

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Биологический факультет

Кафедра микробиологии

Гринько Александра Николаевна

**Регуляция синтеза усеченных гемоглобинов *Chlamydomonas reinhardtii*
в условиях голодания по фосфору**

Выпускная квалификационная работа бакалавра

по направлению подготовки «Биология»

основная образовательная программа бакалавриата «Биология»

Работа выполнена в лаборатории

Адаптации микроорганизмов

Кафедры микробиологии

(зав. лаб. - д.б.н., профессор Ермилова Е.В.)

(зав. кафедрой - д.б.н., профессор Пиневиц А.В.)

Научный руководитель:

д.б.н., профессор Ермилова Елена Викторовна

Санкт-Петербург

Оглавление

Список сокращений	3
Введение	4
Глава 1. Обзор литературы	6
1.1. Адаптация <i>Chlamydomonas</i> к голоданию по фосфору: основные компоненты	6
1.1.1. Глобальный регулятор PSR1	6
1.1.2. PSR1-зависимая экспрессия генов в условиях голодания	8
1.1.3. Связь дефицита фосфора и фотосинтеза	10
1.1.4. Модель регуляции ответов при недостатке фосфора	11
1.2. Усеченные гемоглобины <i>C. reinhardtii</i>	13
Глава 2. Материалы и методы	16
2.1. Используемые штаммы и условия их культивирования	16
2.2. Анализ экспрессии генов	17
2.2.1. Выделение РНК	17
2.2.2. Синтез кДНК	18
2.2.3. ПЦР в режиме реального времени	19
2.3. Анализ генерации NO	21
2.3.1. Количественное измерение уровней NO	21
2.3.2. Измерение концентрации хлорофилла	22
2.3.3. Выделение белков и измерение их концентрации	22
Глава 3. Результаты	24
3.1. Транскрипция <i>THB</i> -генов в условиях голодания по фосфору	24
3.2. Экспрессия <i>THB1</i> и <i>THB2</i> в штаммах, мутантных по транскрипционному регулятору PSR1	25
3.3. Роль окиси азота (NO) в контроле экспрессии <i>THB1</i> и <i>THB2</i> в условиях дефицита фосфора	27
3.4. Генерация NO в клетках в условиях дефицита фосфора	29
Глава 4. Обсуждение результатов	31
Заключение	32
Выводы	33
Благодарности	34
Список литературы	35

Список сокращений

DEA NONOate – диэтиламин ноноат

DEPC – диэтилпиروкарбонат

DMSO – диметилсульфоксид

miRNA – микроРНК

NO – монооксид азота

NR – нитратредуктаза

-P – без фосфора

P – фосфор

Pi – неорганический фосфат

PNPase – полинуклеотидфосфорилаза

PS I – фотосистема первая

PS II – фотосистема вторая

S – сера

SDS – додецилсульфат натрия

TE – трис и ЭДТА

ТНВ – усечённый гемоглобин

БСА - бычий сывороточный альбумин

ДТТ – дитиотреитол

кДНК – комплементарная ДНК

мРНК – матричная РНК

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

В мировой литературе последних лет особенно интенсивно обсуждается проблема, связанная с исследованием молекулярных механизмов, определяющих у разных по уровню организации микроорганизмов восприятие и реализацию клеткой специфических ответов на действующие сигналы, включая такие, как изменения физико-химических параметров окружающей среды. В отличие от прокариот и некоторых гетеротрофных эукариотических микроорганизмов, молекулярные компоненты путей адаптации которых изучаются на протяжении длительного времени и поняты во многих деталях (Лось, 2010; Storz, Spiro, 2011; Horikoshi, 2010; Hohmann, 2002; Kühn, Klipp, 2012), анализ механизмов регуляции стрессовых ответов фотосинтезирующих эукариотических микроорганизмов начат сравнительно недавно, и молекулярные механизмы описаны главным образом у модельного представителя - *Chlamydomonas reinhardtii*.

Одним из компонентов систем адаптации *C. reinhardtii* по последним данным являются усеченные гемоглобины, ТНВ. 12 генов, кодирующих представителей семейства были выявлены в геноме *C. reinhardtii* (Hemschemeier et al., 2013; Huwald et al., 2015). Было установлено, что ТНВ8 вовлечен в ответы микроорганизма на гипоксию (Hemschemeier et al., 2013), а ТНВ1 связан с контролем метаболизма азота (Johnson et al., 2014; Sanz-Luque et al., 2015). Кроме того, ТНВ1 способен взаимодействовать с нитратредуктазой для детоксикации окиси азота и перевода ее в нитрат (Sanz-Luque et al., 2015; Chamizo-Ampudia et al., 2017). Показано, что три *ТНВ*, *ТНВ1*, *ТНВ2* и *ТНВ12*, экспрессируются в условиях голодания по сере (Minaeva et al., 2017). Однако пока неясно, насколько функции ТНВ могут быть специфичными или глобальными (общими) в разных стрессовых условиях, прежде всего в условиях дефицита такого важного макроэлемента, как фосфор.

Поскольку предварительные данные свидетельствовали об увеличении транскрипции ТНВ1, **цель работы** состояла в выявлении усеченных гемоглобинов *Chlamydomonas reinhardtii*, индуцируемых в условиях голодания по фосфору и установлении ключевых сигнальных молекул и потенциальных регуляторов, контролирующих транскрипцию выбранных для анализа ТНВ в среде без фосфора.

Были сформулированы следующие **задачи работы**:

1. На основе сравнительного анализа экспрессии двенадцати генов, кодирующих усеченные гемоглобины выявить ТНВ-ген(ы), индуцируемые в условиях голодания по фосфору и выбрать ген(ы) для последующего анализа механизмов их регуляции.

2. Установить, вовлечен ли глобальный регулятор адаптивного ответа *C. reinhardtii* к условиям дефицита фосфора PSR1 в транскрипционный контроль индуцируемых в условиях голодания по фосфору ТНВ-гена(ов), выбранных для анализа.

3. Проверить высказанную гипотезу о возможности генерации окиси азота в условиях дефицита фосфора и возможной роли NO в контроле транскрипции ТНВ-генов, индуцируемых в условиях голодания по фосфору.

В работе показано, что дефицит фосфора индуцирует транскрипцию семи *ТНВ*-генов. Кроме того, впервые выявлено формирование окиси азота при удалении фосфора из среды.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Адаптация *Chlamydomonas* к голоданию по фосфору:

ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ

Фосфор (P) – жизненно важный макроэлемент, поглощение, хранение и транспортировка которого активно регулируется на протяжении всей жизнедеятельности организма. Дефицит фосфора – частая проблема, так как P требуется в достаточно больших количествах, но, как правило, находится в форме химических соединений, которые не могут быть усвоены большинством организмов. В таких условиях появляются жестко регулируемые механизмы захвата и транспортировки фосфора, а также множество метаболических настроек. Фотосинтезирующие эукариотические организмы обладают специфическим набором ответов на голодание по фосфору, так как для фиксации углерода требуется непрерывное поступление фосфора внутрь хлоропласта.

1.1.1. Глобальный регулятор *PSR1*

Глобальный регулятор играет ключевую роль в появлении ответов на дефицит фосфора. Лучше всего описан PHOSPHATASE (PHO) – регулон дрожжей (Persson et al., 2003), который согласует внутриклеточные и внеклеточные процессы регулировки. У фотосинтезирующих организмов было описано два PHO-подобных регулятора: PHOSPHORUS STARVATION RESPONSE1 (PSR1) у одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* (Shimogawara et al., 1999) и ортологичный ему PHOSPHATE STARVATION RESPONSE1 (PHR1) у *Arabidopsis thaliana* (Rubio et al., 2001).

Ген PSR1 кодирует белок из 762 аминокислот, включающий несколько доменов, характерных для регуляторов транскрипции.

