

УДК 581.1

ВКЛАД ИСКУССТВЕННО СИНТЕЗИРОВАННОГО ФИТОХЕЛАТИНА, КОДИРУЕМОГО ГЕНОМ *PPH6HIS*, В ПОВЫШЕНИЕ ФИТОРЕМЕДИАТИВНЫХ КАЧЕСТВ РАСТЕНИЙ ТАБАКА

© 2022 г. З. Р. Вершинина^{a, b, *}, Д. Р. Масленникова^{a, b}, О. В. Чубукова^{a, b},
Л. Р. Хакимова^{a, b}, В. В. Федяев^{c, d}

^aИнститут биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

^bФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Уфимский государственный нефтяной технический университет”, Уфа, Россия

^cФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Башкирский государственный университет”, Уфа, Россия

^dИнститут биологии — обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского
центра Российской академии наук, Уфа, Россия

*e-mail: zilyaver@mail.ru

Поступила в редакцию 12.12.2021 г.

После доработки 13.01.2022 г.

Принята к публикации 17.01.2022 г.

Изучали линии трансгенных растений *Nicotiana tabacum* L., экспрессирующие искусственно синтезированный ген *PPH6HIS*, с целью оценить вклад продукта — металл связывающего пептида, кодируемого этим геном, в реализацию устойчивости трансформантов к воздействию кадмиевого стресса. В ходе работы были получены восемь линий с экспрессией *PPH6HIS*, доказанной с помощью вестерн-блот анализа с использованием анти-6His-антител. Анализ накопления кадмия в эксплантах и оценка степени повреждения регенерантов при действии ацетата кадмия показали, что линии трансгенных растений табака 13, 32 и 76 аккумулировали больше кадмия, чем другие трансформированные линии и контрольные растения. У этих трех линий наблюдались признаки устойчивости к кадмиевому стрессу, выражающиеся в сохранении регенерационного потенциала и значительно меньшем уровне хлороза листьев в сравнении с другими линиями и контролем. Эти данные позволяют сделать заключение, что продукт экспрессии гена *PPH6HIS* — металл связывающий пептид, может быть перспективным кандидатом для повышения аккумулятивных свойств потенциальных растений-фиторемедиантов.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum*, кадмий, пептид, тяжелые металлы, фиторемедиация, фитохелатин

DOI: 10.31857/S0015330322040182

ВВЕДЕНИЕ

Загрязнение почв тяжелыми металлами (ТМ) представляет собой серьезную экологическую проблему для многих стран мира, поскольку уменьшение площадей плодородных земель для выращивания сельскохозяйственных культур приводит к существенным экономическим издержкам, а накопление ТМ в растениях и дальнейшее их распространение по звеньям пищевой цепи впоследствии может вызывать у людей ряд опасных заболеваний [1]. Поэтому разработка новых методов и технологии ремедиации почв, а также поиск путей регуляции метаболизма растений,

позволяющих повысить устойчивость видов, произрастающих на почвах, загрязненных ТМ, является актуальным направлением биотехнологии и современного растениеводства [2].

Фиторемедиация почв является безопасной технологией восстановления экосистем, загрязненных ТМ, и включает в себя комплекс методов очистки почвы с использованием растений, которые способны концентрировать в своих тканях различные ТМ, переводить их химические соединения в более стабильную и менее агрессивную форму, что позволяет снизить содержание этих опасных экополлютантов в окружающей среде [3]. На сегодняшний день известно более 700 видов растений-гипераккумуляторов ТМ, большинство из которых являются представителями семейств

Сокращения: ТМ — тяжелые металлы, ФХ — фитохелатин, Cd — кадмий; GSH — глутатион, PCS — фитохелатинсинтаза.

Brassicaceae и *Phyllanthaceae* [4]. Однако далеко не все эти виды можно использовать в фиторемедиации, так как растения-фиторемедианты должны отличаться устойчивостью к вредителям и болезням, иметь обширную корневую систему, способность быстро расти и производить большую биомассу. Высокая чувствительность растений к стрессовому воздействию, вызванному влиянием ТМ, и низкий уровень накопления ТМ являются значительным препятствием для реализации фиторемедиационных мероприятий, что делает неэффективным использование большинства характерных для экосистемы видов растений при загрязнении почв ТМ [5]. Исследования, посвященные трансформации растений разнообразными генами, чьи продукты участвуют в аккумуляции ТМ и устойчивости к стрессовым воздействиям, служат теоретической базой для разработки новых методов фиторемедиации почв, что в перспективе позволит преодолеть вышеописанные проблемы [6]. При этом генно-инженерная трансформация быстрорастущих видов, накапливающих значительную биомассу, для придания способности аккумулировать ТМ более простая задача, чем получение растений-гипераккумуляторов с повышенными ростовыми показателями. Поэтому большинство исследований в данной области посвящено трансформации быстрорастущих видов растений генами, продукты которых принимают участие в поглощении, транспорте и секвестрации ТМ [7].

Одним из самых токсичных ТМ, создающих наибольший риск для здоровья человека, является кадмий (Cd). Загрязнение сельскохозяйственных почв Cd зачастую связано с чрезмерным использованием фосфатных удобрений, накоплением городских отходов и добычей полезных ископаемых [8]. Растения обладают значительным спектром приспособительных механизмов, направленных на снижение стрессового воздействия Cd на их рост и развитие. Однако при высоких концентрациях этого ТМ в окружающей среде значительное количество токсичных ионов все-таки проникает в клетку. В этом случае начинают действовать внутриклеточные механизмы детоксикации ионов ТМ, которые включают их связывание в цитоплазме различными лигандами и транспорт таких комплексов в вакуоль. Подобными лигандами служат органические кислоты, аминокислоты, непротеиновые тиолы (глутатион и фитохелатины) и металлотионеины [9, 10].

