

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН І ГЕНЕТИКИ

На правах рукопису

ЄФІМЕНКО Ігор Михайлович

**КЛОНУВАННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ
РЕГУЛЯТОРНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ГЕНУ
ПАТАТИНУ КЛАСУ I *SOLANUM TUBEROSUM L.***

03.00.15. - генетика

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1997



Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі біоінженерії Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України та у відділі молекулярної ембріогенетики і клітинного диференціювання Інституту молекулярної генетики РАН

Наукові керівники: доктор біологічних наук
Галкін А.П.
доктор біологічних наук, професор
Газарян К.Г.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Малюта С.С.
доктор біологічних наук
Левенко Б.О.

Провідна організація: Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Захист дисертації відбудеться "29" травня 1997 року на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 50.09.01. по захисту дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора наук при Інституті фізіології рослин і генетики НАН України за адресою: 252022, Київ-22, вул. Васильківська 31/17.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту фізіології рослин і генетики НАН України.

Автореферат розісланий "29" квітня 1997 р.

**Вчений секретар
спеціалізованої ради**

Труханов В.А.

AB 37.507

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

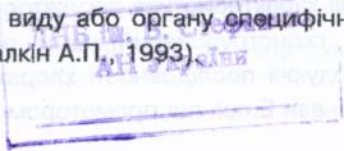
Актуальність проблеми.

Одержання трансгенних рослин з вибірковою експресією чужерідних генів в певних органах або тканинах рослин може допомогти розкриттю видо- або тканино-специфічної регуляції експресії генів в клітинах еукаріот на транскрипційному, посттранскрипційному, трансляційному та посттрансляційному рівнях. Цей підхід може бути також використаний при розробці засобів поліпшення властивостей сільськогосподарських культур, тому що, як правило, потрібно, щоб експресія введеного гену відбувалась в певній тканині рослини.

Відомо, що здатність РНК-полімерази ініціювати транскрипцію залежить головним чином від властивостей промотору та прилягаючих до нього регуляторних послідовностей (Walden et al., 1990). Тому клонування та структурно-функціональне вивчення промоторів генів вищих рослин є одним з самих важливих розділів сучасної молекулярної біології та генетики рослин. На даному етапі клоновано та вивчено декілька десятків промоторів рослин, та лише тільки деякі регуляторні послідовності являють інтерес в біотехнологічному прикладному аспекті (Dyban, 1989).

Функціональний аналіз промоторів проводять, досліджуючи ефективність експресії химерних маркерних генів, активність яких легко тестувати в рослинних клітинах (бактеріальні гени хлорамфеніколацетилацетилтрансферази (CAT) (Gorman et al., 1982), β -глюкуронідази (GUS) (Jeferson et al., 1987) та неоміцинофосфотрансферази II (NPT II) (Reiss et al., 1984), порівнюючи її з транскрипційною активністю різних делеційних варіантів вивчаемого промотору. Використовуючи цей підхід, вдалося встановити, що в багатьох випадках тканиноспецифічна експресія генів в рослинах контролюється окремими ділянками послідовності ДНК, які називаються *cis*-діючими або *cis*-активними елементами. Це означає, що ці ділянки ДНК можуть впливати лише на послідовності, що розташовані на тій ж молекулі ДНК, на якій знаходяться самі, і не можуть впливати на інші послідовності, розташовані в інших місцях.

Сучасні досягнення у вивченні молекулярних механізмів експресії генів свідчать про те, що регуляція вже на рівні транскрипції характеризується участю для кожного виду або органу специфічних *cis*- і *trans*-факторів (Доманський М.М., Галкін А.П., 1993).



Зручною моделлю для дослідження механізмів органоспецифічної експресії у клітинах рослин є гени запасних білків, зокрема, гени запасного білку картоплі - пататину. Експресія цього гена виключно бульбоспецифічна, а також може бути індукована і в зелених частинах рослин при підвищенні концентрації сахарози (7-10%) в середовищі для культивування. Таким чином, експресія генів пататину є не тільки органоспецифічною, а також індукується зовнішніми факторами. Необхідно також відмітити, що пататин містить у складі білкової молекули всі незамінні амінокислоти, отже, його гени можуть бути використані для біотехнологічних цілей. За останнє десятиріччя із багатьох існуючих в геномі генів пататину (70 копій на тетраплоїдний геном *Solanum tuberosum* L.) клоновані тільки деякі (Liu et al., 1991; Mignery et al., 1988; Bevan et al., 1986). Причому така велика кількість копій генів пататину значно ускладнює клонування та вивчення регуляторних послідовностей цих генів, які забезпечують специфічність експресії.

Мета і завдання дослідження.

Метою роботи було клонувати регуляторну 5'-ділянку гену пататину класу I картоплі *Solanum tuberosum* L. та на її основі сконструювати універсальний вектор для бульбо-специфічної експресії чужерідних генів у трансгенних рослинах картоплі.

Згідно з поставленою метою в завдання експериментальної роботи входило:

1. Виділити геномні клони з бібліотеки генів картоплі, які містять послідовності, комплементарні консервативній послідовності 5'-регуляторної ділянки генів пататину класу I.
2. Визначити регуляторну та структурну ділянки гену пататину класу I.
3. Сконструювати вектор для органоспецифічної експресії генів *cat* і *hsk* під контролем промотору пататину в клітинах картоплі.
4. Провести молекулярно-біологічний аналіз активності ферментів CAT та HSK у трансгенних рослинах картоплі.

Наукова новизна роботи.

Вперше був клонований раніше не визначений промотор гену пататину класу I і на його основі сконструйовано вектор pDE1 для бульбоспецифічної експресії чужерідних генів у клітинах картоплі. Була дана структурна характеристика регуляторної ділянки гену пататину.

В сконструйований нами вектор введено химерні гени, які містять кодуючі послідовності хлорамфеніколацетилтрансферази та гомосеринкінази *E.coli* під промотором гену пататину класу I.

Була одержана конструкція, яка містила химерний ген хлорамфеніколацетилтрансферази під контролем делеційного варіанту промотору пататину. Показано, що делеція BglII-BglII фрагменту в позиції від -321 п.н. до -131 п.н. знижує експресію в бульбах, а також повністю усуває індуковану сахарозою експресію в листях трансгенних рослин. Була визначена нуклеотидна послідовність BglII-BglII фрагменту та ідентифіковані консенсус-послідовності, які мають властивості енансерів у промоторах генів пататину класу I.

Клоновано повнорозмірний ген пататину класу I і побудована його рестриктна карта.

Вперше були отримані трансгенні рослини картоплі з бульбоспецифічною експресією гену гомосеринкінази *E.coli* під контролем промотору пататину. Було встановлено посилення синтезу тотального білку у трансгенних рослинах картоплі під впливом екзогенного гену гомосеринкінази *E.coli*.

Практична цінність роботи.

Отримані трансгенні рослини являють собою модельні системи для вивчення органоспецифічної та регулюємої зовнішніми факторами експресії генів вищих рослин.

Сконструйований вектор pDE1, який забезпечує бульбоспецифічну експресію чужерідних генів в трансгенних рослинах картоплі, є перспективним для одержання експресуючих конструкцій для подальшої трансформації рослин з метою надання їм цінних сільськогосподарських ознак (стійкість до гербіцидів, личинок комах-шкідників, хвороб тощо). Можливе також використання органоспецифічного промотору гену пататину для одержання трансгенних рослин, як біореакторів фізіологічно-активних сполук (білків, вуглеводів та ліпідів).

Оскільки амінокислотний індекс пататину дорівнює 100%, клонована кодуєча послідовність гену пататину класу I може бути використана для генно-інженерних робіт з метою підвищення харчових якостей культурних рослин.

