УДК 577.214.5:575.174.015.3

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ХИТИНАЗ
В ЛОВЧИХ АППАРАТАХ НАСЕКОМОЯДНОГО РАСТЕНИЯ
Nepenthes sp. В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ

М. А. Филюшин^{1,*}, Е. З. Кочиева^{1,2}, А. В. Щенникова¹, А. В. Белецкий¹,
А. В. Марданов¹, Н. В. Равин¹, академик РАН К. Г. Скрыбин^{1,2}

Поступило 21.08.2018 г.

В транскриптомах ловчих аппаратов и листьев насекомоядного растения *Nepenthes sp.* выявили 15 хитиназ классов I–V. Из них 10 идентифицированы впервые, включая хитиназы классов II и V. Определены уровни их экспрессии в листьях и на трёх стадиях развития ловчего аппарата. Максимальный уровень транскрипционной активности в открытом кувшинчике наблюдали для генов хитиназы NChi4 (класс II) и её изоформ, уровень экспрессии этих генов значительно возрастал по мере развития ловчего аппарата. Также впервые показана транскрипция генов хитиназ всех пяти классов в листьях этого растения.

Ключевые слова: плотоядное растение, *Nepenthes*, гены хитиназ, транскриптом.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524843358-362>

Тропические растения некоторых родов, произрастающие на кислых и обеднённых почвах в условиях нехватки питательных веществ, сформировали путём модификации листьев ловчие аппараты (кувшинчики), способные захватывать и переваривать насекомых и даже небольших позвоночных животных [1, 2]. Несмотря на то что плотоядные растения развились независимо в нескольких линиях цветковых растений, все они имеют схожее строение кувшинчиков [3]. Для привлечения жертвы плотоядные растения используют ароматические летучие соединения и сладкие вещества белковой природы [3], а наличие крышечки и нескольких слоёв высокомолекулярных восков на внутренней поверхности не позволяет ей выбраться из кувшинчика [4]. Для переваривания пойманной добычи используются выделяемые в пищеварительной зоне кувшинчика гидролитические ферменты (протеазы, эстеразы, липазы, фосфатазы, хитиназы и др.) [2]. Сравнительный анализ содержимого ловчих аппаратов плотоядных растений из родов *Cephalotus*, *Nepenthes* и *Sarracenia* выявил у них схожий набор белков [3].

Поскольку основной добычей плотоядных растений являются насекомые, то особая роль в пищева-

варительном процессе принадлежит хитиназам. Хитиназы (КФ 3.2.1.14) относятся к классу гидролитических ферментов, катализирующих деградацию хитина до олигосахаридов [5]. Изначальная роль хитиназ растений — защита их от хитинсодержащих патогенов [6]. Эти ферменты стали одним из важных факторов эволюции, обеспечивших возникновение как минимум девяти независимых линий плотоядных растений, научившихся в условиях недостатка питания переваривать насекомых. У плотоядных растений в дополнение к защитной функции хитиназы участвуют в биодеградации хитиновых оболочек насекомых [3, 6].

Хитиназы растений представляют собой довольно вариативную группу белков, объединённых наличием каталитического гликозидгидролазного (glycoside hydrolase, GH) домена, но при этом значительно различающихся по первичной последовательности, составу доменов и клеточной локализации [6]. На основе гомологии аминокислотных последовательностей, наличия специфичных мотивов и биохимических характеристик выделяют пять, реже семь классов хитиназ [7]. Классы I, II, IV, VI и VII характеризуются присутствием домена GH19, тогда как ферменты классов III и V содержат домен GH18 [7, 8]. Хитиназы семейства GH18 присутствуют у широкого круга организмов, таких как вирусы, бактерии, животные и высшие растения, в то время как хитиназы GH19 есть только у высших растений и некоторых бактерий [5]. Помимо каталитического домена хитиназы классов I и IV содер-

¹ Институт биоинженерии
Федерального исследовательского центра
“Фундаментальные основы биотехнологий”
Российской Академии наук, Москва

² Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

*E-mail: michel7753@mail.ru

жат N-концевой хитинсвязывающий домен (chitin binding domain, CBD1) и междоменный пролин/глицин-богатый линкерный пептид, вариабельный как по длине, так и по составу [5, 7].