Фитохелатины (ФХ) имеют общую структуру $[\gamma\text{-Глу(Цис)}]_n\text{-Ак}$, где n обычно равно 2–11, а Ак – С-концевая аминокислота, представленная обычно Гли, хотя для ряда семейств растений характерны изофитохелатины с С-терминальным Ала, Глу и Сер [10, 11]. ФХ содержат γ -связь между Глу и Цис и синтезируются при участии фермента фитохелатинсинтазы (PCS), который может использоваться в качестве субстрата восстановленный глута-

тион (GSH) или родственные тиолы. Этот процесс *in vivo* запускается различными металлами, однако, наиболее эффективен в этом плане Cd^{2+} [12]. ФХ и изофитохелатины не являются первичными генными продуктами, синтезируемыми на рибосомах, поскольку γ -связь, вероятно необходимая для защиты данных тиолированных пептидов от неспецифической протеазной активности, не образуется во время трансляции. Нуклеофильные тиоловые группы ФХ обеспечивают им способность реагировать с широким спектром веществ, в том числе с большим количеством органических ксенобиотиков и ТМ [13].

Ранее проводились исследования по изменению экспрессии генов, чьи продукты участвуют в синтезе глутатиона и ФХ, в том числе генов синтеза γ -глутамилцистеинсинтазы, глутатионсинтазы, цистатионинсинтазы, АТФ-сульфилазы, серин-ацетилтрансферазы, глутатионредуктазы, PCS и различных глиоксалаз [7, 14]. Сверхэкспрессия этих генов способствовала как повышению устойчивости и накоплению ТМ в клетках, так и наоборот – приводила к чувствительности растений к металлическому стрессу. Дальнейшие исследования показали, что такое противоречие является результатом того, что не всегда у растений хватает ресурсов на синтез GSH [14]. Нарушение тиолового гомеостаза из-за повышенной активности, например, гена PCS и отсутствие синхронизации между образованием комплекса ФХ-Cd и его транспортом в вакуоль могут увеличить уровень окислительного стресса и снизить способность к детоксикации Cd, что приводит к гиперчувствительности к Cd ряда трансгенных растений со сверхэкспрессией гена PCS. Существует предположение о том, что если скорость образования комплексов ФХ-Cd в растениях превышает скорость их АТФ-зависимого транспорта в вакуоль, то эти комплексы, вероятно, будут накапливаться в цитозоле растений и разрушаться, однако, продукты такого разрушения до сих пор не найдены [15]. Таким образом, вопрос, насколько устойчивостью растений к воздействию ТМ коррелирует с синтезом ФХ имеет достаточно сложный и неоднозначный характер, и далеко не все гены, продукты которых участвуют в синтезе ФХ и других родственных тиолов, подходят для трансформации растений в целях фиторемедиации. Оригинальным способом решения проблемы является создание трансгенных растений, экспрессирующих искусственно синтезированные гены с общей структурой продукта $[\alpha\text{-Глу(Цис)}]_n\text{-Ак}$. Эти синтетические ФХ принципиально отличаются от природных наличием α -пептидной связи в молекуле и способностью нарабатываться на рибосомах. В ряде работ было показано, что подобная замена γ -связи не влияет на способность синтетических ФХ связывать ТМ, так как это свойство прежде всего связано с наличием остатков Цис в этих

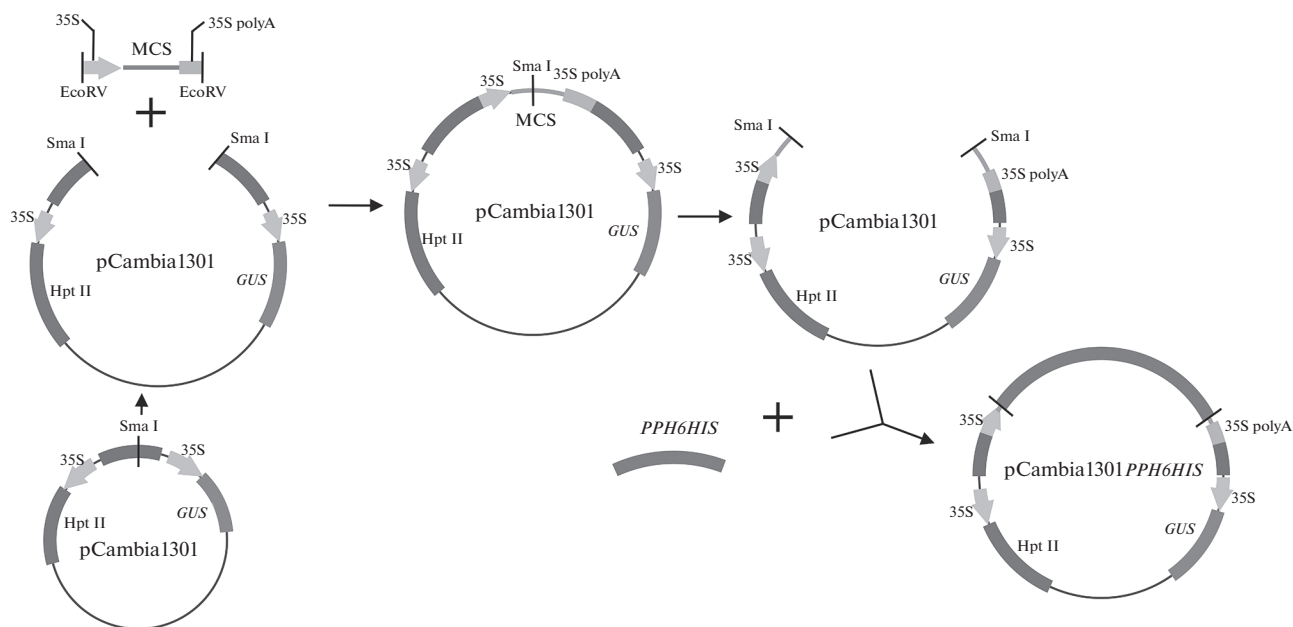


Рис. 1. Схема клонирования гена *PPH6HIS* в плазмиду pCambia1301.

пептидах [16, 17]. При этом был сделан вывод, что пяти остатков Цис недостаточно для связывания высоких концентраций ТМ, в частности Cd [16]. Таким образом, перед нами стояла задача сконструировать более длинный искусственный фитохелатиновый ген, кодирующий эффективный для фиторемедиации пептид, который легко можно было бы обнаружить в трансформированных тканях. Данную задачу можно решить присоединением к аминокислотной последовательности 6 молекул гистидина (6His-tag), который широко используется в иммуноаналитических методах. Кроме того, аминокислота Гис является хелатором ряда двухвалентных катионов металлов и играет значительную роль в детоксикации и накоплении ТМ в клетках растений [18, 19].

