

ТИРОЗИНСПЕЦИФІЧНЕ ФОСФОРИЛЮВАННЯ БІЛКІВ ПІД ЧАС ПРОРОСТАННЯ НАСІННЯ *PINUS SYLVESTRIS* L.

Під час аналізу спектрів тритон-розчинних білків у процесі проростання насіння сосни ми виявили значні відмінності, які зумовлені як деградацією запасних білків, так і змінами у диференціальній експресії генів у клітинах сосни під впливом позаклітинних чинників. Використання Вестерн-блот-аналізу із застосуванням високоспецифічних антитіл рТуг-99 дав змогу з'ясувати, що у всіх зразках проростків візуалізується широкий спектр білків, фосфорильованих за тирозином. Важливо зазначити, що отриманий спектр охоплює як низькомолекулярні (<10 кДа), так і високомолекулярні (250 кДа) білки, а інтенсивність їх фосфорилування змінюється у процесі росту проростків. Присутність тирозинкіназної активності у клітинах семиденних проростків сосни було також підтверджено за допомогою афінної хроматографії з використанням панелі SH2-доменів. Отримані дані свідчать про те, що у сосни звичайної, аналогічно до багатьох видів покритонасінних, тирозинове фосфорилування білків бере активну участь у процесі проростання насіння.

Ключові слова: проростання насіння, експресія генів, сосна звичайна, білки, тирозин.

Ріст рослинного організму розпочинається з проростання насіння. Цей процес залежить від рівня фітогормонів, води, світла, температури, кисню і регулюється, насамперед на клітинному рівні. Усі екзогенні та ендогенні стимули сприймають рецептори, які розташовані на поверхні або всередині рослинних клітин, і є початковою ланкою сигнальних шляхів, що задіяні у регуляції росту та розвитку [2, 3]. Складовою частиною багатьох сигнальних шляхів є каскади із декількох протеїнкіназ (ПК).

У еукаріотній клітині близько 30 % білків піддаються фосфорилуванню [18]. Зворотнє фосфорилування білків за залишками тирозину, яке каталізується протеїнкіназами і фосфопротеїнфосфатазами, виконує визначальну роль у функціонуванні сигнальних шляхів, задіяних у регуляцію процесів росту, проліферації та диференціації клітин у ссавців [13]. Початковою ланкою цих шляхів є рецепторні тирозинкінази, які активуються факторами росту. Подальша передача сигналу відбувається через взаємодію SH2 (Src-гомологічних) доменів сигнальних білків із залишками фосфотирозину цих протеїнкіназ. За участю згаданого механізму активується каскад внутрішньоклітинних серин/треонін-специфічних протеїнкіназ (ПК). Він є висококонсервативний в еукаріотичних клітинах, від дріжджів до людини, дистальна ланка якого MAP-кіназа активує транскрипційні фактори, які регулюють експресію генів [22].

На сьогодні як біологічна значущість, так і молекулярні механізми тирозинспецифічного фосфорилування білків у рослинних організмах є маловивченими. Дотепер типових рецепторних тирозинкіназ (RTK) у геномі рослин не знайдено, але в них присутні багаточисельні рецептороподібні протеїнкінази (RLK) зі специфічністю до залишків серину та треоніну, які виконують роль, аналогічну до RTK ссавців. Окрім того, у рослинних організмах виявлено ПК із подвійною специфічністю, які каталізують фосфорилування залишків треоніну та тирозину, а також ідентифіковано і охарактеризовано тирозинспецифічні протеїнфосфатази у деяких видів вищих рослин (*Arabidopsis*, соя,

горох), рівень експресії яких змінюється у процесі розвитку [7, 12]. Тирозинкіназу активність виявлено у таких видів як горох [20], люцерна [6], кукурудза [21], кокос [14], а також доведено, що процеси ембріогенезу, диференціації [14] та апоптозу [19] у рослин частково регулюються скоординованою дією тирозинкіназ та тирозинфосфатаз [5]. Усі ці дані свідчать про існування у рослин сигнальних механізмів, опосередкованих тирозинспецифічним фосфорилуванням, подібних до тих, які трапляються у тварин. Проте варто зазначити, що дотепер із літературних джерел невідомо про виявлення у клітинах хвойних рослин тирозинспецифічного фосфорилування білків.