Хищные растения рода *Nepenthes* уже более 100 лет используются в качестве модели для изучения механизмов хищничества у растений [9]. Несмотря на то что биохимический и генный (транскриптомный) состав содержимого ловчих аппаратов различных видов *Nepenthes* активно изучается [2, 5, 9], к настоящему времени идентифицировано и описано лишь один-два гена хитиназ классов I [1], III [2] и IV [10], в то время как в геномах неплотоядных растений присутствует более 20 генов хитиназ [6, 11].

Цель настоящей работы — идентификация новых генов хитиназ у *Nepenthes* sp. и определение на основе транскриптомных данных уровней их экспрессии в листьях и ловчих аппаратах на разных стадиях развития.

Поиск последовательностей, кодирующих хитиназы, осуществляли в транскриптомах взрослого листа и ловчего аппарата (кувшинчик) на трёх стадиях развития — зачаток кувшинчика (размер около 1 см), молодой неоткрытый (3–4 см) и взрослый открытый кувшинчик (7–11 см) в трёх биологических повторностях. Лист был взят в связи с тем, что ловчий аппарат является модификацией этого органа. С учётом наличия развитого воскового слоя листьев и кувшинчиков, затрудняющего экстракцию, для выделения РНК из тканей *Nepenthes* мы разработали методику с использованием СТАВ-буфера: 2% (вес/объём) СТАВ (бромид цетилтриметиламмония), 0,1 М трис-HCl-буфер (pH 9,5); 20 мМ ЭДТА; 1,4 М NaCl и 1% бета-меркаптоэтанол. К 1 г растёртой в жидком азоте растительной ткани добавляли 7 мл горячего (65 °C) СТАВ-буфера, перемешивали и инкубировали при 65 °C в течение 3 мин, добавляли равный объём смеси хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1) и центрифугировали 15 мин при 11 000 g и 4 °C. Супернатант отделяли, добавляли к нему 0,25 объёма 10 М LiCl, инкубировали 3 ч при –20 °C и затем центрифугировали 15 мин при 11 000 g и 4 °C. Осадок, содержащий РНК, растворяли в 20 мкл деионизированной воды (получена с помощью установки Milli-Q, “Millipore”, США). Препараты РНК очищали от возможных примесей ДНК с помощью набора RNase-free DNase Set (“Qiagen”, США).

Препараты РНК после пробоподготовки секвенировали с помощью Illumina MiSeq (ЦКП Биоинженерия, ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН). Сборку и картирование чтений, а также идентификацию белок-кодирующих генов

в контигах осуществляли, как было описано нами ранее [12]. Уровень экспрессии генов рассчитывали как число картированных на их последовательности чтений транскриптома на миллион чтений, делённое на длину гена. Для определения статистической значимости различий в уровне экспрессии генов в разных образцах (лист и три стадии развития ловчего аппарата) использовали пакет edgeR. Для идентификации последовательностей хитиназ и определения доменной структуры и консервативных мотивов использовали базу данных NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) и программу MEME 4.11.2 (<http://meme-suite.org/tools/meme>). N-концевые сигнальные пептиды идентифицировали с помощью программы SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>). Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей и построение дендрограммы осуществляли с помощью программы MEGA 7.0 (www.megasoftware.net).

Всего по результатам автоматической аннотации 12 анализируемых транскриптомов (лист и три стадии развития ловчего аппарата, три повтора) мы идентифицировали 27 последовательностей, гомологичных генам растительных хитиназ. Однако только 15 из них содержали полную кодирующую часть, т.е. имели старт-кодон ATG и заканчивались одним из стоп-кодонов (табл. 1). Полученные последовательности депонировали в базу данных NCBI (MH430914–MH430928).

