

На правах рукописи



Федураев Павел Владимирович

**Участие пероксида водорода в передаче сигнала холодового стресса
в клетках цианобактерии *Synechocystis***

03.01.05 – Физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук и в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Миронов Кирилл Сергеевич

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор

Чупахина Галина Николаевна

Официальные оппоненты:

Минибаева Фарид Вилевна

доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, главный научный сотрудник

Бабыкин Михаил Михайлович

кандидат биологических наук, доцент, Международный учебно-научный биотехнологический центр Федерального государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», доцент

Ведущая организация: Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «21» февраля 2019 года в 13 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, Ботаническая ул., 35. Факс: (499) 678-54-20; e-mail: 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, www.ippras.ru.

Автореферат разослан «20» декабря 2018 года.

Учёный секретарь диссертационного совета:

кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Жизнь на Земле, как принято считать, зарождалась в бескислородной «восстановительной» атмосфере, которая насыщалась кислородом вместе с формированием оксигенного фотосинтеза 3,2–2,4 млрд лет назад. Переход на аэробный метаболизм открыл возможность использовать кислород в качестве мощного акцептора электронов. Проблема генерации активных форм кислорода (АФК), как промежуточных состояний в процессе восстановления кислорода, возникла тогда же. При этом единственной стабильной формой АФК является пероксид водорода. Пероксид водорода синтезируется в клетках фотоавтотрофных организмов преимущественно в ходе процессов фотосинтеза, а также, в меньшей степени, при (фото-)дыхании. Некоторые компоненты ЭТЦ, участвующие в окислительно-восстановительных реакциях, в отсутствие НАДФ⁺ способны передавать электроны на кислород, продуцируя супероксид-анион радикал. Данное соединение эффективно нейтрализуется ферментом супероксиддисмутазой, продуктом данной реакции является пероксид водорода. Таким образом, одним из источников H₂O₂ является фотосинтетическая электрон-транспортная цепь (ЭТЦ), локализованная в тилакоидных мембранах.

Степень разработанности темы исследования

Исследование цианобактерий с использованием технологии микрочипов позволило выделить ряд генов, которые индуцируются при окислительном стрессе. Так, обработка клеток *Synechocystis* sp. PCC 6803 0,25-мМ раствором H₂O₂ в течение 30 мин приводила к индукции генов окислительного стресса, среди которых обнаружилось много генов холодового стресса, экспрессия которых регулируется сенсором холодового стресса гистидиновой киназой Hik33. Данный регулятор способен воспринимать температурозависимые изменения текучести клеточных мембран, вызываемые снижением окружающей температуры. Данная киназа характеризуется также наличием PAS-домена, относящимся к функционально разнообразной группе доменов, которые могут участвовать в восприятии и передаче сигналов окислительного стресса.

Таким образом, тема работы является актуальной, а степень разработанности проблемы, связанной с исследованием механизмов восприятия и передачи сигналов абиотических стрессоров, и, в частности, холодового стресса, оставляет возможность проводить исследования в данной области.

На основании всего вышеизложенного была высказана идея о роли пероксида водорода в качестве триггера, вовлеченного в процессы передачи сигналов абиотических стрессов, в данном случае, сигнала холодового шока в клетках цианобактерий.

Цели и задачи

Цель настоящей работы — продемонстрировать участие пероксида водорода в процессах мембрано- и светозависимого формирования ответа на холодовой стресс у цианобактерий.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

- 1) сконструировать мутант *Synechocystis* sp. PCC 6803, чувствительный к действию пероксида водорода, путем последовательной инактивации генов каталазы-пероксидазы и тиоредоксинпероксидазы;
- 2) оценить вклад редокс-статуса пластохинонового пула тилакоидных мембран в формирование ответа на изменение вязкости мембран;
- 3) оценить способность клеток цианобактерий генерировать пероксид водорода в условиях холодового стресса, на свету и в темноте;
- 4) провести анализ дифференциальной экспрессии генов холодового стресса в клетках мутанта, обработанного перекисью водорода.

Научная новизна

Впервые приведено строгое доказательство вовлеченности пероксида водорода в процессы восприятия и передачи сигнала холодового стресса в клетках цианобактерий. Впервые получены индукционные кривые флюоресценции для фотосинтезирующих клеток при различных температурах. Проведен анализ дифференциальной экспрессии генов холодового ответа в условиях измененного редокс-статуса пластохинонового пула. Проведено измерение реальных концентраций пероксида водорода для цианобактериальных культур, экспонированных при низких температурах, в условиях освещенности и в темноте.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в работе данные носят фундаментальный характер. Они дополняют актуальные современные представления о механизмах акклимации к холодовому стрессу через регуляцию со стороны окислительно-восстановительного статуса клетки. Вместе с тем, результаты работы могут иметь и практическое значение. Понимание того, каким образом организмы отвечают на воздействие внешних факторов, позволит создать новые методические подходы к повышению устойчивости фотоавтотрофных организмов, имеющих биотехнологическую, фармацевтическую и пищевую ценность, к действию стрессоров.

Материалы, изложенные в диссертации, также могут быть использованы в учебной работе при подготовке лекционного материала для чтения курсов лекций по физиологии и биохимии растений в высших учебных заведениях.

Методология и методы исследования

В качестве методологической основы данной работы выступали общепринятые протоколы и методики, подчерпнутые исключительно из специализированных источников информации. Преимущественно были использованы экспериментальные методы исследования (наблюдение, сравнение, повторение экспериментов), используемые в молекулярной биологии, геной инженерии, генетике, биохимии, биофизике, а также физиологии растений. На основе эмпирических данных были получены в том числе теоретические знания, следовательно, методология работы носила индуктивный характер.

Положения, выносимые на защиту

1. Получение двойного мутанта по каталазапероксидазе и тиоредоксинпероксидазе дает возможность оценить вклад пероксида водорода в процессы передачи сигнала холодового стресса у фотосинтезирующих организмов.

2. Пероксид водорода может выступать как в качестве индуктора, так и супрессора при формировании клеточного ответа на холодовой стресс на транскрипционном уровне в цианобактериальных культурах.

3. H_2O_2 -опосредованное восприятие клеточного сигнала и его передача идет посредством гистидиновой киназы Hik33, сенсора холодового стресса у *Synechocystis*.

4. Индукция экспрессии генов холодового ответа *Synechocystis* зависит от физических свойств мембран, таких как микровязкость, и от редокс-статуса пластохинонового пула.

Степень достоверности работы и апробация результатов

При выполнении работы были использованы современные и адекватные биохимические, молекулярно-биологические и физиологические методы. Эксперименты были проведены в достаточной биологической повторности. Выводы обоснованы экспериментальными данными и отражены в печатных работах. Достоверность полученных результатов обеспечена использованием в работе комплекса методических подходов: современных высокочувствительных молекулярно-биологических, цитологических и биохимических методов исследования, тщательным учётом и подробной оценкой результатов с использованием методов статистической обработки данных.

Полученные в работе данные доложены на II Международном симпозиуме в городе Уфе «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» в 2017 г. По материалам диссертации опубликовано 4 работы, из которых 2 — в международных рецензируемых изданиях. Статьи, опубликованные по материалам диссертации, прошли независимую рецензию, предшествующую публикации.

