

КЛОНИРОВАНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ *SaCLCa1* И *SaCLCc1* СЕМЕЙСТВА ХЛОРИДНЫХ КАНАЛОВ (CLC) ИЗ ГАЛОФИТА *SUAEDA ALTISSIMA* (L.) Pall.

О.И. Неделева¹, А.В. Шувалов¹, Ю.В. Орлова¹, Л.А. Халилова¹, Д.В. Беляев¹,
Н.А. Мясоєдов¹, О.В. Майорова¹, А.А. Юрченко², Л.Г. Попова¹, Ю.В. Балнокин^{1,3},
И.В. Карпычев¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия, olga.nedelyaeva@yandex.ru

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский государственный университет", Центр геномной биоинформатики им. Ф.Г. Добржанского, Санкт-Петербург, Россия

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Аннотация. Клонировали два гена семейства *CLC* (chloride channel) – *SaCLCa1* и *SaCLCc1* – из галофита *Suaeda altissima* (L.) Pall. Для исследования функции *SaCLCa1* и *SaCLCc1* были экспрессированы в мутанте *Saccharomyces cerevisiae* Δ *gef1*. Экспрессия *SaCLCc1* в Δ *gef1* приводила к восстановлению роста мутанта на селективных средах. Экспрессия *SaCLCa1* восстанавливала рост Δ *gef1* на одной из сред только при замене в селективном фильтре пролина в положении 188 на серин. *SaCLCa1* и *SaCLCc1* экспрессировались во всех органах *S. altissima*. Дефицит NO_3^- в среде стимулировал экспрессию *SaCLCa1*, что особенно заметно в корнях. Предполагается, что *SaCLCa1* транспортирует NO_3^- , тогда как *SaCLCc1* – Cl^- .

Ключевые слова: транспорт ионов, *CLC*, галофит *Suaeda altissima*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-952-956

Семейство хлоридных каналов *CLC* (Chloride channel) включает анионные каналы и анион/ H^+ -антипортеры. Белки семейства *CLC* локализованы в эндомембранах. Они участвуют в стимуляции закисления люмена органелл, накоплении в них анионов (Cl^- и NO_3^-), а, опосредованно, и катионов (Na^+), а также в регуляции трансмембранного электрического потенциала [Zifarelli, Pusch, 2010].

Поскольку белки *CLC* вовлечены в компартментацию Cl^- и Na^+ и в регуляцию трансмембранного потенциала клеточных органелл, мы предположили, что они играют важную роль в солеустойчивости галофитов. Галофит *Suaeda altissima* (сведа высокая) является одним из наиболее солеустойчивых растений, способным произрастать на средах, в которых концентрация NaCl достигает 1 М.

Целью работы являлось клонирование двух генов *CLC*, *SaCLCc1* и *SaCLCa1*, из *S. altissima* и определение функциональной роли белков *SaCLCc1* и *SaCLCa1* путем гетерологичной экспрессии в нокаут-мутанте Δ *gef1* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. *GEF1* является единственным геном семейства *CLC* у *S. cerevisiae*. *Gef1p* локализован в пост-Гольджи везикулах, тонопласте, плазмалемме и участвует в транспорте Cl^- . Нокаут гена *GEF1* приводит к подавлению роста мутантных клеток на Fe-дефицитных средах с неферментируемыми источниками углерода, на минимальных синтетических средах с высокими pH (7.0 и более), на средах с повышенным содержанием токсичных катионов, в частности Mn^{2+} и $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ [Gaxiola et al., 1998; Lopez-Rodriguez et al., 2007].

