

На правах рукописи



Бачин Дмитрий Вячеславович

**Роль кальция в регуляции экспрессии генов
у цианобактерии *Synechocystis***

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2017

Работа выполнена в лаборатории молекулярных основ внутриклеточной регуляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва.

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

Лось Дмитрий Анатольевич

Официальные оппоненты:

Медведев Сергей Семёнович,

доктор биологических наук, профессор,

Заведующий кафедрой физиологии и биохимии растений Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Бабыкин Михаил Михайлович,

кандидат биологических наук,

доцент кафедры генетики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет»

Защита состоится ___ июня 2017 г. в 13 часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 002.210.01 по специальности 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений» (Биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: +7 (495) 977-80-18, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, ул. Ботаническая, 35; <http://www.ippras.ru>

Автореферат разослан «___» апреля 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Макроэлемент кальций играет фундаментальную роль в жизнедеятельности растений, животных и человека, бактерий и архей. Кальций участвует в ключевых физиологических и биохимических процессах клетки – формировании скелета, свертывании крови, мышечных сокращениях, служит универсальным вторичным посредником различных внутриклеточных процессов, в т.ч. с участием сенсорных каналов, (фито)гормонов и нейромедиаторов. Наиболее полно исследована сигнальная роль ионов кальция (Ca^{2+}) в жизнедеятельности животных клеток, менее – в растениях. Кальциевая регуляция физиологических процессов у прокариот по-прежнему недоизучена и представлена отрывочными данными, которые трудно связать в единую систему.

Цианобактерия *Synechocystis* sp. штамм PCC 6803 (далее *Synechocystis*) служит удобным модельным объектом для изучения регуляции фотосинтеза и стрессовых ответов. Наряду с методами генно-инженерной модификации (Grigorieva and Shestakov, 1982), известна и полная нуклеотидная последовательность генома *Synechocystis* (Kaneko *et al.*, 1996). Транскриптомный анализ реакций *Synechocystis* на холодостресс показывает, что снижение температуры культивирования на 6-10°C вызывает адаптивный ответ клеток на уровне индукции генов холодостресса – десатураз жирных кислот (ЖК), РНК-хеликаз и РНК-связывающих белков, протеаз, рибосомных белков и некоторых других генов (Sinetova *et al.*, 2017). Часть генов холодостресса контролируется двухкомпонентной системой регуляции, состоящей из гистидинкиназы Hik33 и регулятора ответа Rre26 (Лось, 2010). Другая часть не зависит от Hik33 и активируется при изменении степени сверхспирализации хромосомной ДНК (Prakash *et al.*, 2009). Hik33 является сенсором низкой температуры, который активируется красным светом (Mironov *et al.*, 2012; 2014), напоминая тем самым фитохром Б высших растений, который интегрирует в себе функции светозависимого холодострессового сенсора (Legris *et al.*, 2016). У растений в передаче сигнала о снижении температуры задействованы ионы Ca^{2+} . Имеются также данные о возможном участии Ca^{2+} в ответах на холодостресс у *Synechocystis* (Nazarenko *et al.*, 2003). Однако, системных исследований роли Ca^{2+} в ответах цианобактерий на холодостресс на уровне транскрипции генов не проводилось.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось выяснение роли ионов кальция в запуске ответов клеток цианобактерий (*Synechocystis* sp. PCC 6803 GT) на снижение температуры окружающей среды. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Выявление кальций-зависимых генов, индуцируемых при холодострессе.
2. Получение мутантов по генам, кодирующим белки, предположительно участвующие в кальциевом сигналинге.
3. Анализ холодоиндуцируемой транскрипции генов в полученных мутантах.
4. Выявление и характеристика Ca^{2+} -зависимых сигнальных путей ответов на холодостресс у *Synechocystis*.

Научная новизна. Впервые проведен системный анализ экспрессии генов в условиях холодостресса под воздействием ингибитора кальциевого канала, кальциевого ионофора и хелатора кальция. Впервые проведено сравнительное исследование экспрессии генов ответа на холодостресс на свету и в темноте в присутствии кальциевого ионофора и хелатора кальция у клеток дикого типа и мутанта по механочувствительному каналу MscL. Впервые было показано участие механочувствительного канала MscL в регуляции экспрессии холодоиндуцируемых

генов. Впервые у цианобактерии *Synechocystis* обнаружены светозависимые гены, не регулируемые двухкомпонентной системой регуляции Hik33-Rre26.

Положения, выносимые на защиту.

1. В ответ на изменения температуры окружающей среды у цианобактерий происходит внутриклеточное перераспределение ионов кальция.
2. У цианобактерий (на примере *Synechocystis*) катионы кальция индуцируют транскрипцию генов ответа на холодовой стресс (*crhR*, *rpbA*, *rpl3*, *rpoA*). Эти гены не контролируются известным сенсором холодового стресса гистидинкиназой Hik33.
3. Мембранный белок MscL, формирующий механосенсорный канал, участвует в регуляции перераспределения внутриклеточных катионов кальция, Ca²⁺-зависимой транскрипции, а также может функционировать в качестве сенсора, который активируется при температурозависимом изменении физических свойств мембран.

Практическая значимость. Научные данные и мутантные организмы, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, могут быть использованы для расширения и углубления знаний о молекулярных механизмах регуляции клеточных процессов, связанных с восприятием, проведением стрессовых сигналов и развитием устойчивости к различным стрессам.

Апробация работы. Основные результаты научной работы были представлены на конференции для молодых учёных «Ломоносов 2015» (Москва, МГУ), на конференции съезда Российского общества физиологов растений (Петрозаводск, КНЦ РАН, 2015) и на конференции для молодых учёных «Биология: от молекулы до биосферы» (Украина, Харьков, ХНУ, 2015).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 5 печатных работ в научных журналах и материалах конференций, 2 из которых являются статьями в рецензируемых журналах.

Структура и объём работы: Диссертационная работа состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Объект и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы». Работа изложена на 174 страницах машинописного текста, содержит 50 рисунков и 4 таблицы. Список цитируемой литературы включает 172 наименований, из которых 161 – на иностранных языках.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования в настоящей работе служила культура цианобактерий *Synechocystis sp.* PCC 6803, штамм GT (Williams, 1988; Ikeuchi and Tabata, 2001). Аксеничные культуры цианобактерий поддерживали на агаризованной среде BG-11, с добавлением 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.5 в качестве буфера, на чашках Петри при температуре 32°C, а постоянное освещение обеспечивалось люминесцентными лампами OSRAM L18W/640 (Россия). Культуры мутантов *Synechocystis* поддерживали в аналогичных условиях, но с добавлением необходимых антибиотиков соответствующей концентрации (5-50 мкг мл⁻¹).

Интенсивные культуры цианобактерий выращивали асептически в культуральных сосудах при 32°C и постоянном освещении и барботировании стерильной газовой смеси, обогащённой CO₂ до концентрации 1,6%. Для перевода в условия интенсивной культуры цианобактерии разбавляли в необходимом объёме стерильной среды BG-11, перемешивали, и разливали по культуральным сосудам. Таким образом, осуществляли синхронизацию роста культур в нескольких сосудах. На 2-3 сутки (ОП₇₅₀=1) цианобактерии переносили в условия эксперимента.

