

На правах рукописи

ШАПИГУЗОВ
Алексей Юрьевич

**УЧАСТИЕ АКВАПОРИНОВОГО ГОМОЛОГА *aqpZ*
В РЕАКЦИИ ЦИАНОБАКТЕРИИ *SYNECHOCYSTIS*
НА ГИПЕРОСМОТИЧЕСКИЙ СТРЕСС**

03.00.12 – Физиология и биохимия растений

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук**

МОСКВА-2003

Работа выполнена в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН в Отделе Молекулярных основ внутриклеточной регуляции и биотехнологии фотоавтотрофных биосинтезов, г. Москва и в Национальном Институте Общей Биологии в Лаборатории клеточной регуляции, г. Оказаки, Япония.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор биологических наук, профессор

Лось Дмитрий Анатольевич

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук

Трофимова Марина Сергеевна

доктор биологических наук

Еланская Ирина Владимировна

ВЕДУЩЕЕ УЧРЕЖДЕНИЕ:

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Защита состоится «23» декабря 2003 г. в 11 часов на заседании Диссертационного совета К 002.210.01 при Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу:
127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (095) 977-80-18

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан «20» ноября 2003 г.

Учёный секретарь

Диссертационного совета,

кандидат биологических наук

М.И. Азаркович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Аквапорины – недавно открытый класс трансмембранных канальных белков, представители которого обеспечивают транспорт воды через клеточные мембраны (Agre & Kozono, 2003). Представители класса аквапоринов встречаются во всех крупных таксонах живых организмов. Многие из этих белков интенсивно исследуются *in vitro*, однако сложность количественной оценки активности аквапоринов затрудняет изучение их роли *in vivo*.

Пресноводная цианобактерия *Synechocystis*, геном которой содержит один ген, гомологичный аквапорину (Calamita et al., 1995), представляется удобным объектом для оценки роли аквапоринов в клеточной реакции на гиперосмотический стресс. В гиперосмотических условиях среды вода выходит из клетки через плазматическую мембрану, и в то же время в клетке развивается стрессовый ответ, наблюдаемый как на уровне клеточного метаболизма, так и на уровне генной экспрессии. Исследование *Synechocystis* с помощью метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) (Blumwald et al., 1983) позволяет количественно оценить динамику изменения объема цитоплазмы клеток и исследовать роль аквапорина в развитии клеточной стрессовой реакции.

Цели и задачи работы. Целью работы являлось изучение роли продукта гомологичного аквапорину гена *aqpZ* пресноводной цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 в клеточном ответе на гиперосмотический стресс.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

1. Создание мутантного штамма *Synechocystis* с инактивированным геном аквапорина.
2. Исследование вклада AqpZ в трансмембранный перенос воды у *Synechocystis in vivo*.
3. Определение роли продукта гена *aqpZ* в реакции клетки *Synechocystis* на гиперосмотический стресс.
4. Изучение влияния делеции гена *aqpZ* на генную экспрессию в условиях гиперосмотического стресса.

Научная новизна. Впервые изучена функция аквапорина AqpZ при реакции клеткок *Synechocystis* на стрессовые условия и показано участие AqpZ в регуляции генной экспрессии при гиперосмотическом стрессе. Метод ЭПР, использованный для анализа изменения цитоплазматического объема, является перспективным способом изучения свойств индивидуальных аквапоринов цианобактерий *in vivo*.

Научно-практическое значение. Полученные результаты могут быть использованы для дальнейшего изучения механизмов развития стрессового ответа на гиперосмотический стресс и роли аквапоринов *in vivo*. Взаимосвязь водного баланса клетки и организма с внутриклеточными процессами, в том числе с генной экспрессией, в значительной степени определяется активностью аквапоринов, поэтому дальнейшее изучение этих белков представляется перспективным для многих прикладных областей.

Апробация работы. Материалы, вошедшие в диссертационную работу, были представлены на Международной конференции «Растения под влиянием стрессов окружающей среды», Москва, 2001; Международном симпозиуме по молекулярной генетике и биотехнологии, Москва, 2001; Европейском симпозиуме по молекулярной биологии цианобактерий, Стокгольм, 2002.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 5 работ в отечественных и зарубежных изданиях.

Структура диссертации. Диссертация состоит из разделов: Введение, Обзор литературы, Объекты и методы исследований, Результаты и их обсуждение, Заключение, Выводы, Литература. Работа изложена на 91 странице машинописного текста, включает 23 рисунка, 2 таблицы; список литературы включает 170 наименований.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы цианобактерий. Штамм цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 был предоставлен Национальным Институтом Общей Биологии (NIBB, Оказаки, Япония). Мутантный штамм *aqpZ(-)* с инактивированным геном аквапорина был получен путем сайт-специфического мутагенеза с использованием кассеты устойчивости к антибиотику спектиномицину.

Создание рекомбинантного штамма. В геноме *Synechocystis* была найдена единственная копия гена, гомологичного аквапорину (Calamita et al., 1995). Амплификация фрагмента, включающего в себя этот ген (*aqpZ* или *slr2057* в соответствии с классификацией CyanoBase, www.kazusa.org/cyano/) с фланкирующими областями, проводилась на геномной ДНК *Synechocystis* при помощи праймеров *wchF*, 5'-ACCGTTGCCGCTGTAAAGGC, и *wchR*, 5'-CAGATAGTTGCCGATAGTGC, ДНК-полимеразой AmpliTaqGold (Perkin Elmer, США). Полимеразная цепная реакция (ПЦР) включала в себя предварительную денатурацию ДНК (2 мин, 96°C); 30 циклов, состоящих из последовательных стадий: (а) денатурации ДНК (1 мин, 96°C), (б) отжига праймеров (1 мин, 50°C) и (в) синтеза цепи ДНК (3 мин, 72°C); после чего проводился дополнительный синтез цепи ДНК в течение 10 мин при 72°C.

Полученный в результате ПЦР фрагмент был лигирован в рТ7-*t/a* вектор (Novagen, США). Кассета устойчивости к спектиномицину была получена из плазмиды *pAL* (Prentki et al., 1984) путем гидролиза рестриктазой *Sma* I и вставлена по двум сайтам *Eco*47 III, находящимся в кодирующей части гена *aqpZ* (Рис. 1а).

Рестрикция и лигирование ДНК проводились ферментами фирмы Fermentas (Литва), согласно протоколам фирмы-изготовителя.