На основе результатов структурного и филогенетического анализов идентифицированные последовательности хитиназ мы разделили на две группы (рис. 1). В аминокислотных последовательностях хитиназ NChi1, NChi2, NChi9, NChi10 и NChi11 выявили по два домена — хитинсвязывающий (CBD1) и гликозидгидролазный GH19. У остальных хитиназ — только по одному домену, GH18 или GH19 (рис. 1, табл. 1). Также анализируемые хитиназы, за исключением NChi5, NChi7, NChi15, содержали на N-конце белка сигнальные пептиды, которые могли участвовать в экспорте фермента из клеток в жидкость пищеварительной зоны ловчих аппаратов. Сравнение в базе NCBI с известными хитиназами растений показало, что выявленные нами у *Nepenthes* sp. хитиназы принадлежат ко всем пяти известным классам (табл. 1). Ранее для *Nepenthes* уже были определены и описаны некоторые хитиназы классов I, III и IV [1, 2, 10]. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей выявил высокую гомологию этих хитиназ с идентифицированными нами NChi1, NChi2, NChi9, NChi10 и NChi11. Остальные 10 хитиназ (NChi3, NChi4, NChi5, NChi6, NChi7,

Таблица 1. Транскрипты генов хитиназ и профиль их экспрессии в листьях и ловчих аппаратах *Nepenthes* sp.

Транс-крипт	Длина поли-пеп-тида, а.о.	Домены	Класс	Уровень экспрессии											
				Зачаток кувшинчика (размер около 1 см)			Молодой неоткры-тый кувшинчик (размер 3–4 см)			Взрослый открытый кувшинчик (размер 7–11 см)			Взрослый лист		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
NChi1	276	CBD1+CH19	IV	4,82	3,16	4,40	2,24	7,37	2,34	0,38	0,83	3,33	55,73	46,03	9,27
NChi2	292	GH18	III	2,73	4,10	7,53	8,17	6,88	2,36	3,84	0,84	0,72	40,53	3,91	1,46
NChi3	216	GH19	II	11,13	16,02	14,62	18,01	17,99	26,72	69,74	66,26	62,68	1,42	4,08	5,59
NChi4	317	GH19	II	93,36	129,19	305,79	352,10	225,20	424,29	1478,88	1493,61	1129,69	21,46	29,00	105,93
NChi5	103	GH19	II	47,06	41,66	89,86	109,08	75,90	144,14	443,93	435,82	401,19	12,23	8,90	34,93
NChi6	145	GH19	II	9,03	8,65	21,25	31,85	17,77	32,79	128,56	130,93	133,10	0,68	1,86	5,98
NChi7	197	GH19	II	14,12	14,91	34,60	46,59	32,89	52,14	134,81	158,80	80,05	6,86	4,88	18,10
NChi8	227	GH18	—	9,85	5,04	7,35	10,65	14,44	11,23	4,09	6,95	14,94	8,38	6,47	9,08
NChi9	277	CBD1+GH19	IV	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	17,33	0,00	5,15	0,00	0,00	0,00
NChi10	350	CBD1+GH19	I	0,66	0,39	0,00	8,20	1,62	3,84	0,83	3,66	0,79	0,00	0,00	0,00
NChi11	318	CBD1+GH19	I	213,20	59,80	108,78	115,73	80,03	42,27	41,88	26,84	13,10	2,15	6,42	7,43
NChi12	299	GH18	III	10,26	11,32	11,71	4,03	3,97	0,00	0,00	0,00	0,00	0,96	0,50	0,00
NChi13	295	GH18	III	2,72	0,00	0,00	0,00	1,14	2,15	0,00	0,00	0,00	2,92	1,35	0,00
NChi14	295	GH18	III	0,00	2,43	0,00	9,11	0,00	3,02	0,00	0,00	3,32	0,00	0,00	0,00
NChi15	258	GH18	V	3,50	2,74	3,78	6,50	1,80	0,69	3,45	2,86	4,88	2,87	3,08	1,45

NChi8, NChi12, NChi13, NChi14 и NChi15) у *Nepen-thes* были обнаружены впервые.