Спектри тритон-розчинних білків проростків сосни звичайної у процесі проростання насіння. Під час проростання насіння сосни у зародках та проростках сосни інтенсивно відбувається поділ та диференціація клітин, тобто ті події, які пов'язані із диференціальною активацією генів, що на молекулярному рівні відображається, наприклад, у зміні складу білків. Ми проаналізували спектри тритон-розчинних білків проростків сосни у процесі проростання насіння і виявили їхні значні відмінності (рис. 1). Так, білки з молекулярною масою 32 та 75 кДа характерні тільки для зародка та початкових стадій його проростання. Білки з молекулярною масою 24-27 кДа, 27-29 кДа, за літературними даними, належать до альбумінової фракції запасних білків, а 21-22 – до глобулінової, вміст яких у процесі проростання зменшується [11], аналогічна картина спостерігається і для низькомолекулярних білків (<10 кДа). На 5-й день проростання істотно зменшується рівень експресії білків із молекулярною масою 15, 17, 26, 30 кДа. Натомість, на третій день проростання насіння зростає експресія білка з молекулярною масою 52 кДа і підтримується на високому рівні протягом наступних днів проростання [10].

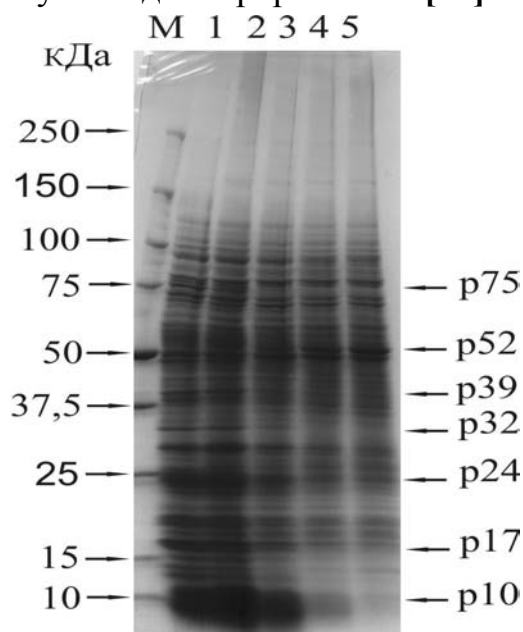


Рис. 1. Електрофоретичний аналіз білкових екстрактів із насіннєвих проростків сосни звичайної у процесі проростання. Фракціонування білків у 5-20 % ПААГ за присутності 0,1 % ДСН, забарвлення Coomassie R-250: М – маркери молекулярної маси; доріжка 1 – зародки насіння у стані спокою; доріжки 2, 3, 4, 5 – 1-а, 3-я, 5-а, 7-а – доба проростання насіння. Стрілками зліва вказано молекулярні маси маркерів, справа – білки, рівень експресії яких змінюється

Очевидно, що виявлені відмінності у білкових спектрах проростків зумовлені як деградацією запасних білків, так і змінами у диференціальній експресії генів у клітинах під впливом позаклітинних чинників. Зважаючи на те, що нещодавно Мачадо із співавторами отримали докази наявності тирозинфосфатазної активності у мегагаметофіті араукарії, яка належить до родини *Pinales*, то можна припустити, що тирозинспецифічне фосфорилування білків спостерігається під час проростання насіння сосни, коли відбувається інтенсивний поділ клітин, регуляція якого у ссавців опосередкована фосфотирозиновим сигналюванням.

Тирозинспецифічне фосфорилування білків проростків сосни у різні фази росту. Виявлення фосфорильованих за тирозином білків (pTyr-білків) в екстрактах проростків різного віку здійснено Вестерн-блот-аналізом із використанням високоспецифічних антитіл pTyr-99 ("Promega"). Як свідчать результати цього експерименту у всіх зразках, візуалізується широкий спектр pTyr-білків від низькомолекулярних (<10 кДа) до високомолекулярних (250 кДа) (рис. 2, Б) і профілі цих білків змінюються у процесі росту проростків.