Трансформация клеток цианобактерий. Трансформация клеток *Synechocystis* проводилась методом Вильямса (Williams, 1988). Клетки из 100 мл интенсивной культуры осаждались центрифугированием и

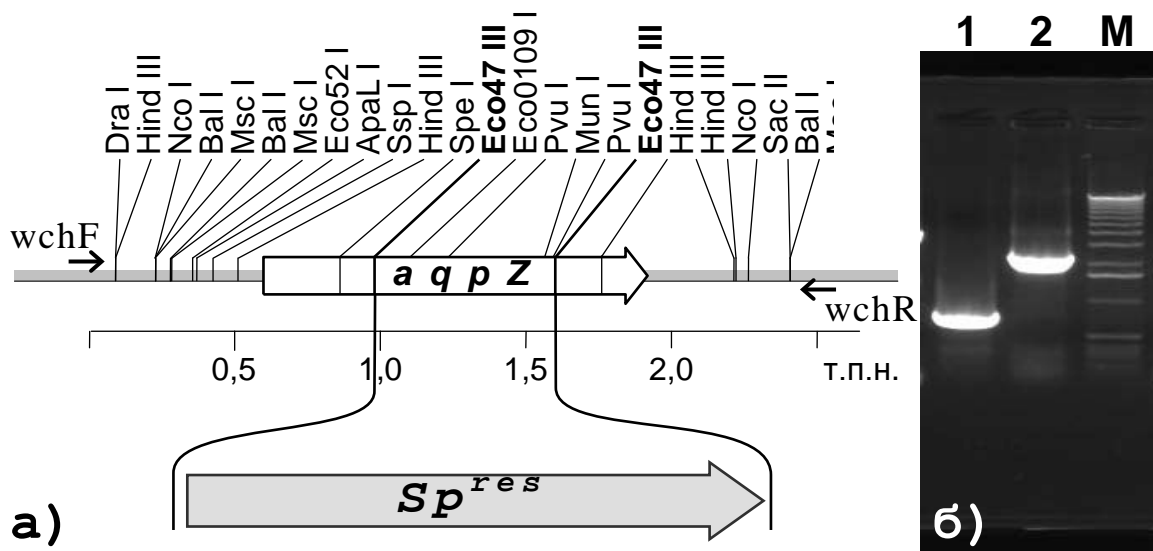


Рисунок 1. Создание мутанта с разрушенным геном аквапорина (*aqpZ*).
 (а) Ген *aqpZ* с фланкирующими областями амплифицирован с использованием праймеров *wchL* и *wchR* (указаны стрелками). С помощью рестриктазы *Eco47 III* из гена удален участок кодирующей последовательности, вместо которого вставлена кассета устойчивости к спектиномицину (*Sp^{res}*). (б) Электрофорез амплифицированных фрагментов ДНК при проверке степени сегрегации хромосом: 1 – фрагмент, амплифицированный из геномной ДНК дикого типа (отрицательный контроль); 2 – фрагмент, амплифицированный из геномной ДНК мутанта; М – метчик молекулярных масс ДНК.

ресуспендировались в 2 мл среды BG11. К суспензии добавляли 5-10 мкг ДНК, инкубировали 4 часа в темноте, затем 10 часов на свету. После этого клетки высевали на чашки с агаризованной средой BG11, содержащей 5 мкг мл⁻¹ спектиномицина. Первичные клоны последовательно пересеивали с увеличением концентрации антибиотика от 5 до 30 мкг мл⁻¹. Полученные рекомбинантные штаммы растили на среде, содержащей 30 мкг мл⁻¹ спектиномицина.

Сегрегация хромосом у мутантного штамма *aqpZ(-)* проверялась полимеразной цепной реакцией с использованием ExTaq DNA Polymerase (TaKaRa Co. Ltd., Киото, Япония). Условия реакции были следующими: предварительная денатурация ДНК (2 мин, 96°C); 30 циклов, состоящих из (а) денатурации ДНК (1 мин, 96°C), (б) отжига праймеров (1 мин, 55°C) и (в) синтеза цепи ДНК (5 мин, 72°C); дополнительный синтез ДНК (10 мин, 72°C). Для проверки также использовались праймеры *wchF* и *wchR* (Рис. 16).

Условия культивирования. Аксеничные культуры цианобактерий поддерживались на агаризованной среде BG11 (с содержанием агарозы 1,2 %), забуференной 20 mM HEPES-NaOH, pH=7,5 (Stainer et al. 1971) на чашках Петри при температуре 34°C и постоянном освещении люминесцентными

лампами интенсивностью 70 мкМ квантов света $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$. Мутант поддерживался на среде с добавлением спектиномицина до концентрации 30 мкг мл^{-1} .

Интенсивные культуры выращивались в плоскопараллельных сосудах в жидкой среде BG11, забуференной 20 mM HEPES-NaOH, pH=7,5, при температуре 34°C, постоянном освещении лампами накаливания интенсивностью 70 мкМ квантов света $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$ и аэрации стерильной газовой смесью, обогащенной CO_2 до концентрации 1 %. Культуры выращивались при данных условиях до плотности $\text{ОП}_{750} = 0,8-1,0$ (контрольные условия) и затем переносились в экспериментальные условия.

Условия гиперосмотического стресса создавались с помощью добавления к среде культивирования 5 M раствора сорбита в среде BG11 до конечной концентрации 0,5 M. Выбор данного вещества для создания гиперосмотических условий связан с тем, что сорбит не проникает внутрь клетки через плазматическую мембрану и, насколько это известно, не оказывает какого-либо существенного влияния на клетку через ее поверхностные рецепторы.

Измерение цитоплазматического объема клеток. Цитоплазматический объем клеток был определен с помощью метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) (Blumwald et al., 1983). Суспензию исследуемых клеток объемом 40 мкл, содержащую реагенты для проведения исследования ЭПР, в том числе 1,0 mM свободный радикал 1-оксил-2,2,6,6-тетраметилпиперидин (ТЕМПО), 20 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ и 75 mM $\text{Na}_2\text{Mn-ЭДТА}$, запаивали в стеклянный капилляр. Спектры ЭПР снимались на спектрометре ESP 300E (Bruker, Карлсруэ, Германия) при комнатной температуре. При этом в качестве контроля использовался капилляр, заполненный 1,0 mM раствором ТЕМПО. Измерения проводились в темноте в следующих условиях: частота модуляции поля 100 кГц, частота микроволн 11,72 ГГц, амплитуда модуляции 0,4 мТ, мощность микроволн 10 мВт, временная постоянная 80 мс, скорость сканирования 0,4 ГГц.

Измерение активности фотосистемы II. Электрон-транспортная активность фотосистемы II определялась *in vivo* при 32°C по светоиндуцированному выделению кислорода с помощью кислородного электрода Кларка (Hansatech Instruments, Кингс-Линн, Великобритания). Индуцирующий свет (с интенсивностью 2 мМ квантов света $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$ на поверхности кюветы) от лампы накаливания пропускаться через красный светофильтр R-60 (Toshiba, Токио, Япония) и фильтр HA-50 (Hoya Glass, Токио, Япония), поглощающий инфракрасное излучение. Выделение кислорода измерялось в присутствии 1,0 mM 1,4-бензохинона или 1,0 mM 2,6-дихлоро-1,4-бензохинона в качестве искусственного акцептора электронов.

