

На правах рукописи



Авраменко Татьяна Викторовна

**Активность и продукция пероксидаз III класса в клеточных культурах растений,  
трансформированных генами *rolB* и *rolC***

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Владивосток – 2015

Работа выполнена в лаборатории биоинженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Биолого-почвенный институт ДВО РАН

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук, доцент  
**Шкрыль Юрий Николаевич**

**Официальные оппоненты:**

**Рихванов Евгений Геннадьевич**  
доктор биологических наук, ФГБУН  
«Сибирский институт физиологии и биохимии  
растений» СО РАН, ведущий научный  
сотрудник лаборатории растительно-  
микробных взаимодействий

**Бакунина Ирина Юрьевна**  
доктор химических наук, старший научный  
сотрудник, ФГБУН «Тихоокеанский институт  
биоорганической химии» ДВО РАН, ведущий  
научный сотрудник лаборатории химии  
ферментов

**Ведущая организация:**

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский  
государственный университет», г. Санкт-  
Петербург

Защита состоится «10» марта 2016 г. в 10<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета ДМ 005.003.04 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Биолого-почвенный институт ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100-летия Владивостока, 159.

Факс: 8(423) 231-01-93. E-mail: info@biosoil.ru

Отзывы на автореферат в двух экземплярах с заверенными подписями просим направлять по адресу: 690022, г. Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, 159, ученому секретарю диссертационного совета.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ДВО РАН и на сайте института <http://www.biosoil.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» декабря 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Музарок Т.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Одним из важнейших достижений последних десятилетий в области физиологии растений стал прогресс в понимании молекулярных механизмов опухолеобразования у растений при встраивании генов *rol* из *Agrobacterium rhizogenes* в растительный геном. Для этих генов были отмечены такие свойства, как изменение фитогормонального и кальциевого статуса растительных клеток, индукция морфогенеза и регуляция процессов роста и развития растений. В результате исследования функций индивидуальных генов T-ДНК Ri-плазмиды *A. rhizogenes* установлено, что гены *rolB* и *rolC* являются эффективными активаторами биосинтеза вторичных метаболитов. Это открытие значительно расширило современные представления о роли генов *rol*, а также имело основополагающее значение для создания стабильных штаммов-суперпродуцентов ценных веществ растительного происхождения. Последние данные свидетельствуют, что влияние этих генов не ограничивается регуляцией вторичного метаболизма и сопровождается значительными изменениями в защитном аппарате растительных клеток. В лаборатории биоинженерии БПИ ДВО РАН показано, что каллусные культуры марены сердцелистной (*Rubia cordifolia* L.), трансформированные генами *rolB* и *rolC*, характеризуются устойчивостью к стрессовым воздействиям и пониженным уровнем внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) (Bulgakov et al., 2013). Баланс АФК в значительной мере влияет на жизнеспособность растительной клетки, в связи с чем особый интерес вызывают ферментные системы, участвующие в их метаболизме.

Ферменты пероксидазы III класса представляют важное звено антиоксидантной системы защиты растений и относятся к патоген-обусловленным (pathogenesis-related, PR) белкам семейства PR-9. В случае атаки патогена пероксидазы реализуют один из самых ранних механизмов защиты, связанный с повышением уровня АФК, и способны индуцировать редокс-чувствительные сигнальные системы растения, а также проявляют бактерицидную активность, разрушая клеточные стенки патогенов. Защитные функции пероксидаз III класса значительны и разнообразны, однако, индукция их синтеза при бактериальном патогенезе в настоящее время изучена недостаточно. Несмотря на известную роль генов *rol* в модуляции защитных систем растений, в литературных источниках практически отсутствует информация об их влиянии на пероксидазы III класса. Вместе с тем, актуальной задачей является поиск новых потенциальных источников пероксидаз в связи с их широким использованием в различных отраслях производства.

Растительные пероксидазы являются ценными ферментами для биотехнологии. Востребованность пероксидаз обусловлена их практическим применением во многих областях, в частности, в медицинской диагностике и биокатализе, в промышленном и пищевом производстве, а также при создании высокочувствительных биосенсоров и систем очистки сточных вод (Ryan et al., 2006). Поэтому, трансгенные клеточные культуры растений с повышенным содержанием пероксидаз могли бы найти применение в рамках крупномасштабного получения ферментов. По предварительным оценкам, если повысить продукцию пероксидаз с помощью генно-инженерных технологий всего лишь на 5%, это приведет к почти двукратному увеличению рентабельности производства (Hailu et al., 2010). Одним из возможных способов решения данной проблемы является трансформация

клеточных культур растений агробактериальными генами *rol*. Но, несмотря на достигнутые успехи в области регуляции вторичного метаболизма, практически ничего не известно о способности этих генов влиять на продукцию ферментов в растительных клетках. Настоящая работа призвана восполнить этот пробел, и посвящена изучению влияния генов *rol* на продукцию и активность ферментов растительных пероксидаз III класса.

В соответствии с вышеизложенным, сформулирована **цель работы** – исследовать регуляторное влияние генов *rol* в отношении растительных пероксидаз III класса в трансгенных клеточных культурах *Rubia cordifolia*.

В рамках поставленной цели предполагалось решить следующие **задачи**:

1. идентифицировать полноразмерные последовательности генов растительных пероксидаз III класса *R. cordifolia*;
2. провести филогенетический анализ пероксидаз III класса *R. cordifolia* и других растений;
3. провести сравнительный анализ влияния агробактериальных генов *rol* на растительные пероксидазы III класса *R. cordifolia*;
4. определить наличие взаимосвязи между уровнем экспрессии трансгена и активации пероксидаз III класса в *rolB*-трансформированных клеточных культурах *R. cordifolia*;
5. установить закономерности накопления и изменения ферментативной активности пероксидаз III класса в *rolB*-трансгенных клеточных культурах *R. cordifolia* в разных фазах роста;
6. провести сравнительную оценку влияния сверхэкспрессии гена *rolB* и абиотических стрессовых факторов на пероксидазы III в клеточных культурах *R. cordifolia*;
7. оценить способность гена *rolB* активировать пероксидазы III класса в клеточных культурах других растений на примере родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.) и смолевки обыкновенной (*Silene vulgaris* (M.) G.).

**Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Сверхэкспрессия гена *rolB* приводит к значительной активации пероксидаз III класса в *rolB*-трансгенных культурах *R. cordifolia*. Данный эффект является специфичной функцией трансгена и положительно коррелирует с уровнем его экспрессии, а также сохраняется на всех фазах роста в течение пассажа.
2. Индукция растительных пероксидаз III класса на фоне сверхэкспрессии гена *rolB* значительно сильнее, чем при культивировании в условиях абиотического стресса и добавлении элиситора.
3. Сверхэкспрессия гена *rolB* в клеточных культурах *Rh. rosea* и *S. vulgaris* также приводит к активации растительных пероксидаз III класса.
4. Трансформация диким штаммом A4 *A. rhizogenes* и геном *rolC* не оказывают существенного эффекта на содержание и активность пероксидаз III класса в клеточных культурах *R. cordifolia*.

**Научная новизна.** Впервые изучено регуляторное действие агробактериальных генов *rol* в отношении растительных пероксидаз III класса, представляющих патоген-обусловленные белки семейства PR-9, в трансгенных клеточных культурах *R. cordifolia*. Показано, что активация пероксидаз III класса в условиях сверхэкспрессии *rolB* является

специфичной функцией трансгена и не характерна для *rolC*. Совместная экспрессия генов *rolB* и *rolC* в составе дикого штамма pRiA4 также не оказывает значительного эффекта на пероксидазы III класса, что указывает на компенсирующее действие гена *rolC* в отношении *rolB*. Проведено исследование молекулярных механизмов *rolB*-индуцируемой активации пероксидаз III класса и показано отсутствие взаимосвязи с общим изменением уровня внутриклеточных АФК на фоне трансформации. Очевидно, что данный эффект является специфическим ответом клетки на сигнал, генерируемый белком RolB. Установлено, что *rolB*-индуцируемая активация пероксидаз III класса положительно коррелирует с уровнем экспрессии трансгена и вызывает транскрипционную и ферментативную активацию белков пероксидаз, а также значительно увеличивает их продукцию. Показано, что данный эффект сохраняется на всех фазах роста в течение пассажа. Установлено, что *rolB* является более сильным индуктором пероксидаз III класса по сравнению с другими абиотическими стрессами, включая низкую и высокую температуры, обработку NaCl и метилжасмонатом. Получены данные о способности гена *rolB* активировать пероксидазы в трансгенных клеточных культурах других растений, в частности, *Rh. rosea* и *S. vulgaris*. Полученные результаты вносят вклад в понимание регуляторного действия генов *rolB* и *rolC* из *A. rhizogenes* на защитный аппарат растительной клетки и дополняют имеющиеся сведения о молекулярных механизмах взаимодействия растений и бактериальных патогенов.

**Практическая значимость.** В контексте практического применения возможно использование генов *rol* для создания клеточных культур растений – суперпродуцентов пероксидаз III класса с целью биотехнологического производства ферментов. Полученные сведения о роли индивидуальных изоформ пероксидаз III класса в условиях абиотического стресса могут служить основой для создания трансгенных растений, устойчивых к неблагоприятным условиям.

**Апробация результатов.** Результаты исследований представлены на XI Региональной конференции студентов, аспирантов вузов и научных организаций Дальнего Востока России (Владивосток, 2012), 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (Тэгу, Южная Корея, 2013), The 8th International Conference on European Science and Technology (Мюнхен, Германия, 2014), Second European Conference on Biology and Medical Sciences (Вена, Австрия, 2014), XV Всероссийской молодежной школо-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2014), VIII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015), VI Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2015).

**Личный вклад автора.** Автором самостоятельно были проведены исследования по определению общей пероксидазной активности и изоферментного состава пероксидаз. Филогенетический и статистический анализы проведены совместно с к.б.н., в.н.с. Шкрыль Ю.Н., определение уровня экспрессии генов пероксидаз выполнено совместно с к.б.н., с.н.с. Веремейчик Г.Н., исследование уровня активных форм кислорода проводили совместно с к.б.н. Горпенченко Т.Ю. (лаб. биотехнологии БПИ ДВО РАН).

Работа выполнена в лаборатории биоинженерии Федерального государственного учреждения науки Биолого-почвенного института ДВО РАН при финансовой поддержке грантов РФФИ (№ 11-04-00113-а и № 14-04-31913).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах и 7 тезисов докладов конференций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы включает 290 публикаций. Диссертация изложена на 121 странице машинописного текста, содержит 9 таблиц и 14 рисунков.

