*Journal of Stress Physiology & Biochemistry, Vol. 10 No. 4 2014, pp. 85-97 ISSN 1997-0838*


**ORIGINAL ARTICLE**

# Mitochondria as a Possible Place for Initial Stages of Steroid Biosynthesis in Plants

Elena K. Shematorova[1], Ivan Yu. Slovokhotov[1], Marat R. Khaliluev[2,3], Irina N. Berdichevets[4,5], Ekaterina N. Baranova[3], Olga G. Babak[4], Dmitry G. Shpakovski[1], Svetlana G. Spivak[4,6], George V. Shpakovski[1]*

[1] *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow 117997, Russia*
[2] *Russian Timiryazev State Agrarian University, Moscow 127550, Russia*
[3] *All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow 127550, Russia*
[4] *Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk 220072, Belarus*
[5] *K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow 127276, Russia*
[6] *Belarussian State Medical University, Minsk 220116, Belarus*

*E-Mail: ***gvs@ibch.ru***

Received November 7, 2014

With the aim of thorough comparison of steroidogenic systems of plants and animals, transgenic plants of Solanaceae family expressing *CYP11A1* cDNA encoding cytochrome $P450_{SCC}$ of mammalian mitochondria were further analysed. Positive effect of *CYP11A1* on resistance of the transgenic tobacco plants to the infection by fungal phytopathogene *Botrytis cinerea* was for the first time detected. Subtle changes in mitochondria of the transgenic *Nicotiana tabacum* plants expressing mammalian *CYP11A1* cDNA were demonstrated by transmissive electron microscopy. Genetic determinants (cDNAs and genes) encoding main components of the electron transfer chain of plant mitochondria were for the first time cloned and characterized. It was established that plants from the Solanaceae family (tomato, tobacco and potato) contain two different genes with similar exon-intron structures (all contain 8 exons) encoding mitochondrial type ferredoxins (MFDX), and one gene for mitochondrial ferredoxin reductase (MFDXR). The results obtained point out on profound relatedness of electron transfer chains of P450-dependent monooxygenases in mammalian and plant mitochondria and support our previous findings about functional compatability of steroidogenic systems of Plantae and Animalia.

*Key words: transgenic plants, Nicotiana tabacum L., Solanum lycopersicum L., Digitalis purpurea L., CYP11A1, cytochrome P450scc, Botrytis cinerea, mitochondrial type plant ferredoxins (MFDX), progesterone, electron microscopy.*

ORIGINAL ARTICLE

# Митохондрии как возможное место инициации синтеза стероидных гормонов в растениях

Е.К. Шематорова[1], И.Ю. Словохотов[1], М.Р. Халилуев[2,3], И.Н. Бердичевец[4,5], Е.Н. Баранова [3], О.Г. Бабак[4], Д.Г. Шпаковский[1], С.Г. Спивак[4,6], Г.В. Шпаковский[1]*

[1] *ФГБУН Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва 117997, Россия*
[2] *ФГБОУ ВПО Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва 127550, Россия*
[3] *ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Москва 127550, Россия*
[4] *ГНУ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск 220072, Беларусь*
[5] *ФГБУН Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН, Москва 127276, Россия*
[6] *Белорусский государственный медицинский университет, Минск 220116, Беларусь*

*E-Mail: ***gvs@ibch.ru***

Поступила в редакцию 7 Ноября 2014 г.

С целью сравнения стероидогенных систем растений и животных продолжен анализ трансгенных растений семейства Solanaceae, экспрессирующих кДНК гена *CYP11A1*, кодирующего у животных митохондриальный цитохром $P450_{SCC}$. Показано положительное влияние *CYP11A1* на устойчивость трансгенных растений табака к грибному фитопатогену *Botrytis cinerea*. Установлено резкое изменение структуры митохондрий трансгенных растений табака, что является первым свидетельством в пользу гипотезы о том, что начальные стадии синтеза стероидных гормонов могут происходить в растительных митохондриях. Впервые структурно охарактеризованы основные компоненты митохондриальной электронтранспортной цепи растений: клонированы и установлена структура кДНК и генов адренонодоксиноподобных ферредоксинов табака, томата и картофеля семейства Solanaceae. Установлено, что у растений этого семейства имеются два разных гена ферредоксинов митохондриального типа (*MFDX1* и *MFDX2*), имеющие сходную экзон-интронную структуру и кодирующие предшественники адренодоксиноподобных белков, различающиеся прежде всего по структуре *N*-концевого участка белка (кодируется первым и вторым экзонами), соответствующего лидерному пептиду. Полученные результаты указывают на несомненное сходство электронтранспортных цепей P450-зависимых монооксигеназ в митохондриях животных и растений и ещё раз свидетельствуют о возможности совмещения стероидогенных систем Plantae и Animalia.