Апробація роботи. Результати дисертаційної роботи доповідались на XVII Міжнародному генетичному конгресі (Бірмінгем, Англія, 1993); на II-му (1993) та III-му (1995) Симпозіумах "Нові методи біотехнології рослин" (Пушино, Росія); на Міжнародному симпозіумі "Біотехнологія та генетична інженерія рослин" (Київ, 1994), на конференціях та семінарах Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України.

Основні положення, що виносяться на захист:

1. Можливість виділення регуляторної та структурної ділянок генів пататину класу I з бібліотеки генів картоплі.

2. Спроможність конструювання бульбо-специфічних експресуючих векторів на основі промотору гену пататину та кодуєчих ділянок генів хлорамфениколацетилтрансферази (*cat*) і гомосеринкінази (*hsk*) *E.coli*.

3. Можливість одержання генетично трансформованих рослин картоплі з бульбо-специфічною експресією генів *cat* і *hsk*.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 8 робіт.

Структура та об'єм роботи. Дисертація викладена на 138 сторінках машинописного тексту і складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, результатів дослідження та їх обговорення, заключення, висновків та списку цитованої літератури, який містить 165 джерел. Робота проілюстрована 28 рисунками.

Конкретний особистий внесок дисертанта. Всі основні результати роботи отримані автором.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для клонування використовували штам *E.coli* TG1, штам DP-50 та TAP-90 були використані як EK2-хазяїн для виділення і розмноження рекомбінантів бактеріофагу λ (Patterson et al., 1987). Для трансформації рослин використовували штам *A.tumefaciens* C58Cl (pGV3850). Об'єктом трансформації була картопля *Solanum tuberosum* L. сортів "Зарево" та "Невський".

Для клонування та одержання векторних молекул ДНК використовували ферменти рестрикції та ДНК-модифікуючі ферменти фірм "Fermentas" (Литва), "New England BioLabs" (США), "Serva" (Швеція), "Promega" (США).

Плазмідну ДНК виділяли лужним методом (Birnboim & Doly, 1977) з модифікаціями. Виділення фагової ДНК проводили за стандартною методикою, як описано у (Patterson et al. 1987; Маниатис і соавт., 1984).

Саузерн-гібридизацію фракціонованої фагової та плазмідної ДНК з міченим олігонуклеотидним зондом проводили згідно (Маниатис і соавт., 1984).

Визначення первинної структури ДНК проводили за методом Сенгера (Sanger et al., 1977) з використанням Т7-ДНК-полімерази (секвенази) і фрагменту Кленова.

Аналіз гомології нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою пакетів програм PC/GENE ("Intelligenetics", США) та DNA-SUN (ДНДІ Генетики промислових мікроорганізмів РАН). Інформація про нуклеотидні послідовності генів рослин отримана з бази даних, сформованої на основі бази даних EMBL (Гейдельберг, Германія), Інформаційного центру Інституту молекулярної генетики РАН.

Трансформацію клітин *A.tumefaciens* проводили прямим методом за (Burgow et al., 1990).

Трансформацію рослин проводили за допомогою методу культивування мікробульбових дисків з *Agrobacterium* (Ishida et al., 1989; Медведева і співавт., 1996). Селекцію трансформантів проводили на середовищі з канаміцином у концентрації 100-200 мг/л.

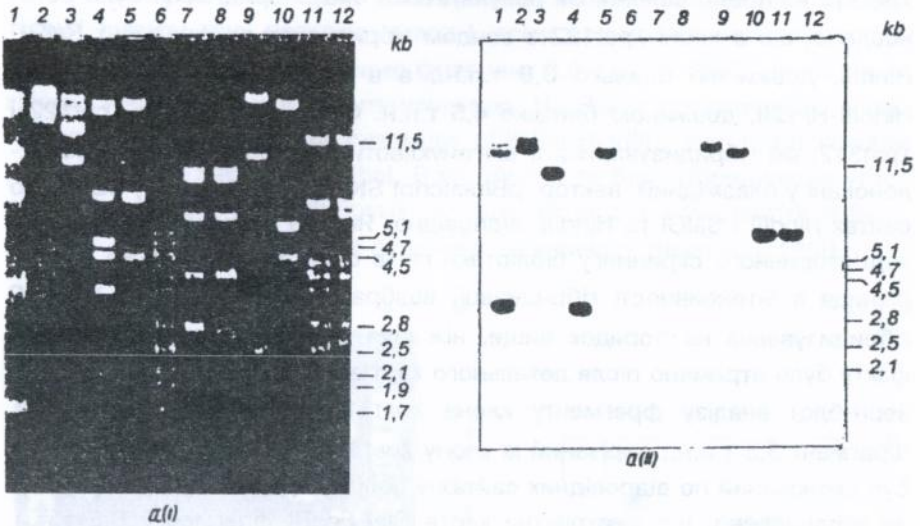
Наявність експресії гену *cat* у трансгенних рослинах визначали за методом Гормана (Gorman et al., 1982). Аналіз активності гомосеринкінази здійснювали спільно з співробітниками відділу молекулярної ембріогенетики Інституту молекулярної генетики РАН. Метод був розроблений Генінгом і співавт. для визначення активності ГСК у клітинах бактерій та тварин (Генинг і соавт., 1994).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

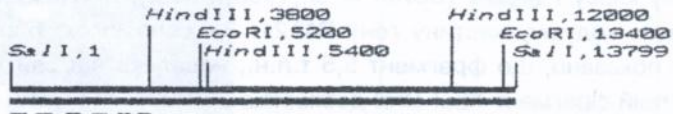
1. Пошук послідовностей генів пататину в геномній бібліотеці картоплі.

Ген пататину класу I, позначений як B33 (Rocha-Sosa et al., 1989), містить у складі промотору прямий повтор довжиною 208 п.н. та АТ-збагачену послідовність довжиною 37 п.н., яка тандемно повторюється три рази. Промотор гену пататину B33 здатний спрямовувати експресію чужерідних генів виключно у клітинах бульб, а також при індукції 7-10% сахарозою - у клітинах листової тканини. Було встановлено, що промотор гену B33 в 5 разів більш активний, ніж промотор гену такого ж класу B24 (Liu et al., 1991).

Виходячи з цих результатів, для того, щоб виявити молекулярні механізми, які складають основу комплексного контролю експресії генів пататину та встановити значення АТ-збагаченого повтору (37 п.н.) у цих механізмах, було вирішено клонувати промотори пататину аналогічного типу з геномної бібліотеки генів картоплі сорту Зарево, який широко культивується у країнах СНД.



λ pat122



6

λ pat312

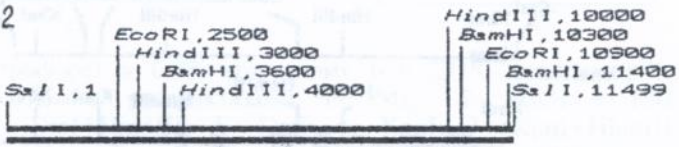


Рис.1. Саузерн-блот аналіз геномного клону λ pat122. (а) Електрофорез в 0,7% агарозному гелі ДНК клону λ pat122, гідролізованної різними ендонуклеазами рестрикції (I) та радіоавтограф, одержаний під час гібридизації утворених фрагментів з P^{32} -міченим пататин-специфічним зондом (II); 1-XbaI; 2-BamHI; 3-SalGI; 4-SalGI+HindIII; 5-HindIII; 6- λ DNA+PstI; 7-DraI; 8-DraI+EcoRI; 9-EcoRI; 10-HindIII+EcoRI; 11-ClaI+EcoRI; 12-ClaI; (б) Рестриктні карти клонів λ pat122 та λ pat312. Фрагменти, які гібридизуються з пататиновим зондом виділені пунктиром.