Работа выполнялась в период с 2015 по 2018 гг. Исследования автора поддержаны грантами РФФИ № 15-34-50992 «Редокс гомеостаз и сигнализация у цианобактерий: от восприятия стресса до физиологического ответа», № 16-34-50175 «Индукция экспрессии генов холодового стресса *Synechocystis* sp. в ответ на изменение редокс статуса фотосинтетических мембран» и РНФ 14-24-00020 «Молекулярные триггеры стрессовых ответов у цианобактерий». Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора.

Диссертация построена по стандартной схеме (ГОСТ Р 7.0.11-2011) и состоит из титульного листа, оглавления, текста диссертации (введения, основной части, разделенной на главы: «обзор литературы», «материалы и методы», «результаты и их обсуждение»; и заключения), списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложений. Работа изложена на 90 страницах машинописного текста, содержит 18 рисунков и 7 таблиц. Список цитируемой литературы включает 209 наименований, из которых 208 — на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы.

Данный раздел содержит описание основных АФК, особенности окислительного стресса в клетках цианобактерий. Рассмотрены также холодовое воздействие и его связь с окислительным стрессом, а также с редокс-статусом клеток и физическими параметрами клеточных мембран *Synechocystis*.

Глава 2. Материалы и методы

Объектом исследования служила культура цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803, штамм GT (номер в коллекции микроводорослей ИФР РАН IPPAS B-1400, далее *Synechocystis*). Мутантные штаммы цианобактерии *Synechocystis*: $\Delta hik33$ (IPPAS B-1464), а также $\Delta desA/desD$ (IPPAS B-1456) — были любезно предоставлены Синетовой М.А. (рук. коллекции IPPAS). Все мутантные штаммы, использованные в настоящей работе, являются производными *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT.

Аксеничные культуры цианобактерий поддерживали на агаризованной среде BG-11. Культивирование мутантных штаммов проводили на той же среде, содержащей антибиотика, канамицин (25 мкг/мл) и спектиномицин (30 мкг/мл). Интенсивное выращивание *Synechocystis* проводили в культуральных сосудах при температуре $32 \pm 0,1$ °C, при непрерывном освещении белым светом люминесцентных ламп ($120 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) и постоянном барботировании стерильной воздушно-газовой смесью, обогащенной до 1,5% CO₂. Засев культуры с агаризованной среды в жидкую проводили в стерильных условиях. При этом начальная

оптическая плотность при длине волны 750 нм (OP_{750}), составляла 0,1–0,2. Рост цианобактерий в условиях интенсивного культивирования продолжали до $OP_{750} = 2$, (поздняя экспоненциальная фаза роста).

Данные параметры культивирования: 32 °C; 120 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ фотонов; 1,5% CO₂; $OP_{750} = 2$; — для всех экспериментов были приняты в качестве нормальных условий (НУ).

Ростовые кривые *Synechocystis*. $OP_{750} = 1$ соответствует $9 \cdot 10^7$ клеток в 1 мл. Эта закономерность позволяет проводить измерения роста по OP_{750} . Период удвоения для каждого независимого повторения на стадии экспоненциального роста рассчитывали по формуле (1):

$$T_{1/2} = \frac{t_2 - t_1}{\log_2 \left(\frac{OP_{750-2}}{OP_{750-1}} \right)} \quad (1)$$

где $T_{1/2}$ — период удвоения;

t_2 — момент времени «2»;

t_1 — момент времени «1»;

OP_{750-2} — OP_{750} в момент времени «2»;

OP_{750-1} — OP_{750} в момент времени «1».

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Реакцию амплификации фрагментов геномной ДНК *Synechocystis* проводили в ходе рутинных процедур, связанных с клонированием и сайт-направленным мутагенезом генов, а также для тестирования праймеров предшествующего проведению ПЦР в реальном времени. Реакции проводили в соответствии с протоколами фирм-изготовителей реактивов. Реакции проводили в термоциклере GeneAmp 2700 (Applied Biosystems). Стандартный протокол начинался с предварительного прогрева смеси при 95 °C в течение 5 мин, с последующими 35 циклами, включавшими последовательные этапы: денатурации при 95 °C — 30 сек; отжига праймеров при 50–65 °C — 30 сек; а также синтеза цепи при 72 °C — 0,5–4 мин. Реакция завершалась инкубацией при 72 °C в течение 10 мин с последующим хранением образцов в течение непродолжительного времени при комнатной температуре.

Выделение тотальной РНК из цианобактериальной культуры. Для выделения РНК экспериментальные образцы (50 мл интенсивной культуры цианобактерий) фиксировали равным объёмом ледяного этилового спирта с 0,5% фенола, после чего выделяли РНК фенольным методом. Содержание РНК в пробе оценивали спектрофотометрически. При необходимости РНК хранили в виде осадка под слоем 70%-спирта не более 1 мес.

1,5 мкг изолированной РНК обрабатывали ДНКазой. Отсутствие геномной ДНК в пробах контролировали с помощью ПЦР, при постановке которой вместо кДНК вносили РНК-эквивалент, без-ревертазные реакции.

Степень деградации РНК определяли с помощью гель-электрофореза. Для этого 1 мкг РНК разделяли в 1% агарозном геле на основе ТАЕ при постоянном токе напряженностью 11 В/см в течение 20 минут. Для тотальной РНК приемлемого качества было характерно наличие трех и более четких линий на дорожке геля, визуализированного бромистым этидием в свете ультрафиолетовых ламп 254 нм, соответствующих рибосомной РНК. Пробы со следами деградации рРНК не были использованы для оценки уровня экспрессии генов.

Оценка относительного содержания транскриптов в образце (ОТ-кПЦР). Для постановки реакции ОТ использовали обратную транскриптазу SuperScript III (ThermoFisher Scientific). Реакцию проводили в соответствии с протоколами фирмы-изготовителя фермента, при этом в реакционную смесь добавляли 1 мкг тотальной РНК и обратные ПЦР-праймеры. В качестве основного контроля ОТ использовали реакции без добавления ревертазы.

Образцы кДНК, полученные в ходе реакции ОТ, использовали в качестве матриц для кПЦР. Реакционная смесь имела объем 25 мкл и содержала воду, 1-кратный буфер qPCRmix-HS SYBR (Евроген, РФ), по 10 пмоль каждого, прямого и обратного, праймера; аликвоту кДНК. Реакцию проводили в термоциклере CFX 96 Touch (Bio-Rad). Протокол кПЦР включал этапы предварительного прогрева смеси, 95 °С — 5 мин; 40 циклов двухступенчатой ПЦР, содержащих фазы: денатурации при 95 °С в течение 15 сек; отжига праймеров и синтеза цепей ДНК при 63 °С — 45 сек; а также считывания интенсивностей флуоресценции лунок плашки. Сканирование кривых плавления ПЦР-продуктов при температурах 65–90 °С с инкрементом 0,5 °С и длительностью каждого шага — 5 сек.

Относительное содержание транскриптов в пробе рассчитывали с помощью CFX Manager v3.1 (Bio-Rad) методом $\Delta\Delta C_q$ (величина нормализованной экспрессии). В качестве референсных генов для нормализации использовали *rnpB*, *secA* и *petB*. Реальные эффективности реакций рассчитывали с помощью стандартных кривых для последовательных десятикратных разбавлений проб кДНК. Эти значения также были использованы при расчете.

Процедура расчета относительного содержания транскриптов в пробе требует наличия контроля среди экспериментальных образцов. Таким контролем служила проба, либо набор проб, зафиксированных при НУ. В случае мутантов контроля также анализировали, и если выяснялось, что они неотличимы от контрольного образца для клеток дикого типа (ДТ), то данные по такому образцу не представляли.