В качестве показателя роста использовали зависимость ОП₇₅₀ суспензии клеток от времени (в сутках культивирования).

Выделение нуклеиновых кислот из клеток *Synechocystis*. Для выделения нуклеиновых кислот, экспериментальные образцы (50 мл интенсивной культуры цианобактерий OD₇₅₀=1) фиксировали равным объёмом ледяного этилового спирта с 0,5% фенола, после чего выделяли РНК или ДНК согласно описанным ранее методикам (Kiseleva *et al.*, 2000; Mironov, Los, 2015). Содержание нуклеиновых в пробе оценивали спектрофотометрически.

Подбор праймеров для амплификации генов был произведён с помощью интернет-ресурса Primer3) и программы Vector NTI (Invitrogen). Проверка праймеров была произведена путём ПЦР с использованием геномной ДНК *Synechocystis* в качестве матрицы.

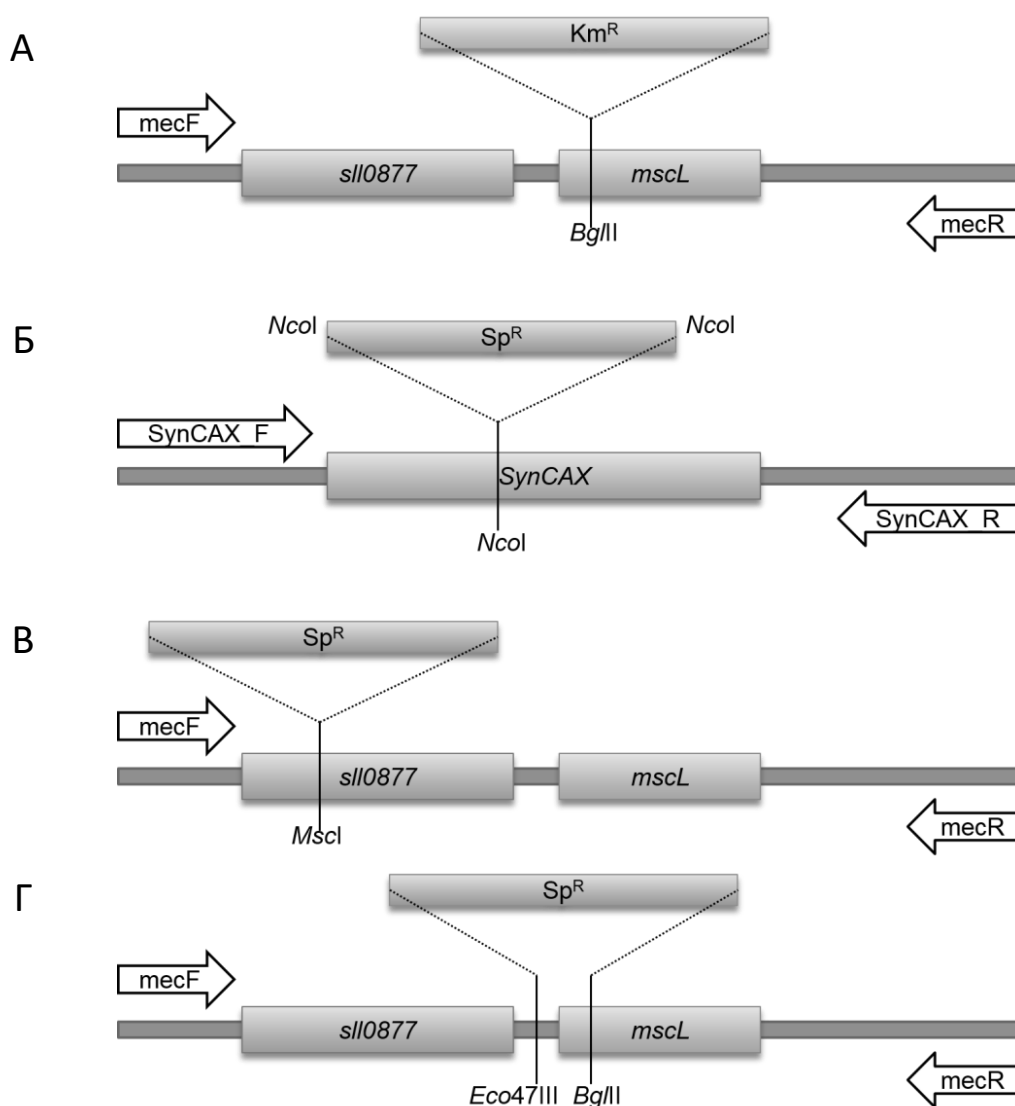


Рис. 1. Схемы генетических конструкций для получения мутантов по генам *mscL* (А), *synCax* (Б), *sll0877* (В) и двойного мутанта по генам *mscL* и *sll0877* (Г). Фрагмент размером 2793 п.н. амплифицировали с помощью праймеров *mecF* и *mecR*. Кассету устойчивости к канамицину размером 1623 п.н. клонировали по сайту рестрикции *Bgl* II (А). Фрагмент размером 826 п.н. амплифицировали с помощью праймеров *SynCaxF* и *SynCaxR*. Кассету устойчивости к спектиномицину размером около 2000 п.н. встраивали по сайтам рестрикции *Nco* I (Б), *Msc* I (В), или *Bgl* II и *Eco47* III (Г).

Конструирование плазмид, необходимых для трансформации сначала моделировали виртуально с использованием базы данных CyanoBase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase/>) и программы Vector NTI 11 (Invitrogen). По результатам производилась вставка кассеты устойчивости к различным антибиотикам в кодирующий участок гена, предварительно клонированного в вектор pTZ57R (Fermentas). Правильность сборки конструкций проверяли с помощью ПЦР. Для амплификации плазмид использовались бактерии *Escherichia coli* штамм XL-1 Blue. Схемы разрушения различных генов представлены на Рис. 1.

Направленный мутагенез генов *Synechocystis*. Штамм *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT трансформировали по методике, основанной на естественной компетентности клеток и процессе двойной гомологичной рекомбинации между хромосомной и экзогенной ДНК (Grigorieva and Shestakov, 1982). Полной сегрегации ДНК, несущей мутированный ген, добивались пассированием цианобактерий до одиночных колоний на среде BG-11 с агаром при повышении концентрации антибиотика. О замене дикого типа мутантным судили по результатам ПЦР с использованием Hot Start *Taq*-полимеразы согласно методикам фирмы-изготовителя (Fermentas). Амплифицированные фрагменты разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле.

Выбор генов для изучения экспрессии проводился исходя из различных литературных данных, связанных изучением холодового стресса методом ДНК-микрочипов, исходя из их фактора индукции (Лось, 2010). Для изучения экспрессии были выбраны холодоиндуцируемые гены, регулируемые двухкомпонентной системой регуляции Hik33-Rre26 (*desB*, *lilA*, *hliB*) и холодоиндуцируемые гены, системы регуляции которых остаются неизученными (*desA*, *crhR*, *rbpA*, *rpl3* и *rpoA*).

