

Функциональная комплементация мутанта *Saccharomyces cerevisiae* $\Delta gef1$ генами *SaCLCa1* и *SaCLCc1* из галофита *Suaeda altissima* (L.) Pall**Научный руководитель – Балнокин Юрий Владимирович***Неделяева О.И.¹, Шувалов А.В.²*

1 - Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия; 2 - Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

Семейство хлоридных каналов (CLC) растений включает анион/протонные антипортеры и анионные каналы, локализованные в эндомембранах. CLC участвуют в стимуляции закисления люмена органелл, регуляции мембранного потенциала и накоплении в них анионов Cl^- и NO_3^- .

Клонировано 2 гена из соленакапливающего галофита *Suaeda altissima* - *SaCLCa1* и *SaCLCc1*. Наиболее вероятно, что оба гена относятся к семейству CLC, так как нуклеотидные последовательности кодирующих областей генов в большей степени сходны с последовательностями CLC других растений. На основе анализа аминокислотной последовательности можно предположить, что оба белка являются анион/ H^+ - антипортерами, *SaCLCa1* транспортирует NO_3^- , а *SaCLCc1* - Cl^- .

В работе исследовали физиологические функции *SaCLCa1* и *SaCLCc1*. Для этого осуществили гетерологическую экспрессию *SaCLCa1* и *SaCLCc1* в мутанте *Saccharomyces cerevisiae* по единственному гену семейства CLC - *GEF1*, участвующему в транспорте Cl^- .

Нокаут *GEF1* приводит к фенотипу *petite*, подавлению роста мутанта на средах, дефицитных по железу и содержащих неферментируемые источники углерода; на минимальных средах с pH 7.0; на средах с повышенным содержанием токсичных катионов (Na^+ , Mn^{2+}).

Для проведения функциональной комплементации получен дрожжевой делеционный мутант $\Delta gef1$ на основе штамма W303. Положительным контролем комплементации мутации $\Delta gef1$ служил *CLCd*, клонированный из *Arabidopsis thaliana*.

Рост мутанта $\Delta gef1$, экспрессирующего *SaCLCc1* и *AtCLCd*, восстанавливался при выращивании клеток на дефицитной по Fe^{2+} среде YPEG (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 2% этанол и 2% глицерин как неферментируемые источники углерода) и на минимальных синтетических средах: SD (2% декстроза – ферментируемый источник углерода, 50 мМ Mes-Tris, pH 7.0) и SR (2% раффиноза – неферментируемый источник углерода, 50 мМ Mes-Tris, pH 7.0). Восстановление роста трансформантов наблюдалось также при выращивании клеток на богатой среде YPD (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 2% декстроза), содержащей ионы Mn^{2+} в повышенных концентрациях. Восстановление роста мутанта $\Delta gef1$ не наблюдалось ни на одной из сред при экспрессии в нем *SaCLCa1*.

Отсутствие комплементации мутации $\Delta gef1$ геном *SaCLCa1* указывает на возможное участие белка *SaCLCa1* в транспорте ионов NO_3^- .

Комплементация фенотипа мутанта $\Delta gef1$ геном *SaCLCc1* свидетельствует об участии белка *SaCLCc1* в транспорте ионов Cl^- . Восстановление переноса Cl^- приводит к нейтрализации положительных зарядов в люмене, что стимулирует работу H^+ -V-АТФазы и Cu^{2+} -АТФазы эндомембран. Подкисление люмена и поступление ионов меди способствуют формированию функциональной высокоаффинной системы поглощения железа в поствезикулах аппарата Гольджи и, следовательно, восстановлению роста мутанта на Fe-дефицитных средах. Конвертирование $\Delta\phi$ в ΔpH и образование высокого трансмембранного ΔpH в результате стимуляции H^+ -V-АТФазы обеспечивает изолирование токсичных ионов

Mn^{2+} в вакуоли и рост мутанта $\Delta gef1$, экспрессирующего *SaCLC1*, на средах с повышенным содержанием ионов Mn^{2+} .

Работа поддержана грантом РФФИ 16-34-00991 мол_а.