Если эксперимент требовал помещения образцов в условия, отличные от НУ, то контролем по отношению к экспериментальному образцу служила проба, зафиксированная из того же культурального сосуда непосредственно перед помещением его в условия эксперимента.

Список основных стрессирующих факторов, использованных в настоящей работе для проведения экспериментов с культурами *Synechocystis*, приведен в Таблице 1. В настоящей работе для воссоздания условий (абиотического) стресса использовали только культуры, адаптированные к росту в НУ. В некоторых случаях одну и ту же культуру подвергали действию двух и более стрессирующих факторов одновременно. Последовательного применения стрессовых факторов к одной и той же культуре клеток в настоящей работе не допускали. Культуры подвергали воздействию любого стрессора в течение строго заданного интервала времени.

Таблица 1 — Перечень стрессовых условий, использованных в экспериментах

Стрессор	Описание
Темнота	Инкубация клеток в условиях полного отсутствия освещенности.
Свет высокой интенсивности	Инкубация культуры в условиях, имитирующих высокую инсоляцию, при интенсивности — $2,5 \text{ ммоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ фотонов
Холод	Снижение температуры инкубации до $22 \text{ }^\circ\text{C}$
H_2O_2	Внесение экзогенной перекиси водорода в культуру
Ингибиторы фотосинтеза	Добавление ингибиторов фотосинтеза в культуру клеток подразумевало использование в качестве контролей культур, обработанных растворителями для ингибиторов фотосинтеза.

Измерение абсолютного содержания пероксида водорода в культуре.

100 мкл культуры цианобактерий смешивали с 1 мл реакционного раствора, приготовленного непосредственно перед экспериментом (1 мл 50 мМ HCl, 100 мкл 1 М KI, 100 мкл 1,0 мМ молибдата аммония в 0,5 М H_2SO_4 и 100 мкл 5% крахмала). Полученный 1,1 мл раствора тщательно перемешивали и центрифугировали в течение 1 мин при 16 000 g. Супернатант собирали и инкубировали при 37°C в течение 20 мин, затем измеряли оптическую плотность раствора при 570 нм. Концентрацию H_2O_2 определяли методом калибровочной кривой. Стандартную кривую H_2O_2 получали путем измерения поглощения в 2-кратных серийных разведениях 0,003% H_2O_2 (т.е. 882 мкМ, 441 мкМ, 221 мкМ, 110 мкМ и т. д.) в реакционном растворе.

Измерение пероксидазной активности культуры цианобактерий. Клетки отмывали водой: 10 мл культуры центрифугировали при 3 000 g 3 мин и ресуспендировали в 10 мл воды, снова осаждали и снова ресуспендировали. Для отмывки культуры определяли концентрацию перекиси (C_0). К суспензии клеток добавляли экзогенный пероксид водорода до конечной

концентрации 250 мкМ, после чего измеряли концентрации пероксида (C_t , мкМ) в определенные моменты времени (t), используя описанный выше способ. Данные о деградации пероксида во времени анализировали в программе SciDAVis (URL: <http://scidavis.sourceforge.net/>) при этом данные аппроксимировали функцией экспоненциального распада первого порядка (2), период полураспада пероксида водорода рассчитывали по формуле (3):

$$C_t = C_0 + 250 \cdot e^{-\lambda t}, \quad (2)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda}, \quad (3)$$

где C_t — концентрация пероксида водорода, мкМ, в момент времени t ;

C_0 — начальная концентрация H_2O_2 , мкМ;

t — время, с;

$t_{1/2}$ — период полураспада, с;

λ — константа распада, s^{-1} .

Для всех аппроксимаций значение параметра R^2 было не меньше 0,99. Измерения проводили в 3-5 независимых повторениях для каждого штамма клеток.

Построение индукционных кривых флуоресценции цианобактерий проводили с помощью многофункционального анализатора M-PEA 2 (Hansatech Instruments Ltd., Англия). Контроль температуры исследуемого образца осуществляли с помощью элемента Пельтье, способного поддерживать заданную температуру в интервале от 16 до +4 5 °С. Актинический свет диода поглощается хлорофиллом, а также фикоцианином и аллофикоцианином фикобилисом цианобактерий. Таким образом, флуоресцентный сигнал, регистрируемый M-PEA 2 можно рассматривать как сумму сигналов, поступающих от фотосистем (ФС1, ФС2) и фикобилисом. Известно, что лишь ФС2 характеризуется нелинейным изменением во времени уровня флуоресценции, опосредованном концентрацией восстановленных пластохинонов (ПХ) мембран.

Глава 3. Результаты и их обсуждение

Инактивация *katG* и *tpx* *Synechocystis*. Как показано на Рис. 1А, получение двойного мутанта происходило в два этапа. В первую очередь инактивировали ген *katG*, при этом использовали кассету устойчивости к антибиотику спектиномицину (Sp^R), которой был замещен фрагмент гена дикого типа (по сайтам рестрикции *NcoI*). Нуклеотидную последовательность *katG* амплифицировали в ПЦР с использованием геномной ДНК в качестве матрицы, а также праймеров *katG-F* и *katG-R*. Полученный ПЦР-фрагмент клонировали в вектор pTZ57R/T. И векторную, и спектиномициновую кассету устойчивости (Sp^R) обрабатывали *NcoI*, а затем лигировали таким образом, чтобы Sp^R была вставлена в центральную область кодирующей последовательности *katG*. Полученную конструкцию использовали для трансформации *Synechocystis*, что позволило рекомбинировать и вставить мутированный ген в геном. Успешные трансформанты отбирали с использованием твердых питательных сред, содержащих антибиотик спектиномицин. Полученный штамм тестировали на предмет наличия мутации в целевом гене посредством ПЦР с праймерами *katG-F* и *katG-R*. Величина продукта ПЦР для гена дикого типа составляла 1,9 т.п.н., для мутантного — 3,2 т.п.н.

Аналогичным образом инактивировали *tpx*. Нуклеотидную последовательность гена *tpx* амплифицировали с помощью праймеров *tpx-F* и *tpx-R*, после чего клонировали в векторе pTZ57R. В кодирующую последовательность *tpx* была вставлена канамициновая кассета устойчивости (Km^R). Плазмиду, содержащую ген *Δtpx*, разрушенный Km^R , использовали для трансформации мутантных клеток *Synechocystis ΔkatG*. Полученный двойной мутант *ΔkatG/tpx* мог расти в присутствии двух антибиотиков, канамицина и спектиномицина. Полной замены исходных генов в хромосомах *Synechocystis* мутированными генами достигали через серию пассажей культур с увеличением концентрации антибиотиков (Рис. 1Б).

Результаты ПЦР-анализа (Рис. 1В) свидетельствуют о том, что гены дикого типа были полностью замещены мутантными в ходе сегрегации. К доказательствам мутантности полученного штамма также следует отнести способность его клеток расти на среде, содержащей антибиотики спектиномицин и канамицин, а также приобретенную в ходе мутагенеза чувствительность данного штамма к перекиси водорода (см. далее).

Возможность полного разрушения генов *katG* и *tpx* говорит о том, что в НУ роста клетки *Synechocystis* могут обходиться без соответствующих ферментов, участвующих в нейтрализации пероксида водорода.

Полученный двойной мутант задепонирован в Коллекции микроводорослей ИФР РАН под номером IPPAS B-1455.