λ pat312 не представлені). За результатами блот-гібридизації було встановлено, що в клоні λ pat122 з зондом гібридується фрагмент SalGI-HindIII, довжиною близько 3,8 т.п.н., а в клоні λ pat312 - фрагмент HindIII-HindIII, довжиною близько 4,5 т.п.н. Фрагменти клонів λ pat122 і λ pat312, які гібридувалися з олігонуклеотидним зондом, були переклоновані у плазмідний вектор pBluescript SK(+), ("Stratagene", США) по сайтах HindIII і SalGI та HindIII, відповідно. Як вже відзначалось вище, в ході вторинного скринингу бібліотеки генів була виявлена дуже сильна різниця в інтенсивності гібридизації відібраних клонів - клон λ pat122 гібридувався на порядок вище, ніж клон λ pat312. Пояснення цього факту було отримано після детального картування та паралельного Саузерн-блот аналізу фрагменту клона λ pat312 довжиною ~ 5,5 т.п.н. Фрагмент 5,5 т.п.н., вирізаний із клону λ pat312 по сайтах ClaI та EcoRI, був клонований по відповідних сайтах у полілінкер плазмиди pSK(+). Було встановлено, що рестриктна карта ClaI-EcoRI фрагменту 5,5 т.п.н. співпадає з рестриктною картою одного з перших клонованих генів пататину класу I PAT21 (Bevan et al., 1986) (Рис.2), причому збіг припадає саме на кодуючу частину гену PAT21. За допомогою блот-гібридизації було показано, що фрагмент 5,5 т.п.н., недалеко від сайту ClaI, містить короткий фрагмент XbaI-DraI довжиною 250-300 п.н., який гібридується з пататиновим зондом. Ймовірно, що саме цей факт і пояснює таку сильну різницю в інтенсивності гібридизації клонів λ pat122 і λ pat312.

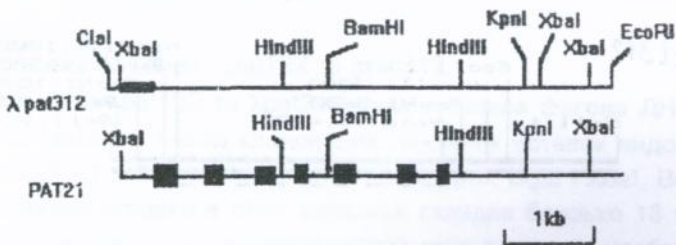


Рис.2. Рестриктні карти фрагменту ClaI-EcoRI (5,5 т.п.о.) клону λ pat312 та кодуючої ділянки гену PAT21 (Bevan et al., 1986). Ділянка, яка гібридується з пататиновим зондом виділена жирною лінією; екзони гену PAT21 виділені заштрихованими блоками.

Оскільки до завдань даної роботи входило клонування промоторної ділянки гену пататину класу I, тому для подальшої роботи був відібраний клон λ pat122, а саме фрагмент 3,8 т.п.н. - SalGI-HindIII, який гібридизувався з високою інтенсивністю. На Рис.3 представлено електрофоретичне розділення плазмиди pSK(Sal-HindIII), яку гідролізували рестриктазами SalGI, DraI, XbaI, BglII, HindIII, та блот-гібридизація утворених фрагментів з пататиновим зондом. Як видно з радіоавтографу, з зондом гібридизується DraI-фрагмент довжиною близько ~ 1800 п.н.

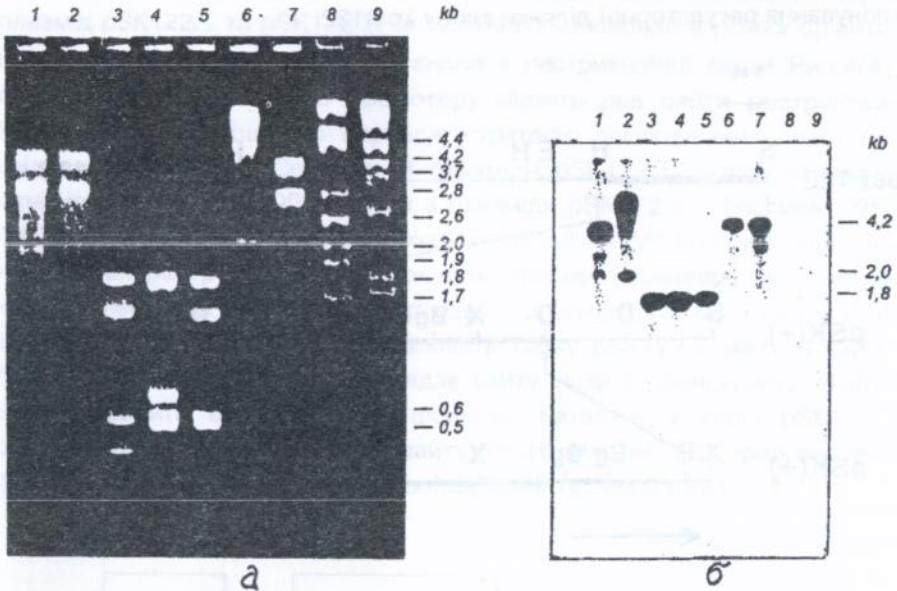
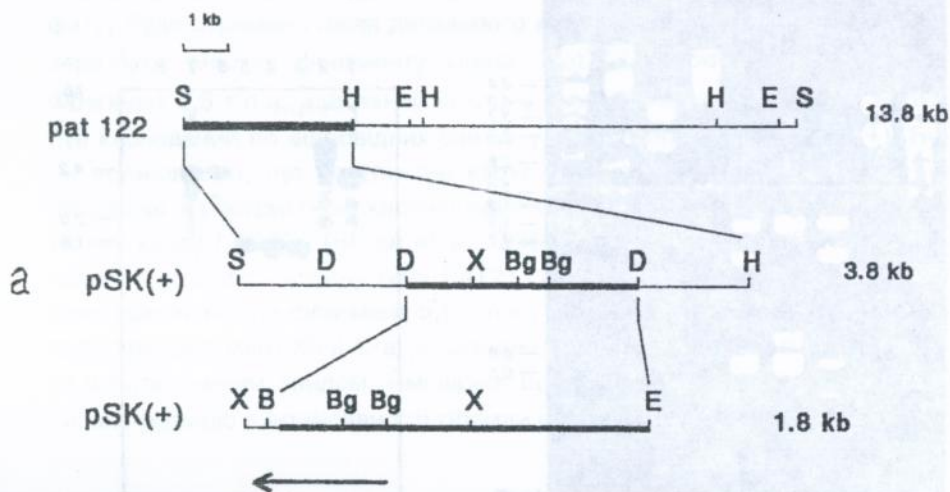


Рис.3. (а) Електрофорез в 0,8% агарозному гелі ДНК плазмиди pSK(Sal-HindIII), гідролізованої рестриктазами: 1- PstI; 2- SalGI + PstI; 3- DraI+SalGI; 4- DraI+HindIII; 5- DraI; 6- KpnI; 7- KpnI+HindIII; 8- pDNt23+PstI; 9- λ DNA+PstI. (б) Радіоавтограф Саузерн-гібридизації утворених фрагментів з P^{32} -міченим пататиновим зондом.

Порівнюючи рестриктні карти та нуклеотидні послідовності відомих генів пататину класу I, які були виявлені в комп'ютерному банку нуклеотидних послідовностей EMBL за допомогою програми "PC-GENE", ми встановили, що 5'-кінець всіх генів пататину досить консервативний, причому на початку кодуючої послідовності усіх секвенованих генів класу I знаходиться сайт рестриктази DraI. Цей сайт розташований в 5'-нетранслюємій частині генів через 12-20 п.о. після точки ініціації тран-

скрипції. Таким чином, промоторну ділянку гену пататину можна клонувати як *DraI*-фрагмент (Rosh-Sosa et al., 1989). Враховуючи цю обставину, ми клонували *DraI*-фрагмент у плазміді pSK(+) в сайт *SmaI*. Для того, щоб довести, що фрагмент, який нас цікавить, був клонований у полілінкер плазміди, було також проведено Саузерн-блот гібридизацію з міченим олігонуклеотидним зондом. Сайт рестрикції *SmaI* був відібраний для клонування тому, що в полілінкері pBluescript SK(+) він фланкований сайтами рестриктаз *EcoRI* та *BamHI*, що дуже зручно для подальшого конструювання химерних генів. На Рис.4(A) представлена схема клонування регуляторної ділянки клону λ pat122.



