

АНАЛИЗ ФУНКЦИИ ГЕНА *prqA* КОНТРОЛИРУЮЩЕГО УСТОЙЧИВОСТЬ К МЕТИЛВИОЛОГЕНУ ЦИАНОБАКТЕРИИ *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC 6803

С.А. Голенкина^{1,2}, И.В. Голденкова-Павлова¹, М.М. Бабыкин²

¹ - Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН (ИОГен РАН), Москва, Россия

² - Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
s_golenkina@mail.ru

Аэробные организмы обладают множеством систем защиты от окислительного стресса, куда входят антиоксидантные ферменты, нейтрализующие активные радикалы, механизмы репарации поврежденных макромолекул, а также системы активного удаления из клеток редокс-активных и других токсичных соединений. Механизмы последнего типа хорошо изучены у гетеротрофных бактерий и дрожжей, но мало исследованы у фотосинтезирующих организмов.

Известно, что в контроль устойчивости цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 к метилвиологену (параквату) вовлечены гены, кодирующие белки-транспортеры, в том числе ген *prqA*. Предполагается, что он кодирует Na⁺- антипортер семейства белков множественной лекарственной устойчивости МАТЕ, широко представленного у растений. Установлено, что ген *prqA* входит в один оперон с регуляторным геном *prqR*, и оперон *prqRA* вовлечен в контроль адаптации цианобактерий к солевому стрессу; при этом с функцией *prqA* связана адаптивная деградация пигментов фотосинтеза и выживание клеток в экстремальных условиях.

Для доказательства антипортерной функции белка PrqA нами исследована способность мутантов PqA и PqR *Synechocystis* с инактивированным и дерепрессированным геном *prqA*, соответственно, удалять меченый ¹⁴C-MV из клеток. Полученные результаты показали, что для мутанта PqA характерно низкоэффективное выведение меченого MV: около 20 % от исходного уровня за 60 мин инкубации. Напротив, внутриклеточное содержание MV у мутанта PqR снижалось значительно за короткое время: на 80 % в течение 36 мин. Добавление к клеткам мутанта PqR ингибитора трансмембранного градиента протонов приводило к падению эффективности удаления ¹⁴C-MV, вплоть до уровня мутанта PqA. Эти данные доказывают, что белок PrqA действительно играет роль молекулярной помпы, выкачивающей MV из цитоплазмы, причем проявляющей функцию H⁺/MV-антипортера.

С целью получения растений, толерантных к стрессовым воздействиям, в том числе, и к метилвиологену, планируется использовать ген *prqA* для введения в клетки модельных растений табака. В качестве гена-репортера, свидетельствующего об экспрессии *prqA* в гетерологичной системе, предусмотрено использование гена *licBM2*, который кодирует модифицированную термостабильную лихеназу *Clostridium thermocellum*. Выбранная репортерная система является весьма удобной и эффективной. Она применима для любых организмов, в частности бактерий и растений [1]. Нами сконструированы транскрипционно-трансляционные слияния *prqA-licBM2* и *licBM2-prqA*, клонированные в рекомбинантных плазмидах pET-PAL и pET-LBP на основе вектора экспрессии в клетках *E. coli*. Экспрессию целевого гена *prqA* оценивали по уровню лихеназной активности. С помощью методов определения активности лихеназы нами показана экспрессия транскрипционно-трансляционных слияний генов *prqA* и *licBM2* в клетках *E. coli*.

Для определения эффективности репортерной системы в цианобактериях *Synechocystis* sp. PCC 6803 гибридная конструкция *prqA-licBM2* была клонирована в специфический цианобактериальный вектор экспрессии pVZ321N под контроль сильного промотора гена устойчивости к канамицину. Было установлено, что данное слияние является токсичным для клеток *Synechocystis* sp. PCC 6803, и его экспрессия возможна только при условии наличия некой супрессорной мутации. Так как в природе ген *prqA* негативно регулируется белком PrqR, то для контроля сохранения функции PrqA в гибридном белке нами были

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 RqA. 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