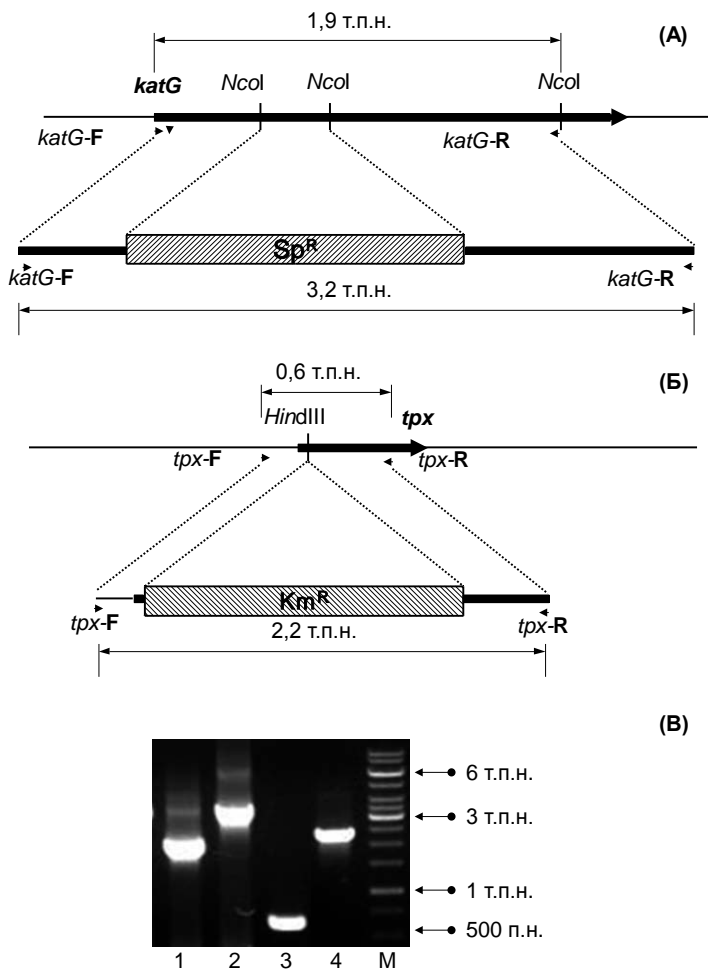


Рисунок 1 — Конструирование двойного мутанта *Synechocystis*, дефектного по генам *katG* и *tpx* ($\Delta katG/tpx$):

(А) ген *katG* инактивировали путем замены фрагмента его кодирующей последовательности на кассету резистентности к спектиномицину (Sp^R); *katG-F*, *katG-R* — прямой и обратный праймеры для амплификации фрагмента гена *katG*;

(Б) ген *tpx* инактивировали путем замены фрагмента его кодирующей последовательности на кассету резистентности к канамицину (Km^R); *tpx-F*, *tpx-R* — прямой и обратный праймеры для амплификации фрагмента гена *tpx*;

(В) с помощью ПЦР проверяли отсутствие в образцах ДНК, выделенных из клеток мутанта, фрагментов генов дикого типа; смеси для ПЦР содержали пары праймеров: *katG-F* и *katG-R*, — 1,2; *tpx-F* и *tpx-R*, — 3, 4; в качестве матриц для ПЦР использовали ДНК: дикого типа (1, 3), двойного мутанта (2, 4); «М» — ДНК-маркер

Действие перекиси водорода на мутант $\Delta katG/tpx$. В качестве контролей роста использовали клетки ДТ, а также мутант $\Delta hik33$. OP_{750} оценивали каждые 8 ч в течение 32 ч. На этом временном интервале все культуры характеризовались экспоненциальным ростом, при этом удвоение OP_{750} происходило каждые 9 ± 1 ч для ДТ, 11 ± 1 ч для $\Delta hik33$ и 10 ± 1 ч для $\Delta katG/tpx$, (см. Рис. 2).

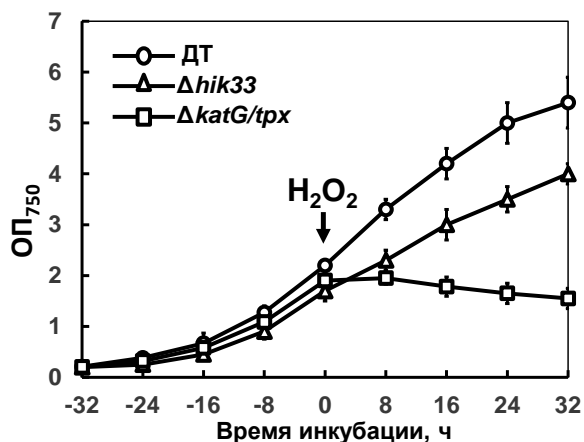


Рисунок 2 — Влияние H_2O_2 на рост $\Delta katG/tpx$: клетки росли при НУ 32 ч, после чего в каждую культуру был внесен пероксид водорода до конечной концентрации 0,25 мМ в момент времени «0»; OP_{750} оценивали каждые 8 ч

По истечении 32 ч экспоненциального роста, когда $OP_{750} \sim 2$, в каждую культуру был внесен пероксид водорода до конечной концентрации 0,25 мМ. На Рис. 2 этому событию соответствует точка «0» на временной шкале. После добавления пероксида водорода клетки

теряли способность к делению, что становилось заметно через 8 ч после внесения H_2O_2 . В то же время клетки ДТ и $\Delta hik33$ продолжали расти, а внесение пероксида водорода никак не отразилось на их скоростях роста.

Таким образом, пероксид водорода негативно влияет на рост двойного мутанта $\Delta katG/tpx$, из чего можно сделать вывод, что клетки данного мутанта чувствительны к действию пероксида водорода.

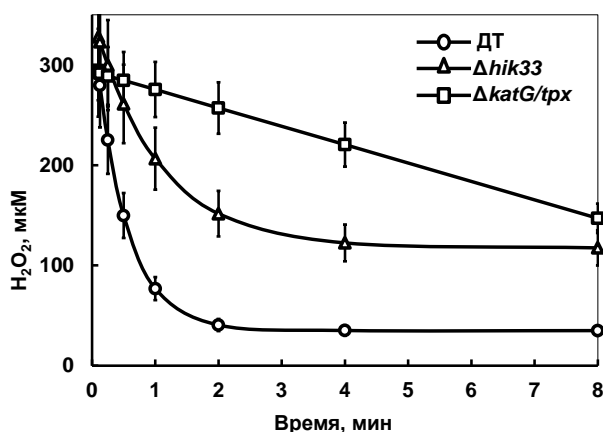
Скорость нейтрализации экзогенного пероксида водорода клетками цианобактерий тестировали с помощью калибровочной кривой. Данный метод, хоть и не является превитальным, но позволяет измерить содержание пероксида водорода в среде для культивирования, отделенной от клеток, либо непосредственно в культуре; измерение длится 20 мин, при этом большая часть пероксида водорода вступает в реакцию уже в первые секунды, следовательно, можно говорить о том, что результаты отражают реальные концентрации в культуре; метод позволяет оперировать абсолютными концентрациями пероксида водорода.

При использовании метода мы опирались на важное допущение, согласно которому пероксид водорода, перемещаясь посредством диффузии сквозь мембраны либо через аквапорины, способен достигать равновесных наружной и внутренней концентраций менее чем за секунду — например, значение 0,9 сек было определено для Т-лимфоцитов. Это допущение позволяет считать, что любые временные интервалы, на которых измерялись концентрации в культурах в настоящей работе, значительно превышают времена, на которых устанавливается равновесие между наружным и внутриклеточным содержанием пероксида водорода.

