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. ФЕРНІ*[2]

[1]*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ;*
[2]*Макс-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, BCAA), 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 BCAA 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 BCAA, 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 амінотрансамінази 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 BCAA. Ці піридоксаль-5′-фосфатзалежні трансамінази 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 Porablot (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 ([α-^{32}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 M NaCl, 0,05 M NaH_2PO_4, pH 7,7, 0,5 mM Na_2-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 листків 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 клоновано 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
GeneRacer 5′	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA
5RaceReBCAT3	AAAGCCAAAGCCAAGGTTATC
5RaceReBCAT4	GCTCAACTCAATATTCCCAAAAC
GeneRacer 3′	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG
3RaceFrBCAT3	TCTACCTGGAATTACGCGAAAAAG
3RaceFrBCAT4	GTTTTGGGAATATTGAGTTGAGCC
FrqRTUBI3	GGTTAAGCTCGCTGTGTTGCA
ReqRTUBI3	CGAAGCCTCTGAACCTTTCCA
FrqRTBCAT3	ACTGGAGGCGTTAAGACTATTGGA
ReqRTBCAT3	TAGCAGCACTCTGTGCCTTCAG
FrqRTBCAT4	TTCAGGTGGCGAGTTCTGCTAG
ReqRTBCAT4	CCAATGTTGTCCCAATCGATGT
FrGFPBCAT3	CACCATGGAGAGCGCCGCCGTATTT
ReGFPBCAT3	TTTGAGCTCAACAATCCAACCCAT
FrGFPBCAT4	CACCATGGAGAGCGGCGGCGTAT
ReGFPBCAT4	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 °C; 10 хв, 95 °C; 15 с, 95 °C; 1 хв, 60 °C, 40 циклів; 15 с, 95 °C; 20 с, 60 °C; 15 с, 95 °C. 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 субклоновано 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 аргоновий 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 комплементаційного аналізу повнорозмірні кодуючі послідовності генів *BCAT3*, *BCAT4* із стоп-кодоном, що знаходилися у проміжному векторі pENTR-SD-D-TOPO, було субклоновано у вектор pAG426GPD з використанням Gateway^R LR Recombinase (Invitrogen, Німеччина). Трансформацію клітин мутанта Δbat1/Δbat2 *Saccharomyces cerevisiae* конструкціями pAG426GPD-BCAT3, pAG426GPD-BCAT4 проводили згідно з протоколом [11]. Культивування здійснювали при 30 °C 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 кодують BCAT3-His6, BCAT4-His6 рекомбінантні протеїни, кодуючі нуклеотидні послідовності генів *BCAT3*, *BCAT4* без стоп-кодонів, що знаходились у векторі pENTR/D/-TOPO, було субклоновано у вектор pYES-DEST52. Плазміди pYES-DEST52-BCAT3, pYES-DEST52-BCAT4 вводили у штам Δbat1/Δbat2 *S. cerevisiae* за допомогою літієвого методу. Дріжджову культуру нарощували при 30 °C 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 °C. 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-HCl, pH 8,0 препарат ензиму одразу використовували для вимірювання активності або заморожували та зберігали при -80 °C.

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-HCl-буфер, pH 8,3; 300 мМ глутамінової кислоти, 0,2 мМ NADH, 0,1 мМ піридоксаль-фосфату, 0,5–4 мМ відповідної кетокислоти (KIC, кетоізокапронової кислоти; KMV, кетометилвалеріанової кислоти;

KIV, кетоізовалеріанової 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 BCAT. 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 BCATs томата було використано наступний підхід: спочатку після аналізу кДНК бібліотеки томата було ідентифіковано декілька клонів, що згідно з анотацією кодують BCATs. Вставку кДНК відібраних EST-клонів було проаналізовано сиквенуванням. За результатами аналізу було ідентифіковано два клони (cTOF24N6, cLEC37H2), що дійсно містили різні нуклеотидні послідовності гомологічні послідовностям амінотрансферази амінокислот із розгалуженим ланцюгом *Arabidopsis thaliana*. Наявність цих кДНК послідовностей дозволила локалізувати гени *BCAT3*, *BCAT4* 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 M82) з його диким родичем *S. pennellii* (LA 716). Поліморфізм між батьківськими видами кожного із генів *BCAT3* і *BCAT4* було знайдено з використанням ендонуклеаз *Hind*III і *Bfr*I відповідно. Внаслідок саузерн-блот-гібридизації ген *BCAT3* було

