aestivum*; Endochit-antifreezeI (GenBank AAG53609) – антифризного белка эндохитиназы ржи *Secale cereale* I класса; Endochitinase (GenBank CAA53626) – белка эндохитиназы пшеницы *T. aestivum*.

Кроме того, в составе катализитического домена нами была предположительно обнаружена в позиции 313 – 319 протяженность длиной в 7

а.к. на С-терминальном конце белка. Наличие такой протяженности является одной из особенностей хитиназ I класса [6]. Предполагается, что С-терминальная протяженность является пептидом, необходимым для направления хитиназы в вакуоль.

Детальный сравнительный анализ мутаций в нуклеотидных последовательностях клонированного гена и 4-х наиболее гомологичных аминокислотных последовательностей белков из разных видов растений генов (рис.1), показал наличие замены Ala[11] =>Val, расположенной в высоко консервативной области, N-сигнального пептида белка. Однако основная функциональная нагрузка на пептид в связи с этой заменой не изменится, так как обе эти алифатические аминокислоты являются гидрофобными и их полярность практически одинакова

Следующая замена аминокислот Thr[53]=>Ile была отмечена в шарнирном регионе белка Chit St15, в области наиболее сильно варьирующей у разных хитиназ. Thr является нейтральной аминокислотой, в то время как Ile относится к алифатическим гидрофобным аминокислотам. Мы можем предположить, что замены такого рода, вероятно, могут несколько изменить полярность шарнирного участка молекулы и привести к усилению скручивания ее спирали за счет приобретения ею гидрофобности, как было отмечено нами при анализе вторичной структуры молекулы клонированного белка ChitSt15.

Замены аминокислот Gly[184]=>Ser, Ser[221]=>Thr и Ala[257]=>Thr были отмечены в высоко консервативном каталитическом домене белка. Учитывая то, что глицин является простейшей алифатической низкополярной аминокислотой, а серин относится к нейтральным аминокислотам, можно допустить, что такая замена не имеет значительных последствий для конформации предполагаемого белка ChitSt15. Замена в 221 позиции каталитического домена нейтральной аминокислоты серина на треонин, вероятно так же не повлияет на основные функциональные свойства домена. Последняя замена, найденная в каталитическом домене белка ChitSt15 алифатической аминокислоты на нейтральную аминокислоту треонин, не может привести к значительным изменениям в конформации и функциональной активности белка.

При анализе множественного выравнивания аминокислотной последовательности клонированного белка хитиназы ChitSt15 с последовательностями известных хитиназ для определения близкородственных белков нами была обнаружена его 97% степень гомологии с белками хитиназы I класса пшеницы *T. aestivum* (UniProtKB Q6T484_WHEAT) и к хитиназе 3 пшеницы *T. aestivum* (UniProtKB Q8W427_WHEAT). Кроме того, 94% гомологии к ChitSt15 имеет эндохитиназа I класса ржи *S. cereale* (UniProtKB Q9AXR9_SECCE). Степень гомологии эндохитиназы A табака *N. tabacum* (UniProtKB CHITTOBAC), основной эндохитиназы арабидопсиса *A. thaliana* (UniProtKB CHIB-ARATH) и хитиназы картофеля *S. tuberosum* UniProtKB CHIT_SOLTU), к ChitSt15, соответственно, составляет около 70%. В то же время проведенный анализ показал низкую степень гомологии к аминокислотным последовательностям белков хитиназ других классов. Эти данные подтверждают принадлежность полученного нами белка к хитиназам I класса.

Высокий полиморфизм аминокислотных последовательностей сравниваемых хитиназ, по видимому, обусловлен особенностями взаимодействия белка с определенными типами субстрата, а так же различными регуляторными агентами белковой природы, специфичными для разных видов организмов. Однако, несмотря на показанную выше вариабельность существующую в аминокислотных последовательностях, нами также был отмечен высокий процент гомологии функционально- и структурно – значимых участков хитиназы, известных как консервативные области.

При обработке полученных данных в программе CLUSTAL W состава аминокислотной последовательности белка клонированного гена хитиназы ChitSt15 было расчитано и построено филогенетическое древо (рис.2).