Важно отметить, что среда BG-11 характеризуется ненулевым содержанием пероксида водорода, $20,3 \pm 0,5$ мкМ. Кроме того, культура клеток также производит и расщепляет пероксид водорода в ходе жизнедеятельности. Для того чтобы исключить влияние пероксида, аккумулируемого культурой естественным образом, клетки промывали водой, после чего измеряли стационарную концентрацию H_2O_2 (C_0). В Таблице 2 представлены величины C_0 , и периоды полужизни пероксида ($t_{1/2}$) в цианобактериальных культурах. Данные параметры

были получены путем анализа кривых, приведенных на Рис. 3.

Рисунок 3 — Деградация H_2O_2 клетками цианобактерий: клетки отмывали водой, после чего вносили 250 мкМ пероксида водорода (точка «0» на оси абсцисс); измерения проводили во временные точки, равные 1/8, 1/4, 1/2, 1, 2, 4, 8 мин



Клетки $\Delta katG/tpx$ характеризовались наибольшим периодом полужизни пероксида водорода, 8 мин; для ДТ $t_{1/2} = 21$ сек, для $\Delta hik33$ $t_{1/2} = 44$ сек. Интересно отметить, что цианобактерии, несмотря на неоднократное промывание водой, поддерживают ненулевые стационарные уровни H_2O_2 . При этом максимальное значение наблюдали для $\Delta hik33$. Стационарная концентрация представляет собой количество пероксида водорода, накопленное в клетках при обычной генерации и разрушении данного вида АФК. При этом интенсивность деградации для $\Delta hik33$ превышала этот параметр для ДТ, но не для $\Delta katG/tpx$. Следовательно, $\Delta hik33$ характеризуется большой величиной продукции пероксида водорода по сравнению с остальными штаммами. Данный феномен однозначно связан с инактивацией гистидиновой киназы Hik33, под контролем которой находится основной пул генов, участвующих в формировании различных стрессовых ответов

Таблица 2 — Деградация пероксида водорода цианобактериальными штаммами

Параметр	ДТ	$\Delta hik33$	$\Delta katG/tpx$
C_0 (мкМ)	35 ± 5	115 ± 11	44 ± 4
$t_{1/2}$	21 ± 2 с	44 ± 3 с	8 ± 1 мин

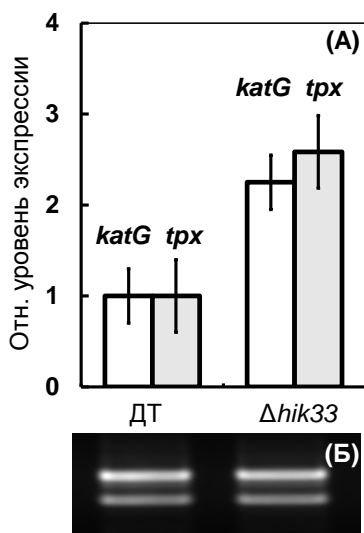


Рисунок 4 — Относительное содержание мРНК *katG* и *tpx* у $\Delta hik33$:

(А) ОТ-кПЦР анализ относительного содержания мРНК *katG* и *tpx* в клетках ДТ и $\Delta hik33$;

(Б) Электрофореграмма тотальной РНК, использованной для анализа

Поскольку Hik33 регулирует экспрессию генов на уровне транскрипции, мы предположили, что в клетках $\Delta hik33$ может быть снижено относительное содержание транскриптов генов *katG* и *tpx*. С помощью ОТ-кПЦР удалось показать, что количество мРНК данных генов значительно превышает таковое для клеток ДТ (см. Рис. 4). И даже несмотря на повышенный уровень экспрессии данных генов, в культуре поддерживается высокий уровень накопления пероксида водорода. Таким образом, причины «сверхпродукции» пероксида водорода у мутанта $\Delta hik33$ пока остаются неизвестными.

Таким образом, клетки двойного мутанта чувствительны к действию пероксида водорода вследствие неспособности к своевременной ее инактивации.

Содержание H_2O_2 в культурах *Synechocystis* при холодовом стрессе зависит от освещенности. Культуры цианобактерий, росшие при НУ, инкубировали при пониженной температуре, равной 22 °С, при нормальном освещении и в темноте. Содержание пероксида водорода определяли по истечении 2-й, 4-й, 8-й, 16-й и 32-й мин, а также до начала эксперимента, «0» мин (см. Рис. 5). В ходе эксперимента нам удалось обнаружить, что для всех исследованных штаммов концентрация пероксида водорода значительно возрастала в том случае, когда культуру подвергали действию пониженных температур на свету, но не в темноте. В последнем случае содержание H_2O_2 оставалось неизменным.

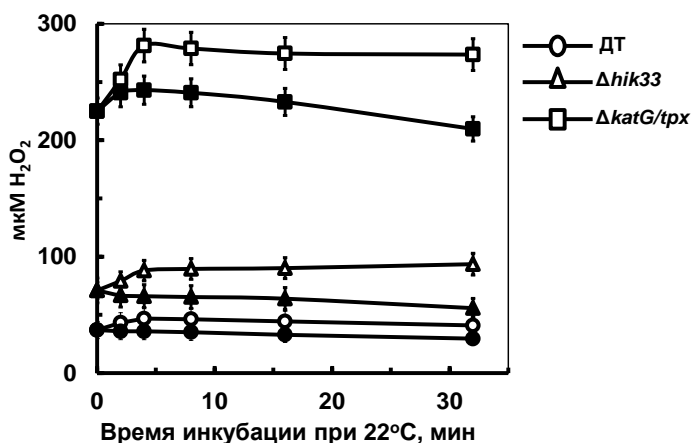


Рисунок 5 — Измерение H_2O_2 в культурах при холодовом стрессе на свету и в темноте: цианобактерии выращивали при НУ, а затем температуру снижали до 22 °С и инкубировали культуры при нормальном освещении (не закрашенные точки), либо в темноте (закрашенные); измерения содержания пероксида водорода проводили во временные точки «0», «2», «4», «8», «16» и «32» мин

Экспрессия генов холодового стресса регулируется H_2O_2 . В случае прокариотических организмов, к которым относится *Synechocystis*, с уверенностью можно говорить, что увеличение числа транскриптов гена в подавляющем большинстве случаев приводит к увеличению содержания белка, кодируемого данным геном. Это, в свою очередь, приводит к накоплению продуктов функционирования данного белка, если речь идет о ферменте. Также данный процесс может сопровождать и усиление процессов деградации соответствующих мРНК, либо белка. Таким образом, в данной работе увеличение, либо уменьшение относительного числа транскриптов в пробе мы будем строго ассоциировать с индукцией, либо репрессией конкретного гена, соответственно.

Клетки цианобактерий подвергали холодовому, окислительному, а также одновременно двум стрессам (Рис. 6) в течение 30 мин, после чего клетки фиксировали и использовали для выделения тотальной РНК. Относительное содержание мРНК генов *desB*, *ndhD2*, *hliB* и *pgr5*, а также АФК-индуцируемого *sodB* и Hik33-независимого гена холодового ответа *rbpA* определяли методом ОТ-кПЦР.

Транскрипция гена *desB*, кодирующего ω -3 десатуразу жирных кислот у цианобактерий, усиливалась при действии холодового стресса как у ДТ, так и у двойного мутанта, но не у

Δhik33. Одновременное действие H₂O₂ и холода подавляло индукцию *desB*, при этом сильнее этот эффект был для клеток двойного мутанта.