**Благодарности.** Автор выражает благодарность своему научному руководителю – кандидату биологических наук Юрию Николаевичу Шкрыль. Автор выражает свою искреннюю признательность сотрудникам БПИ ДВО РАН: кандидату биологических наук Галине Николаевне Веремейчик за неоценимую помощь в организации и проведении исследований методом ПЦР в реальном времени, кандидату биологических наук Татьяне Юрьевне Горпенченко (лаборатория биотехнологии БПИ ДВО РАН) за помощь в проведении исследований методом конфокальной микроскопии и всем сотрудникам лаборатории биоинженерии БПИ ДВО РАН.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Материалы и методы исследования

**1.1. Культивирование клеточных культур и растений.** В качестве объекта исследований использовали растения, а также нетрансформированные и трансгенные клеточные культуры *R. cordifolia*, *Rh. rosea* и *S. vulgaris*.

Нетрансформированная каллусная культура марены (R) получена из листьев проростков растения (Bulgakov et al. 2002). Трансгенная культура RA4 получена в результате трансформации диким штаммом A4 *A. rhizogenes*. Трансформированные клеточные культуры с высоким уровнем экспрессии генов *rolB* (RBH) и *rolC* (RCH) получены в результате трансформации штаммом GV3101/pMP90RK *A. tumefaciens*, несущим конструкции pPCV002-35S-*rolB* и pPCV002-35S-*rolC* соответственно (Bulgakov et al., 2002). В результате клеточной селекции *rolB*-трансгенной культуры *R. cordifolia* были выделены три культуры с низким, средним и высоким уровнем экспрессии трансгена – RBL, RBM и RBH соответственно (Shkryl et al., 2008). Культуры марены, трансформированные постоянно активной  $Ca^{2+}$ -независимой (*AtCPK1-Ca*) и неактивной (*AtCPK1-Na*) формами *AtCPK1* (R-Ca и R-Na соответственно), получены в результате трансформации штаммом ЕНА105/pTiBo542 *A. tumefaciens*, несущими конструкции pART27/*AtCPK1-Ca* и pART27/*AtCPK1-Na* соответственно (Xing et al., 2001). Также в работе использовали клеточные культуры *Rh. rosea* и *S. vulgaris* (Rh и S соответственно) (Bulgakov et al., 2010). Трансгенные культуры родиолы и смолевки (RhB и SB соответственно) получены в результате трансформации штаммом GV3101/pMP90RK *A. tumefaciens*, несущим конструкцию pPCV002-35S-*rolB* (Bulgakov et al., 2010).

Для получения, культивирования и всех экспериментов использовали питательные среды, содержащие макро- и микросоли по прописи Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962). В качестве регуляторов роста в среду добавляли 0.5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 2.0 мг/л  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты (АНУ) – для каллусов *R. cordifolia*, 5.0 мг/л БАП и 2.0 мг/л АНУ – для *R. rosea*, 0.5 мг/л БАП и 1.0 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) – для *S. vulgaris*, а также 25 г/л сахарозы и 7 г/л агара. Значение pH среды доводили до 5.6—5.8 при помощи 5% КОН.

**1.2. Идентификация и анализ экспрессии генов пероксидаз III класса.** Для выделения тотальной РНК использовали методику, оптимизированную для работы с растениями с высоким содержанием вторичных метаболитов (Shkryl et al., 2008). РНК анализировали в автоматической системе электрофореза Experion (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием набора RNA StdSens LabChip® (Bio-Rad Laboratories), согласно рекомендации производителя.

Обратную транскрипцию (ОТ) проводили при помощи набора для синтеза первой цепи кДНК с олиго(дТ)<sub>15</sub>-праймером (Силекс, Москва). Для определения концов кДНК проводили реакцию ОТ с использованием праймера и полимеразы «Encyclo» для синтеза двухцепочечной кДНК, обогащенной полноразмерными последовательностями (Евроген, Россия), которую затем амплифицировали на приборе iCycler (Bio-Rad Laboratories) и использовали в качестве положительного контроля при изучении экспрессии исследуемых генов.

Для амплификации последовательностей, соответствующих генам, кодирующих изоформы пероксидаз III класса в клетках *R. cordifolia*, проводили реакции ПЦР с использованием вырожденных праймеров *Prx-DegD* 5'-MGN YTN YRY TTY CAY GAY TG-3' и *Prx-DegR* 5'-CCN ACN GTR TGN SKN CCN ARN A-3'. Фрагменты известной длины (441 п.н.) выделяли из агарозных гелей с использованием Glass Milk Kit (Силекс) и клонировали в плазмиду pTZ57R/T, используя набор InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit (Fermentas, Литва). Затем клоны амплифицировали с использованием универсальных праймеров M13 и секвенированы по описанному ранее методу (Shkryl et al., 2008) на платформе ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) провели анализ экспрессии генов *RcPrx* с использованием красителя 2.5x SYBR Green, содержащим ROX в качестве референсного красителя (Синтол, Москва) на приборе Bio-Rad CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories). Для определения полноразмерных последовательностей генов пероксидаз III класса *R. cordifolia* проводили быструю амплификацию концевых фрагментов кДНК (RACE) с использованием модифицированной технологии step-out ПЦР (Matz et al., 1999). В первом цикле амплификации использовали вырожденные праймеры *Prx-DegD* и *Prx-DegR*, что позволило одновременно амплифицировать все экспрессируемые изоформы генов *RcPrx*. Для получения индивидуальных ампликонов каждой изоформы *RcPrx* во втором цикле RACE использовали ген-специфичные пары праймеров: для *RcPrx01*, 5'-CGT GAA TGG CTG CGA TGC-3' и 5'-CGT TGA GTT TCT ATT CGG-3'; для *RcPrx02*, 5'-TTG TTG CTA TTG CCG CCA C-3' и 5'-TCT TCC GTC TTT CCT TCC C-3'; для *RcPrx03*, 5'-TGG ACG GAA GCA GGA AGA-3' и 5'-TTC CTT CTC CAA

TGC TGA T-3'; для *RcPrx04*, 5'-CAA TGT GAT AGA TGA AGC G-3' и 5'-AGC AGC AAG AGC CAC GAT-3'; для *RcPrx05*, 5'-GTA AAT GGC TGT GAT GCG GG-3' и 5'-CGA ACC CTC TTG CTG AAT-3'; для *RcPrx06*, 5'-GCT GCT AAC CAA ACC ATT CC-3' и 5'-GTT GTT GGT TTC GTT GTA-3'; для *RcPrx07*, 5'-GCG GCA GCA GGC GTT TAG G-3' и 5'-TGG TGT TGC TCG TCG GTG C-3'. Праймеры к гену *rolB*: 5'-GTG CTG GCG ACA ACG ATT CA-3' и 5'-GAA CTT GCG AAA ATG GCG ATG-3' фланкировали фрагмент размером 232 п.н. В качестве внутреннего стандарта использовали экспрессию гена актина *RcActin* (GenBank Acc. No. DQ531565), *RhActin* (GenBank Acc. No. JX431891) и *SvActin* (GenBank Acc. No. JX431890). Используемые праймеры - 5'-GAT TGA GCA CGG TAT TGT TAG-3' и 5'-ACA CCA TCA CCA GAA TCC AAC-3' – фланкировали участок ДНК, содержащий интронную последовательность размером 91 п.н., что позволяло определить чистоту полученной кДНК по размеру амплифицированных фрагментов. Данные анализировали в программе CFX Manager Software версии 1.5 (Bio-Rad Laboratories).

**1.3. Анализ аминокислотных последовательностей пероксидаз.** Для определения изоэлектрических точек (pI), молекулярных масс, сигнальных пептидов и вероятной локализации в клетке использовали программы ExPASy ([www.expasy.org/tools/](http://www.expasy.org/tools/)), SignalP ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)), TargetP ([www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/)) и PSORT ([www.psort.org](http://www.psort.org)).

**1.4. Филогенетический анализ пероксидаз.** Для анализа были использованы 57 аминокислотных последовательностей пероксидаз III класса из 31 вида растений, депонированных в базу данных GenBank, и 7 последовательностей пероксидаз, полученных в результате данной работы. Выравнивание аминокислотных последовательностей пероксидаз проводили с помощью программы MUSCLE. Для исключения регионов с неоднозначным выравниванием использовали программу GBlocks (версия 0.91b). В программе ProtTest (версия 2.4) определили оптимальную матрицу замены аминокислотных остатков – WAG+I+G+F. ML-анализ с применением полученной матрицы замен проводили в программе Phyml версии 3.0. Для оценки достоверности построенных деревьев проводили бутстреп-анализ (число повторов – 500). Построение деревьев MP- и NJ-методами проводили в программе PhyIip package версии 3.69. Для оценки достоверности построенных деревьев также проводили бутстреп-анализ (число повторов – 1000). Графические изображения филогенетических деревьев обрабатывали в программе TreeView версии 1.6.6.

**1.5. Определение активности и изоферментов пероксидаз.** Экстракцию тотального белка проводили в ледяном трис-ацетатном буфере (pH 5.0), содержащем 2% поливинилпирролидона. Белки осаждали ледяным ацетоном, затем промывали 96% этанолом и растворяли в 2% амфолитах Bio-Lite (Bio-Rad Laboratories). Концентрацию белков определяли с использованием набора RC DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories) по методике производителя.

Активность пероксидаз определяли на спектрофотометре Benchmark Plus microplate spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories) с использованием 4-метокси- $\alpha$ -нафтола (4-MH) в качестве субстрата по стандартному методу (Ferrer et al., 1990). Активность фермента

выражали в нанокаталах, для определения количества окрашенного продукта использовали коэффициент поглощения  $\epsilon_{593} = 2.1 \times 10^4 \text{ нкат} \times \text{М}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ .

Методом изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) в полиакриламидном геле с градиентом рН 3.0—10.0 разделяли фракцию пероксидаз на изоферменты в камере Mini IEF Cell (Bio-Rad Laboratories). В качестве стандарта использовали белки с известными рI (Bio-Rad Laboratories). Для визуализации пероксидаз проводили окраску гелей 4-МН стандартным методом (Ferrer et al., 1990). Гели фотографировали на приборе Versa Doc 4000 (Bio-Rad Laboratories).