Окрім цього, відбуваються зміни рівня фосфорилування низки білків: для p33, p124, p170 він зменшується, а для p14, p21, p29, p36 – збільшується. Так, білки із молекулярною масою 10 та 32 кДа, які характерні тільки для початкових стадій розвитку проростка (доріжки 1-3), є фосфорильованими за тирозином, і на п'яту добу вони не візуалізуються в електрофоретичних спектрах (доріжка 4 А), як зникають і відповідні імунореактивні смуги (рис. 2, А, Б). Залежно від віку проростка значно зменшується рівень фосфорилування білків p170, p124 (рис. 2) і збільшується – p29, p21 та p14 [1].

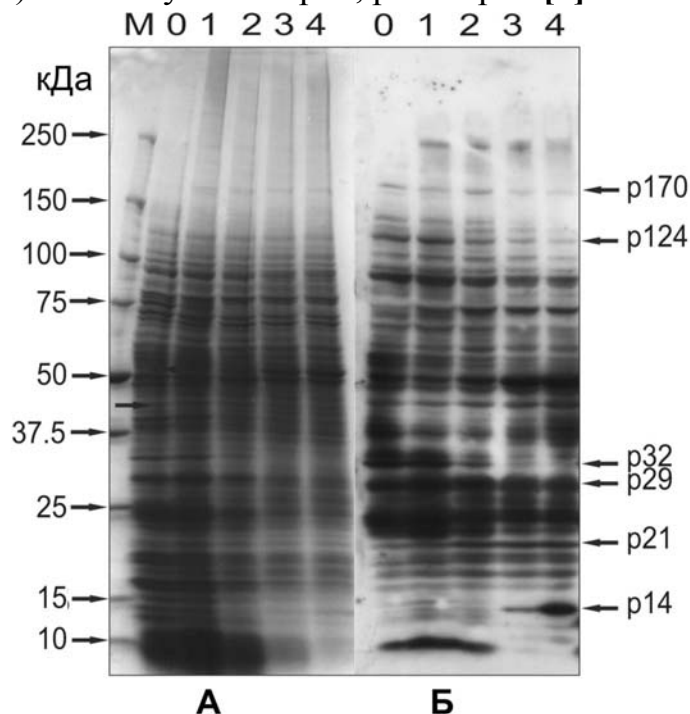


Рис. 2. Електрофореграми білкових екстрактів із проростків сосни звичайної: А – електрофореграма фракціонування білків у 5-20 % ПААГ за присутності 0,1 % ДСН; Б – імуноблотинг із використанням анти-pTyr-99 антитіл; М – маркери молекулярної маси; доріжка 1 – зародки насіння у стані спокою; доріжки 2, 3, 4, 5-1-а, 3-я, 5-а, 7-а – доба проростання насіння. Стрілками зліва вказано молекулярні маси маркерів, справа – білкових смуг, рівень фосфорилування яких змінюється

Варто зауважити, що спостерігаються значні відмінності у спектрах фосфорильованих за тирозином білків на початковій стадії росту зародка (рис. 2, Б, доріжка 2), коли відбувається інтенсивний поділ клітин, та на сьомий день проростання (доріжка 5) у фазі розтягування клітин Х. Хуанг [8, 9] зі співавторами показав регуляторну роль тирозинового фосфорильовання у проліферації клітин гіпокотилу в арабідопсіса, яка стимулювалась фітогормонами кінетином та ауксином [5]. Оскільки в ініціації поділу клітин провідна роль належить цитокініну, а розтягування рослинної клітини зумовлене дією ауксину, то логічно, що кожен із гормонів активує специфічні сигнальні шляхи, складовою ланкою яких, за останніми літературними даними [16], є каскади протеїнкіназ. Істотні відмінності спектрів рТуг-білків у різні фази росту проростка сосни дають підстави припустити залучення фосфотирозинового сигналювання у ці процеси.