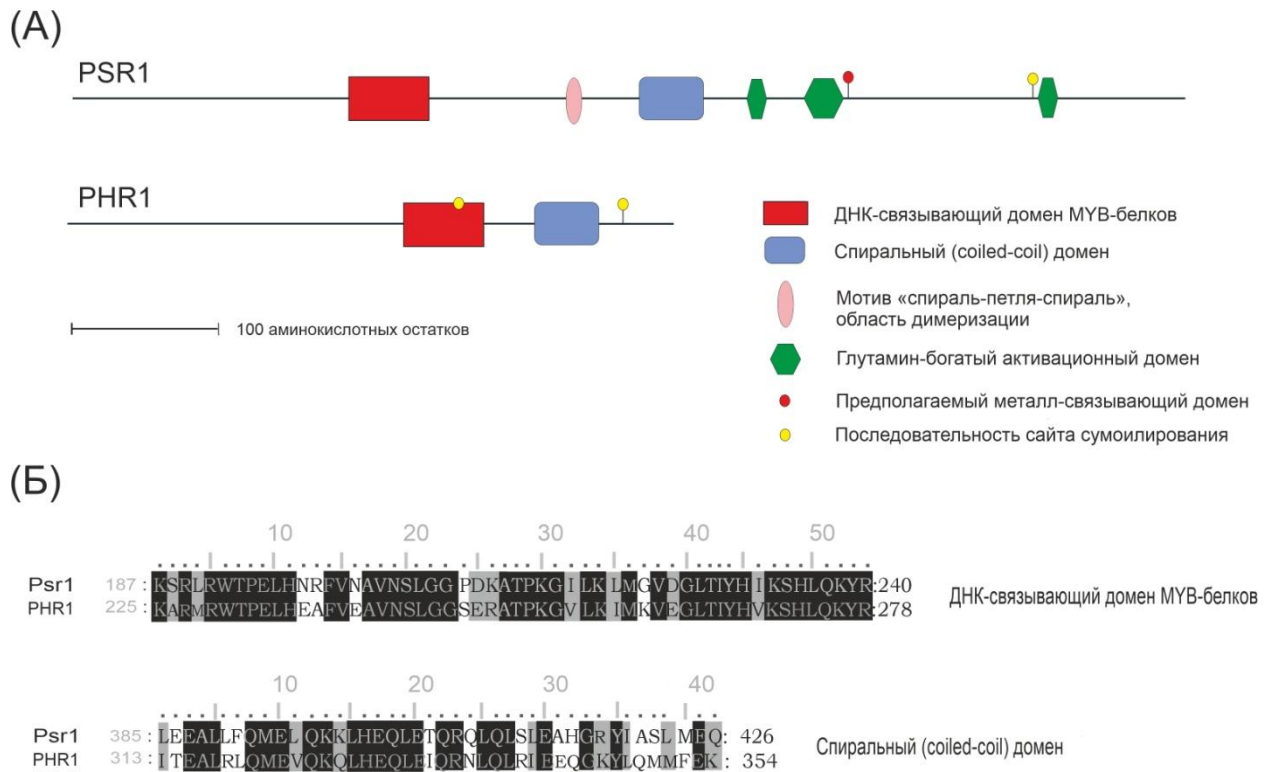


Рис.1. Сравнение последовательности и организации доменов PSR1 и PHR1. А) Схема сравнения белковых доменов PSR1 *Chlamydomonas* и PHR1 *Arabidopsis*. Б) Выравнивание последовательностей ДНК-связывающего домена MYB-белков и спирального (coiled-coil) домена PSR1 и PHR1 с помощью программы **ClustalW**. Идентичные участки окрашены черным, функционально идентичные аминокислотные остатки окрашены серым. (По: Stern D. (ed.), 2009).

Область, локализованная между аминокислотными остатками 187 и 240, относится к ДНК-связывающим доменам MYB-белков (Lipsick, 1996). Подобные домены присутствуют в CCA1, транскрипционном факторе *Arabidopsis*, который ответствен за фитохром-зависимое регулирование генов (Wang et al., 1997), а также в PHR1 (PHosphate starvation Response 1) - P-чувствительном регуляторе в *Arabidopsis* (Rubio et al., 2001).

Другой домен, общий для PHR1, PSR1 и транскрипционных факторов эукариот - это характерный спиральный (coiled-coil) домен, который способствует димеризации белков, в том числе белков CCA1 и PHR1, и требуется для связывания с последовательностями ДНК (Rubio et al., 2001).

Т.о., белок PSR1 *Chlamydomonas* относится к группе белков MYB-CC. Уровень транскрипции PSR1 увеличивается, когда *Chlamydomonas* подвергается воздействию 4-8 часового голодания по P. Увеличение транскриптов PSR1 предшествует индукции других ответов на голодании по P, включая появление высокоаффинных транспортеров Pi и синтез фосфатаз (Quisel et al., 1996; Shimogawara et al., 1999).

Мало что известно о регуляторных молекулах, которые контролируют PSR1 при недостатке фосфора в среде. Сумоилирование PHR1 *Arabidopsis*, продемонстрированное

in vitro, свидетельствует о том, что посттрансляционные процессы контролируют активность PHR1 (Miura et al., 2005). Кроме того, мутант *Arabidopsis siz1*, имеющий адаптированную к дефициту фосфора морфологию корней, и у которого отсутствует лигаза SIZ1 E3 SUMO, демонстрирует повышенную экспрессию некоторых генов голодания по Р в Р-насыщенных растениях и не способен индуцировать экспрессию других генов-мишеней в условиях дефицита Р (Miura et al., 2005). Тем не менее, *in vivo* сумоилизация PHR1 не была продемонстрирована, и фенотип *siz1* не исключает наличие косвенного воздействия на PHR1-зависимую экспрессию гена (Catala et al., 2007). У PSR1 отсутствуют консенсусные последовательности для сумоилирования, которые присутствуют в PHR1 и которые сами по себе не характерны для гомологов PHR1 у растений.

Неясно, насколько консервативны системы трансдукции сигнала при дефиците Р у *Chlamydomonas* и сосудистых растений. Так, был показан предполагаемый путь ингибирования PHR1-зависимой транскрипции, где PHR1 регулирует индукцию miR399 во время Р-голодания *Arabidopsis* и других растений (Bari et al., 2006). Эта miRNA снижает уровень мРНК PHO2 путем взаимодействия с комплементарными последовательностями, которые присутствуют в PHO2 в 5'-нетранслируемой области (Fujii et al., 2005; Chiou et al., 2006). PHO2 кодирует убиквитин-конъюгирующий фермент E2, который синтезируется на высоком уровне в условиях достаточной концентрации Р и подавляет экспрессию генов, которые индуцируются при голодании по Р. Соответственно *pho2*-мутанты имеют повышенный уровень Pi в листьях и постоянно высокую экспрессию PHR1-зависимых генов - это гены переносчиков Pi и гены фосфатаз, индуцирующиеся при дефиците Р (Delhaize and Randall, 1995; Dong et al., 1998; Bari et al., 2006). Хотя у *Chlamydomonas* ещё не было найдено miRNAs со сходными с miR399 последовательностями, у этой водоросли экспрессируется широкий набор miRNAs, и, по меньшей мере, одна из них (кандидат 161 Zhao et al.) имеет потенциальные целевые последовательности в кодирующих областях генов, относящихся к предполагаемым транспортерам Pi - РТВ3 и РТА2 (Molnar et al., 2007; Zhao et al., 2007).