Для определения последовательностей генов и их клонирования из корней растений *S. altissima*, выращенных в водной культуре с добавлением 250 мМ NaCl , выделили тотальную РНК. Чтобы клонировать *SaCLCa1* (KX013489.1, GenBank) (1):

секвенировали фрагмент *SaCLCa1*, который был амплифицирован с использованием пары вырожденных праймеров, подобранных к наиболее консервативному участку путем выравнивания последовательностей *CLC* из различных растений; (2): определили полноразмерную последовательность *SaCLCa1* методами 3'-, 5'-RACE и (3): на основе полноразмерной последовательности подобрали праймеры для клонирования кодирующей части *SaCLCa1* методом In-fusion HD (Clontech) в дрожжевой экспрессионный вектор pMB1.

Опубликование массива коротких прочтений транскриптома (NCBI, SRA, PRJNA279962) близкородственного вида *S. fruticosa* (L.) Forssk. позволило клонировать *SaCLCc1* (MG670589.1, GenBank) другим путем. (1) В собранном нами транскриптом *S. fruticosa* были идентифицированы контиги, содержащие кодирующие регионы (CDS) семи генов, гомологичных генам *CLC A. thaliana*, и по сходству с ними обозначенные как последовательности *SfCLCa/b1*, *SfCLCa/b2*, *SfCLCc1*, *SfCLCc2*, *SfCLCd*, *SfCLCe/f*, *SfCLCg*. (2) Используя последовательность *SfCLCc1*, подобрали пару праймеров для амплификации и секвенирования фрагмента полноразмерной последовательности *SaCLCc1*. Полученный фрагмент был на 99% идентичен соответствующему участку *SfCLCc1*. Основываясь на высоком сходстве частичных последовательностей *SaCLCc1* и *SfCLCc1*, для амплификации полноразмерной последовательности *SaCLCc1* подобрали праймеры, расположенные в не кодирующих 5'- и 3'-областях *SfCLCc1*. Амплифицированный фрагмент включал полноразмерную CDS *SaCLCc1*. (3) Используя полноразмерную последовательность, подобрали праймеры для клонирования *SaCLCc1* методом Gibson assembly (NEB) в дрожжевой экспрессионный вектор pMB1.

Трансляция нуклеотидных последовательностей в аминокислотные последовательности показала, что в *SaCLCa1* и *SaCLCc1* присутствуют оба ключевых глутамата, характерных для анион/ H^+ -антипортеров семейства *CLC*. В селективном фильтре G(P/S)GIP у *SaCLCa1* находится пролин, а у *SaCLCc1* – серин. Показано, что серин отвечает за сродство к Cl^- , а пролин – к NO_3^- [Zifarelli, Pusch, 2010].

Для исследования функции *SaCLCa1* и *SaCLCc1* были экспрессированы в полученном нами делеционном дрожжевом мутанте $\Delta gef1::LEU2$. Мутант получили на основе штамма дикого типа *S. cerevisiae* W3031A (MATa *leu2*, *his3*, *trp1*, *ura3*, *ade2*). В качестве положительного контроля комплементации мутации использовали клонированный в pMB1 ген *AtCLCd*. *AtCLCd* транспортирует Cl^- и восстанавливает рост мутанта $\Delta gef1$, как показано в работе [Lv et al., 2009].

Мутант $\Delta gef1$ был трансформирован конструкциями pMB1-*SaCLCa1*, pMB1-*SaCLCc1* и pMB1-*AtCLCd* литиевым методом. Полученные штаммы высаживали на ряд агаризованных селективных сред [Gaxiola et al., 1998]. В соответствии с данными, представленными в этой работе, в наших экспериментах рост мутанта подавлялся на Fe-дефицитных средах с неферментируемыми источниками углерода (рис. 1, среда 7), на минимальных синтетических средах с pH 7.0 (рис. 1, среда 9, 11), на средах с повышенным содержанием токсичных катионов, в частности Mn^{2+} (рис. 1, среды 2-5).

