

АКТИВАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ МОДЕЛЬНОГО ГЕНА GFP У КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНТЕТИЧЕСКИХ ФЛАВОНОИДОВ

О.В. Чубукова, З.Р. Вершинина, Р.Т. Матниязов, Ал. Х. Баймиев

Уфимский федеральный исследовательский центр РАН, Уфа, Россия

Биологическая азотфиксация является природным процессом чрезвычайной важности. Наибольший вклад в него вносит симбиоз, образованный бобовыми растениями и почвенными граммотрицательными клубеньковыми бактериями с общим названием ризобии (Andrews, 2017). Также ранее было показано, что ризобии могут выступать в качестве PGPR (plant growth promoting rhizobacteria), вступая в ассоциативные взаимодействия с небобовыми растениями, такими как томат, пшеница и др., улучшая рост последних за счет различных механизмов (Mehboob et al., 2012).

В настоящее время ризобии нашли широкое применение в качестве биоудобрений в сельском хозяйстве. Эффективность этих бактерий зависит в большой степени от способности используемых «производственных» штаммов выдерживать конкурентную борьбу за экологическую нишу с местными ризосферными бактериями. Одним из способов повышения выживаемости вносимых полезных бактерий может быть использование регулируемого включения целевых генов, экспрессия которых индуцируется корневыми выделениями растений. Нами предлагается использование механизма регуляции экспрессии *pod* генов ризобий.

На предварительном этапе формирования бобово-ризобияльного симбиоза происходит накопление клубеньковых бактерий в ризосфере растения за счет хемотаксиса ризобий на флавоноиды, содержащиеся в корневых выделениях растений (Liu, Murray, 2016). Флавоноиды взаимодействуют с белком NodD на поверхности клубеньковых бактерий, продуктом единственного конститутивно экспрессирующегося *pod*-гена, вследствие чего происходит активация транскрипции остальных *pod*-генов, отвечающих за синтез Nod-факторов (Тихонович, Проворов, 2009). Также оказалось, что *podD* ризобий проявляет себя как ген хозяйской специфичности, поскольку одни и те же флавоноиды с разной эффективностью индуцируют *podD* различных видов ризобий. (Suominen et al., 2003). Nod-гены в геномах клубеньковых бактерий расположены компактно под общим промотором в виде «*pod*-box». У *Rhizobium leguminosarum* и *Rhizobium galegae* гены *nodD* имеют соседнее расположение с участками «*pod*-box» и при этом имеют разное направление кодирования (Suominen, 2001). Подобное расположение целевых генов позволяет клонировать их в одном фрагменте ДНК.

Цель работы – получение индуцируемых флавоноидами генно-инженерных конструкций широкого круга хозяев, которые позволяют клонировать целевые гены под контролем промотора NodA гена вместе с геном *nodD* *R.leguminosarum* bv *viciae* и *R. galegae*.

Для создания генно-инженерных конструкций использовали вектор pTurboGFP-b («Евроген», Россия) и вектор широкого круга хозяев pJN105 («Addgene», США). Для получения генно-инженерных конструкций были использованы методы молекулярного клонирования. Полученные плазмиды проверяли методом ПЦР, секвенированием ДНК.

Нами были амплифицированы высокоточной Pfu-полимеразой фрагменты ДНК *R. leguminosarum* bv *trifoli* и *R. galegae*, содержащие полноразмерную последовательность гена *nodD* и промоторный участок «*pod*-box» с помощью праймеров, в состав которых были введены сайты рестрикции BglII. Дополнительно в состав заднего праймера был введен ATG кодон и в рамке считывания после него сайт SmaI. Размер амплифицированного продукта составил 1608 и 1432 п. н., соответственно. Далее под промотор «*pod*-box» был клонирован репортерный ген зеленого флуоресцентного белка TurboGFP. Для этого амплификат был порезан рестриктазой BglII и клонирован по сайту BamHI в векторе pTurboGFP. Фрагмент, включающий *nodD*+промотор «*pod*-box»+TurboGFP, из конструкции pTurboNodDGFP был переклонирован по сайтам рестрикции XhoI и DraI в плазмиду широкого круга хозяев pJN105.

Таким образом, нами были получены генно-инженерные конструкции pJNNodDGFP1 и pJNNodDGFP2, которые содержат гены NodD *R.leguminosarum* bv. *trifoli* и *R. galegae* соответственно, с собственным промотором и GFP, под управлением промотора гена *nodA*. Данные плазмиды были трансформированы в штаммы ризобий *R. galegae* CIAM 0702 и *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

Далее планируется исследовать условия активации экспрессии целевого гена GFP в рекомбинантных штаммах ризобий с использованием синтетических флавоноидов. После подбора условий успешной активации экспрессии в дальнейшем под регуляцию промотора *pod*-box нами предполагается встраивать кодирующие последовательности других целевых генов.

