На правах рукописи

Маали Амири Реза

«Введение гена десатураз в картофель *Solanum tuberosum* с целью повышения его холодоустойчивости и изучение физиологических свойств полученных растений-регенерантов»

03.00.12 – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2007

Работа выполнена на кафедре физиологии растений биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ:

доктор биологических наук, профессор **А.М. Носов**

доктор биологических наук **И.В. Голденкова-Павлова**

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук **В.В. Кузнецов**

кандидат биологических наук **Н.В. Хадеева**

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Московская Сельскохозяйственная Академия им. К.А.Тимирязева (МСХА)

Защита состоится 16 февраля 2007г. в ___ часов на заседании Диссертационного совета Д.501.001.46 при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Автореферат разослан "____"_____ 2007г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат биологических наук М.А. Гусаковская

1. Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Исследование физиологических и молекулярных механизмов холодоустойчивости растений является одним из наиболее важных направлений современных физиологии и биохимии растений. Растения не могут изменять внутреннюю температуру своего организма, и в процессе эволюции у них сформировались механизмы, обеспечивающие их функционирование при низких температурах окружающей среды. Многие из этих механизмов основаны на синтезе и накоплении протекторных соединений, изменении осмотического потенциала клетки и др. В середине прошлого века была предложена гипотеза, согласно которой основная роль в способности растений к низкотемпературной адаптации отводится мембранным липидам При продолжительном и сильном снижении температуры окружающей среды текучесть мембран понижается, и они в значительной степени теряют способность поддерживать ионные градиенты и клеточный метаболизм, что приводит к гибели, как отдельных клеток, так и всего организма. Однако существует значительная группа растений, способных адаптироваться к длительному воздействию на них низких температур. Адаптация этих растений к низким температурам обусловлена способностью их клеток повышать текучесть своих мембран посредством увеличения доли полиненасыщенных жирных кислот в мембранных липидах. Важнейшую роль при этом играют десатуразы жирных кислот − ферменты, отвечающие за образование двойных связей, и, следовательно, за изменение физических свойств биологических мембран. Принципиально новые возможности для выяснения роли десатураз в механизмах холодоустойчивости открывают генно-инженерные подходы, в частности получение трансгенных растений, содержащих гены десатураз из гетерологичных организмов. Наибольший интерес в этом аспекте представляют гены ацил-липидных десатураз, формирующие первую (Δ9) и вторую (Δ12) двойные связи в молекулы жирных кислот. Из подобных десатураз наиболее изученными являются десатуразы цианобактерий *des*C (Δ9-десатураза) и *des*A (Δ12-десатураза). Ранее были получены и исследованы трансгенные по гену десатуразы *des*C растения табака; было установлено, что экспрессия этого гена приводит к повышению холодоустойчивости растений (Орлова и др., 2003). Использование подобных подходов имеет не только фундаментальное значение, но

и практическую ценность, поскольку они позволяют создавать устойчивые к низким температурам новые сорта сельскохозяйственных культур. Одной из них является картофель – важная пищевая и техническая культура, относительно устойчивая к низким положительным температурам, но значительно повреждаемая весенними заморозками.

Принципиальным моментом при проведении генно-инженерных работ является выбор эффективной репортерной системы для определения уровня экспрессии исследуемых генов и локализации их продуктов. Ранее была предложена новая система, основанная на использовании гена *lic*B, кодирующего термостабильную лихеназу *Clostridium thermocellum*. Эта репортерная система имеет ряд преимуществ, прежде всего позволяет осуществлять быстрый отбор трансгенных организмов, определять уровни экспрессии гибридных генов и молекулярные массы белковых продуктов гибридных генов.

Цель исследования: Изучение экспрессии генов *des*A и *des*C в клетках про- и эукариот (*E.coli* и картофеля, *Solanum tuberosum*), определение жирнокислотного состава их липидов, проверка холодоустойчивости полученных растений-регенерантов, а также изучение возможности использования репортерной системы на основе термостабильной лихеназы (LicB) для получения трансформантов картофеля.

Исходя из цели работы, были поставлены следующие **задачи**:

1. Анализ нуклеотидной последовательности генов *des*C и *des*A с целью оценки эффективности их экспрессии в клетках *E.coli* и *Solanum tuberosum.*
2. Клонирование нативных и конструирование гибридных генов *des*C и *des*A.
3. Конструирование бактериальных экспрессионных векторов в двух системах pQE и pET.
4. Изучение экспрессии генов десатураз в *E.coli* и состава жирных кислот бактериальных трансформантов.
5. Конструирование растительных экспрессионных векторов, несущих нативные и гибридные гены десатураз..
6. Получение трансформированных растений картофеля и их молекулярный и физиолого-биохимический анализ.

Научная новизна работы.. Впервые для оценки экспрессии генов *des*C и *des*A в клетках про- и эукариот использована репортерная система на основе лихеназы (LicBM3). Установлено, что в составе гибридных белков как лихеназная, так и десатуразная активность сохраняется. Впервые получены трансформанты картофеля, несущие ген ацил-липидной Δ12-десатуразы. Показано, что экспрессия гетерологичных генов десатураз в растениях приводит к повышению уровня ненасыщенности жирных кислот (ЖК) мембранных липидов.

Апробация результатов работы. Результаты работы были представлены на многих Международных и Российских конференциях, в частности 7th International Conference of Plant Genomics, Harbin, China, 2006; International 15th Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology FSEPB, Lyon, France, 2006; 43th Annual Meeting of the Society for Cryobiology and Society for Low temperature Biology, Hamburg, Germany,2006; 24th Annual Meeting of ESCPB Stress in Systems Biology", Antwerpen, Belgium, 2006; International Scientific Conference Genetic-Physiological Fundamentals of Plant Growth and Productivity" Vilnius, Lithuania, 2006; Годичном Собрании Общества Физиологов Растений России, Ростов-на-Дону, 2006 и др.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, а также выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на ….. страницах машинописного текста, включая …… таблиц и …. рисунков. Список цитируемых литературных источников включает ….. наименования.

2. Основное содержание работы

Глава 1. Обзор литературы. В обзоре литературы приведены сведения о типах десатураз жирных кислот цианобактерий и высших растений, анализ строения этих десатураз и структуры кодирующих их генов, механизмы регуляции их экспрессии, Рассмотрены основные механизмы устойчивости растений к низким температурам, роль в них мембранных липидов. Приведена информация о новых репортерных системах на основе лихеназы *Clostridium thermocellum*.

Глава 2. Материалы и методы исследования.

В работе использовали штаммы *E.coli:* XL1blue (Stratagene):F'::Tn10 ^{tet} , proA^{+}B^{+}, lacI ^{Q}, D(lacZ)M15/recA1, endA1, gyrA96, thi,hsdR17, (r_k-m $_{k+}$), supE44, relA1,lac; штамм BL21(DE3) ("Novagene"штат,США) F^{-} dcm ompT hsd S(r_{b-} m_{b-}) gal λ(DE3); штаммы *Agrobacterium tumefaciens* AGLO (rec::bla pTiBo542ΔT, Mop^{+},Cb^{R}). **Стандартные процедуры молекулярного клонирования** выполняли согласно методическому руководству Sambrook et al. (2001). Из генома цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC6803 были клонированы гены *des*A и *des*C, с последующим клонированием в промежуточных плазмидных векторах. Конструирование генов *des*C и *des*A осуществляли в двух бактериальных экспрессионных системах pQE30 и pET22.

