

На правах рукописи



ТУРЛЕНКО АННА ВЛАДИМИРОВНА

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ ПРОТЕИНАЗ В
ПРОЦЕССЕ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА ЖЕНЬШЕНЯ**
Panax ginseng С.А. MEYER

Специальность: 03.01.06 – биотехнология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток, 2011

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии Учреждения
Российской академии наук Биолого-почвенного института Дальневосточного
отделения РАН

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
Киселев Константин Вадимович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
доцент
Брыков Владимир Алексеевич
доктор биологических наук,
ст.н.с.
Максимов Игорь Владимирович

Ведущая организация: Учреждение Российской академии
наук Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва

Защита состоится «29» июня 2011 г. в «10» часов на заседании
диссертационного совета ДМ 005.003.04 при Биолого-почвенном институте
ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку,
159.

факс: (4232) 310-193

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке
ДВО РАН.

Автореферат разослан «23» мая 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Музарок Т. И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Женьшень настоящий *Panax ginseng* С.А. Меуер на сегодняшний день является одним из наиболее известных и ценных лекарственных растений, вследствие чего его природные запасы подвергаются чрезмерной эксплуатации. Современный ареал женьшеня значительно сократился, природные популяции сохранились, вероятнее всего, только на территории российского Приморья. Вид занесен в Красную книгу Приморского края со статусом "на грани исчезновения". Решить проблему с источником сырья может помочь биотехнологический способ получения растений женьшеня, в основе которого лежит процесс образования соматических эмбрионов.

Соматический эмбриогенез у растений зависит от большого числа внешних и внутренних факторов. Например, на данный момент известно более сотни генов, экспрессия которых влияет на соматический эмбриогенез (Karami et al., 2009). Стало понятно, что данное множество факторов, приводящее в итоге к формированию соматических эмбрионов, должно регулироваться единым механизмом. Поэтому изучение регуляции соматического эмбриогенеза редких и исчезающих видов важно для биотехнологии.

Известно, что в сложной сети передачи информации ионы кальция служат универсальным посредником, поскольку ни один вторичный посредник не участвует в столь большом количестве процессов в клетке, как свободный Ca^{2+} цитозоля. Главными сенсорами кальция в клетках растений являются кальций-зависимые протеинкиназы (CDPK), которые принадлежат к эукариотическим протеинкиназам, катализирующим обратимый перенос фосфата с АТФ на боковые цепи аминокислотных остатков в составе белка. Реакции фосфорилирования/дефосфорилирования оказывают значительное воздействие на активность белков и их взаимодействие с другими белками. Предполагается, что у растений большая часть киназной активности, которая стимулируется кальцием, связана именно с CDPK.

Ранее было показано, что кальциевая сигнальная система вовлечена в регуляцию соматического эмбриогенеза (Anil, Rao, 2000), но оставалось непонятным, как эта система может регулировать сразу так много процессов. Полногеномное секвенирование двух таксономически далеких видов растений *Oryza sativa* (однодольные) и *Arabidopsis thaliana* (двудольные) показало, что они содержат 27 и 34 генов CDPK, соответственно (Cheng et al., 2002; Asano et al., 2005). По-видимому, это может свидетельствовать о выполнении разными CDPK различных функций. Постоянно пополняемый список белков-мишеней CDPK включает мембранные транспортные белки (H^+ -АТФазу плазмалеммы, калиевые и анионные каналы замыкающих клеток устьиц, аквапорины и др.), факторы транскрипции, ферменты (сахарозофосфатсинтаза, нитратредуктаза, фенилаланин-аммиаклиаза), белки цитоскелета и другие мишени. Таким образом, CDPK вовлечены в передачу Ca^{2+} -сигнала, связанного с поддержанием мембранного потенциала, регуляцией углеводного и азотного

обменов, движениями устьиц, ответом на стрессовые воздействия, формированием архитектуры клетки, эмбриогенезом и т.д.

Цель и задачи исследования. Целью работы является изучение экспрессии кальций-зависимых протеинкиназ в процессе соматического эмбриогенеза в интактных растениях и клеточных линиях женьшеня настоящего *P. ginseng*.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Подтвердить с помощью анализа экспрессии генов-маркеров эмбриогенеза: генов гомеобокс-содержащих транскрипционных факторов *WUSCHEL* (*WUS*), что в *rolC*-трансгенной линии 2с3 *P. ginseng* при длительном культивировании образуются соматические эмбрионы.

2. Исследовать влияние ингибиторов кальциевых каналов, протеинкиназ и ионофора А23187 на развитие соматических эмбрионов в клеточных линиях женьшеня.

3. Получить нуклеотидные последовательности частей генов *CDPK P. ginseng* и изучить экспрессию этих генов в разных клеточных линиях женьшеня. Создать базу наиболее часто встречаемых генов *CDPK* и изучить экспрессию генов *CDPK* на разных стадиях развития соматических эмбрионов в клеточной линии 2с3 женьшеня.

4. Получить полные последовательности комплементарной ДНК (кДНК) генов *CDPK* женьшеня; сделать детальный анализ экспрессии каждого гена *CDPK*; определить возможные функции белковых продуктов наиболее важных генов *CDPK*.

Научная новизна. Впервые изучена экспрессия генов *CDPK* в клеточных линиях женьшеня с разным уровнем морфо-анатомического развития. Показано, что при развитии соматических эмбрионов в *rolC*-трансгенной клеточной линии женьшеня появляются транскрипты *CDPK* с инсерциями и делециями в последовательности Ser/Thr-киназного домена. Впервые получена полная последовательность белка кодирующей части кДНК первого гена *CDPK* женьшеня *PgCDPK1a* и изучена его детальная экспрессия. Показано, что существует положительная корреляция между экспрессией *PgCDPK1a* и приростом биомассы клеток *P. ginseng*. Возможно, *PgCDPK1a* является позитивным регулятором клеточного роста женьшеня.

Практическая значимость работы. Получена информация о нуклеотидных последовательностях киназного домена основных представителей генов *CDPK* женьшеня, которую можно в дальнейшем использовать в молекулярных и физиологических исследованиях, т.к. CDPK являются основными сенсорами цитоплазматического кальция, а кальций вовлечен в регуляцию практически всех процессов, протекающих в клетке. Информация о полной последовательности генов *CDPK* может быть основой для проведения экспериментов по сверхэкспрессии генов *CDPK* и получению клеточных линий или растений с повышенными характеристиками устойчивости к стрессам или содержанию гингенозидов.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на IX Международной конференции "Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология" (Звенигород, 2008); XI Всероссийской молодежной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2009); 4-й Международной конференции польского сообщества экспериментальной растительной биологии (Краков, 2009); VIII Региональной конференции студентов, аспирантов вузов и научных организаций Дальнего Востока России (Владивосток, 2009); XII Всероссийской молодежной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2010); IX Региональной конференции студентов, аспирантов вузов и научных организаций Дальнего Востока России (Владивосток, 2010).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых международных журналах.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 117 страницах печатного текста, иллюстрирована 19 рисунками и содержит 7 таблиц. Список литературы насчитывает 204 наименования. Данная работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (06-04-48149-а), ДВО РАН, гранта по Программе «Научная школа России» (04-А-06-047), гранта Министерства науки и Образования РФ (А03-2.12-524).

Благодарности. Автор искренне благодарит своего научного руководителя к.б.н. Киселева К.В. за всестороннюю поддержку и помощь в освоении экспериментальных методов и ценные консультации на всех этапах работы; академика РАН Журавлева Ю.Н. за всестороннюю помощь и поддержку; Грищенко О.В. и Чернодод Г.К. за помощь в работе с культурами клеток растений; к.б.н. Горпенченко Т.Ю. за консультации в области морфологии и анатомии клеточных культур; к.б.н. Музарок Т.И. за помощь в поддержании коллекции растений женьшеня; к.б.н. Атопкина Д.М. за помощь в проведении молекулярно-генетических исследований; к.б.н. Козыренко М.М. за помощь и советы при написании диссертации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растения и клеточные линии женьшеня P. ginseng.