Анализ экспрессии генов с помощью обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ОТ-кПЦР). Дополнительную очистку РНК от ДНК осуществляли с помощью дезоксирибонуклеазы I (Fermentas). Оценку качества выделенной РНК определяли с помощью гель-электрофореза. Для этого 1 мкг РНК разделяли в 1% агарозном геле при постоянном токе напряжённостью 11 В см⁻¹ в течение 15 мин. В норме после разделения РНК в геле в присутствии бромистого этидия при освещении ультрафиолетом 254 нм наблюдали 3 мажорные линии, соответствующие 23S рРНК, продукту дегградации 23S рРНК и 16S рРНК.

Реакцию ОТ проводили с помощью обратной транскриптазы Superscript III (Invitrogen, США) в соответствии с протоколами фирмы-изготовителя в присутствии 2 мкг общей клеточной РНК и обратных праймеров (по 2 пмоль каждого). Олигонуклеотиды, использованные в качестве праймеров, синтезированы НПФ «ЛИТЕХ» (РФ). Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили независимо для каждого образца кДНК, полученного в ходе реакции обратной транскрипции. Для синтеза использовали готовые смеси для ПЦР PCRmix-HS SYBR (Evrogen, РФ) и аппаратный комплекс CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Для измерения относительного содержания кальция в клетках *Synechocystis* в условиях холодового и теплового стресса клетки *Synechocystis* в течение 60 мин подвергали холодовому (20-22°C) и тепловому стрессу (44-45°C) отбирали аликвоты по 10 мл каждые 15 мин. Клетки отмывали в 20 мл воды milliQ и

ресуспензировали в 5 мл milliQ. В полученных образцах измеряли содержание кальция методом атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС).

Влияние внеклеточной концентрации Ca^{2+} на ответы клеток на холодовой стресс оценивали следующим образом. Клетки *Synechocystis* инкубировали при 32°C, отмывали в средах с различным содержанием кальция (без кальция; 0,34 мМ кальция – стандартное содержание в среде культивирования; и 2 мМ кальция), и инкубировали 30 мин при 22°C. Из фиксированных проб выделяли РНК и проводили обратную транскрипцию и ПЦР в реальном времени. Результаты кПЦР рассчитывали относительно экспрессии тех же генов при холодовом стрессе в стандартной среде культивирования (0,34 мМ кальция).

Ингибиторный анализ транскрипции в условиях холодового стресса на свету и в темноте. Клетки инкубировали при 32°C с ингибитором кальциевых каналов верапамилом (0,1 мМ), либо в присутствии хелатора кальциевых каналов ВАРТА (2 мМ) в смеси с кальциевым ионофором иономицином (3 μM) в течение 30 мин. Затем выдерживали их на 22°C в течение 30 мин на свету или в темноте (Рис. 2).

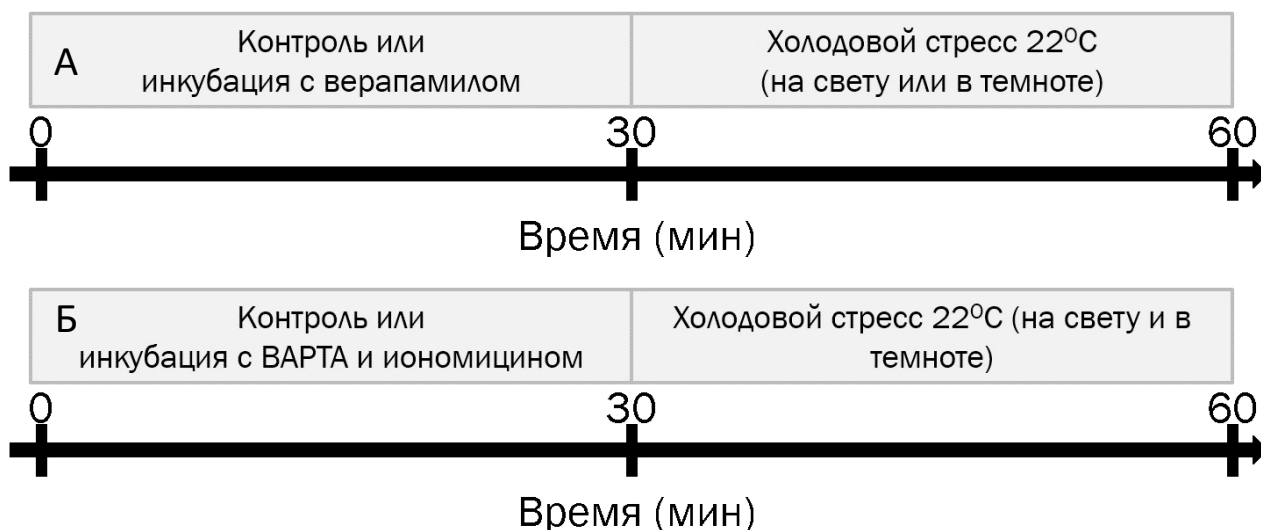


Рис. 2. Схема эксперимента с использованием ингибитора кальциевых каналов верапамила (0,1 мМ) (А), а также ионофора иономицина (3 μM) и хелатора Ca^{2+} ВАРТА (2 мМ) (Б). Клетки фиксировали через 60 мин после начала эксперимента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Измерение относительного содержания кальция в клетках *Synechocystis* при холодовом и тепловом воздействиях показаны на Рис. 3, где приведены расчёты относительного содержания кальция. Следует иметь в виду, что эти данные показывают суммарное содержание как связанного, так и не связанного кальция, и не позволяют оценить содержание кальция в периплазматическом пространстве. Тем не менее, эти оценки позволяют наблюдать относительные изменения количества ионов Ca^{2+} и судить о флуктуациях, вызванных воздействием на клетки низкой или высокой температур. Так, измерения показывают, что изменения концентрации Ca^{2+} значительно менее выражены в мутантных клетках *Synechocystis*, дефектных по

механосенсорному каналу MscL (Рис. 3). Эти данные говорят об участии MscL в температурозависимой регуляции транспорта ионов кальция.

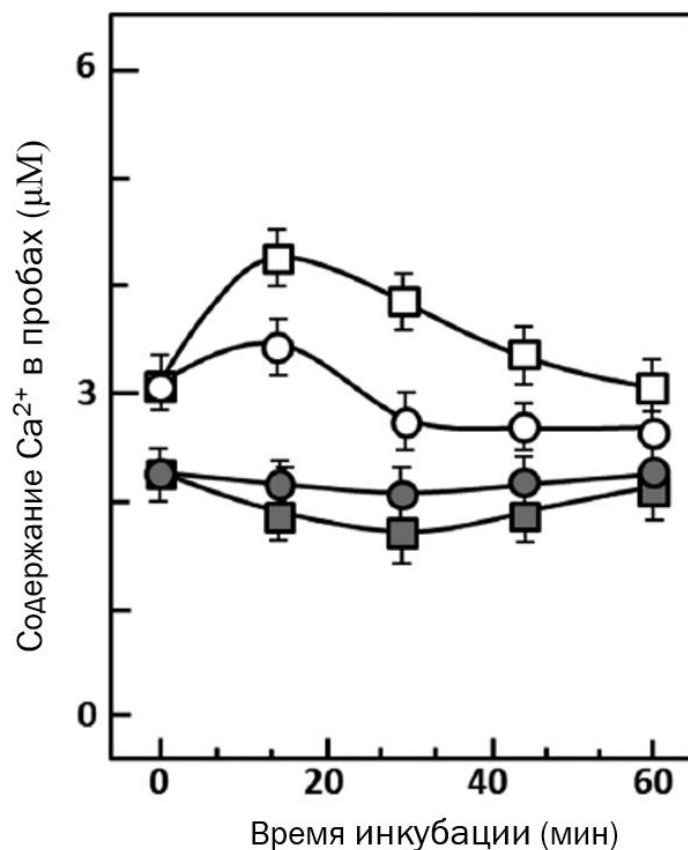


Рис. 3. Измерение относительного содержания кальция в клетках при холодовом (круги) и тепловом (квадраты) стрессах у цианобактерии *Synechocystis* дикого типа (белые значки) и мутанта по гену *mscL* (серые значки).

