

На правах рукописи

Неделяева

Неделяева Ольга Игоревна

**Молекулярная идентификация и функциональная
характеристика белков SaCLCa1 и SaCLCc1 семейства
хлоридных каналов (CLC) из эугалофита *Suaeda altissima* (L.) Pall.**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в лаборатории транспорта ионов и солеустойчивости Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва.

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

Балнокин Юрий Владимирович

Официальные оппоненты:

Минибаева Фарида Вилевна

доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, главный научный сотрудник

Эльдаров Михаил Анатольевич

кандидат биологических наук, Федеральное государственное учреждение, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук

Защита состоится «27» февраля 2020 г. в 11 часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 002.210.01 по специальности 03.01.05 – “Физиология и биохимия растений” (Биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (495) 977 8018, электронная почта: m-azarkovich@mail.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва, и на сайте <https://ippras.ru/>.

Автореферат разослан «___» _____20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Согласно данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (FAO) более 800 млн. га сельскохозяйственных угодий в мире засолено. Засоление, вызванное накоплением ионов Na^+ и Cl^- в почвах, считается одним из самых распространенных и губительных для большинства сельскохозяйственных растений. Культурные растения, возделываемые на засоленных почвах, находятся под действием ионного, осмотического и окислительного стрессов и испытывают дефицит элементов минерального питания. Это приводит к замедлению роста, а заодно и к снижению продуктивности и пищевой ценности возделываемых культур (Wong et al., 2013). Хлористый натрий в почве в концентрациях более 0,1 - 0,3% может приводить к снижению урожая на 25 - 75%.

Поддержание цитоплазматических концентраций Na^+ и Cl^- на низком уровне в условиях почвенного засоления является одним из ключевых защитных механизмов растений. Галофиты регулируют концентрации Na^+ и Cl^- в цитоплазме более эффективно, чем гликофиты. Механизмам Na^+ -гомеостатирования клеток растений в нормальных условиях и в условиях солевого стресса посвящено множество исследований (Amtmann, Sanders, 1998; Blumwald et al., 2000; Tester, Davenport., 2003; Horie, Schroeder, 2004; Apse, Blumwald, 2007). Относительно хорошо исследован также транспорт K^+ (Maathuis, Amtmann, 1999; Tester, Leigh, 2001; Mäser et al., 2002; Rodríguez-Navarro, Rubio, 2006; Ragel et al. 2019). Однако механизмы транспорта анионов (Cl^- и NO_3^-) изучены в гораздо меньшей степени. Транспорт анионов в условиях засоления стали исследовать только в последнее время (Teakle, Tyerman, 2010; Li et al., 2017). Вместе с тем известно, что чувствительность многих растений к Cl^- даже выше, чем к Na^+ (Wei et al., 2016; Li et al., 2016). Это означает, что хлорид-ион, так же, как и Na^+ , должен выводиться из цитоплазмы во внешнюю среду или в вакуоль.

Транспорт анионов у галофитов обладает особенностями, позволяющими им осуществлять поглощение нитрата, накопление его в вакуолях и загрузку в ксилему в

условиях конкуренции с Cl^- , а перенос Cl^- из цитоплазмы в вакуоль – против больших концентрационных градиентов этого аниона (Munns, Tester, 2008; Teakle, Tyerman, 2010; Volkov, 2015). Эти особенности анионного транспорта галофитов должны проявляться не только на функциональном, но и на молекулярно-генетическом уровне. Сравнение генов галофитов с их ортологами из гликофитов и функциональный анализ кодируемых ими белков должны выявить черты, свойственные галофитам на уровне отдельных генов и их продуктов. Гены ион-транспортирующих белков, клонированные из галофитов, можно использовать в генной инженерии для получения солеустойчивых форм сельскохозяйственных растений.

Представители семейства хлоридных каналов (CLC – Chloride Channel) являются одними из основных претендентов на роль белков, участвующих в формировании свойства солеустойчивости растительного организма. Семейство CLC у растений включает анионные каналы и анион/ H^+ -антипортеры, которые локализованы в эндомембранах клеток и участвуют в транспорте Cl^- и NO_3^- . Клонирование полноразмерных кДНК генов анионных транспортеров/каналов из галофитов и функциональный анализ кодируемых ими белков является важной задачей в рамках исследования механизмов солеустойчивости растений и создания форм культурных растений, устойчивых к засолению.

Одним из молекулярно-биологических инструментов исследования функции и физиологической роли продукта гена является комплементация мутации по известному гену геном другого организма, функция продукта которого исследуется. Транспортную функцию белков семейства хлоридных каналов CLC исследуют путем гетерологичной экспрессии кодирующих их генов в $\Delta gef1$ – мутанте дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* по единственному в этом организме гену семейства CLC, *GEF1*, продукт которого является Cl^- -транспортером (Gaxiola et al., 1998; López-Rodríguez et al., 2007). Такой подход был реализован в настоящей работе для достижения основной ее цели – выяснения функций продуктов генов *SaCLCa1* и *SaCLCc1*, клонированных из галофита *S. altissima*.

Цель работы. Клонировать гены *SaCLCa1* и *SaCLCc1* семейства хлоридных каналов (CLC) из эугалопита *Suaeda altissima* (L.) Pall. и функционально охарактеризовать белки, кодируемые этими генами.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить 3'- и 5'- концевые нуклеотидные последовательности кДНК гена *SaCLCa1* из галофита *S. altissima* методом RACE и клонировать ее полноразмерную последовательность.
2. Выполнить *de novo* сборку транскриптома близкородственного вида *Suaeda fruticosa* (L.) Forssk и осуществить поиск *in silico* контигов генов семейства *CLC* в собранном транскриптом. Клонировать кДНК гена *SaCLCc1* из галофита *S. altissima*, основываясь на последовательности *SfCLCc1*.
3. Провести направленный мутагенез в гене *SaCLCa1* (C562T) для замены пролина в положении 188 на серин в селективном фильтре SaCLCa1.
4. Получить мутант *Saccharomyces cerevisiae* по единственному гену семейства *CLC* (*GEF1*) и исследовать комплементацию дрожжевого мутанта $\Delta gef1$ генами *SaCLCa1*, *SaCLCa1*(C562T) и *SaCLCc1* путем выращивания трансформантов на различных селективных средах, выявляющих фенотип $\Delta gef1$.
5. Исследовать экспрессию генов *SaCLCa1* и *SaCLCc1* в органах *S. altissima* при выращивании растений на средах с разными концентрациями Cl^- и NO_3^- , а также в динамике ответа растений на гиперосмотический солевой шок.

Научная новизна. Впервые клонированы полноразмерные нуклеотидные последовательности кДНК генов семейства хлоридных каналов из эугалопита – *SaCLCa1* и *SaCLCc1*, и исследована физиологическая роль белков, кодируемых этими генами. С помощью гетерологичной экспрессии *SaCLCc1*, *SaCLCa1* и *SaCLCa1*(C562T) в дрожжевом мутанте $\Delta gef1$ показано, что оба белка являются функционально-активными; *SaCLCc1* транспортирует Cl^- , а *SaCLCa1*, наиболее вероятно, – NO_3^- .