TTGGTATGTCAAACSTCAAATAGAGAATTTAGCTCAACGGTTGTTT

-32

ACGTGACCTATATATAAGCCATGACGTAGTATATATGCTCAAAGCAC

*

CAACAAAATTT | GGGGGATCC

Рис.4. (а) Схема клонування регуляторної ділянки гену пататина λ pat122. Виділено фрагменти, які гібридизуються з пататиновим зондом; стрілкою позначено орієнтацію промотору; S- *SalGI*; H- *HindIII*; D- *DraI*; B- *BamHI*; Bg- *BglII*; X- *XbaI*; E- *EcoRI*; (б) Нуклеотидна послідовність *XbaI*-фрагменту плазміді pSK122.2.

1.2. Визначення орієнтації промотору пататину у плазмідах pSK122.1 та pSK122.2 .

Через те, що рестриктази, за допомогою яких проводили клонування DraI-DraI фрагменту, утворюють "тупі" кінці у фрагменті ДНК, клоновані промоторні послідовності встроювались не направлено, в зв'язку з чим необхідно було відібрати клони з різними орієнтаціями промотора. Для цього необхідно визначити нуклеотидні послідовності кінцевих фрагментів клонованої вставки. Були побудовані рестрикційні карти плазмід pSK122.1 та pSK122.2, які містили клонований в різних орієнтаціях промотор гену λ pat122. Як видно з рестрикційної карти Рис.4(А), послідовність клонованого промотору містить два сайти рестриктази BglII і один для XbaI, що спрощує стратегію секвенування даної послідовності методом Сенгера. З плазміди pSK122.1 було елюйовано фрагмент EcoRI-XbaI (900 п.о.), а з плазміди pSK122.2 - фрагмент XbaI (500 п.о.) та клоновано у полілінкер бактеріофагу M13mp8 по відповідним сайтам рестрикції. Використовуючи фрагмент Кленова, була визначена нуклеотидна послідовність кінцевих фрагментів з боку сайту DraI. Виявилось, що 3'-кінцева послідовність клону pSK122.2 містить ТАТА-бокс та послідовність, яка відповідає сайту ініціації транскрипції. Тобто можна зробити висновок, що промотор пататину у клоні pSK122.2 орієнтований від сайту EcoRI до сайту BamHI. На Рис.4(Б) представлено фрагмент секвенованої ділянки XbaI-фрагменту клону pSK122.2.

5'

pat122	T	TGGTTATG	T	CAAAC TCAAA	AT	AGAGAATT	TAGCTCAACGG	TTGTTTACGT
B33	T	TGGTTATG	T	CAAAC TCAAA	gT	A-A-AATT	T--CTCAAC--	TTGTTTACGT
PS20	T	TGGTTATG	T	CAAAC TCAAA	gT	A-A-AATT	T--CTCAAC--	TTGTTTACGT
B24	T	TGGTTATG	T	CAAAC TCAAA	AT	A-A-AATT	T--CTCAAC--	TTGTTTACGT

pat122	GAC	CTATATA TA	AGCCATGA	CGTAGTATAT	ATGCTCAAA	GCACCAACAA	AATTT
B33	G-C	CTATATA TA	--CCATG-	C-TtGT-TAT	ATGCTCAAA	GCACCAACAA	AATTT
PS20	G-C	CTATATA TA	--CCATG-	C-TtGT-TAT	ATGCTCAAA	GCACCAACAA	AATTT
B24	G-C	CTATATA TA	--CCATG-	C-TtGT-TAT	ATGCTCAAA	GCACCAACAA	AATTT

3'

Рис.5. Комп'ютерне порівняння 5'-послідовностей деяких генів пататину класу I. Послідовності, гомологічні кор-енхансеру, СААТ- та ТАТА-боксам виділені рамкою; точка старту транскрипції вказана символом *.

1.3. Аналіз 5'- ділянки нуклеотидної послідовності Dral-Dral фрагменту клону Δ pat122.

Використовуючи пакет програм "DNA-SUN" та "PC-GENE", було проведено порівняння нуклеотидних послідовностей відомих генів пататину класу I з секвенованим фрагментом промотору гену pat122. Результати комп'ютерної обробки представлені на Рис.5. Як видно з комп'ютерного вирівнювання ("alignent") клонованого промотору пататину з іншими промоторами генів пататину класу I, в його послідовності присутні області, гомологічні консенсусним послідовностям ТАТА- та СААТ-боксів в позиціях -36 п.н. та -80 п.н. від точки ініціації транскрипції відповідно. Ділянка, гомологічна кор-енхансеру, також може бути виявлена, виходячи з гомології з послідовностями інших генів пататину, припущений енхансерний елемент розташований в позиції -89 п.н.

Різниця між секвенованим фрагментом і 5'-ділянками інших промоторів генів пататину класу I головним чином обумовлена точковими інсерціями в послідовності гену pat122, які не торкаються консервативних регуляторних ділянок промотору, що в свою чергу, певно, пов'язано з функціональною значимістю цих елементів. Ми не виявили аналогічної послідовності серед пататинових генів, які знаходяться в базі даних EMBL, тому було зроблено висновок, що нами клоновано один з невідомих промоторів гену пататину класу I. Слід відзначити, що хоча ділянка від +31 до +52 п.н., яка містить у випадку генів пататину класу II характерну вставку довжиною 22 п.н., відсутня у межах клонованого Dral-фрагменту, ми, використовуючи комп'ютерні програми PC-GENE та DNA-SUN, встановили, що послідовності олігонуклеотидів, використаних для скринінгу геномної бібліотеки і наступних блот-гібридизацій з клонованими фрагментами, зустрічаються виключно в 5'-нетранслюємих ділянках генів пататину класу I. Ці факти також свідчать, що нами був клонований саме промотор гену пататину класу I.

2. Конструювання векторів та химерних генів для бульбоспецифічної експресії у клітинах трансгенних рослин.

Клонований у плазміді pBluescript SK(+), Dral-фрагмент промотору гену пататину pat122, довжиною 1,8 т.п.н., був взятий для конструювання химерних генів хлорамфеніколацетилтрансферази (*cat*) та гомосеринкінази (*hsk*) з E.coli. Загальна схема конструювання химерних генів представлена на Рис.6. Базовим вектором для отримання генної конструкції, котра містила б ген *cat* під промотором пататину,

зручно було взяти плазмиду pUC19, в яку по сайтах BamHI і HindIII клонували фрагмент поліаденилювання гену нопалинсинтази Ti-плазміді (термінатор транскрипції). Отримана плазмідна рUC19-term(NOS) містила перед сайтами EcoRI, BamHI та HindIII сайт рестрикції NarI (ізошизомер Ehel). Цю плазмиду гідролізували рестриктазою Ehel і вбудовували нефосфорильований лінкер HindIII. Отримана таким чином плазмідна містила в своїй послідовності сайти рестрикції EcoRI, BamHI та термінатор транскрипції гену *nos*, фланковані сайтами HindIII. Далі в цю плазмиду направлено клонували по сайтах рестрикції EcoRI і BamHI промотор пататину з плазміді pSK(DraI-DraI). Отримана конструкція містила клоновані у плазміді pUC19 промотор пататину pat122 та термінатор транскрипції term(*nos*), між якими знаходиться сайт рестрикції BamHI. Цей вектор позначили як pDE1. В сайт BamHI було клоновано бактеріальний ген хлорамфеніколацетилтрансферази (*cat*). Слід відмітити, що правильна орієнтація гену *cat* у векторі pDEcat визначалась рестрикційним аналізом, за допомогою унікальних сайтів EcoRI у гені *cat* та у векторі pDE1. Отримана плазмідна pDEcat містила в своїй послідовності повнорозмірний химерний ген *cat* під промотором гену пататину класу I та термінатор транскрипції NOS, причому уся ця конструкція була фланкована сайтами HindIII.