І ще одне підтвердження присутності тирозинкіназної активності у клітинах семиденних проростків сосни ми отримали шляхом ідентифікації фосфотирозинвмісних білків за їх здатністю специфічно зв'язуватись *in vitro* із рекомбінантними формами SH2-доменів, кон'югованими з глутатіон-S-трансферазою (GST), низки сигнальних білків. Як контроль використовували саму лише GST. Результати електрофоретичного аналізу преципітатів показують специфічні для кожного домену профілі рТуг-білків, (рис. 3), що дає підстави припустити наявність широкого спектру цих білків у клітинах проростків, оскільки відомо, що SH2-домени різних сигнальних білків взаємодіють із фосфотирозином, який перебуває у певному оточенні амінокислотних залишків.

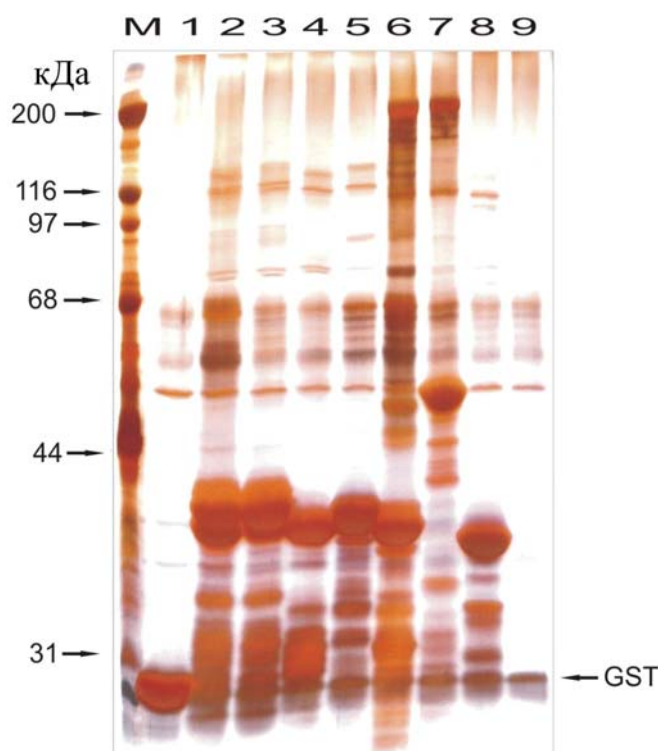


Рис. 3. Електрофоретичний аналіз білків зародків насіння сосни звичайної, що специфічно зв'язуються *in vitro* із рекомбінантними формами SH2-доменів сигнальних білків, кон'югованих з GST: 1 – GST, 2 – N-кінцевий SH2-домен GAP; 3 – C-кінцевий SH2-домен GAP; 4 – N-кінцевий SH2-домен Sur; 5 – C-кінцевий SH2-домен Sur; 6 – N-кінцевий SH2-домен PLCγ; 7 – N+C-кінцевий SH2-домен PLCγ; 8 – SH2-домен Shc; 9 – SH2-домен Grb2

Ми встановили, що N-кінцевий SH2-домен PLC γ зв'язує значну кількість білка з мол. масою 180 кДа. У меншій кількості у комплексі з вказаним SH2-доменом виявляються також білки з мол. масами 144, 110, 75 і 50 кДа (рис. 3, доріжка 6). Із C-кінцевим SH2-доменом PLC γ специфічно зв'язалися білки із молекулярною масою 43 і 34 кДа (рис. 3, доріжка 7). У комплексі із SH2-доменами *Syp* і *GAP* та *Shc* виявлено поліпептиди із мол. масами 130, 116, 75 кДа, специфічною для SH2-доменів *GAP* є наявність у преципітатах білка із Мм 36 кДа, для SH2-доменів *Syp* – 33 кДа, для SH2-домену *Shc* – 30 кДа [4]. Основна функція SH2-доменів у тваринних клітинах полягає в забезпеченні білок-білкової взаємодії шляхом зв'язування із залишками фосфотирозину сигнальних білків. Тому, за аналогією з тваринними клітинами, ми можемо припустити, що білки зародків насіння сосни звичайної, виявлені в преципітатах із специфічними SH2-доменами, також фосфорильовані за тирозином.