*Key words: трансгенные растения, Nicotiana tabacum L., Solanum lycopersicum L., Digitalis purpurea L., CYP11A1, цитохром P450scc, Botrytis cinerea, растительные ферредоксины митохондриального типа (MFDX), прогестерон, электронная микроскопия.*

В последнее десятилетие получен ряд экспериментальных данных об определённой структурной и функциональной консервативности путей биосинтеза биологически активных стероидных соединений в растениях и у животных. Установлено, что основные стадии в процессах биосинтеза и метаболизма стероидных гормонов животных и брассиностероидов растений катализируют цитохромы P450, в обеих системах функционируют такие ферменты, как стероид-5α-редуктаза (5αR) и 3β-гидроксистероид-дегидрогеназа /$\Delta^5$-$\Delta^4$-изомераза (3β-HSD). Также убедительно доказано, что в растениях наряду с брассиностероидами присутствуют такие стероидные гормоны животных, как прогестерон, 17-гидроксипрогестерон, 16-дегидроксипрогестерон и андростендион (Simerský *et al.*, 2009; Pauli *et al.*, 2010). Пути биосинтеза этих соединений и их роль в жизнедеятельности растений пока не изучены. На сегодняшний день установленным является лишь то, что прогестерон выполняет важные функции в регуляции процессов роста и развития растений: например, экзогенный прогестерон стимулирует рост и созревание пыльцы растений табака (Ylstra *et al.*, 1995). Совокупность этих данных делает актуальным создание и исследование трансгенных растений, экспрессирующих гены стероидогенных белков животных. С одной стороны эти растения являются удобной моделью для изучения процессов биосинтеза и функций стероидных гормонов животных в растениях. С другой стороны подход, основанный на применении генов белков стероидогенеза животных, может привести к созданию трансгенных растений, обладающих важными для сельского хозяйства свойствами, а в случае лекарственных растений – свойствами, важными для производства медицинских препаратов из растительного сырья. Не исключено также и то, что культура тканей этих трансгенных растений может найти биотехнологическое применение для осуществления трансформации различных стероидных соединений или их наработки.

Ключевую роль в биосинтезе стероидных гормонов животных играет цитохром $P450_{SCC}$ (side-chain-cleaving), который локализован во внутренней мембране митохондрий клеток стероидогенных тканей и, с участием двух других компонентов митохондриальной электрон-транспортной цепи, адренодоксина и адренодоксинредуктазы, катализирует реакцию отщепления боковой цепи холестерина с превращением его в прегненолон – общий предшественник всех стероидных гормонов животных. Несмотря на то, что похожий белок в растениях пока не найден, известно, что в растениях рода наперстянка (*Digitalis sp.*), по-видимому, также именно в митохондриях, происходит превращение холестерина в прегненолон (Lindemann & Luckner, 1997).

## MATERIALS AND METHODS

Методы получения трансгенных растений с помощью агробактериальной трансформации,

использованные нами в данной работе, были подробно описаны в предыдущих публикациях (Kartel *et al*., 2004; Spivak *et al*., 2009; Khaliluev *et al*., 2011).

Тестирование трансгенных растений табака, содержащих кДНК гена *CYP11A1*, на устойчивость к грибному фитопатогену *Botrytis cinerea* проводили по методике, вкратце описанной нами ранее (Kartel *et al*., 2004). В качестве тест-культуры использовали фитопатогенный гриб вида *Botrytis cinerea,* вызывающий серую гниль. В провоцирующих условиях изолированные листья среднего возраста и одного размера помещали в чашки Петри на фильтровальную бумагу, увлажненную водой. По 10 мкл суспензии спор возбудителя, содержащей 2000 спор/мл, наносили в 6 точек на лист, после чего чашки с листьями герметично закрывали для создания повышенной влажности и выдерживали в климатокамере при температуре 24°C и 16-ти часовом световом дне. В качестве контроля использовали листья нетрансформированных растений и растений, содержащих только векторную плазмиду (без кДНК *CYP11A1*). Степень поражения листовых пластинок (обратная величина по отношению к устойчивости растения к *Botrytis cinerea*) оценивалась в баллах по количеству и размеру некротических пятен на 10-ые сутки после заражения.

Клонирование кДНК и генов митохондриальных ферредоксинов растений семейства Solanaceae. Для выделения тотальной геномной ДНК из листьев томата, картофеля и наперстянки использовали методику, описанную нами ранее для табака (Kartel *et al*., 2004), и представляющую собой модифицированную методику Эдвардса с соавторами (Edwards *et al*., 1991), включающую дополнительную экстракцию фенолом.

Суммарную РНК экстрагировали из замороженных и гомогенизированных в жидком азоте листьев растений с помощью TRIzol-метода (Invitrogen) и очищали с использованием набора Qiagen RNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen). Синтез полноразмерных кДНК проводили по методу SMART (Zhu *et al*., 2001), используя систему гнездовых SMART-праймеров с различающимися SfiI-сайтами (на 5'- и 3'-концах кДНК) и Long-Distance ПЦР-амплификацию для синтеза второй цепи и получения двухцепочечной кДНК (Barnes, 1994).