1.1.2. PSR1-зависимая экспрессия генов в условиях голодания по фосфору

Фосфатазы. Содержание мРНК PHOX-гомолога *Chlamydomonas*, который кодирует основную индуцируемую внеклеточную фосфатазу, увеличивается в 5 000 раз в клетках, которые голодали в течение 24 часов, что коррелирует с накоплением избытка внеклеточного полипептида весом 190 кДа. Более того, ни накопление транскрипта, ни белка 190 кДа не происходит в штаммах с мутацией *psr1* (Moseley et al., 2006).

Системы транспорта фосфора. Эффективное поглощение P_i , которое фиксируется у *Chlamydomonas* в условиях голодания по P, по-видимому, является следствием изменения экспрессии генов, кодирующих соответствующие P_i транспортеры. Так, 4 белка-транспортера типа В (РТВ), гомологичные Na^+/P_i -симпортеру РНО89 дрожжей, экспрессируются во время голодания по P_i и регулируются PSR1 (Kobayashi et al., 2003; Moseley et al., 2006). Кроме того, выявлено 4 гена, кодирующие P_i транспортеры типа А, гомологичные РНО84 дрожжей, продукт которого функционирует как высокоаффинный H^+/P_i ко-транспортер. Из четырех генов РТА только РТА4 индуцируется во время голодания по P; причем в PSR1-независимой манере. Интересно, что РТА3 реагирует на Mn-голодание, при этом его транскрипция повышается в 25 раз, в то время как количество транскриптов РТА4 увеличивается в 5 раз, что указывает на их возможную роль в поглощении Mn (Allen et al., 2007). Было показано, что транспортеры в этом классе функционируют как Mn^{2+}/PO_4^{3-} ко-транспортеры (Fristedt et al., 1999; Jensen et al., 2003), поэтому усиление транскрипции РТА4 во время голодания по P может отражать уменьшение скорости поглощения Mn^{2+} . Действительно, в клетках с дефицитом Mn уменьшается содержание внутриклеточного P, хотя они не характеризуются увеличением экспрессии генов, чувствительных к дефициту P (Allen et al., 2007).

Транскрипт РТА1 снижается примерно в 1000 раз после того, как клетки подвергаются голоданию по P, и это снижение не возникает в мутантах по *psr1* (Moseley et al., 2006). Это предполагает, что РТА1-транспортер характеризуется низким сродством к P_i и работает в клетках, находящихся в условиях переизбытка фосфора. Не исключено также, что, изменение уровня транскриптов РТА1 и РТВ может являться результатом изменений в транспортировке P_i внутрь и наружу из внутриклеточных компартментов.

Другие компоненты, вовлеченные в метаболизм P. Ряд дополнительных генов, связанных с метаболизмом P, по-разному регулируются во время его недостатка и, вероятно, находятся под контролем PSR1. Ген САХ1, кодирующий предполагаемый H^+/Ca^{2+} антипортер (Hanikenne et al., 2005), активируется в клетках при P-голодании и может участвовать в регуляции внутриклеточного уровня Ca^{2+} , когда Ca^{2+} высвобождается из полифосфатных гранул (Moseley et al., 2006). Дефицит P также активирует экспрессию VTC1, который кодирует гомолога вакуолярных дрожжевых транспортных шаперонов, которые связаны с полифосфатным метаболизмом (Ogawa et al., 2000; Auesukaree et al., 2004). Подавление гена PNP, кодирующего PNPase хлоропласта, вероятно, находится под контролем PSR1, поскольку этого подавления не наблюдается у *psr1*-мутантов (Yehudai-Resheff et al., 2007).

Помимо контроля клеточных ответов, которые способствуют сбору внеклеточного,

свободного или этерифицированного Pi, PSR1 также может участвовать в регуляции класса генов, связанных с функцией своеобразного «электронного клапана». Эти функции способствуют рассеянию энергии возбуждения от фотосинтетической и дыхательной цепи, по-видимому, для предотвращения генерации активных форм кислорода в условиях, когда клетки ограничены в делении и росте. Например, количество транскриптов генов, кодирующих пластидные и митохондриальные альтернативные оксидазы, увеличивается количественно у клеток дикого типа, у P-голодающих клеток, но не у мутантов *psr1*. Увеличение уровня транскрипов характерно для генов, кодирующих ферменты, которые участвуют в синтезе, деградации и ферментационном обмене крахмала (пируват-форматлиаза и алкогольдегидрогеназа), что, возможно, отражает снижение уровня кислорода в культурах во время голодания по P. Кроме того, небольшое, но воспроизводимое повышение уровня транскрипта HYDA2 (но не HYDA1), кодирующего Fe-гидрогеназу (Fe связан с активным центром фермента) *Chlamydomonas*, наблюдается в клетках, голодающих по фосфору (Moseley et al., 2006). Электроны для формирования H₂ поступают из реакций ферментации (Atteia et al., 2006) или от ферредоксина, восстановленного с помощью PS I (Benemann et al., 1973).

Активация генов, кодирующих функции электронного клапана, может отражать повышенную потребность «отбирать» электроны от фотосинтетической электрон-транспортной цепи в условиях, когда скорость линейного потока электронов ограничивается потреблением восстановительных эквивалентов, что является следствием уменьшения эффективности фиксации CO₂ и снижением других анаболических активностей (например, редукции сульфата, фосфата или нитрита). Неспособность *psr1*-мутантов к увеличению уровня транскриптов полипептидов «электронного клапана» во время голодания по P может отражать прямое взаимодействие между PSR1 и специфическими промоторами, или, с другой стороны, мутанты могут поддерживать различные метаболические состояния гомеостаза как следствие их неспособности адекватно адаптироваться в условиях дефицита P.

1.1.3. Связь дефицита фосфора и фотосинтеза

Wykoff et al. (1998) продемонстрировали, что *Chlamydomonas* во время голодания по P контролирует подавление фотосинтеза, что предотвращает фотоповреждения в условиях, при которых поглощенная энергия света не может быть использована для роста. Голодание по S вызывает тот же набор ответов, хотя и гораздо более быстрый (Zhang et al., 2004), что отражает ограниченную доступность внутренней S по сравнению с P. Эффективность использования энергии света сильно сокращается после 4 дней голодания

по Р, и максимальная скорость выделения O_2 снижается до одной четвертой от начальной скорости.

Изучение отдельных реакций фотосинтетического транспорта электронов продемонстрировало, что PS II является сайтом, на котором ингибируется фотосинтез во время голодания по Р, в то время как транспорт электронов через $cyt\ b_6f$ и PS I комплекс остается неизменным. С другой стороны, снижение фотосинтетического выхода во многом объясняется снижением на 30% количества функциональных PS II, что определяется путем количественного измерения избытка белка D1 и функциональным уровнем Q_A , а также увеличением доли PS II, не являющихся компетентными для переноса электронов из Q_A в Q_B . Активация ксантофиллового цикла в Р-голодающих клетках приводит к увеличению рассеяния поглощенной энергии света в виде тепла, а движение светособирающих комплексов от PS II до PS I (переходное состояние; клетки переходят из состояния 1(state 1) в состояние 2(state 2)) отводит поглощение от PS II (реакционный центр PS I может действовать как гаситель). Более того, циклический поток электронов вокруг PS I, по-видимому, повышается во время Р-стресса, предположительно, для поддержания ΔpH , необходимого для нефотохимического тушения, и для обеспечения производства АТФ для поддержания клеточных процессов (Wykoff et al., 1998).

1.1.4. Модель регуляции ответов при недостатке фосфора

На основе полученных данных была предложена модель, объясняющая регуляцию адаптации *Chlamydomonas* в условиях недостатка фосфора (рис.2).