В работе использованы листья и корни 2- и 3-летних растений из коллекционного питомника с искусственным затенением, собранные в июле–сентябре 1993–2009 гг. в природных популяциях Приморского края, и дикорастущие растения, собранные в неохраямой Сихотэ-Алинской популяции.

Клеточные линии *P. ginseng* из коллекции лаборатории биотехнологии БПИ ДВО РАН: каллусная культура женьшеня 1с полученная в 1988 г. из стебля растения *P. ginseng* (Булгаков и др., 1991); трансгенная клеточная линия GV, не содержащая ген *rolC*; *rolC*-трансгенные линии 2сR2, 2с2 и эмбриональная линия 2с3, полученные в 1993-2004 гг. (Gorpenchenko et al., 2006). Клеточные

линии выращивали на твердой среде W_{4CPA} (Bulgakov et al., 1998). Эмбриональная линия 2с3 представляет собой гетерогенный каллус, образованный из нескольких клеточных агрегатов, обладающих разной степенью дифференциации. Каллус был механически разделен на 3 группы клеток: 1) 2с3-DD – рыхлый недифференцированный каллус, который представлен мелкими меристематическими клетками; 2) 2с3-ES – соматические эмбрионы на ранних стадиях развития: глобулярная, сердцевидная и торпедовидная стадии; 3) 2с3-LS – соматический эмбриогенез на поздних стадиях развития. Обычно соматический эмбриогенез в линии 2с3 не достигает поздних стадий в условиях культивирования на среде W_{4CPA} , при перенесении на иницирующую среду (Chang, Hsing, 1980) и в присутствии белого света нам удалось получить поздние стадии эмбриогенеза.

Обработка ингибиторами и ионофором A23187. Ингибиторы и ионофор получены из ICN Biomedicals. Ингибиторы кальциевых каналов добавляли в питательные среды до автоклавирования и измерения pH среды, а ионофор и ингибиторы протеинкиназ добавляли после автоклавирования.

Обратно-транскрипционная ПЦР (ОТ-ПЦР) и секвенирование ДНК. Тотальную РНК экстрагировали из клеточных линий на 30-35 день культивирования при помощи метода с использованием LiCl (Bekesiova et al., 1999). кДНК получали, используя 1-3 мкг тотальной РНК (предварительно обработав ДНКазой), с помощью набора для обратной транскрипции (Силекс, Россия). Реакцию проводили при 37°C в течении 1-2 часов. На основе известных аминокислотных последовательностей CDPK растений (номера доступа в GenBank D21805, AF363784, AF072908, D21806, AJ344154, AJ344155, AB042550, D84408) подобраны вырожденные праймеры 5'-GTKCAYYTWGKATGGAR и 5'-TTCKGCCCAAADGGWGG к консервативным участкам серин-треонин киназного домена. На основе известных аминокислотных последовательностей WUS растений (AJ012310, AJ538329, AF481951) к гомеобоксу были подобраны вырожденные праймеры: 5'-AARGAACTYТАCTACAACAATG и 5'-CTCTTCTTCTGTCTYTCACGRGC. Температура отжига праймеров 53°C к генам *CDPK* и *WUS* позволяет получать сигнал в области 390 и 150 п.н., соответственно, без дополнительных сигналов.

Секвенирование продуктов ОТ-ПЦР генов *PgActin1*, *rolC*, *WUS* и *CDPK* проводили с использованием набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer Biosystems, Foster City, CA) по методике производителя. Секвенирование осуществляли на секвенаторе ABI 3130 Genetic Analyser (Perkin-Elmer Biosystems) на базе БПИ ДВО РАН. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с известными последовательностями этих генов в программе NCBI BLAST. Выравнивание участков *WUS* и *CDPK* проводили в программе BioEdit 7.0.8. Секвенированные фрагменты генов *Actin1*, *WUS* и *CDPK* депонированы в GeneBank, номера доступа даны в скобках: *PgActin1* (AY907207), *PgWUSI-1* (EU293843), *PgWUSI-2* (EU293844), *PgWUSI-3* (EU293845), *PgWUSI-7* (EU939528), *PgWUSII-6* (EU939529), *PgWUSII-3-6* (EU939530), *PgWUSII-5*

(EU939527), *PgWUSII-8* (EU939531), *PgCDPK1a* (DQ421785), *PgCDPK1b* (EF546429), *PgCDPK1c* (EF621917), *PgCDPK2a* (DQ422856), *PgCDPK2b* (EF541125), *PgCDPK2c* (EF600555), *PgCDPK3a* (DQ422857), *PgCDPK3b* (DQ981494), *PgCDPK4a* (EU043518), *PgCDPK1d* (EU378948), *PgCDPK2d* (EU073200), *PgCDPK3L* (EU672431).

Анализ экспрессии генов WUS и CDPK на основе ОТ-ПЦР. Для получения данных по суммарной экспрессии генов *CDPK* и *WUS* ПЦР-продукты после ОТ-ПЦР нормализовали с ПЦР-продуктами гена актина *P. ginseng* по ранее описанной методике (Kiselev et al., 2006). Для сравнения экспрессии генов *Actin1*, *WUS* и *CDPK* в разных линиях использовали технологию микрочипов с DNA 1000 LabChip®kit на Agilent 2100 Bioanalyzer (Германия), как описано ранее (Киселев и др., 2008). Далее ампликоны *CDPK* и *WUS* были выделены из геля при помощи набора Glass Milk (Силекс, Россия), клонированы в вектор pTZ57R/T согласно протоколу фирмы-производителя (Fermentas, Литва) и секвенированы, как описано ранее (Kiselev et al., 2006). Экспрессию отдельных генов семейств *WUS* и *CDPK* оценивали количественно, основываясь на данных о частоте встречаемости отдельных клонов каждого транскрипта в исследуемых пробах, полученных с помощью секвенирования, и данных о суммарной экспрессии генов (Kiselev, Dubrovina, 2010).

Условия проведения ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Для генов *rolC* и *CDPK* ПЦР-РВ была выполнена согласно методике, описанной Гиулиетти с соавторами (Giulietti et al., 2001). Геноспецифичные пары праймеров и TaqMan пробы представлены ранее (Kiselev et al., 2010). кДНК амплифицировали с помощью Real-time PCR Kit (Синтол, Россия), используя iCyler амплификатор с оптическим блоком iQ5 для ПЦР-РВ (Bio-Rad Laboratories, США). Данные анализировали при помощи программного обеспечения Optical system software v.2.0. Праймеры и зонды синтезировали по рекомендациям фирмы Синтол. Обработку результатов проводили при помощи программного обеспечения Optical system software v.2.0, как описано ранее (Dubrovina et al., 2010). ПЦР-РВ проводили с использованием набора реактивов фирмы Синтол (Россия).

Статистический анализ полученных результатов. Результаты были обработаны при помощи программы Statistica 9.0. Все данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка измерений. Значимость полученных данных оценивалась по спаренному критерию Стьюдента. Уровень значимости в 0.05 был выбран как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфология клеток и экспрессия гена rolC в клеточных линиях женьшеня. Ранее было показано, что ген *rolC* экспрессируется в полученных линиях женьшеня на разном уровне (Gorpenchenko et al., 2006). Сильная экспрессия гена выявлена в корнях, средняя – в эмбрионах линии 2с3. Слабая экспрессия гена *rolC* не приводила к значительным морфо-анатомическим изменениям, тогда как сильная экспрессия гена *rolC*, в 8-9 раз большая, чем в линиях

женьшеня с низким уровнем экспрессии *rolC* (2с2), вызывала ризогенный эффект. Из клеток корней получена линия 2сR2, в которой тоже наблюдается высокий уровень экспрессии *rolC*. В этой линии мало дифференцированных структур, но сохраняется способность формировать корни. В линии 2с2, обладающей низкой экспрессией *rolC*, клетки характеризуются хорошим ростом и гомогенной консистенцией без каких-либо проявлений эмбриогенеза. На основании проведенного анализа мы полагаем, что только средний уровень экспрессии *rolC* приводит к наблюдаемым эффектам: образование проэмбриональных структур, соматических эмбрионов и почек.