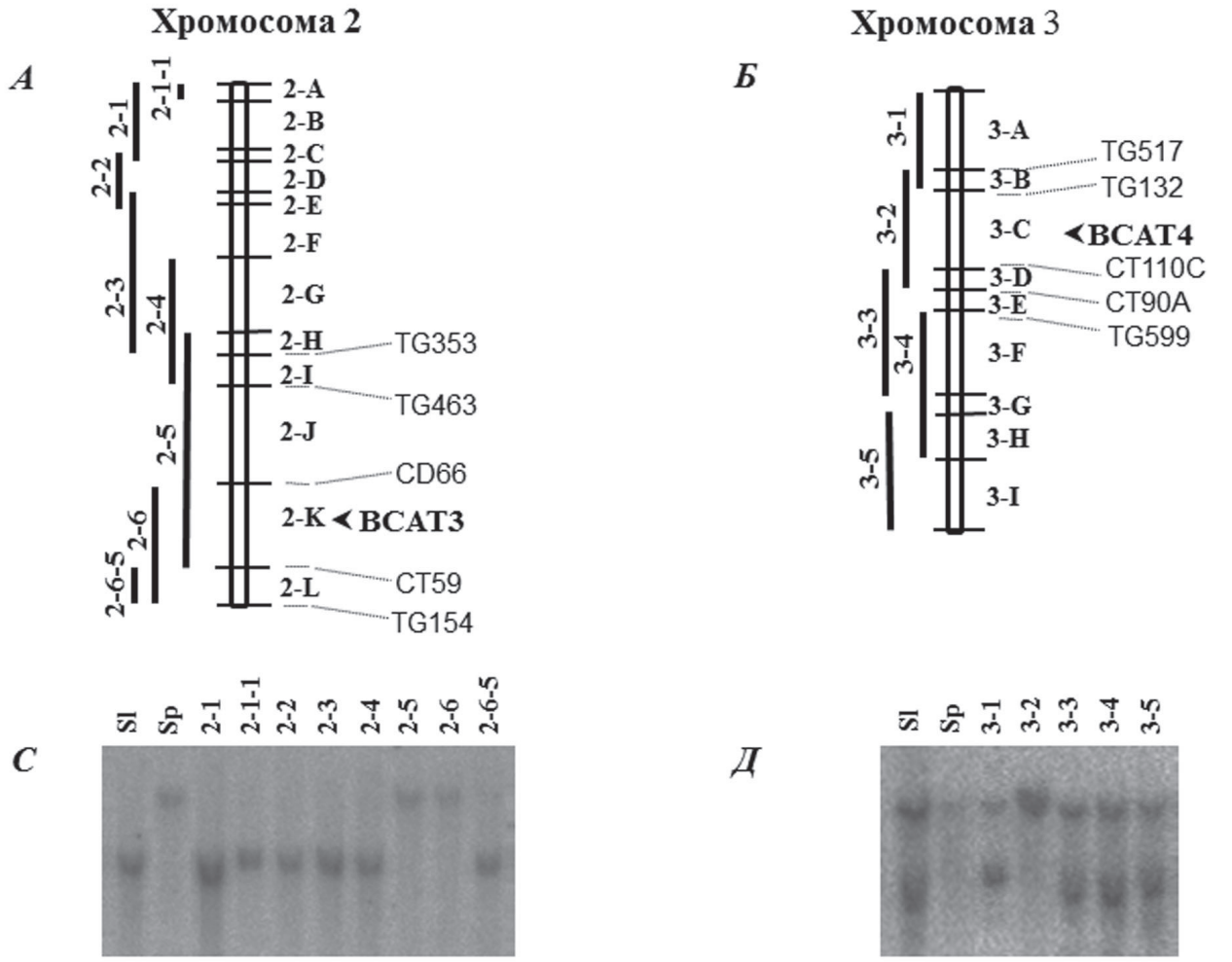

Рис. 1. Картування генів BCAT3 і BCAT4. А, Б – локалізація на хромосомній карті; С, Д – результати блотингу за Саузерном; 2-1 – 2-6-5; 3-1 – 3-5 інтрогресивні лінії томата; S1 – S. lycopersicum; Sp – S. pennelii