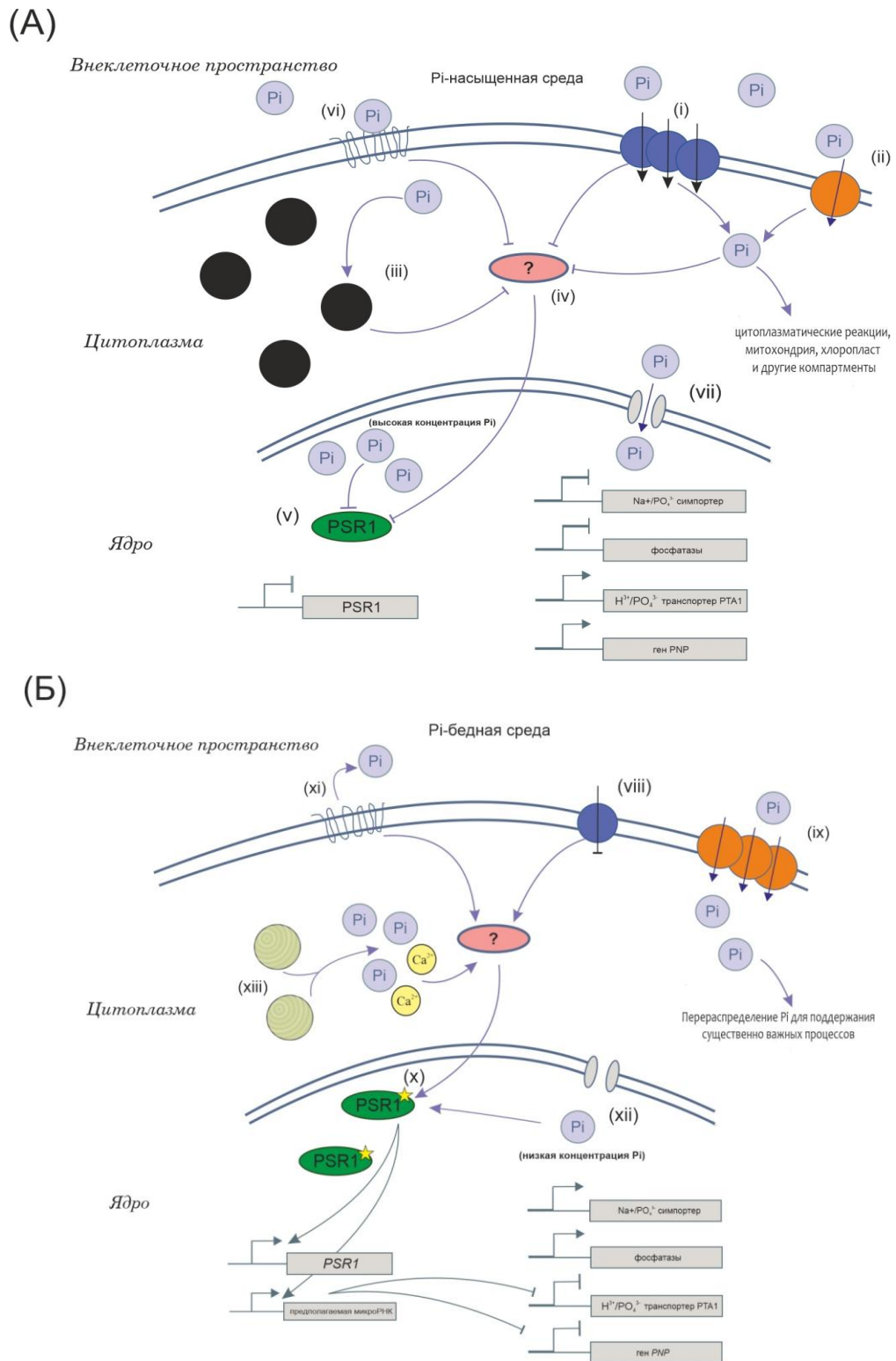


Рис. 2. Схема регуляции клеточного ответа *C. reinhardtii* на голодание по фосфору. А) В клетках, растущих в Рi-насыщенной среде, перемещение Рi из внешней среды в цитоплазму происходит в основном через систему с низким сродством к Рi (i); система с высоким сродством к Рi присутствует в ограниченном количестве (ii). Перенесенный Рi участвует в реакциях, которые происходят в цитоплазме или отправляется в другие клеточные компартменты. Избыток Рi включается в богатые полифосфатом ацидокальцисомы (iii). Цитоплазматический Рi может ингибировать компонент трансдукции цитоплазматического сигнала (iv), необходимый для активации PSR1 (v) в ядре. В качестве альтернативы (или дополнительно) ингибирующие сигналы могут передаваться внешним датчиком Рi (vi), от ацидокальцисом или от самой транспортной системы с низким сродством. Предположительно, Рi входит в ядро через ядерные поры (vii) и

может играть роль в репрессии PSR1. В условиях Pi-насыщения, PSR1, Na⁺/PO₄³⁻ транспортер и гены индуцибельной фосфатазы экспрессируются на базальном уровне, тогда как гены *PTA1* и *PNP* экспрессируются на максимальном. (Б) Когда концентрация Pi в среде истощается и становится недостаточной для роста, активность системы поглощения с низким сродством к Pi снижается (viii), но транспорт через систему с высоким сродством сохраняется (ix). Снижающиеся уровни Pi в клетке и/или транспорт Pi исключительно через высокоаффинную систему могут создавать сигнал, который передается в ядро и позволяет PSR1 активировать транскрипцию (x). Количество мРНК PSR1 увеличивается в течение 1 часа после переноса клеток в среду с дефицитом Pi, и это повышение экспрессии предшествует активации Na⁺/PO₄³⁻ транспортера, генов индуцибельной фосфатазы и репрессии *PTA1* и *PNP*. Вместо того чтобы действовать как активатор и как репрессор транскрипции *PTA1* и *PNP*, PSR1 может контролировать эти гены посредством экспрессии ингибирующей miRNA, которая уменьшает количество транскриптов данных генов. Временная разница в экспрессии генов после перемещения клеток в среду без фосфора может отражать разное сродство отдельных промоторов к PSR1. Альтернативная модель заключается в том, что сигнал для активации PSR1 передается, когда Pi диссоциирует от внешнего датчика (xi). PSR1 может также реагировать на изменения концентрации Pi в ядре (xii). Цитоплазматические полифосфаты расщепляются и уравнивают цитоплазматическую концентрацию Pi до тех пор, пока их запасы не будут исчерпаны (xiii). Ионы Ca²⁺, высвобождаемые из полифосфатных тел, могут активировать внутренний сигнал P-голодания, приводящий к активации PSR1. (По: Stern D. (ed.), 2009).

В условиях избытка питательных веществ, белок PSR1 присутствует в неактивной форме. Не исключено, что ген *PTC1* (рис. 2, (A; vi)) может быть сенсором внеклеточного уровня Pi, как в случае с гомологичными белками в дрожжах, и может через неизвестные промежуточные продукты (iv) отрицательно регулировать активность PSR1 при высокой концентрации внеклеточного Pi. Дополнительно или альтернативно, PSR1 может быть чувствительным к уровням Pi в ядре и/или к активности Pi переносчиков (ii). При дефиците фосфора PSR1 активируется с помощью невыявленного пока механизма и временно регулирует транскрипцию ряда генов (см 1.1.2). Не исключено также, что, как и в растениях, miRNAs и протеолиз могут играть роль в PSR1-зависимой генной экспрессии.

1.2. Усеченные гемоглобины *C. reinhardtii*

Основываясь на филогении, глобиновое суперсемейство делят на три типа: (i) флавогемоглобины и однодоменные гемоглобины, (ii) протоглобины и двойные глобиновые сенсоры и (iii) «усеченные» гемоглобины (TrHb). Члены глобинового суперсемейства принадлежат к двум структурно-отличающимся классам:

- (a) классический «3-на-3» α-спиральный «сэндвич» (флавогемоглобины, однодоменные гемоглобины, протоглобины и двойные глобиновые сенсоры);
- (b) «2-на-2» α-спиральный «сэндвич» (TrHbs), который представляется собой укороченный классический «3-на-3» α-спиральный «сэндвич» (рис.3).