Рост трансформированного мутанта $\Delta gef1$, экспрессирующего *SaCLCc1*, так же, как и мутанта, экспрессирующего *AtCLCd*, восстанавливался при выращивании клеток на дефицитной по Fe-среде YPEG (2% этанол и 2% глицерин – неферментируемые источники углерода, 1% дрожжевой экстракт, 2% пептон) и на минимальных синтетических средах: SD (2% декстроза – ферментируемый источник углерода, 50 mM Mes-Tris, pH 7.0) и SR (2% раффиноза – неферментируемый источник углерода, 50 mM Mes-Tris, pH 7.0) (рис. 1, среды 7, 9, 11). Восстановление роста трансформантов наблюдалось также при выращивании клеток на богатой среде YPD (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 2% декстроза), содержащей токсичные ионы Mn^{2+} (рис. 1, среды 2-5).

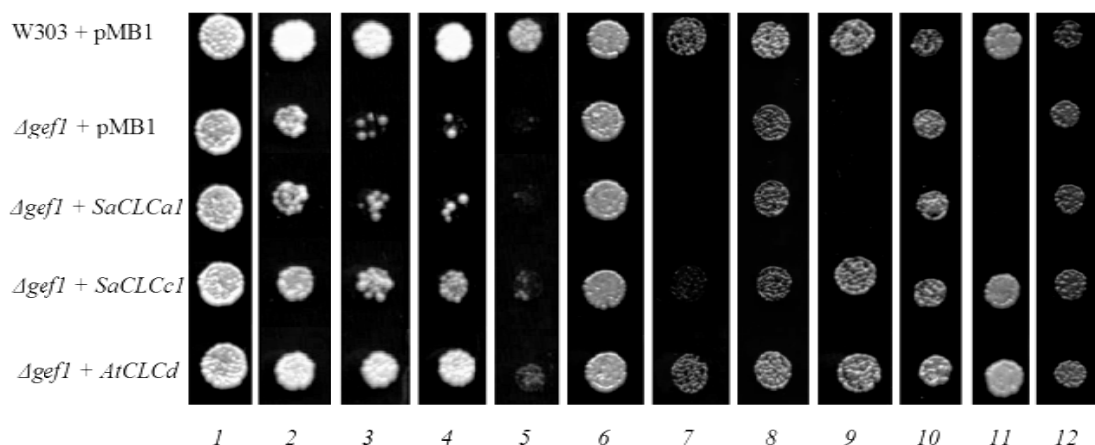


Рис. 1. Рост мутанта *Δgef1*, трансформированного генами *SaCLCc1*, *SaCLCa1* и *AtCLCd*, на селективных средах. Контрольные варианты: дикий тип W303 и мутант *Δgef1*, трансформированные вектором pMB1. Селективные среды: 1 – YPD; 2 – YPD, 2 mM $MnCl_2$; 3 – YPD, 3 mM $MnCl_2$; 4 – YPD, 2 mM $MnSO_4$; 5 – YPD, 3 mM $MnSO_4$; 6 – YPEG; 7 – YPEG, 1 mM феррозин (хелатор Fe^{2+}); 8 – YPEG, 1 mM феррозин, 0,1 mM $CuSO_4$; 9 – SD, pH 7; 10 – SD, pH 7, 0,1 mM $CuSO_4$; 11 – SR, pH 7; 12 – SR, pH 7, 0,1 mM $CuSO_4$. Показано разведение 1:100 – 10^5 кл/мл.

Экспрессия *SaCLCa1* не приводила к восстановлению роста мутанта *Δgef1* на селективных средах. Однако замена пролина в селективном фильтре *SaCLCa1* в положении 188 на серин привела к частичному восстановлению роста *Δgef1* на среде YPD с повышенным содержанием токсичных катионов Mn^{2+} (рис. 2).

Для оценки уровня экспрессии *SaCLCa1* и *SaCLCc1* в органах *S. altissima* растения вырастили в водной культуре в ряду засоления (0, 250 и 750 mM NaCl) (1) в богатой по содержанию нитрата среде – 15 mM NO_3^- и (2) в условиях дефицита нитрата – 0,75 mM NO_3^- .