локалізовано на хромосомі 2 між маркерами CD66 і CT59 (рис. 1, *А*, *С*). Також було встановлено, що ген *BCAT4* знаходиться на хромосомі 3 між маркерами TG517 і CT110C (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 кодуються генами *BCAT3*, *BCAT4* було проведено комплементаційний аналіз ауксотрофного за BCAA мутанта дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*) Δbat1/Δbat2. Цей мутантний штам дріжджів є дефектним відразу за двома амінотрансферазами і тому не здатний рости на мінімальному поживному середовищі за відсутності BCAA [15]. Кодуючі послідовності цих генів було клоновано у вектор pAG426GPD під контролем конститутивного гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогеназного (GPD) промотору. Клітини мутанта Δbat1/Δbat2, що експресували конструкції pAG426GPD-BCAT3 та pAG426GPD-BCAT4 здатні рости на мінімальному середовищі без додавання BCAA. Трансформація ж клітин мутанта порожнім вектором pAG426GPD не призводить до комплементації ауксотрофного фенотипу (рис. 2). Таким чином, клоновані нуклеотидні послідовності були здатні ефективно комплементувати мутації структурних генів *BAT1*, *BAT2* метаболізму BCAA *S. cerevisiae*, вказуючи на те, що протеїни SlBCAT3 і SlBCAT4 мають амінотрансферазну активність.

Зелений флуоресцентний протеїн було використано як маркер для виявлення субклітинної локалізації протеїнів та встановлення їхньої можливої функції. Було синтезовано дві конструкції SlBCAT3-GFP і SlBCAT4-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 транзієнтної експресії SlBCAT3-GFP і SlBCAT4-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 BCAA 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 BCAA.

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

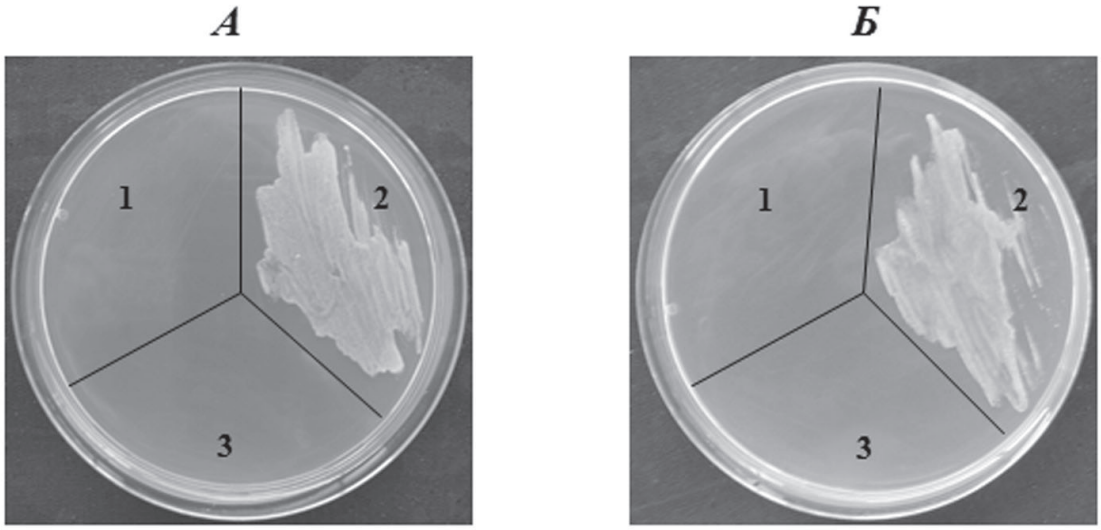

Рис. 2. Комплементаційний аналіз S1BCATs у мутанті дріжджів Saccharomyces cerevisiae – Δbat1/Δbat2, дефектному за амінотрансферазною активністю. А, Б – комплементаційний тест BCAT3 та BCAT4 відповідно. 1 – нетрансформовані клітини мутанта Δbat1/Δbat2; 2 – трансформація вектором pAG426GPD, що містив послідовність BCAT; 3 – трансформація порожнім вектором pAG426GPD