Аминокислотные последовательности хитиназ NChi10 и NChi11 содержат хитинсвязывающий домен (38 а.о.) и домен GH19 (232 а.о.), в котором мы идентифицировали функциональные мотивы MLXXR, XFYTXX, AFXXAA, FXXTGX и TSH, ха-рактерные для хитиназ GH19 класса I [13, 14]. Хи-тиназы NChi1 и NChi9 имели более короткие хи-тинсвязывающий домен (27 а.о.) и домен GH19 (203 а.о.). В домене GH19 выявили мотивы DXXXS-FKXALW и GFGXTIRAIN, что позволило отнести эти хитиназы к классу IV [13]. Хитиназы NChi3, NChi4, NChi5, NChi6 и NChi7 значительно менялись

по длине (табл. 1) и содержали только домен GH19, на основании чего они были отнесены к классу II [13]. Анализ нуклеотидных выравниваний показал, что хитиназы, кодируемые *NChi3*, *NChi5*, *NChi6* и *NChi7*, могут быть изоформами NChi4, возник-шими, по всей вероятности, в результате альтерна-тивного сплайсинга.

К другому семейству хитиназ относились NChi2, NChi8, NChi12, NChi13, NChi14 и NChi15, содер-жащие домен GH18. Сравнительный анализ амино-кислотных последовательностей с известными хи-тиназами в базе данных NCBI позволил отнести хитиназы NChi2, NChi12, NChi13 и NChi14 к клас-су III, так как они содержали в домене характерный

Рис. 1. Филогенетическая классификация и структурный анализ аминокислотных последовательностей хитиназ *Nepenthes* sp. Дендрограмма построена методом максимального правдоподобия (модель WAG + G + I) с помощью MEGA 7.0. Прямоугольниками отмечены консервативные мотивы, идентифицированные с помощью MEME 4.11.2. Мотивы 1–10 локализованы в домене GH19, мотивы 11–16 — в домене GH18; * — хитинсвязывающий домен.

для этого класса активный сайт LDGIDFDIE [15], а NChi15 — к классу V.

Анализ MEME консервативных мотивов в последовательностях белков хитиназ *Nepenthes* sp. показал, что группа GH18 имела более консервативную первичную структуру в сравнении с GH19 (рис. 1). Интересно, что хитиназа NChi8 содержала домен GH18 (согласно NCBI—CDD), но при этом не имела мотивов, специфичных для какого-либо класса GH18-хитиназ (согласно [15]). На дендрограмме (рис. 1) NChi8 формировала базальную ветвь к кластеру GH19-хитиназ. Возможно, NChi8 представляет собой новый класс хитиназ, возникший в результате эволюционной дупликации и диверсификации генов GH18-хитиназ у хищных растений.

Анализ транскриптомов показал, что идентифицированные гены хитиназ различались по уровню экспрессии как между разными органами и стадиями развития, так и между собой. Максимальный уровень транскрипции мы обнаружили для гена *NChi4* (класс II) во взрослых открытых кувшинчиках (табл. 1). Уровень экспрессии *NChi4* и генов *NChi3*, *NChi5*, *NChi6* и *NChi7*, кодирующих изоформы *NChi4*, возрастал по мере развития ловчих аппаратов, достигая максимума во взрослых открытых кувшинчиках (табл. 1). Также высокий уровень экспрессии мы выявили для гена *NChi11* (класс IV), но в отличие от *NChi4* он был максимален в зачатках кувшинчиков и снижался по мере их развития (табл. 1). Различия уровней экспрессии генов *NChi4* и *NChi11* в листьях относительно кувшинчиков, а также между зачатками кувшинчиков и зрелыми кувшинками были статистически значимыми ($p < 0,05$).

Остальные анализируемые гены хитиназ имели низкую транскрипционную активность либо вовсе не экспрессировались на всех трёх исследуемых стадиях развития ловчего аппарата (табл. 1).

Ранее [1, 2, 10] все исследования хитиназ у *Nepenthes* ограничивались исключительно ловчими аппаратами. Анализ транскриптомов в настоящей работе показал, что гены хитиназ всех пяти классов экспрессируются также и в листьях, но на более низком уровне, чем в ловчих аппаратах. По-видимому, некоторый базовый уровень экспрессии генов хитиназ в листьях необходим для защиты растения от патогенов, поскольку для всех растений хитиназы являются в первую очередь защитными белками [6]. Интересно, что для ряда идентифицированных генов, например *NChi1*, *NChi2* и *NChi4*, выявлена повышенная экспрессия (более 40 единиц) в некоторых повторностях взрослого листа (табл. 1).