Отже, ми отримали дані, які свідчать, що у сосни звичайної, аналогічно до багатьох видів покритонасінних, присутня фосфотирозинкіназна активність. Нещодавно у геномах двох видів рису було знайдено шість і сім послідовностей, які кодують гіпотетичні тирозинкінази (ТК), з шести передбачених ТК *Oryza sativa ssp. Indica* тільки три містили всі амінокислотні залишки, які необхідні для каталітичної активності, а з семи передбачених ТК *Oryza sativa ssp. Japonica* – чотири. У протеомі *Arabidopsis thaliana* можливих ТК не ідентифіковано. Така мала кількість виявлених тирозинкіназ не обов'язково є свідченням того, що тирозинове фосфорилування у рослин є феноменом. Радше, останнє здебільшого здійснюється протеїнкіназами із подвійною специфічністю. Окрім згаданих вище протеїнкіназ у геномах рослин виявлено багато послідовностей, які кодують тирозинкіназоподібні білки (TKL): 776 у *A. thaliana* і більш ніж 1000 у двох видів рису, але значущість такої великої кількості TKL залишається невідомою [17].

Присутність фосфатаз із подвійною специфічністю (DSP), а особливо тирозинфосфатаз, є істотним індикатором фосфотирозинового сигналювання. У рослин виявлено по 6 DSP у кожного із згаданих вище видів рослин, одна тирозинфосфатаза у *A. thaliana* і по дві у кожного із видів рису [15].

У тварин до передачі низхідних сигналів, генерованих тирозиновими кіназами, залучені білки, які містять у своєму складі фосфотирозинзв'язувальні домени: SH2 або РТВ. SH2 домени, подібні до STAT білків ссавців, знайдено і у рослин: у *A. thaliana* – два і один у *O. sativa*. На сьогодні РТВ доменів у геномах рослин не виявлено. Нещодавно було охарактеризовано третій тип фосфотирозинзв'язувальних доменів – це С2 домен протеїнкінази С дельта (PKC δ) людини [17]. У протеомах *A. thaliana*, *Oryza sativa ssp. Indica* та *Oryza sativa ssp. Japonica* знайдено 85, 103 та 106 С2-вмісних білків відповідно. Варто зауважити, що жоден із цих білків не містить кіназного домену. Наразі залишається невідомим, які із амінокислотних залишків С2 домену є визначальними у зв'язуванні з фосфотирозином.

Таким чином, ми отримали експериментальні свідчення тирозинспецифічного фосфорилування білків у сосни звичайної разом із даними про тирозинфосфатазну активність у клітинах іншої хвойної рослини *Araucaria angustifolia*, що спонукало нас до пошуку фосфотирозин зв'язувальних білків і у цього класу рослин.