Для биоинформационного поиска последовательностей, предположительно кодирующих близкие по структуре к адренодоксину (ADX) и адренодоксинредуктазе (ADXR) белки из растений семейств Solanaceae (паслёновые) и Scrophulariaceae (норичниковые), использовали подходы, описанные в монографии по биоинформатике растений из серии Methods in Molecular Biology (Edwards D., Editor, 2007). На основании этих данных были сконструированы наборы маловырожденных праймеров и олигонуклеотидных зондов для поиска интересующих нас последовательностей в описанных выше препаратах геномной и комплементарной ДНК. В частности, для клонирования кДНК томата, картофеля и табака,

кодирующих ферредоксины митохондриального типа (MFDX) использовали праймеры oYSH16 (5'-GACGAATTCCAAATGGTSGGNTTYCA) и oYSH17 (5'-CAGGATCCTCGAGCTARTGHGGYTTNGG). Молекулярное клонирование полученных ПЦР-фрагментов, отбор и анализ клонов проводили с помощью методов последовательных разведений и/или гибридизации нуклеиновых кислот, описанных нами ранее (Shpakovski & Lebedenko, 1997; Shpakovski & Shematorova, 1999). ДНК секвенировали по методу Сэнгера на приборе ABI 3730 фирмы Applied Biosystems (Евроген, ИБХ РАН).

Трансмиссионная электронная микроскопия. Растительным материалом для исследований служили асептические проростки *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana линии SR1 и полученные на основе этого сорта табака две трансгенные линии (TR-2, TR-7) поколения $T_4$, экспрессирующие кДНК гена *CYP11A1* цитохрома $P450_{SCC}$, выделенную из коры надпочечников быка. Фрагменты срединной части семядолей, полученных от двухнедельных асептических проростков, фиксировали при температуре +4°C в 2,5% растворе глутарового альдегида на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.2) с добавлением 1.5% сахарозы. После отмывки от фиксирующей смеси растительный материал дофиксировали 1.0% раствором четырёхокиси осмия ($OsO_4$) (Sigma, США), обезвоживали в этаноле повышающейся концентрации (30, 50, 70, 96 и 100%), затем – в окиси пропилена. Образцы заключали в смесь эпоксидных смол Эпона-812 и Аралдита по стандартной методике. Ультратонкие срезы толщиной 30–40 нм получали на ультрамикротоме LKB–V, монтировали на покрытые формваровой подложкой бленды, после чего контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу (Reynolds, 1963). Полученные препараты просматривали на электронном микроскопе H-500 (Hitachi, Япония) при ускоряющем напряжении 75 кВ.

## RESULTS AND DISCUSSION

Ранее нами в рамках совместного проекта учёных России и Беларуси были получены и детально охарактеризованы трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L. (в качестве удобного модельного объекта), экспрессирующие кДНК *CYP11A1* цитохрома $P450_{SCC}$ из коры надпочечников быка (рис. 1) и обладающие повышенной продуктивностью и устойчивостью к грибным фитопатогенам (Shpakovski *et al.*, 1992; Kartel *et al.*, 2004; Kartel *et al.*, 2007). Изучение четырёх поколений этих трансгенных растений показало, что они по сравнению с растениями дикого типа имеют сокращенный период вегетативного развития, выражающийся прежде всего в раннем цветении и созревании семян (рис. 2), увеличенную биомассу и повышенную продуктивность (количество и качество семян), а также повышенный иммунитет к неспецифическому патогену Паслёновых *Botrytis cinerea* (рис. 3). В отличии от контрольных растений дикого типа в трансгенных растениях обнаружен прегненолон – продукт реакции, катализируемой цитохромом $P450_{SCC}$ (CYP11A1).

Установлено, что содержание прогестерона в листьях трансгенных растений существенно (в несколько раз) выше, чем в листьях растений дикого типа (Spivak *et al*., 2009; Spivak *et al*., 2010).

Очень важным было определить точное место синтеза прегненолона и прогестерона в полученных нами трансгенных растениях табака. У животных первые этапы синтеза стероидных гормонов (отщепление боковой цепи холестерина с превращением его в прегормон прегненолон, и далее – в прогестерон) происходят в митохондриях, на их внутренней мембране (Miller, 2013). Как отмечалось выше, именно там локализован цитохром $P450_{SCC}$ (CYP11A1) и именно туда доставляется субстрат холестерин. При этом именно перемещение холестерина с наружной на внутреннюю мембрану митохондрий, осуществляемое с помощью особой, многокомпонентной макромолекулярной машины при активном участии белка StAR (steroidogenic acute regulatory protein), является скорость-лимитирующей стадией в синтезе стероидных гормонов у животных.

В то же время, по всем имеющимся на сегодняшний день данным синтез брассиностероидов (стероидных гормонов растений) происходит на мембранах эндоплазматического ретикулума или, гораздо реже, на плазматической мембране растительных клеток. Несмотря на то, что цитохромы P450 представляют собой едва ли не самое обширное из всех белковых семейств в протеомах растений (например, на них приходится ~1% кодирующего потенциала арабидопсиса (Nelson *et al*., 2004)), существование митохондриальных цитохромов у растений до сих пор не доказано. Тем не менее, основываясь на данных Лузикова с соавторами (Luzikov *et al*., 1994) о том, что незрелый цитохром $P450_{SCC}$ из коры надпочечников быка импортируется в митохондрии растений, где приобретает размеры зрелой формы, аналогично тому, как это происходит в митохондриях клеток животных, при конструировании экспрессионного растительного вектора мы использовали полноразмерную последовательность кДНК *CYP11A1* длиной в 1754 п.о. (рис. 1), кодирующую белок-предшественник $P450_{SCC}$ из коры надпочечников быка с лидерным *N*-концевым экстрапептидом (Shpakovski *et al*., 1992; Spivak *et al*., 2009).

