

УДК 576.3/7.086.83:58+УДК 573.6.086.83:577.21

Пинкус С.А., вед. инж. лаборатории биотехнологии;  
Веремейчик Г.Н., канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории биоинженерии;  
Шкрыль Ю.Н., канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории биоинженерии,  
БПИ ДВО РАН

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНА  
КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМОЙ ПРОТЕИНКИНАЗЫ АРАБИДОПСИСА *ATCPK1*  
НА УСТОЙЧИВОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ КЛЕТОК МАРЕНЫ СЕРДЦЕЛИСТНОЙ  
К ТЕМПЕРАТУРНЫМ СТРЕССАМ**

*Целью настоящей работы являлось исследование влияния сверхэкспрессии гена *AtCPK1* на устойчивость клеток марены к температурным стрессам. Для выявления молекулярного механизма действия трансгена нами исследована экспрессия генов НАДФН-оксидаз и антиоксидантных ферментов в нормальной и трансгенных клеточных линиях. Показано, что в *AtCPK1*-трансгенных клетках окислительный взрыв регулируется как на стадии генерации активных форм кислорода, так и на стадии детоксификации, приводя к снижению порога чувствительности трансгенных клеток к стрессовым воздействиям.*

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫЕ ПРОТЕИНКИНАЗЫ, ТЕМПЕРАТУРНЫЙ СТРЕСС, МАРЕНА СЕРДЦЕЛИСТНАЯ, КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ РАСТЕНИЙ

UDC 576.3/7.086.83:58+УДК 573.6.086.83:577.21

Pinkus S.A., leading engineer of laboratory of biotechnology;  
Veremeichik G.N., senior researcher of laboratory of bioengineering;  
Shkryl Y.N., leading researcher of laboratory of bioengineering,  
IBSS FEB RAS

**INFLUENCE OF ARABIDOPSIS CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE  
*ATCPK1* GENE OVEREXPRESSION ON RESISTANCE OF *RUBIA CORDIFOLIA*  
TRANSGENIC CELLS TO TEMPERATURE STRESSES**

*The aim of this work was to study the influence of *AtCPK1* gene overexpression on resistance of the madder cells to temperature stresses. To identify the molecular mechanism of transgene action we investigated NADPH oxidase and antioxidant enzymes genes expression in normal and transgenic cell lines. It is shown that in *AtCPK1*-transgenic cells oxidative burst is modulated at both stages - generation of reactive oxygen species and their detoxification, leading to reduction in the sensitivity of transgenic cells to stresses.*

KEYWORDS: CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE, TEMPERATURE STRESS, *RUBIA CORDIFOLIA*, PLANT CELL CULTURES

Кальциевая сигнальная система является центральным механизмом регулирования ответов организма на абиотические стимулы [1,4]. В настоящее время известно несколько групп белков, ответственных за восприятие и передачу кальциевого сигнала в клетках растений, из которых наибольшее внимание исследо-

вателей привлекает семейство  $Ca^{2+}$ -зависимых протеинкиназ — CDPK (calcium-dependent protein kinase), CDPKs — наиболее распространенные протеинкиназы, специфичные для растений и некоторых простейших [3].

Участие кислорода в норме во всех дыхательных процессах и производство

его в процессе фотосинтеза приводит к накоплению супероксидов, перекиси водорода, гидроксильных радикалов и иных свободных радикалов, которые реагируют с ДНК, белками и липидами, приводя к их повреждению. Это явление описано как окислительный стресс, отражающий активацию НАДФН-оксидаз [6,7,11]. В растениях эти ферменты названы гомологами оксидаз респираторного взрыва — Rboh (respiratory burst oxidase homologs). Основной ферментативной функцией Rboh является окисление НАДФН, сопровождающееся генерацией супероксидрадикала — свободного радикала кислорода, наиболее агрессивной формы активного кислорода [8].

Процесс детоксификации АФК в растениях включает в себя повышение экспрессии генов, кодирующих антиоксидантные ферменты, таких как супероксиддисмутаза — SOD (superoxide dismutase), аскорбатпероксидаза — Аpx (ascorbate peroxidase), каталаза — CAT (catalase), глутатионпероксидазы и другие. В процессе жизнедеятельности растений эти защитные механизмы играют важную роль в устойчивости к экологическим стрессам, их важной особенностью является то, что их активность увеличивается, когда клетки попадают в условия повышенного производства свободных радикалов [8].

Изоформа 1 арабидопсиса — *AtCPK1* опосредует передачу сигнала клетки в ответ на такие стрессовые воздействия как холод и засоление, а так же участвует в восприятии сигнала абсцизовой кислоты и реакции свет/темнота. Нативный *AtCPK1* локализуется в мембранах пероксисом [4] и способен значительно повышать активность мембраносвязанной НАДФН-оксидазы за счет фосфорилирования в присутствии ионов  $Ca^{2+}$  [4,10].