Измерение активности фотосистемы I. Электрон-транспортная активность фотосистемы I определялась *in vivo* при 32°C по светоиндуцированному поглощению кислорода с помощью кислородного электрода Кларка (Hansatech Instruments, Кингс-Линн, Великобритания). Индуцирующий свет (с интенсивностью 2 мМ квантов света $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$ на поверхности кюветы) от лампы накаливания пропускаться через красный светофильтр R-60 (Toshiba,

Токио, Япония) и фильтр HA-50 (Hoya Glass, Токио, Япония), поглощающий инфракрасное излучение. Активность фотосистемы I измерялась в присутствии 15 мкМ DCMU (дихлорфенилдиметилмочевины), 5 мМ аскорбата натрия, 0,1 мМ TMPD (*N,N,N',N'*-тетраметил-*p*-фенилендиамина) и 0,1 мМ метилвиологена (Allakhverdiev et al., 2000).

Выделение РНК. Выделение РНК проводили согласно Kiseleva et al. (2000). Для этого 50 мл суспензии клеток *Synechocystis* ($ОП_{750} = 0,8-1,0$) фиксировали с помощью добавления равного объема охлажденного этанола, содержащего 5 % фенола. Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 4000 об мин⁻¹ при температуре 4°C (центрифуга K-23, Германия). Осадок ресуспендировали в 1 мл буфера TE 50/100 (50 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 100 мМ ЭДТА), переносили в пробирки, осаждали центрифугированием, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C. Перед выделением нуклеиновых кислот осадок ресуспендировали в 0,5 мл 50/100 TE буфера и инкубировали с 0,5 мл фенола, насыщенного TE, 10 мин при 65°C. Затем смесь центрифугировали в течение 3-5 мин и супернатант дважды обрабатывали смесью фенола с хлороформом (1:1). Нуклеиновые кислоты осаждали двойным объёмом этанола, разделяли путём осаждения РНК в LiCl (Sambrook et al. 1989).

Микрокомплектный анализ экспрессии генов (DNA microarray). Выделенную из клеток РНК очищали от остаточных количеств ДНК с помощью ДНКазы I (Nippon Gene, Токио, Япония). Для реакции обратной транскрипции использовали следующую реакционную смесь: 100 ед. обратной транскриптазы AMV Reverse Transcriptase XL (TaKaRa Co. Ltd., Киото, Япония), 1х реакционный буфер, смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов с низким содержанием dCTP (2 мМ dCTP, 5 мМ dTTP, 5 мМ dGTP, 5 мМ ATP), 3 мМ Су3-dCTP (или Су5-dCTP), (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция), 300 пМ случайного гексамерного праймера, 100 ед. ингибитора РНКаз (RNasin I, TaKaRa Co. Ltd., Киото, Япония), 20 мкг общей РНК. Су3 и Су5 – флуорофоры с различными спектрами поглощения и эмиссии. РНК, выделенную из контрольного образца, метили Су5-dCTP, выделенную из экспериментального образца - Су3-dCTP. Реакцию обратной транскрипции проводили при 42°C 2 часа. Не включившиеся в цепь кДНК нуклеотиды удаляли путем гель-фильтрации на колонках Centri-Sep (Princeton Separations, США) (Kanesaki et al., 2002; Yamaguchi et al., 2002). Полученную меченую кДНК освобождали от РНК щелочным гидролизом (200 мМ NaOH 40 минут при 65°C) с последующей нейтрализацией щелочи 3 М ацетатом натрия (pH 5,5) и переосаждением спиртом (Heller et al., 1997; Ye et al., 2000).

Цианочипы версии 1.4 (CyanoCHIP v. 1.4) были предоставлены компанией TaKaRa. Микрочипы прегибридизовали в буфере, содержащем, 4х SSC, 0,2 % SDS, 5х раствор Денхардта, 100 нг мл⁻¹ ДНК спермы лосося, при температуре 65°C 1 час. Гибридизацию проводили при тех же условиях в течение 12 часов. Гибридизованные чипы отмывали в 2х SSC (1х SSC содержит 150 мМ NaCl и 15 мМ цитрата натрия) при комнатной температуре, 2х SSC 10 мин при 60°C,

затем в 0,2x SSC и 0,1 % SDS 10 мин при 60°C и в 0,2x SSC 2 мин при комнатной температуре.

Сканирование микрочипов проводили на сканере GMS418 (Affimetrix, США). Определение интенсивности сигналов индивидуальных генов проводили при помощи программы AutoGene V. 4.1 software (BioDiscovery, Лос-Анджелес, США). Интенсивность сигнала каждого гена нормализовали по сумме интенсивностей сигналов всех генов за исключением генов рибосомальной РНК. Затем рассчитывали изменения в количестве транскрипта каждого гена по отношению к общему уровню мРНК. Все эксперименты проводили в двух-трех повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гиперосмотический стресс: относительные изменения цитоплазматического объема клеток *aqpZ(-)* мутанта и дикого типа. Изменения цитоплазматического объема исследуемых штаммов проводились методом ЭПР. Этот метод представляется одним из наиболее эффективных способов оценки цитоплазматического объема клеток цианобактерий. В случае других возможных подходов, таких как измерение упакованного (внешнего) объема клеток, либо непосредственная визуализация фиксированных клеток при помощи электронной микроскопии, исследование упирается в значительные трудности. С одной стороны, наличие у цианобактерий механически прочной клеточной стенки не позволяет судить по внешнему объему клетки об объеме ее цитоплазмы. В условиях гиперосмотического стресса объем пространства, ограниченного цитоплазматической мембраной, может значительно сокращаться (см. ниже), в то время как жесткая клеточная стенка сохраняет свой объем (данные не представлены). В случае метода электронной микроскопии проблемы с определением цитоплазматического объема клеток возникают на стадии фиксации препарата, когда под действием формальдегида нарушается целостность цитоплазматических мембран.

Суть метода ЭПР состоит в том, что свободный радикал ТЕМПО, окисленный под действием $K_3[Fe(CN)_6]_3$, легко проникает через цитоплазматическую мембрану и достигает равновесия во всех фазах суспензии клеток. Na_2Mn -ЭДТА является тушителем парамагнитного эффекта радикала ТЕМПО. При этом диффузия Na_2Mn -ЭДТА через цитоплазматическую мембрану крайне затруднена, и, таким образом, ТЕМПО, растворенный в цитоплазме клеток, не подвергается тушению. По разности сигнала ЭПР в условиях наличия, либо отсутствия тушителя можно судить об изменениях внутреннего объема клеток *in vivo*.