Целью данной работы являлось проведение агробактериальной трансформации растений табака искусственно синтезированным геном *PPH6HIS*, кодирующим ФХ со структурой продукта Мет-Гис₆[α-Глу(Цис)]₆Гли, выявление вклада данного продукта в накопление Cd и снижение его негативного действия на экспланты трансгенных растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение генно-инженерной конструкции для трансформации растений

Ген *PPH6HIS* был собран из искусственно синтезированных комплементарных блоков 5'-ATG-CACCACCACCACCACCACGAATGCGAATGT-GAGTGCAGTGCGAGTGCGAATGT-GGCTAA-3' и 5'-TTAGCCACATTCGCACTCGCACTCGCACT-

CACATTCGCACTCGTG-GTGGTGGTGGTGGT-GCAT-3' с 6His-tag на N-конце. Метка 6-His была добавлена в последовательность для обнаружения меченого белка. После сшивки данных блоков, последовательность была клонирована в бинарный вектор для трансформации растений pCambia1301 (Cambia, Австралия), содержащий в области Т-ДНК репортерный ген *GUS* и ген устойчивости к гигромицину. Для удобства клонирования в pCambia1301 по сайту *SmaI* была вставлена 35S кассета, состоящая из 35S промотора вируса мозаики цветной капусты, полилинкера и 35S polyA последовательности (рис. 1). Далее полученный модифицированный вектор pCambia1301 линеаризовали рестриктазой *SmaI* (NEB, Великобритания) в полилинкере 35S кассеты и по данному сайту клонировали последовательность *PPH6HIS* с использованием T4 ДНК-лигазы (NEB, Великобритания) при температуре 14°C в течение 16 ч. Для поиска целевых клонов *E. coli* XL1-Blue после трансформации лигазную смесь использовали праймер 35SF3: 5'-TCCGGAACCTCCTC-GGATT-3' в паре с праймером P6R: 5'-TTAGCCACATTCGCACTCGCACT-3' (ПЦР-продукт размером 405 п.н.). Вставки в клонх проверяли секвенированием на автоматическом анализаторе нуклеиновых кислот ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

В дальнейшем полученная генно-инженерная конструкция pCambia1301*PPH6HIS* была использована для трансформации растений табака с помощью бактерий *Agrobacterium tumefaciens* AGL0.

Трансформация растений табака

Трансгенные растения табака (*Nicotiana tabacum* L., сорт Petit Havana, линия SR1) создавали путем агробактериальной трансформации листовых пластинок модифицированным штаммом агробактерий *A. tumefaciens* AGL0, содержащим вектор pCambia1301PPH6HIS [20]. Для получения контрольных (не несущих целевой пептид) растений использовали исходную конструкцию pCambia1301. Отбор трансгенных растений проводили по результатам гистохимического анализа активности репортерного гена *GUS* и ПЦР-анализа на наличие целевого гена *PPH6HIS* с помощью праймеров 35SF3 и P6R.

Первичные трансформанты выращивали в теплице при 26°C, освещенности 15 клк и 16/8 ч фотопериоде. Семена поколения T1 были получены путем самоопыления трансгенных растений табака поколения T0. С каждого растения семена были собраны отдельно, стерилизованы и отобраны на МС-среде с гигромицином (25 мг/л) в течение 4 нед. [21]. Затем проводился анализ сегрегации растений на зеленые и белые с использованием критерия χ^2 по стандартной методике, и выделяли для дальнейшей работы линии с одной интегрированной копией трансгенов. Зеленые растения адаптировали к почве в течении 3 дней и выращивали в теплице при 26°C, освещенности 15 клк и 16/8 ч фотопериоде. С целью отбора линий трансгенных растений с устойчивой экспрессией синтетического ФХ проводили дальнейший вестерн-блот анализ.

Выделение белков из растений и вестерн-блот анализ

Для вестерн-блот анализа получали белковый экстракт листьев [22]. Электрофорез проводили в трициновой системе ДДС-ПААГ, используя акриламидный набор TGX Stain-Free FastCast (Bio-Rad, США). Белки переносили на нейлоновую мембрану PDVF (Bio-Rad, США) в приборе Trans-BlotTurbo (Bio-Rad, США) при комнатной температуре в течение 12 мин при напряжении 25 В и силе тока 2.5 мА [23]. В качестве маркера использовали набор предварительно окрашенных белков 10–250 кД “Kaleidoscope” (BioRad, США). Для обнаружения пептида были использованы поликлональные антитела мыши к bHis (Abscam, Великобритания). В качестве вторичных были использованы антитела козы против мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена HRP (Abscam, Великобритания). В качестве хромогена для диагностики был использован набор DAB (Cell Marque Corporation, США).

Определение выживаемости эксплантов трансгенных растений поколения T1 на Cd

Для экспериментов использовали листья двухмесячных растений поколения T1, выросших в теплице при 26°C, освещенности 15 клк и 16/8 ч фотопериоде. Стерилизацию проводили следующим образом: листья промывали стерильной дистиллированной водой, затем добавляли 70% этанол, чтобы полностью покрывал растительный материал. Аккуратно перемешивали в течение 15 с, после чего сливали спирт и в сосуд наливали 10% раствор хлорного отбеливателя “Белизна” (ОАО “БСК”, Россия) с добавлением 10 мкл Твин-20. Следили, чтобы раствор также полностью покрывал кусочки листьев. Стерилизацию проводили в течение 10 мин при осторожном периодическом перемешивании и покачивании. Затем сливали стерилизующий раствор и промывали кусочки листьев 5 раз стерильной дистиллированной водой. Далее переносили листья в стерильные чашки Петри, обрезали побелевшие края и скальпелем нарезали на отдельные экспланты размером приблизительно 1 × 1 см без крупных жилок. Готовые экспланты переносили на МС-среду нижней стороной листа вверх. Выживаемость трансгенных эксплантов проверяли, выращивая листовые пластинки в течение 1 мес. на МС-среде с добавлением (на 100 мл среды) 40 мг CaCl₂, 3 г сахарозы, 3 мМ морфолинэтансульфоновой кислоты (рН 5.7), 1 мг 6-БАП, 0.1 мг/л ИУК и Cd²⁺ (в виде соли (CH₃COO)₂Cd) в концентрациях 50, 100 и 200 мкМ [16, 24]. Контрольные экспланты выращивали на той же среде, но без добавления ацетата Cd.