Впервые исследована экспрессия мРНК генов *SaCLCa1* и *SaCLCc1* в органах *S. altissima*. Показано, что оба гена экспрессируются в корнях и листьях *S. altissima* и их

экспрессия изменяется в ответ на дефицит нитрата и засоление среды культивирования. Изменение экспрессии гена *SaCLCa1* наблюдали преимущественно в корнях, а гена *SaCLCc* – в листьях.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведенная работа имеет фундаментальный характер. Полученные результаты расширяют знания о роли белков анионных транспортеров в солеустойчивости растений-галофитов. Обзор литературных данных в сочетании с результатами исследования могут быть использованы в разработке лекционных курсов по физиологии и биохимии растений в высших учебных заведениях биологического профиля.

Методология и методы исследования. Работа выполнялась с применением современных молекулярно-биологических и физиологических методов, опубликованных и хорошо зарекомендовавших себя. Эксперименты проводились в 3 - 5 биологических и аналитических повторностях. Результаты исследования проходили статистическую обработку. Проведен однофакторный дисперсионный анализ, на графиках представлены средние значения \pm их стандартные ошибки, * - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$; *** - $P \leq 0,001$.

Публикации и апробация работы на научных мероприятиях. По материалам диссертационной работы опубликовано 11 работ в журналах и материалах конференций, из которых 2 – в журналах, рекомендуемых ВАК.

Результаты диссертационной работы представлены на VIII Съезде Общества физиологов растений России, Всероссийской научной конференции с международным участием «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2016» (Москва, 2016); Годичном собрании Общества физиологов растений России 2016, Научной конференции с международным участием и школой молодых ученых «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма» (Санкт-Петербург, 2016); IV Международном симпозиуме по сигналингу и ответной реакции растений (Санкт-Петербург, 2016); Международной конференции

«Биомембраны 2016: механизмы старения и возрастные болезни» (Долгопрудный, 2016); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2018» (Москва, 2018); Годичном собрании Общества физиологов растений России, Всероссийской научной конференции с международным участием и Школой молодых ученых «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды» (Иркутск, 2018); IX Съезде Общества физиологов растений России, Всероссийской конференции и школе для молодых ученых «Физиология растений - основа создания растений будущего» (Казань, 2019).

Связь с научными программами. Работа выполнялась с 2015-2019 гг. в рамках темы НИР «Исследование белков, вовлеченных в механизмы ионного гомеостатирования растений при высоких концентрациях NaCl в среде» (№ 0106-2014-0009, № 0106-2018-0017) в лаборатории транспорта ионов и солеустойчивости ФГБУ ИФР им. К.А. Тимирязева РАН при частичной поддержке грантов РФФИ № 15-04-04712 А, 16-34-00991 мол_а и 18-04-00504 А.

Личный вклад автора в исследование. Автор работы принимал непосредственное участие в организации, планировании и проведении экспериментов, а также в обсуждении результатов и подготовке рукописей к публикации. Подавляющая часть результатов получена лично автором или при его активном участии. В процессе работы над диссертацией, кроме научного руководителя, консультативную помощь автору оказывали к.б.н., с.н.с. Карпычев И.В., к.б.н., н.с. Шувалов А.В., д.б.н., в.н.с. Попова Л.Г., к.б.н., с.н.с. Беляев Д. В.

Структура диссертационной работы. Работа имеет стандартную структуру и состоит из разделов: Содержание, Обозначения, Введение, Обзор литературы, Объекты и методы исследования, Результаты и обсуждение, Заключение, Список литературы, Приложение. Работа изложена на 138 страницах машинописного текста, содержит 12 таблиц и 16 рисунков. Список литературы включает 188 источников.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Объектами исследования были эугаллофит *S. altissima* (L.) Pall., *A. thaliana* (экотип Col-0), штамм *S. cerevisiae* дикого типа (ДТ) W3031A (МАТа *leu2*, *his3*, *trp1*, *ura3*, *ade2*) и изогенный ему мутант по гену *GEF1* – Δ *gef1* (*gef1::LEU2*).

Растения *S. altissima* выращивали на среде Робинсона-Даунтона (Robinson, Downton, 1985) при разных концентрациях Cl^- и NO_3^- . Для проведения солевого шока растения *S. altissima* выращивали на среде без NaCl. Солевой шок проводили, добавляя в среду NaCl до конечной концентрации 250 мМ. Растения *A. thaliana* выращивали на питательном растворе 1/3 Гибо (Gibeaut et al., 1997).

Штаммы *S. cerevisiae* культивировали согласно (Sherman, 2002). Исследование роста штаммов ДТ, мутанта Δ *gef1* и мутанта Δ *gef1*, экспрессировавшего целевые гены, проводили на селективных средах (Gaxiola et al., 1998).

Выделение суммарной РНК из тканей *S. altissima* и *A. thaliana*. Выделение суммарной РНК из растений проводили фенольным методом (Yuorieva et al., 2018).

Синтез 1-ой цепи кДНК на матрице РНК (обратная транскрипция). Примеси одно- и двухцепочечной ДНК в растворе с выделенной суммарной РНК удаляли обработкой ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США). 1-ую цепь кДНК на матрице РНК синтезировали с помощью MMLV/MINT-ревертазы (Евроген, Россия).

Постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР проводили с помощью Taq ДНК-полимеразы (СибЭнзим, Россия) или Encyclo ДНК-полимеразы (Евроген, Россия) по стандартной схеме. Длину ампликонов оценивали в 1-1,5% агарозном геле на основе 1xTAE-буфера.

ПЦР в режиме реального времени (ОТ-кПЦР). Реакции проводили на амплификаторе LightCycler 96 (Roche, Швейцария) с использованием флуоресцентного красителя SybrGreen (Евроген, Россия). *SaeEF1 α* (GenBank: MN076325) и *SaAct7* (GenBank: MK615596), клонированные из *S. altissima*, служили референсными генами. Данные по результатам ОТ-кПЦР анализировали в программе

LightCycler 96 SoftwareVersion 1.1. Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали методом (Livak, Schmittgen, 2001) по формуле $2^{-\Delta\Delta Cq}$.

Клонирование кДНК гена *SaCLCa1*. кДНК срединного фрагмента *SaCLCa1* амплифицировали с помощью вырожденных праймеров и Encyclo ДНК-полимеразы. Нуклеотидные последовательности 3'- и 5'-концов гена *SaCLCa1* получили методом RACE с помощью набора (Евроген, Россия). Далее подобрали пару праймеров для амплификации полноразмерной кДНК гена *SaCLCa1* (CloneAmp Hi-Fi PCR Premix kit, Takara Bio, США) и ее последующего клонирования в дрожжевой экспрессионный вектор рМВ1 с помощью набора In-Fusion HD kit (Takara Bio, США).

Введение точечной нуклеотидной замены (C562T) в кДНК гена *SaCLCa1*. Линеаризованную конструкцию рМВ1-*SaCLCa1*(C562T) получили с помощью ПЦР-смеси CloneAmp HiFi PCR Premix и пары праймеров в результате «инвентированной» ПЦР. 5'-концы линеаризованной плазмидной ДНК были фосфорилированы с использованием Т4-полинуклеотидкиназы (СибЭнзим, Россия). Фосфорилированную плазмидную ДНК лигировали с помощью Т4-лигазы (Fermentas, США). Исходную плазмидную ДНК рМВ1-*SaCLCa1*, служившую матрицей для амплификации, удаляли из смеси обработкой метилзависимой ДНК-эндонуклеазой MspI (СибЭнзим, Россия).