Основной целью представленной работы является исследование влияния сверхэкспрессии мутантной постоянно активной изоформы гена *AtCPK1-Ca* на устойчивость трансгенных клеток марены сердцелистной к температурным стрессам.

## **Материалы и методы** **Клеточные культуры**

В работе использовали нетрансформированную и трансгенные каллусные культуры марены сердцелистной *Rubiacordifolia* L. (Rubiaceae), полученные и описанные ранее [9]. Трансгенные культуры экспрессировали изоформы гена кальций-зависимой протеинкиназы арабидопсиса *AtCPK1*, неактивную (Na) и постоянно активную (Ca), полученные в результате точечных мутаций в автоингибиторном домене белка [5]. Нетрансформированная культура, обозначенная в работе символом R, а также культура, трансформированная неактивной формой *AtCPK1* (R-Na), использовались в качестве контрольных для культуры, экспрессирующей постоянно активную форму *AtCPK1* (R-Ca).

### **Анализ экспрессии генов**

Выделение тотальной клеточной РНК и синтез первой цепи кДНК проводили согласно описанной ранее методике [9].

Анализ экспрессии генов НАДФН-оксидаз марены (*RcRboh1*, *RcRboh3*) и генов ферментов детоксификации активных форм кислорода - супероксиддисмутаза (*RcCSD1*, *RcCSD2*, *RcCSD3*), аскорбатпероксидаз (*RcApx1*, *RcApx2*, *RcApx3*) и каталазы (*RcCAT1*) проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с использованием реакционной смеси, предназначенной для проведения ПЦР с интеркалирующим красителем SYBR Green I в присутствии пассивного референсного красителя ROX (Синтол, Москва, Россия) на приборе CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) как описано ранее [2].

### **Статистический анализ**

Результаты всех экспериментов были обработаны при помощи программы Statistica, версия 6.0. Все данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка. Достоверность оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Уровень значимости в 0,05 был выбран как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах.

## Результаты

Для выявления влияния сверхэкспрессии мутантной постоянно активной изоформы гена *AtCPK1-Ca* на устойчивость к температурным стрессовым воздействиям нормальная и трансгенные клеточные линии были подвержены воздействию низкой (12°C) и высокой (28°C)

температур (рис. 1). Данные значения были выбраны как пороговые для контрольной клеточной линии — экспериментально было показано, что при воздействии более низких и более высоких температур контрольная культура погибала.

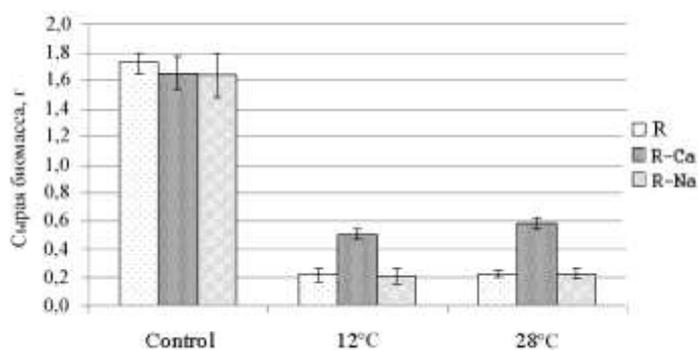


Рис. 1. Влияние температурного стресса на рост клеточных культур марены сердцелистной

Показано, что сверхэкспрессия мутантной постоянно активной изоформы гена *AtCPK1-Ca* приводит к 2-х кратному увеличению устойчивости к температурным стрессовым воздействиям — как к понижению, так и к повышению температуры.

Для выявления молекулярного механизма устойчивости *R-Ca* культуры к температурным стрессам нами была ис-

следована экспрессия генов НАДФН-оксидаз марены — *RcRboh1* (стресс-индуцируемая изоформа) и *RcRboh3* (постоянно-экспрессируемая изоформа). Методом ПЦР в реальном времени мы провели анализ экспрессии генов *RcRboh1* и *RcRboh3* в нормальной и трансгенных клеточных линиях в экспоненциальной (20 дней) и стационарной (30 дней) фазах роста (рис. 2).