Химерний ген pat122- *cat* -term(*nos*) був вирізаний з плазміді pDEcat по сайтах рестрикції HindIII і клонований у відповідний сайт полілінкеру бінарного вектора pBin19 (Bevan et al., 1984). Вектор pBin19 найбільш частіше використовується для прямої трансформації *Agrobacterium tumefaciens* (Burow et al., 1990) і подальшої трансформації рослин.

Структура бінарного вектору pBin19(pat122- *cat* - term(*nos*) представлена на Рис.7(А).

Ген гомосеринкінази *E.coli* (*hsk*) кодує фермент гомосеринкіназу (КФ 2.7.1.39), який каталізує реакцію фосфорилування гомосерину, перетворюючи його в О-фосфогомосерин в ланцюгу реакцій метаболізму амінокислот аспартатного сімейства. Використовуючи бактеріальний ген гомосеринкінази в генетичній інженерії вищих рослин, ми враховували два аспекти: по-перше, є повідомлення, де показано, що гени аспартатного сімейства з *E.coli* використовують як селективні маркери в трансформації деяких видів рослин, додаючи в живильні середовища як селективний агент токсичні аналоги амінокислот або токсичні концентрації амінокислот-субстратів; по-друге, було б цікаво проаналізувати експресію генів треонінового оперону в трансгенних рослинах під кон-

тролем потужного органоспецифічного промотору. У випадку генів гомосеринкінази та треонінсинтази під регуляцією промотору пататину класу I можливо припустити, що треонін не буде розходитись по шляхах катаболізму, а буде накопичуватись у бульбах картоплі.

Враховуючи ці аспекти, ми поставили перед собою мету отримати експресуючу конструкцію, яка містила б кодуючу частину гену гомосеринкінази під промотором пататину *pat122*.

Ген гомосеринкінази був люб'язно наданий професором К.Г.Газаряном (Інститут Молекулярної генетики РАН, м.Москва). Схема конструювання рекомбінантних плазмід аналогічна схемі представленої на Рис.6 для отримання химерного гену *cat*. У векторі *pDE1* в сайт *BamHI* було клоновано ген гомосеринкінази (*hsk*), який був вирізаний з плазміди *pMK* по сайтах *BamHI* та *BglII*. Оскільки клонування гену *hsk* проходило не спрямовано перед промотором пататину, конструкції з правильною орієнтацією відбирались рестрикційним аналізом, використовуючи сайти *BamHI* та *BglII*. Далі конструкція *pat122-hsk-term(nos)* була вирізана з плазміди *pDE-hsk* по сайтах *HindIII* і переклонована у полілінкер бінарного вектору *pBin19* по тому ж сайту. Карта бінарного вектору *pBin19(pat122-hsk-term(nos)* представлена на Рис.7(Б).

2.1. Конструювання делеційного варіанту промотору пататину *pat122*.

Одним з важливих завдань даної роботи було отримання делеційного варіанту промотору пататину *pat122*, з метою визначення функціонального значення АТ-збагаченого фрагменту довжиною 200 п.н. в проксимальній ділянці 5'-кінця промотору. Як вже відомо, авторами (Rosha-Sosa et al., 1989; Grierson et al., 1993) було встановлено, що існує мінімальний промотор в пататинових генах класу I, котрий розташований в позиції від -344 п.н. до +1 п.н.(точки ініціації транскрипції), який здатний спрямовувати і бульбо-специфічну і сахарозо-індуковану експресію генів. Було показано, що мінімальний промотор містить одну копію консервативного повтору, представленого в трьох копіях в повнорозмірному промоторі гену пататину. Ця консервативна ділянка складена з двох суміжних послідовностей, позначених в літературі як А- і В-повтори, які разом складають близько 90-100 п.н. Повнорозмірні промотори, які містять більш дистальні копії ділянки А- і В- повторів (названого А+В повтор), спрямовували високі рівні експресії, більш специфічної у бульбах. Ділянка промотору від -360 п.н. до +1 п.н., фланкована мінімальним 35S-промотором (від -90 п.н. до +1 п.н.),

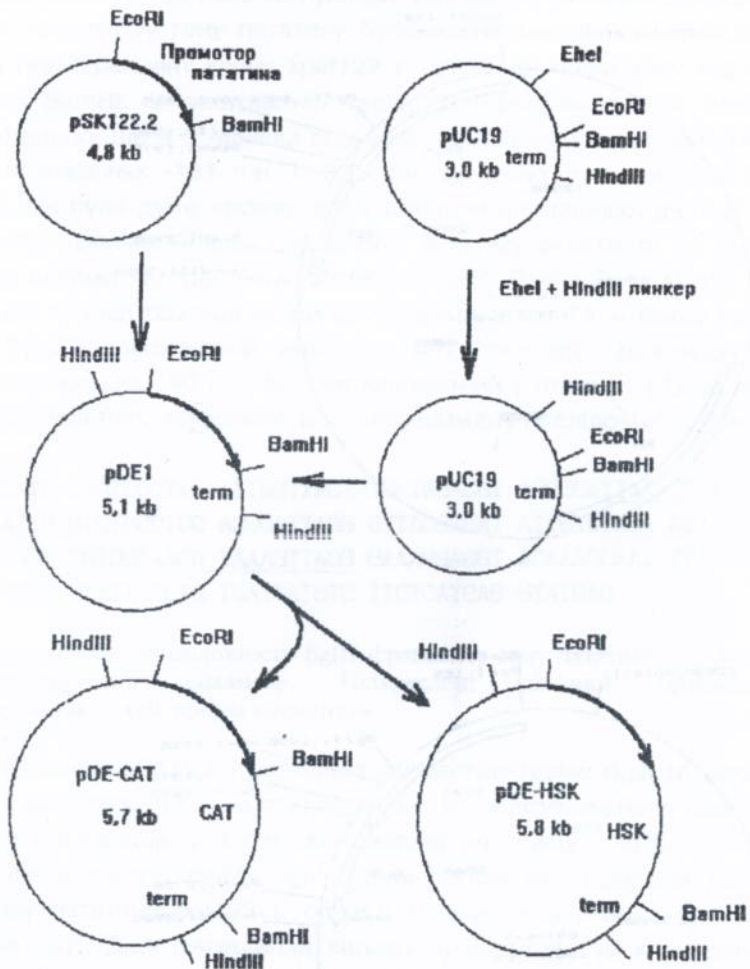
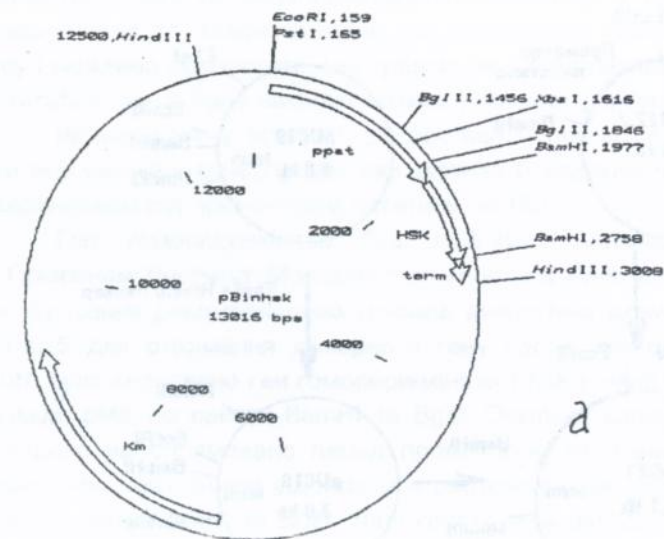