Анализ экспрессии генетического маркера эмбриогенеза растений WUS в клеточных линиях женьшеня. Соматические эмбрионы в *rolC*-трансгенной линии 2с3 за период работы с 2007 по 2010 г.г. имели вид, описанный ранее (Gorpenchenko et al., 2006). В течение развития соматические зародыши проходили стадии глобулы и сердечка, иногда достигали стадии торпеды. Индукция соматических эмбрионов геном *rolC* в линиях женьшеня является доказанным фактом. Было не ясно, активирует ли ген *rolC* известные эмбриогенные механизмы. Эмбриогенез в линии 2с3 был схож с эффектами сверхэкспрессии гомеобокс содержащего гена *WUS* (Zuo et al., 2002). На сегодняшний день *WUS* считается одним из генетических маркеров эмбриогенеза растений (Klimaszewska et al., 2011), поэтому решено было оценить экспрессию гена *WUS* женьшеня в контрольной линии GV и эмбриональной 2с3 с помощью выродженных праймеров.

Многочисленные попытки клонировать ПЦР-продукт с контрольной линии GV не увенчались успехом: последовательностей, гомологичных генам *WUS*, секвенировать не удалось. ПЦР-продукты с линией 2с3 были успешно клонированы. Анализ аминокислотных последовательностей показал высокую гомологию с известными *WUS* растений (77-85% идентичности). Анализ колоний, полученных с ОТ-ПЦР-продуктов, показал, что в 2с3 линии экспрессируются 3 гена *WUS*. Больше всего экспрессировался *PgWUSI* (67% всех клонированных ПЦР-продуктов), в меньшей степени *PgWUSII* (28%) и *PgWUSIII* (5%). Дальнейший анализ экспрессии генов *WUS* в линии 2с3 и клеточных агрегатах 2с3-DD, 2с3-ES, 2с3-LS показал, что количество секвенированных генов *WUS* увеличилось до 9. Были описаны гены *WUS*, которые по нуклеотидной последовательности наиболее близки к *PgWUSI* и *PgWUSII*. Все полученные части гомеобоксного домена по аминокислотной последовательности были наиболее близки к известным *WUS* растений. Затем, мы проанализировали экспрессию *rolC* в разных агрегатах линии 2с3, содержащих соматические эмбрионы на разных стадиях развития с помощью ПЦР-РВ. Оказалось, экспрессия этого гена в разных клеточных агрегатах различна. Уровень экспрессии *rolC* в клеточных агрегатах 2с3-DD был в 1.5 раза ниже уровня экспрессии этого гена в линии 2с3. Уровень экспрессии гена *rolC* в 2с3-ES и 2с3-LS был в 1.1-1.3 раза выше, чем в линии 2с3 (рис. 1А). Ранее было показано, что экспрессия генов под 35S промотором может регулироваться различными путями у разных видов растений и в разных

тканях (Benfey, Chua, 1990). Разница в экспрессии *rolC* может быть обоснована разницей ткани и клеток в агрегатах линии 2с3. Экспрессия генов *WUS* в линии GV отсутствовала, а в 2с3 и ее разных клеточных агрегатах экспрессия была на уровне от 0.05 до 0.21 отн. ед. (рис. 1Б). Суммарная экспрессия генов *PgWUS* в значительной степени коррелировала с суммарной экспрессией гена *rolC*. Далее определяли качественный состав ПЦР-продуктов генов *WUS* и на основе данных по суммарной экспрессии и качественному составу проб высчитывали экспрессию каждого гена *WUS* женьшеня.

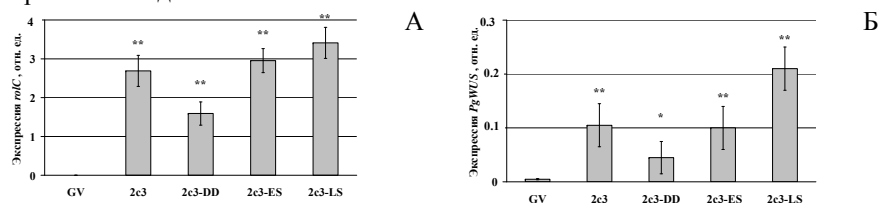


Рис. 1. Экспрессия *rolC* (А) и *WUS* (Б) в линиях GV, 2с3 и клеточных агрегатах 2с3-DD, 2с3-ES и 2с3-LS. Данные получены в трех независимых экспериментах, выведено среднее значение с учетом погрешности. *P < 0.05, **P < 0.01.

Экспрессия *WUS* в 2с3-DD. В недифференцированном рыхлом каллусе 2с3-DD экспрессия представителей I подсемейства генов *WUS* была намного больше, чем экспрессия *PgWUSII*. Единственным геном, чья экспрессия была близка к 0.05 отн. ед. был ген *PgWUSII-7* (рис. 2А).

Экспрессия *WUS* в 2с3-ES. В клеточных агрегатах 2с3-ES, содержащих соматические эмбрионы на начальных стадиях развития (рис. 2Б) отмечались достоверные изменения в экспрессии подсемейств *PgWUSII* по сравнению с клеточными агрегатами 2с3-DD. В 2с3-ES достоверно возростала экспрессия *PgWUSII-8* до 0.06 отн. ед. и появлялась экспрессия двух новых генов – *PgWUSII-6* и *PgWUSII-5*. Экспрессия остальных генов изменялась незначительно.

Экспрессия *WUS* в 2с3-LS. В клеточных агрегатах 2с3-LS, содержащих соматические эмбрионы на поздних стадиях развития (рис. 2В), экспрессия генов *WUS* значительно отличалась от экспрессии в ранее описанных клеточных агрегатах. В 2с3-LS достоверно повышена экспрессия *PgWUSII-3*, *PgWUSII-7*, *PgWUSII-5* и *PgWUSII-6*, и достоверно снижена экспрессия *PgWUSII-8* (рис. 2В).

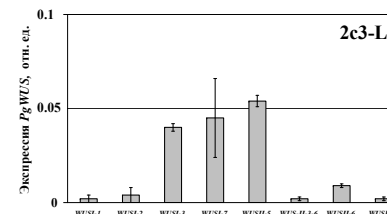
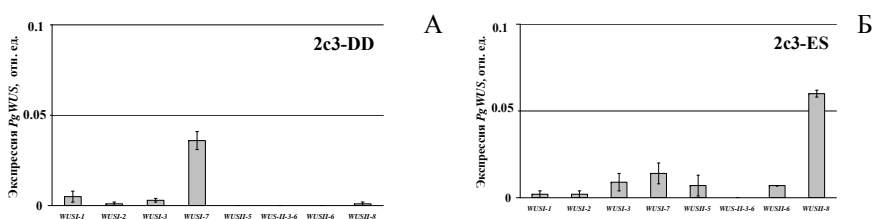


Рис. 2. Экспрессия генов *WUS* в клеточных линиях женьшеня 2с3-DD (А), 2с3-ES (Б) и 2с3-LS (В).

Влияние ингибиторов кальциевых каналов, ингибиторов протеинкиназ и ионофора A23187 на эмбриогенез в клеточной линии 2с3. Ранее было показано (Anil, Rao, 2000), что частота эмбриогенеза в культуре клеток чефраса *Santalum album* связана с концентрацией цитоплазматического Ca^{2+} . Эмбриогенезу сопутствует повышенная концентрация $[Ca^{2+}]_{цит}$. Кроме того, функционирование гена *rolC* связано с кальциевой сигнальной системой (Bulgakov et al., 2003). Учитывая вышесказанное, нами были проведены эксперименты по определению влияния $[Ca^{2+}]_{цит}$ на соматический эмбриогенез женьшеня. Использовали общий ингибитор каналообразующих Ca^{2+} -ионофоров $LaCl_3$, ингибитор внешних Ca^{2+} -каналов – верапамил, ингибитор внутриклеточных Ca^{2+} -каналов – нифлюмовую кислоту. Все ингибиторы снижали частоту эмбриогенеза в линии 2с3 (рис. 3), соматические эмбрионы перерождались в рыхлые каллусные клетки. Наиболее достоверное подавление эмбриогенеза достигнуто при использовании нифлюмовой кислоты и верапамила (15 и 28%, соответственно).

