

сконструированы рекомбинантные плазмиды на основе вектора R30m, где, в одном случае, слияние *prqA-licBM2* находится в одном опероне с нативным геном *prqR*, а в другом случае, с мутантным геном *prqR*. Обе конструкции клонированы в клетках штамма PqA. Слияние проявляет токсичность для цианобактерий при конститутивной дерепрессии, и вместе с тем оно индуцируется 0,5 М NaCl с развитием устойчивости клеток к MV.

Представленные результаты указывают на необходимость тщательной разработки системы экспрессии гена *prqA*, включающей различные регуляторные элементы. И только при условии нахождения наиболее оптимальной генно-инженерной конструкции, содержащей изучаемый ген, станет возможным получение трансгенных растений и использование их в качестве экспериментальных моделей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты: №05-04-49371, 08-04-90410_укр), ЦНТП РИ-112/001/211 («Ведущие научные школы»), и программы фундаментальных исследований РАН «Динамика генофондов растений, животных и человека».

1. Goldenkova I.V., Musiychuk K.A., Piruzian E.S. A thermostable *Clostridium thermocellum* lichenase-based reporter system for studying the gene expression regulation in prokaryotic and eukaryotic cells // *Mol. Biol. (Russia)* - 2002.- 36(5) – С. 698-704.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ НАТИВНЫХ И ГИБРИДНЫХ ГЕНОВ $\Delta 9$ - и $\Delta 12$ -ДЕСАТУРАЗ *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC 6803 В КЛЕТКАХ ПРО- И ЭУКАРИОТ

М.В. Гордукова, Х.Р. Шимшилашвили, И.В. Голденкова-Павлова

*Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН (ИОГен РАН), Москва, Россия
chris@vigg.ru*

Несмотря на значительные успехи ученых в области исследования физиолого-биохимических основ устойчивости растений к абиотическим стрессам, единая теория адаптации растений к низким температурам до сих пор не создана. Растения могут адаптироваться к низким температурам, используя различные механизмы, действующие на разных уровнях организации - на физиологическом, биохимическом и молекулярном. Одним из наиболее известных механизмов адаптации растений к низким температурам является активация синтеза и накопления сахаров и других осмолитов, прежде всего, пролина, обладающих осморегуляторным и стресс-протекторным действием (Кузнецов, Дмитриева, 2006). Другим типом приспособительных реакций растений к изменяющимся температурным условиям является изменение каталитических свойств ферментов, за счет модификаций в их молекулах. (Алехина и др., 2005). Третьим механизмом адаптации растений к низким температурам является синтез стрессорных белков холодового ответа. В настоящее время идентифицировано несколько генов, кодирующих белки холодового ответа, которые часто обозначают как *COR-белки* (от англ. *cold-responsive proteins*) (Jaglo et al., 2001). Известно, что механизм адаптации растений к низким температурам также связан с изменением состава мембранных липидов и увеличение текучести мембран. В настоящее время именно этому механизму отводится главная роль в приспособлении растений к холодовому стрессу. Известно, что одной из причина гибели растений при холодовом стрессе является уменьшение подвижности белков в липидном бислое, их неспособность к изменению конформации и, как следствие, - полная потеря своих функций.

Обычно клетки обладают защитными системами для контроля над состоянием своих мембран и в момент изменения условий среды активируют эти системы. Так, при снижении температуры активируется синтез десатураз, которые отвечают за образование двойных

связей в молекулах жирных кислот. Десатурация вызывает увеличение подвижности жирно-кислотных хвостов в липидах.

В качестве целевых генов были выбраны гены *desA* и *desC* *Synechocystis* sp PCC 6803, кодирующее десатуразы с различной субстратной специфичностью. Мы предположили, что за счет функционирования десатураз в растительных клетках будет изменяться количество ненасыщенных жирных кислот мембран, что приведет к увеличению текучести мембраны и, как следствие, к увеличению устойчивости растений к ряду стрессовых воздействий: изменение температур и осмотический стресс.

Поскольку десатуразы обладают ферментативной активностью, которую можно определить, используя трудоемкие методы, были сконструированы гибридные гены, в которых целевые гены десатураз трансляционно слиты с последовательностью репортерного гена термостабильной лихеназы. Были сконструированы бактериальные экспрессионные вектора, содержащие нативные и гибридные гены десатураз.

Полученными векторами были трансформированы клетки *E. coli*. Бактериальные трансформанты были проанализированы методами чашечного теста, ПААГ-электрофореза, энзимограмм, также был проведен анализ жирнокислотного состава бактериальных трансформантов.

Полученные результаты позволили заключить, что в составе гибридных белков DesC-LicBM2 и DesA-LicBM2, как лихеназа, так и десатуразы сохраняют свою активность, при этом активность гибридных белков не отличается от активности белков в нативном состоянии.