После создания условий гиперосмотического стресса с помощью добавления сорбита до конечной концентрации 0,5 М цитоплазматический объем клеток дикого типа снижался примерно в два раза за 5-10 мин за счет выхода воды из клеток во внешнюю среду, в то время как в клетках мутантного штамма практически не наблюдалось изменения объема (Рис. 2). На основании этих данных можно предположить, что продукт гена *aqpZ*

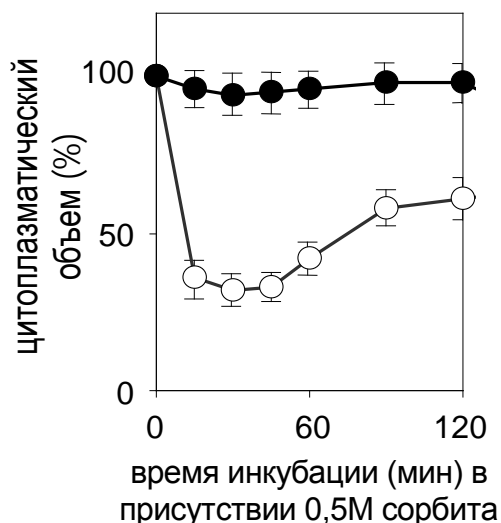


Рисунок 2. Относительные изменения цитоплазматического объема клеток дикого типа (O) и мутанта *aqpZ(-)* (●) в ходе инкубации в условиях гиперосмотического стресса.

задействован в быстром выходе воды из клеток *Synechocystis* в условиях гиперосмотического стресса. При этом вклад липидного бислоя в водную проницаемость цитоплазматической мембраны этого организма оказывается несущественным, по крайней мере, на ранних стадиях клеточного ответа на гиперосмотический стресс.

Эти данные согласуются с исследованиями действия ртутных ингибиторов аквапоринов на клетки *Synechococcus*. Их применение сильно затрудняло сжатие клеток этого организма в ответ на гиперосмотический стресс (Allakhverdiev et al., 2000).

Изменения активности фотосистем в клетках мутанта *aqpZ(-)* и дикого типа в условиях гиперосмотического стресса. Была проведена оценка электрон-транспортной активности фотосистем I и II в клетках дикого типа и *aqpZ(-)* мутанта в течение инкубации этих штаммов в гиперосмотических условиях.

В клетках дикого типа активность обеих фотосистем существенно снижалась в первые 20-30 мин гиперосмотического стресса и оставалась пониженной в течение более чем 2 часов, что свидетельствует о значительных изменениях в жизнедеятельности клеток дикого типа на начальных этапах адаптации к гиперосмотическим условиям культивирования. В дальнейшем активность фотосинтеза в клетках дикого типа постепенно восстанавливалась (Рис. 3, 4). С другой стороны, электрон-транспортная активность обеих фотосистем практически не изменялась в клетках мутанта *aqpZ(-)* в течение первого часа гиперосмотического стресса. В дальнейшем, однако, наблюдалось ингибирование обеих фотосистем (Рис. 3, 4).

Корреляция, наблюдаемая между процессами изменения цитоплазматического объема исследуемых штаммов (Рис. 2) и активности их фотосистем, позволяет предположить, что внутренний объем, либо форма клетки может каким-то образом влиять на механизмы адаптации, в том числе на процессы фотосинтетического транспорта электронов.

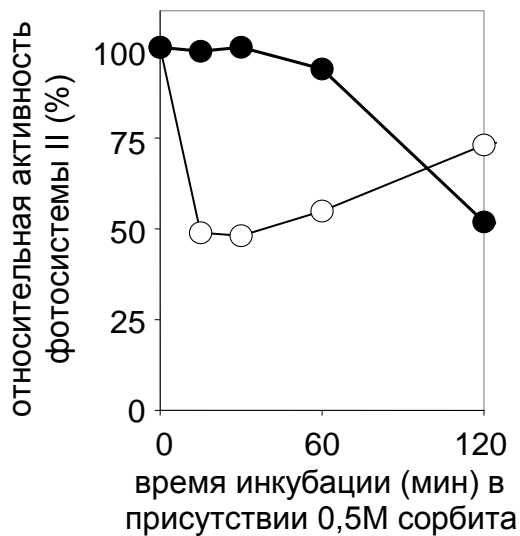


Рисунок 3. Относительные изменения активности фотосистемы II в клетках дикого типа (○) и мутанта *aqpZ*(-) (●) в ходе инкубации в условиях гиперосмотического стресса.

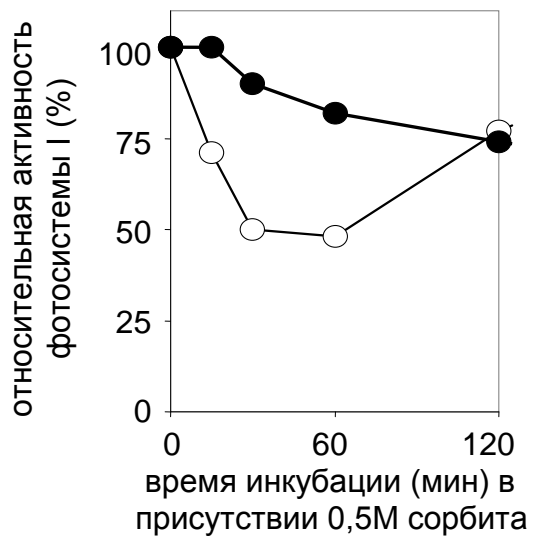


Рисунок 4. Относительные изменения активности фотосистемы I в клетках дикого типа (○) и мутанта *aqpZ*(-) (●) в ходе инкубации в условиях гиперосмотического стресса.

Фенотипическая маскированность мутации в гене *aqpZ* при стандартных условиях культивирования. С помощью метода микрокомплектного анализа экспрессии генов можно проанализировать изменения в концентрации мРНК каждого индивидуального гена *Synechocystis*. Мы провели сравнение генной экспрессии у штаммов дикого типа и *aqpZ*(-) мутанта при их интенсивной культивации в стандартных условиях. На диаграмме, представленной на рисунке 5, положение каждой точки по оси ординат определяется отношением уровня экспрессии определенного гена в мутантном штамме к уровню экспрессии того же гена в штамме дикого типа. Большая часть генов сконцентрирована вокруг прямой $y=1$ в пределах интервала $y \in (0,5; 2)$, определяющего ошибку данного метода. Тем не менее, ряд точек выходит за рамки этого интервала. Снизу видна одна точка, соответствующая собственно гену *aqpZ*. Около 20 точек соответствуют генам, экспрессия которых в мутантном штамме более чем вдвое превосходит экспрессию в диком типе. Эти точки, расположенные выше прямой $y=2$, соответствуют генам рибосомальных белков *sll1799-sll1813* и *ssl3432-ssl3437*, которые входят в состав одного оперона и кодируют белки обеих субъединиц рибосомы. Скорее всего, индукция рибосомальных генов в мутанте *aqpZ*(-) не связана с действием мутации, но определяется поддержанием культуры мутанта на антибиотике спектиномицине. Это вещество, связывающееся с малой субъединицей рибосомы, является ингибитором прокариотической трансляции, и индукция экспрессии ряда рибосомальных белков в мутанте *aqpZ*(-) может иметь компенсаторное значение.