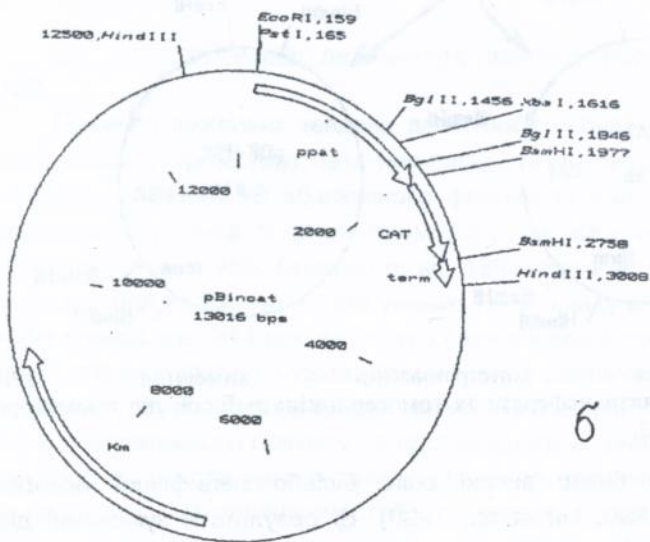
Рис.6. Схема конструювання химерних генів хлорамфеніколацетилтрансферази та гомосеринкінази *E.coli* під промотором гену пататину *pat122*.

спрямовувала ще більш високі рівні бульбо-специфічної експресії (Jefferson et al., 1990; Liu et al., 1990). Ці результати зумовлені дією бульбоспецифічного ехансеру, розташованого в межах -119 п.н. і -342 п.н.

Ми поставили перед собою мету, використовуючи метод делеційного аналізу промоторів, отримати делеційний варіант промотору гену пататину *pat122* та сконструювати химерний ген хлорамфенікола



a



б

Рис.7. Рестриктивні карти бінарних векторів (а) pBin19pat122-hsk-term(nos) та (б) pBin19pat122-cat-term(nos).

цетилтрансферази під його контролем. Для конструювання делеційного варіанту промотору гену пататину була взята плазміда рSK122.2, яка містила DraI-фрагмент клону λ pat122 в орієнтації промотору від сайту EcoRI до BamHI. З рестриктної карти DraI-фрагменту цієї плазміди (Рис.4А) видно, що в 5'-ділянці промотору є два сайти для рестриктази BglII в положеннях -131 п.н. і -321 п.н. відносно точки ініціації транскрипції. Це було дуже зручно для отримання внутрішньої делеції DraI-фрагменту, оскільки більше сайтів BglII в цьому фрагменті не було. А також за даними авторів (Grierson et al., 1993; Rosh-Sosa et al., 1989) саме в цій позиції розташований самий ближній до TATA-боксу (один з трьох) бульбо-специфічний енхансер A+B повтору. Довжина BglII-фрагменту складає 190 п.н. Він був клонований у плазміді рTZ19 та методом Сенгера було визначено його нуклеотидну послідовність (Рис.8).

CCCC GG G G G G A T C T C G T C C G T A C A T T G G T T A C T T G A T G G A C G T A C C G G A T T A A G T C A T A A C C T
 A T A T A A A T T G G T C T C C C T C C A C C C A T T A G G G T A C C A C A T A T T C T C T A C A A T A T T C C A T
 C G C T G A C G G T T G T G G T A A C A T A A A G T T A G G G A A A G G A G G T A G A A A C C A A T T T A C G A C T A A
 C G T C T T T C G T C T T T C T C T G T G A T G A T G T C T T C T C A T C A G G T A T G A G

Рис.8. Нуклеотидна послідовність BglII-фрагменту гену пататину, що містить бульбо-специфічний енхансер. Підкреслені ділянки відповідають передбачуваним енхансерним елементам.

Плазміді рSK122.2 гідролізували рестриктазою BglII та елюювали головний фрагмент з агарозного гелю, потім лігували його самого на себе для трансформації *E.coli*. Контрольна рестрикція підтвердила наявність лише одного сайту BglII, таким чином ми отримали делецію промотору пататину λ pat122 в області бульбоспецифічного енхансера (A+B повтору). Далі делеційний варіант промотору був клонований у векторі рDE1 по сайтах рестрикції EcoRI та BamHI, і в сайт BamHI був встроєний ген хлорамфеніколацетилтрансферази (*cat*). Конструкція λ pat122del-*cat*-term(nos) була клонована в HindIII-сайт полілінкеру бінарного вектору рBin19.

3. Аналіз експресії химерних генів в трансгенних рослинах.

Конструкції, які містили химерні гени *cat* та *hsk* під контролем промотору гену пататину класу I λ pat122 та його делеційного варіанту, були використані для прямої трансформації клітин *Agrobacterium tumefaciens* штаму рGV3850 (Bürow et al., 1990). Трансформанти

A.tumefaciens відбирали на стійкість до антибіотику канаміцину. Ці клітини далі використовували для трансформації рослин картоплі методом зараження мікробульб (Ishida et al., 1989).

В експериментах використовувались мікробульби трансгенних рослин *Solanum tuberosum* сортів "Невський" та "Зарево", які культивувалися *in vitro*.

Для трансформації рослин ми використовували штами *A.tumefaciens*, які несуть генні конструкції, де репортерним геном являється ген *cat*, кодуючий фермент хлорамфеніколацетилтрансферазу (CAT). Оскільки цей фермент синтезується виключно в клітинах *E.coli*, тому для визначення ефективності експресії гену *cat* в трансформантах було застосовано аналіз активності CAT. Цей репортерний ген широко застосовується в молекулярній біології для аналізу активності регуляторних послідовностей як у тварин, так і у рослин (Gorman et al., 1982; Дрейпер та інш., 1990).

Для аналізу експресії гену гомосеринкінази *E.coli* під контролем промотору пататину ми вперше застосували на рослинах метод визначення активності гомосеринкінази, розроблений для клітин *E.coli* і тварин (Генинг и соавт., 1994).

3.1. Експресія химерного гену pat122-cat в трансгенних рослинах картоплі.

Рослини-регенеранти картоплі, трансформовані за допомогою штаму *A.tumefaciens* pGV3850::pBin19/pat122cat, були проаналізовані на наявність експресії гена *cat* в різних органах рослин.

На рис.9 представлено радіоавтограф хроматограми на пластинці "Silufol", на яку було нанесено аліквоти реакційних сумішей з неочищеним екстрактом мікробульб трансформованих рослин картоплі (трек 1) та з екстрактом, осадженим сульфатом амонію (трек 4). Реакції на CAT активність проводили з екстрактами листа (трек 5) та нижніх частин стебла, включаючи кореневу систему рослини (трек 6). Як позитивний контроль використовували клітинний екстракт штаму *E.coli*, котрий містить плазмиду pBR325 з геном *cat* (трек 2), як негативний контроль на пластинку наносили аліквоту реакційної суміші з екстрактом мікробульб нетрансформованої рослини (трек 3). Всі реакції проводили в однакових умовах.

Максимальна активність CAT проявляється в мікробульбах трансформованих рослин картоплі і практично відсутня в тканинах листа, стебла і коренях. Цей факт підтверджує, що клонований промо-

тор гену пататину забезпечує бульбо-специфічну експресію гену *cat*. Відсутність експресії в коренях підтверджує належність промотору гену пататина *pat122* до класу I сімейства пататинових генів, так як відомо, що гени пататину класу I спрямовують високі рівні експресії виключно у тканинах бульб (Liu et al., 1990), тоді як гени пататину класу II експресуються в незначній мірі у клітинах кореня і практично не експресуються у бульбах (Koster-Topfer et al., 1989).