Поскольку уникальный только для животных ключевой фермент стероидогенеза CYP11A1 функционирует в митохондриях вместе с FAD-содержащим флавопротеидом ADXR (адренодоксинредуктазой) и [2Fe-2S]-ферредоксином ADX (адренодоксином), мы изучили, какие белки выполняют функцию этих партнёров цитохрома $P450_{SCC}$ в растениях. В результате, впервые охарактеризованы основные компоненты митохондриальной электронтранс-портной цепи растений: клонированы и установлена структура кДНК и генов адренонодоксиноподобных ферредоксинов табака, томата, картофеля из семейства Solanaceae и наперстянки *Digitalis purpurea* L.

(семейство Scrophulariaceae). Установлено, что у растений из семейства паслёновых имеются два разных гена ферредоксинов митохондриального типа (*MFDX1* и *MFDX2*), имеющие сходную экзон-интронную структуру (содержат по 8 экзонов) и кодирующие предшественники адренодоксино-подобных белков (204-216 аа), различающиеся прежде всего по структуре *N*-концевого участка белка (кодируется первым и вторым экзонами), соответствующего лидерному пептиду (рис. 4). Определена первичная структура кДНК и генов, кодирующих белки NADPH-оксидоредуктазы (MFDXR) *Nicotiana tabacum* L., *Solanum lycopersicum* L. и *Solanum tuberosum* L. (485 аа), структурно родственные ADXR животных. Полученные результаты указывают на несомненное сходство электронтранспортных цепей P450-зависимых монооксигеназ в митохондриях животных и растений.

Далее, с помощью электронной микроскопии на ультратонких срезах листьев табака мы показали, что в изучаемых нами трансгенных растениях табака, экспрессирующих кДНК гена *CYP11A1*, изменяется структурная организация митохондрий: они уменьшаются в размерах, теряют характерную округлую форму (становятся более овальными) и приобретают более плотную, гранулированную консистенцию (рис. 5). Это указывает на то, что перенесённый нами в растения цитохром $P450_{SCC}$ животных, по-видимому, также функционирует именно в митохондриях (накапливаясь в митохондриях растений и даже изменяя их структуру). Эти данные – первое свидетельство того, что начальные этапы синтеза стероидных гормонов могут происходить и в растительных митохондриях. Будет интересно определить все белки-участники этого процесса, в частности истинные партнёры цитохрома $P450_{SCC}$ в клетках растений.