Определение содержания Cd в эксплантах

Экспланты в течение 5 мин отмывали последовательно в 0.1 мМ растворе CaCl₂ и в дистиллированной воде для удаления Cd, адсорбированного на их поверхности. Далее растительный материал фиксировали при 105°C в течение 1 ч, высушивали при 70°C в течение 24 ч до абсолютно сухого веса и взвешивали. Подготовку проб для анализа проводили общепринятым методом сухого озоления. Для этого 200 мг сухого материала измельчали в фарфоровой ступке и сжигали при 500°C в муфельной печи в течение 4 ч. Полученный зольный остаток растворяли в 1 мл 1 М раствора азотной кислоты, переносили в мерные колбы объемом 100 мл и доводили раствор до метки 0.01 М раствором азотной кислоты. Определение содержания Cd проводили методом инверсионной полярографии с использованием вольтамперометрического анализатора “Экотест-ВА” с программируемым роботизированным автосамплером “АС-01/3Д” и углеродным электродом “три в одном” (НПП

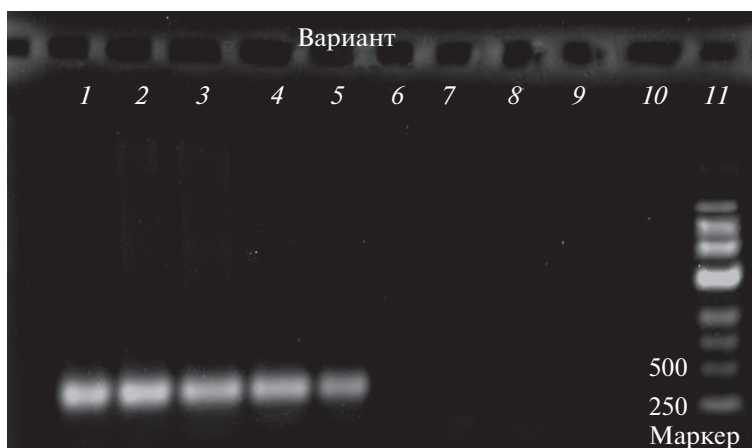


Рис. 2. ПЦР-анализ на наличие целевого гена *PPH6HIS* в трансформированных растениях табака. 1–5 – растения, трансформированные pCambia1301*PPH6HIS*; 6–9 – растения, трансформированные pCambia1301 (контроль); 10 – ПЦР без ДНК; 11 – маркер длин ДНК, 3000 п.н.

“Эконикс-Эксперт”, Россия), согласно инструкции по использованию прибора.

Статистическая обработка результатов

Во всех случаях проводили не менее пяти независимых экспериментов как минимум в пяти повторностях. Результаты обрабатывали с использованием пакета Microsoft Office Excel 2010, доверительные интервалы определяли для 95% уровня значимости.

На рисунке 5 приведены средние величины и их стандартные ошибки. Величины, различия между которыми значимы при $P \leq 0.05$, обозначены разными латинскими буквами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Синтетический ген *PPH6HIS*, кодирующий аналог ФХ с шестью повторяющимися единицами Глу и Цис, а также с 6His-tag на N-конце был клонирован в модифицированный вектор pCambia1301 (рис. 1). В дальнейшем путем агробактериальной трансформации было получено 78 независимых трансгенных линий растений *N. tabacum* L., отобранных по результатам гистохимического анализа активности репортерного гена *GUS* и ПЦР-анализа на наличие целевого гена *PPH6HIS* (рис. 2).

От 24 линий растений не было получено семян, поэтому эти линии в дальнейших экспериментах не использовались. Из оставшихся 54 линий 32 линии несли в себе одну интегрированную копию трансгена. Для экспериментов были отобраны 8 линий, вестерн-блот анализ которых выявил наличие целевого пептида в тканях растений (рис. 3). Эксперименты с листовыми эксплантатами трансгенных и контрольных растений табака позволили оценить вклад продукта гена *PPH6HIS* в преодоление стресса, вызванного Cd. Анализ

физиологического состояния эксплантов, выращенных на регенерационной среде с добавлением разных концентраций Cd^{2+} в течение 1 месяца показал, что в присутствии 50 мкМ ацетата Cd у всех отобранных трансгенных линий и контроля не обнаруживались признаки хлороза тканей, а наблюдалась активная регенерация эксплантов (рис. 4). При концентрации 100 мкМ Cd^{2+} в контрольном варианте у эксплантов обнаруживались большие некротировавшие участки ткани, в то время как в трансгенных линиях наблюдался хлороз, уменьшение размеров листовой пластинки и ее скручивание. Важно отметить, что в линиях 13, 32, 76 регенерационные процессы продолжались и эти экспланты были меньше подвержены хлорозу и скручиванию. При концентрации Cd^{2+} 200 мкМ в регенерационной среде практически все экспланты остановились в росте без признаков регенерации (рис. 4).

Анализ содержания Cd в эксплантах показал, что при концентрации Cd^{2+} 50 мкМ у всех отобранных трансгенных линий и контроля не было статистически достоверных различий в его накоплении (рис. 5). В присутствии 100 мкМ Cd^{2+} в регенерационной среде накопление Cd в эксплантах трансгенных растений было выше на 15.7–109.1% по сравнению с контрольным вариантом опыта в тех же условиях. Линии 13, 32 и 76 накапливали Cd на 72.2, 52.7 и 109.1% больше по сравнению с контролем соответственно.