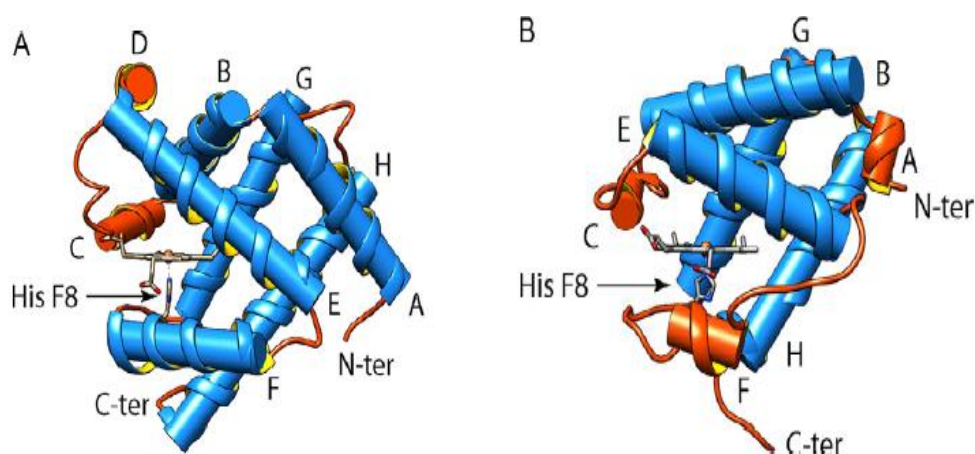


Рис. 3. Два структурно-отличающихся класса глобинового суперсемейства. А) Классический «3-на-3» α -спиральный «сэндвич». В) «2-на-2» α -спиральный «сэндвич». (По: Johnson et al., 2014).

Функция глобинов в одноклеточных организмах является в основном (псевдо) ферментативной, причем транспортировка и хранение O_2 являются специализированными функциями и связаны с эволюцией метазоа (Vinogradov et al., 2005; Vinogradov et al., 2007; Vuletich and Lecomte, 2006; Vinogradov et al., 2006; Ascenzi et al., 2007; Vinogradov and Moens, 2008; Pesce et al., 2013; Vinogradov et al., 2013).

TrHbs широко распространены у растений и бактерий, а также найдены у некоторых одноклеточных эукариотических организмов (Wittenberg et al., 2002).

Группа TrHbs разделяется на три класса, обозначаемых как 1 (или группа N, или группа I), 2 (или группа O, или группа II) и 3 (или группа P, или группа III). TrHbs, принадлежащие к 1 и 2 классу, делятся на две и четыре подгруппы соответственно, в то время как TrHbs, относящиеся к 3 классу сгруппированы в одном подклассе, так как демонстрируют высокий уровень сходства (Pesce et al., 2013; Pesce et al., 2000).

Члены трех классов используют упрощенный глобиновый фолдинг из четырех основных α -спиралей. В отличие от других глобинов, гемовый карман TrHbs демонстрирует большую вариабельность в пределах групп и подклассов, особенно в дистальной его части. За исключением проксимального остатка His (F8), связанного с железом гемма, и пары Phe (B9)-Tyr (B10) (рис.3), обычно встречающейся в дистальной части, другие аминокислотные остатки, составляющие окружение гема, не сохраняются у TrHbs (Vuletich and Lecomte, 2006).

Такая изменчивость в белковой части отражает разнообразные лигандсвязывающие свойства представителей разных групп TrHb, что позволило сделать предположение о биологических функциях, связанных с взаимодействием O_2 /NO (Pesce et al., 2013).

Некоторые бактерии, растения и одноклеточные эукариотические организмы вырабатывают множество TrHbs, принадлежащих разным классам. С эволюционной точки зрения, постулируется, что члены классы 1 и 3 произошли от генов класса 2 в результате дублирования и передачи (Vinogradov et al., 2005; Vinogradov et al., 2007; Vuletich and Lecomte, 2006; Vinogradov et al., 2006; Ascenzi et al., 2007; Vinogradov and Moens, 2008; Pesce et al., 2013; Vinogradov et al., 2013). Примечательно, что наличие нескольких TrHb в одном организме предполагает их ключевую роль в осуществлении разнообразных физиологических функций, включая защиту от окислительного повреждения при нитрозилировании TrHb, детоксикации NO под действием оксигенированного железа TrHb, образование NO из NO₂ дезоксигенированным Fe²⁺ TrHb и удаление пероксинитрита Fe³⁺ TrHb; каждый процесс зависит от окислительно-восстановительного и лигирующего состояния гем-белка (Ascenzi and Visca, 2008; Gardner, 2008; Sturms et al., 2011; Ascenzi et al., 2014).

Chlamydomonas reinhardtii обеспечила создание ценной справочной системы для исследования основных биологических функций как у растений, так и у животных. Это связано не только с простотой использования этого организма в лабораторных условиях, но и с особой эволюционной историей рода *Chlamydomonas*. Род сохранил такой признак как жгутик, который присутствует у животных, но потерян у высших растений, в сочетании с хорошо сохранившимся фотосинтетическим аппаратом (Harris, 2001). Интерес к *C. reinhardtii* значительно повысился благодаря публикации полной последовательности генома в 2007 году, что позволило идентифицировать новые функции генов (Blaby et al., 2014). Было установлено, что в геноме *C. reinhardtii* закодировано 12 генов группы TrHb1; эти гены были названы THB1-12 (Hemschemeier et al., 2013). THB1 вовлечен в путь усвоения азота, так как он связывает NO как в трехвалентном, так и в двухвалентном состоянии геммового железа и проявляет эффективную NO-диоксигеназную активность (Johnson et al., 2014); также показано взаимодействие THB1 с нитратредуктазой (NR), направленное на удаление монооксида азота (Chamizo-Ampudia et al., 2017; Sanz-Luque et al., 2015). С другой стороны, постулируется, что THB8 является частью NO-зависимого сигнального пути (Hemschemeier et al., 2013).

Хотя функция THB1 в восстановлении нитратов описана, функции других усеченных гемоглобинов остаются не выясненными.

Таким образом, требуется характеристика того влияния, которое усеченные гемоглобины оказывают на адаптацию клеток в условиях дефицита компонентов питания.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1.Используемые штаммы и условия их культивирования

Штаммы *Chlamydomonas reinhardtii* cw15-325 (*cw15mt⁺arg7-8*), 305 (*nit1 mt⁻*) и его родительский штамм 6145с (*mt⁻*), были предоставлены проф. М. Шродой (Технический университет г. Кайзерслаутерн, Германия) и проф. Э. Фернандесом (Университет г. Кордоба, Испания) соответственно. Также были использованы штаммы CC-4267 (*psr1-1 mt⁻*), CC-124 (wild type *mt⁻*), 21gr (wild type *mt⁻*), CC-4274 (*psr1-1 sac3*), CC-4276 (*psr1-1 snrk2-1mt⁻*), CC-2895-CC-4533 (*cw15mt⁻*) полученные из коллекции *Chlamydomonas* (США). Штаммы LMJ.RY0402.124745 (*THB1mt⁻*) и LMJ.RY0402.201192 (*THB2mt⁻*) были получены из коллекции *Chlamydomonas* Library Project (CLiP) (Li et al., 2016).

Для культивирования использовалась среда TAP (Sager and Granick, 1954).