Описанная ранее у одного из видов *Nepenthes* хитиназа класса III, гомологичная NChi2, имела низкую ферментативную активность в пищеварительной жидкости [2]. При этом уровень экспрессии её практически не изменялся при внесении субстрата, что не позволяет говорить об участии данной хитиназы в переваривании насекомых [2]. Это подтвердилось нашими данными, поскольку уровень транскрипции *NChi2* остался примерно на одинаково низком уровне и в ловчем аппарате (на всех стадиях), и в листе, за исключением одного повтора, где уровень вырос более чем в 10 раз (табл. 1), что может быть связано с ответом растения на локальный внешний фактор.

Таким образом, в транскриптомах ловчих аппаратов (на трёх стадиях развития) и взрослых листьев *Nepenthes* sp. мы идентифицировали и охарактеризовали последовательности мРНК 15 хитиназ классов I—V. При этом хитиназы классов II и V для представителей рода *Nepenthes* были выявлены нами впервые.

Работа выполнена частично при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда 14–24–00175 с использованием экспериментальной установки искусственного климата (Институт биотехнологии ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eilenberg H., Pnini-Cohen S., Schuster S., et al. // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. № 11. P. 2775–2784.
2. Rottloff S., Stieber R., Maischak H., et al. // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. № 13. P. 4639–4647.
3. Fukushima K., Fang X., Alvarez-Ponce D., et al. // Nat. Ecol. Evolut. 2017. V. 1. № 3. Article 59.
4. Gorb E.V., Baum M.J., Gorb S.N. // Sci. Rept. 2013. V. 3. Article 3078.
5. Xu J., Xu X., Tian L., et al. // Sci. Rept. 2016. V. 6. 29022.
6. Grover A. // Crit. Revs. Plant Sci. 2012. V. 31. P. 57–73.
7. Singh A., Kirubakaran S., Sakthivel N. // Protein Expr. Purif. 2007. V. 56. № 1. P. 100–109.
8. Frazier C.K. // Carnivorous Plant Newslett. 2000. V. 29. P. 56–61.
9. Rottloff S., Miguel S., Bateau F., et al. // Ann. Bot. 2016. V. 117. P. 479–495.
10. Ishisaki K., Honda Y., Taniguchi H., et al. // Glycobiology. 2012. V. 22. P. 345–351.
11. Passarinho P.A., de Vries S.C. // Amer. Soc. Plant Biol. 2002. V. 1. e0023.
12. Ravin N.V., Gruzdev E.V., Beletsky A.V., Mazur A.M., Prokhortchouk E.B., Filyushin M.A., Kochieva E.Z., Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Skryabin K.G. // BMC Plant Biol. 2016. V. 16. Suppl. 3. P. 153–161.
13. Misra B. // The Winnower. 2015. V. 5. Article e144125.54243.

14. Кочиева Е.З., Филюшин М.А., Белецкий А.В., Ра-
вин Н.В., Скрябин К.Г. // ДАН. 2017. Т. 473. № 3.
С. 370–373.
15. Karlsson M., Stenlid J. // J. Mol. Microbiol. Biotech.
2009. V. 16. P. 208–223.

**IDENTIFICATION AND EXPRESSION ANALYSIS
OF CHITINASE GENES IN PITCHERS OF *Nepenthes* sp.
DURING DEVELOPMENT**

**M. A. Filyushin, E. Z. Kochieva, A. V. Shchennikova, A. V. Beletsky,
A. V. Mardanov, N. V. Ravin, Academician of the RAS K. G. Skryabin**

Received August 21, 2018

Fifteen chitinases of classes I–V were identified in the transcriptomes of pitchers and adult leaves of the carnivorous plant *Nepenthes* sp. Ten of these chitinases were identified for the first time, including the chitinases of classes II and V. The expression levels of all found chitinase genes in leaves and at three stages of pitcher development were determined. The maximum level of transcriptional activity in an open pitcher was observed for the genes encoding chitinase NChi4 (class II) and its isoforms. The expression levels of these genes significantly increased as the pitcher developed. In addition, for the first time, transcription of the genes encoding chitinases of all five classes was detected in the leaves of this plant.

Keywords: carnivorous plant, *Nepenthes*, chitinases genes, transcriptome.