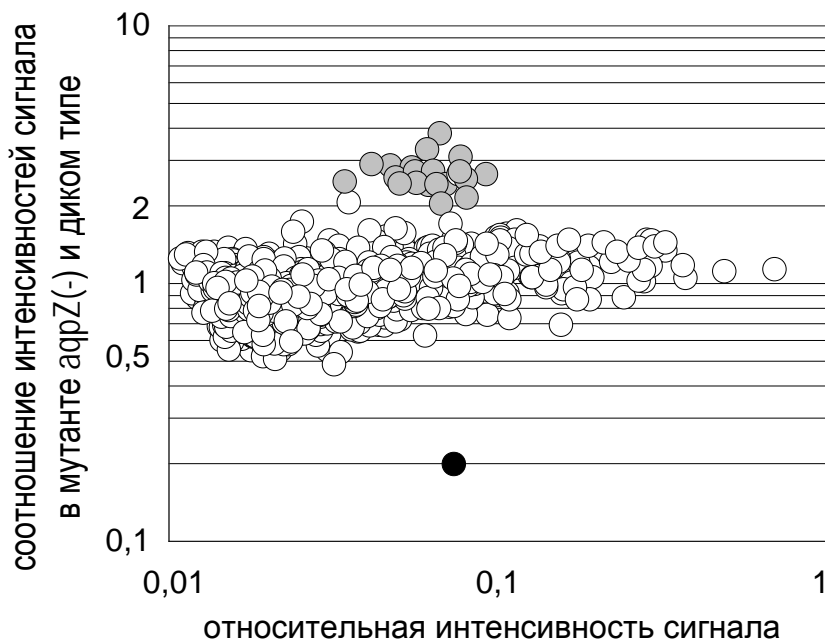


Рис 5. Соотношение профилей генной экспрессии у мутанта *aqpZ(-)* и дикого типа в стандартных условиях культивирования. Серым цветом отмечены гены рибосомальных белков, экспрессия которых индуцирована в клетках мутанта по сравнению с диким типом. Черным обозначен ген *aqpZ*.

Таким образом, при культивации мутантного штамма в стандартных условиях профилю его генной экспрессии не свойственны какие-либо значительные отклонения от дикого типа.

Изменения генной экспрессии в клетках *aqpZ(-)* мутанта и дикого типа в условиях гиперосмотического стресса. Известно, что гиперосмотический стресс вызывает изменения в экспрессии целого ряда генов в клетках *Synechocystis* (Kanesaki et al., 2002). Для того чтобы выяснить, изменен ли характер генной экспрессии при гиперосмотическом стрессе у мутанта *aqpZ(-)*, был также применен метод микрокомплектного анализа. Мы получили данные по изменениям генной экспрессии в клетках дикого типа и в мутанте *aqpZ(-)* после 15, 60 и 120 минут культивации этих штаммов в гиперосмотических условиях.

Список генов, экспрессия которых чувствительна к гиперосмотическим условиям, оказался сходным в обоих штаммах. Некоторые из этих генов индуцируются (Рис. 6), а некоторые – претерпевают репрессию (Рис. 8). Для части генов характерна кратковременная индукция на ранней стадии клеточного ответа, тогда как другие гены индуцируются позже, достигая максимума экспрессии через 60 минут и более после добавления сорбита (Рис. 6). Скорее всего, наблюдаемое увеличение концентраций соответствующих мРНК связано с их синтезом *de novo*, хотя возможность повышения стабильности мРНК также не следует исключать.

В клетках дикого типа около 40 генов демонстрируют кратковременную индукцию более чем в два раза в течение первых 15 минут

гиперосмотического стресса. К ним относятся гены некоторых протеаз, в том числе *clpB*, ген шаперона *hspA* и несколько генов с неизвестными функциями.

Индукция ряда генов развивается медленнее и имеет более продолжительный характер. Так, через час после добавления сорбита в клетках наблюдается повышенная экспрессия генов шаперонов (*dnaJ*, *dnaK*, *hspG*), шаперонинов (*groEL*, *groEL-2*, *groES*) (Рис. 7) и протеаз (*htrA*). За счет этого в клетке, очевидно, повышается стабильность белков и обеспечивается их правильное сворачивание. Наблюдается также экспрессия гена супероксиддисмутазы *sodB*, продукт которого тоже играет в клетке протектирующую роль, снижая концентрацию активных форм кислорода. Индуцируются и гены некоторых регуляторных белков, в том числе, сигма-фактора РНК полимеразы *sigD*, и некоторых участников двухкомпонентных сигнальных систем.

Значительную индукцию в клетках дикого типа, но не мутанта, претерпевает ген глюкозилглицеринфосфатсинтазы, *ggpS* (*sll1566*), продукт которого участвует в синтезе глюкозилглицерина, одного из основных осмопротекторных веществ у *Synechocystis* (Engelbrecht et al., 1999).

Экспрессия некоторых генов медленно индуцируется в течение первых 60 минут гиперосмотического стресса и, по-видимому, остается повышенной в течение нескольких часов. Вероятно, эти гены отвечают за восстановление активности клеточных процессов на фоне адаптации клеток к изменившимся условиям среды. К ним относятся гены субъединиц АТФ-синтазы и рибосомальных белков. Долгосрочная индукция характерна также для ряда генов, связанных с энергетическим метаболизмом, фиксацией CO₂ и биосинтезом гема и для многих генов с неизвестными функциями.

Для клеток *aqpZ*(-) мутанта характерны примерно те же наборы индуцирующихся генов, однако их индукция сильно ослаблена (к исключениям этой закономерности относится ряд генов рибосомальных белков).

К генам, репрессуемым в клетке в гиперосмотических условиях культивирования, относятся гены компонентов фотосистем I и II и фикобилисомы, ферментов фиксации CO₂ (*rbcL*, *rbcS*), синтеза хлорофилла; тиоредоксинов (*trxM*, *trxA*), а также сигма-субъединиц РНК полимеразы, в том числе *rpoE* (*slr1545*) и *rpoF* (*slr1564*). Также значительно снижена экспрессия генов пилинов (*pilT*, *hofG*), ряда регуляторных белков, в том числе фитохрома, репрессора *lexA* (*sll1626*) и некоторых регуляторов ответа двухкомпонентных систем (*slr1584*, *slr0474*, *sll0485*) (Рис. 8).