Оценка влияния концентрации ионов Ca^{2+} в среде культивирования на индукцию транскрипции генов холодового шока. Для определения влияния концентрации ионов Ca^{2+} на индукцию транскрипции генов холодового шока клетки, выращенные при 34°C в среде BG-11, отмывали в среде без кальция и инкубировали 30 мин при 22°C в среде культивирования с разным содержанием кальция (0, 0.34 и 2 мМ). Относительное содержание транскриптов генов ответа на холодовой шок показаны на Рис. 4.

В условиях этого эксперимента количество транскриптов 6 исследованных генов мало отличалось и не зависело от концентрации кальция во внешней среде. Если кальций необходим для запуска ответов на снижение температуры и при этом, как в клетках растений, необходимо повышение его концентрации в цитозоле, то это увеличение происходит, скорее всего, не за счет накачивания Ca^{2+} из внешней среды. При быстрой отмывке клеток ионы Ca^{2+} могут оставаться в периплазматическом пространстве, которое может служить кальциевым депо при необходимости быстрого изменения концентрации кальция внутри клеток.

Транскрипция генов ответа на холодовой стресс в присутствии блокатора кальциевых каналов верапамила. На рис. 5 показано относительное содержание

мРНК светозависимого гена *hliB* и светонезависимого гена *rbpA* при холодном стрессе на свету и в темноте или на свету в присутствии верапамила. Ген *hliB* не индуцируется холодом в темноте, в то время как *rbpA* индуцируется холодом как на свету, так и в темноте. Блокатор кальциевых каналов верапамил снижает холодоиндуцируемую транскрипцию обоих генов на 40-60%, что может указывать на существование у *Synechocystis* кальциевых каналов, чувствительных к верапамилу.

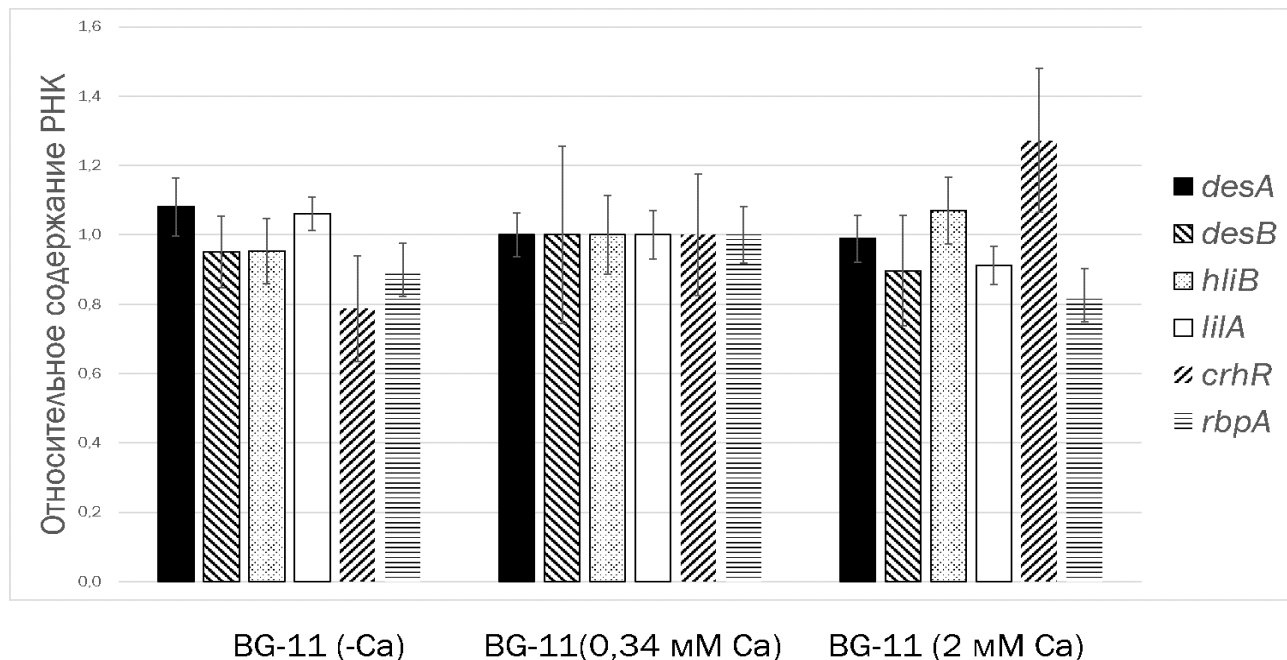


Рис. 4. Относительное содержание мРНК в клетках цианобактерий после 30 мин инкубации при 22°C в среде культивирования с разным содержанием кальция.