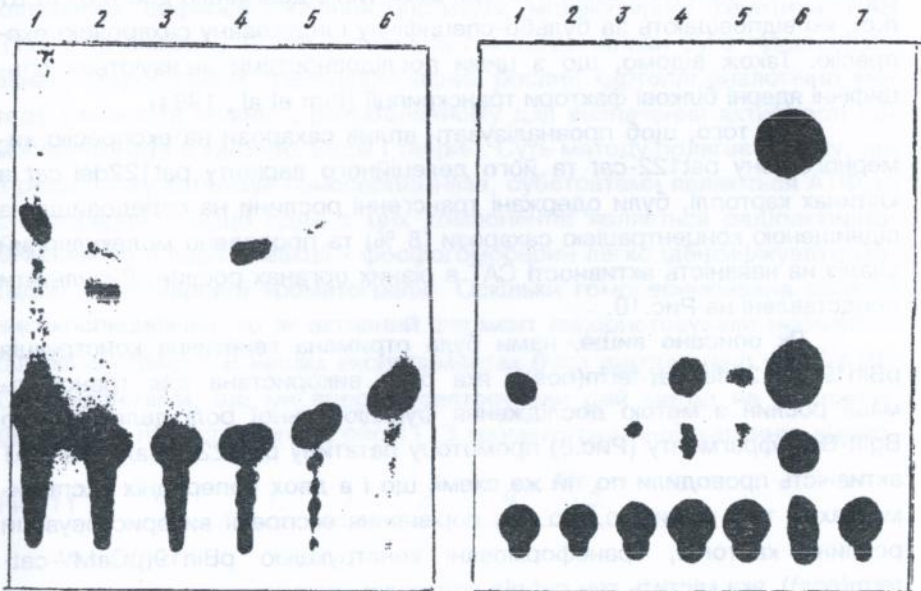


Рис.9. Аналіз CAT-активності трансгенних рослин картоплі. 1,4-мікробульби; 2- екстракт *E.coli*, що містить плазмиду *pBR325*; 3- мікробульби нетрансформованої рослини; 5- листя; 6- коріння.

Рис.10. Порівняння CAT- активності у трансгенних рослинах, трансформованих вектором, який містить делетований промотор пататину. 1- *pCaMVcat* (мікробульби); 2- *pat122del-cat* (листя); 3- *pat122-cat* (листя, індуковані 8% сахарозою); 4,5 - мікробульби; 6- *E.coli* (*pBR325*); 7- нетрансформована рослина (мікробульби).

Слід відзначити, що на Рис.9 представлені результати аналізу експресії CAT у трансгенних рослинах, які були отримані на поживних середовищах з мінімальним вмістом сахарози (5-6 %), необхідної для індукції бульбоутворення (у випадку аналізу мікробульб) та 2 % для регенерації проростків на першій стадії трансформації рослин (у випадку аналізу екстрактів листа, стебла та коренів). Концентрація сахарози в поживних середовищах має дуже важливе значення для експресії генів

пататину. Особливість експресії генів пататину класу I полягає в тому, що вона не тільки органо-специфічна, а також регулюється вмістом сахарози в середовищі культивування. Так було показано, що при культивуванні трансгенних рослин картоплі на середовищі з 8% сахарозою, експресія генів пататину класу I індукується в листовій тканині та складає 50-70% від експресії у бульбах (Wenzler et al., 1989;). Відомо, що 5'-регуляторні ділянки клонуваних раніше генів пататину класу I B33 та PAT21 містять АТ-збагачені повтори двох типів довжиною 208 п.о. та 37 п.о., які відповідають за бульбо-специфічну і індуковану сахарозою експресію. Також відомо, що з цими послідовностями зв'язуються специфічні ядерні білкові фактори транскрипції (Kim et al., 1994).

Для того, щоб проаналізувати вплив сахарози на експресію зимного гену *pat122-cat* та його делеційного варіанту *pat122del-cat* в клітинах картоплі, були одержані трансгенні рослини на середовищах з підвищеною концентрацією сахарози (8 %) та проведено молекулярний аналіз на наявність активності CAT в різних органах рослин. Результати представлені на Рис.10.

Як описано вище, нами була отримана генетична конструкція *pBin19(pat122del-cat-term(nos))*, яка була використана для трансформації рослин з метою дослідження функціональної ролі делетованого *BgIII-BgIII* фрагменту (Рис.8) промотору пататину *pat122*. Аналіз на CAT активність проводили по тій же схемі, що і в двох попередніх експериментах, з тою різницею, що для порівняння експресії використовували рослини картоплі, трансформовані конструкцією *pBin19(pCaMV-cat-term(nos))*, яка містить ген *cat* під контролем потужного конститутивного промотору *CaMV35S*. На Рис.10 представлено результати цього аналізу.

Як видно, делеція *BgIII-BgIII*-фрагменту повністю виключає експресію в індукованих сахарозою листях та зменшує експресію в мікробульбах. Ми припускаємо, що делетований фрагмент промотору, послідовність якого представлена на Рис.9, містить один з енансерних елементів, які забезпечують індуковану сахарозою експресію, а також містить послідовність бульбоспецифічного енансеру. Проте для повного доказу отриманих результатів потрібен делеційний аналіз всієї промоторної послідовності, оскільки існують дані, що бульбо-специфічні енансери в промоторі пататину представлені в трьох копіях і розташовані на різних відстанях від точки старту транскрипції (Grierson et al., 1994). Крім того, комбінація мінімального -90 п.о. 35S промотору з кожним з цих енансерів здатна спрямовувати високі рівні бульбо-специфічної експресії (Grierson et al., 1994).

3.2. Аналіз експресії химерного гену гомосеринкінази *E.coli* pat122-hsk в трансгенних рослинах картоплі.

Експресія гену гомосеринкінази *E.coli* (*hsk*) в трансгенних рослинах була визначена по наявності ферментативної активності гомосеринкінази в різних органах рослин. Метод визначення активності гомосеринкінази був розроблений у відділі молекулярної ембріогенетики та клітинного диференціювання Інституту молекулярної генетики РАН (Генінг та співавт., 1994). Активність гомосеринкінази була проаналізована у мікробульбах трансформованих рослин картоплі аналогічно методу Генінга та співавт., розробленому для визначення активності гомосеринкінази в клітинах *E.coli* і тварин. Суть методу полягає в тому, що в реакції, яку каталізує гомосеринкіназа, субстратами являються АТФ та L-гомосерин, і якщо один з цих компонентів являється радіоактивно-міченим, то продукт реакції - фосфогомосерин легко ідентифікувати методом тонкошарової хроматографії. Оскільки гомосеринкіназна реакція високоспецифічна, то як активний фермент використовували неочищені білкові екстракти. В наших експериментах було використано γ -P³³-АТФ. Слід відзначити, що ми вперше застосували цей метод на рослинах, результати представлені на рис.11. З хроматографічної картини видно,

Рис.11

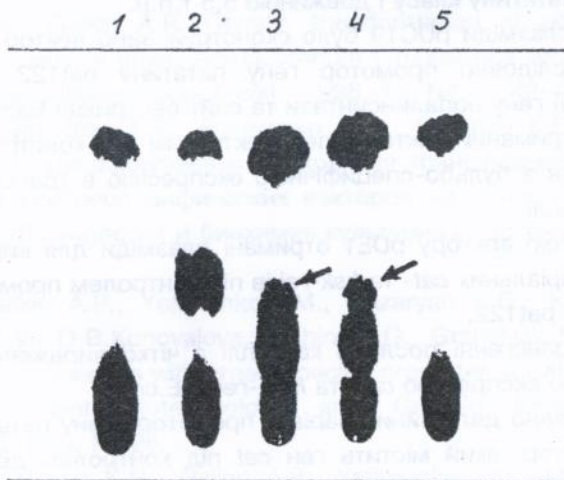


Рис.11. Аналіз HSK-активності трансгенних рослин картоплі. 1- негативний контроль; 2- екстракт *E.coli*; 3,4- мікробульби (стрілкою позначено фосфогомосерин); 5- нетрансформована рослина.