Показанная нами на примере CYP11A1 функциональная совместимость стероидогенных систем Plantae и Animalia, открыла перспективу получать трансгенные растения с комбинированными стероидогенными системами таких интересных с точки зрения сельского хозяйства, практической биотехнологии и/или фармакологии видов, как томат, картофель и наперстянка. Первичные трансгенные растения томата *Solanum lycopersicum* L. и наперстянки *Digitalis purpurea* L., экспрессирующие кДНК *CYP11A1* цитохрома $P450_{SCC}$ из коры надпочечников животных, уже получены нами методом агробактериальной трансформации (рис. 6). В настоящее время полученные независимые трансгенные линии растений томата и наперстянки успешно адаптированы к почвенным условиям и выращены в защищенном грунте; для некоторых первичных трансгенных линий томата получены плоды с жизнеспособными семенами (рис. 7).

```
   1      cagct gtgggggcag cATGCTAGCA AGGGGGCTTC CCCTCCGCTC AGCCCTGGTC
  56 AAAGCCTGCC CACCCATCCT GAGCTCAGTG GGGGAGGGCT GGGGCCACCA CAGGGTGGGC
 116 ACTGGAGAGG GAGCTGGCAT CTCCACAAAG ACCCCTCGCC CCTACAGTGA GATCCCCTCC
 176 CCTGGTGACA ATGGCTGGCT TAACCTCTAC CATTTCTGGA GGGAGAAGGG CTCACAGAGA
 236 ATCCACTTTC GCCACATCGA GAACTTCCAG AAGTATGGCC CCATTTACAG GGAGAAGCTT
 296 GGCAATTTGG AGTCAGTTTA TATCATTCAC CCTGAAGACG TGGCCCATCT CTTCAAGTTC
 356 GAGGGATCCT ACCCAGAGAG ATATGACATC CCGCCCTGGC TGGCCTATCA CCGATATTAT
 416 CAGAAACCCA TTGGAGTCCT GTTTAAGAAG TCAGGAACCT GGAAGAAAGA CCGGGTGGTC
 476 CTGAACACGG AGGTGATGGC TCCAGAGGCA ATAAAGAACT TCATCCCACT GCTGAATCCA
 536 GTGTCTCAGG ACTTCGTCAG CCTCCTGCAC AAGCGCATCA AGCAGCAGGG CTCCGGAAAG
 596 TTTGTAGGGG ACATCAAGGA AGACCTGTTT CACTTTGCCT TTGAGTCCAT CACCAATGTC
 656 ATGTTTGGGG AGCGCCTGGG GATGCTGGAG GAGACAGTGA ACCCCGAGGC CCAGAAGTTC
 716 ATTGATGCCG TCTACAAGAT GTTCCACACC AGTGTCCCTC TGCTCAACGT CCCTCCAGAA
 776 CTGTACCGTC TATTCAGAAC CAAGACTTGG AGGGACCATG TAGCCGCATG GGACACAATT
 836 TTCAATAAAG CTGAAAAATA CACTGAGATC TTCTACCAGG ACCTGAGACG GAAAACAGAA
 896 TTTAGGAATT ACCCAGGCAT CCTCTACTGC CTCCTGAAAA GTGAGAAGAT GCTCTTGGAG
 956 GATGTCAAGG CCAATATTAC GGAGATGCTG GCAGGGGGTG TGAACACGAC ATCCATGACA
1016 TTGCAATGGC ACTTGTACGA GATGGCACGC AGCCTGAATG TGCAGGAGAT GCTGCGGGAG
1076 GAGGTTCTGA ATGCCCGACG CCAGGCAGAG GGAGACATAA GCAAGATGCT GCAAATGGTC
1136 CCACTTCTCA AAGCTAGCAT CAAGGAGACG CTGAGACTCC ACCCCATCTC CGTGACCCTG
1196 CAGAGATACC CTGAAAGTGA CTTGGTTCTT CAAGATTACC TGATTCCTGC CAAGACACTG
1256 GTGCAAGTGG CCATCTATGC CATGGGCCGA GACCCTGCCT TCTTCTCCAG TCCGGACAAG
1316 TTTGACCCAA CCAGGTGGCT GAGTAAAGAC AAAGACCTCA TCCACTTCCG GAACCTGGGC
1376 TTTGGCTGGG GAGTGCGGCA GTGCGTGGGC CGGCGGATCG CCGAGCTGGA GATGACCCTC
1436 TTCCTCATCC ACATTCTGGA GAACTTCAAG GTTGAAATGC AGCATATCGG TGACGTGGAC
1496 ACCATATTCA ACCTCATCCT GACGCCGGAC AAGCCCATCT TCCTTGTCTT CCGCCCCTTC
1556 AACCAGGACC CGCCCCAGGC GTGAccggag agggcgggca ctgccctttc caccaatcca
1616 gctagctggg gtgtgggaag acggcccgag ggggtggggc catggaggta cccgcacctc
1676 cattgctcgc tcagtccaca cctcttgcac ctttctggct aggtctgacc agatgaagct
1736 ggcactcagg ggtcagctg
```

**Рисунок 1.** Нуклеотидная последовательность полноразмерной кДНК гена *CYP11A1* из коры надпочечников быка, использованная нами при создании рекомбинантных плазмид для её экспрессии в растениях. Подчёркнуты стартовый (ATG) и терминирующий (TGA) кодоны и выделенный помимо этого ещё и жирным шрифтом кодон ATC, кодирующий первую аминокислоту (Ile) зрелого белка – цитохрома $P450_{SCC}$.

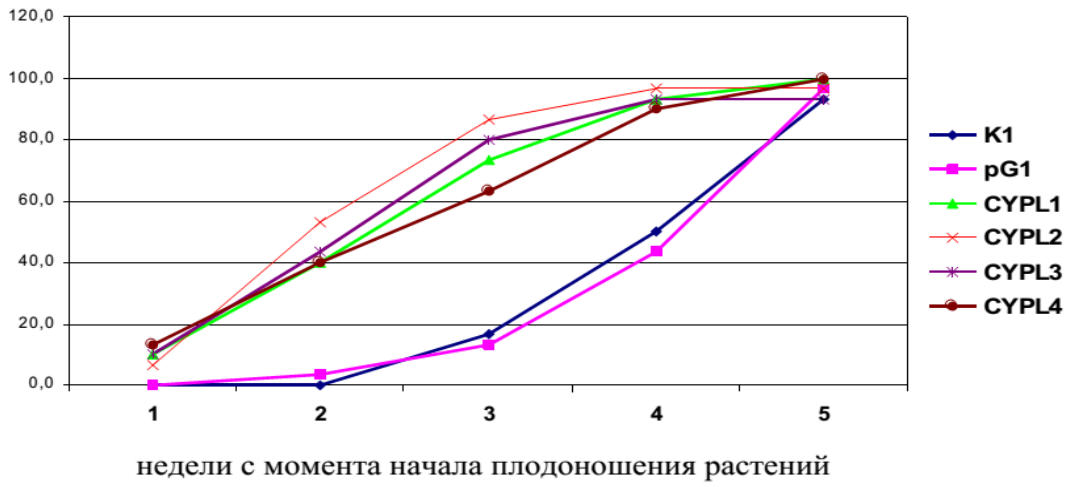



**Рисунок 2.** Динамика образования семенных коробочек у трансгенных растений табака поколения T3. CYPL1–CYPL4 – независимые линии трансгенных растений табака, экспрессирующих кДНК *CYP11A1*; K1 – контрольные растения дикого типа, pG1 – растения, трансформированные вектором, не содержащим кДНК *CYP11A1*.