Все экспланты, выращенные в присутствии 200 мкМ Cd^{2+} в среде, демонстрировали значительное увеличение содержания этого ТМ – выше на 95.9–243.3% по сравнению с контролем. Линии 13, 32 и 76, как и в экспериментах со 100 мкМ Cd^{2+} в среде, так и в присутствии 200 мкМ Cd^{2+} показали наилучшие результаты по накоплению Cd, кото-

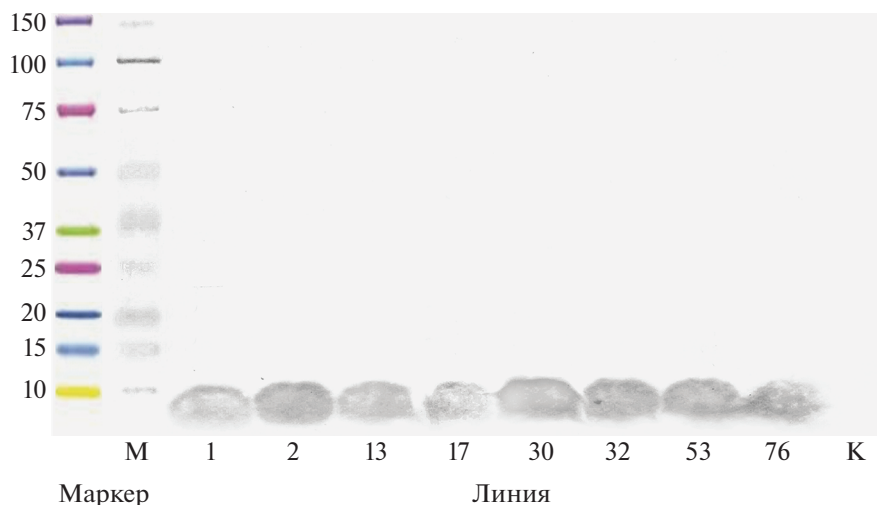


Рис. 3. Вестерн-блот анализ тотального белка из растений табака, трансформированных плазмидой pCambia1301PPH6HIS (линии 1, 2, 13, 17, 30, 32, 53, 76). М – белковый маркер; К – растение, трансформированное pCambia1301 (контроль).

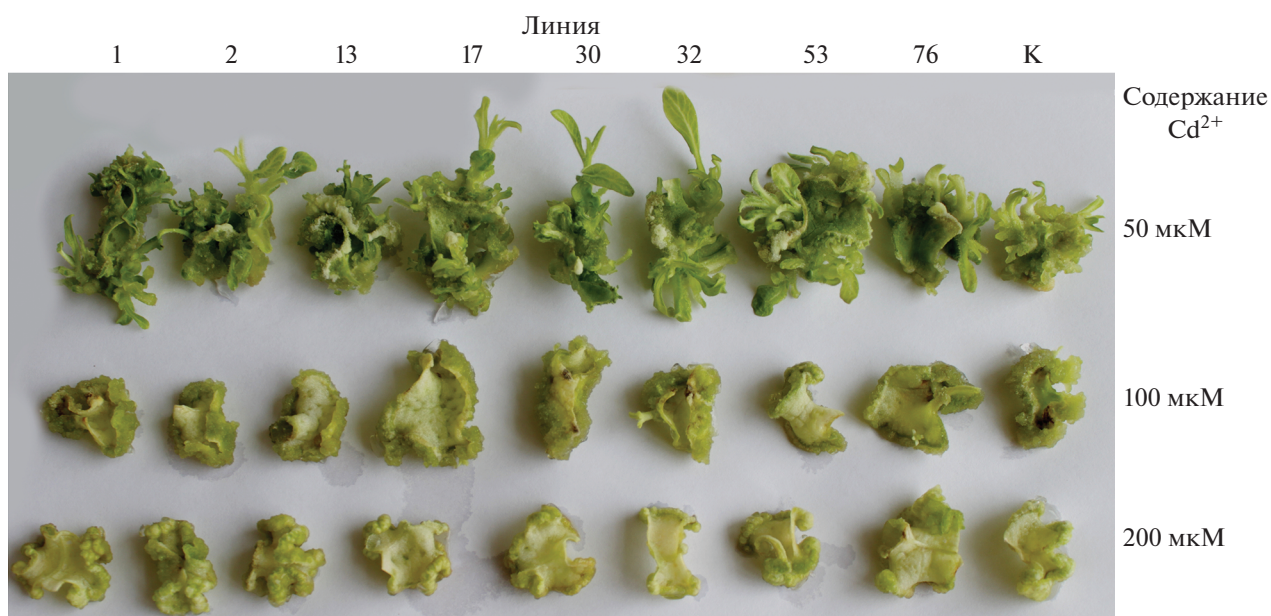


Рис. 4. Визуальная оценка эксплантов листьев трансгенных растений табака Т1 поколения (линии 1, 2, 13, 17, 30, 32, 53, 76) после 30 дней экспозиции на регенерационных средах, содержащих 50, 100 и 200 мкМ ацетата Cd.

рое было больше относительно контрольного варианта на 196.3, 159.2 и 243.3% соответственно (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Культура тканей растений достаточно часто используется в качестве инструмента для исследований в области фиторемедиации почв, загрязненных ТМ. Эти модельные объекты можно использовать для поэтапного улучшения генно-инженерных

конструкций в случае трансформации растений, что позволяет снизить затраты на последующие лабораторные и полевые эксперименты. Использование таких культур также устраняет негативное влияние микроорганизмов (что неизбежно в случае выращивания растений в грунте) и корневых барьеров транслокации, в результате чего можно получить более четкое понимание способности тканей растений к детоксикации ТМ [25, 26].

Один из основных вопросов, который задавался в рамках планирования данных исследований,