Растения. Использовали растения картофеля *Solanum tuberosum* сорта <Десница>. **Агробактериальную трансформацию растений картофеля** проводили по разработанному ранее в ИФР РАН методу с использованием микроклубней (Дерябин, Юрьева, 1997). Отбор трансформантов и дальнейшее их поддержание проводили на среде МС с добавлением 50-100 мкг/мл канамицинсульфата.

Молекульярно-биологический анализ первычных трансформантов растений проводили с использованием методов ПЦР, а таже количественных и качесвенных методов определения активности лихеназы.

Методы определения активности. Количественное определение лихеназной активности в бактериальных и растительных белковых лизитах проводили по методу Miller et al. (1960) с модификациями (Голденкова с сотр., 2003). За единицу активности принимали количество фермента, образующее 1 мкмоль восстанавливающих сахаров за 1 мин. **Зимограммы** получали разделением белков в 10% ДСН-ПААГ, содержащем субстрат лихенан, с последующим окрашиванием гелей 0,5% раствором Конго красного (Sigma) и отмыванием в 1М NaCl. Активность лихеназы в бактериальных колониях **методом чашечного теста** проводили согласно Teacher & Wood (1982).

Белковые экстракты для определения активности лихеназы получали разрушением клеток в 50мМ трис-HCI, pH 8,0 ультразвуком, с последующим центрифугированием при 12000g в течение 30 минут для получения осветленных препаратов.

Анализ жирных кислот проводили с использованием газо-жидкостной хроматографии по разработанному ранее методу (Верещагин с сотр., 1985, Пчёлкин с сотр.2006).

Определение холодостойкости трансформированных растений картофеля. Для оценки холодостойкости растений-регенерантов определяли количество основного продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) ─ малонового диальдегида (МДА) (Жиров с сотр.1982). **Определение проницаемости мембран** при охлаждении оценивали по выходу электролитов из тканей растений (Herburn et al.,1996).

Статистическая обработка данных. Данные в таблицах и на рисунках представляют собой средние арифметические величины и стандартные ошибки, полученные при обработке результатов пяти независимых экспериментов.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Анализ нуклеотидной последовательности генов *des*C и *des*A.

Первым этапом работы был анализ нуклеотидных последовательностей генов *des*C и *des*A с целью оценки встречаемости редких кодонов. Были использованы компьютерные базы данных: GENSCAN (http://genes.mit.edu/GENSCAN.html - поиск интронов, поли А-сигналов); Codon usage Database (http://www.kazusa.or.jp/codon/; http://gcua.schoedl.de/); Countcodon program (http:/www.kazusa.or.jp/codon/countcodon). Для выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей применяли программу Blastn, Blastp -http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Сравнительный анализ встречаемости кодонов у *E. coli, Synechocystis*, *Solanum tuberosum* и генов десатураз цианобактерий позволил заключить, что нуклеотидная последовательность гена Δ9-десатуразы содержит 0,4% редких кодонов относительно *E. coli* и *Synechocystis*, в то время как ген Δ12-десатуразы содержит 2,3% редких кодонов относительно *E. coli*, и не содержит редких кодонов относительно *Solanum tuberosum*. Таким образом, можно предположить, что в *Solanum tuberosum* должны эффективно эксперсссироваться оба гена. В клетках *E. coli* можно ожидать эффективную экспрессию гена Δ9-десатуразы, и не столь высокую - гена Δ12-десатуразы

3.2. Конструирование прокариотических экспрессионных векторов.

Для изучения экспрессии генов десатураз в модельных организмах был использован подход, заключающийся в конструировании и переносе гибридных генов, в состав которых входят целевой ген и ген репортерного белка термостабильной лихеназы, слитых в рамке считывания. Методами молекулярного клонирования были сконструированы гибридные гены *des*C–*lic*BM3 и *des*A-*lic*BM3. Созданные гибридные гены, а также нативные гены *des*C и *des*A были клонированы в экспрессионные вектора для трансформации клеток *E.coli:* pET-*des*C, pET-*des*C-*lic*BM3, pET-*des*A, pET-*des*A-*lic*BM3 (рис.1.а), pQE30-*des*C, pQE30-*des*C-*lic*BM3, pQE30-*des*A, pQE30-*des*A-*lic*BM3 (рис.1.б).

А:

Б:

Рис 1. Схема бактериальных экспрессионных векторов.
А − pET-*des*C, pET-*des*C-*lic*BM3, pET-*des*A, pET-*des*A-*lic*BM3,
Б − pQE30-*des*C, pQE30-*des*C-*lic*BM3, pQE30-*des*A, pQE30-*des*A-*lic*BM3.

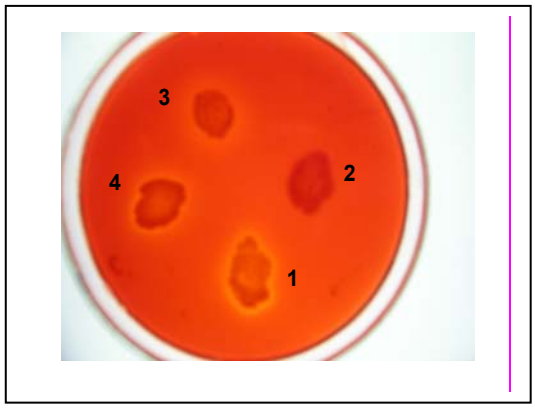
3.3-1. Молекулярный анализ бактериальных трансформантов, несущих плазмиды с нативными *des*C, *des*A и гибридными *des*C-licBM3, *des*A-licBM3 генами.

Для сравнения уровня экспрессии генов *des*C, *des*A в прокариотических и эукариотических клетках, на первом этапе работы были получены бактериальные трансформанты (штаммы *E.coli* XL1blue и BL21), несущие плазмиды, содержащие бактериальные экспрессионные вектора.

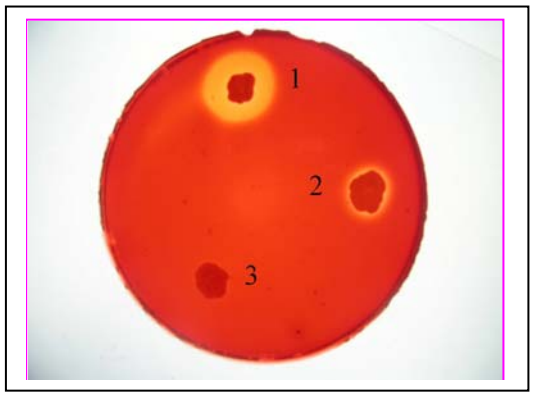
Первоначально бактериальные трансформанты были проанализированы методом чашечного теста (рис.2). Активность репортерного белка лихеназы обнаружена только у трансформантов, несущих плазмиды, которые содержали последовательность гена *lic*BM3 или гибридных генов pET-*des*C-LicBM3, pQE30-*des*C-LicBM3, pET-*des*A-LicBM3 и pQE30-*des*A-LicBM3 (рис.2).