Сборка *de novo* транскриптома *S. fruticosa* (L.) Forssk и клонирование кДНК гена *SaCLCc1*. Транскриптом *S. fruticosa* собрали на основе опубликованных в базе SRA NCBI (PRJNA279962) массивов коротких прочтений (Diray-Arce et al., 2015). (1) Проверку качества извлеченных из библиотек SRA коротких прочтений РНК, (2) удаление нуклеотидов низкого качества и остатков адаптеров Illumina и (3) сборку очищенных ридов в контиги выполнили с помощью программ FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), Trimmomatic (Bolger et al., 2014) и Trinity (Haas et al., 2013) соответственно. Аннотацию контигов проводили на основе сходства с последовательностями из базы данных SwissProt (Bairoch et al., 2004).

Полноразмерную последовательность кДНК гена *SaCLCc1* амплифицировали с помощью полимеразы Phusion High Fidelity (Thermo Fisher Scientific, США) и пары

праймеров, подобранных к найденной в транскриптом последовательности *SfCLCc1*, и клонировали в вектор pMB1 (Gibson Assembly Cloning kit, NEB, США).

Биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей белков SaCLCa1 и SaCLCc1. Топологию белков предсказывали с помощью программы MEMSAT-SVM (Nugent, Jones, 2009). Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей выполнили в MAFFT (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>). Филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей CLC семейства построили в MEGA X v. 10.0.1 (Kumar et al., 2018) методом максимального правдоподобия, основанном на модели Джонса-Тейлора-Торнтон (Jones et al., 1992).

Определение содержания ионов Cl^- и NO_3^- в водных экстрактах тканей органов *S. altissima*. Концентрацию NO_3^- в растворах определяли с помощью ионоселективного электрода Elite-021 (Нико Аналит, Россия). Концентрацию Cl^- в растворах измеряли меркуриметрическим методом согласно ГОСТ Р 4245-72, используя полуавтоматический титратор Top Buret H Eppendorf (Eppendorf, Германия).

Методы молекулярной биологии *S. cerevisiae* и *E. coli*. Выделение геномной ДНК, выделение суммарной РНК фенольным методом, трансформацию *S. cerevisiae* литиевым методом выполняли согласно (Ausubel et al., 2003).

Выделение плазмидной ДНК, получение химически- и электрокомпетентных клеток *E. coli*, их трансформацию целевыми конструкциями, культивирование и отбор колоний на селективных средах выполняли согласно (Sambrook et al., 1989; руководство фирмы-производителя электропоратора Eppendorf Multiporator (Eppendorf, Германия)). В работе использовали штаммы HST08 (Takara Bio, США), NEB 5-alpha Competent (NEB, США), XL1-Blue (Евроген, Россия), Top-10 и dH5alpha (Invitrogen, США) *E. coli*.

Получение делеционного мутанта *S. cerevisiae* Δ gef1. Мутант с делетированным геном *GEF1* (YJR040W) – *gef1::LEU2* – получили путем гомологичной рекомбинации в клетках штамма ДТ *S. cerevisiae* W3031A. Клетки

W3031A трансформировали *LEU2*-конструкцией, амплифицированной с плазмиды pRS315 (CloneAmp HiFi PCR Premix, Takara Bio, США). Трансформанты отбирали на селективной минимальной среде SD без лейцина и проверяли с помощью ПЦР-скрининга (Рис. 1.).

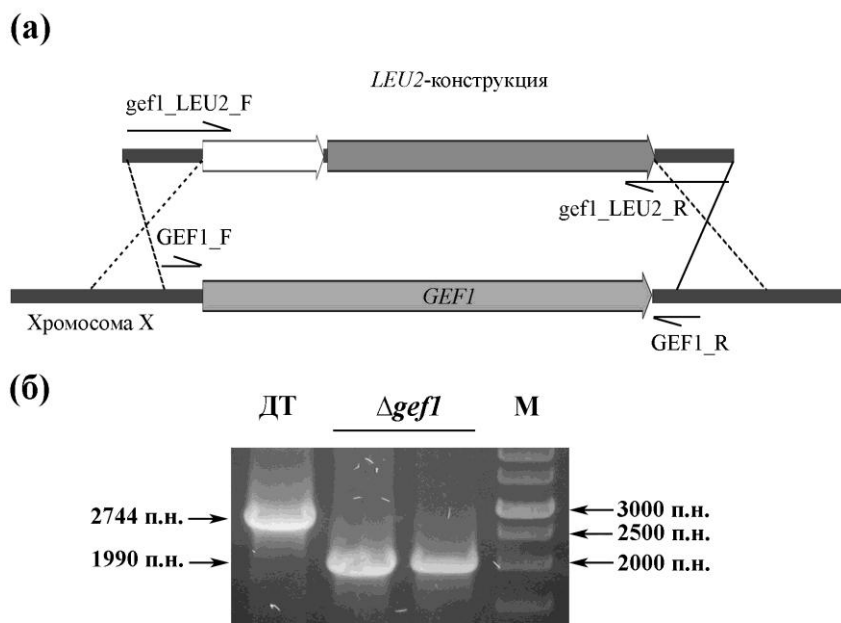


Рис. 1. Получение штамма *S. cerevisiae* Δ *gef1*. (а) ген *GEF1* делетировали путем замены его кодирующей последовательности на конструкцию *LEU2*. *gef1_LEU2_F* и *gef1_LEU2_R* – праймеры для амплификации *LEU2*-конструкции; (б) ПЦР-скрининг колоний-кандидатов с помощью пары праймеров *GEF1_F* и *GEF1_R*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей белков SaCLCa1 и SaCLCc1. В работе клонировали два гена семейства хлоридных каналов, *SaCLCa1* (GenBank, MG670589.1) и *SaCLCc1* (GenBank, KX013489.1), из эугалофита *S. altissima* с помощью методов, описанных в разделе «Объекты и методы исследования». Нуклеотидные последовательности генов *SaCLCc1* и *SaCLCa1* включают открытые рамки считывания. *SaCLCa1* кодирует полипептид, состоящий из 811 аминокислотных остатков (а. о.) с рассчитанной молекулярной массой 89,5 кДа. *SaCLCc1* кодирует белок размером 791 а. о. с рассчитанной молекулярной массой 87,0 кДа. Аминокислотные последовательности SaCLCa1 и SaCLCc1 в наибольшей степени сходны с аминокислотными последовательностями анион/ H^+ -антипортеров *A. thaliana* AtCLCa, AtCLCb, AtCLCc и AtCLCd (Рис. 2.). SaCLCa1 и SaCLCc1 содержат 3 мотива, характерных для белков семейства CLC: (1) G(P/S)GxPE; (2)

GKxGPxxH; (3) PxxGxLF, где x – переменные а. о. Эти мотивы находятся в положениях 187-192, 229-236 и 288-294 а. о. у SaCLCa1 и в положениях 181-186, 223-230 и 282-288 а. о. у SaCLCc1 соответственно. В других организмах такого рода мотивы участвуют в формировании анион-проводящего пути через мембрану, определяют анионную селективность транспортных белков и вовлечены в воротный процесс (Jentsch, 2015). Мотив (1) G(P/S)GxPE (Рис. 2.) является селективным фильтром (Jentsch, 2015; Dutzler, 2004). Во втором положении селективного фильтра находится одна из аминокислот, определяющая аминокислотную специфичность транспортера, – пролин (P) или серин (S). Пролин отвечает за транспорт белком иона NO_3^- , а серин – иона Cl^- (Zifarelli, Pusch, 2009; Wege et al., 2010). Во втором положении аминокислотной последовательности селективного фильтра SaCLCa1 находится пролин, а у SaCLCc1 – серин (Рис. 2.). На основе этого можно предположить, что SaCLCa1 транспортирует NO_3^- , в то время как SaCLCc1 переносит Cl^- .

