

ВЕКТОРЫ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ФОСФОЛИПАЗЫ C NICOTIANA

Т. А. Гапеева, А. Н. Пундик, Т. Г. Третьякова, А. А. Пилько,
И. Д. Волотовский

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
г. Минск, Беларусь, , lmbc@biobel.bus-net.by*

В последнее время становится всё более очевидным, что компоненты клеточных мембран – фосфолипиды способны функционировать в качестве вторичных мессенджеров при передаче сигналов в растительной клетке [1]. Особая роль отводится фосфоинозидам, синтез которых происходит при участии специфических киназ, а гидролиз катализируется фосфатазами и фосфоинозитид-специфической фосфолипазой C (ФИ-ФлС) [2]. ФИ-ФлС участвует в ответе растительной клетки на действие осмотических стрессовых изменений, абсцизовой кислоты, света, гравитации, патогенов. Эта фосфолипаза расщепляет мембранный фосфолипид фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат на диацилглицерол и инозитолтрифосфат (ИФ₃). ИФ₃ затем открывает внутриклеточные кальциевые каналы и мобилизует Ca²⁺ из внутриклеточных депо, что является одним из путей переходного увеличения цитоплазматической концентрации свободного Ca²⁺. Известно, что в животной клетке ФИ-ФлС является ключевым ферментом системы Ca²⁺-сигнализации. В растительной клетке Ca²⁺ также участвует во многих сигнальных процессах. Тем не менее, до настоящего времени участие фосфоинозитидов и, следовательно, фосфолипазы C в процессах сигнальной трансдукции в растительной клетке не подтверждено прямыми экспериментальными доказательствами. Это связано, как с трудностями измерения активности этого фермента *in vivo*, так и с тем, что из растительного материала не удаётся выделить нативные формы данной фосфолипазы [2].

Перспективное направление исследования функций этого фермента в клетках растений основано на использовании генно-инженерных подходов, позволяющих изменять содержание и, следовательно, модифицировать функции этого фермента *in vivo*. В основе таких подходов лежит конструирование векторов для синтеза в клетках растений РНК, индуцирующих процесс РНК-интерференции [3]. Результатом данного процесса является посттранскрипционное ингибирование экспрессии генов. Вопрос о выборе наиболее эффективной структуры химерных генов для инициации процессов РНК-интерференции в клетках растений остаётся открытым. Исторически сложилось, что большинство работ такого рода связано с использованием генов для синтеза антисмысловых РНК. Работы по успешному применению кассет экспрессии, содержащих инвертированные повторы, немногочисленны [4, 5]. Имеются также сообщения об индукции РНК-интерференции с помощью генов для синтеза смысловых РНК, в частности, для синтеза дефектной смысловой РНК полигалактуроназы томатов [6].

В данной работе получали генетические конструкции для индукции процесса РНК-интерференции в клетках *Nicotiana plumbaginifolia*, направленного на ингибирование экспрессии генов фосфолипазы C. Выбор вида растений обоснован наличием трансгенного варианта, в клетках которого экспрессируется Ca²⁺-связывающий белок - апоэжворин, использование которого позволяет изучать изменение содержания ионов кальция в клетках хемоллюминесцентным методом. Химерные гены для конститутивного синтеза антисмысловых, двуцепочечных и дефектных смысловых РНК получали на основе кДНК гена *PLC1 Nicotiana tabacum*,

любезно предоставленной проф. Сопори (Индия). Было показано, что у генов ФИ-ФлС *N. plumbaginifolia*, по-крайней мере, в 3'- консервативной области имеются участки, обладающие высокой степенью гомологии с ФИ-ФлС *Nicotiana tabacum*. Обоснована возможность использования генов ФлС *Nicotiana tabacum* при получении химерных генов для ингибирования синтеза фосфолипазы С *N. plumbaginifolia*.

Бинарные векторные системы для агробактериальной трансформации конструировали на основе плазмиды pBI121 и агробактериального штамма GV2260. Полученные агробактериальные штаммы проанализированы на предмет наличия функциональной активности гена *uidA* (GUS) из Т-области. Показано, что в клетках агробактерий, несущих векторы pBI121 и pBI121-NtPLC7^{1_{sense}}, функционирует фермент GUS, при этом активность β-D- глюкокуронидазы в клетках агробактерий, содержащих pBI121, выше, чем для вектора pBI121-NtPLC7^{1_{sense}}. Проведена также сравнительная оценка стабильности бинарных векторов в процессе многократных циклов регенерации агробактериальных клеток.

С использованием полученных конструкций была проведена генетическая трансформация растений *Nicotiana plumbaginifolia*, экспрессирующих апоэкворин. Для анализа трансформированных растений методом ПЦР сконструированы праймеры и оптимизированы условия ПЦР для детекции в геноме трансформированных растений генов *nptII* (неомицинфосфотрансферазы) и *uidA* из Т-области бинарных векторов. Использовали комбинации праймеров, исключаящие ПЦР-амплификацию последовательностей эндогенных растительных, а также, что не менее важно, агробактериальных генов. В результате ПЦР-скрининга отобраны варианты растений, содержащие химерные гены для синтеза антисмысловых и дефектных смысловых РНК генов фосфолипазы С. Данные варианты являются основой для получения линий трансгенных растений, для которых хемоллюминесцентный мониторинг [Ca²⁺]_{цит.} проводится на фоне уменьшенного содержания фосфолипазы С. Наличие такой модельной системы существенно расширяет возможности изучения процессов внутриклеточной сигнализации, протекающих с участием фосфоинозитидов, что в перспективе может способствовать созданию биотехнологически улучшенных сортов культурных растений.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Meijer H. J., Munnik T. Phospholipid-based signaling in plants // Annu. Rev. Plant Biol. 2003. V. 54. P. 265-306.
- 2 Mueller-Roeber, B. and Pical, C. Inositol phospholipid metabolism in Arabidopsis. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C isoforms. // Plant Physiol. 2002. V. 130. P. 1-25.
- 3 Montgomery M. K. RNA interference: historical overview and significance // Methods Mol Biol. 2004. V. 265. P. 23-21.
- 4 Levin, J. Z., Framond, A. J., Tuttle, A., Bauer, M. W. and Heifetz, P. B. Methods of double-stranded RNA-mediated gene inactivation in Arabidopsis and their use to define an essential gene in methionine biosynthesis // Plant Mol. Biol. 2000. V. 44. P. 759-775.
- 5 Chuang, C. F. and Meyerowitz, E. M. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000. V. 97. P. 4985-4990.
- 6 Han, Y. and Grierson, D. Relationship between small antisense RNA's and aberrant RNA's associated with sense transgene mediated gene silencing in tomato // Plant J. 2002. V. 29. P. 509-519.