По степени гомологии аминокислотных последовательностей нами произведена оценка эволюционного расстояния между белками разных видов растений, к которым принадлежат сравниваемые организмы, и определена степень сродства клонированного белка хитиназы пшеницы казахстанского сорта Степная 15 с хитиназами других видов растений. Исходя из данных представленных в дендрограмме видно, что клонированная нами последовательность находится в

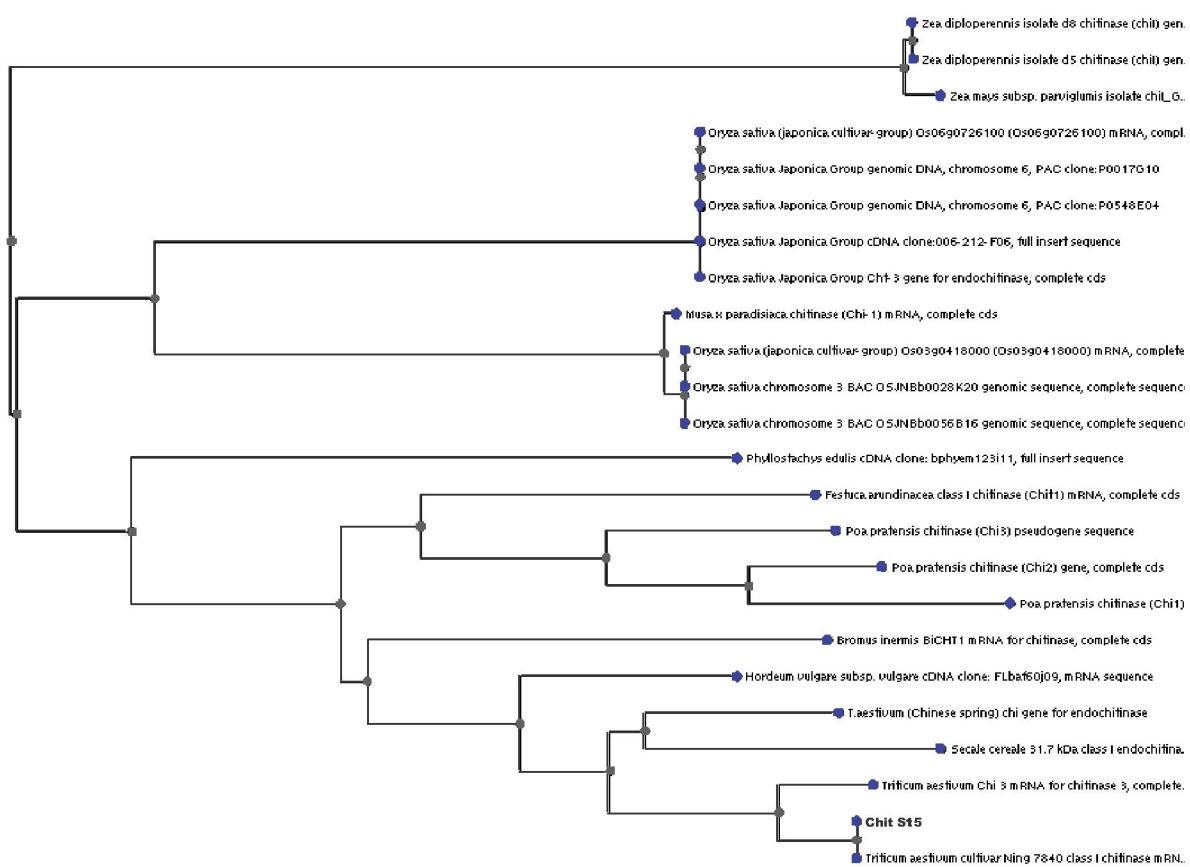


Рис. 2. Филогенетическое дерево для белка клонированного гена хитиназы Chit St15.