Для доказательства синтеза белковых продуктов перенесенных генов в бактериальных трансформантах белковые экстракты из бактерий были проанализированы методом ПААГ электрофореза (рис.2,3,4). Однако сколь нибудь значимых различий в спектрах полипептидов между индуцированными и контрольными препаратами обнаружено не было. Поэтому для доказательства экспрессии рекомбинантных десатураз был использован метод энзимограмм, основанный на определении активности репортерного гена – лихеназы. (рис.2,3 и 4). Как видно из представленных результатов активность термостабильной лихеназы выявлена только у трансформантов, в состав которых входит репортерный ген термостабильной лихеназы.

А:



Б:



В:

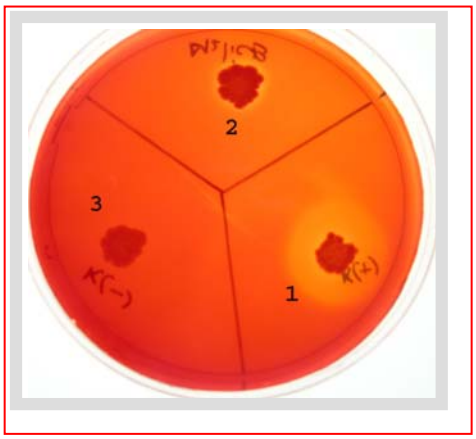


Рис.1. Чашечный тест бактериальных трансформантов, несущих плазмиды:
А − pQE-*lic*BM3 (1), pQE-*des*C (2), pQE-*des*C-*lic*BM3 (3),
pET-*des*C-*lic*BM3 (4);
Б − pQE-licBM3 (1),
pET-*des*A-*lic*BM3 (2), pET-desA (3).
В − pQE-*lic*BM3 (1), pET-*des*A (2), pET-*des*A-*lic*BM3 (3).

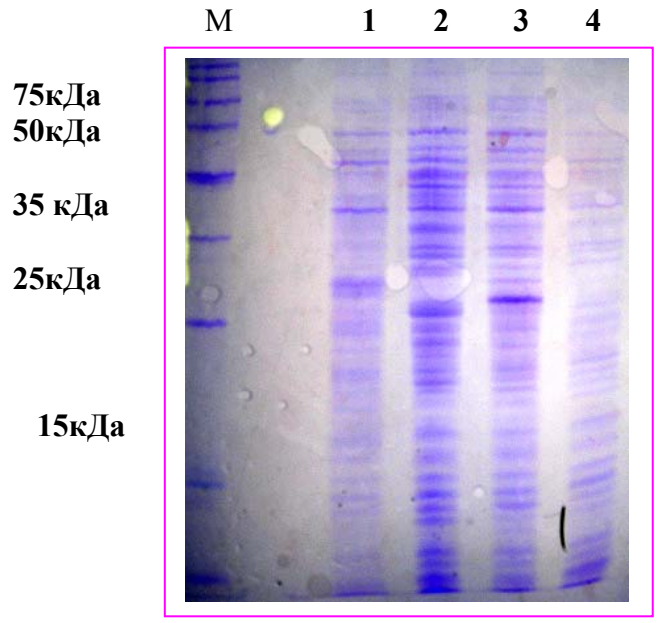


Рис. 2а. Электрофореграмма белковых экстрактов, полученных из клеток *E.coli*.
M – маркер молекулярных масс.
1 – DesC-LicBM3; 2 – DesC;
3 – LicBM3; 4 – XL1Blue.

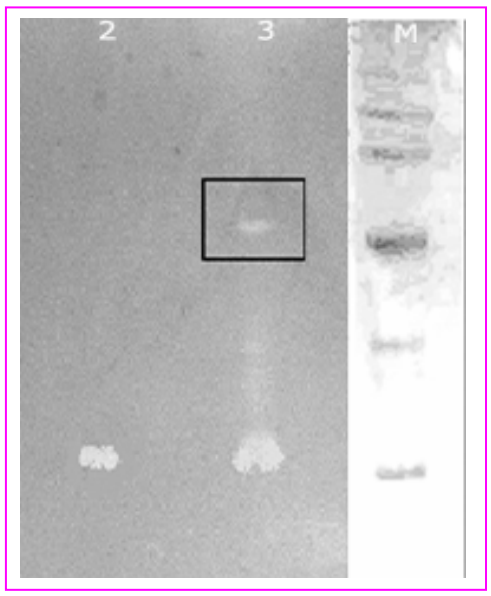


Рис 2б. Зимограмма белковых экстрактов, полученных из клеток *E.coli*
1- DesC; 2- LicBM3;
3- DesC-LicBM3; M- маркер.

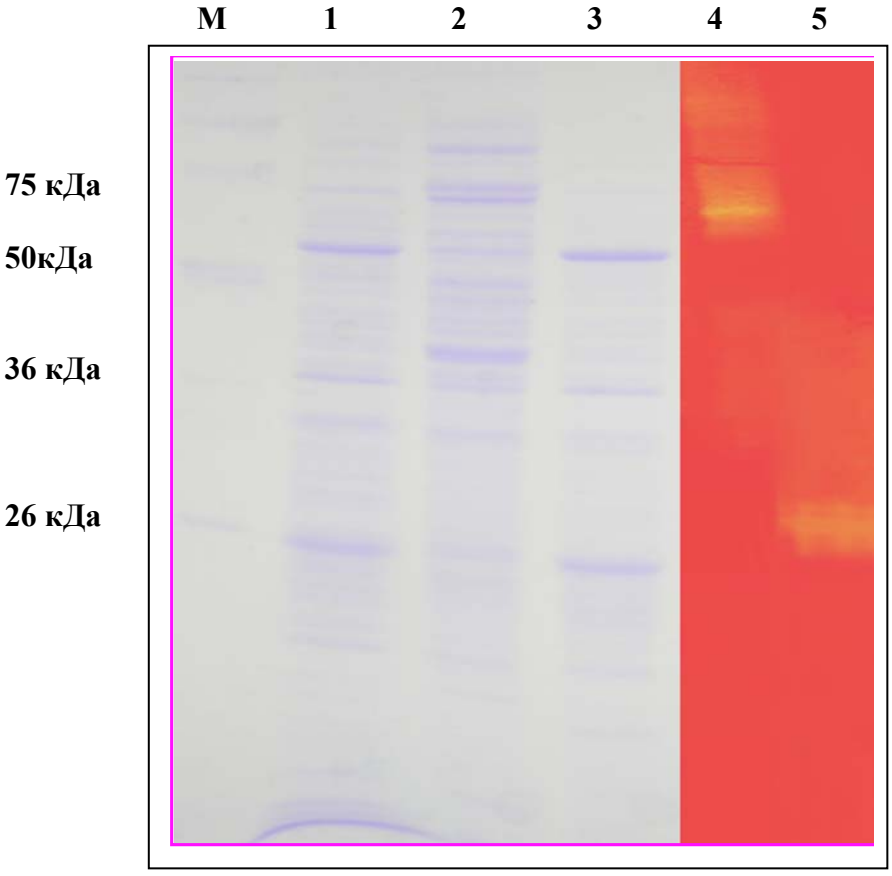


Рис. 3. Электрофореграмма (слева) и зимограмма (справа) белковых экстрактов, полученных из бактериальных трансформантов плазмид pQE-DesA-licBM3;
M-маркер, 1-DesA; 2-DesA-LicBM3; 3- pQE; 4- pQE-DesA-licBM3; 5- LicBM3

Таким образом, методом энзимограмм было показано, что лихеназа в составе гибридных белков сохраняет как свою термостабильность, так и активность, и по активности лихеназы можно точно определять молекулярные массы гибридных белков, в состав которых входит лихеназа.