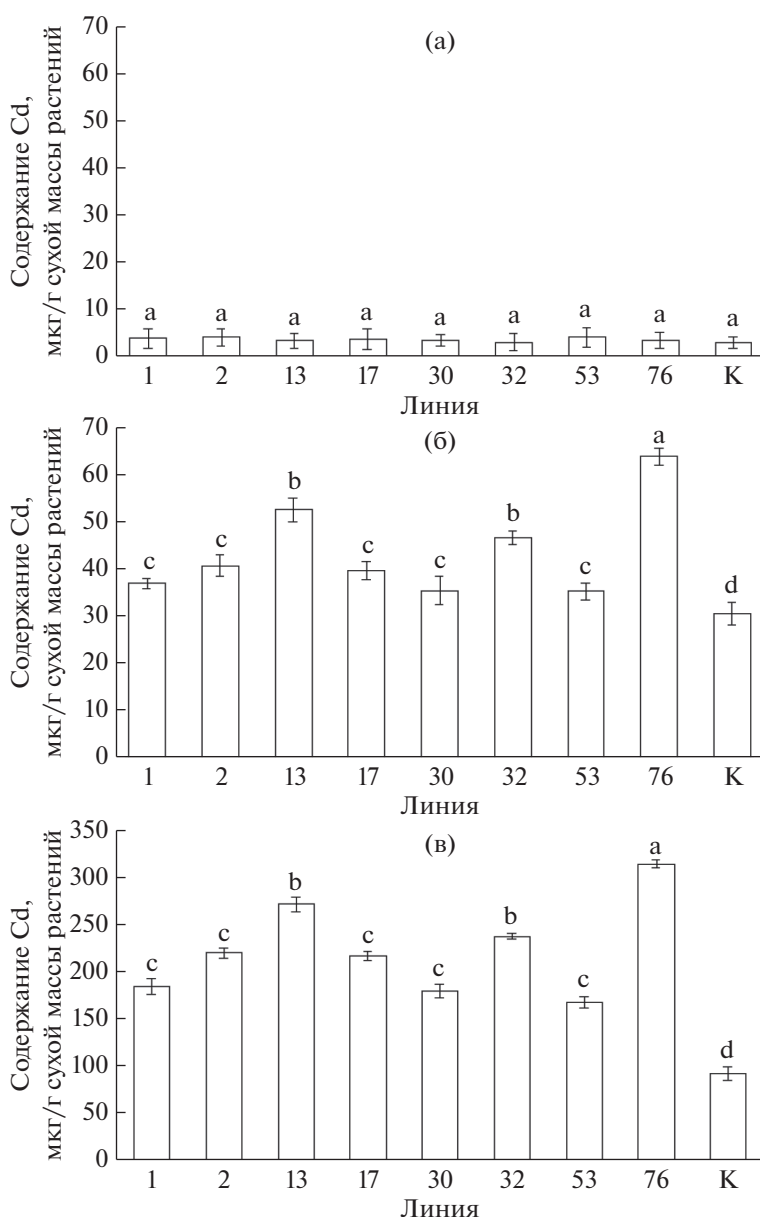


Рис. 5. Содержание Cd в листовых эксплантатах табака после 30 дней экспозиции на средах, содержащих 50 мкМ (а), 100 мкМ (б) и 200 мкМ (в) ацетата Cd. Разными латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми значимы при $P \leq 0.05$.

был связан с тем, не мешает ли полигистидиновая последовательность 6His-tag на N-конце искусственного ФХ его металлсвязывающей активности. Ранее практически аналогичный искусственный пептид был использован в исследовании Постригань с соавторами, но этот ФХ, названный “псевдофитохелатином”, из-за особенностей процедуры клонирования содержал 5 молекул Цис, а для экспериментов была использована всего 1 линия трансгенного табака [16]. В данном исследовании мы выявили 8 линий табака с экспрессией *PRH6HIS*, доказанной с помощью вестерн-блот анализа с использованием анти-6His-антител (рис. 3).

Полигистидиновая последовательность 6His-tag известна широким применением в методе металл-аффинной хроматографии белковых веществ [27]. Эта технология основывается на взаимодействии некоторых аминокислот (преимущественно Гис) с катионами таких металлов, как Cu, Ni, Zn и Co. Эти ионы проявляют разное сродство и специфичность к Гис. Так Ni^{2+} проявляют высокое сродство, но низкую специфичность, а Co^{2+} более специфичны, но не так эффективно связываются с Гис [28]. В течение многих лет использование полигистидиновых меток было основным методом выделения рекомбинантных белков. Однако

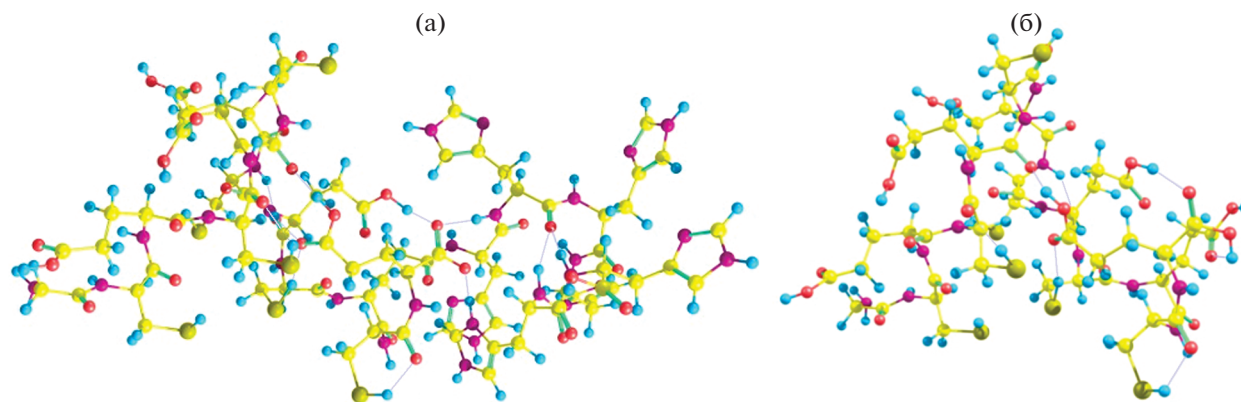


Рис. 6. Визуализация в программе ChemCraft трехмерных структур *PPH6HIS* (а) и *PPH6* (б).

ряд исследований показал, что добавление His-метки может повлиять на функцию и стабильность белка, и данный факт, вероятно, вызван изменениями в трехмерной структуре [29]. В живых организмах из миллионов потенциально возможных пространственных комбинаций протеин принимает одну-единственную заранее известную форму (фолдинг белков). Добавление 6His-tag на N-конце может непреднамеренно изменить функциональность и биотехнологические характеристики искусственного ФХ. В нашей работе визуализация в программе ChemCraft пептидов, соответствующих *PPH6* (Met[α -Глу(Цис)]₆Гли) и *PPH6HIS* (Met-Гис₆[α -Глу(Цис)]₆Гли), выявила различия в их структуре (рис. 6).