Использование данных векторных конструкций с GFP позволит визуально оценивать эффективность работы и подбирать оптимальные условия активации регуляторной системы при разных условиях существования трансгенных микроорганизмов: в свободноживущем состоянии, при культивировании на питательных средах с добавлением экссудатов корней различных растений, при взаимодействии трансгенных бактерий с поверхностями корней бобовых и небобовых растений.

Работа была выполнена в рамках госзадания (тема № АААА-А16-116020350028-4) при финансовой поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований № 18-34-00033 мол_а, № 18-34-20004 мол_а_вед.

ЛИТЕРАТУРА

1. Andrews M., et al. Specificity in legume-rhizobia symbioses // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. 18(4): 705. doi:10.3390/ijms18040705.
2. Mehboob I., Naveed M., Zahir A.Z. Ashraf M. Potential of Rhizobia for Sustainable Production of Non-legumes // *Crop Production for Agricultural Improvement*. Springer Netherlands. 2012. P.659–704.
3. C. Liu, J.D. Murray. The Role of flavonoids in Nodulation Host-Range Specificity: An Update // *Plants (Basel)*. 2016. 5(3):33. doi: 10.3390/plants5030033.
4. Тихонович, И.А., Проворов, Н.А. (2009). Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего. Издательство Санкт-Петербургского университета. С. 209.
5. Suominen L. et al. Activation of the nodA promoter by the nodD genes of *Rhizobium galegae* induced by synthetic flavonoids or *Galega orientalis* root exudate // *FEMS Microbiol. Lett.* 2003. V. 219(2). P. 225–232.
6. Suominen L., Roos C., Lortet G., Paulin L., Lindström K. Identification and structure of the *Rhizobium galegae* common nodulation genes: evidence for horizontal gene transfer // *Mol. Biol. Evol.* 2001. V. 18(6). P. 907–916..

УДК 57.577

ДЕТЕКЦИЯ ПРОМУТАГЕННЫХ ДЕЗАМИНАЗ СЕМЕЙСТВА AID/АРОВЕС В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ

Е.С. Шилов, А.А. Власова, О.Н. Шилова

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Цитидин-дезаминазы семейства AID/АРОВЕС являются ключевыми участниками процессов индуцированного мутагенеза и редактирования РНК. Их повышенная активность свойственна клеткам многих опухолей и является одним из механизмов геномной нестабильности. В данной работе был определен уровень экспрессии генов цитидин-дезаминаз AID/АРОВЕС человека в трех клеточных линиях В-лимфобластного происхождения: IM-9 (CCL-159), Daudi (CCL-213) RPMI 8226 (CCL-155). IM-9 по своему происхождению представляют собой клетки множественной миеломы, трансформированные вирусом EBV, Daudi ведут происхождение от лимфомы Бёркита, RPMI являются производными плазмацитомы, в качестве контроля специфичности экспрессии дополнительно использовали линию HeLa (производная рака шейки матки). В работе анализировался уровень экспрессии характерной для активированных В-лимфоцитов дезаминазы AID (ключевой фермент в процессах переключения изотипа антител и соматического мутагенеза, кодируется геном *Aicda*), а также АРОВЕС1, АРОВЕС2 и АРОВЕС3 (восемь паралогов, обозначаются буквами от А до Н).

Было показано, что в ряду RPMI 8226 – Daudi – IM-9 уровень экспрессии AID при каждом переходе повышается примерно на порядок, в клетках HeLa экспрессия AID отсутствует. Экспрессия АРОВЕС1 и АРОВЕС2 отсутствует во всех проанализированных клеточных линиях, а экспрессия АРОВЕС3 несколько варьирует в зависимости от паралога и клеточной линии, но в целом демонстрирует стабильный паттерн – преобладание паралогов 3С, 3D и 3G. Специфической для линии Daudi была экспрессия АРОВЕС 3F, а для линии IM-9 – соответственно АРОВЕС 3Н, линии RPMI 8226 и HeLa других АРОВЕС3-дезаминаз помимо 3С, 3D и 3G не экспрессировали. При этом экспрессия дезаминаз в клетках лимфоидных линий являлась конститутивной и не зависела от сигналов активации через рецепторы врожденного иммунитета – активация клеток при помощи липополисахарида, полного адьюванта Фрейнда и тотального лизата кишечной палочки не приводила к принципиальным изменениям паттерна экспрессии.

В работе показано, что исходный характерный для В-лимфоцитов паттерн экспрессии дезаминаз AID/АРОВЕС сохраняется в клеточных линиях, однако уровень экспрессии AID в разных лимфобластоидных линиях может значительно варьировать, влияя на их нестабильность генома.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-34-51014