Ген *ndhD2* демонстрировал схожий с *desB* профиль экспрессии. Однако в клетках двойного мутанта была отмечена небольшая индукция при комбинированном действии двух стрессовых факторов.

Транскрипция *hliB* значительно усиливалась при одновременном действии двух факторов, пероксида водорода и холода. В клетках ДТ холодовой стресс вызывал увеличение экспрессии гена *hliB* (пор. 10%), тогда как комбинированная обработка холодом и H₂O₂ приводила к еще более значительной индукции (до 40%). Для клеток *ΔkatG/tpx* относительный уровень экспрессии данного гена достигал 40%, а холодовая обработка приводила всего лишь к 10%, подобно клеткам ДТ. При комбинированном же стрессе наблюдали максимальное для данного гена значение величины экспрессии, близкое к 100%.

Профиль экспрессии гена *pgr5* в значительной степени соответствовал таковому для *hliB*.

Мы подтвердили, что индукция гена *rbpA* низкими температурами является независимой от *Hik33*, поскольку все три штамма демонстрируют индукцию этого гена при 22 °С. Однако, в клетках *ΔkatG/tpx* индукция *rbpA* была наибольшей.

Ген *sodB*, кодирующий супероксиддисмутазу, сильно индуцировался в клетках дикого типа только при совместном действии холода и H₂O₂. Двойной мутант *ΔkatG/tpx* характеризовался повышенным уровнем транскрипции *sodB* при действии H₂O₂ при нормальной температуре. Данный ген находится под контролем *Hik33*.

Таким образом, все гены, находящиеся под контролем гистидин-киназы *Hik33*, демонстрировали пероксид-зависимый характер экспрессии.

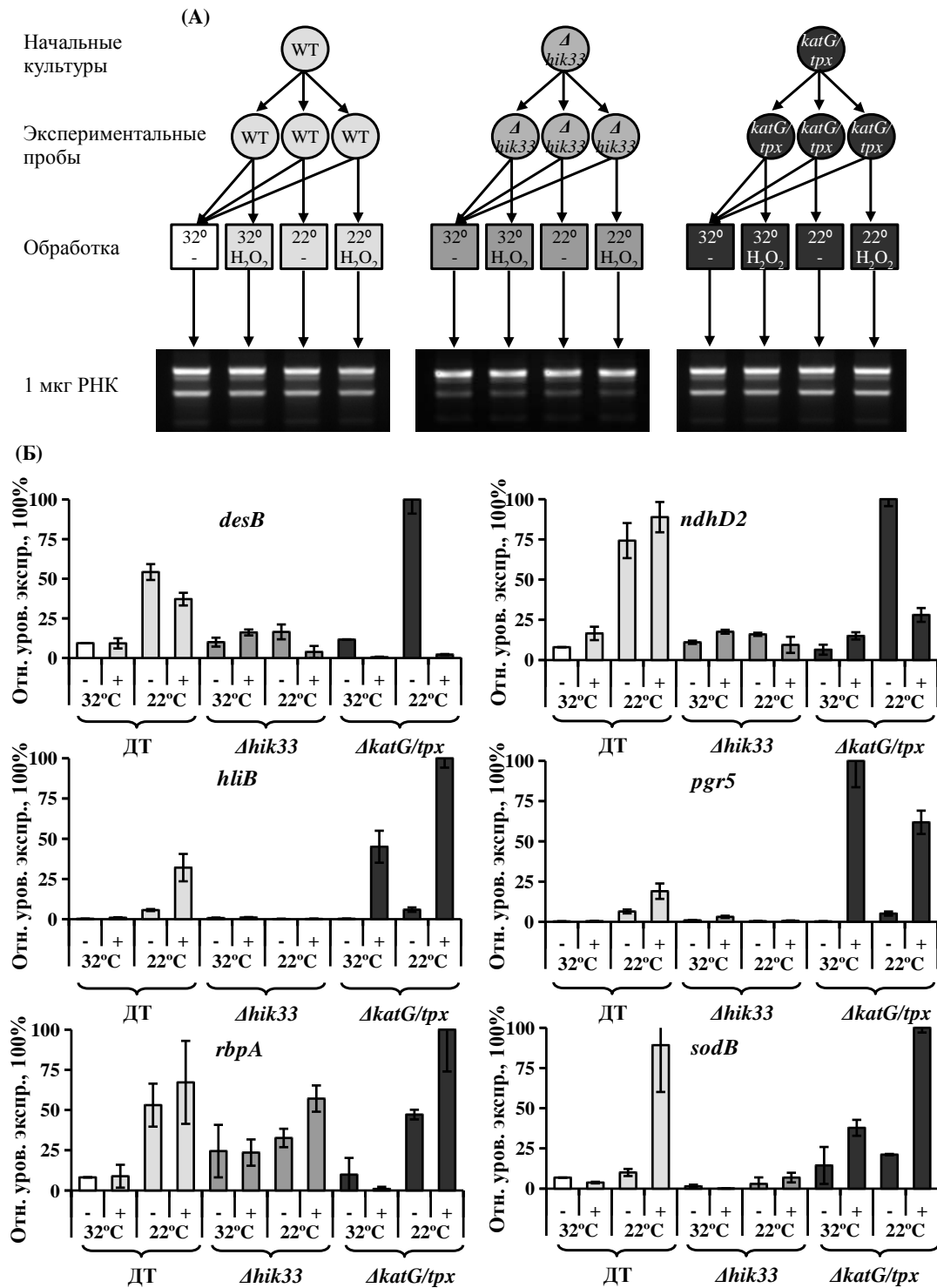


Рисунок 6 — Анализ дифференциальной экспрессии генов:

(А) схема эксперимента, начальная культура росла при НУ, после чего ее разбавляли свежей средой и рассаживали на три культуральных сосуда; перед началом эксперимента из каждого сосуда отбирали пробы-контроли, которые затем смешивали в равных частях; все три сосуда подвергали действию стрессоров: пероксида водорода, холода и совместному действию этих двух факторов — в течение 30 мин, после чего пробы фиксировали и выделяли из них РНК;

(Б) результаты анализа экспрессии по отдельным генам; за 100% принят максимальный уровень экспрессии каждого для гена, наблюдавшийся в ходе каждого отдельного эксперимента

Если принять во внимание тот факт, что в клетках ДТ избыток внесенного пероксида водорода полностью расщепляется в течение первых двух минут стресса, а собственный пероксид водорода, накапливаемый в ходе инкубации при пониженной температуре, характеризует повышение концентрации не более 20%, то становится очевидным тот факт, что участие пероксида сложно продемонстрировать, используя лишь ДТ и мутант *Δhik33*. Двойной мутант не способен инактивировать пероксид водорода с той же эффективностью, что ДТ, следовательно, к достаточно высокому уровню эндогенного пероксида *ΔkatG/tpx* добавляется еще и внесенный в среду искусственно, что обеспечивает длительное воздействие H_2O_2 на клетки. Именно это позволило рассматривать различия в экспрессии генов холодового ответа у ДТ и двойного мутанта в качестве подтверждения гипотезы об участии пероксида водорода в процессы восприятия или передачи сигнала холодового стресса у *Synechocystis*.