Полученные на листовых эксплантатах результаты доказали, что продукт гена *PPH6HIS* способен повышать устойчивость растительных тканей к стрессовому воздействию Cd и увеличивать накопление этого ТМ, вероятно благодаря транспорту комплексов “искусственный ФХ-Cd” в вакуоли клеток. На сегодняшний день практически нет работ, в которых доказан процесс этого транспорта, но результаты, полученные в настоящей статье и в работах Постриганя с соавторами [16], а также Shukla с соавторами [17] говорят о такой возможности, иначе чрезмерное накопление и последующее разрушение комплексов “искусственный ФХ-Cd” в цитозоле приводило бы к отравлению и последующей гибели растительных клеток. Однако в вышеописанных работах были получены результаты, показывающие преодоление токсического воздействия Cd трансформированными видами растений, а также накопление этого ТМ в тканях трансформантов, вырабатывающих искусственные ФХ, что свидетельствует, вероятно, о транспорте искусственных ФХ в вакуоли клеток.

В настоящей работе в присутствии 100 мкМ ацетата Cd экспланты трансгенных растений,

особенно линии 13, 32 и 76, могли значительно аккумулировать Cd (рис. 5б), а также хорошо переносили стрессовое воздействие и почти не останавливались в своем росте, о чем свидетельствует визуальная оценка эффективности регенерации проростков (рис. 4). Данный результат, вероятно, обусловлен положением гена *PPH6HIS* в геноме отдельных трансформированных линий и напрямую связан с уровнем его экспрессии. Нарботка продукта MetГис₆[α -Глу(Цис)]₆Гли может быть как недостаточной для проявления устойчивости к Cd, так и избыточной, что может, вероятно, привести к проблемам с транспортом комплексов “искусственный ФХ-Cd” в вакуоли.

Листовые экспланты, полученные от трансгенных растений, характеризовались более высоким уровнем накопления Cd при 200 мкМ Cd²⁺ в регенерационной среде по сравнению с контрольной группой, однако как и в экспериментах со 100 мкМ Cd²⁺ 3 линии – 13, 32 и 76 – отличались наибольшими показателями. Несмотря на то, что экспланты, полученные из листьев этих трансгенных линий, как и остальные (в том числе и контрольные) замедляли свой рост при 200 мкМ Cd²⁺ в среде, однако они выглядели физиологически более благополучными по сравнению с контрольными, имеющими большие очаги некротической ткани (рис. 4).

Результаты анализа устойчивости трансформированных *PPH6HIS* растений табака к кадмиевому стрессу отличались от тех, которые ранее были получены на растениях табака, трансформированных “псевдофитохелатином” [16]. Авторами рассматривалась одна линия растений табака, которая по сравнению с контролем активно росла и регенерировала при 200 мкМ Cd²⁺ в среде. Наши исследования показали, что экспланты растений табака, трансформированных геном *PPH6HIS*, не выдерживали присутствия такой высокой концентрации Cd²⁺, демонстрируя сильное торможение

ние в росте и развитии, а также значительный хлороз листьев. Известно, что хлороз является основным визуальным неспецифическим признаком действия ТМ на растения, свидетельствуя об уменьшении уровня зеленых пигментов в них [10]. Возможно, меньшая устойчивость эксплантов, несущих ген *PPH6HIS*, при действии 200 мкМ ацетата Cd связана с изменением пространственной структуры молекулы и вероятными проблемами с транспортировкой комплексов ФХ-ТМ в вакуоли клеток, что мешало детоксикации.

Эксперименты с искусственными фитохелатиновыми генами последних лет показали, что увеличение количества повторяющихся единиц Глу и Цис может как положительно, так и негативно влиять на свойства пептида связывать ТМ. Так в работе Chaturvedi и Archana было показано, что пептид со структурой $[\alpha\text{-Глу(Цис)}]_{20}$ способствовал как повышению устойчивости бактерий *Deinococcus radiodurans* к воздействию Cd, так и большему накоплению этого ТМ в клетках [30]. При этом трансгенные растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, содержащие пептиды со структурой $[\alpha\text{-Глу(Цис)}]_{16}$ и $[\alpha\text{-Глу(Цис)}]_{20}$, становились чувствительными к воздействию Cd и мышьяка. Однако преодолеть стресс и накапливать значительные концентрации ТМ удавалось только *A. thaliana*, нарабатывающим пептид со структурой $[\alpha\text{-Глу(Цис)}]_{14}$. Одним из возможных объяснений полученных результатов является тот факт, что более длинные комплексы металлов с ФХ не могут легко транспортироваться через тонопласт [16].

В данной работе ген *PPH6HIS* со структурой продукта МетГис₆ $[\alpha\text{-Глу(Цис)}]_6$ Гли был показан как эффективный инструмент для повышения устойчивости растений табака к воздействию Cd. Несмотря на то, что добавление 6His-tag на N-конце несколько снизило способность пептида связывать данный ТМ, очень интересным является дополнительная аффинность молекулы к таким металлам, как Cu, Ni, Zn и Co, что открывает новые перспективы для использования продукта гена *PPH6HIS* для фиторемедиации.