В аминокислотной последовательности белков SaCLCa1 и SaCLCc1 также присутствуют два консервативных глутамата – E1 («воротный») и E2 («протонный»), свойственных белкам семейства CLC (Miller, 2006; Accardi, 2015). Ключевые глутаматы находятся в положениях 231(E231) и 298(E298) у SaCLCa1 и в положениях 225(E225) и 292(E292) у SaCLCc1 (Рис. 2.).

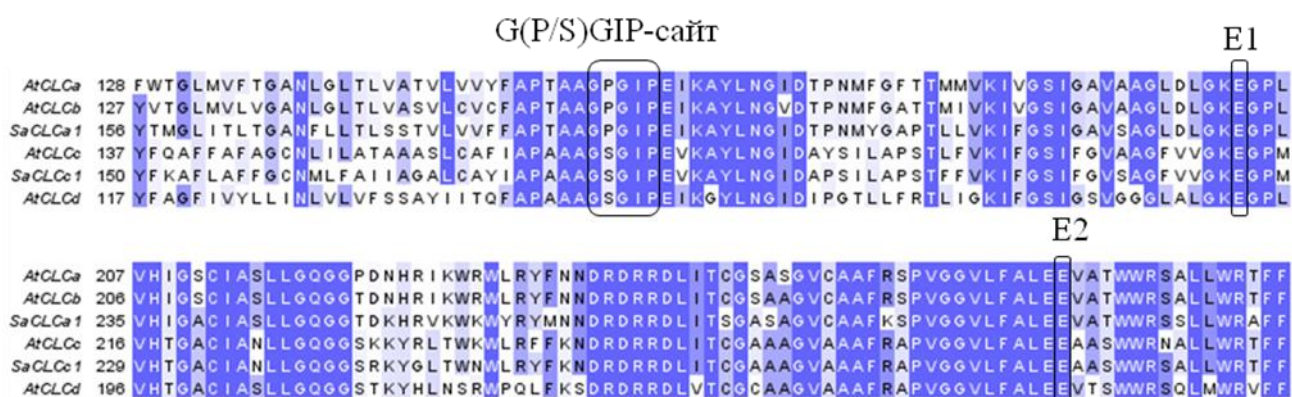


Рис. 2. Фрагмент выравнивания аминокислотных последовательностей белков SaCLCa1, SaCLCc1, AtCLCa, AtCLCb, AtCLCc и AtCLCd. Сайт G(P/S)GIP – селективный фильтр. E1, E2 – ключевые глутаматы, характерные для анион/ H^+ -антипортеров.

Согласно моделям топологии, полученным в программе MEMSAT-SVM, SaCLCa1 и SaCLCc1 – интегральные мембранные белки. SaCLCa1 образован 10, а SaCLCc1 – 11 трансмембранными доменами. SaCLCa1 и SaCLCc1 содержат два регуляторных CBS-домена – CBS1 и CBS2, характерных для других представителей семейства CLC. CBS1 и CBS2 располагаются в гидрофильной области на С-конце белков. Координаты расположения CBS доменов в аминокислотной последовательности для SaCLCa1 – 627-696 а. о. и 742-794 а. о., для SaCLCc1 – 617-679 а. о. и 729-779 а. о.

Филогенетический анализ подтверждает сходство SaCLCa1 и SaCLCc1 с CLC других растений (Рис. 3.). SaCLCa1 располагается в одной подгруппе с NO_3^-/H^+ -обменниками AtCLCa и AtCLCb, участвующими в накоплении NO_3^- в вакуоли, тогда как SaCLCc1 – с AtCLCc, вакуолярным Cl^- -транспортером.

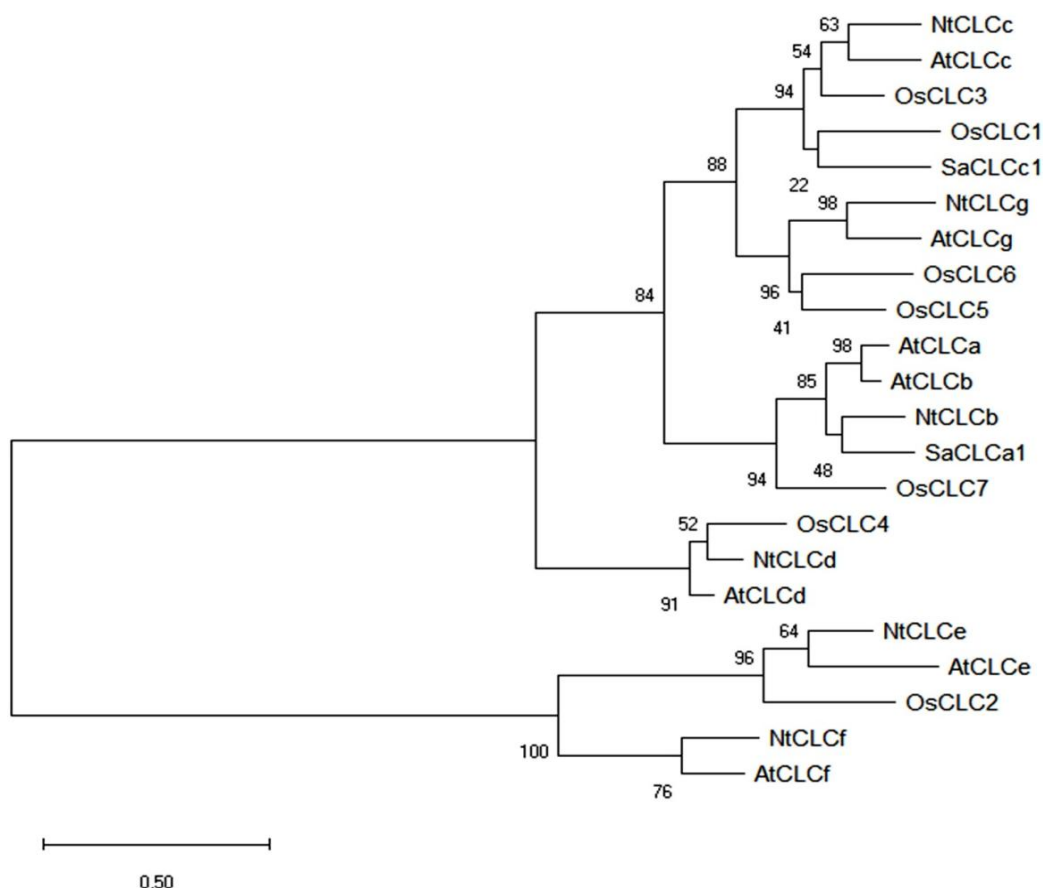


Рис. 3. Дендрограмма белков семейства CLC *A. thaliana*, *O. sativa*, *N. tabacum* и *S. altissima*. Цифры в узлах дерева – значения бутстрепа (100 итераций).

Гетерологичная экспрессия *SaCLCa1*, *SaCLCc1* и *SaCLCa1(C562T)* в клетках мутанта *S. cerevisiae Δgef1* и комплементационный анализ трансформантов. В работе получили мутант *Δgef1*. Мутантный штамм трансформировали рекомбинантными конструкциями для экспрессии генов *SaCLCa1*, *SaCLCc1* и *AtCLCd* (Рис. 4.). кДНК гена *AtCLCd* клонировали из *A. thaliana* в качестве положительного контроля комплементации.