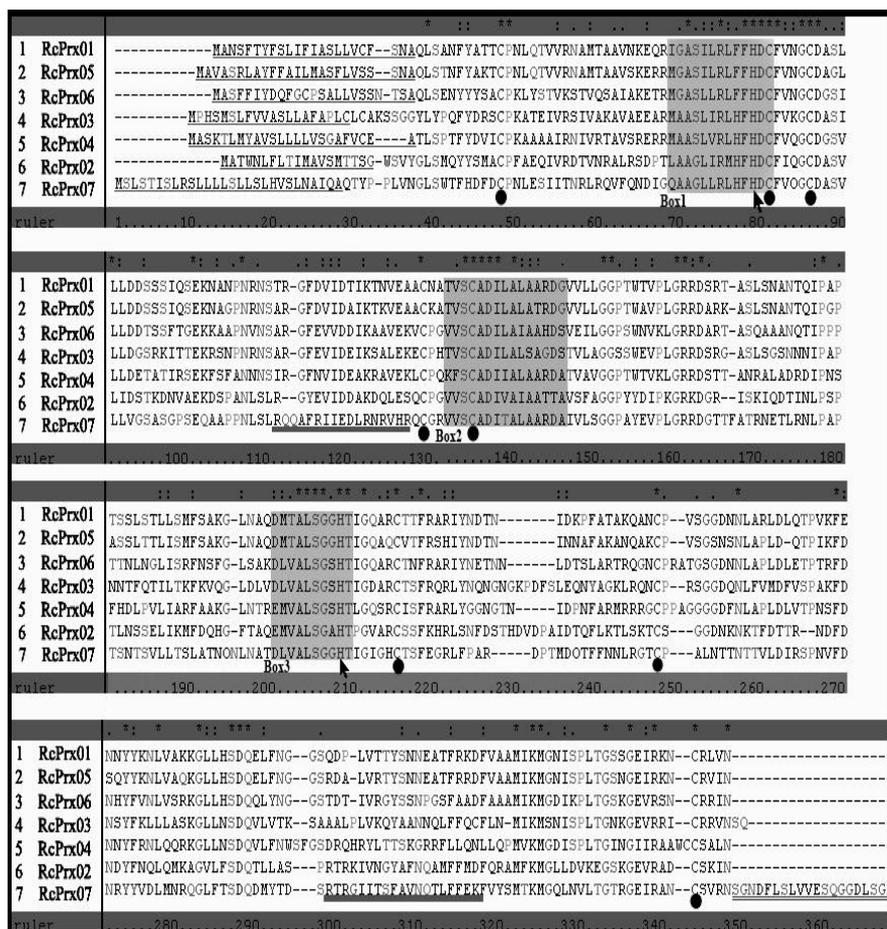
**1.6. Определение уровня внутриклеточных АФК.** Единичные клетки и агрегаты по 10—20 клеток окрашивали 2,7-дихлорфлуоресцеин-3,6-диацетатом ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ , Molecular Probes) и детектировали измерение флуоресценции на конфокальном микроскопе LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия). Видеофайлы полученных изображений были записаны и проанализированы в программе LSM 510 Release 3.5 software.

**1.7. Статистический анализ.** Результаты всех экспериментов обработаны при помощи программы Statistica версии 10.0. Все данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка. Для статистической оценки данных был проведен многофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с пост-хок тестом Фишера (PLSD). Для изучения взаимосвязи между переменными величинами использовали корреляционный анализ Пирсона. Уровень значимости различий принят равным 0.05.

## 2. Результаты исследования и их обсуждение

**2.1. Идентификация и анализ генов пероксидаз III класса *R. cordifolia*.** Для получения генов, кодирующих пероксидазы III класса марены, использовали образцы кДНК из листа и стебля растения, а также клеточных культур R, RBH, RCH и RA4. С помощью модифицированного протокола RACE (Matz et al., 1999) получены и секвенированы полноразмерные последовательности семи генов пероксидаз *R. cordifolia*, *RcPrx01—RcPrx07*, включая 5'- и 3'-нетранслируемые области, которые депонированы в базу данных GenBank под номерами доступа GQ380495, GQ380496, NM807270, NM807271, NM807272, NM807273 и NM807274 соответственно. Длина последовательностей варьировала от 1104 до 1412 п.н.

**2.2. Анализ аминокислотных последовательностей пероксидаз III класса *R. cordifolia*.** Были проанализированы аминокислотные последовательности зрелых белков *RcPrx01—RcPrx07*, состоящие из 294, 300, 309, 303, 293, 297 и 326 а.о. соответственно (Рис. 1; Табл. 1). У всех *RcPrx01—RcPrx07* установлено наличие нескольких высокогомологичных участков, включая активный сайт (Вох 1, Рис. 1), центральный консервативный (Вох 2, Рис. 1) и проксимальный гем-связывающий домены (Вох 3, Рис. 1). Все цистеины и два гистидина, необходимые для катализа реакций, сохраняются и в зрелых белках. У всех семи изоформ пероксидаз идентифицированы предполагаемые N-концевые сигнальные пептиды. У *RcPrx07* также обнаружены два  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -связывающих мотива и характерный C-терминальный пептид, функция которого связана, вероятно, с локализацией фермента в вакуолях (Carter et al., 2004; Welinder et al., 2002).



**Рис. 1.** Выравнивание аминокислотных последовательностей пероксидаз III класса *R. cordifolia*. Звездочки, точки и двоеточия над последовательностями – одинаковые аминокислотные остатки и замены с низкой и высокой идентичностью соответственно. Тонкое подчеркивание – N-терминальный сигнальный пептид; **Box 1** – активный сайт, **Box 2** – центральный консервативный домен; **Box 3** – проксимальный гем-связывающий домен; черные кружки – аминокислотные остатки цистеина, формирующие дисульфидные мостики; стрелки – аминокислотные остатки гистидина; двойное подчеркивание – C-терминальный пептид.

В соответствии со значениями изоэлектрических точек предполагаемых зрелых белков, исследуемые RcPrx могут быть разделены на три группы: RcPrx02 относится к анионным пероксидазам ( $pI < 6$ ), RcPrx07 – к нейтральным ( $pI 6-8$ ), а остальные пять изоферментов представлены щелочными пероксидазами ( $pI > 8$ ), среди которых RcPrx03, RcPrx04 и RcPrx05 – сильнощелочные ( $pI > 9$ ) (Табл. 1).

**Табл. 1.** Характеристики аминокислотных последовательностей пероксидаз III класса *R. cordifolia*

Характеристика	RcPrx						
	01	02	03	04	05	06	07
Предполагаемая длина зрелого белка, а.о.	294	300	309	303	293	297	326
Длина сигнального пептида, а.о. <sup>a</sup>	23	19	22	24	25	24	28
Предполагаемый молекулярный вес зрелого белка, кДа <sup>b</sup>	31.6	33.1	33.8	33.4	31.4	31.9	35.7
Предполагаемая $pI$ зрелого белка <sup>b</sup>	8.78	5.88	9.35	9.95	9.33	8.76	6.33
Вероятная клеточная локализация <sup>c</sup>	C	C	C	C	C	C	C, B

C – секретлируемые, B – вакуолярные формы. <sup>a</sup>Результаты анализа, полученные с помощью программ SignalP и PSORT; <sup>b</sup>Результаты анализа, полученные с помощью ExPasy; <sup>c</sup>Результаты анализа, полученные с помощью TargetP.

### 2.3. Филогенетический анализ пероксидаз III класса.

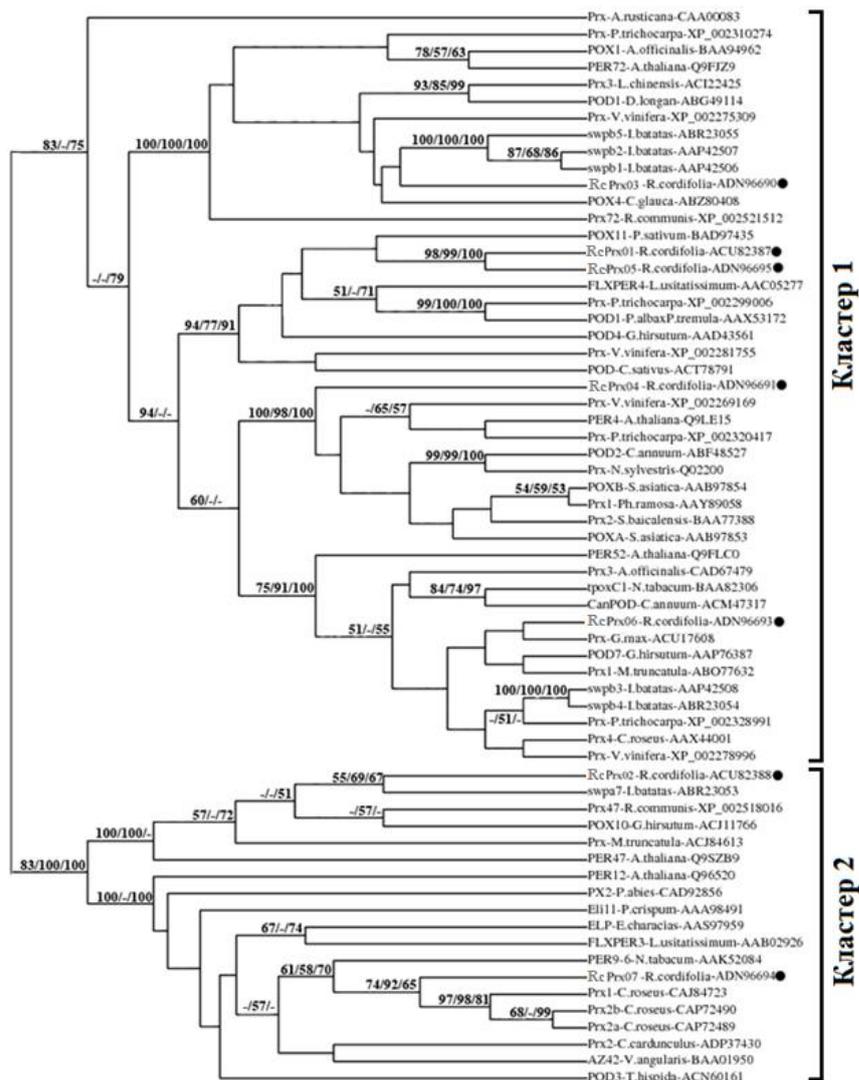
Результат анализа 64 аминокислотных последовательностей пероксидаз 31 вида растений, включая *R. cordifolia*, показал разделение пероксидаз на два кластера (Рис. 2). Для последовательностей RcPrx01, RcPrx03, RcPrx04, RcPrx05 и RcPrx06, объединенных в один кластер, имеют аминокислотные остатки Arg31 и Ser35 (номера позиций указаны в соответствии с аминокислотной последовательностью пероксидазы хрена), тогда как в последовательностях пероксидаз RcPrx02 и RcPrx07, объединенных во второй кластер, находились другие аминокислотные остатки. Внутри второго кластера выделяется группа пероксидаз, включая RcPrx07, характеризующихся наличием Ca<sup>2+</sup>/CaM-связывающего домена. Аминокислотные остатки Arg38, His42, Glu64, Asn70, Ser73, His 170, Glu176 и Asp247, необходимые для катализа, являются строго консервативными и сохраняются во всех последовательностях пероксидаз.

Внутри второго кластера выделяется группа пероксидаз, включая RcPrx07, характеризующихся наличием Ca<sup>2+</sup>/CaM-связывающего домена. Аминокислотные остатки Arg38, His42, Glu64, Asn70, Ser73, His 170, Glu176 и Asp247, необходимые для катализа, являются строго консервативными и сохраняются во всех последовательностях пероксидаз.

Внутри второго кластера выделяется группа пероксидаз, включая RcPrx07, характеризующихся наличием Ca<sup>2+</sup>/CaM-связывающего домена. Аминокислотные остатки Arg38, His42, Glu64, Asn70, Ser73, His 170, Glu176 и Asp247, необходимые для катализа, являются строго консервативными и сохраняются во всех последовательностях пероксидаз.