Таблица 1. Состав среды TAP (на 1 литр):

Раствор А	25 мл
Фосфатный буфер	1 мл
Трис-ацетат 1М <ul style="list-style-type: none"> • трис – 2,42 г/л • ледяная уксусная кислота - 1 мл/л • <i>ddH₂O</i> до 1 литра 	20 мл
Микроэлементы	1 мл
Ацетат натрия	1 г
Вода дистиллированная	До 1 литра

Состав раствора А:

NH_4Cl – 15 г;

Mg_2SO_4 – 2 г (или $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 4,0 г);

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 2,0 г;

H_2O – 1 л

Состав фосфатного буфера:

K_2HPO_4 – 9,35 г;

KH_2PO_4 – 6,3 г;

H_2O – 100 мл.

Состав раствора микроэлементов:

ЭДТА – 50 г/л;

ZnSO₄ – 22 г/л;

MnCl₂·4H₂O – 5,06 г/л;

H₃BO₃ – 11,4 г/л;

FeSO₄·7H₂O – 4,99 г/л;

(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O – 1,1 г/л;

CoCl₂·6H₂O – 1,61 г/л;

CuSO₄·5H₂O – 1,57 г/л.

В среду ТАР при необходимости вносили аргинин - 100 мг/л.

Для анализа процессов адаптации в среде без фосфора, клетки, выращенные на среде ТАР на свету, дважды промывали средой без фосфора (ТАР-Р) и затем ресуспендировали в ТАР-Р. ТАР-Р среда была получена благодаря замене 1 мМ раствора фосфата калия на 1,5 мМ раствора хлорида калия.

После каждого отбора культуры количество клеток измеряли с использованием светового микроскопа и счетной камеры Горяева. Для визуализации нежизнеспособных клеток осуществляли микрокопирование с добавлением 0,0125% (V/V) метиленового синего (DIA-M, Россия) как описано (Zalutskaya et al., 2018). Окрашенные (нежизнеспособные) и неокрашенные (жизнеспособные) клетки наблюдали и подсчитывали. 4×10^2 клеток было отобрано из каждой культуры, эксперименты повторялись трижды.

2.2. Анализ экспрессии генов

2.2.1. Выделение РНК

Выделение тотальной РНК осуществлялось в несколько этапов (Ermilova et al., 2010).

Первый этап: осажденные центрифугированием клетки *C. reinhardtii* ресуспендировали в 250 мкл реагента для выделения тотальной РНК (TRIzol), при этом клетки лизировались, а целостность РНК сохранялась за счет ингибирования действия РНКаз. После полученный клеточный лизат замораживали при температуре -70 °С.

Второй этап: Образцы размораживали при комнатной температуре, а затем вносили 50 мкл хлороформа, который способствует денатурации белков и разрушению липидов, помогает поддерживать разделение фаз. Пробы встряхивали вручную 20 сек и инкубировали 2 мин. После пробы помещали в центрифугу (12000 g, t=4°C) на 15 минут для отделения денатурированных белков и фрагментов клеточных органелл от

нуклеиновых кислот, при этом ДНК и РНК оказывались в разных фазах. Верхнюю фазу, содержащую РНК, переносили в новые пробирки.

Третий этап: Добавляли 125 мкл изопропилового спирта для осаждения суммарной РНК и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. После осаждения РНК центрифугированием (12000 g, $t=4^{\circ}\text{C}$, 15 мин), супернатант сливали и полученный осадок нуклеиновых кислот отмывали раствором этанола 75%, затем снова центрифугировали (12000 g, $t=4^{\circ}\text{C}$, 5 мин). Остатки супернатанта сливали, осадок подсушивали 2 мин и растворяли его в воде DEPC.

Четвертый этап: Для оценки чистоты препарата РНК проводили измерения оптической плотности раствора при длинах волн 260, 280, 320 нм. Для чистого образца РНК отношение A_{260}/A_{230} , т.е. на максимумах поглощения растворов РНК и белков, должно быть около 2. Также производили оценку чистоты при длине волны 320, т.к. нуклеиновые кислоты имеют $A_{320} = 0$, то при $\lambda = 320$ нм препараты чистой нуклеиновой кислоты должны иметь нулевую оптическую плотность.

Измерение концентрации РНК осуществляли с помощью спектрофотометра (BioRad, SmartSpec Plus. США): 1 мкл РНК растворяли в 99 мкл ТЕ буфера.

2.2.2. Синтез кДНК

Синтез одноцепочечной кДНК был осуществлен с помощью набора RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, США). В образцы РНК добавляли ДНКазу I без РНКазной активности (RNase-Free DNase I)(Fermentas), с целью очистить их от остатков геномной ДНК. Для расщепления ДНК пробирки с образцами ставили в термоциклер (MJ Mini™ Thermal Cycler, Bio-Rad) на 15 мин при 37°C . Затем добавляли 0.43 мкл ЭДТА для того, чтобы осуществить связывание кофакторов фермента, и возвращали в термоциклер на 10 мин при 80°C . После добавляли 0,3 мкл oligo(dT)-праймеров, которые являются затравкой для фермента обратной транскриптазы. Образцы ставили в термоциклер на 5 мин при 65°C для отжига oligo(dT)-праймеров.

Готовили смесь, содержащую следующие компоненты:

- 5X RT Buffer – буфер, предназначенный для фермента обратной транскриптазы
- 10 mM dNTP смесь
- 50 mM MgCl_2
- обратную транскриптазу RevertAid
- ингибитор РНКазы RiboLock.

Полученную смесь разносили по пробам, затем пробы возвращали в термоциклер на 1ч при 42°C и на 10 мин при 70°C.

2.2.3. ПЦР в режиме реального времени

. Количественная ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) осуществлялась в амплификаторе Light Cycler Instrument (CFX96 Real-Time PCR Detection System, Bio Rad). Для детекции сигнала был использован интеркалирующий краситель SYBR Green I, флуоресценция которого значительно увеличивается при связывании с двухцепочечной ДНК; SYBR Green I находился в растворе DMSO (Amresco, США). Реакционная смесь заливалась в микропробирки для ПЦР в стрипах по 8 с прозрачными крышками (Bio-Rad, США) в объеме 20 мкл. Каждый индивидуальный образец вносился в двух повторах.

Состав реакционной смеси:

- 10X Hot Start Taq буфер
- MgCl₂ (50 мМ)
- Раствор SYBRGreenI в DMSO
- Смесь dNTP (0,5 мМ)
- HotStart Taq полимеразы (5 е.а./мкл)
- смесь прямого и обратного праймеров (200 нМ)
- кДНК (250 нг)

Реакция ПЦР в реальном времени проходила в несколько этапов: 1) денатурация ДНК; 2) отжиг праймеров; 3) элонгация. Программа для ПЦР представлена в Таблице 1.

Таблица 2. Программа для амплификации:

Температура	Время	Количество циклов
96°C	5 мин	1
96°C	30 сек	40
60°C	30 сек	
72°C	1 мин	
4°C	До выключения прибора	1

Последовательности праймеров, которые использовались в реакции, приведены в Таблице 3.