Рис. 4. Схема рекомбинантной конструкции рМВ1-*SaCLCa1* (*SaCLCc1* или *AtCLCd*) для экспрессии *SaCLCa*, *SaCLCc1* и *AtCLCd* в дрожжевом мутанте *Δgef1*. Обозначения: P_{GPD1} – промотор глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы; *SaCLCa/SaCLCc1/AtCLCd* – полноразмерная кДНК одного из трех генов; T_{PGK1} – терминатор 3-фосфоглицерат-киназы; *URA3* – ген оротидин-5-фосфат-декарбоксилазы; CEN/ARS – центромера CEN6 *S. cerevisiae*, соединенная с автономно реплицирующейся последовательностью; Amp^R – ген β-лактамазы; ori – начало репликации в *E. coli*.

Экспрессия *SaCLCa1* в дрожжевых клетках не восстанавливала рост колоний *Δgef1* на селективных средах. Однако рост мутанта, экспрессировавшего *SaCLCc1*, восстанавливался в отсутствии ионов Cu²⁺ (1) на Fe-дефицитной среде YPEG (Рис. 5а, 2) и на минимальных средах SD и SR (рН 7,0) (Рис. 5а, 4 и 6) и (2) на среде YPD, содержащей ионы Mn²⁺ (Рис. 5б, 2 - 5). Эффективность восстановления зависела от концентрации Mn²⁺ и сопутствующего аниона.

Восстановление роста *Δgef1* в результате экспрессии *SaCLCc1*, а также экспрессии *AtCLCd*, использовавшегося в качестве положительного контроля комплементации, как транспортер Cl⁻, показывает, что *SaCLCc1* тоже является Cl⁻-транспортером.

Отсутствие восстановления роста *Δgef1* экспрессией *SaCLCa1* дает основание предположить, что *SaCLCa1* транспортирует NO₃⁻. Косвенным подтверждением этого является присутствие пролина в селективном фильтре GPGIPE *SaCLCa1* (Рис. 2). Чтобы проверить эту гипотезу, выполнили сайт-направленный мутагенез.

Однонуклеотидная замена (C562T) в гене *SaCLCa1* приводила к замене в селективном фильтре пролина в положении 188 на серин (P188S). Экспрессия *SaCLCa1*(C562T) привела к частичному восстановлению роста клеток *Δgef1* на среде YPD, содержащей 3 мМ $MnCl_2$ или 3 мМ $MnSO_4$ (Рис. 5в, 2 и 3). Частичная комплементация роста *Δgef1* экспрессией *SaCLCa1*(C562T) предполагает смену селективности у *SaCLCa1*.

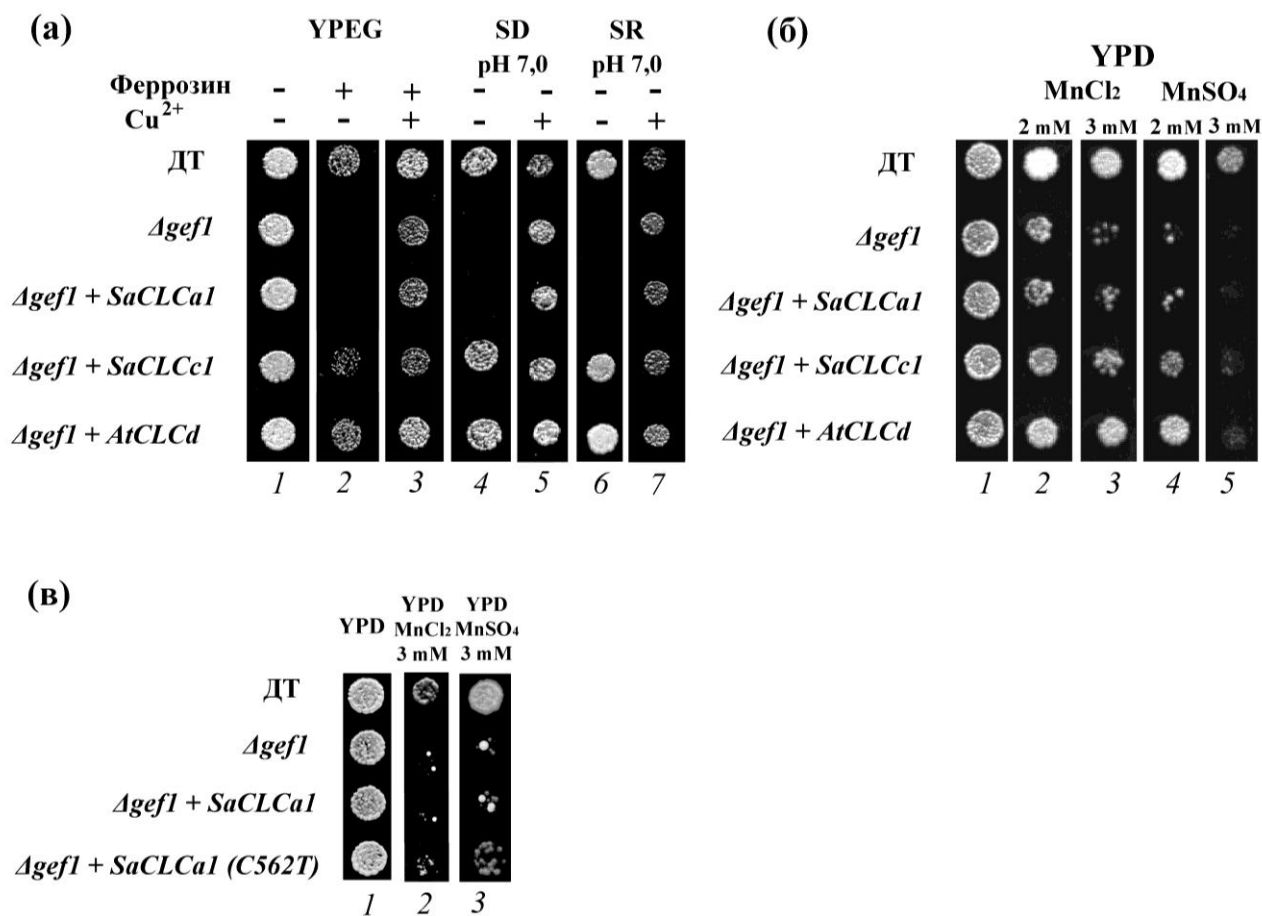


Рис. 5. Рост мутантных клеток *Δgef1 S. cerevisiae*, экспрессирующих гены *SaCLCa1*, *SaCLCc1*, *AtCLCd* и *SaCLCa1*(C562T), на селективных средах. Контрольные варианты, трансформированные рМВ1, – штамм ДТ и мутант *Δgef1*. Селективные среды: а) 1 – YPEG; 2 – YPEG, 1 мМ феррозин (хелатор Fe^{2+}); 3 – YPEG, 1 мМ феррозин, 0,1 мМ $CuSO_4$; 4 – SD, pH 7,0; 5 – SD, pH 7,0, 0,1 мМ $CuSO_4$; 6 – SR, pH 7,0; 7 – SR, pH 7,0, 0,1 мМ $CuSO_4$; б) 1 – YPD; 2 – YPD, 2 мМ $MnCl_2$; 3 – YPD, 3 мМ $MnCl_2$; 4 – YPD, 2 мМ $MnSO_4$; 5 – YPD, 3 мМ $MnSO_4$; в) 1 – YPD; 2 – YPD, 3 мМ $MnCl_2$; 3 – YPD, 3 мМ $MnSO_4$. Разведение культуры клеток дрожжей 1:100 (10^5 кл/мл).