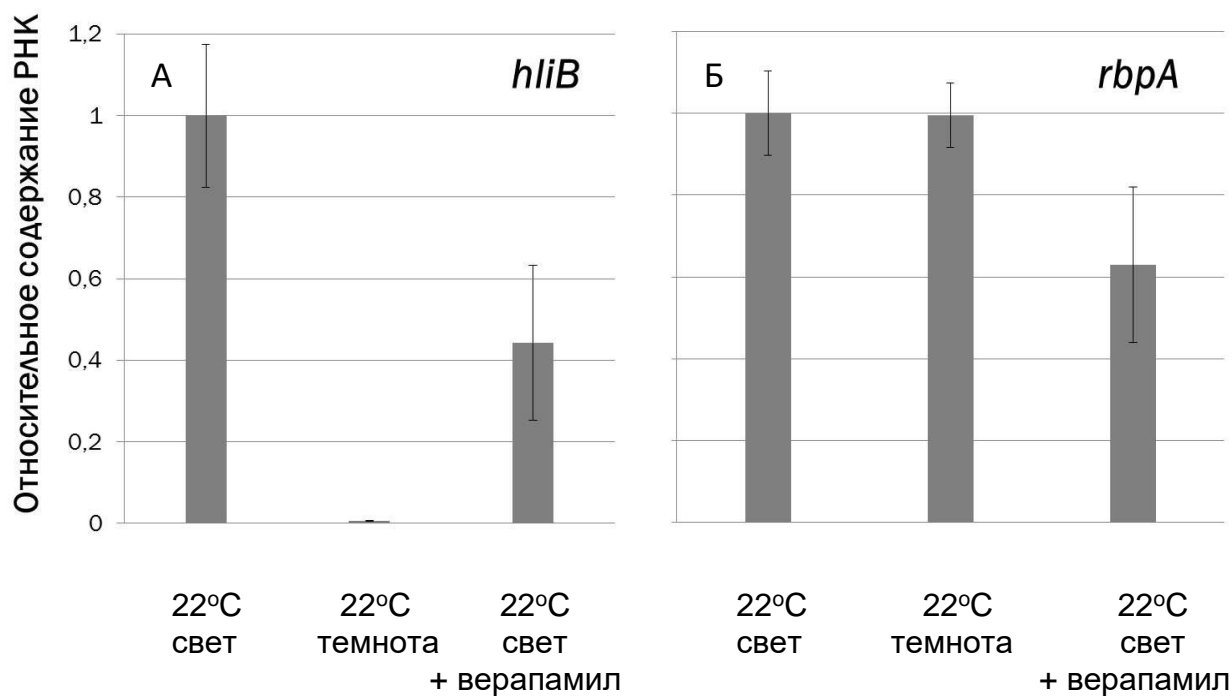


Рис. 5. Относительное содержание мРНК светозависимого гена *hliB* (А) и светонезависимого гена *rbpA* (Б) при холодном стрессе (22°C) на свету и в темноте или на свету в присутствии верапамила (0,1 мМ) в клетках *Synechocystis* дикого типа.

Однако, этот блокатор может неспецифически блокировать и калиевые каналы (Demidchik *et al.*, 2002), поэтому однозначный вывод о существовании специфических кальциевых каналов у цианобактерий делать пока рано.

Направленный мутагенез переносчиков кальция. Охарактеризованные белки, которые могут участвовать в транспорте кальция у *Synechocystis* включают механосенсорный канал высокой проводимости MscL (Nazarenko *et al.*, 2003), H^+/Ca^{2+} -антипортер SynCAX (Waditee *et al.*, 2004) и Ca^{2+} -зависимый K^+ -канал (Checchetto *et al.*, 2013). Мы начали функциональное изучение этих компонентов с направленного мутагенеза и получения мутантных штаммов, дефектных по генам *mscL*, *synCax*, гена неизвестной функции *sll0877*, который является гомологом АТФазы⁺⁺⁺ и расположен в непосредственной близости к *mscL*, а также одновременно по 2 генам *mscL* и *sll0877* (Рис. 1).

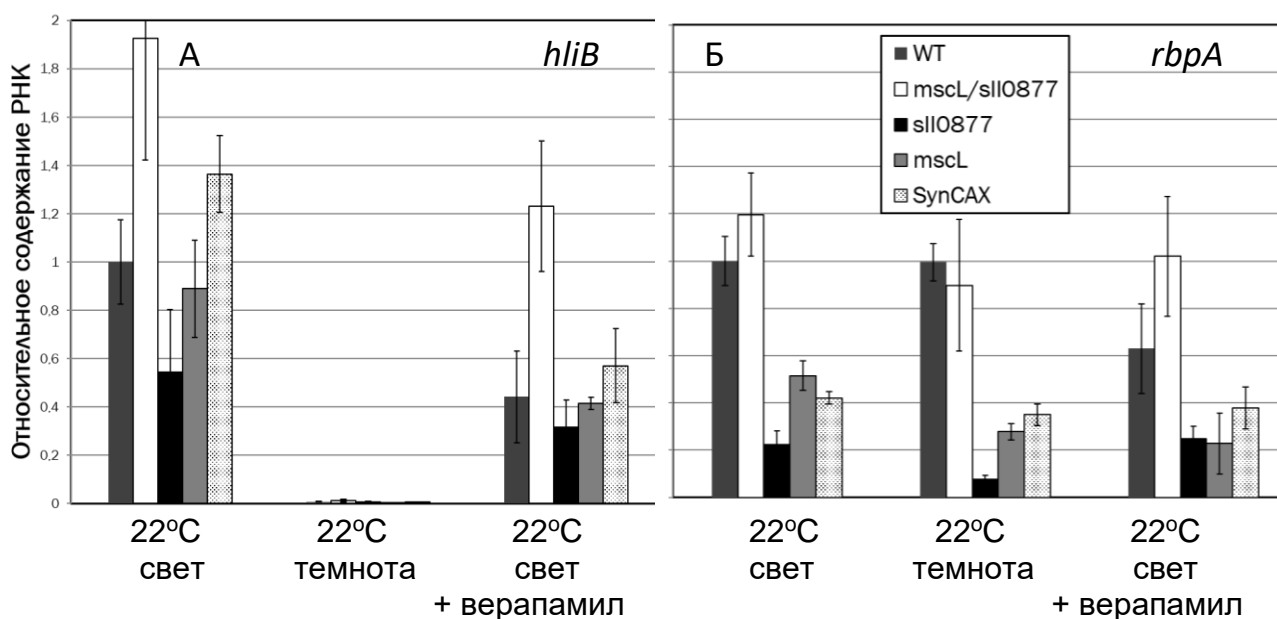


Рис. 6. Относительное содержание мРНК светозависимого гена *hliB* (А) и светонезависимого гена *rbpA* (Б) при холодном стрессе (22°C) на свету и в темноте или на свету в присутствии верапамила (0,1 мМ) в клетках *Synechocystis* дикого типа и мутантов по генам *mscL*, *SynCax*, *sll0877* и двойного мутанта по *mscL* и *sll0877*.

Индукция холодом гена *hliB* не наблюдалась в темноте и снижалась в присутствии верапамила на свету (Рис. 6). Это указывает на возможное существование пока неизвестных, возможно – светозависимых, каналов транспорта Ca^{2+} в дополнение к выключенным MscL и SynCAX. Роль гипотетической АТФазы Sll0877 в транспорте Ca^{2+} неизвестна, а феномен усиления транскрипции *hliB* на свету у двойного мутанта по *mscL* и *sll0877* пока остается необъяснимым. В то же время транскрипция гена *rbpA* не регулировалась светом и/или верапамилем и заметно снижалась у мутантов по генам *mscL*, *SynCax* и *sll0877* (но не у двойного мутанта по *mscL* и *sll0877*), указывая на их возможное участие в кальциевой регуляции независимых от света реакций на холодный стресс.

Приобретенная светозависимая транскрипция генов у мутанта по MscL. Дальнейшее изучение транскрипции Nik33-независимых генов *crhR*, *rbpA* и *rpl3* подтвердило, что в клетках дикого типа индукция этих генов холодом не зависит от

света (Mironov *et al.*, 2012; 2014). Однако мутация по гену механосенсорного канала *mscL* приводит к появлению их светозависимости (Рис. 7). Очевидно, что температурозависимый поток кальция через MscL выполняет регуляторные функции, возможно, обеспечивая работу дополнительного регуляторного пути ответов клеток на холододовый стресс в темноте. При блокировании этого потока клетки вынуждены использовать оставшийся светозависимый путь регуляции через Hik33. Известно, что ген *rbpA* играет важную роль в светозависимом закаливании при холододовом стрессе: например, инкубация клеток *Synechocystis* при 15°C на свету обеспечивает их жизнеспособность при 5°C (Tan *et al.*, 2011). Таким образом, индукция транскрипции гена *rbpA* может контролироваться двумя системами регуляции – светозависимой и светонезависимой. Последняя непосредственно связана с работой механосенсорного канала MscL.

