N E W S
OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL
ISSN 2224-5308
Volume 6, Number 324 (2017), 176 – 182

Y. M. Dyo, A. K. Tursunova, O. V. Chebonenko, A. Zh. Amirkulova, O. A. Sapko, A. Y. Elchibekova, A. B. Mukhametkali, A. T. Zhaparova A. Sh. Utarbaveva

M. A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, CS MES RK, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: a.utar@mail.ru

ENZYME ACTIVITY OF CELLULAR EXTRACTS OF TRANSPLASTOMIC STRAINS OF *Chlamydomonas* CARRIED WITH GENETIC INSERTS *St-gluB* AND *St-chta2*

Abstract. The use of modern genetic engineering methods for the production of biofungicidal preparations based on microalgae is a new and topical direction with a great perspective along with widely used microbial recombinant preparations. Hydrolytic enzymes are part of a complex system of plant protective response to the effects of pathogens. It is proved that the activity of chitinases increases significantly when the plant interacts with the pathogen. The aim of the study was to determine the level of enzymatic activity of recombinant *St-gluB* and *St-chtA2* in cell extracts of transplastic *Chlamydomonas* strains and optimize the conditions for cultivation of promising transformants. The level of enzymatic activity of recombinant *St-gluB* and *St-chtA2* in cell extracts of transplastic *Chlamydomonas* strains was determined and conditions for cultivation of promising transformants were optimized. As a result of the studies of enzyme activity, 8 transformants *Chlamydomonas reinhardtii* TN 72-4 with *St-gluB* insert and 4 with *St-chtA2* insert showed that the extracts from lyophilized biomass, which are subject to finer purification, are more active than the coarse cellular extracts. Based on the obtained data on the activity of recombinant enzymes, the two most promising transformed strains – *Chlamydomonas reinhardtii TN 72 - CH1* and *GB4* – were selected.

Keywords: *Chlamydomonas*, microalgae, recombinant PR2, PR3 proteins, enzymatic activity, cellular extracts.

УДК 577.21: 581.19: 632.938

Ю. М. Дё, А. К. Турсунова, О. В. Чебоненко, А. Ж. Амиркулова, О. А. Сапко, А. Ю. Ельчибекова, А. Б. Мухаметкали, А. Т. Жапарова, А. Ш. Утарбаева

РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина» КН МОН РК, Алматы, Казахстан

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ЭКСТРАКТОВ ТРАНСПЛАСТОМНЫХ ШТАММОВ *Chlamydomonas*, НЕСУЩИХ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВСТАВКИ *St-gluB* И *St-chta2*

Аннотация. Использование современных генно-инженерных методов для получения биофунгицидных препаратов на основе микроводорослей является новым актуальным направлением, имеющим большую перспективу наряду с широко используемыми микробными рекомбинантными препаратами. Гидролитические ферменты являются частью сложной системы механизма защитного ответа растений на воздействие патогенов. Доказано, что активность хитиназ значительно возрастает при взаимодействии растения с патогеном. Целью исследования было определить уровень ферментативной активности рекомбинантных *St-gluB* и *St-chtA2* в клеточных экстрактах трансластомных штаммов *Chlamydomonas* и оптимизировать условия культивирования перспективных трансформантов. Определен уровень ферментативной активности рекомбинантных *St-gluB* и *St-chtA2* в клеточных экстрактах трансластомных штаммов *Chlamydomonas* и оптимизи-

рованы условия культивирования перспективных трансформантов. В результате проведенных исследований ферментативной активности 8 трансформантов *Chlamydomonas reinhardtii TN 72* – 4 со вставкой *St-gluB* и 4 со вставкой *St-chtA2* было показано, что наибольшей активностью обладают экстракты из лиофилизированной биомассы, подверженные более тонкой очистке, по сравнению с грубыми клеточными экстрактами. На основании полученых данных об активности рекомбинантных ферментов, были отобраны 2 наиболее перспективных трансформированных штамма – *Chlamydomonas reinhardtii TN 72* – CH1 и GB4.

Ключевые слова: *Chlamydomonas,* микроводоросли, рекомбинантные PR2, PR3 белки ферментативная активность, клеточные экстракты.

Фундаментальные исследования в области формирования естественного иммунитета растений сфокусированы главным образом на одном из основных направлений по борьбе с фунгальными патогенами – получении ГМО растений картофеля с приобретенной путем встраивания генов различных классов хитиназ и глюканаз устойчивостью к фунгальным патогенам [1, 2], а также перенос гена β-1,3-глюканазы картофеля в другие растения [3]. Указаная стратегия основана на том, что PR-белки растений (хитиназ и β-1,3-глюканаз) играют важную защитную роль в фитоиммунном ответе на действие патогена [4, 5].

Гидролитические ферменты являются частью сложной системы механизма защитного ответа растений на воздействие патогенов. Доказано, что активность хитиназ значительно возрастает при взаимодействии растения с патогеном [6]. Участие хитиназ (EC 3.2.1.14) и ß-1,3-глюканаз (EC 3.2.1.39) в защитном ответе подтверждается данными о том, что очищенные препараты растительных хитиназ способны в сочетании с действием β-1,3-глюканаз разрушать изолированные клеточные стенки гриба и значительно ингибировать *in vitro* рост патогенных грибов [7, 8].

Некоторые изоформы гидролитических ферментов могут накапливаться конститутивно, однако, при заражении их уровень возрастает в несколько раз [9] и индуцируется координировано [10] – это составляет важную часть защитной реакции растений, направленной на угнетение роста грибов.

Хитиназы широко распространены среди живых организмов и обнаруживаются в грибах, бактериях, растениях и животных [11]. Они делятся на семейства согласно классификации по схожести их аминокислотной последовательности [12]. Хитинолитические ферменты также делятся по характеру ферментативного действия на субстрат. Эндохитиназы идентифицируются как ферменты, катализирующие случайное расщепление внутренних точек полимера хитина. Экзохитиназы катализируют массивное выделение ацетилхитобиозы или N-ацетилглюкозамина из не восстанавливающих концов хитина и таким образом относятся к хитобиозидазам и β-N-ацетилглюкозаминидазам соответственно [13, 14].

Хитиназы демонстрируют различные функции в различных организмах. В бактериях они чаще всего вовлечены в процесс обмена веществ, в то время, как в дрожжах и некоторых грибах они преимущественно задействованы в процессе морфогенеза. У животных и растений хитиназы играют основную роль в защите организма от атаки патогена [15].

Индукция синтеза PR-белков при инфицировании вирусами, бактериями и грибами является одним из основных механизмов защиты растений от фитопатогенов. В этой связи, особое внимание уделяют гидролитическим ферментам – хитиназам и β-1,3-глюканазам, защитная роль которых составляет важную часть в семействах PR-белков [16].

Использование современных генно-инженерных методов для получения биофунгицидных препаратов на основе микроводорослей является новым актуальным направлением, имеющим большую перспективу наряду с широко используемыми микробными рекомбинантными препаратами. Необходимость разработки способов повышения устойчивости к патогенам на основе современных молекулярно-биологических и биохимических подходов – выявления молекулярных и биохимических механизмов участия PR-белков в формировании устойчивости к патогенам и разработки на их основе биологических средств защиты очевидна и несомненна.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования служили транспластомные штаммы полученные в результате проведенной ранее трансформации клеток двух идентичных клонов микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii TN 72* с применением двух типов плазмидного вектора *pSRSap1* – несущего ген *St-gluB* и *St-chtA2* было получено 8 трансформантов – 4 со вставкой *St-gluB* и 4 со вставкой *St-chtA2*.