що радіоактивність, яка відповідає фосфогомосерину в *E.coli*, присутня і в двох білкових екстрактах мікробульб трансформованих рослин (доріжки 3 и 4). Оскільки міченим субстратом був γ - P^{33} -АТФ, то ймовірно, що в кінцевому продукті реакції присутні більш важкі домішки, які не відповідають фосфогомосерину, а представляють неспецифічну дію фосфатаз, що і проявляється при хроматографії. Так як в отриманих нами трансформантах гомосеринкіназна активність доведена, ми зробили висновок, що ген гомосеринкінази експресується на рівні транскрипції і трансляції, а рослини картоплі, трансформовані штамом *A.tumefaciens* pGV3850::pBin19/pat122- *hsk*, є трансгенними.

ВИСНОВКИ

1. За допомогою специфічного 21-членного олігонуклеотидного зонду, комплементарного консервативній 5'-нетранслюємій ділянці генів пататину класу I, з геномної бібліотеки ДНК картоплі було виділено два клони λ pat122 и λ pat312, які містять послідовності генів пататину.
2. З клону λ pat122 було реклоновано фрагмент ДНК гену пататина 1,8 т.п.н., який містить регуляторну ділянку гену та визначена його нуклеотидна послідовність. Клон λ pat312 містить кодуючу послідовність гену пататину класу I довжиною 5,5 т.п.н.
3. На основі плазмиди pUC19 було сконструйовано вектор pDE1, який містить послідовно промотор гену пататину pat122, термінатор транскрипції гену нопалинсинтази та сайт рестрикції BamHI для клонування. Отриманий вектор є перспективним для конструювання химерних генів з бульбо-специфічною експресією в трансгенних рослинах картоплі.
4. За допомогою вектору pDE1 отримані плазмиди для вивчення експресії бактеріальних *cat*- та *hsk*-генів під контролем промотору пататину класу I pat122.
5. Отримані трансгенні рослини картоплі з чітко вираженою бульбо-специфічною експресією *cat*- та *hsk*-генів *E.coli*.
6. Сконструйовано делеційний варіант промотору гену пататину та отримано вектор, який містить ген *cat* під контролем делетованого промотору. Показано, що делеція BgIII-фрагменту (гомологічного послідовності бульбо-специфічного енхансеру) знижує рівень бульбо-специфічної експресії *cat*-гену.

7. Сукупність отриманих результатів дозволяє стверджувати, що нами клоновано новий потужний промотор гену пататину класу I та кодуєча ділянка гену з мультигенного сімейства пататинових генів.

Список робіт, опублікованих по темі дисертації:

1. Domansky N.N., Yefimenko I.M., Galkin A.P. Cloning of the tuberspecific promoter of a class I patatin gene // *Dopovidy Akademii Nauk Ukrainy.*-1992.- N10.- P.151-154.
2. Yefimenko I.M., Medvedeva T.V., Kovalenko P.G., Gazaryan K.G., Galkin A.P. Organ-specific gene expression in transgenic potato: the cloning a new promoter of a class I patatin gene // *Biopolimers & cell.* -1995.-11, №6.- с.96-103.
3. Ефименко И.М., Медведева Т.В., Доманский Н.Н., Генинг Л.В. Клубнеспецифическая экспрессия хлорамфениколацетилтрансферазы в трансгенных растениях картофеля//II Российский симпозиум "Новые методы биотехнологии растений".- 1993, 18-20 мая, г. Пущино,с.20.
4. Ефименко И.М., Медведева Т.В., Галкин А.П., Газарян К.Г. Клубне-специфическая экспрессия гомосеринкиназы *E.coli* в трансгенных растениях картофеля //III Российский симпозиум "Новые методы биотехнологии растений."-1995.- с.45.
5. Kovalenko P.G., Yefimenko I.M., Medvedeva T.V.,Shuman N.V., Gazaryan K.G., Galkin A.P. Genetic transformation of potato (*Solanum tuberosum* L.) using a binari *Agrobacterium tumefaciens* vector with patatin promoter class I // *Biopolimers & cell.* -1996.-12, N4.- с.42-46
6. Медведева Т.В., Ефименко И.М., Газарян К.Г., Галкин А.П. Использование микроклубневых дисков для трансформации картофеля посредством клубнеспецифических векторов на основе *Agrobacterium tumefaciens* // *Физиология и биохимия культурных растений* - 1997. № 3 (в печати).
7. Galkin A.P., Yefimenko I.M., Gazaryan K.G., Kovalenko P.G., Medvedeva T.V., O.B.Konovalova, Leshina L.G., Grzhelyak N.V. Cloning of the plant DNA sequences with organ-specific promoter activity//*Abstr. of the Int. Symp. "Plant Biotechnology and Genetic Engineering".* 3-6 October,1994, Kiev. P.126.
8. Gazaryan K.G., Galkin A.P., Yefimenko I.M., Medvedeva T.V., Kovalenko P.G., Gening L.V., Domansky N.N. Expression of bacterial homoserinekinase gene in transgenic plants// *Abstr. of the XVII International Congress of Genetics, Birmingham, England, 15-21 August, 1993, P.153.*

Yefimenko I.M. The cloning and studying of regulatory sequences of *Solanum tuberosum* L. patatin gene class I

Thesis for gaining a scientific degree of Candidate of Biological Sciences on speciality 03.00.15 - Genetics, Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 1997.

The results of 8 scientific publications are defended.

From a potato genomic library two phage lambda clones were isolated that carried the coding and regulatory regions of patatin gene class I. The 5'-end sequences of the pat122 promoter region were determined. On the basis of a patatin promoter genetic vectors for the tuber-specific expression of *E.coli* chloramphenicolacetyltransferase (*cat*) and homoserine kinase(*hsk*) genes in potato cells were constructed. Determination of CAT and HSK activities showed the presence of organ-specific *cat* and *hsk* gene expression in transgenic potato cells.

Ефименко И.М. Клонирование и исследование регуляторных последовательностей гена пататина класса I *Solanum tuberosum* L.

Диссертация на соискание уч.ной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.15 - генетика, Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев, 1997.

Защищается 8 научных работ по теме диссертации. Из геномной библиотеки картофеля *Solanum tuberosum* L. было изолировано два клона фага λ , которые содержат кодирующую и регуляторную области генов пататина класса I. Определена нуклеотидная последовательность 5'-концевого участка промотора pat122. На основе промотора пататина pat122 сконструированы генетические вектора для клубнеспецифической экспрессии генов хлорамфениколацетилтрансферазы (*cat*) и гомосеринкиназы (*hsk*) *E.coli* в клетках картофеля. Используя методы определения активности CAT и HSK было показано наличие органо-специфической экспрессии генов *cat* и *hsk* в клетках трансгенных растений.

Ключові слова: пататин; промотор; молекулярно-генетичні конструкції; бульбо-специфічна експресія; картопля; трансгенні рослини.

Підписано до друку 04.03.97р. Формат 60x84/16.
Ум. друк. арк. 1,0. Обл.-вид. арк. 1,0.
Наклад 100. Зам. 67.

Відділ оперативної поліграфії
Центру Міжнародної освіти
227-12-75, 227-37-86

435140

AB 37.594