**Рисунок 3.** Результаты биотеста на устойчивость трансгенных растений табака, экспрессирующих кДНК гена *CYP11A1*, к грибному фитопатогену *Botrytis cinerea* (а – поражение листа). 1 – контрольное нетрансгенное растение (поражение листа в 7 баллов); 2 – растение одной из трансгенных линий (поражение листа в 1 балл).

**Sl-MFDX1:**
MVGFHVRRLAHRLTRSSISALLLHDSASAAHVSLLKVGSRSYNTAAKNRIRDLFPSNCSNATSP
CNPGTSYGPLSRYQILLGLGHKEYCTTTGNEEKQTISVTFVDKDGEEKHIKVPVGMSLLEAAHE
NDIELEGACEGSLACSTCHVIVMDVDQYNKLEDPTDEENDMLDLAFGLTETSRLGCQVIAKPEL
DGIRVALPAATRNFAVDGFKPKPH (216 aa)

**Sl-MFDX2:**
MVGFQNLRLAHRLTGYVSRSTCELLLKIGCRGYCTEISNRVRNLFPLNYISAPLACIPRTSYTD
LLRYSSTQGLRHEQFCTTAGNEEMQKISVTFVDKDGEENHIKVPVGMSMLEAAHENDIELEGAC
EASLACSTCHVIVMDMEYYNKLEDPTDEENDMLDLAFALTDTSRLGCQVIAKPELDGIRLALPV
ATRNFAVDGYKPKPH (207 aa)

**Nt-MFDX1:**
MVGFHVLRAARRLARCSLSSLLLRGSPSAFGSFLKVGCRRYNTSTRNRAGVLFPSNSLNALSAC
TSETSHYPLSRYHFLQRHEQYCTAAGNEEKQTISVTFVDKDGEEKHIKVPVGMSMLEAAHENDI
ELEGACEGSLACSTCHVIVMDVDYYNKLEDPTDEENDMLDLAFGLTETSRLGCQVIAKPELDGL
RLALPAATRNFAVDGYEPKPH (213 aa)

**Nt-MFDX2:**
MVGFHVIRIARRFARCSAFGSFLKVGCRSYNTATRNRAGVLFPSNSLNALLACTSGTSHDPLSR
CHFSRVLRHEQYCTTAGNEEKQTISVTFVDKDGEEKHIKVPVGMSMLEAAHENDIELEGACEGS
LACSTCHVIVMDVDYYNKLEDPTDEENDMLDLAFGLTETSRLGCQVIAKPELDGLRLALPAATR
NFAVDGYKPKPH (204 aa)

**St-MFDX1:**
MVGFHVRRLAHSLTRSSLSSLLLHDSASAAHVSLLKVGSRSYNTAAKNRIRGLFPSNCSNAISP
CTPGTSYGPLSRYQILLGLRHKEYCTTTGSEEKQTISVTFVDKDGEEKHIKVPVGMSLLEAAHE
NDIELEGACEGSLACSTCHVIVMDVDQYNKLEDPTDEENDMLDLAFGLTETSRLGCQVIAKPEL
DGIRVALPAATRNFAVDGFKPKPH (216 aa)

**St-MFDX2:**
MVGFHNLRLAHRLTGCSLSSLLLHGSASTCELSLKVGCRSYCTGTSNRVRNLFPLNYISAPLAC
IPRTSYTHLLRYSSTQGLRHEQFCTTAGNEGEQKISVTFVDKDGEENHIKVPVGMSMLEAAHEN
DIELEGACEASLACSTCHLIVMDMEYYNKLEDPTDEENDMLDLAFALTDTSRLGCQVIAKPELD
GIRLALPVATRNFAVDGYKPKPH (215 aa)

**Рисунок 4.** Аминокислотные последовательности митохондриальных ферредоксинов (MFDX) томата (Sl), картофеля (St) и табака (Nt), выведенные нами из установленных первичных структур впервые клонированных и секвенированных полноразмерных кДНК соответствующих генов. Sl – *Solanum lycopersicum*, Nt – *Nicotiana tabacum*, St – *Solanum tuberosum*.