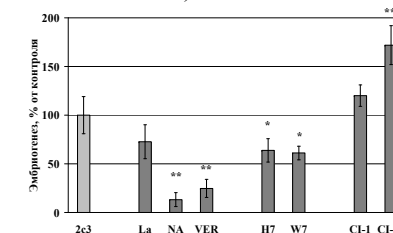


Рис. 3. Эмбриогенез в клеточной линии 2с3 на средах с добавлением ингибиторов кальциевых каналов, ингибиторов протеинкиназ и ионофора A23187. 2с3 – эмбриогенез в норме; La – эмбриогенез при добавлении $LaCl_3$ (0.5 мМ); NA – нифлюмовой кислоты (50 мкМ); VER – верапамила (0.25 мМ); H7 общего ингибитора протеинкиназ (30 мкМ); W7 –ингибитора CDPK (15 мкМ); CI-1 – ионофора A23187 (1 мкМ); CI-10 – ионофора A23187 (10 мкМ). *P < 0.05; **P < 0.01.

Основными сенсорами кальция в клетке служат CDPK, поэтому важно было изучить влияние общего ингибитора протеинкиназ (H7) и более специфического ингибитора CDPK (W7) на эмбриогенез в клеточной линии женьшеня 2с3. Показано, что H7 и W7 на 30-40% подавляли эмбриогенез в культуре (рис. 3). Важным этапом стало изучение влияния увеличения концентрации $[Ca^{2+}]_{цит}$ с помощью ионофора A23187 на эмбриогенез в линии 2с3 (рис. 3). Функционируя, как правило, в условиях низких концентраций

ионов этот ионофор действует как ионообменный "челнок": на каждый внесенный двухвалентный катион он переносит два иона водорода из клетки. Следовательно, он не деполяризует мембрану, поэтому ионофор A23187 широко используется в клеточной биологии для повышения концентрации свободного кальция в цитозоле. Нами показано, что добавление ионофора A23187 достоверно увеличивает количество соматических эмбрионов в линии 2с3 в 1.2–1.7 раза (рис. 3).

Экспрессия CDPK в клеточных линиях GV и 2с3 женьшеня. В кальциевой сигнальной системе растений важную роль играют гены *CDPK* (Ludwig et al., 2004). Впервые анализ экспрессии генов *CDPK* в клеточных линиях женьшеня был проведен в 2007 г. (Киселев и др., 2008), но уровень выполненных работ был недостаточен, поэтому мы повторили анализ с привлечением большего количества клонов. Методом ПЦР с использованием вырожденных праймеров для генов *CDPK* для кДНК линий GV и 2с3 были получены ампликоны ожидаемого размера. Эти ампликоны клонировали и секвенировали фрагменты нескольких *CDPK*, кодирующих часть киназного домена. Все части киназного домена по выведенной аминокислотной последовательности наиболее близки к известным CDPK растений. Аминокислотные последовательности CDPK женьшеня при выравнивании в программе BioEdit разделились на четыре подсемейства, как описано ранее у *P. ginseng* (Киселев и др., 2008) и у CDPK *A. thaliana* (Cheng et al., 2002), им присвоили название *PgCDPK1*, *PgCDPK2*, *PgCDPK3*, *PgCDPK4*. Каждое подсемейство представлено несколькими генами, всего выделено 12 генов *CDPK*. Принцип разделения на 12 был следующим: по нуклеотидным последовательностям фрагментов генов *CDPK* женьшеня, ограниченных вырожденными праймерами, определили аминокислотные последовательности. Основанием для выделения нового гена было отличие в аминокислотной последовательности секвенированного участка больше, чем на один аминокислотный остаток. Нуклеотидные последовательности, установленные по результатам трех независимых секвенирований, депонированы в GeneBank. Важно отметить, что в эмбрионной линии женьшеня 2с3 найдены CDPK, в серин-треонин киназном домене которых отсутствовал ряд субкаталитических доменов, а рамка считывания при этом сохранялась. Аминокислотные последовательности этих CDPK полностью идентичны ранее описанным генам и отличались только отсутствием нескольких аминокислотных остатков. Их объединили в группу *PgCDPK1as* или *PgCDPK2ds* (s – short).

Аминокислотная последовательность части киназного домена, определенная по результатам секвенирования *PgCDPK1a*, среди известных CDPK наиболее близка к *NiCDPK1* (87% идентичности), *PgCDPK2a* – к *AtCPK10* (84%), *PgCDPK3a* – к *OsCPK7* (94%), *PgCDPK4a* – к *AtCDPK17* (94%). Интенсивность суммарной экспрессии генов *CDPK*, полученных на кДНК эмбрионной линии 2с3, всегда была значительно ниже, чем у GV (рис. 4). Этот эффект подтвержден результатами анализа кДНК из нескольких пассажей. Более 300

клонов *CDPK* векторной контрольной линии GV и эмбрионной линии 2с3 было отсеквенировано и определена экспрессия каждого гена *CDPK*.

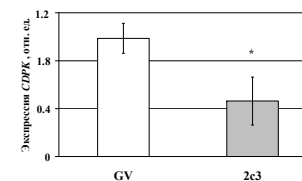


Рис. 4. Суммарная экспрессия генов *CDPK* женьшеня в векторной линии GV и эмбрионной линии 2с3. *P < 0.05.

В норме в каллусной линии GV сильнее всего экспрессировались *PgCDPK1a*, *PgCDPK1b* и *PgCDPK3a*. Экспрессия гена *rolC* и появление соматических эмбрионов приводило к достоверному снижению уровня экспрессии именно активно экспрессирующихся в контроле *CDPK*: *PgCDPK1a*, *PgCDPK1b* и *PgCDPK3a* (рис. 5). В линии 2с3 женьшеня экспрессия этих генов была наименьшей из всех проанализированных проб кДНК и уступала уровню экспрессии генов *PgCDPK2b* и *PgCDPK2d* (рис. 5). Таким образом, нами было отмечено достоверное изменение экспрессии 10 транскриптов *CDPK*. Для подтверждения полученных результатов проведен следующий анализ.

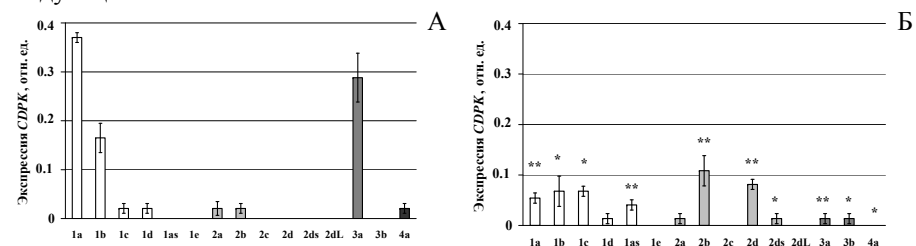


Рис. 5. Экспрессия генов *CDPK* в контрольной клеточной линии GV, *rolC*-трансгенных 2с2, 2с2R2 и эмбрионной линии 2с3. *P < 0.05, **P < 0.01.

Анализ экспрессии генов CDPK женьшеня с помощью ПЦР-РВ. На основе известных нуклеотидных последовательностей генов *CDPK* провели ПЦР-РВ для подтверждения результатов экспрессии *CDPK*, полученных с помощью вырожденных праймеров. Оказалось, что оба метода выявляют сходную тенденцию: экспрессия генов *PgCDPK1a*, *PgCDPK1b*, *PgCDPK3a* уменьшается, а генов *PgCDPK2b*, *PgCDPK2d* увеличивается. Отмечены лишь небольшие отличия в степени увеличения или уменьшения уровня экспрессии анализируемых генов, но это можно отнести к ошибкам измерений и к тому, что сигналы получены на разной кДНК. Таким образом, с помощью ПЦР-РВ было доказано, что экспрессия нескольких транскриптов *CDPK* действительно изменяется. Но, экспрессия каких генов *CDPK* имеет более важное значение для развития соматических эмбрионов в линии 2с3 женьшеня? Для ответа на этот вопрос были проведены эксперименты по изучению экспрессии *CDPK* на разных стадиях развития соматических эмбрионов.