Таблица 3. Последовательности праймеров

Ген-мишень	Имя праймера, F – прямой, R–обратный	Последовательность (5'–3')
<i>THB1</i>	<i>THB1F</i> <i>THB1R</i>	ATGAAGAAGCAGCGCCGCAAAC ACCAGGTCAAAGTGGTGGTGGTTC
<i>THB2</i>	<i>THB2F</i> <i>THB2R</i>	GCCGGTTGATCCGCGACAAG CGATCCAACCTTTACACCCGCTCAA
<i>THB3</i>	<i>THB3F</i> <i>THB3R</i>	TCACTTATCGCCAGTCTAGAGGAC CGCTCAGGATGTCGTCTATAAGC
<i>THB4</i>	<i>THB4F</i> <i>THB4R</i>	GCTTCAAGGAGACGGTGTGAAGTCTAC ACATCCACCGTTGCTGCCACA
<i>THB5</i>	<i>THB5F</i> <i>THB5R</i>	GCGTTTTATCGCAAGTTGT CTTGAACGTATCCAGCAGCA
<i>THB6</i>	<i>THB6F</i> <i>THB6R</i>	CCTGGACTCGATAGCAGAGG TGTCGTGAGAGACGGAAGT
<i>THB7</i>	<i>THB7F</i> <i>THB7R</i>	CATGGTGCCGTGCTCGTACA CGACCAGCACTGCCTACTTG
<i>THB8</i>	<i>THB8F</i> <i>THB8R</i>	CGGGAGTCAGCAAGCTGTCAAC CCGCCC GTACACAAACAAGCAC
<i>THB9</i>	<i>THB9F</i> <i>THB9R</i>	GCTCTCTCTGGTTTTGAAGCAT AGCTGCTCATCTGCGTACAAT
<i>THB10</i>	<i>THB10F</i> <i>THB10R</i>	TGCTGCGGAGGTGTTCCCTTG CATTGCCGCCTCTGCTGATG
<i>THB11</i>	<i>THB11F</i> <i>THB11R</i>	TTGCGTGCGTCCATGCTGTC CCGGTTGCGGATACACCTCT
<i>THB12</i>	<i>THB12F</i> <i>THB12R</i>	GACCCCTCACTCATAAAGTTCCT AAGTACTTCATGCCAGATCAAA
<i>RACK1</i>	<i>RACK1F</i> <i>RACK1R</i>	CTTCTCGCCCATGACCAC CCCACCAGGTTGTTCTTCAG

Праймеры для RT-qPCRs подбирались на основе показателя эффективности реакции равному $\geq 90\%$ и без образования неспецифических продуктов, что соответствует единственному пику на кривой плавления.

В качестве референс-гена был использован ген, кодирующий рецептор для активированной протеинкиназы C - *RACK1* (Cre06.g278222, ранее назывался *CBLP*). Голодание по фосфору не влияет на накопление транскриптов гена *RACK1* у *C. reinhardtii*.

Для относительной количественной оценки экспрессии генов были использованы ΔC_t и $\Delta\Delta C_t$ методы.

C_t – это пороговый цикл, показатель того, когда уровень флюоресценции пересекает пороговую черту и все последующие циклы уже могут быть использованы для анализа.

- Формула для расчета по ΔC_t методу:

$$\Delta C_t = C_t(\text{референс}) - C_t(\text{проба})$$

$$\text{Уровень изменения экспрессии гена интереса} = 2^{\Delta C_t}$$

- Формула для расчета по $\Delta\Delta C_t$ методу (Livak):

$\Delta\Delta C_t$ рассчитывается как ΔC_t пробы - ΔC_t референс-гена, где:

$$\Delta C_t \text{ пробы} = C_t \text{ пробы} - C_t \text{ контроля пробы}$$

$$\Delta C_t \text{ референс-гена} = C_t \text{ гена интереса калибратора} - C_t \text{ гена контроля калибратора}$$

$$\text{Уровень изменения экспрессии гена интереса} = 2^{-(\Delta\Delta C_t)}$$

2.3. Анализ генерации NO

2.3.1. Количественное измерение уровней NO

Клетки *C. reinhardtii* (45 мкг/мл хлорофилла) отмывали и переводили в среду без P и в течение 15 мин инкубировали в присутствии 1 мкМ флуоресцентного красителя 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлуоресцеина (DAF-FM DA, Sigma-Aldrich), который чувствителен только к внутриклеточному NO. Через 15 мин клетки отмывали еще раз, ресуспендировали в среде без P и затем инкубировали в течение дополнительных 30 мин, чтобы под действием внутриклеточных эстераз обеспечить полный переход DAF-FM DA в 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлуоресцеин (DAF-FM), который не может проникать через клеточные мембраны.

Внутриклеточную продукцию NO измеряли с использованием планшетного спектрофлуориметра CLARIOstar (BMG).

Длины волн были установлены на 483 ± 14 и 530 ± 30 нм, что соответствует значениям длин волн возбуждения и испускания триазафлуоресцеина (DAF-2T) - продукта взаимодействия DAF-FM и окиси азота. Уровни флуоресценции выражали в относительных единицах, пересчитанных на единицу на хлорофилл или белка в 10^6 клеток. Значения аутофлуоресценции клеток вычитали из общей флуоресценции клеток,

полученной после окрашивания. Измерение осуществлялось в трех повторах для каждой отдельной культуры в заданных условиях. Эксперимент проводился три раза независимо.

2.3.2. Измерение концентрации хлорофилла

Для измерения содержание хлорофилла осуществляли экстракцию ацетоном (Harris, 1989). 1,2 мл культуры клеток разделяли на два повтора по 600 мкл, центрифугировали, супернатант сливали осадок ресуспендировали в 100 мкл дистиллированной вода и 500 мкл ацетона для того, чтобы экстаргировать пигменты. Остатки клеточного детрита были отделены с помощью центрифугирования, а супернатант, содержащий хлорофилл а и b, был отобран для спекторфотометрического анализа. Анализ оптической плотности на спекторфотометре (SmartSpec Plus, BioRad) осуществлялся при длинах волн 652 нм, что соответствует усредненному значению спектров поглощения хлорофилла а и b.

Подсчет суммарного содержания хлорофилла (мкг/мл) производился по следующей формуле:

$$Cl(a + b) = \frac{A_{652}}{34,5} \cdot 1000$$

2.3.3. Выделение белков и определение их концентрации

Для суммарного выделения белков 10 мл культуры (2×10^6 кл/мл) осаждали центрифугированием, супернатант сливали, а осадок растворяли в 0,1 М ДТТ и 0.1M Na_2CO_3 .

На следующем этапе во все образцы добавляли 5% раствор SDS и 30% раствор сахарозы. После перемешивания смесь кипятили, помещали в холод на 2 мин и далее центрифугировали, после чего отбирали гомогенат, содержащий растворенные белки.

Концентрацию белков определяли с помощью красителя амидо-черного (Porov et al., 1975). К готовому гомогенату добавляли воду, перемешивали. Далее для анализа приливали осаждающий реагент - 0,5% амидо-черный. После перемешивания смесь центрифугировали, надосадочную жидкости сливали, осадок промывали с помощью метанола и уксусной кислоты, растворяли в 0,2N NaOH. Далее определяли оптическую плотность раствора на спектрофотометре SmartSpec Plus Spectrophotometer (BioRad, США) при 615 нм.

Построение калибровочной кривой осуществлялось с помощью БСА. К растворам белка БСА с известными концентрациями приливали осаждающий реагент и дальше

работали, как и с опытными вариантами. После измерения оптической плотности строили калибровочную кривую.

Все эксперименты проводили в 3-4 биологических повторах и 3 технических для каждого эксперимента. Для статистической обработки полученных данных использовался пакет офисных программ Microsoft Excel. Данные представлены в виде среднего арифметического значения и ошибки среднего арифметического. Для оценки достоверности различий между значениями контроля и опыта использовали t-критерий (Стьюдента) для 1%-ного уровня значимости ($p < 0,01$).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Транскрипция *ТНВ*-генов в условиях голодания по фосфору

Было показано, что работа генов *ТНВ1* и *ТНВ2* регулируется источником азота и зависит от *NIT2*, транскрипционного фактора, необходимого для экспрессии генов ассимиляции нитратов (Sanz-Luque et al., 2015). Чтобы изучить связь транскрипции генов *ТНВ* с присутствием или отсутствием фосфора, нами была проанализирована экспрессия генов *ТНВ1-12* в среде без фосфора на свету (рис. 4). Уровни транскриптов трех из двенадцати изучаемых генов увеличились в клетках, которые инкубировались в среде без фосфора, в частности, экспрессия генов *ТНВ1*, *ТНВ2* и *ТНВ12* возросла максимально в 17, 59 и 27 раз. Транскрипция еще четырех генов, *ТНВ3*, *ТНВ4*, *ТНВ5* и *ТНВ6* превышала контроль в 2-3 раза. Изменения экспрессии других *ТНВ*-генов в условиях дефицита фосфора выявлено не было. Гены *ТНВ1*, *ТНВ2*, *ТНВ12* были проанализированы дополнительно в условиях кратковременной инкубации в ТАР-Р.