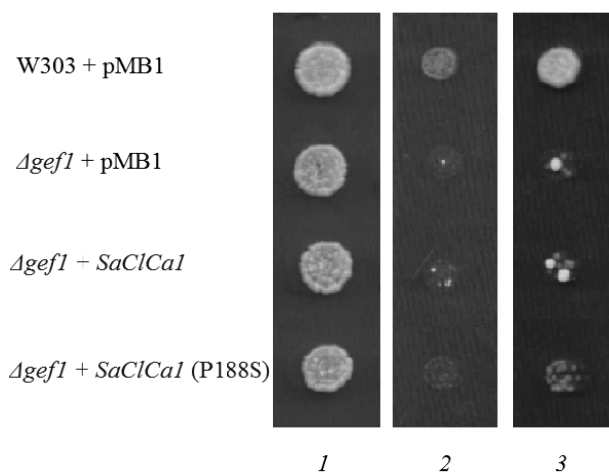


Рис. 2. Рост мутанта *Δgef1*, экспрессирующего *SaCLCa1(P188S)*, на селективных средах. Контрольные варианты: дикий тип W303 и мутант *Δgef1*, трансформированные вектором pMB1. Селективные среды: 1 – YPD; 2 – YPD, 3 mM $MnSO_4$ (рост в течение 2-х дней); 3 – YPD, 3 mM $MnSO_4$ (3 дня роста). Показано разведение 1:100 – 10^5 кл/мл.

Тотальная РНК была выделена из листьев, стеблей и корней растений. Уровень представленности транскриптов оценивали с помощью Real-time PCR относительно актина 7 и фактора элонгации 1-альфа. *SaClCa1* и *SaClCc1* экспрессировались во всех органах *S. altissima*. Дефицит NO_3^- стимулировал экспрессию *SaClCa1* в органах *S. altissima*, особенно в корнях (рис. 3), тогда как засоление в условиях разной доступности NO_3^- влияло на экспрессию *SaClCc1* в гораздо меньшей степени (данные не приведены).

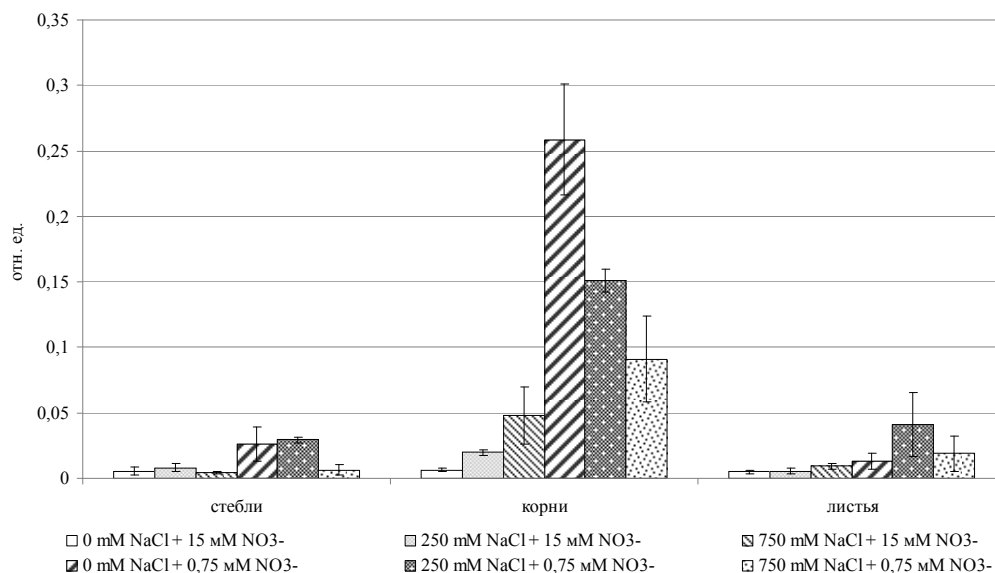


Рис. 3. Уровень представленности транскриптов *SaClCa1* в органах *S. altissima* при разных концентрациях NaCl и NO_3^- в среде выращивания (Real-time PCR) относительно актина. Бары – стандартное отклонение.