Следует отметить, что молекулярные массы гибридных белков DesC-LicBM3 и DesA-LicBM3, выявленных методом энзимограмм, соответствует теоретически рассчитанным и составляют около 50 и 66.5 кДа соответственно.

Уровень экспрессии генов может быть определен по количеству образовавшихся мРНК и/или белкового продукта. Мы оценили уровень экспрессии гибридных генов *des*A-*lic*BM3 и *des*C-*lic*BM3 в клетках прокариот на основании данных количественного определения уровня активности лихеназы, входящей в состав гибридных белков (табл. 1). Для сравнения уровня накопления гибридных белков были использованы полученные нами ранее бактериальные pQE30-*lic*BM3 трансформанты, экспрессрующие лихеназу**.** Как видно из представленных данных, уровень экспрессии гибридного гена *des*A-*lic*BM3 значительно ниже, чем таковой гибридного гена *des*C-*lic*BM3.

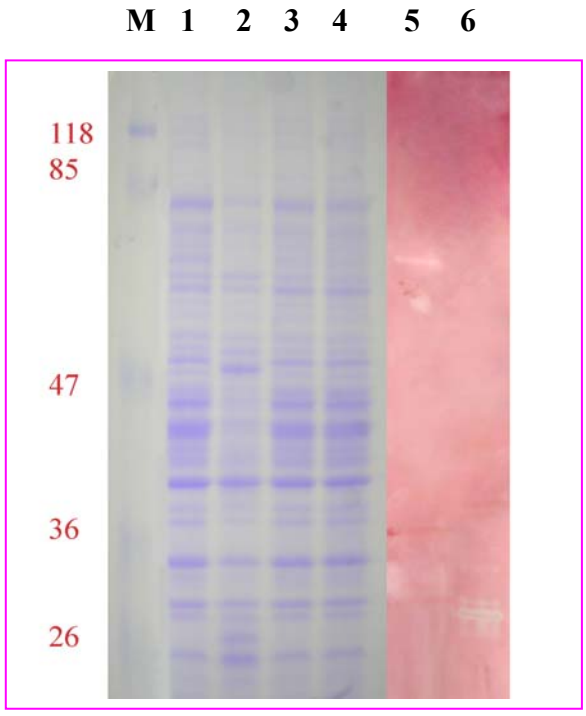


Рис. 4. Электрофореграмма (слева) и зимограмма (справа) белковых экстрактов, полученных из бактериальных трансформантов плазмид pET-DesA-licBM3;
M - маркер,
1 - pET;
2 - pQE;
3 - pET-desA;
4 - pET-DesA-licBM3;
5- pET-DesA-licBM3;
6 - LicBM3.

Возможно, низкий уровень экспрессии гибридного гена *des*A-*lic*BM3 обусловлен наличием в эго последовательности кодонов, которые редко используются как в клетках *E.coli*, так и в клетках цианобактерий. Можно предположить, что это обусловлено тем, что экспрессия гена *des*A у цианобактерий

запускается воздействием ряда стрессовых факторов, например таких, как низкие температуры.

Таблица 1. Уровни экспрессии гибридных генов определенных по активности термостабильной лихеназы.

Вариант	Активность (ед/мг суммарного белка)	Относительная активность в %
Контроль	$< 10^{-4}$	-
LicBM3	296 ± 3	100
DesC-LicBM3	288 ± 2	97
DesA-LicBM3	0,552 ± 0,023	2

3.3.2. Изучение влияния введенных генов ацил-липидных десатураз на состав жирных кислот липидов бактериальных трансформантов.

Несмотря на то, что активный центр десатураз сформирован аминокислотами, расположенными в середине белковой молекулы, удаленной от N- и С-концевой областей фермента, необходима проверка сохранения активности десатураз в составе гибридных белков. Для этого бактериальные трансформанты, несущие плазмиды с нативными и гибридными генами Δ9- или Δ12-десатураз, были выращены на минимальной среде с добавлением ИПТГ (изопропил-6d-галактопиронозида) и соответствующего субстрата, в качестве которого для изучения экспрессии гена *des*C использовали стеарат натрия (18:0), а гена *des*A - олеат натрия (С18:1). В качестве контроля были использованы бактериальные трансформанты, несущие плазмиды только с репортерным геном термостабильной лихеназы. Далее методом газо-жидкостной хроматографии определили жирнокислотный состав липидов контрольных и трансформированных генами Δ9- и Δ12-десатуразы клеток *E.coli*. Полученные результаты представлены в таблицах 2 и 3.

Из табл. 2 можно видеть, что в клетках, экспрессирующих нативный и гибридный ген *des*C и выращиваемых на среде, содержащей стеарат натрия, относительное содержание остатков стеариновой кислоты (С18:0) снижалось, что сопровождалось повышением доли остатков олеиновой кислоты ($C18:1^{\Delta 9}$); уровень С16:1 при этом не изменялся. Это свидетельствует о высокой субстратной специфичности Δ9-десатуразы, десатурирующей С18:0, но не С16:0.

Таблица 2. Изменение состава жирных кислот в клетках *E. coli* в результате экспрессии нативного и гибридного генов *des*C в системе экспрессии pET.*

ЖК	Относительное содержание ЖК, % от суммы МЭЖК		
	контроль	pET-Δ9	pET-Δ9-licB
16:0	31.1	27.1	30.8
16:1 Δ5	0.1	0.1	0
16:1 Δ9	0	0	0
16:1 Δ11	4.6	4.9	5.0
17:0**	3.1	3.0	2.5
18:0	58.0	51.0	51.8
18:1 Δ9	2.4	12.3	8.7
18:1 Δ11	0.3	0.3	0.1
транс-9,12-18:2	0.1	0.3	0.5
19:0**	0.4	1.0	0.6

* Во всех случаях статистическая ошибка не превышала 0.1%.

** Суммарное количество двух изомеров, один из которых, возможно, представляет собой циклическую ЖК.

Таблица 3. Изменение состава жирных кислот в клетках *E. coli* в результате экспрессии нативного и гибридного генов *des*A в системах экспрессии pQE и pET.