Исследование экспрессии *SaCLCa1* и *SaCLCc1* в органах *S. altissima*.

Следующим этапом работы было исследование экспрессии генов *SaCLCa1* и *SaCLCc1* в органах *S. altissima* при разном анионном составе среды для оценки их физиологической роли.

Экспрессия *SaCLCa1* была низкой и в корнях, и в листьях *S. altissima* при отсутствии NaCl в среде и достаточном снабжении нитратом (15 мМ NO₃⁻). Увеличение концентрации Cl⁻ в среде, содержащей 15 мМ NO₃⁻, приводило к возрастанию экспрессии *SaCLCa1* в корнях, но не влияло на экспрессию *SaCLCa1* в листьях, где она оставалась на относительно низком уровне. Дефицит нитрата (0,75 мМ NO₃⁻) стимулировал экспрессию *SaCLCa1* в корнях, в листьях экспрессия *SaCLCa1* достоверно не изменялась. При дефиците нитрата в условиях увеличения концентрации Cl⁻ в среде относительный уровень представленности транскриптов *SaCLCa1* снижался в корнях, оставаясь тем не менее на высоком уровне (Рис. 6а.).

Экспрессия *SaCLCc1* в корнях почти не зависела от концентрации NO₃⁻ и Cl⁻ в среде культивирования. Однако рост концентрации Cl⁻ или дефицит NO₃⁻ стимулировали экспрессию *SaCLCc1* в листьях (Рис. 6б.).

При ответе растений на солевой шок (250 мМ NaCl) наибольшие изменения экспрессии *SaClCa1* наблюдали в корнях растений *S. altissima* (Рис. 6в.). Количество транскриптов в корнях снижалось в 3 раза через 1 ч и 2 ч после внесения NaCl в среду по сравнению с исходным уровнем, затем оно возрастало в два раза к 6-му и 9-му часу действию соли и повторно снижалось к 24 часу до более низких значений, чем в контроле. В ходе реакции направленность изменений содержания транскриптов *SaClCa1* в листьях была такой же, как в корнях, однако их амплитуда была заметно меньше и различия не были достоверными.

Экспрессия *SaClCc1* незначительно изменялась и в корнях, и в листьях в динамике ответа растений на солевой шок (Рис. 6г.). Наибольшие изменения экспрессии *SaClCc1* наблюдали в листьях. Уровень транскриптов *SaClCc1* в листьях постепенно увеличивался после внесения NaCl в среду. Экспрессия *SaClCc1* увеличилась в 2 раза к 9 ч действия соли и оставалась на таком же уровне через 24 ч.

В корнях экспрессия *SaCLCa1* увеличилась в 1,5 раза, по сравнению с исходным уровнем, к 6 и 9 ч после внесения соли в среду и оставалась приблизительно на этом же уровне через сутки (Рис. 6г.).

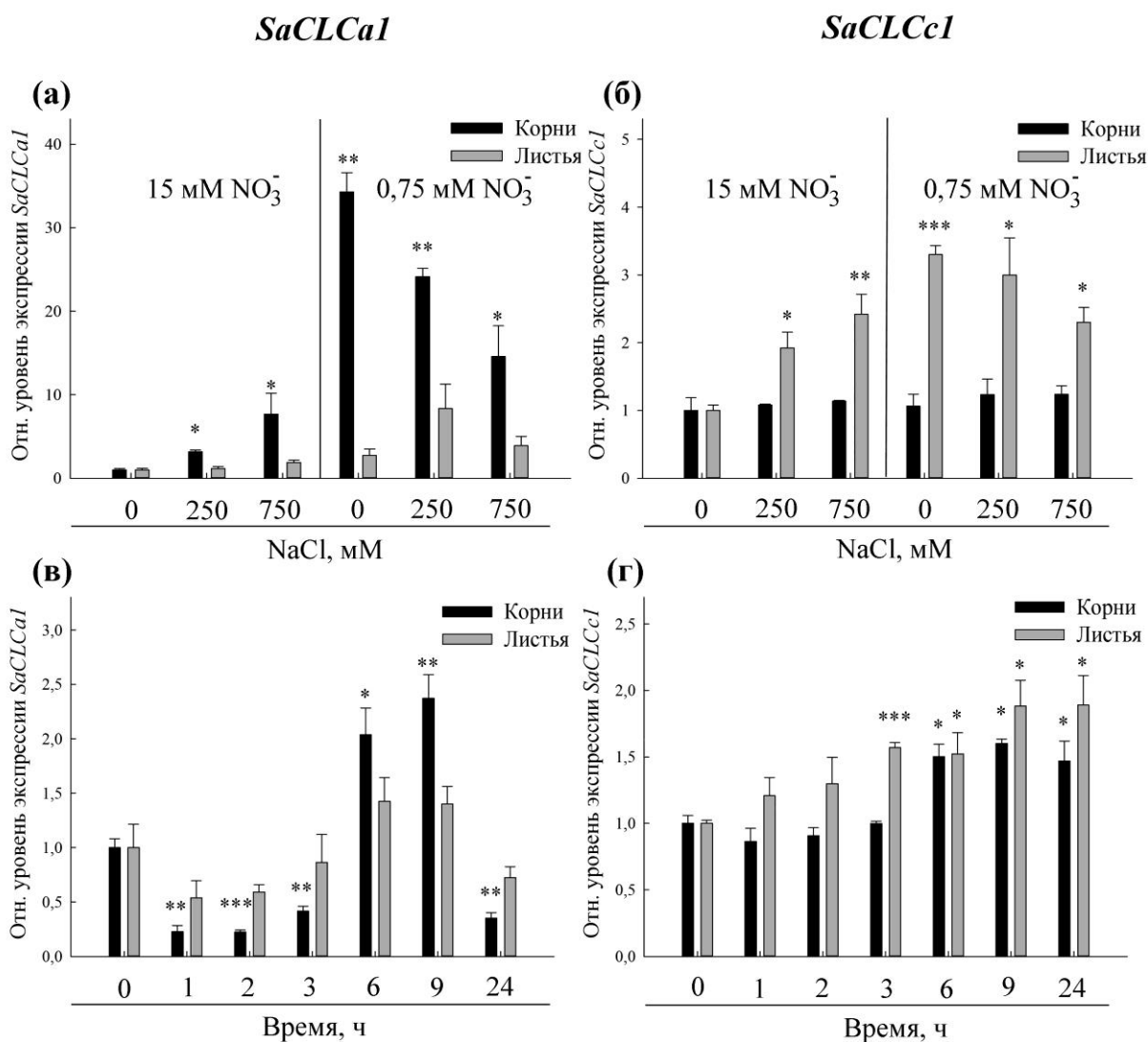


Рис. 6. Относительный уровень экспрессии *SaCLCa1* (а, в) и *SaCLCc1* (б, г) в органах 55-дневных растений *S. altissima* (а, б) при разной концентрации Cl⁻ и NO₃⁻ в среде и (в, г) в динамике ответа растений на солевой шок.

Содержание ионов NO₃⁻ и Cl⁻ в органах *S. altissima* при разных концентрациях NO₃⁻ и Cl⁻ в среде.