Внутри второго кластера выделяется группа пероксидаз, включая RcPrx07, характеризующихся наличием Ca<sup>2+</sup>/CaM-связывающего домена. Аминокислотные остатки Arg38, His42, Glu64, Asn70, Ser73, His 170, Glu176 и Asp247, необходимые для катализа, являются строго консервативными и сохраняются во всех последовательностях пероксидаз.

**2.4. Эффект трансформации генами *rolB*, *rolC* и диким штаммом A4 *A. rhizogenes* на пероксидазы III класса *R. cordifolia*.** Содержание пероксидаз в нетрансформированной клеточной культуре *R. cordifolia* было значительно ниже, чем в листе и стебле растения, что, очевидно, связано с утратой дифференцировки (Табл. 2; Рис. 3). Сверхэкспрессия гена *rolC*, а также совместная экспрессия генов *rolB* и *rolC* в составе дикого штамма pRiA4, не оказала видимого эффекта на пероксидазы III класса в трансформированных клеточных культурах *R. cordifolia* (Табл. 2; Рис. 3). Напротив, сверхэкспрессия гена *rolB* вызвала активацию экспрессии всех генов *RcPrx* (в 23—314 раз) и 53-кратное увеличение пероксидазной активности по сравнению с контролем R, а также значительные изменения в изоферментном составе пероксидаз (Табл. 2; Рис. 3).

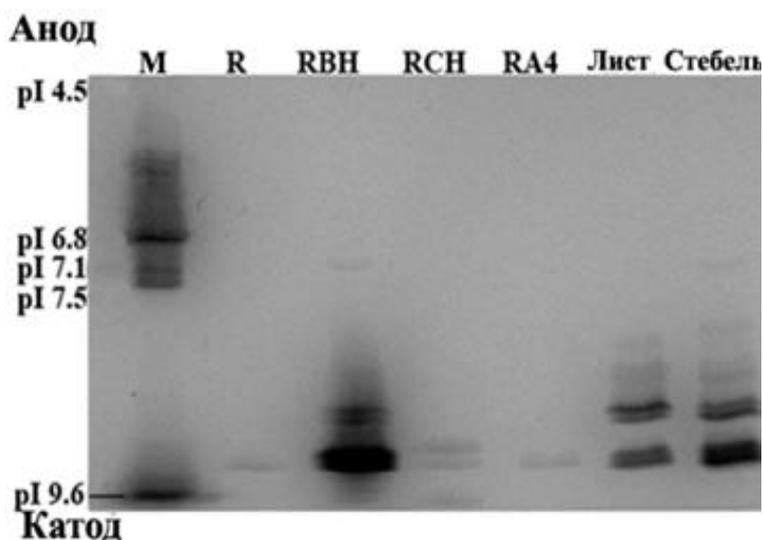


**Рис. 2.** Филогенетическое дерево пероксидаз 31 вида растений, построенное в программе Phym1. Числами обозначены значения бутстрепа, рассчитанные для ML-, MP- и NJ-методов соответственно. Черными кружками отмечены пероксидазы, идентифицированные в настоящей работе.

**Табл. 2.** Экспрессия генов *RcPrx* в листе, стебле и клеточных культурах *R. cordifolia*

Количество мРНК семи генов <i>RcPrx</i> , определенных с помощью ПЦР в реальном времени, в относительных единицах										
Ген	R	RBH	RBH/R	RCH	RCH/R	RA4	RA4/R	Лист	Стебель	Лист/Стебель
<i>RcPrx01</i>	0.009±0.001 <sup>d</sup>	0.472±0.021 <sup>b</sup>	↑ 52	0.009±0.001 <sup>d</sup>	равное	0.011±0.002 <sup>d</sup>	равное	0.304±0.009 <sup>c</sup>	0.549±0.009 <sup>a</sup>	↓ 1.8
<i>RcPrx02</i>	0.002±0.001 <sup>c</sup>	0.219±0.002 <sup>a</sup>	↑ 109	0.002±0.001 <sup>c</sup>	равное	0.003±0.001 <sup>c</sup>	равное	0.075±0.002 <sup>b</sup>	0.084±0.001 <sup>b</sup>	равное
<i>RcPrx03</i>	0.001±0.001 <sup>d</sup>	0.023±0.004 <sup>c</sup>	↑ 23	0.001±0.001 <sup>d</sup>	равное	0.001±0.001 <sup>d</sup>	равное	0.054±0.001 <sup>b</sup>	0.243±0.005 <sup>a</sup>	↓ 4.5
<i>RcPrx04</i>	0.002±0.001 <sup>b</sup>	0.114±0.004 <sup>a</sup>	↑ 57	0.006±0.001 <sup>b</sup>	равное	0.003±0.001 <sup>b</sup>	равное	0.001±0.004 <sup>b</sup>	0.003±0.002 <sup>b</sup>	равное
<i>RcPrx05</i>	0.003±0.001 <sup>d</sup>	0.255±0.002 <sup>a</sup>	↑ 85	0.004±0.001 <sup>d</sup>	равное	0.002±0.001 <sup>d</sup>	равное	0.193±0.005 <sup>c</sup>	0.224±0.006 <sup>b</sup>	↓ 1.2
<i>RcPrx06</i>	0.009±0.001 <sup>d</sup>	0.213±0.005 <sup>c</sup>	↑ 24	0.019±0.002 <sup>d</sup>	равное	0.006±0.001 <sup>d</sup>	равное	0.275±0.002 <sup>b</sup>	0.694±0.009 <sup>a</sup>	↓ 2.5
<i>RcPrx07</i>	0.001±0.001 <sup>d</sup>	0.314±0.006 <sup>c</sup>	↑ 314	0.001±0.001 <sup>d</sup>	равное	0.001±0.001 <sup>d</sup>	равное	0.454±0.008 <sup>b</sup>	0.973±0.027 <sup>a</sup>	↓ 2.1

R – нетрансформированная клеточная культура; RBH – трангенная клеточная культура с высоким уровнем экспрессии гена *rolB*; RCH – клеточная культура с высоким уровнем экспрессии гена *rolC*; RA4 – трангенная культура, трансформированная диким типом A4 *A. rhizogenes*. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка. Различия в надстрочных индексах (<sup>a, b, c, d</sup>) обозначают статистически значимую разницу ( $p < 0,05$ ) средних значений в рядах. Вертикальные стрелки ↑ и ↓ обозначают увеличение или уменьшение уровня экспрессии соответственно.



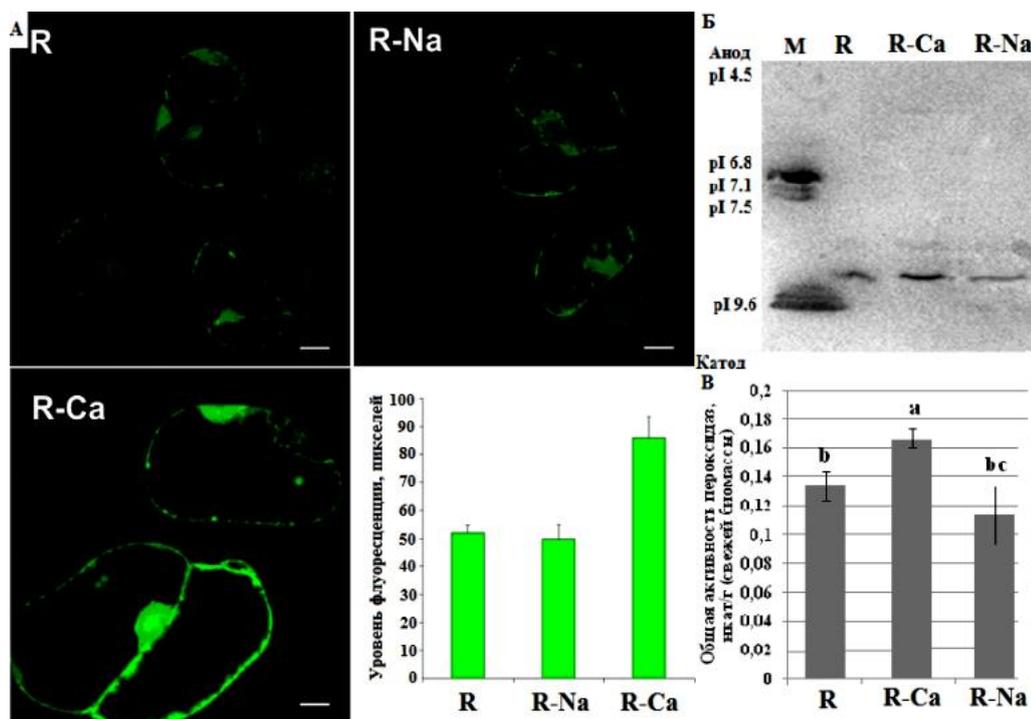
**Рис. 3.** Нативное изоэлектрическое фокусирование пероксидаз *R. cordifolia* в ПААГ. М – белковый маркер с известными pI для изоэлектрического фокусирования, R – нетрансформированная клеточная культура; RBH – *rolB*-трансформированная клеточная культура с высоким уровнем экспрессии трансгена; RCH – *rolC*-трансформированная клеточная культура с высоким уровнем экспрессии трансгена; RA4 – клеточная культура, трансформированная диким

Содержание пероксидаз в *rolB*-трансформированной культуре было сопоставимо с таковым в листе и стебле взрослого растения. Возможной причиной отсутствия активации пероксидаз III класса при совместной экспрессии генов *rolB* и *rolC* может быть низкий уровень экспрессии трансгена, поскольку в составе дикого штамма он находится под контролем собственного промотора. Однако более вероятно, что отсутствие эффекта активации вызвано тем, что *rolC* или другие гены Т-ДНК компенсируют активирующий эффект *rolB*, нивелируя его действие в отношении пероксидаз.

Примечательно, что ранее уже были получены данные о том, что, несмотря на общее происхождение генов *rolB* и *rolC*, они оказывают разное влияние на баланс кальция (Bulgakov et al., 2003), биосинтез вторичных метаболитов (Shkryl et al., 2008) и жизнеспособность растительных клеток (Schmülling et al., 1988), что свидетельствует в пользу последнего предположения.

**2.5 Влияние повышенного содержания АФК на активность пероксидаз III класса.** Одним из главных регуляторных эффектов *rolB* является модуляция уровня внутриклеточных АФК, в частности, индукция НАДФН-оксидаз, что приводит к продукции АФК. На фоне повышенного содержания АФК в клетке активируются антиоксидантные ферменты супероксиддисмутаза, каталаза и аскорбатпероксидаза, осуществляющие ликвидацию избыточных АФК и, как следствие, восстановление внутриклеточного редокс-гомеостаза (Bulgakov et al., 2013). В связи с этим, целью наших экспериментов было установить, является ли активация пероксидаз III класса частью компенсаторного механизма клетки на фоне избыточной продукции АФК. Для этого мы использовали клеточную культуру R-Са марены сердцелистной, трансформированную постоянно активной формой гена *AtCPK1* (*AtCPK1-Ca*) протеинкиназы арабидопсиса, которая является известным активатором НАДФН-оксидазы (Xing et al., 2001). В качестве контроля использована трансгенная культура марены R-Na, трансформированная неактивной формой *AtCPK1* (*AtCPK1-Na*).