Большинство регуляторных белков, участвующих в клеточных сигнальных путях (например, белки двухкомпонентных систем), присутствуют в клетке в низких концентрациях, и метод микрокомплектного анализа оказывается недостаточно чувствительным для регистрации изменения этих концентраций. Примером промотер-специфических регуляторов транскрипции,

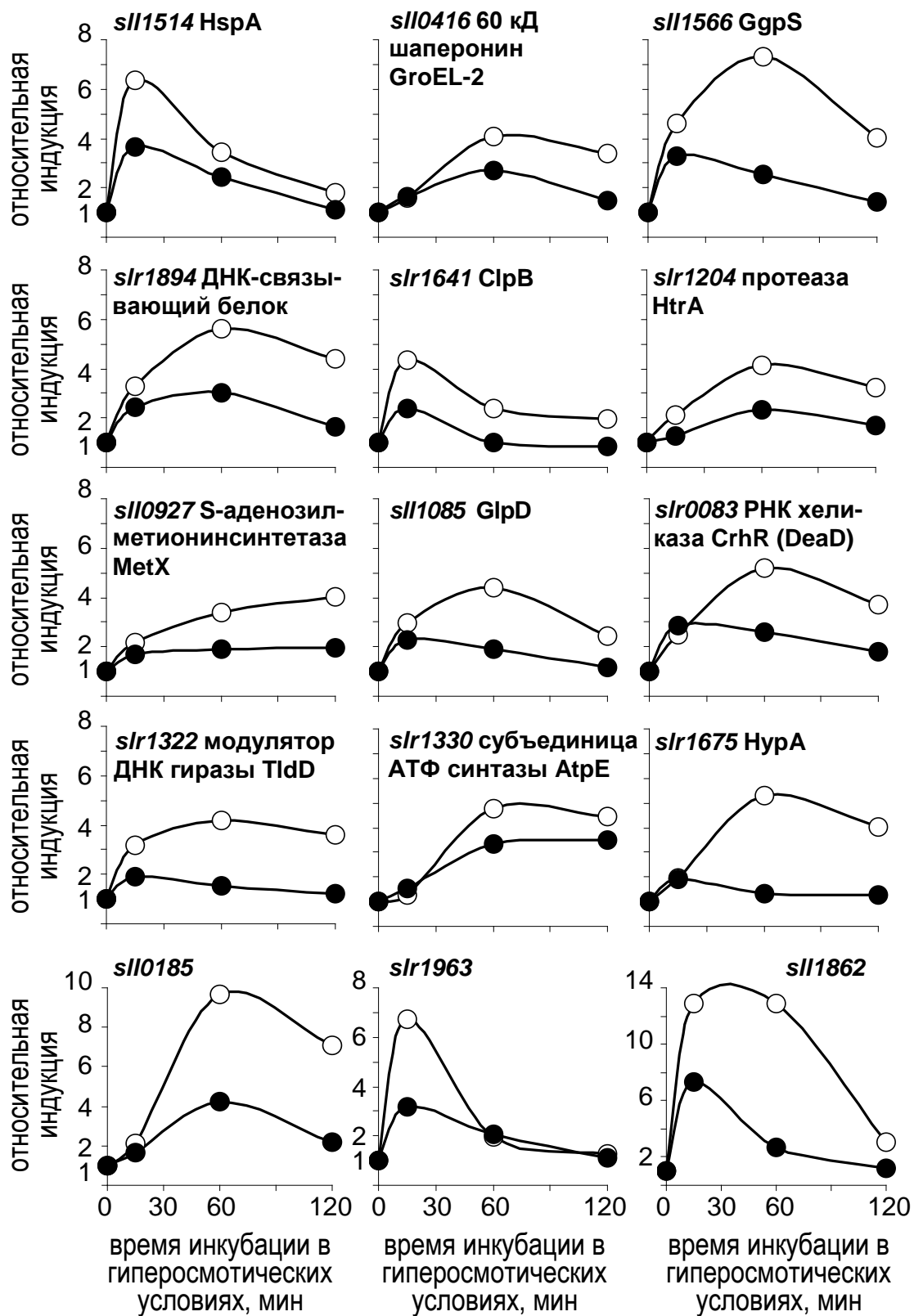


Рисунок 6. Динамика генной индукции в клетках дикого типа (○) и мутанта *aqpZ*(-) (●) в ходе гиперосмотического стресса (по данным микрокомплектного анализа).