Редокс-регуляция экспрессии генов холодового ответа зависит от вязкости клеточных мембран. Поскольку в данном эксперименте стояла задача тестирования влияния редокс-статуса фотосинтетических мембран, то представлялось невозможным проводить эксперименты при пониженных температурах, т.к. процессы фотосинтеза, приводящие к изменению редокс-статуса клеток, сильно зависят от температуры. Поэтому изменения редокс-статуса будут зависеть не только от состояния клеточных мембран, но и от не связанных с мембранами процессами миграции энергии, зависящими от температуры. Именно поэтому было решено отказаться от изменения термических параметров системы в пользу использования двойного мутанта *ΔdesA/desD*, физические свойства мембран которого характеризуются повышенной вязкостью по сравнению с мембранами ДТ во всем температурном диапазоне. Клетки двойного мутанта по генам десатураз *ΔdesA/desD* характеризуются отсутствием полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Поскольку у *Synechocystis* адаптация к пониженным температурам происходит за счет изменения ЖК-состава клеточных мембран, то данный двойной мутант не способен адаптироваться к пониженным температурам, накапливая ПНЖК. Эти свойства данного мутанта схематично представлены на Рис. 7.

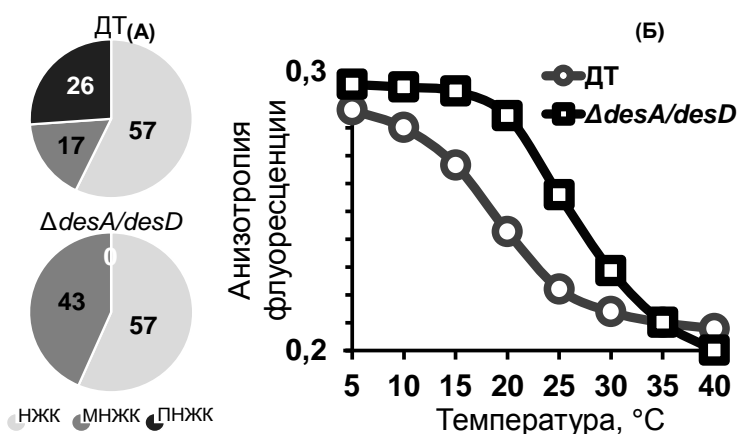


Рисунок 7 — Свойства мембран мутанта *ΔdesA/desD*:

(А) накопление лишь МНЖК в липидах мембран; цифрами указано содержание ЖК, мол. %

(Б) Анизотропия флуоресценции дифенилгексатриена в препарате тотальных мембран *ΔdesA/desD* при различных температурах

Клеточные мембраны мутанта также характеризуются повышенной вязкостью по сравнению с клетками ДТ (см. Рис. 7Б). Таким образом, данный мутант представляет удобную модель для исследования формирования редокс-зависимого ответа генов холодового стресса, которые экспрессируются под контролем гистидин-киназы Hik33.

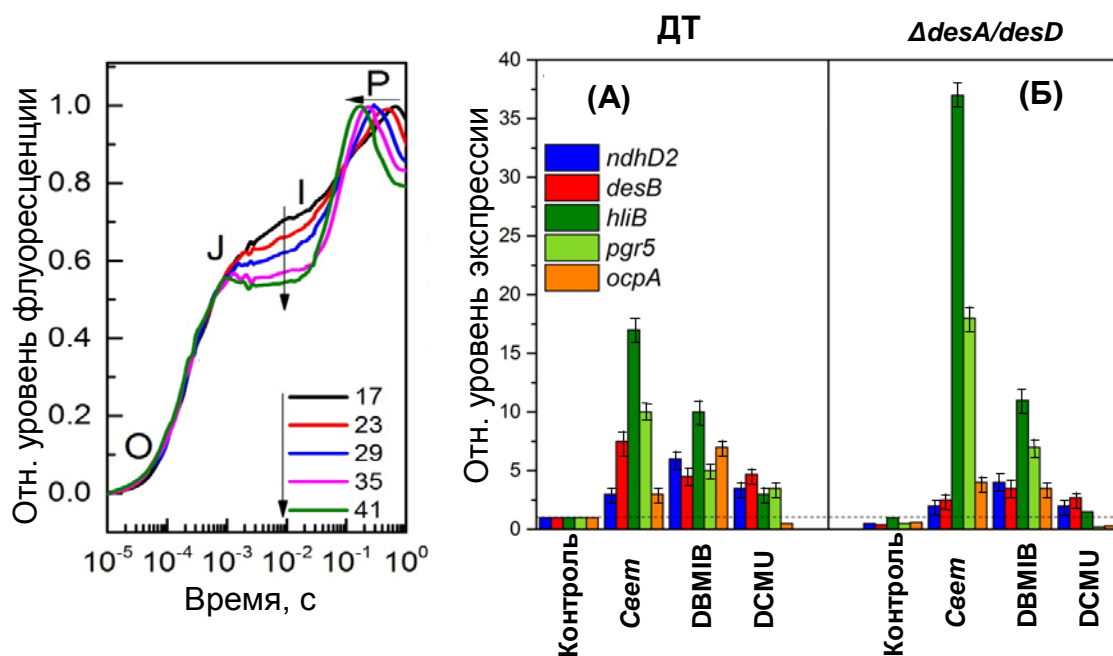


Рисунок 8 — Влияние вязкости клеточных мембран на редокс-зависимую экспрессию генов холодового ответа: (А) Характерные температурозависимые изменения индукционных кривых флуоресценции для ДТ *Synechocystis*: символами «О», «J», «I» и «P» обозначены разные стадии первичных процессов фотосинтеза, связанных с индукцией ФС2 светом; измерения проводили при указанных цифрами температурах; (Б) Экспрессия генов холодового ответа регулируется редокс-статусом клеток у *Synechocystis*: клетки, росшие при НУ, подвергали 30-мин воздействию света высокой интенсивности, 2500 мкЕ·м⁻²·с⁻¹, «Свет»; обрабатывали ингибиторами фотосинтеза: 10 мкМ DBMIB, либо 10 мкМ DCMU; относительное количество транскриптов в контроле ДТ принято за единицу

Клетки ДТ выращивали при НУ, затем инкубировали в темноте при различных температурах (17, 23, 29, 35 и 41 °С) в течение 5 мин, после чего использовали для построения индукционных кривых флуоресценции. Участок «О–J» на кривой Каутского соответствует восстановлению первичного хинонового акцептора электронов ФС2, Q_A; «J–I» — соответствует этапу, на котором происходит восстановление пула ПХ тилакоидных мембран; фаза «I–P» обусловлена несколькими механизмами, имеющими место в мембранах; пик «P» соответствует насыщению и блокированию потока электронов на акцепторной стороне ФС1 [1].

На Рис. 8А хорошо заметны температурозависимые изменения на участке «J–I» и смещение пика «P» индукционной кривой. Чем выше температура, тем ниже вязкость

тилакоидных мембран и тем сильнее происходят процессы диффузии и обмена ПХ, которые, восстанавливаясь, разгружают ЭТЦ. Также при высокой температуре за более короткое время достигается максимальный уровень флуоресценции «Р», поскольку в этом случае пулу ПХ требуется меньшее время для восстановления.

Для изменения редокс-статуса пула ПХ клетки освещали светом высокой интенсивности, либо применяли ингибиторы фотосинтеза. Для анализа были выбраны гены *desB*, *hliB*, *ndhD2*, *pgr5* и, кроме того, *ospA*, кодирующий оранжевый каротиноид-связывающий белок, фотопротектор цианобактерий (см. Рис. 8Б).