Работа была выполнена с привлечением приборного парка регионального Центра коллективного пользования уникального оборудования “Агидель” Уфимского федерального исследовательского центра РАН в рамках госзадания (тема №АААА-А21-121011990120-7) и при частичном финансировании Программы создания и функционирования карбонового полигона на территории Республики Башкортостан “Евразийский карбоновый полигон” на 2021–2022 годы.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ojuederie O.B., Babalola O.O.* Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: a review // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2017. V. 14. P. 1504. <https://doi.org/10.3390/ijerph14121504>
2. *Villiers F., Jourdain A., Bastien O., Leonhardt N., Fujio-ka S., Tichtincky G., Parcy F., Bourguignon J., Hugou-vieux V.* Evidence for functional interaction between brassinosteroids and cadmium response in *Arabidopsis thaliana* // *J. Exp. Bot.* 2012. V. 63. P. 1185. <https://doi.org/10.1093/jxb/err335>
3. *Ali H., Khan E., Sajad M.A.* Phytoremediation of heavy metals – concepts and applications // *Chemosphere*. 2013. V. 91. P. 869. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
4. *Reeves R.D., Baker A.J., Jaffré T., Erskine P.D., Echevarria G., van der Ent A.* A global database for plants that hyperaccumulate metal and metalloids trace elements // *New Phytol.* 2018. V. 218. P. 407. <https://doi.org/10.1111/nph.14907>
5. *Ibañez S., Talano M., Ontañón O., Suman J., Medina M.I., Macek T., Agostini E.* Transgenic plants and hairy roots: exploiting the potential of plant species to remediate contaminants // *N. Biotechnol.* 2016. V. 33. P. 625. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.11.008>
6. *Yan A., Wang Y., Tan S.N., Mohd Yusof M.L., Ghosh S., Chen Z.* Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 359. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00359>
7. *Das N., Bhattacharya S., Maiti M.K.* Enhanced cadmium accumulation and tolerance in transgenic tobacco overexpressing rice metal tolerance protein gene *Os-MTP1* is promising for phytoremediation // *Plant Physiol. Biochem.* 2016. V. 105. P. 297. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.049>
8. *Haider F.U., Liqun C., Coulter J.A., Cheema S.A., Wu J., Zhang R., Wenjun M., Farooq M.* Cadmium toxicity in plants: impacts and remediation strategies // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2021. V. 211. P. 111887. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111887>
9. *Raza A., Habib M., Kakavand S.N., Zahid Z., Zahra N., Sharif R., Hasanuzzaman M.* Phytoremediation of cadmium: physiological, biochemical, and molecular mechanisms // *Biology (Basel)*. 2020. V. 9. P. 177. <https://doi.org/10.3390/biology9070177>
10. *Тумов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В.* Тяжелые металлы и растения. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2014. 194 с.
11. *Zagorchev L., Seal C.E., Kranner I., Odjakova M.* A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. P. 7405. <https://doi.org/10.3390/ijms14047405>
12. *Wójcik M., Tukiendorf A.* Cadmium uptake, localization and detoxification in *Zea mays* // *Biol. Plant.* 2005. V. 49. P. 237. <https://doi.org/10.1007/s10535-005-7245-7>
13. *Satofuka H., Fukui T., Takagi M., Atomi H., Imanaka T.* Metal-binding properties of phytochelatin-related peptides // *J. Inorg. Biochem.* 2001. V. 86. P. 595. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(01\)00223-9](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(01)00223-9)

14. *Wawrzynski A., Kopera E., Wawrzynska A., Kaminska J., Bal W., Sirko A.* Effects of simultaneous expression of heterologous genes involved in phytochelatin biosynthesis on thiol content and cadmium accumulation in tobacco plants // *J. Exp. Bot.* 2006. V. 57. P. 2173. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj176>
15. *Wojas S., Clemens S., Hennig J., Skłodowska A., Kopera E., Schat H., Bal W., Antosiewicz D. M.* Overexpression of phytochelatin synthase in tobacco: distinctive effects of AtPCS1 and CePCS genes on plant response to cadmium // *J. Exp. Bot.* 2008. V. 59. P. 2205. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern092>
16. *Постригань Б.Н., Князев А.В., Кулуев Б.Р., Яхин О.И., Чемерис А.В.* Активность синтетического псевдо-фитохелатинового гена в растениях табака // *Физиология растений.* 2012. Т. 59. С. 303.
17. *Shukla D., Tiwari M., Tripathi R.D., Nath P., Trivedi P.K.* Synthetic phytochelatin complement a phytochelatin-deficient Arabidopsis mutant and enhance the accumulation of heavy metal (loid) s // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. V. 434. P. 664. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.138>
18. *Callahan D.L., Baker A.J.M., Kolev S.D., Wedd A.G.* Metal ion ligands in hyperaccumulating plants // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2006. V. 11. P. 2. <https://doi.org/10.1007/s00775-005-0056-7>
19. *Zemanová V., Pavlík M., Pavlíková D., Tlustoš P.* The significance of methionine, histidine and tryptophan in plant responses and adaptation to cadmium stress // *Plant Soil Environ.* 2014. V. 60. P. 426. <https://doi.org/10.17221/544/2014-PSE>
20. *Horsh R.B., Fry J.E., Hoffmann N.L., Wallroth M., Eichholtz D., Rogers S.C., Fraley R.T.* A simple and general method for transferring genes into plants // *Science.* 1985. V. 227. P. 1229. <https://doi.org/10.1126/science.227.4691.1229>
21. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
22. *Heiss S., Wachter A., Bogs J., Cobbett C., Rausch T.* Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure // *J. Exp. Bot.* 2003. V. 54. P. 1833. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg205>
23. *Towbin H., Staehelin T., Gordon J.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1979. V. 76. P. 4350. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
24. *Krystofova O., Zitka O., Krizkova S., Hynek D., Shestivska V., Adam V., Hubalek J., Mackova M., Macek T., Zehnalek J., Babula P., Havel L., Kizek R.* Accumulation of cadmium by transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.) carrying yeast metallothionein gene revealed by electrochemistry // *Int. J. Electrochem. Sci.* 2012. V. 7. P. 886.
25. *Jaskulak M., Grobelak A.* Potential applications of plant *in vitro* cultures in phytoremediation studies // *Chall. Mod. Technol.* 2017. V. 8. P. 11. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.2613>
26. *Muszyńska E., Hanus-Fajerska E., Koźmińska A.* Differential tolerance to lead and cadmium of micropropagated *Gypsophila fastigiata* ecotype // *Water Air Soil Pollut.* 2018. V. 229. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3702-8>
27. *Zhang C.Y., Zhao S.Q., Zhang S.L., Luo L.H., Liu D.C., Ding W.H., Fu D.J., Deng X.D., Yin D.C.* Database study on the expression and purification of membrane proteins // *Protein Pept. Lett.* 2021. V. 28. P. 972. <https://doi.org/10.2174/0929866528666210415120234>
28. *Ueda E.K., Gout P.W., Morganti L.* Current and prospective applications of metal ion–protein binding // *J. Chromatogr.A* 2003. V. 988. P. 1. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(02\)02057-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(02)02057-5)
29. *Booth W.T., Schlachter C.R., Pote S., Ussin N., Mank N.J., Klapper V., Offermann L.R., Tang C., Hurlburt B.K., Chruszcz M.* Impact of an N-terminal polyhistidine tag on protein thermal stability // *ACS Omega.* 2018. V. 3. P. 760. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01598>
30. *Chaturvedi R., Archana G.* Cytosolic expression of synthetic phytochelatin and bacterial metallothionein genes in *Deinococcus radiodurans* R1 for enhanced tolerance and bioaccumulation of cadmium // *BioMetals.* 2014. V. 27. P. 471. <https://doi.org/10.1007/s10534-014-9721-z>