Экспрессия генов *CDPK* в клеточных агрегатах линии *2c3* с разной степенью развития соматических эмбрионов: *2c3-DD*, *2c3-ES*, *2c3-LS*. Экспрессию генов *CDPK* определяли с использованием анализа частоты встречаемости клонированных ПЦР-продуктов и ПЦР-РВ. Фрагменты ожидаемой длины были получены с использованием вырожденных праймеров для кДНК клеточного штамма *1c*, линий *GV*, *2c3* и клеточных агрегатов *2c3-DD*, *2c3-ES* и *2c3-LS*. Тотальная экспрессия генов *CDPK* в эмбрионной линии *2c3* и в различных клеточных агрегатах была в 1.8-2.0 раза ниже, чем в контрольном штамме клеток *1c* и линии *GV* (рис. 6).

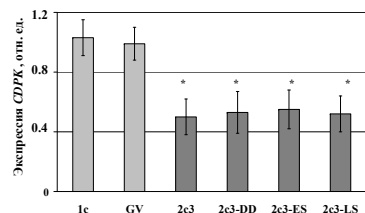


Рис. 6. Экспрессия генов *CDPK* в клеточном штамме *1c*, линиях *1c*, *GV*, *2c3* и клеточных агрегатах *2c3-DD*, *2c3-ES*, *2c3-LS*. * $P < 0.05$.

Экспрессия генов *PgCDPK1a*, *PgCDPK1d* и *PgCDPK3a* в клетках рыхлого недифференцированного каллуса *2c3-DD* значительно ниже, чем в контрольной линии *GV* (рис. 5А; рис. 7А). Однако экспрессия *PgCDPK1c*, *PgCDPK2c* и *PgCDPK3b* достоверно возрастала (рис. 5А; рис. 7А).

В сравнении с каллусными клетками *2c3-DD* в клеточных агрегатах *2c3-ES* выявлено несколько изменений в экспрессии внутри подсемейства *PgCDPK2* (рис. 7Б). Так, уровень экспрессии *PgCDPK2d* возрос семикратно, в то время как уровень экспрессии *PgCDPK2c* – снижился. При анализе кДНК из клеточных агрегатов *2c3-ES* обнаружен короткий химерный транскрипт *CDPK: PgCDPK2ds(2d-3b)* (рис. 7Б). Транскрипт *PgCDPK2ds(2d-3b)* отличался от *PgCDPK2d* отсутствием 102 нуклеотидов, включая VI каталитический субдомен (рис. 8). Ранее (Киселев и др., 2008) были описаны подобные короткие транскрипты в *rolC*-трансгенных линиях женьшеня, однако в полученных транскриптах *PgCDPK2ds1* и *PgCDPK2ds2* отсутствовали 132 и 15 нуклеотидов, соответственно (рис. 8). Транскрипт *PgCDPK2ds1* был обнаружен ранее в кДНК линии *2c3*, транскрипт *PgCDPK2ds2* в кДНК линии *2cR2* (Киселев и др., 2008). Первая часть короткого химерного транскрипта *PgCDPK2ds(2d-3b)* идентична таковой транскрипта *PgCDPK2d*, в то время как вторая его часть такая же, как у транскрипта *PgCDPK3b*. Таким образом, *PgCDPK2ds(2d-3b)* – это химерный короткий транскрипт.

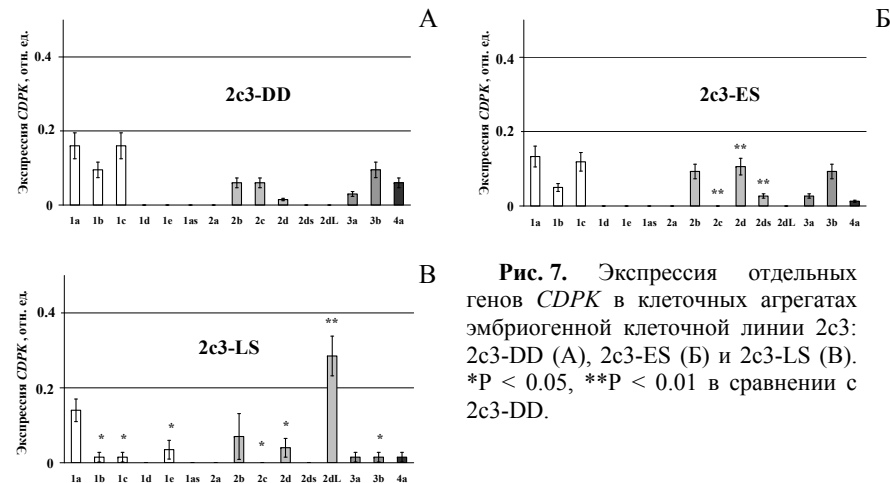


Рис. 7. Экспрессия отдельных генов *CDPK* в клеточных агрегатах эмбрионной клеточной линии *2c3*: *2c3-DD* (А), *2c3-ES* (Б) и *2c3-LS* (В). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ в сравнении с *2c3-DD*.



Рис. 8. Выровненные аминокислотные последовательности части киназного домена генов *CDPK*, выделенных из контрольной линии *GV* и *rolC*-трансгенных линиях *P. ginseng*. Примечание: (–) – отсутствие аминокислотных остатков, (*) – консервативные аминокислотные остатки.

Экспрессия *CDPK* в *2c3-LS* сильно отличается от таковых в других клеточных агрегатах линии *2c3*. Все *CDPK* транскрипты, описанные выше, экспрессировались гораздо слабее, за исключением транскрипта *PgCDPK1a* (рис. 7В). Доминирующим транскриптом на этой стадии развития соматического эмбриогенеза является *PgCDPK2dL* (рис. 7В). Нуклеотидная последовательность данного транскрипта близка к *PgCDPK2d*, с той лишь разницей, что внутри VIII каталитического субдомена располагается достаточно длинная вставка из 53 нуклеотидов (рис. 9). Эта инсерция приводит к сдвигу рамки считывания и образует несколько преждевременных стоп-кодонов (рис. 9).

ПЦР-РВ *CDPK* на разных стадиях морфологической дифференциации. ПЦР-РВ использовался нами для подтверждения результатов, полученных с помощью вырожденных праймеров. Нами было показано, что оба метода имеют схожие результаты, хотя значения экспрессии *CDPK* варьировали, что может быть объяснено ошибкой измерения или тем фактом, что ПЦР-сигнал был получен при использовании разных проб кДНК. В общем, экспрессия

подсемейства *PgCDPK1* в линии 2с3 по сравнению с контролем GV уменьшалась. Экспрессия *PgCDPK2a* и *PgCDPK2b* увеличивалась в 3 раза на ранних и поздних стадиях соматического эмбриогенеза в сравнении с контролем. Экспрессия *PgCDPK2d* значительно возросла в на ранних и поздних стадиях эмбриогенеза в сравнении с контролем. Экспрессия *PgCDPK2dL* сильно возросла в 2с3-LS в сравнении с GV.

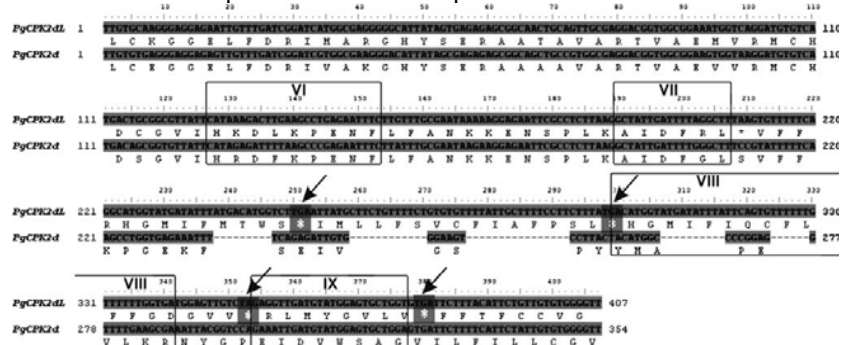


Рис. 9. Выровненные аминокислотные и нуклеотидных последовательностей части киназного домена транскриптов *PgCDPK2d* и *PgCDPK2dL*, выделенных из клеточных линий *P. ginseng*. Примечание: пунктиром обозначена инсерция 53 п.н. Стрелками указаны стопкодоны, прямоугольниками отмечены VI–IX каталитические субдомены.