ЖК	Относительное содержание ЖК, % от суммы МЭЖК					
	Система pQE			Система pET		
	Контр.	pQE-Δ12	pQE-Δ12-Lic B	Контр.	pET-Δ12	pET-Δ12-Lic B
14:0	1.3	1.0	1.1	0.5	0.5	3.5
16:0	9.1	7.3	9.2	8.3	4.1	10.1
16:1ω9	0	0.2	0.1	0	0	0
16:1ω7	1.8	1.8	1.7	1.8	0.9	2.6
16:1ω5	0	0	0.2	0	0.2	0
∇17:0	1.6	1.2	1.2	0.8	0.6	0.2
18:0	1.1	0.4	0.2	0.7	0.5	0.7
18:1ω9	80.0	83.3	82.3	82.8	86.9	74.8
18:1ω7	2.3	3.0	1.5	4.6	2.5	3.6
18:2ω6	0	0.2	0.5	0	0.3	1.9
∇19:0	1.2	0	0.1	0.4	0.9	0.9
17-Me-19:0	0	0	0.5	0	0.1	0.4

* Во всех случаях статистическая ошибка не превышала 0.1%.

Таким образом можно заключить, что сравнительный анализ экспрессии нативного и гибридного генов в клетках бактерий показал, что лихеназа в составе

гибридных белков сохраняет активность и термостабильность, а десатуразы сохраняют способность катализировать введение двойной связи в соответствующие жирные кислоты. Следует также отметить, что использование лихеназы как трансляционного репортера позволяет быстро и точно определять уровни экспрессии гибридных генов, в состав которых входит ген термостабильной лихеназы, а также молекулярные массы их белковых продуктов, что является важным при создании трансгенных растений.

На основании полученных результатов был сделан вывод, что для трансформации растений использование гибридных генов, в которых последовательность генов десатураз слита с последовательностью репортерного гена, кодирующего термостабильную лихеназу, весьма перспективно.

3.4. Получение трансформантов картофеля и молекулярно-биологический анализ полученных растений-регенерантов.

В результате процедур молекулярного клонирования был сконструирован растительный экспрессионный вектор pBISN1-IN-*des*A-*lic*BM3 и pBISN1-IN-*des*A , в которых гибридный и нативный ген *des*A-*lic*BM3 находился под контролем сильного конститутивного промотора 35S РНК CaMV. В качестве репортерного гена использовали *lic*BM3, а селективного гена – *nptII.*

Растения-регенеранты, трансформированные геном *des*A-LicBM3 и устойчивые к канамицину, были проанализированы методом качественного определения активности лихеназы. В таблице 4 представлены результаты селекции этих регенерантов на среде с канамицином с последующим отбором первичных трансформантов по активности лихеназы (табл. 5).

Проведенные эксперименты позволили отобрать трансформанты растений картофеля линии DesA-LicBM3, которые экспрессировали перенесенный гибридный ген. Далее, первичные трансформанты, отобранные на селективном агенте, были проанализированы методом ПЦР. Для анализа первичных трансформантов линий *Des*A-LicBM3 и *Des*A использовали специфические праймеры к последовательностям генов *des*A и *lic*BM3. Полученные фрагменты соответствовали размерам этих последовательностей ─ 1053 п.н. для гена *des*A и 1700 п.н. для гибридного гена, соответственно.

Таблица 4. Эффективность трансформации гибридными генами *des*A-*lic*BM3(Δ12-licBM3) и *des*A (Δ12).

Конструкции	Δ12	Δ12-licBM3
Кол-во эксплантов	21	22
Кол-во полученных регенерантов	16	29
Кол-во канамицин-устойчивых регенерантов	6	8
Кол-во трансформированных линий	1	4
Эффективность трансформации (количество трансформированных регенерантов на 1 исходный эксплант	0.05	0.18

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что термостабильная лихеназа является удобным трансляционным репортером для отбора трансгенных организмов. Можно также заключить, что эффективность трансформации (рассчитанная как количество трансформированных линий на исходный эксплант) почти в 3 раза выше в варианте использования гибридного гена *des*A-*lic*BM3.

Таблица 5. Эффективность экспрессии гибридных генов, рассчитанная по активности термостабильной лихеназы.

Растительные линии	Активность лихеназы, (ед./мг суммарного белка)	Уровень накопления рекомбинантных белков (% от суммарного белка)
Линия 1 (DesA-LicBM3)	0.065	0.0155
Линия 2 (DesA-LicBM3)	0.016	0.007
Линия 3 (DesA-LicBM3)	0.066	0.0157
Линия 4 (DesA)	0	0
Контроль, NPTII-позитивный	0	0

Исходя из полученных результатов, для дальнейшей работы были выбраны трансформированные растения картофеля несущие гибридный ген DesA-LicBM3 (линии **1**, **2** и **3**) и линия **4** с нативным геном DesA.

3.5. Качественный и количественный состав ЖК трансформированных растений.

Для изучения эффекта Δ12-ацил-липидной десатуразы на ЖК-состав липидов надземных частей контрольных и трансформированных растений был проведен анализ абсолютного содержания отдельных ЖК в липидах листьев и стеблей. Полученные результаты представлены в табл. 6.

Таблица 6. Абсолютное содержание жирных кислот в листьях различных линий растений картофеля, трансформированных геном Δ12-ацил-липидной десатуразы.

ЖК	Состав ЖК, мкмоль/г сырой массы				
	Контроль	Линия 1	Линия 2	Линия 3	Линия 4
14:0	0.05	0.03	0.07	0.04	0.05
13-Me-14:0	0.05	0.02	0.05	0.09	0.25
15:0	0.02	0.02	0.04	0.01	0.03
изо-16:0	0.12	0.03	0.01	0.13	0.11
16:0	1.48	1.84	2.40	1.74	1.84
Δ9-16:1	0.39	0.16	0.08	0.53	0.72
15-Me-16:0	0	0	0	0	0.03
Δ9,12-16:2	0.04	0.04	0.06	0.06	0.05
Δ8,11-16:2	0.02	0.01	0.04	0.01	0.02
Δ7,10,13-16:3	0.40	0.31	0.48	0.75	0.34
15-Me-17:0	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
18:0	0.13	0.12	0.15	0.14	0.19
Δ9-18:1	0.05	0.05	0.09	0.09	0.13
Δ11-18:1	0.03	0.04	0.03	0.04	0.03
Δ9,12-18:2	1.58	1.54	2.73	2.13	2.20
19:0	0.01	0	0.01	0.02	0.02
Δ9,12,15-18:3	3.03	2.49	3.13	4.28	3.38
18-Me-19:0	0	0	0.08	0.07	0
17-Me-19:0	0	0	0.04	0.01	0
20:0	0.04	0.05	0.11	0.07	0.09
Сумма ЖК	7.44	6.77	9.60	10.22	9.50
ИН	0.14	0.12	0.17	0.20	0.17

Установлено, что липиды изученных линий картофеля включали 16-19 индивидуальных видов C_{14}-C_{20} ЖК. Главными ЖК липидов всех исследованных растений были линоленовая (18:3), линолевая (18:2) и пальмитиновая (16:0); в значительном количестве содержались также гексадекатриеновая (16:3), пальмитолеиновая (16:1) и стеариновая (18:0) кислоты. Во всех линиях трансформированных растений, кроме линии **1**, уровень главных полиненасыщенных ЖК (18:2 и 18:3) значительно увеличивался по сравнению с контролем. Так, содержание линолевой кислоты возрастало на 72% (линия **2**), 35% (линия **3**) и 40% (линия **4**), а повышенный уровень линоленовой кислоты отмечен

для линии **3**, где он был на 41% выше контроля, и линии **4** (12%). Абсолютное содержание олеиновой кислоты (18:1 Δ9) у линий **2** и **3** увеличивалось на 80%, а у линии **4** ─ даже на 160%. Соответственно, индекс ненасыщенности ЖК в липидах линий **2**, **3** и **4** на 21.4, 43 и 21.4% превосходил контрольный.