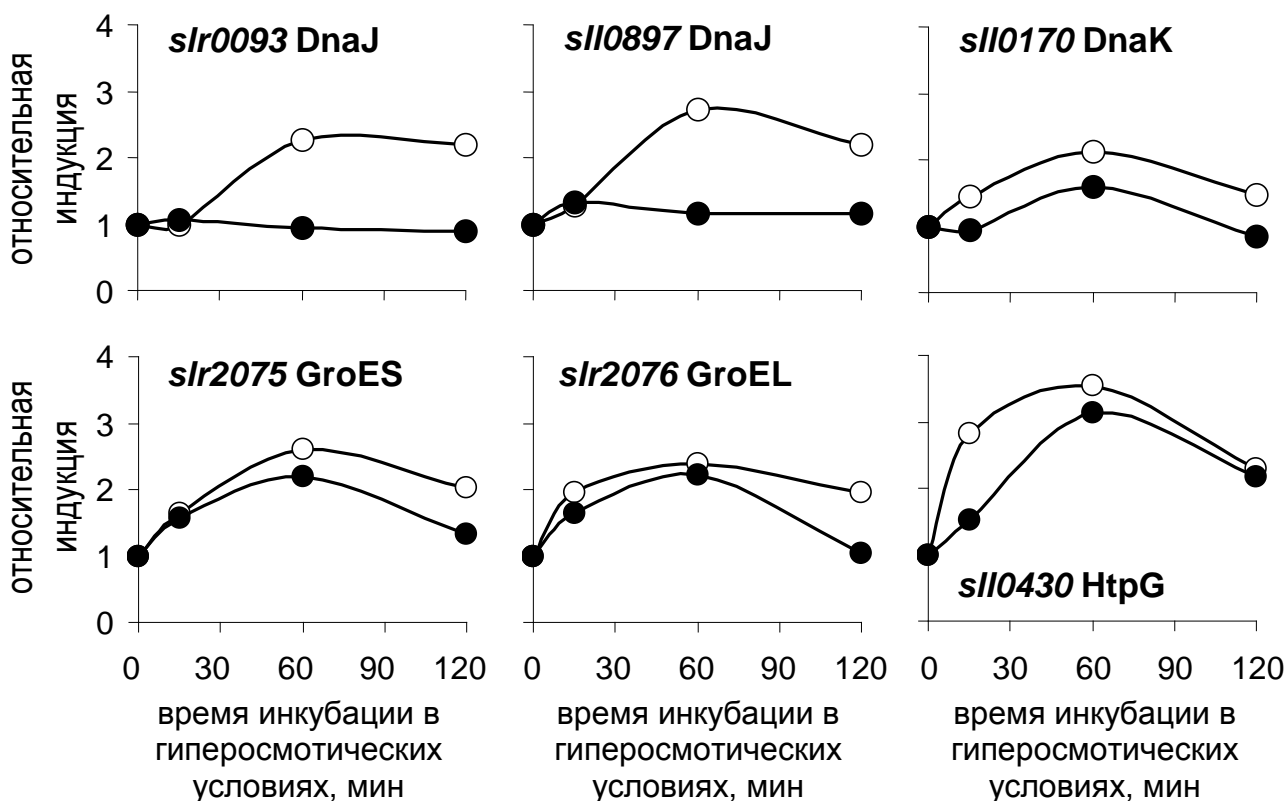


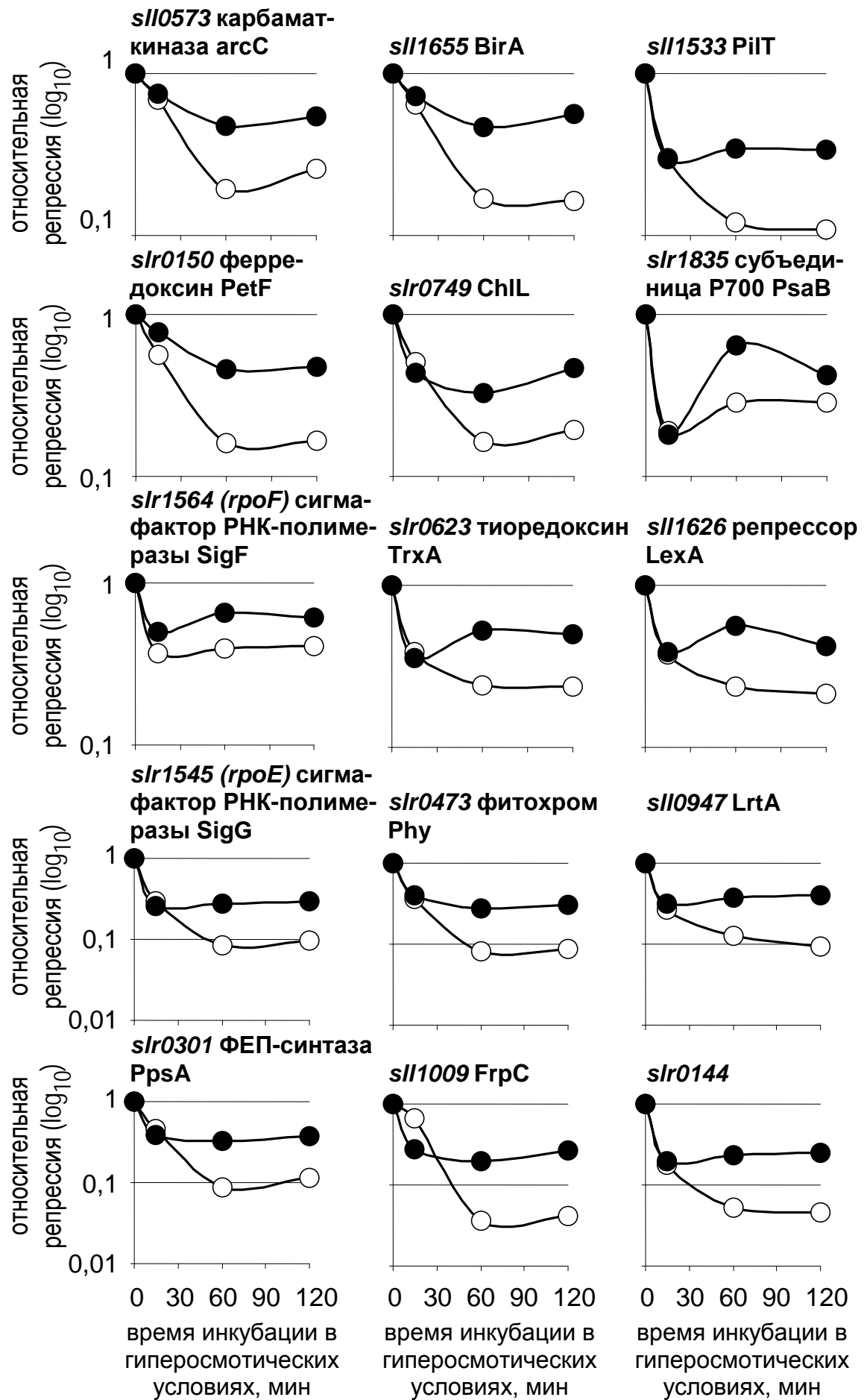
Рисунок 7. Динамика индукции генов шаперонов в клетках дикого типа (O) и мутанта *aqpZ(-)* (●) в ходе гиперосмотического стресса (по данным микрокомплектного анализа).

существующих в клетке в значительной концентрации, могут, по-видимому, являться альтернативные сигма-факторы РНК полимеразы, экспрессирующиеся в определенных стрессовых условиях. В связи с этим следует отметить выраженную репрессию генов одних сигма-факторов (*sigG*, *sigF*, *sigH*) и индукцию других (*sigB*) в ходе гиперосмотического стресса, что может являться одной из причин комплексных изменений генной экспрессии.

Экспрессия генов, демонстрирующих репрессию в клетках дикого типа, также репрессирована в *aqpZ(-)* мутантных клетках, впрочем, она значительно менее выражена количественно.

Таким образом, по данным микрокомплектного анализа, клетки мутанта *aqpZ(-)* демонстрируют нарушения в реакции на гиперосмотический стресс, выраженные в количественном ослаблении изменений в генной экспрессии, как индукции, так и репрессии. Следует отметить, что отличия в генной экспрессии между клетками дикого типа и мутанта носят количественный, но не качественный характер, то есть, наборы индуцирующихся и репрессирующихся генов в случае обоих штаммов практически одинаковы.

Рисунок 8. Динамика репрессии некоторых генов в клетках дикого типа (O) и мутанта *aqpZ(-)* (●) в ходе гиперосмотического стресса (по данным микрокомплектного анализа).



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мутантный штамм с разрушенным геном аквапоринового гомолога *aqpZ* демонстрирует нарушенную реакцию на гиперосмотический стресс, созданный с помощью сорбита. С одной стороны, у мутанта резко затруднен выход воды из клетки, с другой стороны, мутантный штамм отличается от клеток дикого типа менее выраженными изменениями фотосинтетической активности и генной экспрессии. Скорее всего, именно неспособность мутанта к быстрому выбросу воды из клетки в гиперосмотических условиях лежит в основе наблюдаемых нарушений. На основании этого заключения можно выдвинуть некоторые предположения относительно механизмов активации клеточного ответа на гиперосмотический стресс.