Комплементация фенотипа мутанта *Δgef1* геном *SaClCc1* свидетельствует об участии белка *SaClCc1* в транспорте ионов Cl^- . Мы предположили, что восстановление переноса Cl^- в пост-Гольджи везикулы нейтрализует накапливающиеся в люменах положительные заряды при функционировании H^+ -V-АТФазы и Cu^{2+} -АТФазы, стимулируя их этим. Подкисление люмена H^+ -V-АТФазой и поступление в люмен ионов меди необходимо для формирования высокоаффинной системы поглощения железа. Конвертирование $\Delta\phi$ в ΔpH при стимуляции H^+ -V-АТФазы хлоридным транспортером приводит к образованию ΔpH , достаточного по величине для компартиментации токсичных ионов Mn^{2+} , и, следовательно, к восстановлению роста мутанта *Δgef1*, экспрессирующего *SaClCc1*, на средах, содержащих ионы Mn^{2+} .

Отсутствие комплементации мутации *Δgef1* при экспрессии *SaClCa1*, частичное восстановление роста мутанта, экспрессирующего *SaClCa1*(P188S), а также возрастание экспрессии *SaClCa1* в органах *S. altissima* в условиях дефицита NO_3^- в среде выращивания указывают на возможное участие белка *SaClCa1* в транспорте ионов NO_3^- .

Литература

- Gaxiola R.A., Yuan D.S., Klausner R.D., Fink G.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1998. – V. 95. – P. 4046–4050.
- Lopez-Rodriguez A., Trejo A.C., Coyne L., Halliwell R.F., Miledi R., Martinez-Torres A. // FEMS Yeast Res. – 2007. – V. 7. – P. 1218–1229.
- Lv Q.D., Tang R.J., Liu H., Gao X.S., Li Y.Z., Zheng H.Q., Zhang H.X. // Plant Science. – 2009. – V. 176. – P. 650–661.

CLONING AND FUNCTIONAL CHARACTERISTIC OF THE *SaCLCa1* AND *SaCLCc1* GENES OF CHLORIDE CHANNEL FAMILY (CLC) FROM HALOPHYTE *SUAEDA ALTISSIMA* (L.) Pall.

O.I. Nedelyaeva¹, A.B. Shuvalov¹, Yu.V. Orlova¹, L.A. Khalilova¹, D.V. Belyev¹, N.A. Myasoedov¹, O.V. Mayorova¹, A.A. Yurchenko², L.G. Popova¹, Yu.V. Balnokin^{1,3}, I.V. Karpichev¹

¹K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia, olga.nedelyaeva@yandex.ru

²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Saint-Petersburg State University", Theodosius Dobzhansky Center for Genome Bioinformatics, Saint-Petersburg, Russia

³Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. *SaCLCa1* and *SaCLCc1*, the genes of the CLC (chloride channel) family were cloned from halophyte *Suaeda altissima* (L.) Pall.. To study functions, *SaCLCa1* and *SaCLCc1* were expressed in the mutant *Saccharomyces cerevisiae* Δ *gef1*. Expression of *SaCLCc1* in Δ *gef1* led to restoration of mutant growth on selective media. Expression of *SaCLCa1* restored the growth of Δ *gef1* on one of the media only when proline was replaced with serine in the selective filter at position 188. *SaCLCa1* and *SaCLCc1* were expressed in all organs of *S. altissima*. Deficiency of NO₃⁻ in the medium stimulated the expression of *SaCLCa1*, especially noticeable in the roots. It is assumed that *SaCLCa1* transports NO₃⁻, whereas *SaCLCc1* - Cl⁻.

Keywords: ion transport, CLC, *Suaeda altissima* halophyte