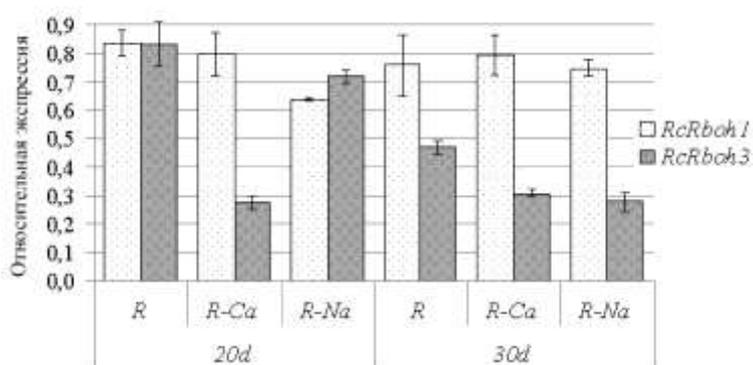


Рис. 2. Экспрессия генов НАДФН-оксидаз в клеточных культурах марены сердцелистной на 20-й и 30-й дни культивирования

Сверхэкспрессия *AtCPK1-Ca* привела к 3-х кратному снижению уровня экспрессии *RcRboh3* в экспоненциальной фазе роста и дальнейшему снижению при последующем культивировании. Сверхэкспрессия *AtCPK1-Na* также оказывала

влияние на экспрессию *RcRboh3*, снижая ее в логарифмической фазе роста трансгенных клеточных линий. Экспрессия *RcRboh1* под действием *AtCPK1-Ca* и *AtCPK1-Na* статистически не изменялась. При этом отмечено, в экспоненциальной

фазе роста уровень экспрессии *RcRboh3* в культуре R-Ca был в 3 раза ниже, чем в культуре R, а в стационарной фазе роста эта разница составляла всего 1,7 раз.

Для выявления изменений в экспрессии генов супероксиддисмутазы, аскорбатпероксидазы и каталазы марены выполнен анализ экспрессии генов *RcCSD1*, *RcCSD2*, *RcCSD3*, *RcApx1*, *RcApx2*, *RcApx3* и *RcCAT* в нормальной и трансгенных клеточных линиях в экспоненциальной (20 дней) и стационарной (30 дней) фазах роста.

В нормальных и трансгенных культурах *CSD1*, *CSD2*, *CSD3* экспрессированы с различной интенсивностью (рис. 3). *AtCPK1-Ca* в экспоненциальной фазе роста клеточных линий незначительно повышал экспрессию *CSD1* и оказывал влияние на экспрессию *CSD3*, приводя к 2-х кратному увеличению. В *AtCPK1-Na*- и *AtCPK1-Ca*-

трансформированных культурах к 20 дням культивирования наблюдали 2-х кратное увеличение экспрессии *CSD3*. К 30 дням культивирования *AtCPK1-Ca* и *AtCPK1-Na* не оказывали статистически значимого влияния на экспрессию *CSD2*, *CSD3*, лишь незначительно снижая экспрессию *CSD1*.

В нормальных культурах уровень экспрессии *Apx1*, *Apx2*, *Apx3* снижается со временем культивирования (рис. 4). *AtCPK1-Ca* приводил к 2-х и 2,5-кратному повышению экспрессии *Apx2*, и 5-ти и 3-х кратному повышению *Apx3* в экспоненциальной и стационарной фазах роста соответственно. *AtCPK1-Na* оказывал влияние на экспрессию *Apx3*, приводя к 2-х кратному увеличению в стационарной фазе роста и 2,5-кратному увеличению экспрессии *Apx2*, а также незначительно снижая экспрессию *Apx1* в экспоненциальной фазе роста клеточной линии.

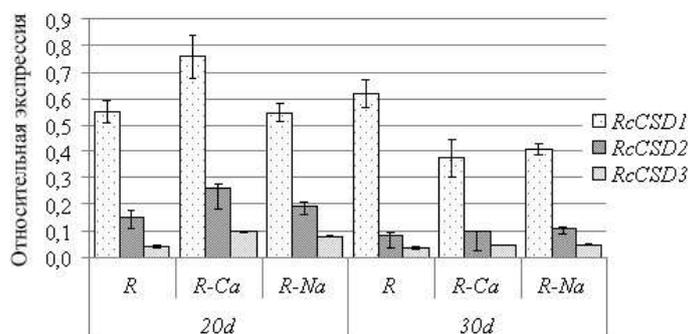


Рис. 3. Экспрессия генов супероксиддисмутаз в клеточных культурах марены на 20-й и 30-й дни культивирования.

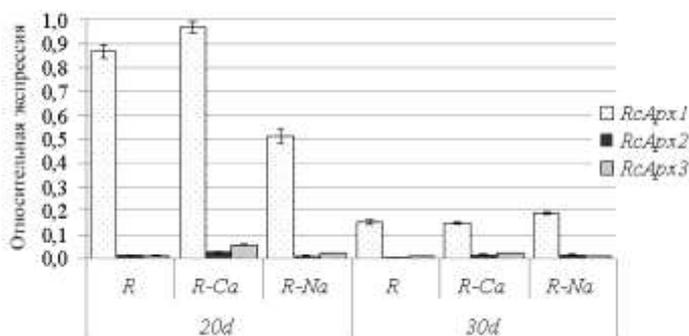


Рис. 4. Экспрессия генов аскорбатпероксидаз в клеточных культурах марены на 20-й и 30-й дни культивирования.