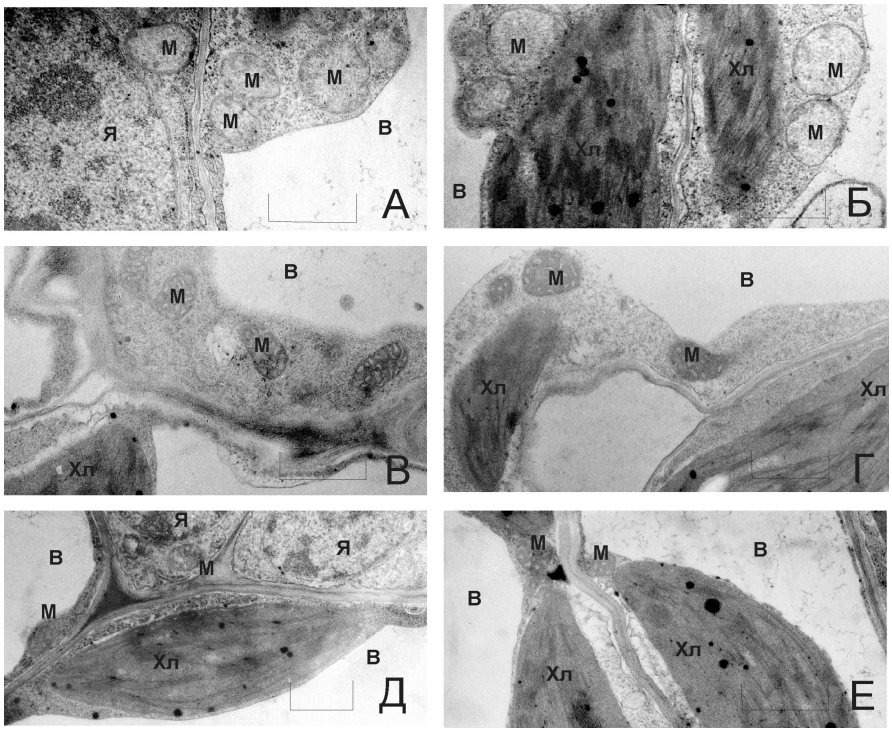
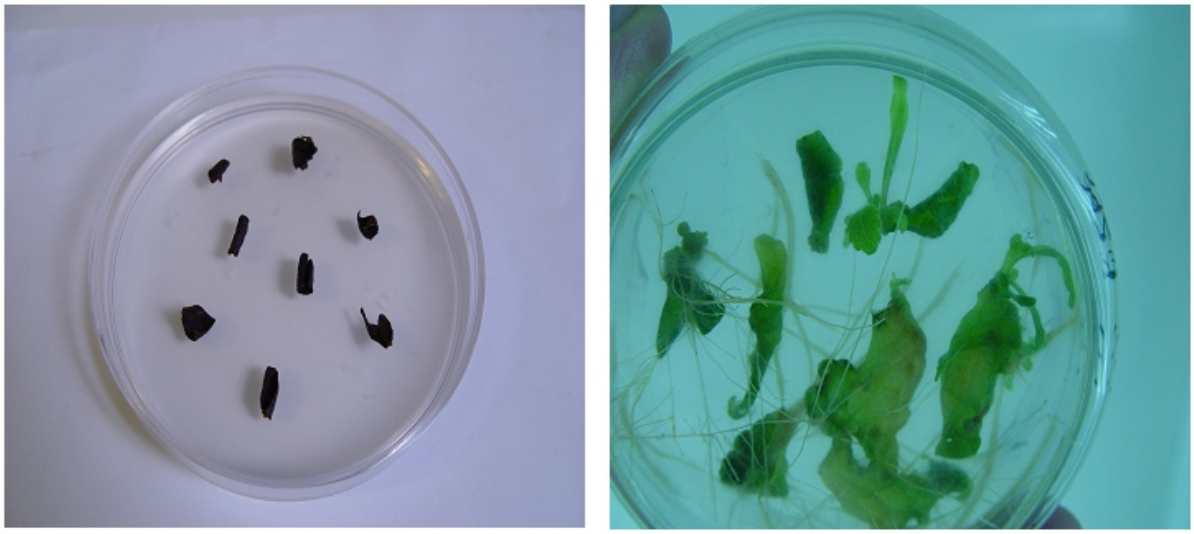



**Рисунок 5.** Ультраструктурная организация фрагментов клеток губчатой (А, В, Д) и столбчатой (Б, Г, Е) паренхимы семядольного листа растений дикого типа (А, Б) и трансгенных линий табака TR-2 (В, Г) и TR-7 (Д, Е), экспрессирующих кДНК *CYP11A1* цитохрома $P450_{SCC}$ из коры надпочечников быка. Обозначения: М – митохондрия, Хл – хлоропласт, В – вакуоль, Я – ядро. Масштабная линейка – 0,5 мкм.



**А** **Б**

**Рисунок 6.** Регенерация растений наперстянки *Digitalis purpurea* L. на среде, содержащей селективный агент – канамицин. А – экспланты листьев растений исходного (дикого) типа. Б – экспланты листьев растений, подвергнутых агробактериальной генетической трансформации.

**Рисунок 7.** Плоды со зрелыми семенами первичных трансгенных растений томата *Solanum lycopersicum* L. (сорт Рекордсмен), экспрессирующих кДНК гена *CYP11A1* из коры надпочечников быка (линия 7, растение 2 [трансгенная линия 7-2]).

## ACKNOWLEDGMENT

Данная работа осуществлялась в рамках совместного российско-белорусского исследовательского проекта при финансовой поддержке Российского (РФФИ) и Белорусского республиканского (БРФФИ) фондов фундаментальных исследований.