Методом конфокальной микроскопии мы установили, что трансформация геном *AtCPK1-Ca* приводит к увеличению уровня АФК на 34% в клетках марены сердцелистной (Рис. 4А). Однако результаты нативного ИЭФ и измерения общей пероксидазной активности не выявили признаков значительной активации пероксидаз III класса. Так, в

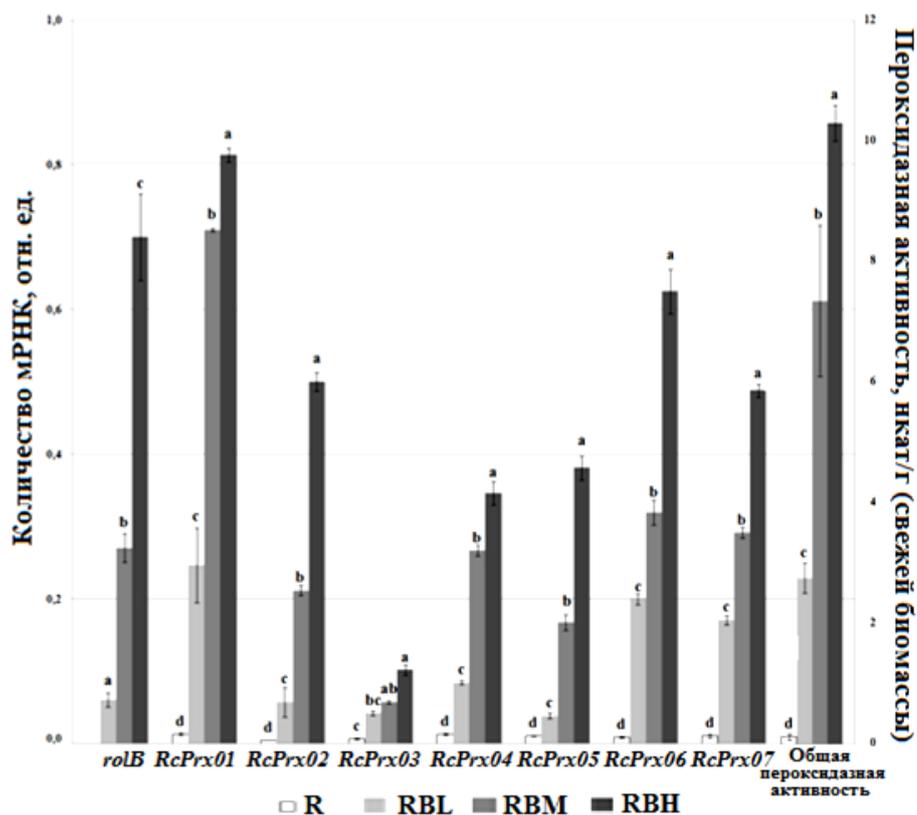


культуре R-Ca был идентифицирован один дополнительный щелочной изофермент (Рис. 4Б) и незначительно (в 1.3 раза) увеличилась пероксидазная активность (Рис. 4В), тогда как культура, трансформированная неактивной формой *AtCPK1*(*AtCPK1-Na*), не отличалась от контроля R.

Таким образом, в данной серии экспериментов мы показали отсутствие значительной активации пероксидаз III класса на фоне повышенного содержания АФК в результате трансформации клеточной культуры *R. cordifolia* геном *AtCPK1-Ca* постоянно активной формы кальций-зависимой протеинкиназы арабидопсиса. Полученные данные имеют особенное значение, поскольку демонстрируют разобщенность процессов активации ферментов пероксидаз III класса и нейтрализации избыточных количеств АФК. В случае сверхэкспрессии гена *rolB* активация пероксидаз также протекает в условиях интенсивного образования АФК, и, очевидно, что данный эффект не имеет прямой взаимосвязи с реакциями восстановления редокс-гомеостаза в клетке. Вероятно, что сигнал, генерируемый белком *RolB*, является специфичным в отношении пероксидаз III класса. В связи с чем, на следующем этапе работы нам предстояло выяснить наличие взаимосвязи между уровнем экспрессии гена *rolB* и активацией пероксидаз III класса.

## 2.6. Влияние уровня экспрессии *rolB* на активацию пероксидаз III класса.

Методом ПЦР-РВ мы определили экспрессию генов *RcPrx01— RcPrx07* в контрольной и *rolB*-трансформированных культурах *R. cordifolia* с низким, средним и высоким уровнем экспрессии гена *rolB* (RBL, RBM и RVH соответственно) (Рис. 5). Увеличение количества транскриптов генов пероксидаз в культурах RBL, RBM и RVH составило от 3 до 31, 10 до 59 и 17 до 125 раз по сравнению с нетрансформированной культурой R соответственно. Между уровнем экспрессии генов *rolB* и пероксидаз *RcPrx01-RcPrx07* была выявлена высокая положительная корреляция:  $r = 0.961$ ,  $p = 0.039$ . Паттерн экспрессии сохранялся неизменным во всех культурах: уровень экспрессии *RcPrx03* был самым низким, тогда как



**Рис. 5.** Экспрессия генов *rolB*, *RcPrx01*—*RcPrx07* и общая пероксидазная активность в клеточных культурах *R. cordifolia*. R – нетрансформированная клеточная культура; RBL, RBM, RBH – трансгенные клеточные культуры с низким, средним и высоким уровнем экспрессии гена *rolB* соответственно. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка. Различия в надстрочных индексах (<sup>a,b,c,d</sup>) обозначают статистически значимую разницу ( $p < 0,05$ ) средних значений в рядах.

транскрипты мРНК *RcPrx01*, *RcPrx02* и *RcPrx06* были представлены в наибольшем количестве. Примечательно, что уровень экспрессии генов положительно коррелировал со степенью активации соответствующих изоформ. Так, например, *RcPrx03* была активирована слабее остальных – от 6.8 до 16.8 раз по сравнению с контролем, тогда как изоформы *RcPrx01*, *RcPrx02* и *RcPrx06* были активированы наиболее значительно – в 19.7—67.8, 13.3—116.2 и 23.5—73.9 раз по сравнению с культурой R соответственно. Результаты измерения общей пероксидазной активности и ИЭФ согласуются с полученными данными об экспрессии генов *RcPrx*.

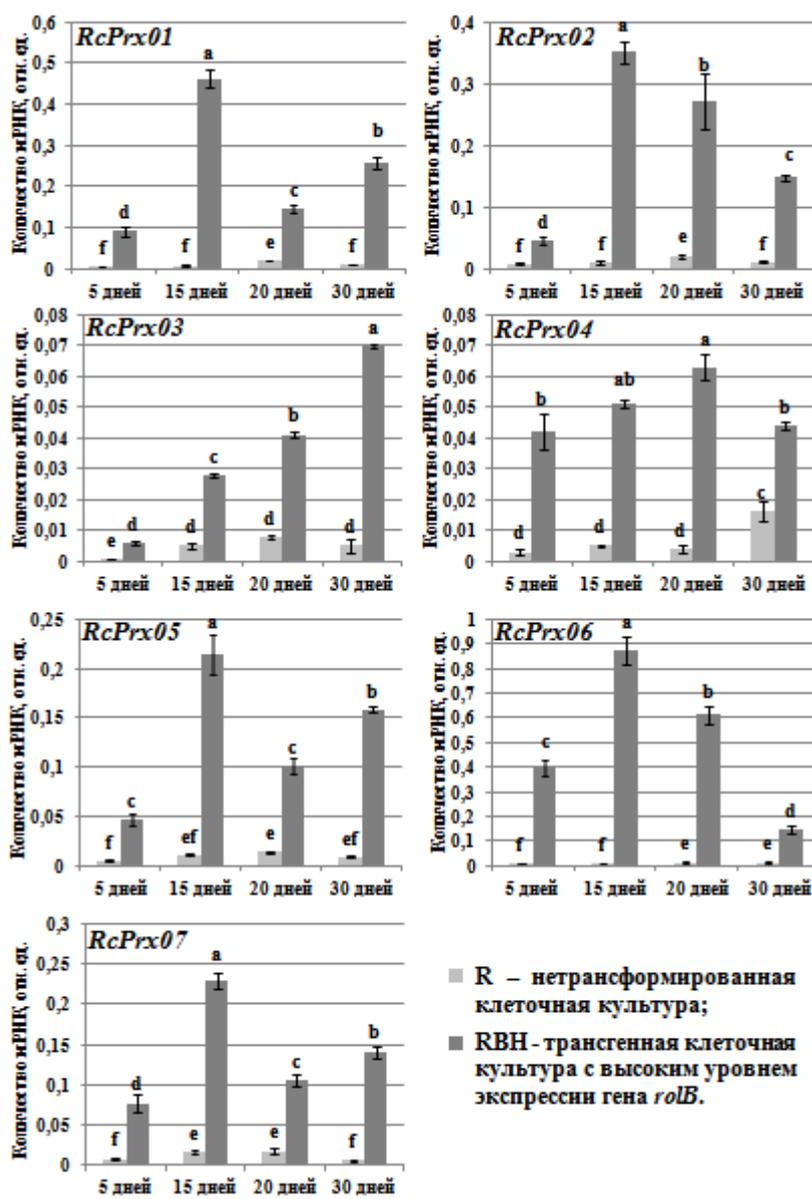
По сравнению с нетрансформированной культурой R, общая пероксидазная активность в культурах RBL, RBM и RBH увеличилась в 23, 61 и 86 раз соответственно. Анализ Пирсона показал наличие высокой положительной корреляции между уровнем экспрессии гена *rolB* и общей пероксидазной активностью ( $r = 0.985$ ,  $p = 0.001$ ), а также между экспрессией индивидуальных изоформ пероксидаз и общей пероксидазной активностью ( $r = 0.977$ ,  $p = 0.023$ ) в *rolB*-трансгенных культурах марены. Внутреннее сравнение показало 20-кратное увеличение продукции пероксидаз в культуре RBL относительно R, 2-кратное – в культуре RBM относительно RBL и 0.8-кратное увеличение продукции в RBH относительно RBM, что свидетельствует о фактическом достижении биосинтетического максимума в трансформированных клетках по мере усиления экспрессии гена *rolB* (Табл. 3).