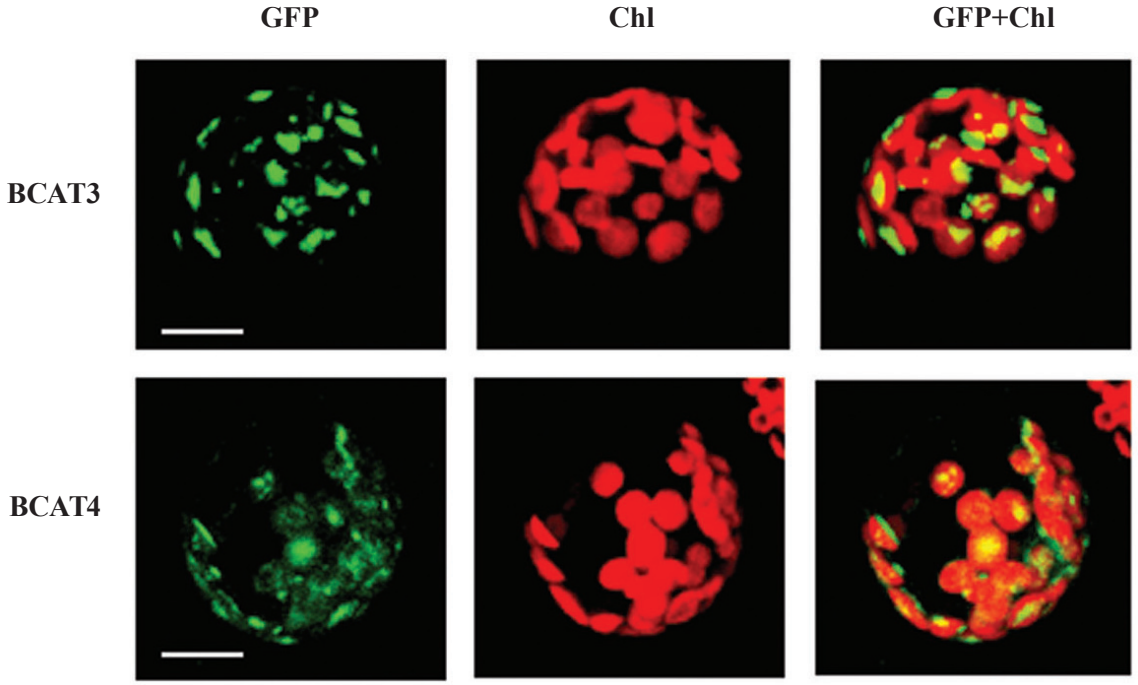

Рис. 3. Конфокальномікроскопічний аналіз мезофільних протопластів тютюну, що експресують химерні протеїни BCAT3-GFP, BCAT4-GFP. GFP – зелений флуоресцентний протеїн. Chl – автофлуоресценція хлорофілу, GFP+Chl-об'єднане зображення автофлуоресценції хлорофілу і GFP. Масштаб – 10 мкм

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 одинаковою 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].

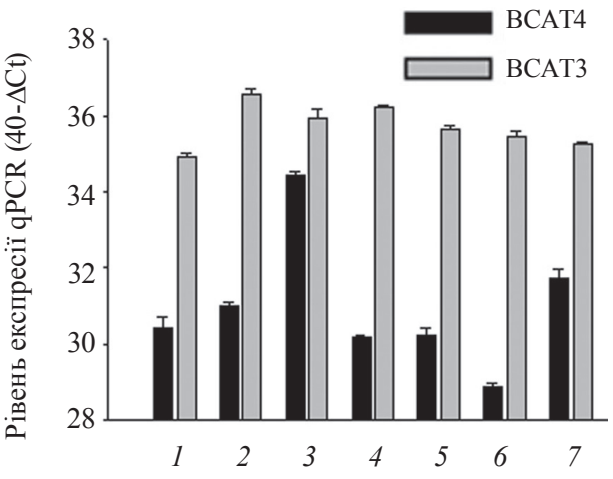

Рис. 4. Аналіз експресії генів BCAT3 і BCAT4 за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі (qPCR). 1 – стебла; 2 – листки; 3 – квітки; 4 – плоди через 10 днів після розкриття квітки (д.п.р.к.); 5 – через 20 д.п.р.к.; 6 – через 30 д.п.р.к.; 7 – через 40 д.п.р.к.