Уровень экспрессии *CAT* в нормальных клеточных линиях марены снижается со временем культивирования (рис. 5). В культурах, трансформированных *AtCPK1-Ca* и *AtCPK1-Na* экспрессия *CAT*

в экспоненциальной фазе роста незначительно снижена, к 30 дням культивирования незначительно повышается в культурах, трансформированных *AtCPK1-Na*.

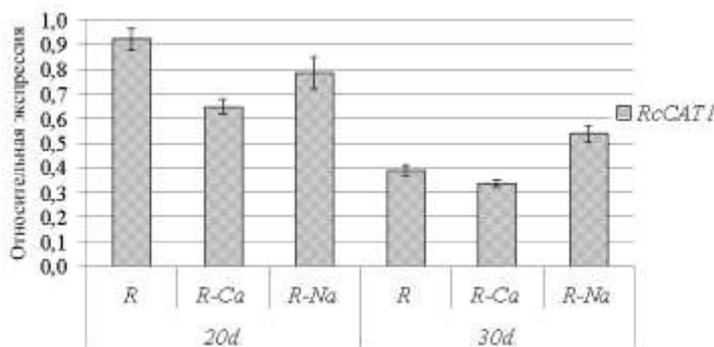


Рис. 5. Экспрессия гена каталазы в клеточных культурах марены на 20-й и 30-й дни культивирования.

### Заключение

Таким образом, в трансгенных клеточных линиях отмечено повышение экспрессии генов антиоксидантных ферментов в экспоненциальной фазе роста, что соответствует снижению экспрессии *RcRboh3*. Мы показали, что в культуре R-Ca окислительный взрыв регулируется как на стадии генерации АФК, так и на стадии детоксификации. Это приводит к снижению порога чувствительности трансгенных клеток к стрессовым воздействиям, которые в норме сопровождаются губительным для клеток окислительным взрывом.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bohmer, M. A chemical-genetic approach to elucidate protein kinase function in planta. / M. Bohmer, T. Romeis // *Plant Molecular Biology* - 2007. - N 6. - P. 817.
2. Bulgakov, V.P. Recent advances in the understanding of *Agrobacterium rhizogenes*-derived genes and their effects on stress resistance and plant metabolism / Bulgakov, V.P., Shkryl, Y.N., Veremeichik, G.N., Gorpenchenko, T.Y., Vereshchagina, Y.V. // *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* - 2013. N 1. - P. 1-22.
3. Cheng, S.H. Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family / S.H. Cheng, M.R. Willmann, H.C. Chen, J. Sheen // *Plant Physiology* - 2002. - N 2. - P. 469.
4. Dammann, C. Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from *Arabidopsis* / C. Dammann, A. Ichida, B. Hong, S.M.

Romanowsky, E.M. Hrabak, A.C. Harmon, B.G. Pickard, J.F. Harper // *Plant Physiology* - 2003. - N 4. - P. 1840.

5. Harper, J.F. Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain / J.F. Harper, J.F. Huang, S.J. Lloyd // *Biochemistry* - 1994. - N 23. - P. 7267.

6. Kobayashi, M. Subcellular localization of *Strboh* proteins and NADPH-dependent O<sub>2</sub>-generating activity in potato tuber tissues / M. Kobayashi, K. Kawakita, M. Maeshima, N. Doke, H. Yoshioka // *Journal of Experimental Botany* - 2014. - N 6. - P. 1373.

7. Price, A.H. Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium / A.H. Price, A. Taylor, S.J. Ripley, A. Griffiths, A.J. Trewavas, M.R. Knight // *The Plant Cell* - 2014. - N 9. - P. 1301.

8. Sagi, M. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases / M. Sagi, R. Fluhr // *Plant Physiology* - 2006. - N 2. - P. 336.

9. Shkryl, Y.N. Induction of anthraquinone biosynthesis in *Rubiocordifolia* cells by heterologous expression of a calcium-dependent protein kinase gene / Shkryl, Y.N., Veremeichik, G.N., Bulgakov, V.P., Zhuravlev, Y.N. // *Biotechnology Bioengineering* - 2011. N 7. - P. 1734-1738.

10. Xing, T. Ectopic expression of an *Arabidopsis* calmodulin-like domain protein kinase-enhanced NADPH oxidase activity and oxidative burst in tomato protoplasts / T. Xing, X.J. Wang, K. Malik, B.L. Miki // *Molecular Plant-Microbe Interactions* - 2001. - N 10. - P. 1261.

11. Yoshioka, H. Induction of plant gp91 phox homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato / H. Yoshioka, K. Sugie, H.J. Park, H. Maeda, N. Tsuda, K. Kawakita, N. Doke // *Molecular Plant-Microbe Interactions* - 2001. - N 6. - P. 725.