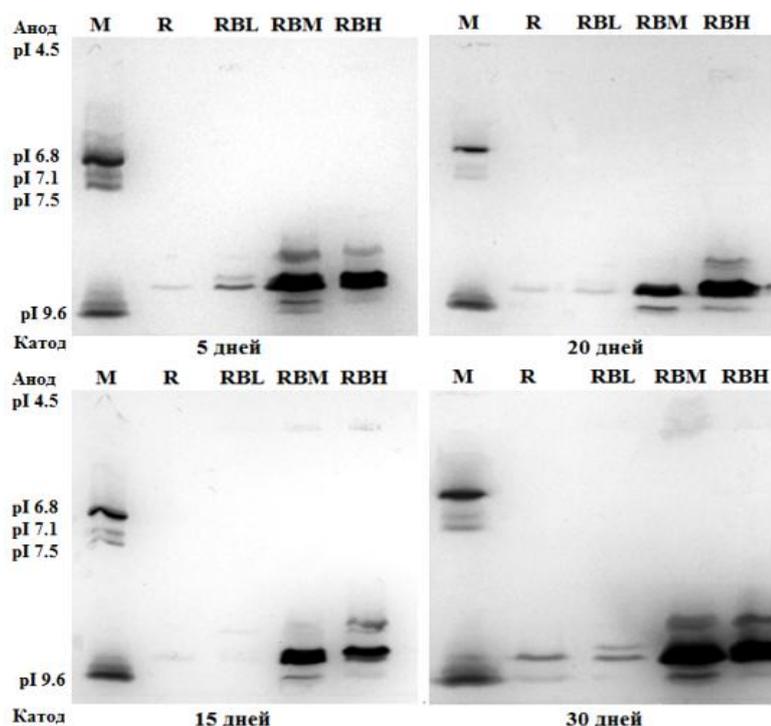
**2.7. Активирующий эффект *rolB* на пероксидазы III класса *R. cordifolia* в разных фазах роста.** Исследование динамики накопления транскриптов мРНК *RcPrx01*—*RcPrx07* в течение пассажа позволило идентифицировать различия в профилях экспрессии

**Рис. 6.** Экспрессия генов *RcPrx01–RcPrx07* в нетрансформированной и *rolB*-трансгенной клеточных культурах *R. cordifolia* на разных фазах роста: лаг-фаза (5 дней), фаза линейного (15 дней) и замедленного (20 дней) роста, а также стационарная фаза (30 дней). Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка.

индивидуальных изоформ (Рис. 6). Важно отметить, что в культуре RBH у всех изоформ *RcPrx01–RcPrx07*, за исключением *RcPrx03*, произошло смещение максимальных показателей уровня экспрессии в более раннюю фазу, тогда как общий профиль экспрессии при этом практически не изменился (Рис. 6). Транскрипты мРНК изоформ *RcPrx01*, *RcPrx05* и *RcPrx07* имеют схожую динамику накопления с наличием двух пиков – в фазе

линейного роста и в стационарной фазе. Примечательно, что последовательности *RcPrx01* и *RcPrx05* гомологичны генам *SSP1*, *SSP2* и *SSP5* пероксидаз *Senecio squalidus* L. (от 76% до 82% идентичности), участвующих в формировании цветковых органов (McInnis et al., 2005). Кроме того, в отличие от других пероксидаз *RcPrx*, характеризующихся низкой степенью гомологии, аминокислотные последовательности *RcPrx01* и *RcPrx05* идентичны на 82%, что также может свидетельствовать о наличии у этих изоферментов общих функций. Аналогично, *RcPrx07* имеет высокую степень сходства с генами *AtPrx37* и *AtPrx33* пероксидаз арабидопсиса (80% и 83% гомологии соответственно), которые контролируют рост и растяжение клеток (Passardi et al., 2006; Pedreira et al., 2011). Кроме того, белки *RcPrx07* и *AtPrx37* имеют вакуолярную локализацию. В совокупности, полученные данные позволяют предположить, что изоформы *RcPrx01*, *RcPrx05* и *RcPrx07* участвуют в процессах роста и дифференцировки. Увеличение их экспрессии в конце пассажа может быть связано с массовой гибелью клеток и подготовкой более мелких, меристемных, клеток к делению. Количество транскриптов *RcPrx03* и *RcPrx04* было очень мало на всех стадиях пассажа (Рис. 6), тогда как в условиях абиотического стресса их





**Рис. 7.** Нативное изоэлектрическое фокусирование пероксидаз в клеточных культурах *R. cordifolia* с разным уровнем экспрессии гена *rolB* на разных фазах роста: лаг-фаза (5 дней), фаза линейного (15 дней) и замедленного (20 дней) роста, стационарная фаза (30 дней). М – маркер, R – нетрансформированная клеточная культура; RBL, RBM, RBH – трансгенные клеточные культуры с низким, средним и высоким уровнем экспрессии гена *rolB* соответственно.

экспрессия значительно увеличивалась (Рис. 8), что указывает на их участие в защитных реакциях.

Изоферментные спектры пероксидаз демонстрируют наличие

активирующего эффекта гена *rolB* на ферменты на всех стадиях роста (Рис. 7). Выявлено наличие двух изоформ щелочной природы в культуре R, три – в клеточной культуре RBL, тогда как в культурах RBM и RBH обнаружили значительную активацию и появление дополнительных изоформ на всех фазах роста (Рис. 7). Качественные различия изоферментных паттернов в трансгенных культурах RBM и RBH минимальны, однако в последней присутствуют дополнительные изоформы щелочной природы, которые также появляются в культуре RBM в конце пассажа. Визуальное сравнение полос показало, что пероксидазная активность на 5-ый день пассажа во всех культурах достаточно высока, что, вероятно, связано с переходом из стационарной фазы предыдущего пассажа в лаг-фазу следующего. В соответствии с нашими расчетами, общая продукция пероксидаз во всех *rolB*-трансформированных каллусах *R. cordifolia* была значительно выше, чем в нормальной культуре (880—2020 нкат/л по сравнению с 62 нкат/л соответственно). Самый высокий уровень продукции был обнаружен в каллусах со средним уровнем экспрессии, пик которого находился в фазе замедленного роста (Табл. 3). Таким образом, в данной серии экспериментов мы показали, что активирующий эффект гена *rolB* на пероксидазы III класса сохраняется на всех фазах роста и положительно коррелирует с уровнем экспрессии трансгена.

## 2.8. Активация пероксидаз III класса на фоне других факторов стресса.

Активация пероксидаз является частью защитной стратегии растительных клеток в неблагоприятных условиях, например, при температурных стрессах, в присутствии NaCl и метилжасмоната, которые являются известными стресс-факторами (Park et al., 2003, Mika et al., 2010, Wang et al., 2013). В связи с этим, на данном этапе работы перед нами стояло две задачи: провести сравнительный анализ влияния сверхэкспрессии гена *rolB* и других стрессовых факторов на активацию ферментов и определить роль индивидуальных пероксидаз III класса *R. cordifolia* в условиях стресса.

**Табл. 3.** Динамика активности, накопления пероксидаз и биомассы в нормальной и *rolB*-трансгенных клеточных культурах *R. cordifolia*

Клеточная культура	Возраст, дней	Свежая биомасса, г/л	Общая пероксидазная активность, нкат/г свежей биомассы	Общая продукция пероксидаз, нкат/л
R	5	58±4 <sup>i</sup>	0.06±0.01 <sup>k</sup>	4±1 <sup>k</sup>
	15	175±8 <sup>e</sup>	0.10±0.02 <sup>k</sup>	18±3 <sup>j</sup>
	20	297±12 <sup>bc</sup>	0.21±0.03 <sup>j</sup>	62±5 <sup>i</sup>
	30	346±18 <sup>a</sup>	0.12±0.05 <sup>jk</sup>	42±13 <sup>i</sup>
RBL	5	46±2 <sup>jk</sup>	1.2±0.10 <sup>i</sup>	55±3 <sup>i</sup>
	15	122±8 <sup>gh</sup>	5.5±0.70 <sup>f</sup>	671±43 <sup>g</sup>
	20	246±17 <sup>cd</sup>	3.5±0.60 <sup>g</sup>	880±83 <sup>f</sup>
	30	308±20 <sup>ab</sup>	2.8±0.20 <sup>h</sup>	850±4 <sup>f</sup>
RBM	5	40±2 <sup>k</sup>	3.5±0.20 <sup>g</sup>	140±17 <sup>h</sup>
	15	90±11 <sup>h</sup>	14.1±0.80 <sup>b</sup>	1260±79 <sup>d</sup>
	20	171±16 <sup>ef</sup>	11.8±0.70 <sup>c</sup>	2020±75 <sup>a</sup>
	30	231±14 <sup>d</sup>	7.4±0.40 <sup>e</sup>	1700±21 <sup>b</sup>
RBH	5	30±1 <sup>l</sup>	5.1±0.10 <sup>f</sup>	150±1 <sup>h</sup>
	15	57±5 <sup>ij</sup>	19.3±0.90 <sup>a</sup>	1100±30 <sup>e</sup>
	20	103±13 <sup>gh</sup>	15.1±0.60 <sup>b</sup>	1560±105 <sup>c</sup>
	30	128±16 <sup>fg</sup>	10.3±0.30 <sup>d</sup>	1320±113 <sup>d</sup>

R – нетрансформированная клеточная культура; RBL, RBM, RBH – трансгенные клеточные культуры с низким, средним и высоким уровнем экспрессии гена *rolB* соответственно. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка. Различия в надстрочных индексах обозначают статистически значимую разницу ( $p < 0,05$ ) средних значений.

В данной серии экспериментов мы использовали культуры R и RBH, которые культивировали в условиях низкой (+12°C) и высокой (+28°C) температур, а также в присутствии 60 мМ NaCl и 10 мкМ метилжасмоната (Мж) в течение одного полного периода пассажа (30 дней).