Наряду с анализом относительного уровня экспрессии *SaCLCa1* и *SaCLCc1* в органах *S. altissima* было измерено содержание Cl⁻ и NO₃⁻ (Рис. 7.).

При повышении концентрации Cl⁻ в среде культивирования в условиях стандартного снабжения растений нитратом (15 mM NO₃⁻) содержание NO₃⁻

снижалось в корнях и незначительно возрастало в листьях (Рис. 7а.). В условиях дефицита нитрата в среде ($0,75\text{ мМ NO}_3^-$) содержание этого аниона в органах также было низким. Когда концентрацию Cl^- в среде повышали в условиях дефицита нитрата, содержание NO_3^- оставалось на низком уровне, а содержание Cl^- – возрастало.

Содержание Cl^- в корнях и листьях увеличивалось, когда концентрацию NaCl в среде культивирования повышали и практически не зависело от доступности NO_3^- (Рис. 7б.).

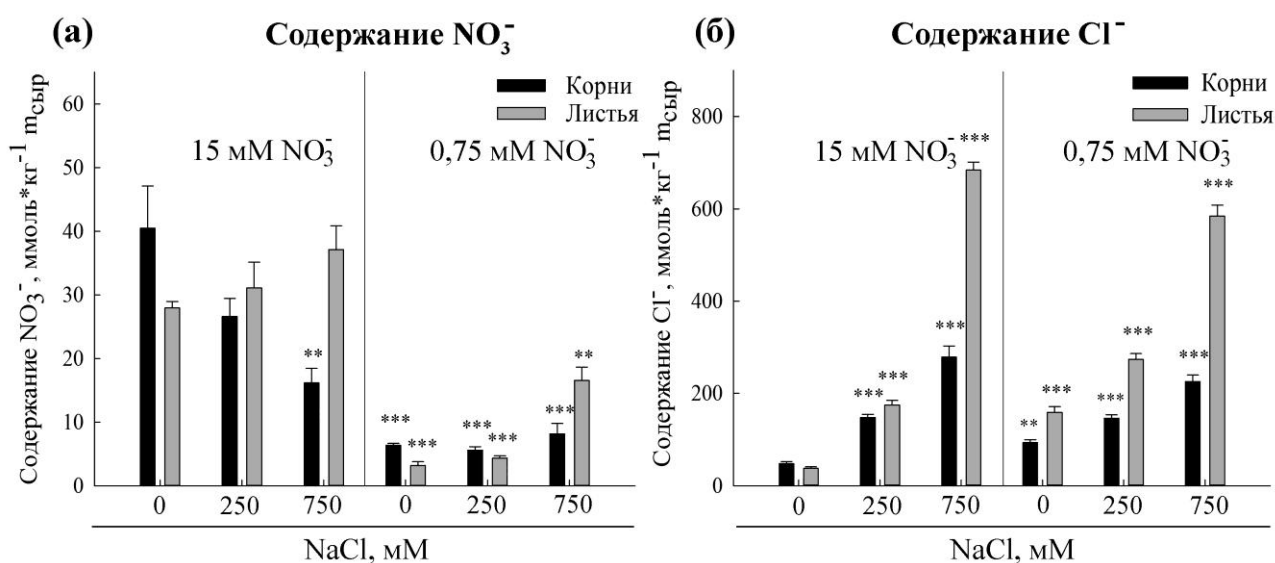


Рис. 7. Содержание NO_3^- (а) и Cl^- (б) в органах *S. altissima* при разном содержании Cl^- и NO_3^- в среде культивирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе исследовали функции продуктов генов семейства хлоридных каналов *SaCLCa1* и *SaCLCc1*, клонированных из эугалофита *S. altissima*. Для исследования ионной специфичности *SaCLCa1* и *SaCLCc1* путем гетерологичной экспрессии был получен мутант *Δgef1* с делетированным геном *GEF1*, единственным геном семейства *CLC* у *S. cerevisiae*, продукт которого участвует в транспорте Cl^- (López-Rodríguez et al., 2007). Экспрессия *SaCLCc1* и *AtCLCd*, кодирующего Cl^- -транспортер пост-Гольджи везикул (Zifarelli, Pusch, 2010), привела к восстановлению роста дрожжевого мутанта на селективных (1) Fe-дефицитных средах (Рис. 5а, 2, 4, 6); (2) богатой среде

YPD с ионами Mn^{2+} (Рис. 5б, 2 - 5), что свидетельствует о восстановлении функции Cl^- -транспортера в клетках мутанта *Δgef1*.

Экспрессия *SaCLCa1* в *Δgef1* не привела к восстановлению роста мутанта, вероятно, по причине нитратной специфичности *SaCLCa1*. Частичное восстановление роста мутанта, экспрессировавшего *SaCLCa1(P188S)*, на Mn^{2+} -содержащей среде YPD указывает на хлоридную селективность *SaCLCa1(P188S)* и на ее отсутствие у *SaCLCa1* (Рис. 5в, 2-3). Сходная неполная комплементация ростового фенотипа была показана на клетках мутанта *Δgef1*, экспрессировавших *AtCLCa(P160S)* (Wege et al., 2010). По-видимому, наличие пролина или серина в селективном фильтре является не единственным фактором, обуславливающим анионную селективность транспортера.

Экспрессия *SaCLCa1* и *SaCLCc1* у растений *S. altissima* была орган-специфичной и изменялась в ответ на варьирование анионного состава среды культивирования (Рис. 6.). Индукция экспрессии *SaCLCa1* происходила в корнях при (1) дефиците NO_3^- в питательной среде и соответствующем низком содержании NO_3^- в органах и (2) при стандартном снабжении растений NO_3^- в условиях повышения концентрации $NaCl$ в среде (Рис. 6а, 7а). Наличие $NaCl$ и снижение концентрации NO_3^- в среде не вызвали изменений в экспрессии *SaCLCc1* в корнях. Однако экспрессия *SaCLCc1* в этих условиях увеличивалась в листьях (Рис. 6б), что указывает на возможное участие *SaCLCc1* в накоплении ионов Cl^- в вакуолях листьев *S. altissima*, как это было показано для *AtCLCc* (Jossier et al., 2010).

Одновременное увеличение экспрессии *SaCLCa1* в корнях и увеличение содержания нитрата в листьях указывают на возможное участие *SaCLCa1* в регуляции потоков анионов из корней в побеги, т.е. в регуляции загрузки ионов NO_3^- в ксилему корня. Одним из возможных объяснений индукции экспрессии *SaCLCa1* может быть способность *SaCLCa1* к двунаправленному транспорту нитрата через тонопласт, как это показано методом локальной фиксации потенциала для *AtCLCa* (Wege et al., 2014). Загрузка нитрата в ксилему корня зависит от концентрации NO_3^- в цитозоле клеток переецикла (Geilfus, 2018). Для увеличения загрузки NO_3^- в ксилему корня, концентрация NO_3^- в цитозоле этих клеток может быть повышена за счет изменения

направления его транспорта через *SaCLCa1* и уменьшения пула вакуолярного NO_3^- . Повышение концентрации NO_3^- в цитозоле клеток перицикла может быть достигнуто за счет изменения направления переноса анионов белком. Транспорт NO_3^- в вакуоли может сменяться оттоком NO_3^- из вакуолярного компартмента через *SaCLCa1*.