Влияние гиперосмотического стресса на генную экспрессию изучалась в разных группах организмов (Csonka, 1989; Hecker & Volker, 2001; Rep et al., 2000; Poolman & Glaesker, 1998), причем на роль первичного стимула, ответственного за активацию клеточных систем ответа, претендовали различные аспекты гиперосмотического стресса (Csonka, 1989; Hoffmann & Dunham, 1995; Wood, 1999; Strom & Kaasen, 1993). Так, появление в среде культивирования растворенного осмотического агента вызывает снижение внеклеточного водного потенциала. Кроме того, осмотический агент может непосредственно воздействовать на клетку (как в случае солевого стресса, индуцированного с помощью NaCl), однако, использование сорбита в качестве осмотика позволяет устранить такое специфическое воздействие. Разность водного потенциала по разные стороны плазматической мембраны провоцирует выход воды из клетки. Это, в свою очередь, приводит к уменьшению объема цитоплазмы, деформации клеточных мембран и концентрированию цитоплазмы. Каждое из указанных явлений могло бы лежать в основе активации определенных клеточных сенсорных систем.

Можно предположить, что в клетках *Synechocystis* присутствуют сенсорные системы (возможно, представленные гистидиновыми киназами двухкомпонентных сигнальных систем или механосенсорными каналами (Johansson et al., 1998)), количественно реагирующие на степень изменений, сопровождающих гиперосмотический стресс. В случае мутанта *aqpZ(-)*, лишённого аквапоринов и, в связи с этим, неспособного к высвобождению воды, эти изменения значительно ослаблены, что и приводит к количественному, но не качественному, ослаблению реакции мутантных клеток.

С другой стороны, полноценная реакция на гиперосмотический стресс может предусматривать активацию в клетках дикого типа дополнительных сенсорных молекул по мере выхода из них воды, в то время как в мутантных клетках эти молекулы будут оставаться неактивными.

Мы предполагаем, что такие гипотетические сенсорные молекулы, чувствительные к изменению формы/объема клетки, являются трансмембранными белками, реагирующими на состояние окружающего их липидного бислоя. Такие белки могут активироваться в результате изменения свойств мембраны при сжатии клетки и стимулировать дальнейшие

изменения в генной экспрессии, наблюдаемые в клетках дикого типа, но не характерные для клеток *aqpZ(-)* мутанта.

Недавние исследования свидетельствуют о том, что некоторые мембраносвязанные сенсорные гистидиновые киназы могут принимать участие в рецепции нескольких различных видов стресса. Это происходит в том случае, если эти стрессы сходно влияют на физическое состояние клеточных мембран (Los and Murata, 2000). Так, трансмембранная гистидиновая киназа Hik33, известная ранее, как сенсор холодного стресса и, по-видимому, активирующаяся благодаря физическим изменениям своего липидного окружения, отвечает также за индукцию ряда генов при гиперосмотическом стрессе (Mikami et al., 2002).

К числу генов, экспрессия которых нарушена в клетках мутантного штамма *hik33(-)* в условиях гиперосмотического стресса, относятся, например, *sl1483*, *clpB*, *sigB* и *htrA*. Индукция указанных генов также нарушена в мутанте *aqpZ(-)*. Это говорит о том, что гистидиновая киназа Hik33, скорее всего, является одним из сенсорных белков, участвующих в рецепции гиперосмотического стресса. С другой стороны, Hik33 не может быть единственным существующим сенсором, так как спектр нарушений генной экспрессии отличается в мутантных штаммах *hik33(-)* и *aqpZ(-)*. Прочих участников активации сигнальных путей в ответ на гиперосмотический стресс еще предстоит найти.

ВЫВОДЫ

1. При стандартных условиях культивирования ген *aqpZ* (*slr2057*) не является необходимым для жизнедеятельности *Synechocystis* sp. PCC 6803. При интенсивной культивации клеток дикого типа и мутанта *aqpZ*(-) в стандартных условиях штаммы характеризуются сходным профилем генной экспрессии.
2. Продукт гена *aqpZ* играет существенную роль в обеспечении выхода воды из клетки в условиях гиперосмотического стресса. Водная проницаемость липидного бислоя вносит незначительный вклад в изменение цитоплазматического объема на ранних этапах гиперосмотического стресса.
3. В условиях гиперосмотического стресса мутант *aqpZ*(-) не демонстрирует снижения электрон-транспортной активности фотосистем I и II, характерного для клеток дикого типа.
4. Набор генов, уровень экспрессии которых изменяется в условиях гиперосмотического стресса, сходен у клеток мутанта *aqpZ*(-) и дикого типа, однако изменения генной экспрессии в мутанте значительно ослаблены количественно.
5. Выход воды из клетки, обеспеченный продуктом гена *aqpZ* и сопровождающийся изменениями цитоплазматического объема и клеточной формы, играет важную роль в формировании стрессорного клеточного ответа.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Shapiguzov, A.Yu.**, Sergeyenko, T.V., Lyukevich, A.A., Allakhverdiev, S.I., Murata, N., Los, D.A. (2001) Aquaporin controls rapid changes in cell volume in *Synechocystis* under hyperosmotic and salt stresses. Abstr. Intl. Conf. "Plants under environmental stress". October 23-28, 2001. Moscow, Russia. p. 262.
2. **Shapiguzov, A.Yu.**, Sergeyenko, T.V., Allakhverdiev, S.I., Murata, N., Los, D.A. (2001) Response of the aquaporin-deficient mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803 to hyperosmotic stress. Abstr. Internat. Symp. on Molecular Genetics and Biotechnology. November 22-24, 2001. Moscow, Russia. p. 187-188.
3. **Shapiguzov, A.**, Sergeyenko, T.V., Lyukevich, A., Allakhverdiev, S.I., Murata, N., Los, D.A. (2002) Aquaporin controls osmotically induced volume changes and gene expression in *Synechocystis*. 5th European Workshop on Molecular Biology of Cyanobacteria. June 10-12, 2002. Stockholm.
4. Shoumskaya, M., Suzuki, S., **Shapiguzov, A.**, Piven, I, Zinchenko, V.V., Los, D.A., Murata, N. (2003) A mutant library of response regulators in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. 11th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, August 24-29, 2003. Tokyo, Japan. p. 135.
5. **Шапигузов, А.Ю.** (2004) Аквапорины: строение, систематика и особенности регуляции. *Физиология растений* 51: 1-11.
6. **Shapiguzov, A.**, Lyukevich, A.A., Allakhverdiev, S.I. Sergeyenko, T.V., Suzuki, I., Murata, N., Los, D.A. (2005) Osmotic shrinkage of cells by water efflux via aquaporins regulates osmostress-inducible gene expression. *Microbiology SGM* 151: 447-455.