Суммарное количество ЖК у линий **2**, **4** и **3** увеличивалось на 28-37%, и только у линии **1** было на 9% ниже уровня контроля. Таким образом, экспрессия гена *des*A могла стимулировать биосинтез мембранных липидов в трансформированных линиях.

Следует отметить любопытный факт - под влиянием гена десатуразы *des*A в трансформированных растениях синтезировались несколько видов разветвленных ЖК, которые отсутствуют в контроле. Линии **2** и **3** содержали в значительном количестве остатки кислот, которые были идентифицированы нами как 18-Me-19:0 и 17-Me-19:0. Содержание другой разветвленной ЖК, идентифицированной как 13-Me-14:0, в линиях **3** и **4** увеличивалось в 1.5 и 5 раз соответственно, а у линии **1** уменьшалось на 60%. Присутствие еще одного вида разветвленных ЖК ─ 15-Me-16:0 ─ наблюдалось только в линии **4**.

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что ведение гена Δ12-ацил-липидной десатуразы существенно изменяет качественный и количественный состав и соотношение жирных кислот в липидах растений-регенерантов картофеля.

3.6. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) в трансформированных растениях картофеля.

Известно, что увеличение количества ди- и триеновых ЖК является результатом активности Δ12- и ω3-десатураз картофеля, которые используют в качестве субстратов моно- и диненасыщенные ЖК и отвечают за образование второй и третьей двойной связей в молекуле ЖК, соответственно. 18:2-ЖК, в свою очередь, служит субстратом для Δ6- и ω3-десатураз. Таким образом, можно заключить, что именно Δ12-десатураза является «ключевым» ферментом, который необходим для выживания клеток при низких температурах. Поэтому завершающим этапом работы явилось исследование физиологических характеристик трансформированных растений-регенерантов, характеризующих устойчивость растений к стрессовым факторам.

Как известно, перекисное окисление липидов (ПОЛ) приводит к частичному разрушению, прежде всего, полиненасыщенных ЖК, изменяя тем самым физико-химические свойства мембран. Одной из самых ранних неспецифических реакций клетки на стрессоры, в том числе низкотемпературный стресс, является развитие окислительного стресса, который инициируется активными формами кислорода (АФК) и может приводить к интенсификации перекисного окисления ненасыщенных ЖК липидов мембран и увеличению содержания в тканях одного из его конечных продуктов ─ малонового диальдегида (МДА). Таким образом, содержание МДА служит показателем активности окислительных процессов, обусловленных АФК, которые взаимодействуют с ненасыщенными жирными кислотами, вызывая усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ) в плазмалемме и клеточных органеллах. Поэтому для оценки степени холодостойкости исследуемых генотипов картофеля был использован метод определения ПОЛ по содержанию одного из конечных его продуктов ─ МДА.

Согласно полученным результатам (рис. 5), через 30 мин после начала охлаждения содержание МДА в тканях контрольных растений значительно возрастало, а спустя 1 ч после начала холодовой экспозиции оно было на 25% выше по сравнению с неохлажденным вариантом. В то же время уже при исходных условиях (22 ºС) уровень МДА в тканях всех исследованных трансформантов картофеля был почти в 1.5 раза ниже, чем в контроле; после охлаждения в этих тканях (линии 1 и 2), в отличие от контрольных, увеличения содержания МДА не наблюдалось, а у двух других линий (3 и 4) оно даже уменьшилось на 30 и 25 % соответственно. Через 60 мин после начала низкотемпературного стресса количество МДА в тканях трансформантов продолжало оставаться на исходном уровне (линии 2 и 4) или же понижалось на 15% как у линий 1 и 3.

Таким образом, определение интенсивности ПОЛ в тканях полученных генотипов картофеля выявило повышенную устойчивость всех линий трансформантов к охлаждению по сравнению с контролем. В то же время усиление накопления продуктов ПОЛ в тканях контрольных растений картофеля при снижении температуры среды свидетельствовало о серьезных повреждениях их мембранных структур, в отличие от трансформантов.

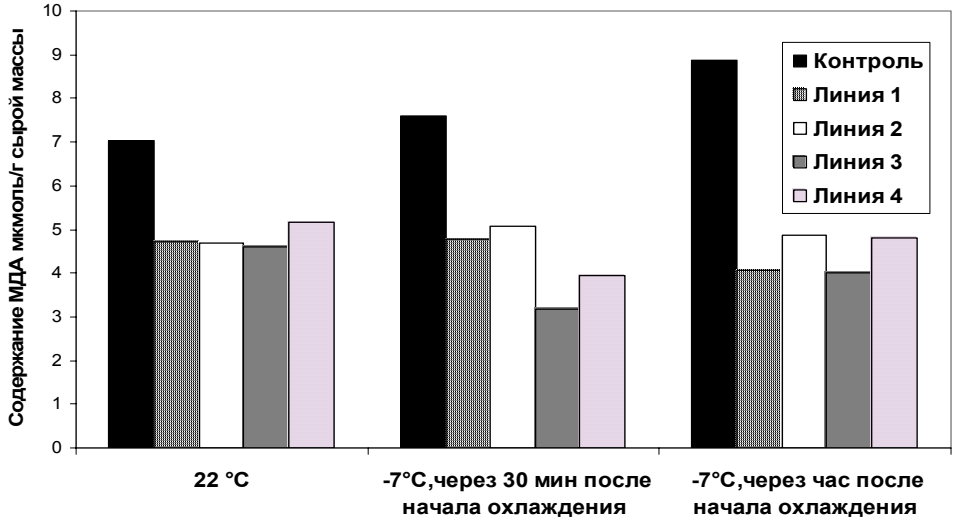


Рис. 5. Интенсивность перекисного окисления липидов в листьях различных трансформированных линий растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Десница в норме и после охлаждения.