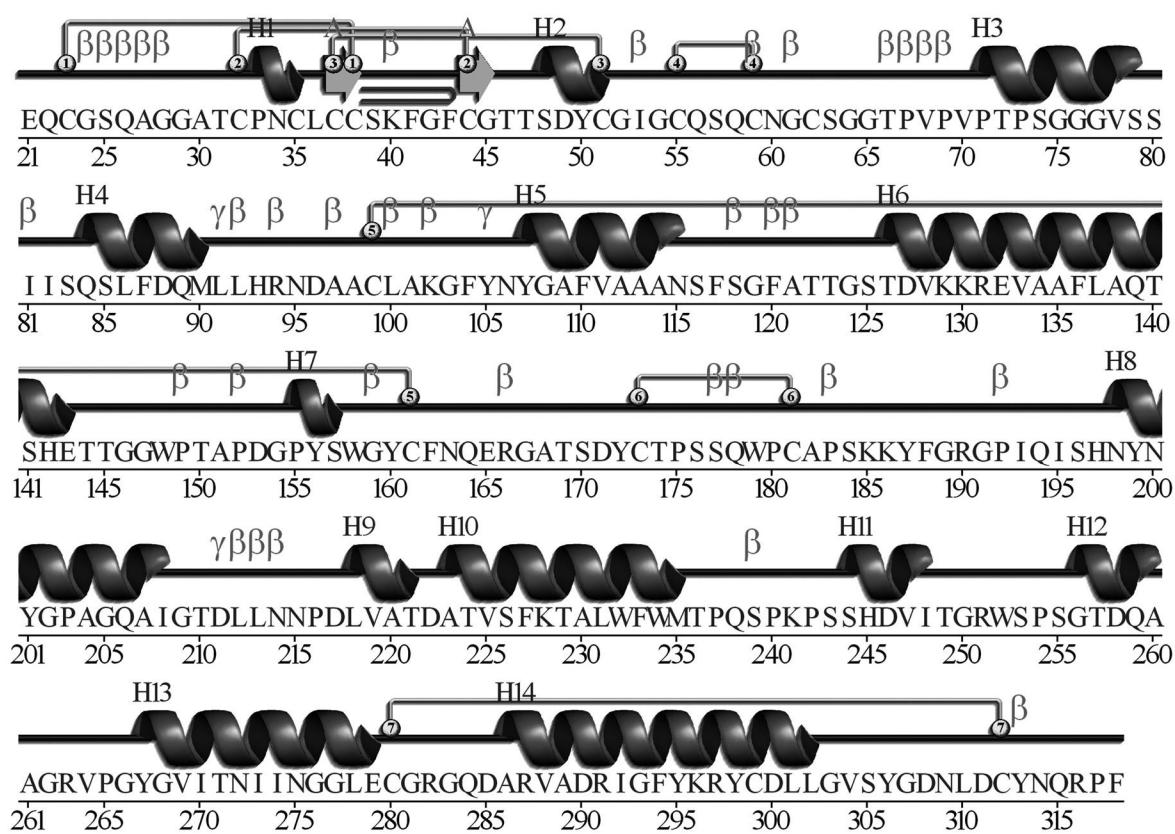
эволюционно – близкородственных отношениях с хитиназами пшеницы *Triticum aestivum*, кодирующими эндохитиназу I класса пшеницы, а также с хитиназами I класса других злаковых культур – ржи и ячменя.

Вторичная структура белка

Определение предполагаемой вторичной структуры клонированного белка ChitSt15 показало, что на этом уровне организации происходит формирование 14 б-спиралей, множества в-складчатых структур разной длины и двух г-поворотов, как представлено на рисунке 3. Кроме того, в составе вторичной структуры белка было обнаружено 14 каталитических остатков цистеина, отвечающих за образование 7 дисульфидных связей.

Вторичная структура хитин-связывающего домена клонированного белка Chit St15 содержит две б-спирали, небольшую в-шпильку, образованную остатками 4 аминокислот и, как показано на рис.3, четыре дисульфидные связи, образованные цистеиновыми остатками в позициях Cys23 и

Cys38, Cys32 и Cys44, Cys37 и Cys51, Cys55 и Cys59. 4 аминокислотных остатка формируют в-шпильку, вследствие чего стабилизируются водородные связи внутри домена. Такое сложное и компактное строение хитин-связывающего домена может объясняться его специализацией, основной функцией которого является связывание белка с хитиновым субстратом и притягивание к нему каталитического домена. Как известно роль хитин-связывающего домена заключается в строгой ассоциации каталитического домена с поверхностью полимерного субстрата, клеточной стенки патогена, обеспечивая тем самым возможность гидролиза множества соседних хитиновых цепей [6]. При отсутствии хитин-связывающего домена, каталитический домен диффундирует от поверхности клеточной стенки после однократного расщепления. В этом заключена разница в поведении хитиназ I и II классов. Хитиназы I класса, присоединяясь к поверхности клеточной стенки гриба, расщепляют большее количество хитиновых цепей, тогда как хитина-



