

Секция «Биоинженерия и биоинформатика»

Создание белка-субстрата фитаспазы с улучшенным сайтом гидролиза.

Балакирева Анастасия Васильевна

Студент

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: anasteya@bk.ru

Агробактерии – фитопатогенные микроорганизмы, трансформирующие растительные клетки в процессе заражения. Трансформация происходит путем переноса части агробактериальной ДНК в растительную клетку и встраивания ее в растительную хромосому. Этот процесс осуществляется при помощи специальных белков вирулентности агробактерий. В частности, белок VirD2 присоединяется к переносимой ДНК и направляет ее в ядро растительной клетки. Ядерный транспорт этого комплекса обусловлен наличием сигнала ядерной локализации (NLS) в белке VirD2 [1].

В некоторых растениях в ответ на агробактериальное заражение развивается защитный ответ, осуществляемый ферментом фитаспазой - растительной аспарат-специфичной протеазой, являющейся аналогом апоптотических протеаз животных клеток. Вблизи С-конца VirD2 фитаспаза узнает последовательность TATD перед сигналом ядерной локализации белка и вносит одиночный разрыв после остатка аспарагиновой кислоты, отщепляя NLS и делая, таким образом, процесс трансформации невозможным [2].

Ранее на основе белка VirD2 был создан химерный белок-субстрат фитаспазы, представляющий собой зеленый флуоресцентный белок GFP, соединенный с С-концевым участком VirD2 [3]. Однако исследование специфичности фитаспазы с помощью синтетических пептидных флуорогенных субстратов показало, что последовательность TATD не является оптимальной для гидролиза. С гораздо большей эффективностью фитаспаза узнает последовательность VEID [4].

В задачу курсовой работы входило создание нового более эффективного белка-субстрата фитаспазы путем замены в белке GFP-VirD2 последовательности TATD на VEID. Для этого был осуществлен мутагенез гена GFP-VirD2 с помощью полимеразной цепной реакции. Мы убедились путем секвенирования, что полученная нами плаزمида действительно содержит желаемые мутации.

Затем полученной конструкцией трансформировали клетки *E. coli* и выделили из них рекомбинантный белок в индивидуальном состоянии при помощи аффинной хроматографии. Сравнение способности исходного белка и полученного мутанта гидролизоваться фитаспазой *in vitro* показало, что в результате введенных мутаций эффективность расщепления белка-мишени фитаспазой повысилась в несколько раз.

Литература

1. Чумаков М.И. Механизм агробактериальной трансформации растений. - Саратов:Издательство "Слово 2001.
2. Hwang H.-H., Kirankumar S. Mysore, Stanton B. Gelvin. Transgenic Arabidopsis plants expressing Agrobacterium tumefaciens VirD2 protein are less susceptible to Agrobacterium transformation. - Molecular Plant Pathology, 2006. 7(6) 473-484.

3. Chichkova N.V., Sang Hyon Kim, Elena S. Titova, Markus Kalkum, Vasiliy S. Morozov, Yuri P. Rubtsov, Natalia O. Kalinina, Micheal E. Taliansky, Andrey B. Vartapetian. A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. - *The Plant Cell*, 2004. Vol. 16, 157-171.
4. Nina V Chichkova, Jane Shaw, Raisa A Galiullina, Georgina E Drury, Alexander I Tuzhikov, Sang Hyon Kim, Markus Kalkum, Teresa B Hong, Elena N Gorshkova, Lesley Torrance, Andrey B Vartapetian, Michael Taliansky. Phytaspase, a relocalisable cell death promoting plant protease with caspase specificity. *The EMBO Journal* (2010) 29, 1149-1161.