Основываясь на результатах исследования экспрессии в динамике ответа растений на солевой шок, можно предположить, что *SaClCa1* не участвует в первичном ответе на действие соли. Экспрессия *SaClCa1* в первые часы после внесения соли в среду подавляется. Это может быть связано с NaCl-индуцированным замедлением биосинтетических процессов и включением механизмов акклимации к осмотическому и токсическому действию соли. Возможно, после 3 ч действия соли возникает необходимость в поддержании пула NO_3^- и в восстановлении процессов азотного обмена, что требует повышения экспрессии *SaClCa1* (Рис. 6в.).

Экспрессия *SaClCc1* возрастает в листьях уже на первых этапах действия соли и продолжает оставаться на более высоком уровне по сравнению с начальным значением в течение суток (Рис. 6г.). Вероятно, *SaClCc1* участвует в депонировании Cl^- в вакуолях клеток листьев. Хлорид, являясь главным сопутствующим анионом катиона Na^+ , поддерживает ионный баланс, а также вносит вместе с Na^+ основной вклад в снижение водного потенциала клеток для обеспечения восходящего тока воды по ксилеме в системе корень-стебель-лист в условиях засоления (Балнокин и др., 2005).

Наиболее вероятно, *SaCLCc1* вовлечен в депонирование Cl^- в вакуолях листьев, а *SaCLCa1* участвует в регуляции потоков NO_3^- из корня в побег *S. altissima*.

ВЫВОДЫ

1. Клонированы полноразмерные последовательности кДНК двух генов из эугалофита *Suaeda altissima*, *SaCLCa1* и *SaCLCc1*.

2. Белки, кодируемые генами *SaCLCa1* и *SaCLCc1*, относятся к семейству хлоридных каналов и имеют три ключевых аминокислотных мотива, свойственных белкам семейства CLC. Оба белка *SaCLCa1* и *SaCLCc1* содержат в аминокислотных последовательностях два ключевых глутамата – «воротный» и «протонный», что

указывает на их принадлежность к анион/протонным антипортерам. Селективный фильтр SaCLCa1 содержит пролин, а SaCLCc1 – серин, что предполагает нитратную специфичность первого транспортера и хлоридную специфичность второго.

3. Экспрессия гена *SaCLCc1* в дрожжевом мутанте *Saccharomyces cerevisiae Δgef1* приводит к восстановлению роста мутантных клеток на селективных средах. Комплементация фенотипа мутанта *Δgef1* геном *SaCLCc1* указывает на участие белка SaCLCc1 в транспорте ионов Cl⁻.

4. Экспрессия гена *SaCLCa1* в клетках дрожжевого мутанта *Δgef1* не приводит к восстановлению роста мутантных клеток на селективных средах. Замена в селективном фильтре SaCLCa1 пролина в положении 188 на серин (P188S) приводит к частичной комплементации фенотипа мутанта на двух селективных средах, что указывает на возможное участие SaCLCa1 в транспорте ионов NO₃⁻.

5. Гены анионных транспортеров *SaCLCa1* и *SaCLCc1* экспрессируются как в корнях, так и в листьях *S. altissima*. Экспрессия *SaCLCa1* и *SaCLCc1* изменяется в органах в ответ на изменение концентрации NaCl и NO₃⁻ в среде. Изменение экспрессии гена *SaCLCa1* наблюдали преимущественно в корнях, а гена *SaCLCc* – в листьях.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Работы, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Неделяева О. И., Шувалов А. В., Майорова О. В., Юрченко А. А., Попова Л. Г., Балнокин Ю. В., Карпычев И. В. (2018). Клонирование и функциональный анализ гена SaCLCc1, принадлежащего семейству хлоридных каналов (CLC), из галофита *Suaeda altissima* (L.) Pall. *Доклады Академии Наук*, 481(1), 104–107. <https://doi.org/10.31857/S086956520000062-1>

2. Nedelyaeva O. I., Shuvalov A. V., Karpichev I. V., Beliaev D. V., Myasoedov N. A., Khalilova L. A., Popova L. G., Balnokin Y. V. (2019). Molecular cloning and characterisation of SaCLCa1, a novel protein of the chloride channel (CLC) family from the halophyte *Suaeda altissima* (L.) Pall. *Journal of Plant Physiology*, 240, 152995. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.152995>

Работы, опубликованные в рецензируемых изданиях:

1. Орлова Ю. В., Майорова О. В., Халилова Л. А., Мясоедов Н. А., Неделеяева О. И., Попова Л. Г., Балнокин Ю. В. (2018). Накопление и распределение неорганических ионов в тканях органов галофита *Suaeda altissima* (L.) Pall. В условиях засоления. *Известия Уфимского научного центра Российской академии наук*, 3(4), 107–114. <https://doi.org/10.31040/2222-8349-2018-4-3-107-114>

Публикации в сборниках конференций:

1. Неделеяева О. И., Харитонашвили Е. В., Жигалова Т. В., Аверчева О. В., Беляев Д. В., Мясоедов Н. А., Балнокин Ю. В. (2015). Изменение фотохимической активности *Arabidopsis thaliana* (L.), вызванные мутацией гена *AtCLCe*. VIII Съезд общества физиологов растений России. Тезисы докладов, с. 37

2. Неделеяева О. И., Шувалов А. В., Орлова Ю. В., Халилова Л. А., Беляев Д. В., Мясоедов Н. А., Майорова О. В., Юрченко А. А., Попова Л. Г., Балнокин Ю. В., Карпычев И. В. (2018). Клонирование и функциональная характеристика генов *SaCLCa1* и *SaCLCc1* семейства хлоридных каналов (CLC) из галофита *Suaeda altissima* (L.) Pall. Годичное собрание общества физиологов растений. Тезисы докладов, с. 952-956.

Тезисы конференций:

1. Неделеяева О. И. (2016). Влияние мутации гена анионного канала тилакоидной мембраны CLCe на фотохимическую активность *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2016». Тезисы докладов, с. 357-358.

2. Неделеяева О. И., Харитонашвили Е. В., Жигалова Т. В., Аверчева О. В., Беляев Д. В., Мясоедов Н. А., Балнокин Ю. В. (2016). Функциональная роль белка CLCe *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh в светозависимом закислении люмена тилакоидов. Годичное собрание общества физиологов растений России. Тезисы докладов, с. 243-244.

3. Nedelyaeva O. I., Kharitonashvili E. V., Zhigalova T. V., Avercheva O. V., Belyaev D. V., Myasoedov N. A. and Balnokin Y. V. (2016). The functional role of the CLCe

protein of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. in light-dependent acidification of thylakoid lumen. 4th International Symposium on Plant Signaling and Behavior. Proceedings, p. 78.

4. Nedelyaeva O. I., Belyaev D. V., Shuvalov A. V., Myasoedov N. A. and Balnokin Yu. V. (2016). The plant CLC channels: the diversity of functions, membrane localizations, structures and mysteries. International Conference “Biomembranes 2016: Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases”. Book of abstracts, p. 78.

5. Неделяева О.И., Шувалов А.В. (2018). Функциональная комплементация мутанта *Saccharomyces cerevisiae* Δ gef1 генами *SaCLCa1* и *SaCLCc1* из галофита *Suaeda altissima* (L.) Pall. Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2018». Тезисы докладов.

6. Шувалов А. В., Неделяева О. И., Юрченко А. А., Мясоедов Н. А., Попова Л. Г., Балнокин Ю. В. (2019). Экспрессия генов анион-транспортирующих белков у галофита *Suaeda altissima* (L.) Pall. в условиях засоления и дефицита нитрата. Съезд общества физиологов растений. Тезисы докладов, с. 488.