Структура и экспрессия гена PgCDPK1a в корнях, листьях и клеточных линиях женьшеня. Наши первые попытки изучения экспрессии генов *CDPK* женьшеня с использованием вырожденных праймеров, описанные выше, показали, что в линиях женьшеня экспрессируется от 15 до 20 различных транскриптов *CDPK*. Далее была секвенирована полная последовательность кДНК первого гена *CDPK P. ginseng* – *PgCDPK1a*. С помощью метода ПЦР-РВ проанализирована экспрессия *PgCDPK1a* в листьях, корнях и клеточных линиях женьшеня с разным уровнем синтеза гинзенозидов и разным уровнем экспрессии патоген-связанных генов и устойчивости к солевому стрессу. Используя 5', 3' RACE амплификацию мы получили полную кДНК *PgCDPK1a* (GeneBank GU137295). Показана высокая гомология (80% идентичности) между *PgCDPK1a*, *LeCDPK1* и *NtCDPK1* на белковом уровне. Данные киназы (*PgCDPK1a*, *LeCDPK1* и *NtCDPK1*) имеют сходные структуры: аминоконцевая часть содержит каталитический серин-треониновый киназный домен, карбоксильный домен содержит кальмодулин-подобный домен с четырьмя предполагаемыми Ca^{2+} -связывающими доменами. Между киназным и кальмодулин подобным доменом располагается связывающий домен. Каталитические субдомены (I–IX), связывающий домен и кальмодулин подобный домен *PgCDPK1a* обнаруживают 90–95% гомологии с соответствующими доменами гена *CDPK1* табака (*NtCDPK1*), что доказывает высокую консервативность данных доменов между генами таких разных семейств как *Araliacea* и *Nicotiana*. Гены *PgCDPK1a* и *NtCDPK1* имеют

гомологичные участки (45% гомологии) в пролин-глицин-богатых последовательностях. В отличие от этих двух киназ, *LeCDPK1* не содержит пролин-глицин-богатых последовательностей. Филогенетические отношения киназ с несколькими представителями кальций-зависимых протеинкиназ, ответственных за защитные механизмы (Levy et al., 2004) представлены на рис. 10. *PgCDPK1a*, *NtCDPK1*, *LeCDPK1* являются представителями отдельного кластера филогенетического дерева (рис. 10).

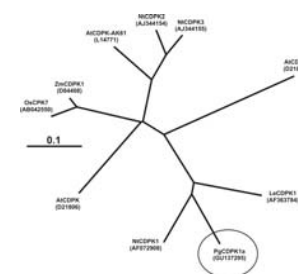


Рис. 10. Филогенетическое дерево основных представителей кальций-зависимых протеинкиназ, полученное методом объединения ближайших соседей. *PgCDPK1a*, *NtCDPK1*, *LeCDPK1* составляют отдельный кластер на филогенетическом древе.

Экспрессия PgCDPK1a в клетках P. ginseng. Экспрессию *PgCDPK1a* проанализировали в листьях и корнях двухлетнего дикорастущего женьшеня и женьшеня из коллекционного питомника. Активно растущие листья собраны в июле 2009 г.; листья, завершающие рост – в сентябре этого же года. Корни растений из питомника были разделены на две группы – медленно растущие основные корни и быстрорастущие молодые тонкие корни. Наивысший уровень экспрессии *PgCDPK1a* был отмечен в активно растущих молодых листьях и корнях (рис. 11). Экспрессия *PgCDPK1a* в листьях дикорастущих растений была в 1.3–1.9 раза ниже, чем экспрессия в листьях интродуцированных растений (рис. 11). Уровень экспрессии данного гена в клеточных линиях *P. ginseng* GV, 2с2 и GB был проанализирован, и свойства этих линий описаны нами подробно в статье (Kiselev et al., 2010). Самая низкая экспрессия *PgCDPK1a* определена в эмбрионной линии 2с3, что в 4 раза ниже в сравнении с экспрессией в GV (рис. 12Б). Линия GV была использована для анализа экспрессии *PgCDPK1a* при разных условиях культивации клеток: различные концентрации ауксина и NaCl.

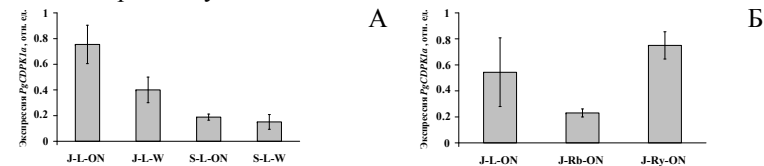


Рис. 11. Экспрессия *PgCDPK1a* в листьях и корнях *P. ginseng*. J-L-ON – РНК выделена из активно растущих листьев интродуцированных растений; J-L-W – РНК выделена из листьев дикорастущих растений; S-L-ON – РНК выделена из завершающих рост листьев интродуцированных растений; S-L-W – РНК выделена из листьев дикорастущих растений; J-Rb-ON – РНК выделена из медленно растущих основных

корней интродуцированных растений; J-Ry-ON – РНК выделена из активно растущих молодых тонких корней интродуцированных растений.

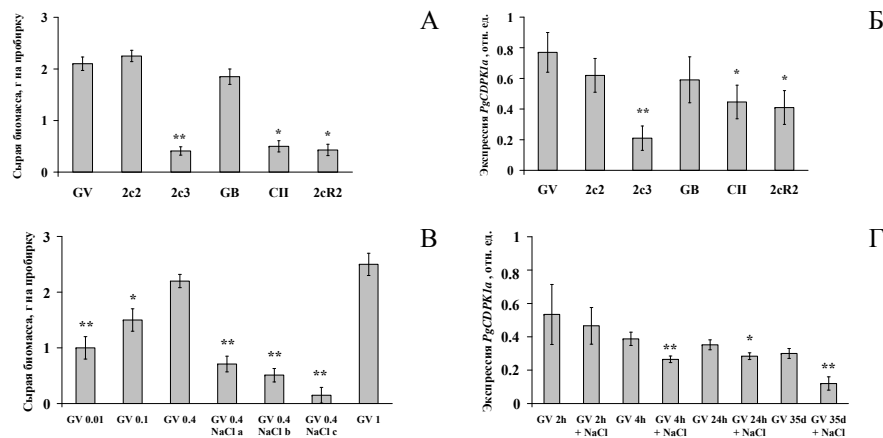


Рис. 12. Прирост сырой биомассы (А, В) и экспрессия гена *PgCDPK1a* (Б, Г) в клеточных линиях GV, 2c2, 2cR2, CII, 2c3 и GB. GV 0.01 – линия GV, растущая на среде с концентрацией 4-CPA 0.01 мг/л; GV 0.1 – GV на среде 0.1 мг/л 4-CPA; GV 0.4 – GV на среде с 0.4 мг/л 4-CPA; GV0.4 + NaCl a – GV на среде с 0.4 мг/л 4-CPA и 60 мМ NaCl; GV0.4 + NaCl b – GV на среде с 0.4 мг/л 4-CPA и 100 мМ NaCl; GV0.4 + NaCl c – GV на среде с 0.4 мг/л 4-CPA и 200 мМ NaCl; GV 1 – на среде с 1 мг/л 4-CPA; *P < 0.05, **P < 0.01.

Показано, что прирост биомассы и уровень экспрессии *PgCDPK1a* в линии GV положительно коррелирует с концентрацией ауксина в питательной среде. Наивысший уровень экспрессии данного гена в линии GV зафиксирован при содержании ауксина 4-CPA в среде в концентрации 1 мг/л, в то время как уровень экспрессии гена значительно снижался при понижении концентрации этого гормона (рис. 12Г). Интересно, что экспрессия гена *PgCDPK1a* значительно снижалась в условиях солевого стресса в линии GV (рис. 12Г).