Ранее было показано, что суммарное количество ЖК и их индекс ненасыщенности всех трансформированных линий кроме линии **1**, увеличивалось на 27-38 и 21-43%, соответственно. Можно предположить, что кроме специфического влияния (увеличение количества 18:2 ЖК), экспрессия Δ12-ацил-липидной десатуразы приводит к повышению общего содержания ЖК в мембранных липидах трансформированных растений и в результате ─ к более высокой устойчивости трансформированных линий к низкой температуре (-7°С). Было показано, что ген *des*A является высокочувствительным геном при изменении условий среды и вызванным этим процессом повышением уровня 18:2 ЖК в липидах льна.

3.7. Определение устойчивости к низким температурам контрольных и трансформантов растений по выходу электролитов.

Известно, что понижение температуры, увеличивая проницаемость клеточных мембран, главным образом, плазмалеммы, вызывают интенсивный выход ионов во время охлаждения из клеток в клеточные стенки и межклетники (апопласт), откуда электролиты при последующей инфильтрации и встряхивании легко выделяются в воду. Этот метод позволяет выявить нарушение структуры клеточных мембран при охлаждении, которое легко регистрируется в виде резкого увеличения скорости утечки растворенных веществ из тканей растений. Показано,

что выход ионов зависит от температуры охлаждения и продолжительности ее действия (Wright, Simon, 1973).

Анализ полученных результатов показал, что при оптимальной температуре выращивания 22°С (без охлаждения) трансформированые и контрольные растения по коэффициенту повреждения значительно отличались (рис.6), что свидетельствует о неповрежденном состоянии мембран трансформированных растений по сравнению с контролем. Эти результаты свидетельствуют об активности гена *des*A с промотором 35S РНК CaMV даже при оптимальной температуре. Согласно полученным результатам, через 30 мин после начала охлаждения индекс повреждения в тканях контрольных растений значительно возрастал, он оказался на 51.7% выше по сравнению с неохлажденным вариантом. В то же время при исходных условиях (22ºС) индекс повреждения у линий 1, 2, 3 и 4 был на 32.7%, 2.2%, 41.2% и 41.2 % ниже, чем в контроле.

Охлаждение увеличило проницаемость мембран всех вариантов. Причем наибольшая степень повреждения наблюдалась у растений контрольного варианта. Показано, что под воздействием низкотемпературного стресса наиболее сильно повреждаются контрольные растения, в то же время, индекс повреждения в трансформированных линиях (линии 1, 2, 3 и 4, соответственно) уменьшался на 36.5%, 46.5%, 31% и 56% по сравнению с контрольными растениями.

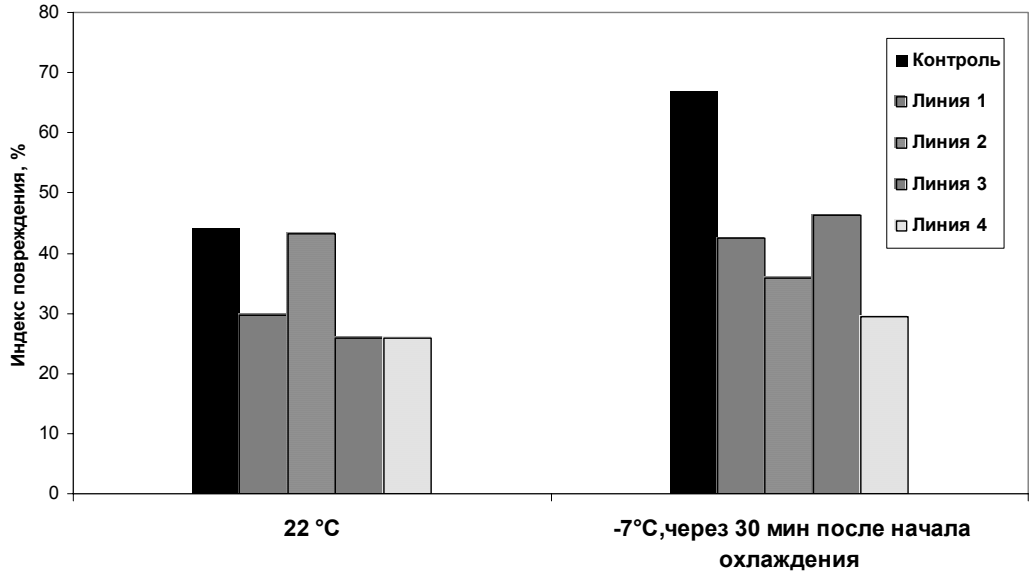


Рис.3.17. Индекс повреждения листьев различных трансформированных линий растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Десница в норме и после охлаждения.

По изменению индекса повреждения можно судить о нарушениях барьерных свойств плазмалеммы. В связи с этим полученные результаты можно интерпретировать, как значительное снижение барьерных функций плазмалеммы у тканей контрольных растений при охлаждении, что соответствует высокой степени холодового повреждения и свидетельствует о пониженной холодостойкости этих растений. В то же время, трансформированные растения имеют достоверно более низкие значения индекса повреждения, по сравнению с контролем, что позволяет охарактеризовать их как более устойчивые к пониженной температуре.

Таким образом, в настоящей работе показано, что низкая температура оказывает разное влияние на линии трансформированного картофеля, различающиеся по уровню экспрессии гена Δ^{12}-ацил-липидной десатуразы, и контрольные растения. Полученные данные подтверждают предположение о важной роли ненасыщенных ЖК в снижении температуры фазового перехода липидов в механизмах устойчивости растений к низкой температуре.

Заключение

Формирование устойчивости растение к низкой температуре является комплексным процессом, запускающим каскад сложных функциональных изменений, в том числе перестройку липидных компонентов мембран, включающих десатурацию жирных кислот. В течение последних двух десятилетий большое внимание уделяется молекулярным механизмам холодоустойчивости растений. Знания биохимии и молекулярной биологии десатураз жирных кислот открывает широкие перспективы в области биотехнологии и сельского хозяйства, поскольку позволяет создание сортов и видов растений, способных переносить ограничения той или иной климатической зоны.

Представленные результаты исследования позволяют заключить следующее: нуклеотидная последовательность, а также кодоновый состав генов могут влиять на их экспрессию в разных организмах, поскольку уровень экспрессии гибридного гена *des*A-*lic*BM3 в бактериях оказался значительно ниже, чем таковой гибридного гена *des*C-*lic*BM3. Возможно, низкий уровень экспрессии гибридного гена *des*A-*lic*BM3 на уровне активности репортерного гена и жирнокислотного состава

обусловлен наличием в его последовательности кодонов, которые редко используются как в клетках *E.coli*, так и в клетках цианобактерий.

Продемонстрировано, что в составе гибридных *Des*A-LicBM3 и *Des*C-LicBM3 белков DesA и DesC белки сохраняют свою биологическую активность - катализировать введение двойной связи в цепи ЖК и изменять ЖК-состав липидных мембран в клетках *E.coli* и растений картофеля, а лихеназа сохраняет основные свойства репортерного белка – термостабильность и активность. Полученные результаты свидетельствует о возможности использования этой репортерной системы при изучении экспрессии генов в клетках про- и эукариотических организмов.