## REFERENCES

Barnes W.M. (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2216–2220.

Edwards D., Editor (2007) Plant Bioinformatics (Methods and Protocols) [From: Methods in Molecular Biology (J.M. Walker, Series Editor)] – Totowa, New Jersey.: Humana Press, 552 pp.

Edwards K., Johnstone C., Thompson C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, **19**, 1349.

Kartel N.A., Shpakovski G.V., Spivak S.G., Brichkova G.G., Yarmolinsky D.G., Berdichevets I.N., Maneshina N.V. (2004) Recombinant plasmid pGBP450f for construction of transgenic plants and the approach for generation of transgenic

tobacco plants with higher productivity and resistance to fungal phytopathogens: Patent of the Russian Federation No. 2237717. Bulletin of Innovations 2004. No. 10. (Application No. 2002134424. Priority from December 20, 2002. Registered October 10, 2004).

Kartel N.A., Spivak S.G., Shpakovski G.V., Maneshina N.V., Brichkova G.G., Yarmolinsky D.G., Berdichevets I.N. (2007) Gene engineering construct expressing cDNA of the mammalian *CYP11A1* gene in plants and the approach for generation of transgenic plants with higher productivity and resistance to phytopathogens: Patent of the Republic of Belarus No. 9201. (Application No. a20021122. Priority from December 30, 2002. Registered January 25, 2007).

Khaliluev M.R., Mamonov A.G., Smirnov A.N., Kharchenko P.N., Dolgov S.V. (2011) Expression of genes encoding chitin-binding proteins (PR-4) and hevein-like antimicrobial peptides in transgenic tomato plants enhanced resistance to *Phytophthora infestans*. *Russ. Agricult. Sci.*, **4**, 297-302.

Lindemann P., Luckner M. (1997) Biosynthesis of pregnane derivatives in somatic embryos of *Digitalis lanata*. *Phytochemistry*, **46**, 507–513.

Luzikov V.N., Novikova L.A., Spiridonova V.A., Isaeva L.V., Whelan J., Hugosson M., Glazer E. (1994) Design of heterologous mitochondria: import of cattle cytochrome P-$450_{SCC}$ precursors in plant mitochondria. *Biochemistry (Moscow) [Biokhimiia]*, **59**, 1098–1101.

Miller W.L. (2013) Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **379**, 62–73.

Nelson D.R., Schuler M.A., Paquette S.M., Werck-Reichhart D., Bak S. (2004) Comparative genomics of rice and arabidopsis. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant Physiology*, **135**, 756–772.

Pauli G.F., Friesen J.B., Gödecke T., Farnsworth N.R., Glodny B. (2010) Occurrence of progesterone and related animal steroids in two higher plants. *Journal of Natural Products*, **73**, 338–345.

Reynolds E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **17**, 208–212.

Shpakovski G.V., Lebedenko E.N. (1997) Molecular cloning and characterization of cDNA of the *rpc10*$^{+}$ gene encoding the smallest subunit of nuclear RNA polymerases of *Schizosaccharomyces pombe*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **23**, 441–448.

Shpakovski G.V., Shematorova E.K. (1999) Rpc19 and Rpc40, two alpha-like subunits shared by nuclear RNA polymerases I and III, are interchangeable between the fission and budding yeasts. *Current Genetics*, **36**, 208-214.

Shpakovski G.V., Spivak S.G., Mazanik S.N., Akhrem A.A. (1992) Study of cytochrome P450XIA1 genes structure and their expression in geterologous systems. Proceedings of the II

(Second) All-Union Plan-Report Conference on the direction "Genetic and Cellular Engineering" (November-December 1991, Pushchino-on-Oka), 58-59.

Simerský R., Novák O., Morris D.A., Pouzar V., Strnad M. (2009) Identification and quantification of several mammalian steroid hormones in plants by UPLC-MS/MS. *Journal of Plant Growth Regulation*, **28**, 125–136.

Spivak S.G., Berdichevets I.N., Litvinovskaya R.P., Drach S.V., Kartel N.A., Shpakovski G.V. (2010) Some peculiarities of steroid metabolism in transgenic *Nicotiana tabacum* plants bearing the *CYP11A1* cDNA of cytochrome $P450_{SCC}$ from the bovine adrenal cortex. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **36**, 224–232.

Spivak S.G., Berdichevets I.N., Yarmolinsky D.G., Maneshina N.V., Shpakovski G.V., Kartel N.A. (2009) Construction and characteristics of transgenic tobacco *Nicotiana tabacum* L. plants expressing *CYP11A1* cDNA encoding cytochrome $P450_{SCC}$. *Russian Journal of Genetics,* **45**, 1067–1073.

Ylstra B., Touraev A., Brinkmann A.O., Heberle-Bors E., Tunen A. (1995) Steroid hormones stimulate germination and tube growth of in vitro matured tobacco pollen. *Plant Physiology*, **107**, 639–643.

Zhu Y.Y., Machleder E.M., Chenchik A., Li R., Siebert P.D. (2001) Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques*, **30**, 892–897.