Для оценки экспрессии генов в условиях повышенной жесткости клеточных мембран был использован мутант по десатуразам А и D, который отличает наличие лишь мононенасыщенных жирных кислот в составе липидов мембран, что в свою очередь значительно повышает их вязкость. Клетки мутанта и ДТ, выращенные при 32 °С, обрабатывали ингибиторами фотосинтеза: 10-мкМ диуроном (DCMU) и 10-мкМ дибромтимохиноном (DBMIB), — и наблюдали за экспрессией генов холодового ответа (Рис. 7Б, 7В). Известно, что DCMU блокирует перенос электронов с Q_A на Q_B ФСII, что приводит к окислению ПХ ЭТЦ, в то время как DBMIB взаимодействует с Q_0 -сайтом комплекса цитохрома b_6f , что приводит к восстановлению пула ПХ.

Представленные данные говорят о том, что в клетках *Synechocystis* экспрессия генов холодового ответа связана с редокс-статусом фотосинтетических мембран и одновременно зависит от вязкости клеточных мембран. Экспрессия *hliB* и *pgr5* усиливалась на свету и при действии DBMIB. При этом эффект усиливался в клетках $\Delta desA/desD$. Индукция же генов *desB*, *ospA* и *ndhD2*, наоборот, снижена в клетках мутанта. Таким образом, уровень восстановления ПХ также влияет на транскрипцию генов холодового ответа, экспрессия которых регулируется светозависимо. Мы считаем, что в данном случае светозависимость регуляции экспрессии должна быть связана с редокс-состоянием фотосинтетических мембран. А поскольку перевосстановленность ПХ связывают с генерацией АФК, в частности, пероксида водорода, то последний может случить триггером при формировании стрессового ответа на действие пониженных температур, который и обеспечивает наблюдаемую светозависимость в функционировании *Nik33*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании было показано, что сконструированный двойной мутант *ΔkatG/tpx* в стандартных условиях рос примерно с тем же периодом удвоения, что и клетки ДТ *Synechocystis*, поддерживая гипотезу о том, что инактивация данных генов не является для клеток существенной в нестрессовых условиях. Важность обоих генов стала очевидной при добавлении в культуры экзогенного пероксида водорода, что привело к гибели клеток двойного мутанта. Таким образом, нами было подтверждено, что и KatG, и Tpx практически участвуют в детоксикации пероксида водорода в активно растущей культуре. Неспособность мутанта *ΔkatG/tpx* столь же эффективно, как и ДТ, детоксифицировать H_2O_2 , делает его отличной моделью для изучения эффектов экзогенной перекиси водорода на экспрессию генов, особенно при действии холодового стресса.

Было проведено сравнение уровней накопления пероксида водорода культурами при НУ и обнаружено, что двойной мутант накапливает такие количества H_2O_2 , которые превышают концентрацию пероксида в культуре ДТ на порядок. Также было показано, что в активно фотосинтезирующей культуре цианобактерий, экспонированной при пониженной температуре, заметно увеличивается содержание H_2O_2 . Очевидно, что это и является сигналом для клеток, которые адаптируются к действию пониженных температур светозависимо.

Полученные данные показывают, что эндогенный пероксид водорода является фактором, регулирующим ответ на холодовой стресс. Из-за быстрой детоксикации перекиси в НУ, эффект H_2O_2 на экспрессию генов в клетках ДТ заметен гораздо слабее, чем в клетках двойного мутанта, у которого отсутствуют основные пероксидазные ферменты. Мы показали, что клеткам мутанта *ΔkatG/tpx* требуется гораздо больше времени, чем ДТ, для инактивации пероксида водорода, что дает возможность наблюдать эффекты влияния повышенной концентрации пероксида водорода на экспрессию генов.

Добавление пероксида водорода в культуру клеток приводило к изменениям в профилях экспрессии генов холодового ответа по сравнению с контролем. Следует оговориться, что H_2O_2 -зависимые изменения экспрессии заметны также и в клетках ДТ, но, учитывая тот факт, что при совместном действии двух стрессоров определить точную причину изменения уровня экспрессии (например, холод, пероксид водорода или изменение фотосинтетических параметров при экспонировании клеток в стрессовых условиях) затруднительно, именно различия между ДТ и двойным мутантом показательны с точки зрения оценки вклада пероксида водорода в процессы передачи и восприятия сигнала холодового стресса у *Synechocystis*. Таким образом, настоящая работа содержит подтверждение гипотезы о регуляции экспрессии генов холодового ответа АФК.

В настоящий момент уже известно, что пластохиноны способны к конверсии синглетного кислорода в пероксид водорода. Таким образом, существует связь между процессами энергетического обмена, пластического обмена, локализованными в ЭТЦ, окружающей температурой, а также количеством генерируемых АФК в фотоавтотрофных клетках. Температурно-зависимые изменения скорости восстановления (окисления) пластохинонов (-олов) из-за изменения состава жирных кислот и текучести мембран регулируют экспрессию стресс-зависимых генов. Такая регуляция имеет важное значение для акклиматизации фототрофных организмов.

ВЫВОДЫ

1. Двойной мутант по генам каталазы-пероксидазы и тиоредоксинпероксидазы, *ΔkatG/tpx*, — адекватная модель для изучения H_2O_2 -связанных процессов регуляции генной экспрессии в фотоавтотрофных условиях.
2. Для клеток двойного мутанта по генам каталазы-пероксидазы и тиоредоксинпероксидазы, *ΔkatG/tpx*, характерно повышенное содержание H_2O_2 , что не вызывает изменений параметров роста клеток при нормальных условиях.
3. В культуре цианобактерий образование пероксида водорода усиливается при понижении температуры окружающей среды. Данный эффект носит строго светозависимый характер.
4. Экспрессия генов холодового ответа, регулируемых гистидин-киназой Nik33, зависит одновременно от редокс-статуса пластохинонового пула, а также от концентрации пероксида водорода.
5. Полученные данные указывают на то, что гистидиновая киназа Nik33 является интегральным универсальным стрессовым триггером, отвечающим за восприятие и передачу холодового, светового, редокс и АФК сигналов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных международных рецензируемых журналах

Maksimov E.G., Mironov K.S., Trofimova M.S., Nechaeva N.L., Todorenko D.A., Klementiev K.E., Tsoraev G.V., Tyutyayev E.V., Zorina A.A., Feduraev P.V., Allakhverdiev S.I., Paschenko V.Z., Los D.A. (2017) Membrane fluidity controls redox-regulated cold stress responses in cyanobacteria. *Photosynthesis research*, **133**, 215-223.

Fedurayev P.V., Mironov K.S., Gabrielyan D.A., Bedbenov V.S., Zorina A.A., Shumskaya M., Los D.A. (2018) Hydrogen peroxide participates in perception and transduction of cold stress signal in *Synechocystis*. *Plant and Cell Physiology*, **59**, 1255-1264.

Публикации в сборниках конференций

Федураев П.В., Максимов Е.Г., Миронов К.С., Синетова М.А., Зорина А.А., Лось Д.А. Текучесть мембран и редокс-контроль стрессовых ответов у цианобактерий // Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений: тезисы докл. II международного симпозиума (Уфа, 26 июня – 1 июля 2017 г.). – Уфа, 2017. — С.251—254.

Миронов К.С., Федураев П.В., Зорина А.А., Лось Д.А. Редокс-регуляция генов стрессовых ответов у цианобактерий // Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений: тезисы докл. II международного симпозиума (Уфа, 26 июня – 1 июля 2017 г.). – Уфа, 2017. — С.359—363.

Атореферат напечатан
20 декабря 2018 года