Література

1. Гут Р.Т. Порівняльний аналіз загальних білкових спектрів фосфотирозинвмісних білків зародків насіння сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) в процесі їх проростання / Р.Т. Гут, Г.Т. Криницький, І.Т. Гут // Науковий вісник УкрДЛТУ : зб. наук.-техн. праць. – Львів : РВВ УкрДЛТУ. – 1999. – Вип. 9.10. – С. 86-90.
2. Гут Р.Т. Значення SH3-доменів у функціонуванні клітин рослин / Р.Т. Гут // Біополімери і клітина. – 2004. – Т. 20, № 5. – С. 380-387.
3. Гут Р.Т. Роль фосфоліпази С в сигнальних механізмах рослин / Р.Т. Гут // Физиология и биохимическая культ. раст. – 2005. – Т. 37, № 1. – С. 3-15.
4. Ковальова В.А. Експресія RUK/CIN85-споріднених адаптерних білків у проростаючому насінні сосни (*Pinus silvestris* L.) / В.А. Ковальова, Р.Т. Гут // Лісове господарство, лісова, паперова та деревообробна промисловість : міжвід. наук.-техн. зб. – Львів : Вид-во УкрДЛТУ. – 2004. – Вип. 29. – С. 48-51.
5. Barizza E. Evidence suggesting protein tyrosine phosphorylation in plants depends on the developmental conditions / E. Barizza, F.Lo. Schiavo, M. Terzi // FEBS Lett. – 1999. – Vol. 447, № 2-3. – PP. 191-194.
6. Duerr B. MsERK1: a mitogen-activated protein-kinase from a flowering plant / uerr B.M. Gawienowski, N. Ropp // Plant Cell. – 1993. – Vol. 10. – PP. 87-96.
7. Fordham-Skelton A.P. Higher plant tyrosine-specific protein phosphatases (PTPs) contain novel amino-terminal domeins: expression during embriogenesis / Fordham-Skelton A.P., Skipsey M., Eveans I.M. et al. // Plant Mol. Biol. – 1999. – Vol. 39, № 3. – PP. 593-605.
8. Gout R.T. Study of phosphotyrosine-dependent signalling in the pinus silvestris seed germs during the germination / Gout R.T., Gout I.T., Krynytski G.T. // Mechanisms of Cellular Signal transduction and communication: 3th Parnas conference, October 14-18. – Lviv, 2000. – С. 98.
9. Gout R.T. Aktivation tyrosine phosphorylation proteins in the Pinus sylvestris seed during germination / R.T. Gout // Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources: International Symposium. – Yalta, Ukraine. – 2002, May 26-31. – С. 10.
10. Gout R.T. Expression Of Proteins In Seed Germ Of Scots Pine During Germination / R.T. Gout // Mechanisms of Cell Activation: Biological Signals And Their Target Enzyme. – Wroclaw, 2002. – С. 85.
11. Groome M.C. Hydrolysis of lipid and protein reserves in loblolly pine seeds in relation to protein electrophoretic patterns following imbibition / Groome M.C., Axler S.R., Gifford D.J. // Physiol Plant. – 1991. – Vol. 83. – PP. 99-106.
12. Gupta R. Identification of a dual-specificity protein phosphatase that inactivates a MAP kinase from Arabidopsis / Gupta R., Huang Y., Kieber J. et al. // Plant J. – 1998. – Vol. 16, № . 5. – PP. 581-589.
13. Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signalling / T. Hunter // Cell. – 1995. – Vol. 96, № 2. – PP. 225-236.
14. Islas-Flores I. Protein phosphorylation during coconut zygotic development / Islas-Flores I., Oropeza C., Hernandez-Soromayor S. // Plant. Physiol. – 1998. – Vol. 118. – PP. 257-263.
15. Kerk D. Evolutionary radiation pattern of novel protein phosphatases revealed by analysis of protein data from the completely sequenced Genomes of Humans, Green Algae, and Higher Plants / Kerk D., Templeton G., Moorhead G. // Plant Physiol. – 2008. – Vol. 146. – PP. 351-367.
16. Kovtun Y. Sheen Suppression of auxin signal transduction by a MARK cascade in higher plants / Kovtun Y., Chiu W.L., Zeng J. // Nature. – 1998. – Vol. 395. – PP. 716-720.
17. Miranda-Saavedra D. Classification and functional annotation of eukaryotic protein kinases / Miranda-Saavedra D., Barton G. // Proteins. – 2007. – Vol. 68. – PP. 893-914.
18. Pelech S.L. Mitogen-activated protein kinases: rersatile transducers for cell signalling / Pelech S.L., Sanghera J.S. // Trends Biochem. Sci. – 1992. – Vol. 17, № 2. – PP. 233-238.
19. Shih Y. Changes of protein tyrosine phosphorylation during mannose and senescence induced cell death in rice / Shih Y., Chou W., Lin Y. et al. // Plant. Growth. Regul. – 2004. – Vol. 42. – PP. 271– 282.
20. Torruella M. Evidence of the activity of tyrosine kinase (s) and of the presence of phosphotyrosine proteins in pea plantlets / Torruella M., Casano V., Vallejos R. // J. Biol. Chem. – 1986. – Vol. 261. – PP. 6651-6653.
21. Trojanec J. Phosphorylation of plant proteins and the indication of protein-tyrosine kinase activity in maize seedlings / Trojanec J., Ek P., Scoble J. et al. // Eur. J. Biochem. – 1996. – Vol. 235. – PP. 338-344.