Для вивчення каталітичних особливостей ензимів нами були сконструйовані генетичні конструкції для експресії рекомбінантного протеїну, що містив додатково введену гексагістидинову послідовність на С-кінці. Така генетична модифікація протеїну дозволяє його виділяти і очищати за допомогою металхелатуючої хроматографії. Експресію рекомбінантних протеїнів проводили в Δbat1/Δbat2 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 локалізовано у хлоропластах, амінотрансферази BCAT3 і BCAT4 задіяні в біосинтезі BCAA. У зв'язку з цим субстратну специфічність очищених рекомбінантних протеїнів у реакції трансамінації досліджували в інкубаційному середовищі, яке містило α-кетокислоти із розгалуженим ланцюгом (KIC, KMV, KIV), що є попередниками BCAA. Обидві ізоформи BCAT3 і BCAT4 здатні трансамінувати всі три типи субстратів, хоча їхня трансаміназна активність істотно відрізняється. BCAT3 як і BCAT4 виявляє вищу специфічність до KMV. BCAT4 майже однаково добре трансамінує KIC і KIV, тоді як специфічність BCAT3 до KIC у 2 рази вища, ніж до KIV (табл. 2).

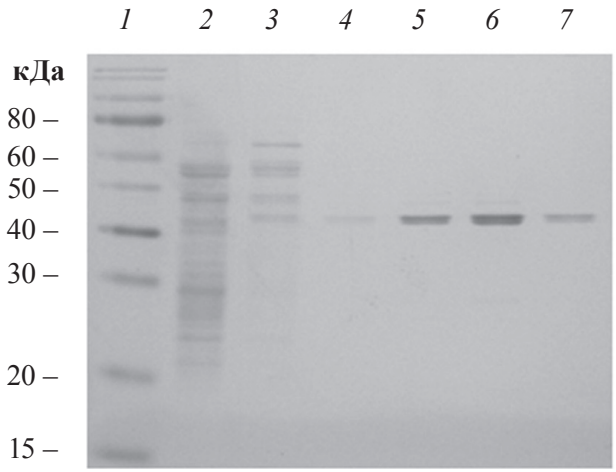

Рис. 5. Електрофореграма фракцій хроматографічного виділення BCAT-His6, розділених у 12%-му ПААГ-SDS. 1 – маркери молекулярної маси; 2 – клітинний лізат; 3 – протеїнова фракція, яка не зв'язалася з Ni-NTA-агарозою; 4 – фракція відмивання; 5, 6, 7 – очищений рекомбінантний протеїн

Таблиця 2. Кінетичні параметри BCAT3, BCAT4. Значення константи Міхаеліса (K_m) і максимальної швидкості (V_{max}) реакції амінування для очищеної амінотрансферази томата (M ± m, n = 5)

Ензим	α-Кето-кислоти	K_m, мМ	V_{max}, нМ/хв·мг протеїну
BCAT3	KIC	0,38 ± 0,01	114,8 ± 1,55
	KMV	0,26 ± 0,01	121,6 ± 2,08
	KIV	0,81 ± 0,05	145,5 ± 2,99
BCAT4	KIC	0,45 ± 0,02	124,4 ± 2,34
	KMV	0,24 ± 0,03	97,25 ± 3,37
	KIV	0,60 ± 0,02	167, 8 ± 1,55

KIC – кетоізокапронова кислота, KMV – кетометилвалеріанова кислота, KIV – кетоізовалеріанова кислота

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

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

А. С. Кочевенко[1,2], А. Р. Ферни[2]

[1]Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев;
[2]Макс-Планк-Институт молекулярной физиологии растений, Гольм, Германия;
e-mail: andkochevenko@gmail.com

В данном исследовании приведены доказательства участия BCAT3 і BCAT4 протеинов томата в биосинтетическом пути аминокислот с разветвленной цепью. С использованием ПДРФ-анализа (полиморфизма длины-рестрикционных фрагментов) проведено картирование генов *BCAT3* и *BCAT4*. 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 протеин, рекомбинантный протеин.

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

A. S. Kochevenko[1,2], *A. R. Fernie*[2]

[1]Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
[2]Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Golm, Germany;
e-mail: andkochevenko@gmail.com

Summary

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. *Malatrasi 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