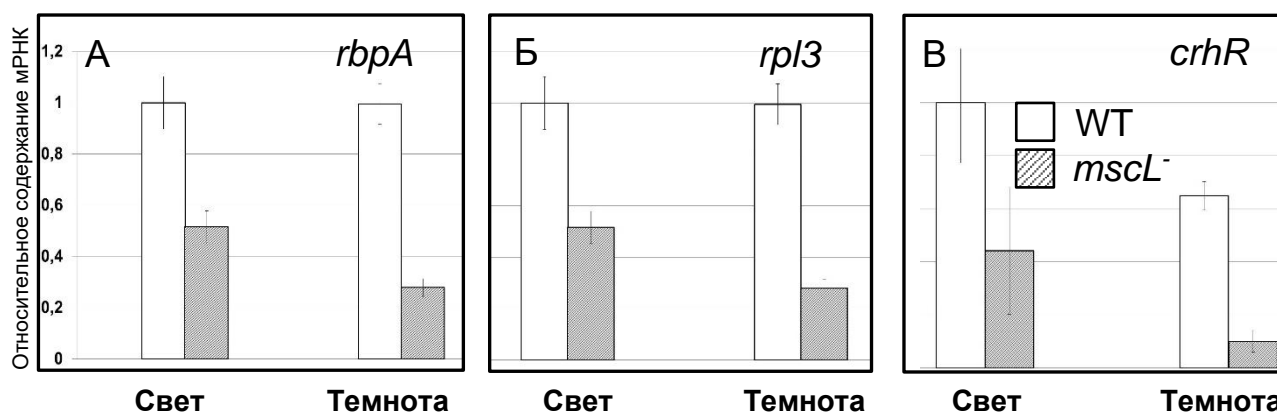


Рис. 7. Относительное содержание мРНК генов *crhR* (А), *rbpA* (Б), и *rpl3* (В) в клетках *Synechocystis* дикого типа (WT, темные колонки) и мутанта по гену *mscL* (*mscL*⁻, светлые колонки) при холододовом стрессе (22°C) на свету и в темноте

Скорее всего в этом регуляторном пути помимо MscL имеются и другие (возможно – кальций-зависимые) белки, которые ещё предстоит идентифицировать. На данном этапе можно лишь констатировать, что регуляция ответов на холододовый стресс у *Synechocystis* происходит сложнее, чем может обеспечить одна двухкомпонентная система и что одна из ветвей этих регуляторных путей задействует ионы Ca²⁺.

Удаление кальция из клеток с помощью ионофора и хелатора («откачивание» кальция). Поскольку блокатор кальциевых каналов верапамил может неспецифично блокировать и другие ионные каналы, а направленный мутагенез был применен пока только к ограниченному числу кальциевых переносчиков, мы решили оценить температурозависимые изменения транскрипции генов при «откачивании» ионов кальция из клеток. Для этого к клеткам цианобактерий добавляли кальциевый ионофор иономицин, который делает периплазматическую мембрану проницаемой для кальция, и кальциевый хелатор ВАРТА. Сочетание перфоратора и хелатора формирует кальциевый поток (градиент) из периплазматического пространства во внешнюю среду и, таким образом, снижает концентрацию Ca²⁺ в периплазме, которая может служить депо для поставки кальция внутрь клеток при необходимости.

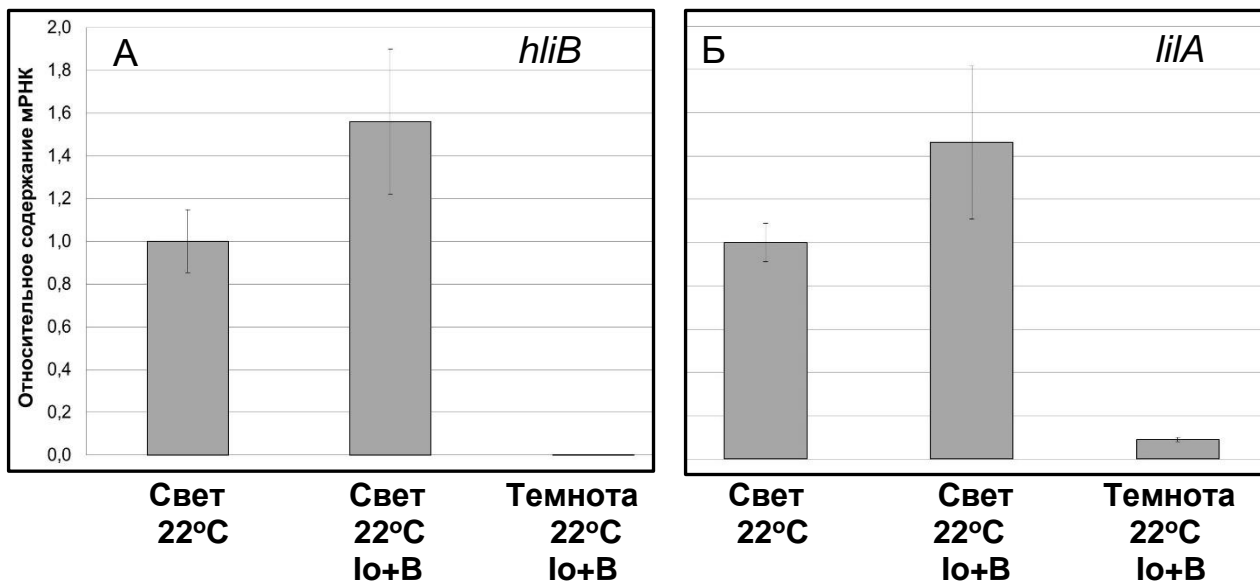


Рис. 8. Относительное содержание мРНК светозависимых генов *hliB* (А) и *lila* (Б) после 30 мин холодого стресса (22°C) клеток *Synechocystis* дикого типа на свету и в темноте в присутствии иономицина (Io; 3 μM) и ВАРТА (B; 2 mM).

Клетки инкубировали в присутствии иономицина и ВАРТА в течение 30 мин при 32°C и 30 мин при 22°C на свету или в темноте. При «откачивании» кальция наблюдалось некоторое увеличение транскрипции генов *hliB* и *lila* на свету. Однако, в темноте никакой низкотемпературной индукции не происходило (Рис. 8), как и в контрольных вариантах (без добавления химических агентов; Рис. 5А). Эти результаты свидетельствуют о том, что транскрипция светозависимых генов ответа на холодовой стресс, скорее всего, не регулируются кальцием. Если всё же взаимодействие Ca^{2+} и Nik33 имеет место, то Ca^{2+} (или система регуляции с участием Ca^{2+}) должен частично ингибировать светозависимый Nik33-опосредованный путь.

Напротив, «откачивание» кальция из периплазматического пространства приводило к снижению холодоиндуцируемой транскрипции светонезависимых генов *rbpA*, *crhR*, *rpl3* (Рис. 9). Этот означает, что индукция этих генов при снижении температуры может быть связана с повышением внутриклеточной концентрации кальция, который поступает в цитоплазму клеток через цитоплазматическую мембрану из периплазматического пространства.