Элементы вторичной структуры: - α -спирали и β -листы;

H1, H2 - номер спирали; **A** - складка аминокислотной цепи

Мотивы: β - бета поворот; γ - гамма поворот; - шпилька

Дисульфидные связи: - дисульфидная связь и ее порядковый номер

Рисунок 3. Вторичная структура белка Chit St15 в он-лайн сервисе SwissModel и PDBsum

зы II класса отсоединяются после однократного отщепления.

Каталитический домен белка хитиназы содержит одиннадцать β -спиралей, несколько в-складчатых структур и два γ -поворота спирали расположенных на разных участках этого домена. Обнаружены три дисульфидные связи образованные цистеинами в позициях: Cys[99] и Cys[161], Cys[173] и Cys[181], Cys[280] и Cys[312] служат для поддержания третичной структуры белка.

В петлеобразной структуре в-складчатого слоя каталитического домена белка были найдены 2 каталитических остатка глутамина в положении Glu[123] и Glu[145], необходимых для обеспечения каталитической активности белка

и наделяющих его способностью к связыванию с хитиновым субстратом. По данным, полученным из литературных источников, такое расположение глутаматов является классически консервативным для хитиназ I класса. Наличие двух глутаматов в каталитическом центре белка было экспериментально определено в кристаллической структуре хитиназы С II класса зерна ячменя белка, а так же хитиназы I класса А табака, хитиназ картофеля, томата и сосны Веймутова *Pinus strobus* [7,8]. Расположение глутаматов в каталитическом центре домена было определено для хитиназ разных классов принадлежащих 18-ому и 19-ому семействам гликозил-гидролаз, а так же у лизоцимов [9,10]. Дистанция между этими каталитическими остатками составляет 22