ОБСУЖДЕНИЕ

CDPK играют важную роль в процессе соматического эмбриогенеза в *rolC*-трансгенной линии 2c3 *P. ginseng*. Предполагаемый механизм эмбриогенеза в линии 2c3. Кальциевая сигнальная система играет одну из ключевых ролей в регуляции большинства физиологических процессов в клетках растений (Lescougieux et al., 2006), в том числе эмбриогенеза (Anil, Rao, 2000). Результаты наших опытов с ингибиторами кальциевых каналов показывают, что подавление притока кальция в цитоплазму блокирует соматический эмбриогенез в эмбрионной линии 2c3. Более того, добавление ионофора A23187 достоверно увеличивает количество соматических эмбрионов в линии 2c3. Эти результаты свидетельствуют о том, что активация

процессов эмбриогенеза геном *rolC* в линии 2c3 связана с поступлением кальция в клетку. Возможно, *rolC*, изменяя работу кальциевой сигнальной системы, прямо или опосредованно влияет на чувствительность клеток к кальцию. Одним из результатов такого влияния может быть модификация основных сенсоров кальция в клетках растений – CDPK. Интерес к генам *CDPK* усиливали результаты опытов с ингибиторами киназ и данные индийских ученых (Anil, Rao, 2000), обнаруживших у сандалового дерева *S. album* белок *swCDPK*, активность которого повышена в эмбрионной линии 2c3 и прямо коррелирует с $[Ca^{2+}]_{цит.}$.

Первые результаты анализа экспрессии *CDPK* с использованием вырожденных праймеров поставили под сомнение данные индийских ученых (Anil, Rao, 2000), т.к. суммарная экспрессия *CDPK* в эмбрионной линии 2c3 уменьшалась в 2 раза. Более детальный анализ показал, что в линии 2c3 на фоне уменьшения экспрессии генов *PgCDPK1a*, *PgCDPK1b*, *PgCDPK3a* и увеличения экспрессии *PgCDPK2b* появляются новые *CDPK*, которых нет в контроле: *PgCDPK1as*, *PgCDPK2d*, *PgCDPK2ds*. Возможно, новые транскрипты *CDPK*, экспрессия которых возросла в эмбрионной линии 2c3, являются аналогами *swCDPK* сандалового дерева, нуклеотидная последовательность которой до сих пор не опубликована, что не позволяет проанализировать сходство между *swCDPK* и генами *CDPK* женьшеня.

Несмотря на усилия многих исследователей, еще нет полного понимания механизма действия *CDPK*, не известны субстраты, функции и регуляция экспрессии генов *CDPK*. Первые шаги, сделанные нами, показывают, что в клетках женьшеня экспрессируется несколько транскриптов *CDPK*. Возможно, есть *CDPK*, которые еще не выявлены, но на основе имеющихся аминокислотных последовательностей определены четыре филогенетические ветви. У арабидопсиса и риса также обнаружены четыре подсемейства *CDPK*, это говорит о том, что нами найдены все основные подсемейства *CDPK* женьшеня. У большинства *CDPK* женьшеня секвенирован фрагмент, кодирующий часть серин-треонин киназного домена, но известно (Cheng et al., 2002), что на основе только этого домена можно успешно отнести *CDPK* к существующим подсемействам, и различия в серин-треонин киназном домене должны, вероятно, сказываться на функциях *CDPK*. Возможно, и в нашем случае есть *CDPK* с разными функциями. Подсемейство *PgCDPK1* (особенно *PgCDPK1a*, *PgCDPK1b*) и *PgCDPK3* (*PgCDPK3a*) активно экспрессируются в контрольной каллусной быстрорастущей линии GV. Гены из группы *PgCDPK3a* по кодируемой аминокислотной последовательности близки к VCPK1 винограда *Vitis labrusca* × *V. vinifera*, которая способствует приросту биомассы в культуре клеток (Yu et al., 2007). Сходный результат получен и в наших опытах: в трансгенных линиях женьшеня снижение прироста биомассы клеток коррелировало с уменьшением экспрессии *PgCDPK3a*. Аминокислотные последовательности, кодируемые *PgCDPK1a* и *PgCDPK1b*, наиболее близки к NtCDPK1, который активно экспрессируется в быстро делящихся тканях и клеточных культурах растений. NtCDPK1

взаимодействует с 26S протеасомой и катализирует процессы деградации многих ферментов и регуляторных белков, способствуя переходу клеток к делению (Lee et al., 2003). Возможно, в норме в контрольной линии GV деградации подвергается ряд белковых факторов, инициирующих процессы морфогенеза, поэтому соматические эмбрионы из этой линии получить не удалось. Согласно этому сценарию, экспрессия *rolC* привела к уменьшению экспрессии *PgCDPK1a* и *PgCDPK1b*, что понизило активность 26S протеасом и увеличило концентрацию белковых факторов, запускающих соматический эмбриогенез. В эмбрионной линии 2c3 активно экспрессируется подсемейство *PgCDPK2* (*PgCDPK2b*, *PgCDPK2d*), наиболее близкое к *AtCPK30*. *AtCPK30* – это кальциевый сенсор, вовлеченный в проведение гормональных сигналов и участвующий в образовании корней растений. Повышенная экспрессия гена *AtCPK30* коррелировала с процессами морфогенеза в культурах клеток и органов растений (Yuan et al., 2007).

Сравнение экспрессии *CDPK* в клеточных агрегатах линии 2c3 с разной степенью развития соматических эмбрионов (2c3-DD, 2c3-ES и 2c3-LS) показали наиболее интересные результаты. Клетки в 2c3-DD и 2c3-ES имели сходную картину экспрессии *CDPK*, однако обнаружена разница в экспрессии, которая заключалась в высокой экспрессии *PgCDPK2d* и *PgCDPK2ds(2d-3b)* на ранних стадиях соматического эмбриогенеза. Транскрипты *PgCDPK2d* и *PgCDPK2ds(2d-3b)* являются доминирующими в 2c3-ES. Напротив, на поздних стадиях развития соматических эмбрионов ген *PgCDPK2dL* уже является доминирующим среди других *CDPK*. *PgCDPK2dL* близок по нуклеотидному составу к *PgCDPK2d*, следовательно, изменения в экспрессии генов внутри подсемейства *PgCDPK2d* наиболее значимы в процессе инициации и развития соматического эмбриогенеза женьшеня. Таким образом, при развитии соматических эмбрионов в линии 2c3 появляются новые *CDPK*, наблюдается активация экспрессии некоторых *CDPK*. Известно несколько примеров, где в качестве белков-мишеней для *CDPK* могут выступать факторы транскрипции (Ludwig et al., 2004), значит, WUS являются белками, с которыми могут взаимодействовать новые *CDPK*. Известно, что WUS участвуют в инициации развития соматических эмбрионов растений (Klimaszewska et al., 2011), поэтому можно предположить, что соматических эмбрионы появляются в линии 2c3 вследствие экспрессии новых белков *CDPK* которые активируют WUS и тем самым запускают процесс эмбриогенеза.

Наличие коротких (*PgCDPK2ds(2d-3b)*) и длинных транскриптов (*PgCDPK2dL*) *CDPK* в кДНК из различных клеточных агрегатов линии 2c3 на разных стадиях соматического эмбриогенеза является любопытным явлением. В обзоре Нишияма (Nishiyama et al., 1999) говорит о том, что существует лишь один известный случай альтернативного сплайсинга *CDPK*, при котором участок, кодирующий руки связывания с кальцием, подвергался видоизменениям. Имеются данные о том, что модификациям альтернативного сплайсинга также подвержены гены *MAPK* риса (Xiong, Yang, 2003). Короткие транскрипты *MAPK* получались при вырезании III–VI субдоменов

каталитического серин-треонин киназного домена, что приводило к снижению киназной активности белкового продукта. Таким образом, существует несколько примеров подобных структурных изменений в киназах растений, сходных с возможными посттранскрипционными модификациями, наблюдаемыми в *PgCDPK2dL*. Однако известны и другие работы, в которых описываются изменения, напоминающие именно модификации *PgCDPK2dL*. В работе (Wei et al., 2007) описали три варианта специфичной для семенников мыши серин-треонин киназы, образованных благодаря процессу альтернативного сплайсинга. Эти изоформы содержали инсерцию из 10 аминокислотных остатков в IV области. Белковые продукты после сплайсинга не обладали киназной активностью. Появление стопкодонов в длинном транскрипте *CDPK* может приводить к тому, что будут синтезироваться короткие белковые продукты *CDPK*, лишённые киназной активности. Либо транскрипт *PgCDPK2dL* может служить мишенью для нонсенс-опосредованного разрушения мРНК (Baker, Parker, 2004), что приводит к деградации мРНК. Таким образом, для установления функций подобных транскриптов должны быть проведены дополнительные исследования.