Снижение уровня индукции светонезависимых генов при «откачивании» кальция из периплазмы оказалось более выраженным в темноте (Рис. 9). Таким образом, подобно выключению гена *mscL*, удаление кальция из периплазмы приводило к проявлению светозависимости транскрипции генов, которые в обычных условиях от света не зависят. Полученные результаты также косвенно указывают на то, что механосенсорный канал MscL, помимо участия в процессе выхода кальция из клеток (Nazarenko *et al.*, 2003), может регулировать вход Ca^{2+} из периплазматического пространства в цитоплазму под действием низкотемпературного стресса.

Удаление кальция из клеток с помощью ионофора и хелатора («откачивание» кальция) у мутанта по механосенсорному каналу MscL. Для установления роли механосенсорного канала MscL в ответе на холодовой стресс кальций-зависимых генов, эксперимент по «откачиванию» ионов Ca^{2+} из

периплазматического пространства с помощью ионофора иономицина и хелатора ВАРТА проводили с мутантом *Synechocystis*, дефектным по *MscL*. Результаты по генам *crhR*, *rbpA* (Рис. 10), а также *rpl3* и *rpoA* (данные приведены в диссертации).

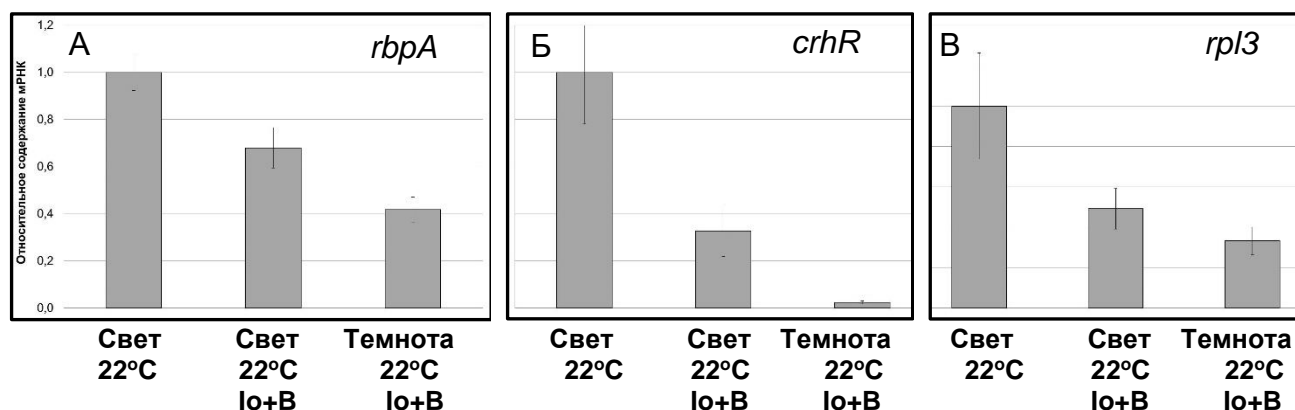


Рис. 9. Относительное содержание мРНК гена светонезависимых генов *rbpA* (А), *rpoA* (Б) и *rpl3* (В) после 30 мин холодого стресса (22°C) клеток *Synechocystis* дикого типа на свету и в темноте в присутствии иономицина (Io; 3 μM) и ВАРТА (В; 2 mM).

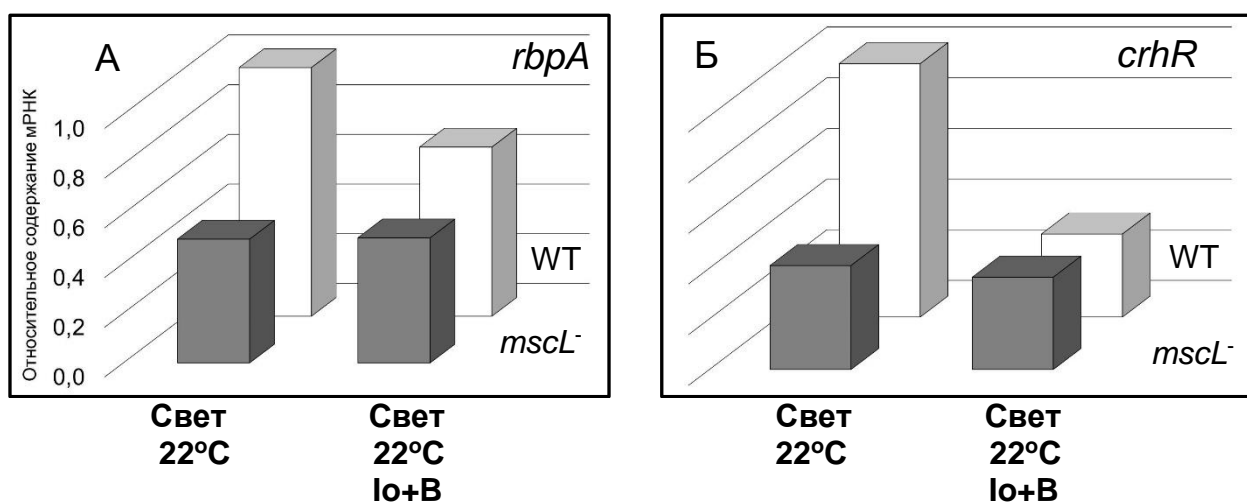


Рис. 10. Относительное содержание мРНК светонезависимых генов *rbpA* (А) и *crhR* (Б) после 30 мин холодого стресса (22°C) в клетках *Synechocystis* дикого типа (WT) и мутанта по гену *mscL* (*mscL*⁻) на свету в присутствии иономицина (Io; 3 μM) и ВАРТА (В; 2 mM).

У мутанта, дефектного по *MscL*, индукция транскрипции светонезависимых генов при снижении температуры проявляется слабее, чем у клеток дикого типа (Рис. 6 и 10). При «откачивании» кальция из клеток дикого типа транскрипция *rbpA* и *crhR* индуцируется холодом значительно слабее, чем обычно, в то время как у мутанта по *MscL* – практически не изменяется. Это свидетельствует о том, что *MscL*, локализованный в цитоплазматической мембране (Huang *et al.*, 2002), действительно может отвечать за вход Ca^{2+} в цитоплазму из периплазматического пространства в условиях холодого стресса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клетки цианобактерии *Synechocystis* отвечают на снижение температуры активацией ряда генов, необходимых для акклиматизации. Часть этих генов контролируется гистидинкиназой *Nik33*, является светозависимой и, вероятно, не требует ионов Ca^{2+} для активации. Другая часть является светонезависимой и их активация происходит с участием ионов Ca^{2+} . Механосенсорный канал *MscL* участвует в регуляции содержания кальция в клетках. Мутант по этому каналу не реагирует на инкубацию с ВАРТА и иономицином, что указывает на участие *MscL* в транспорте кальция из периплазмы в цитозоль при холоде стрессе. Поскольку канал механочувствительный, то он способен реагировать на изменения текучести цитоплазматической мембраны, уплотняющейся при снижении температуры, и открываться в ответ на холодовой стресс.