22. Wendy J.F. Signalling by receptor tyrosine kinases / Wendy J.F., Jonson D.E., Williams L.T. // Ann. Rev. Biochem. – 1993. – Vol. 62. – PP. 453-481.

Гут Р.Т. Тирозинспецифическое фосфорилирование белков при прорастании семян *Pinus sylvestris* L.

Во время анализа спектров тритон-растворимых белков в процессе прорастания семян сосны мы обнаружили значительные отличия, которые предопределены как деградацией запасных белков, так и изменениями в дифференциальной экспрессии генов в клетках сосны под воздействием внеклеточных факторов. Использование Вестерн-блот-анализа с применением высокоспецифических антител pTyr-99 дало возможность выяснить, что во всех образцах побегов визуализируется широкий спектр белков, фосфорилированных по тирозину. Важно отметить, что полученный спектр охватывает как низкомолекулярные (<10 кДа), так и высокомолекулярные (250 кДа) белки, а интенсивность их фосфорилирования изменяется в процессе роста побегов. Присутствие тирозинкиназной активности в клетках семидневных побегов сосны было также подтверждено с помощью аффинной хроматографии с использованием панели Sh2-доменов. Полученные данные свидетельствуют о том, что у сосны обыкновенной, аналогично со многими видами покрытосемянных, тирозиновое фосфорилирование белков активно участвует в процессе прорастания семян.

Ключевые слова: прорастание семян, экспрессия генов, сосна обыкновенная, белки, тирозин.

Gout R.T. Characterisation of protein tyrosine phosphorylation at various stages of seed germination of *Pinus sylvestris* L.

Comparative analysis of triton-soluble proteins obtained from germinating seeds of Scots pine allowed us to identify significant differences in their pattern at various stages of germination. Observed differences might reflect the degradation of storage proteins as well as the changes in the expression pattern of genes activated by external factors inducing the process of germination. With the use of highly specific pTyr-99 antibodies we showed by Western blot analysis that germinating seed contain a highly divers spectrum of proteins phosphorylated on tyrosine. Notably, the observed pattern of proteins includes low (<10kDa) and high (250kDa) molecular weight proteins, whose phosphorylation pattern changes during germination. The presence of tyrosine kinase activity in germinating cells was further confirmed by affinity chromatography with the use of a panel of SH2 domains, which interact specifically with proteins phosphorylated on tyrosine. These findings strongly indicate that that protein tyrosine phosphorylation plays an important role in the process of seed germination in Scots pine and other plants.

Keywords: germinating seeds, expression of genes, Scots pine, proteins, tyrosine.

УДК 581.9

Ст. викл. Г.Ф. Аркушина, канд. біол. наук; доц. О.В. Гулай, канд. біол. наук – Кіровоградський ДПУ ім. В.К. Винниченка

ОСОБЛИВОСТІ ДЕНДРОФЛОРИ КІРОВОГРАДА ТА ЇЇ ЗНАЧЕННЯ В ОПТИМІЗАЦІЇ МІСЬКОГО СЕРЕДОВИЩА

Розглянуто особливості деревно-чагарникової флори м. Кіровограда, спонтанна та культивована фракції якої налічують 180 видів з 84 родів та 36 родин. Тільки у природних місцях зростання трапляється 11 видів, у природі та культурі – 84, лише у культурі – 85.

Ключові слова: дендрофлора, урбановфлора, Кіровоград.

Вступ. В озелененні міст деревно-чагарникова флора виконує важливі функції [5, 9-11]. Найбільше фітомеліоративне і рекреаційне значення мають насадження міських вулиць та місць загального користування – озеленені упо-