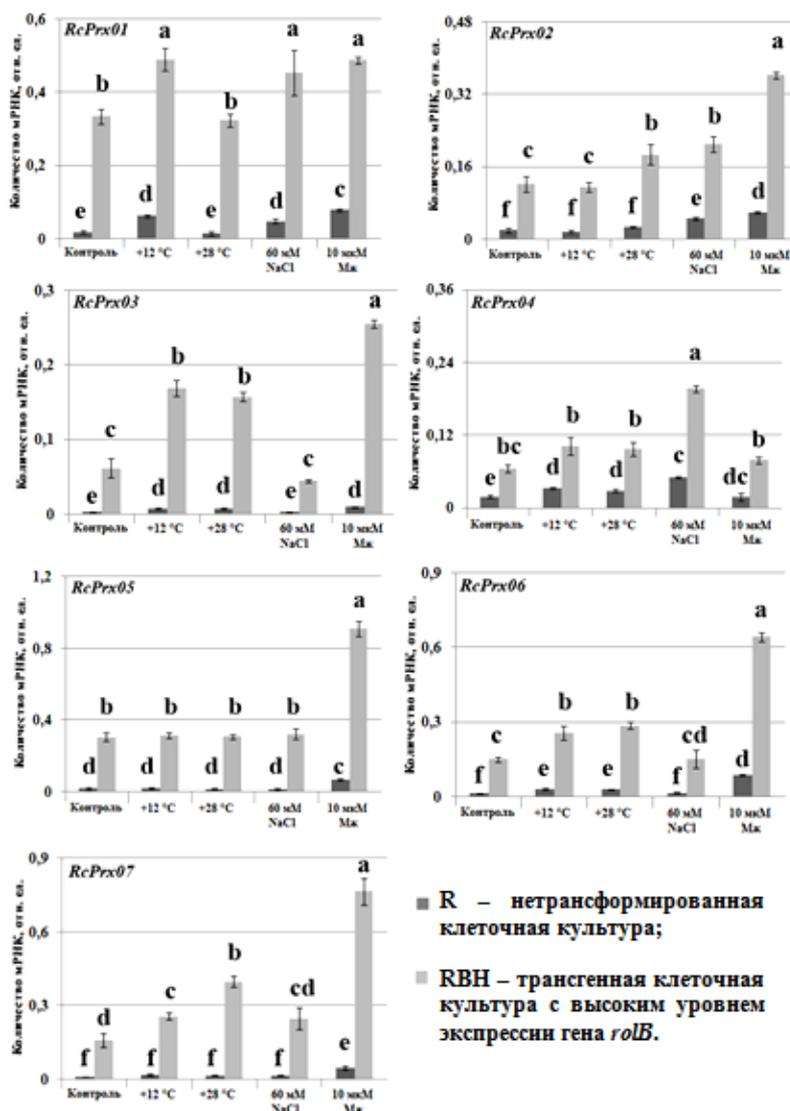
Результаты ПЦР-РВ показали, что разные типы стрессов активировали специфичные изоформы генов *RcPrx* как в контрольной, так и *rolB*-трансгенной культурах *R. cordifolia* (Рис. 8). Так, в обеих культурах холодовой стресс активировал экспрессию *RcPrx01*, *RcPrx03* и *RcPrx06*, тепловой – изоформ *RcPrx03* и *RcPrx06*. Добавление 60 мМ NaCl привело к активации *RcPrx01*, *RcPrx02* и *RcPrx04* как в контрольной, так и *rolB*-трансгенной культурах. Самый сильный стимулирующий эффект на пероксидазы оказал метилжасмонат, активируя при этом экспрессию большинства изоформ *RcPrx* как в контрольной, так и *rolB*-трансгенной культурах – максимальный уровень активации был отмечен для изоформ *RcPrx06* и *RcPrx07*. Изоформа *RcPrx05* оказалась нечувствительна ко всем воздействиям, за исключением обработки метилжасмонатом с увеличением

экспрессии в 3 раза в обеих культурах, что указывает слабовыраженную роль соответствующего изофермента при данных условиях. В обеих культурах, R и RBH, изоформа *RcPrx03* активировалась при всех типах воздействия (от 1.6 до 4.2 раз), кроме обработки NaCl, тогда как *RcPrx04* активировалась только в ответ на добавление соли. Важно отметить, что ни одно из исследованных стрессовых воздействий не оказало отрицательного эффекта на экспрессию семи изоформ генов *RcPrx* как в нормальной, так и в *rolB*-трансгенной культурах *R. cordifolia*.

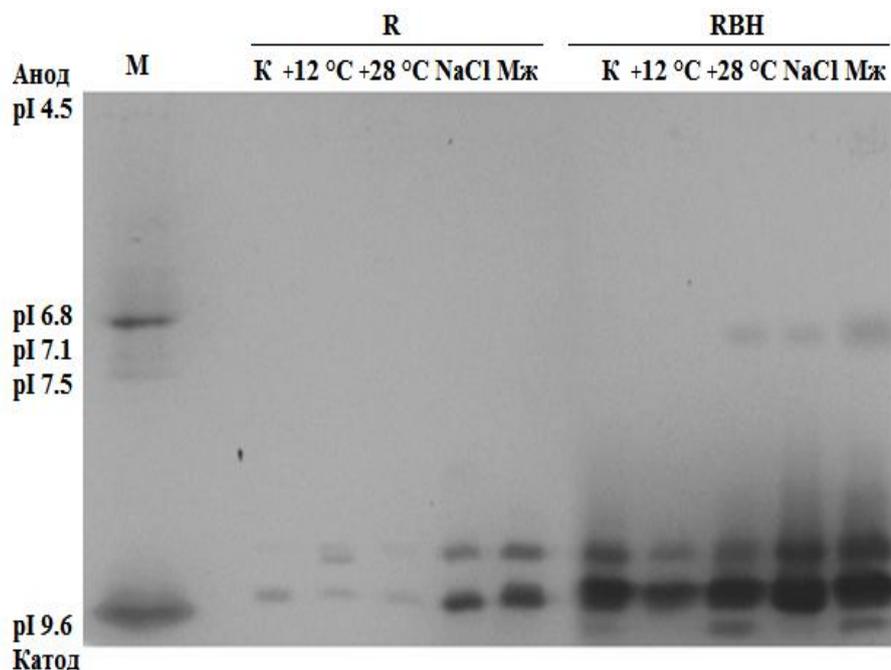
Данные об экспрессии *RcPrx* согласуются с результатами ИЭФ (Рис. 9). Наибольший уровень активности в культуре RBH отмечен в области высоких значений pH, где сконцентрированы пероксидазы щелочной природы, в частности, *RcPrx01*, *RcPrx03* и *RcPrx06*, гены которых также отличались высоким уровнем экспрессии как в нормальных, так и стрессовых условиях (Рис. 8; Табл. 1).

Культивирование в течение 30 дней в условиях стресса оказало различное влияние на активность и продукцию пероксидаз III класса в нормальной и *rolB*-трансформированной культурах (Табл. 4). Так, действие низкой и высокой температур не оказало выраженного эффекта в обеих культурах, тогда как присутствие NaCl и метилжасмоната вызывало существенное увеличение активности в культуре R (в 16 и 21 раз соответственно).

В культуре RBH абиотический стресс стимулировал пероксидазную активность в значительно меньшей степени (от 1.1 до 1.7 раз по сравнению с нормальными условиями), что согласуется с данными ИЭФ и свидетельствует о лучшей адаптации *rolB*-трансгенных



**Рис. 8.** Экспрессия генов *RcPrx01*–*RcPrx07* в культурах *R. cordifolia* в нормальных и стрессовых условиях: под действием низкой (+12°C) и высокой (+28°C) температур, с добавлением 60 mM NaCl и 10 мкМ метилжасмоната. R – нетрансформированная клеточная культура; RBH – трансгенная клеточная культура с высоким уровнем экспрессии гена *rolB*. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка. Различия в надстрочных индексах (<sup>a,b,c,d,e,f</sup>) обозначают статистически значимую разницу (p < 0,05) средних значений в рядах.



**Рис. 9.** Изоэлектрическое фокусирование пероксидаз в *rolB*-трансгенных клеточных культурах *R. cordifolia* с высоким уровнем экспрессии трансгена в нормальных (К) и стрессовых условиях: под действием низкой (+12°C) и высокой (+28°C) температур, 60 мМ NaCl и 10 мкМ метилжасмоната (Мж). М – маркер для изоэлектрического фокусирования, R – контрольная культура; RBH – трансгенная клеточная культура с высоким уровнем экспрессии гена *rolB*.

культур марены к неблагоприятным условиям (Рис. 9). Исследованные типы стрессов не оказали значительного влияния на продукцию пероксидаз в культуре RBH, однако, при добавлении соли и метилжасмоната наблюдали незначительное увеличение продукции, что свидетельствует о наличии синергетического эффекта индукторов. Напротив, температурные воздействия оказали отрицательный эффект на продукцию пероксидаз в контрольной культуре R, тогда как добавление соли и метилжасмоната привело увеличению соответствующих показателей в 3.6 и 8.4 раз соответственно (Табл. 4).

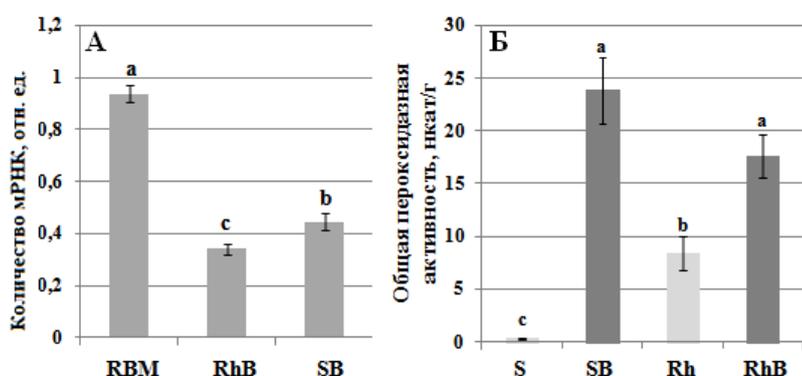
**Табл. 4.** Накопление биомассы, продукция и активность пероксидаз III класса в клеточных культурах *R. cordifolia* после 30 дней культивирования в нормальных и стрессовых условиях: при низкой (+12°C) и высокой (+28°C) температуре, добавлении 60 мМ NaCl и 10 мкМ метилжасмоната.

	Клеточная культура	Свежая биомасса, г/л	Общая пероксидазная активность, нкат/г свежей биомассы	Продукция пероксидаз, нкат/л
Нормальные условия (+24°C)	R	317±12 <sup>a</sup>	0,15±0,02 <sup>g</sup>	48±5 <sup>f</sup>
	RBH	141±6 <sup>b</sup>	9,80±0,50 <sup>c</sup>	1382±12 <sup>b</sup>
Холодовой стресс (+12°C)	R	61±4 <sup>e</sup>	0,38±0,03 <sup>f</sup>	23±1 <sup>g</sup>
	RBH	89±3 <sup>d</sup>	10,90±0,60 <sup>bc</sup>	970±20 <sup>c</sup>
Тепловой стресс (+28°C)	R	96±7 <sup>d</sup>	0,25±0,03 <sup>fg</sup>	24±1 <sup>g</sup>
	RBH	124±4 <sup>c</sup>	12,30±0,80 <sup>b</sup>	1525±47 <sup>a</sup>
Солевого стресс (60мМ NaCl)	R	69±5 <sup>e</sup>	2,50±0,20 <sup>e</sup>	173±2 <sup>e</sup>
	RBH	101±6 <sup>d</sup>	15,66±0,60 <sup>a</sup>	1582±32 <sup>a</sup>
Метилжасмонат, 10 мкМ	R	128±9 <sup>b</sup>	3,15±0,20 <sup>d</sup>	403±7 <sup>d</sup>
	RBH	61±7 <sup>e</sup>	16,80±0,70 <sup>a</sup>	1025±65 <sup>c</sup>

R – нетрансформированная клеточная культура; RBH – трансгенная клеточная культура с высоким уровнем экспрессии гена *rolB*. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка. Различия в надстрочных индексах (<sup>a, b, c, d, e, f, g</sup>) обозначают статистически значимую разницу ( $p < 0,05$ ) средних значений в рядах.