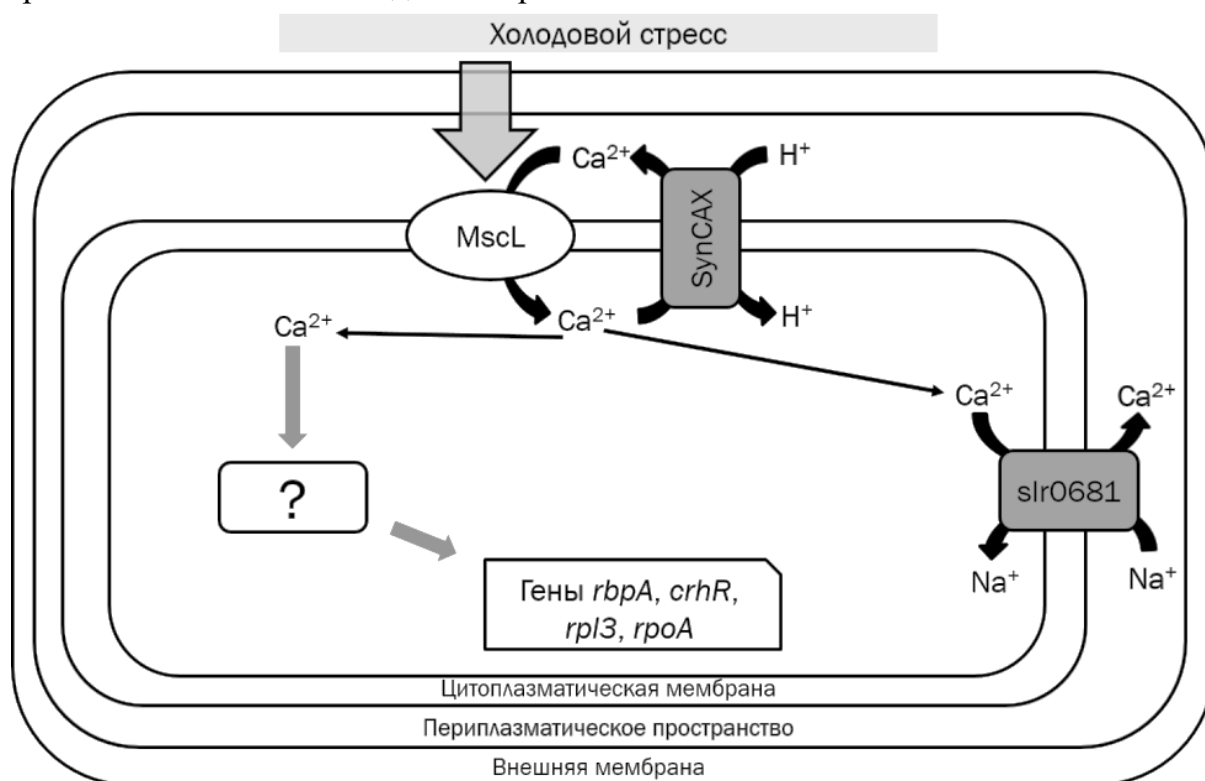


Рис. 11. Гипотетическая схема регуляции кальций-зависимых генов.

Таким образом, обнаружено существование новой системы регуляции экспрессии генов ответа на холодовой стресс, оперирующая с использованием Ca^{2+} . Транскрипция Ca^{2+} -зависимых генов (*crhR*, *rbpA*, *rpl3*, *rpoA*) не зависит от света при нормальной работе всех сигнальных путей в клетках дикого типа, однако, становится светозависимой при нарушении кальциевого гомеостаза у мутанта, дефектного по *MscL*. Это свидетельствует о том, что температурозависимый поток кальция через цитоплазматическую мембрану, регулируемый *MscL*, необходим для формирования клеточных ответов на холодовой стресс. В схеме запуска экспрессии светонезависимых генов холодового шока (Рис. 11) пока отсутствуют два важных компонента – кальций-связывающие белки и/или непосредственные кальций-зависимые регуляторы транскрипции. Возможно также, что этот регуляторный путь опосредован через протеинкиназные или фосфатазные реакции. Эти вопросы требуют дальнейших исследований по направлениям, обозначенным в этой работе.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружена новая система регуляции экспрессии генов ответа на холодовой стресс, оперирующая с использованием Ca^{2+} .
2. Среди генов ответа на холодовой стресс, которые не контролируются гистидинкиназой Hik33, обнаружены Ca^{2+} -зависимые гены (*crhR*, *rpbA*, *rpl3*, *rpoA*), транскрипция которых, возможно, регулируется посредством Ca^{2+} -светозависимого сигналинга.
3. В ответ на холодовой и тепловой стресс у *Synechocystis* происходит внутриклеточное перераспределение ионов кальция. Этого перераспределения не наблюдаются у мутанта, дефектного по механосенсорному каналу MscL, что свидетельствует о его участии в регуляции ответов на температурные стрессы.
4. Изменения внеклеточной концентрации ионов Ca^{2+} не оказывает заметного влияния на транскрипцию генов ответа на холодовой стресс. Однако, изменения потока кальция, по крайней мере, через MscL, играют важную роль в модуляции транскрипции генов, которые экспрессируются в ответ на снижение температуры окружающей среды (*hliB*, *lilA*, *crhR*, *rpbA*, *rpoA*, *rpl3*).
5. Светозависимость транскрипции генов *crhR*, *rpbA*, *rpl3*, *rpoA* не обнаруживается в клетках дикого типа и проявляется только при нарушении кальциевого гомеостаза или при выключении гена *mscL*. Таким образом, эти гены, по-видимому, могут контролироваться двумя разными системами регуляции.
6. Механосенсорный канал MscL отвечает за переход ионов Ca^{2+} из периплазмы в цитозоль в условиях холодового стресса и может являться холодовым сенсором, который активируется при температурозависимом изменении физических свойств мембран.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В журналах, рекомендованных ВАК

1. Bachin D., Nazarenko L.V., Mironov K.S., Pisareva T., Allakhverdiev S.I., Los D.A. (2015) Mechanosensitive ion channel MscL controls ionic fluxes during cold and heat stress in *Synechocystis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **362**, fnv090.
2. Sinetova M.A., Mironov K.S., Mustardy L., Shapiguzov A., Bachin D., Allakhverdiev S.I., Los D.A. (2015) Aquaporin-deficient mutant of *Synechocystis* is sensitive to salt and high-light stress. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **152**, 377–382.

В прочих изданиях

1. Бачин Д.В. (2015) Роль кальция в регуляции экспрессии генов у цианобактерии *Synechocystis* в условиях холодогового и солевого стресса. Ломоносов-2015: XXII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных: Секция «Биология»; (13-17 апреля 2015 г.), Москва, МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет: Тезисы докладов. с. 332–333.
2. Бачин Д.В. (2015) Роль кальция в регуляции экспрессии генов у цианобактерии *Synechocystis* в условиях холодогового и солевого стресса. Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий: Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых учёных (21-26 сентября 2015 г.). Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. с. 57–57.
3. Бачин Д.В. (2015) Кальциевая регуляция ответа на холодоговой стресс у цианобактерии *Synechocystis*. Биология: от молекулы до биосферы. Материалы X Международной конференции молодых учёных (2-4 декабря 2015 г.), Украина, г. Харьков, ХНУ им. В.Н. Каразина, биологический факультет. с. 137–137.