На основе наших данных можно предположить, что соматический эмбриогенез растений опосредован Ca^{2+} -сигнальной системой. Под действием гена *rolC* происходит дисбаланс в кальциевой сигнальной системе. Далее происходит, возможно, активация определенных белков, что, в свою очередь, приводит к увеличению экспрессии генов WUS, что мы наблюдали в эмбриональной клеточной линии 2c3. Активные формы белков WUS приводят к постоянному эмбрионному стимулу в 2c3. Инициация эмбриогенеза у растений обусловлена, в какой-то мере, увеличением или уменьшением экспрессии определенных генов *CDPK*. У женьшеня это *PgCDPK1a*, *PgCDPK1b*, *PgCDPK2b*, *PgCDPK2d* и *PgCDPK3a*. Возможно, определенную роль в инициации эмбриогенеза в клеточной линии 2c3 играет появление коротких и длинных мРНК *CDPK*, значение которых еще предстоит понять. Доказательство этого предполагаемого механизма образования соматических эмбрионов в линии 2c3 является нашей дальнейшей работой.

***PgCDPK1a* – позитивный регулятор клеточного роста женьшеня.** Нами получена полная последовательность кДНК гена *PgCDPK1a* женьшеня и проанализирована его экспрессия в различных условиях культивирования клеток, в том числе и в клетках растения *P. ginseng*. Выявлена позитивная корреляция между приростом сырой биомассы в клетках женьшеня и экспрессией гена *PgCDPK1a*. Также обнаружена неявная негативная корреляция между экспрессией патоген-связанных генов и содержанием гинзенозидов с экспрессией *PgCDPK1a*, потому что экспрессия этого гена понижена в линии 2cR2 с более высоким содержанием гинзенозидов и экспрессией патоген-связанных генов (Bulgakov et al., 1998; Kiselev et al., 2006). Возможно, *PgCDPK1a* вовлечен в ростовые процессы женьшеня и является позитивным регулятором клеточного роста. Недавние исследования (Lee et al., 2003), связанные с вирус-индуцируемым замолканием гена

NtCDPK1 табака, показали, что существует корреляция между степенью ингибирования экспрессии *NtCDPK1* и степенью индукции генов, ответственных за механизмы защиты данного растения. Чем сильнее степень ингибирования гена *NtCDPK1*, тем выше экспрессия генов, ответственных за механизмы защиты (Lee et al., 2003). Так и в нашем случае уровень содержания мРНК гена *PgCDPK1a* уменьшался при увеличении экспрессии защитных генов, таких как *PAL* и бета-1,3-глюканазы в линиях СИ и 2сR2 (Kiselev et al., 2006; Persiyanova et al., 2008).

Несмотря на то, что гены *CDPK* вовлечены в механизмы защиты растений от биотического и абиотического стресса, они признаны как индуцибельные гены (Ludwig et al., 2004), но имеется несколько примеров, когда ингибирование экспрессии *CDPK* ассоциировано с активацией защитных реакций в растении. Учитывая высокую гомологию генов *NtCDPK1*, *PgCDPK1a* и *LeCDPK1*, можно предположить существование высококонсервативной группы *CDPK*, которые выполняют сходные функции в растении. Их функционирование может служить связующим звеном между клеточным ростом и защитным контролем в клетке.

ВЫВОДЫ

1. Добавление ингибиторов кальциевых каналов и ингибиторов протеинкиназ в питательные среды достоверно уменьшало в 1.3–6.7 раза количество соматических эмбрионов в эмбрионной клеточной линии женьшеня 2с3, напротив добавление ионофора A23187 достоверно увеличивало количество соматических эмбрионов в 1.2–1.7 раза. Это указывает на то, что кальциевая сигнальная система участвует в регуляции соматического эмбриогенеза растений.

2. В каллусной контрольной линии женьшеня GV полностью отсутствовала экспрессия генов *WUS*, в то время как в эмбрионной линии 2с3 присутствовали транскрипты 8-ми различных генов *WUS*, что подтверждает эмбрионную природу клеточных агрегатов линии 2с3.

3. В *rolC*-трансгенной линии 2с3 изменена экспрессия генов *CDPK* по сравнению с контрольной линией GV: достоверно увеличена экспрессия *PgCDPK1c*, *PgCDPK2b*, *PgCDPK2d* и *PgCDPK3b*; достоверно уменьшена экспрессия *PgCDPK1a*, *PgCDPK1b*, *PgCDPK3a* и *PgCDPK4a*; появлялись транскрипты, в киназном домене которых выпадает несколько аминокислот (*PgCDPK2ds*).

4. По мере развития соматических эмбрионов в клеточной линии женьшеня 2с3 значительным изменениям в экспрессии подверглось подсемейство *PgCDPK2d* (*PgCDPK2d*, *PgCDPK2ds* и *PgCDPK2dL*): на ранних стадиях соматического эмбриогенеза достоверно активировалась экспрессия *PgCDPK2d* и появлялись транскрипты, в киназном домене которых выпадают несколько аминокислот (*PgCDPK2ds*); поздние стадии характеризовались появлением экспрессии доминирующего транскрипта *PgCDPK2dL*, в последовательности киназного домена которого встречаются стоп-кодоны.

5. Впервые получена полная последовательность белок кодирующей части кДНК *CDPK* женьшеня *P. ginseng* – *PgCDPK1a*. Обнаружена положительная корреляция между приростом сырой биомассы клеток *P. ginseng* и экспрессией *PgCDPK1a* и отрицательная корреляция между уровнем экспрессии патоген-связанных генов и содержанием гинзенозидов с уровнем экспрессии *PgCDPK1a*. Таким образом *PgCDPK1a*, возможно, является позитивным регулятором роста клеток женьшеня.

Список работ по теме диссертации:

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах из списка ВАК:

1. Kiselev K.V., Turlenko A.V., Zhuravlev Y.N. 2009. *CDPK* gene expression in somatic embryos of *Panax ginseng* expressing *rolC* // Plant Cell Tissue and Organ Culture. V. 99. P. 141–149.

2. Kiselev K.V., Turlenko A.V., Zhuravlev Y.N. 2009. *PgWUS* expression during somatic embryo development in a *Panax ginseng* 2с3 cell culture expressing the *rolC* oncogene // Plant Growth Regulation. V. 59. P. 237–243.

3. Kiselev K.V., Turlenko A.V., Zhuravlev Y.N. 2010. Structure and expression profiling of a novel calcium-dependent protein kinase gene *PgCDPK1a* in roots, leaves, and cell cultures of *Panax ginseng* // Plant Cell Tissue and Organ Culture. V. 103. P. 197–204.

Работы, опубликованные в материалах региональной, всероссийских и международных научных конференций:

4. Киселев К.В., Турленко А.В. 2008. Механизм соматического эмбриогенеза в культурах клеток женьшеня, экспрессирующих онкоген *rolC* // В сборнике тезисов IX Международной конференции "Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология", Звенигород, Россия, С. 176–177.

5. Турленко А.В., Киселев К.В. 2008. Экспрессия генов *CDPK* на разных стадиях развития соматических эмбрионов в культуре клеток женьшеня *Panax ginseng*, экспрессирующей агробактериальный ген *rolC* // Актуальные проблемы экологии, морской биологии и биотехнологии. Владивосток. С. 8–10.

6. Турленко А.В., Киселев К.В. 2009. Экспрессия генов *WUS* на разных стадиях развития соматических эмбрионов в культуре клеток женьшеня *Panax ginseng*, экспрессирующей агробактериальный ген *rolC* // XII Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии. Владивосток. С. 89.

7. Turlenko A.V., Kiselev K.V. 2009. Changes of *CDPK* genes expression during embryogenesis in *Panax ginseng rolC*-expressing cell culture 2с3 // Acta Biologica Sracoviensia Series Botanica. V. 51. P. 24.

8. Турленко А.В., Киселев К.В. 2010. Структура и экспрессия кальций зависимой протеинкиназы *PgCDPK1a* в корнях, листьях и клеточных культурах женьшеня *Panax ginseng* // XIII Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии. Владивосток. С. 72.