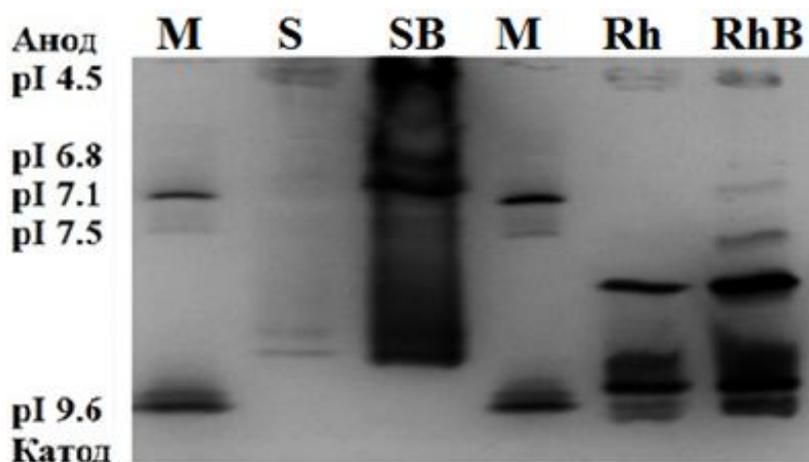
Таким образом, в данной серии экспериментов нам удалось идентифицировать индивидуальные изоформы пероксидаз III класса, индуцируемых при воздействии разными типами абиотических стрессовых факторов, а также показать, что, несмотря на их чувствительность к исследуемым типам воздействий, значительного увеличения активности и продукции ферментов не выявлено. Результаты сравнительного анализа свидетельствуют о том, что, ген *rolB* вызывает более выраженную индукцию биосинтеза пероксидаз, чем при добавлении элиситора или действии факторов абиотического стресса, что свидетельствует об эффективности использования данного подхода для увеличения продукции растительных пероксидаз III класса. В связи с этим, на следующем этапе работы нам предстояло выяснить, сохраняется ли эффект активации пероксидаз III класса геном *rolB* в клеточных культурах других видов растений.

### 2.9. Эффект трансформации геном *rolB* на пероксидазы III класса *Rh. roseus* и *S. vulgaris*.



**Рис. 10.** Экспрессия гена *rolB* (А) и общая пероксидазная активность (Б) в клеточных культурах *R. cordifolia*, *Rh. roseus* и *S. vulgaris*. RBM – *rolB*-трансформированная культура *R. cordifolia* со средним уровнем экспрессии трансгена, Rh и S – нетрансформированные клеточные культуры, RhB и SB – *rolB*-трансгенные клеточные культуры *Rh. roseus* и *S. vulgaris*, соответственно.

*vulgaris*. В данной серии экспериментов мы использовали нетрансформированные клеточные культуры *Rhodiola roseus* L. (Rh) и *Silene vulgaris* (M.) G. (S), а также культуры, трансформированные геном *rolB*, обозначенные RhB и SB соответственно. Методом ПЦР-РВ установлено, что уровень экспрессии *rolB* в трансгенных культурах был сопоставим с экспрессией трансгена в культуре RBM (Рис. 10А). Измерение общей пероксидазной активности в нетрансформированных культурах показало, что они имели разный базовый уровень активности пероксидаз: в культуре S уровень пероксидазной активности составил 0.32 нкат/г свежей биомассы, тогда как в культуре Rh он был значительно выше – 8.4 нкат/г (Рис. 10Б). В результате измерения общей пероксидазной активности в *rolB*-трансгенных культурах RhB и SB было установлено 2.1- и 75.1-кратное увеличение активности соответственно.



**Рис. 11.** Нативное изоэлектрическое фокусирование пероксидаз в *rolB*-трансгенных клеточных культурах *Rh. roseus* и *S. vulgaris* на 30-ый день культивирования. М – маркер, Rh и S – контрольные клеточные культуры, RhB и SB – *rolB*-трансгенные клеточные культуры *Rh. roseus* и *S. vulgaris*, соответственно.

Таким образом, вероятно, что бóльший эффект *rolB* оказывает на клетки с низким исходным уровнем активности пероксидаз, тогда как в клетках с более высоким базовым уровнем эффект активации менее выраженный. С этим предположением согласуются результаты изоферментного разделения пероксидаз III класса *Rh. roseus* и *S. vulgaris* (Рис. 11). Активность ферментов в культуре SB увеличилась значительно по сравнению с контролем, тогда как в культуре RhB эффект активации был менее выраженным. Таким образом, на примере *Rh. roseus* и *S. vulgaris* мы показали, что трансформация геном *rolB* приводит к активации пероксидаз и данный эффект не является видоспецифичным, в связи с чем, данный подход может быть использован для активации биосинтеза ферментов также в клеточных культурах других растений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе было исследовано влияние агробактериальных генов *rol* на пероксидазы III класса. Впервые было показано, что ген *rolB* является мощным индуктором экспрессии и активности пероксидаз III класса в клеточных культурах растений. Впервые нами установлено, что данное свойство является специфичной функцией *rolB* и положительно коррелирует с уровнем экспрессии трансгена, а также зависит от базового уровня активности и содержания ферментов пероксидаз III класса в растительных клетках. Нами показано, что индукция пероксидаз на фоне сверхэкспрессии гена *rolB* не является видоспецифичной, а значит, может быть использована для получения ферментов из различных источников с целью промышленного производства. Кроме того, трансгенные культуры с повышенным содержанием пероксидаз могут быть использованы в качестве модельной системы для изучения механизмов активации биосинтеза ферментов и других белков, что, в свою очередь, может послужить основой для создания новых растительных штаммов-суперпродуцентов.

## ВЫВОДЫ

1. Идентифицированы семь полноразмерных последовательностей генов пероксидаз III класса *R. cordifolia* – *RcPrx01*, *RcPrx02*, *RcPrx03*, *RcPrx04*, *RcPrx05*, *RcPrx06* и *RcPrx07*.
2. Филогенетический анализ показал разделение пероксидаз на два кластера: *RcPrx01*, *RcPrx03*, *RcPrx04*, *RcPrx05* и *RcPrx06* объединены в один кластер и содержат аминокислотные остатки Arg31 и Ser35. Пероксидазы *RcPrx02* и *RcPrx07* объединены во второй кластер и содержат другие аминокислотные остатки в соответствующих позициях. Пероксидаза *RcPrx07* объединена в подкластер пероксидаз с сайтом связывания  $Ca^{2+}$ /кальмодулина.
3. Сверхэкспрессия *rolB* приводит к активации экспрессии генов *RcPrx01*—*RcPrx07* (в 23—314 раз), увеличению общей пероксидазной активности (до 193 раз) и продукции ферментов (до 32 раз).
4. Выявлено, что *rolB*-индуцируемая активация растительных пероксидаз III класса *R. cordifolia* положительно коррелирует с уровнем экспрессии трансгена и сохраняется во всех фазах роста в течение пассажа.

5. Сверхэкспрессия гена *rolC*, а также совместная экспрессия *rolB* и *rolC* под контролем собственных промоторов в составе дикого штамма A4 *A. rhizogenes*, не оказала значительного влияния на пероксидазы III класса *R. cordifolia*.

6. Активация растительных пероксидаз III класса геном *rolB* является специфическим эффектом трансгена, и не обусловлена повышением уровня внутриклеточных активных форм кислорода на фоне трансформации.

7. Ген *rolB* активировывает продукцию растительных пероксидаз III класса марены сердцелистной значительно эффективнее по сравнению с известными элиситорами и факторами абиотического стресса.

8. В клеточных культурах *S. vulgaris* и *Rh. rosea* ген *rolB* также вызывает индукцию пероксидаз, и данный эффект зависит от исходного уровня активности ферментов.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК МОН России

1. Bulgakov V.P., Gorpenchenko T.Y., Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Mischenko N.P., **Avramenko T.V.**, Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. CDPK-driven changes in the intracellular ROS level and plant secondary metabolism // *Bioengineered Bugs*. 2011. V. 2, No. 6. – P. 327–330.

2. Veremeichik G.N., Shkryl Y.N., Bulgakov V.P., **Avramenko T.V.**, Zhuravlev Y.N. Molecular cloning and characterization of seven class III peroxidases induced by overexpression of the agrobacterial *rolB* gene in *Rubia cordifolia* transgenic callus cultures // *Plant Cell Reports*. 2012. V. 31, No. 6. – P. 1009–1019.

3. Shkryl, Y.N., Veremeichik, G.N., Bulgakov, V.P., **Avramenko, T.V.**, Günter, E.A., Ovodov, Y.S., Muzarok, T.I., Zhuravlev, Y.N. The production of class III plant peroxidases in transgenic callus cultures transformed with the *rolB* gene of *Agrobacterium rhizogenes* // *Journal of Biotechnology*. 2013. V. 168, No. 1. P. 64–70.

### Тезисы конференций

1. **Avramenko T.V.**, Veremeichik G.N., Shkryl Y.N., Gorpenchenko T.Y., Bulgakov V.P., Zhuravlev Y.N. Simultaneous activation of secondary metabolism and an increase in temperature stress tolerance in *Rubia cordifolia* cells by overexpression of a calcium-dependent protein kinase gene // 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition. – Тэгу, Южная Корея. 2012. P. O-S8-0035.

2. **Авраменко Т.В.**, Веремейчик Г.Н., Шкрыль Ю.Н., Горпенченко Т.Ю., Булгаков В.П. Активация защитных механизмов в трансгенных *Rubia cordifolia* под действием гетерологичной экспрессии кальцийзависимой протеинкиназы // Актуальные проблемы экологии, морской биологии и биотехнологии. Материалы XI Региональной конференции студентов, аспирантов вузов и научных организаций Дальнего Востока России. Владивосток. 2012. – С. 11–12.

3. **Avramenko T.V.**, Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Bulgakov V.P. Molecular cloning of seven class III peroxidases induced by overexpression of the agrobacterial *rolB* gene in *Rubia cordifolia* transgenic callus cultures // 2 European Conference on Biology and Medical Sciences. – Вена, Австрия. 2014. V. 1. P. 20-25.

4. **Avramenko T.V.**, Veremeichik G.N., Shkryl Y.N., Bulgakov V.P. Characterization and phylogenetic analysis of seven class III peroxidases from *Rubia cordifolia* callus culture // The 8th International Conference on European Science and Technology. – Мюнхен, Германия. 2014. V. 1. – P. 57–62.

5. Югай Ю.А., Авраменко Т.В., Шкрыль Ю.Н. Исследование активности антиоксидантных ферментов в *rolC*-трансгенных корневых культурах // XV Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии. Владивосток. 2014. – С. 60.

6. Авраменко Т.В., Веремейчик Г.Н., Шкрыль Ю.Н., Булгаков В.П. Продукция растительных пероксидаз III класса в трансгенных клеточных культурах *Rubia cordifolia*, трансформированных геном *rolB* из *Agrobacterium rhizogenes* // VIII Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва. 2015. Т. 1, Н. 1. – С. 311–316.

7. Авраменко Т.В., Веремейчик Г.Н., Шкрыль Ю.Н., Булгаков В.П. Активация пероксидаз III класса в клеточных культурах растений, трансформированных агробактериальным геном *rolB* // VI Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины». Ростов-на-Дону. 2015. – С. 12-13.