Полученные результаты показывают, что в трансформированных растениях картофеля синтезируется гетерологичная Δ12-ацил-липидная десатураза, которая стимулирует биосинтез мембранных липидов и повышает уровень ненасыщенных ЖК, в частности 18:2 и 18:3. Значительные изменения в липидах мембран за счет увеличения ненасыщенности их ЖК свидетельствуют о том, что десатураза цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 эффективно экспрессируется в листьях картофеля и повышает уровень ЖК 18:2, служащий субстратом для последующего синтеза триеновых ЖК. Таким образом, перенос гена Δ12-ацил-липидной десатуразы в геном растений картофеля может приводить к увеличению ненасыщенности мембранных липидов. При этом, увеличение доли полиненасыщенных ЖК в мембранных липидах может приводить к повышению холодостойкости трансформантов картофеля.

Выводы

1. Анализ последовательности генов *des*C и *des*A показал, что для эффективной экспрессии в про- и эукариотах нуклеотидные последовательности этих генов в модификации не нуждаются.

2. Показано, что нативные и гибридные гены десатураз Δ9 и Δ12 эффективно экспрессируются в клетках прокариот (*E. coli*) и эукариот (картофель). При этом как лихеназа, так и десатуразы сохраняют свои основные свойства.

3. Впервые показано, что гетерологичная ацил-липидная Δ12-десатураза эффективно экспрессируется в трансформантах картофеля, вызывает изменения биосинтеза мембранных липидов и повышает уровень ненасыщенности ЖК.

4. В результате экспрессии бактериального гена *des*A изменяется физиолого-биохимическое состояние растений-регенерантов картофеля, в частности интенсивность перекисного окисления липидов и степень проницаемости мембран. Обнаруженные изменения свидетельствуют о повышении холодостойкости обогащенные ненасыщенными жирными кислотами трансформированных растений.

5. На основании полученных результатов по сохранению каталитической активности бактериальных десатураз в составе гибридных белков, для трансформации растений предлагается использовать гибридные гены, в которых последовательности генов десатураз слиты с последовательностью репортерного гена, кодирующего термостабильную лихеназу.

Публикации по материалам работы:

1. **. Маали А.Р.,** Шимшилашвили Х.Р., Пчёлкин В.П., Цыдендамбаев В.Д., Носов А.М., Лось Д.А., Голденкова-Павлова И.В. Сравнительное изучение экспрессии нативного и гибридного гена ацил-липидной Δ^9- десатуразы в бактерии *Escherichia coli.* // Генетика, 2007. Т.43, №2. с. 176-182.
2. **Maali A.R.,** Goldenkova-Pavlova I.V., Pchelkin V.P., Tsydendambaev V.D., Los D.A., Nosov A.M. Acyl-lipid Δ12-desaturase of the cyanobacterium increases the unsaturation degree in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.). // Biologija, № 2, 2007. (в печати).
3. **Маали А.Р.,** Голденкова-Павлова И.В., Юрьева Н.А., Пчёлкин В.П., Цыдендамбаев В.Д., Верещагин А.Г., Дерябин А.Н., Трунова Т.И., Лось Д.А., Носов А.М. Жирнокислотный состав липидов растений картофеля, трансформированных Δ12-десатуразы Synechocystis sp. PCC6803 // Физиология растений, Т. 54, № 4, 2007 (в печати).
4. **Maali A.R.,** Goldenkova-Pavlova I.V., Nosov A.M., Los D.A. New approach for the expression of the gene Δ12 acyl-lipid desaturase in plant, // Proceeding of the 7th International Conference of Plant Genomics, Harbin, China, 2006, P. 142.
5. **Maali A.R.,** Goldenkova-Pavlova I.V., Nosov A.M., Los D.A., Shimshelashvili X. New approach for the expression of the gene Δ12 acyl-lipid desaturase in plant. // Proceeding of the International 15th Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology FSEPB, Lyon, France, 2006, P.134.
6. **Maali A.R.,** Goldenkova-Pavlova I.V., Nosov A.M., Los D.A., Shimshelashvili X.P. Expression of the gene delta9 acyl-lipid desaturase in Escherichia coli, // Proceeding of the 43th annual meeting of the Society for Cryobiology and Society for Low temperature Biology, Hamburg, Germany, 2006, P. 198.
7. **Маали А.Р.,** Голденкова-Павлова И.В., Носов А.М., Лось Д.А., Шимщлащвили Х.Р. Влияние трансформации *Escherichia coli* геном Ацил-липидной Δ9-десатуразы на устойчивость организма к низкой температуре. // Сборник материалов Годичного Собрания Общества Физиологов Растений России, Ростов-на-Дону, России, 2006, с.119.

8. **Маали А.Р.,** Голденкова-Павлова И.В., Носов А.М., Лось Д.А., Шимщлащвили Х.Р. Сравнительное изучение экспрессии нативного и гибридного гена ацил-липидной Δ12-десатуразы в клетках *Escherichia coli*, // Сборник материалов международной конференции"Генетика в России и мир", посвященной 40-летию института общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН, Москва, 2006, с.113.
9. **Maali A.R.,** Goldenkova-Pavlova I.V., Nosov A.M., Los D.A., Shimshelashvili X.P. New approach for the Expression of the gene for the Δ9 acyl-lipid desaturase in plant // Proceeding of 24th Annual Meeting of ESCPB "Stress in Systems Biology", Antwerp, Belgium, 2006.
10. **Maali A.R ,** Goldenkova-Pavlova I.V., Pchelkin V.P., Tsydendambaev V.D., Los D.A., Nosov A.M. The study of influence Δ12 acyl-lipid desaturase (desA) gene in fatty acid composition of transgenic Potato plants. // Proceeding of International Scientific Conference "Genetic-Physiological Fundamentals of Plant Growth and Productivity"Designed to the 100th anniversary of Prof. Jonas DAGys Vilnius, Lithuania, 2006.
11. **Маали А.Р.,** Голденкова-Павлова И.В., Носов А.М., Лось Д.А., Шимщлащвили Х.Р. Влияние трансформации *Escherichia coli* геном Ацил-липидной Δ12-десатуразы на рост организма к низкой температуре.// Сборник материалов международной конференции "Генетика микроорганизмов и биотехнология", посвященной 100-летию со дня рождения С. И. Алиханяна, Пущино, Москва, 2006, с.61.
12. Н. Мирахоли, Д.В. Сотченков, **Р. Маали**, И.А. Абдеева, И.В. Голденкова-Павлова, Э.С. Пирузян. Дизайн сисем экспрессии для биотехнологии растений // В сборнике: «Факторы экспериментальной эволюции организмов», Научные труды, Редактор Акад. М.В. Ройка, Т.3., Киев – ЛОГОС, 2006, Т. 3, с. 609-613.
13. Х.Р. Шимшилашвили, Д.В. Сотченков, **Р. Маали**, И.В. Голденкова-Павлова. Экспериментальные модели для создания трансгенных растений, устойчивых к стрессовым // В сборнике: «Факторы экспериментальной эволюции организмов», Научные труды, Редактор Акад. М.В. Ройка, Т.3., Киев – ЛОГОС, 2006, Т. 3, с. 653-657.