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.

Далее были сконструированы растительные экспрессионные вектора, несущие нативные и гибридные гены десатураз, под контролем конститутивного промотора.

Для выяснения роли десатураз в механизмах холодоустойчивости, а также для изучения возможности изменения холодоустойчивости за счет экспрессии гетерологичных генов десатураз были сконструированы экспериментальные модели первичных трансформантов картофеля. Поскольку ранее были получены и исследованы трансгенные растения табака, экспрессирующие ген *desC* $\Delta 9$ -десатуразы, и было установлено, что экспрессия этого гена приводит к повышению холодоустойчивости растений (Orlova et al., 2003), в этом исследовании были получены экспериментальные модели растений картофеля, экспрессирующие нативный и гибридный ген $\Delta 12$ -десатуразы. Анализ трансформантов позволил заключить, что экспрессия гена $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы стимулирует биосинтез мембранных липидов и существенно изменяет качественный и количественный состав жирных кислот в липидах растений-регенерантов картофеля в условиях оптимальных температур. Можно предположить, что первичные трансформанты растений картофеля, экспрессирующие ген *desA*, будут устойчивы и к низкой температуре, так как способность выживания при низких температурах коррелирует с наличием диеновых ЖК в мембранах и способностью клеток синтезировать полиненасыщенные ЖК.

Полученные результаты показывают, что в трансформированных растениях картофеля синтезируется гетерологичная $\Delta 12$ -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 $\Delta 12$ -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.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант №08-04-90410_укр.

БИОСИНТЕЗ РАСТИТЕЛЬНОГО ГОРМОНА ИНДОЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ РИЗОСФЕРНЫМИ БАКТЕРИЯМИ *P. MENDOCINA*

С.С. Жардецкий, Е.А. Храмцова, Н.П. Максимова

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
shar-gen1313@mail.ru

Известно, что многие микроорганизмы способны к синтезу ауксина – индол-3-уксусной кислоты (ИУК). Показано, что до 80% бактерий ризосферы могут синтезировать ИУК [1, 2]. Некоторые из них, такие как *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *Erwinia herbicola* и два патовара *Pseudomonas syringae* (*savastanoi* и *syringae*), участвуют в патогенезе растений, тогда как другие (например представители родов *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* и *Rhizobium*) наоборот стимулируют рост растения. В данной работе был изучен синтез ИУК у ризосферных бактерий *P. mendocina* ВКМВ 1299 и исследована возможность их использования для стимуляции роста растений.

В проведенном ранее скрининге коллекции ризосферных микроорганизмов и исследовании их способности к синтезу ИУК было показано, что штамм *P. mendocina* обладает максимальной продукцией фитогормона. Показано, что синтез ИУК у данного штамма протекает по ИПВК пути (через индол-3-пируват), и, кроме того, клетки данного штамма обладают активностью 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-дезаминазы, способной снижать природный уровень этилена в растении [3, 4].

Выделение плазмидной и хромосомной ДНК, трансформацию, электрофорез в агарозном геле проводили согласно руководству Маниатис [5]. Рестриктию, лигирование, секвенирование и полимеразную цепную реакцию выполняли согласно инструкциям фирмы изготовителя используемых ферментов (Fermentas). Для амплификации *ipdC* гена использовали праймеры: 25 *mer* – обратный, 5' *ctggggatccgacaagtaacagc* 3', и *Shar-put* – прямой, 5' *gaaggatccctgtatgctaacc* 3'. Мутантные бактерии с повышенным синтезом ИУК получали с помощью нитрозогуанидина [6] и отбирали по устойчивости к структурным аналогам триптофана, а затем по количеству синтезируемой ИУК. Удельную активность триптофан-аминотрансферазы (ТАТ), индолпируват-декарбоксилазы (ИПДК) и 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-дезаминазы определяли в соответствии с описанными ранее методами [7 – 9]. Концентрацию белка в реакции определяли по Бредфорду [10].

В ходе работы изучена регуляция синтеза ИУК у бактерий *P. mendocina*. Было установлено, что наличие триптофана в среде (400 мг/мл) индуцирует синтез аминотрансферазы в 7,5 раз, а декарбоксилазы в 4 раза. Однако добавление в среду антралиловой кислоты приводило к практически полной репрессии триптофанаминотрансферазной активности, в то время как активность индолпируват-декарбоксилазы практически не изменялась. Полученные данные свидетельствуют о наличии пути индукции синтеза ИУК триптофаном и репрессии антралилатом. Причем антралилат влияет непосредственно на этапе превращения триптофан → ИПВК. При изучении регуляции активности ИПДК было показано, что внесение в реакционную смесь одного из аналогов триптофана, а именно 5-фтор-DL-триптофана в концентрации 10 мМ, увеличивает активность фермента в 2,5 раза.