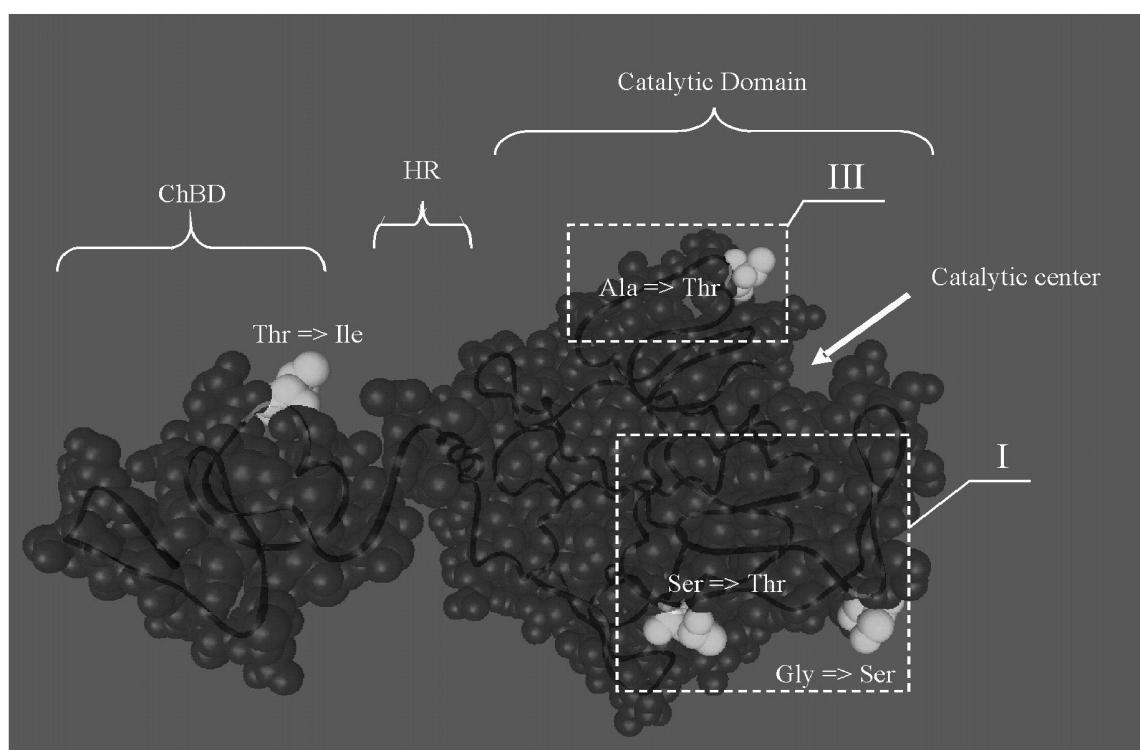


Рисунок 4. 3D структура белка хитиназы Chit St15 в режиме он-лайн сервиса Swiss-Model и в программе WebLab ViewerLite

аминокислоты, что точно соответствует размерам субстрата с одной молекулой воды, с которым связан фермент. Как отмечено выше, такое расстояние каталитических остатков абсолютно идентично расположению глутаматов Glu[123] и Glu[145] в аминокислотной последовательности клонированного нами белка.

Третичная структура

При помощи компьютерного анализа нами была получена глобулярная структура, состоящая из двух доменов, связанных шарнирным регионом (рисунок 4). Структура каталитического домена клонированного белка хитиназы ChitSt15 в виде б-спирали формирует глобулярный домен с желобком, в котором находятся каталитические остатки двух глутаматов – Glu[123] и Glu[145]. Эти два глутаминовых остатка, расположенные по обеим сторонам желобка друг против друга, обладают способностью к связыванию с молекулами хитина. При этом их расположение таково, что расстояние между ними точно соответствует размерам связываемого субстрата.

Каталитический домен белка хитиназы ChitSt15 содержит четыре петли, расположенные

на разных участках этого домена, что является характерной особенностью 18-го семейства хитин-связывающих модулей. 1-я и 2-я петли расположены по обеим сторонам каталитического желобка, тогда как 3 и 4 петли расположены рядом на поверхности белка на достаточном удалении от каталитического центра. Расположение и функции 1-ой петли связывают с усилением степени сродства каталитического домена к субстрату и обеспечением дополнительного сахаросвязывающего сайта в нем. Предполагается, что 2-я петля домена обладает способностью закрывать каталитический желобок в тоннель, удерживая тем самым субстрат внутри. Наличие этих двух петель является одним из важных признаков классификации хитиназ, по которому клонированный нами белок можно отнести к хитиназам I класса. 4-я петля, предположительно представляющая собой C-концевой регион исследуемого белка ChitSt15, следует за последним цистеином, образующим дисульфидную связь, что согласуется с данными Neuhaus J.M [6]. При этом 3-я петля удерживает 4-ю на месте таким образом, что C-конец 4-й петли располагается на поверхности белка.

ChBD – хитин-связывающий домен, HR – шарнирный регион, Catalytic Domen – каталитический домен, Catalytic center – каталитический центр белка, Thr =>Ile; Ala =>Thr; Ser =>Th; Gly =>Ser – аминокислотные замены. I, III – петли каталитического домена. Желтым цветом отмечены аминокислотные замены.

С большой степенью достоверности можно предположить, что замены аминокислотных остатков в белке ChitSt15, найденные при его анализе выравнивания аминокислотных последовательностей с гомологичными белками, вероятно не привели к изменению конформации белка и, как следствие этого, предположительно не влияют на функциональную активность хитиназы ChitSt15 (рисунок 4). Вероятно, эти замены могут влиять на регуляцию активности хитиназы, вызывая либо усиление, либо ослабление функции белка. При анализе строения каталитического домена исследуемого белка в ресурсе Swiss-Model была определена его принадлежность 18-ому семейству хитин-связывающих модулей и к 19-ому семейству гликозил – гидролаз.

Таким образом, было изучена структурная организация белка ChitSt15 – продукта клонированного нами ранее гена хитиназы I класса пшеницы казахстанского сорта Степная 15. Предполагаемый белок определен как эндохитиназа I класса, длиной в 319 аминокислот, с расчетной молекулярной массой 34 кДа и рН 7,02. Заряд белка при нейтральном рН составляет 0,04. Этот белок был отнесен к 19-ому семейству гликозил – гидролаз, содержащих в своем составе 1 хитин-связывающий домен, соответствующий 18-ому семейству хитин-связывающих модулей.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. Singh, I.Kirubakaran, N. Sakthivel. Heterologous expression of new antifungal chitinase from wheat // Protein Expression and Purification. 2007. 56, 100-109.
2. A. Kasprzewska. Plant chitinases – regulation and function // Cellular and Molecular biology letters. 2003. 8. 809-824.
3. Neuhaus,J-M., Fritig B., Linthorst H.J.M., Meins F. Jr., Mikkelsen J.D. and Ryals J. A revised nomenclature of chitinase genes // Plant Mol.Biol.Rep. 1996. 14, 102-104.
- 4 Liu, J.-J., Ekramoddoullah, A. K. M., and Zamani, A. A class IV chitinase is up-regulated by fungal infection and abiotic stresses and associated with slow-canker-growth resistance to

Cronartium ribicola in western white pine (*Pinus monticola*) // Phytopathology. 2005. 95, 284-291.)

5. Sticher L., Hofsteenge J., Milani A., Neuhaus J.M. and Meins F.Jr. Vacuolar chitinases of tobacco: a new class of hydroxyproline-containing proteins // Science..1992. 257, 655.

6. Neuhaus, J.M.. Plant chitinases, Pathogenesis-Related Proteins in Plants. // CRC Press, Boca Raton. 1999. pp. 77–105.

7. Hart P.J., Monzingo A.F., Ready M.P., Ernst S.R., Robertus J.D. Crystal structure of an andochitinase from *Hordeum vulgare* L. seeds // J. Mol.Biol.. 1993.229,189.

8. Hart P.J., Pfluger H.D., Monzingo A.F., Hollis T., Robertus J.D. The refined crystal structure of an endochitinase from *Hordeum vulgare* L. seeds at 1.8 angstrom resolution// J.Mol.Biol. 1995. 248, 402.

9. Andersen M.D., Jensesn A., Robertus J.D., Leah R., Skriver J.K. Heterologous expression and characterization of wild-type nad mutant forms of a 26kDa endochitinase from barley (*Hordeum vulgare* L.)// Biochemical J.. 1997. 322 (Part 3), 815.

10. Iseli – Gamboni B., Boller T., Neuhaus J.-M.. Mutation of either of two essential glutamates converts the catalytic domain of tobacco class I chitinase into a chitin-binding domain // Plant Sci., 1998 134, 45.

Резюме

Осыдан бұрын бізбен қазақстандық Степная 15 бидай сортынан хитиназа генінің кДНК-сы клондалынды және ұзындығы 319 аминқышкылы қалдықтарынан тура-тын полипептид алынды. Биоакпараттық талдау әдісінің көмегімен болжамды ақызы құрылымының ерекшеліктері құрылымның біріншілік, екіншілік және үшіншілік деңгейінде зерттелді. Ақыздың негізгі құрылымдық элементтері, хитин-байланыстыруыш домені, каталитикалық домені және шарнирлі участкесі анықталынды. Болжамды ақызы I кластиң хитиназасы ретінде анықталды. Бұл ақызы гликозил-гидролазаның 19 тұқымдастығына жататын хитиназаның негізгі формасы және болжамды түрде оның құрамында 18 тұқымдастығының хитин-байланыстыруушы модельіне тән 1 хитин-байланыстыруушы домені бар.

Summary

Previously we have cloned chitinase cDNA from Kazakhstani wheat “Stepnaya 15”.and the corresponding 319 amino acids protein was extracted. Bioinformatics methods were applied to determine protein structure on primary, secondary and tertiary levels of organization and characterize its main structural domains e.g. chitin-binding domain, catalytic and hinged region. Supposed protein was identified as chitinase I base forms of chitinase 19 family of glycozyl-hydrolases and presumably contains just the only one chitin-binding domain of 18th chitin-binding modules family.

Институт молекулярной биологии
и биохимии им. М.А. Айтхоксина,
г. Алматы

Поступила 03.02.2010 г.