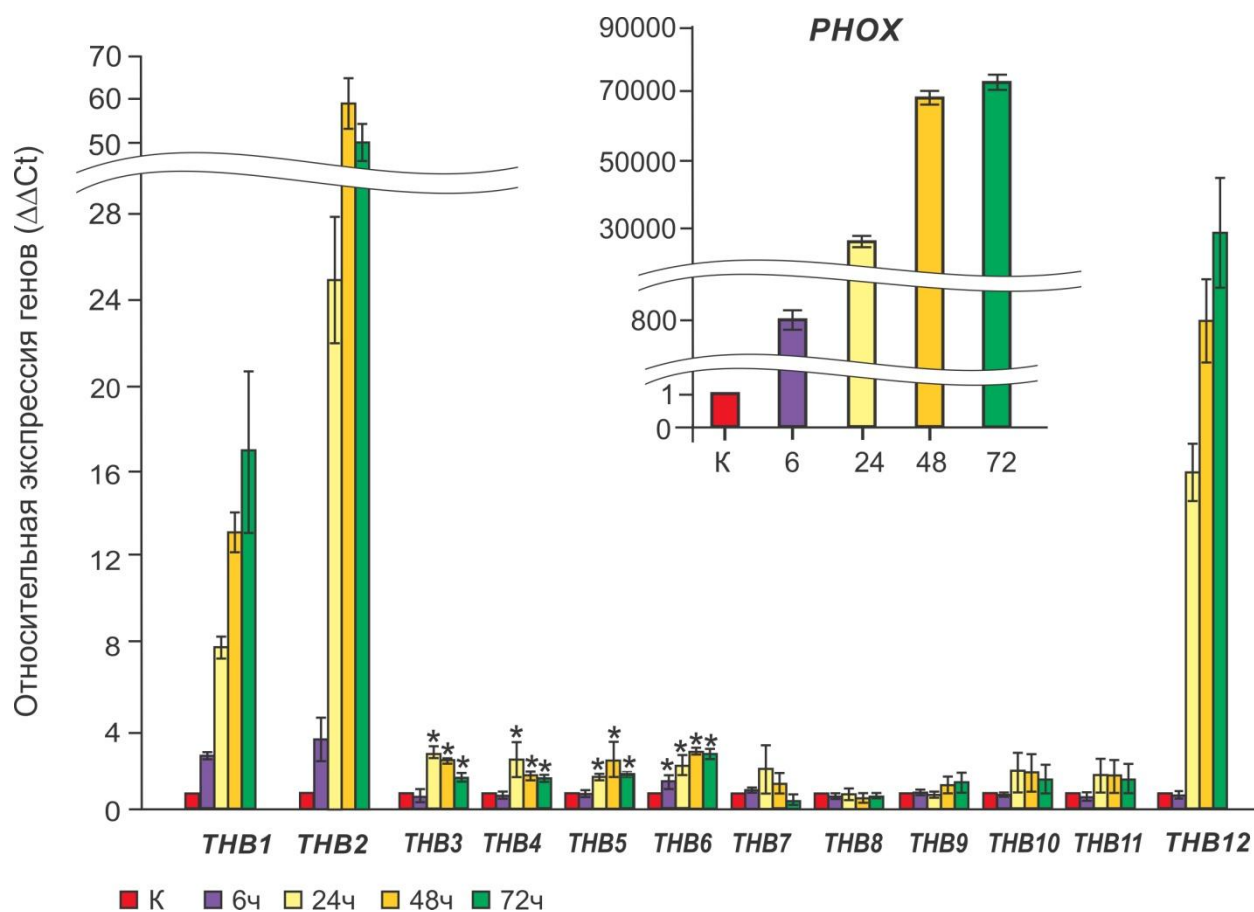


Рис. 4. Влияние дефицита фосфора на уровни экспрессии генов, кодирующих усеченные гемоглобины *ТНВ1-12* *S. reinhardtii*. Клетки штамма sw15-325 выращивали в среде ТАР на свету и переносили в среду ТАР-Р, затем инкубировали 6ч, 24ч, 48ч, 72ч. Уровни экспрессии генов даны относительно референс-гена *RACK1*, значение экспрессии которого принято за 1. Во вставке представлена относительная экспрессия гена *PHOX* у штамма sw15-325 в среде без фосфора. Звездочкой обозначены достоверные отличия.

При инкубировании клеток в среде без фосфора в интервале от 1ч до 4ч (рис. 5), анализ транскрипции показал, что количество мРНК *THB1* увеличилось примерно в 3 раза через два часа; экспрессия *THB2* увеличилась в 3,8 раза после четырех часов инкубации клеток в среде без фосфора. Количество мРНК *THB12* достоверных изменений не показало.

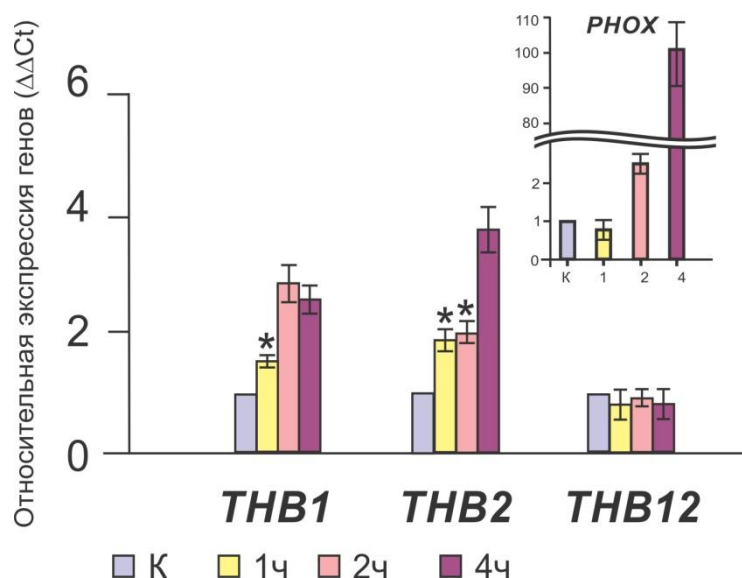


Рис. 5. Относительная экспрессия генов *THB1*, *THB2*, *THB12* *Chlamydomonas reinhardtii* в среде без фосфора. Клетки штамма sw15-325 выращивали в среде TAP на свету и переносили в среду TAP-P, затем инкубировали 1ч, 2ч, 4ч. Уровни экспрессии генов даны относительно референс-гена *RACK1*, значение экспрессии которого принято за 1. Вставка: Относительная экспрессия гена *PHOX* у штамма sw15-325 в среде без фосфора. Звездочками обозначены достоверные отличия.

3.2. Экспрессия *THB1* и *THB2* в штаммах, мутантных по транскрипционному регулятору *PSR1*

Известно, что ключевую роль в регуляции транскрипции клеток *Chlamydomonas*, голодающих по фосфору, играет регуляторный белок *PSR1* (Bajhaiya et al., 2016). Нас интересовало, вовлечен ли регулятор *PSR1* в контроль экспрессии *THB*-генов, индуцируемых в условиях дефицита фосфора? В работе для анализа мы выбрали два гена: *THB1* и *THB2*.

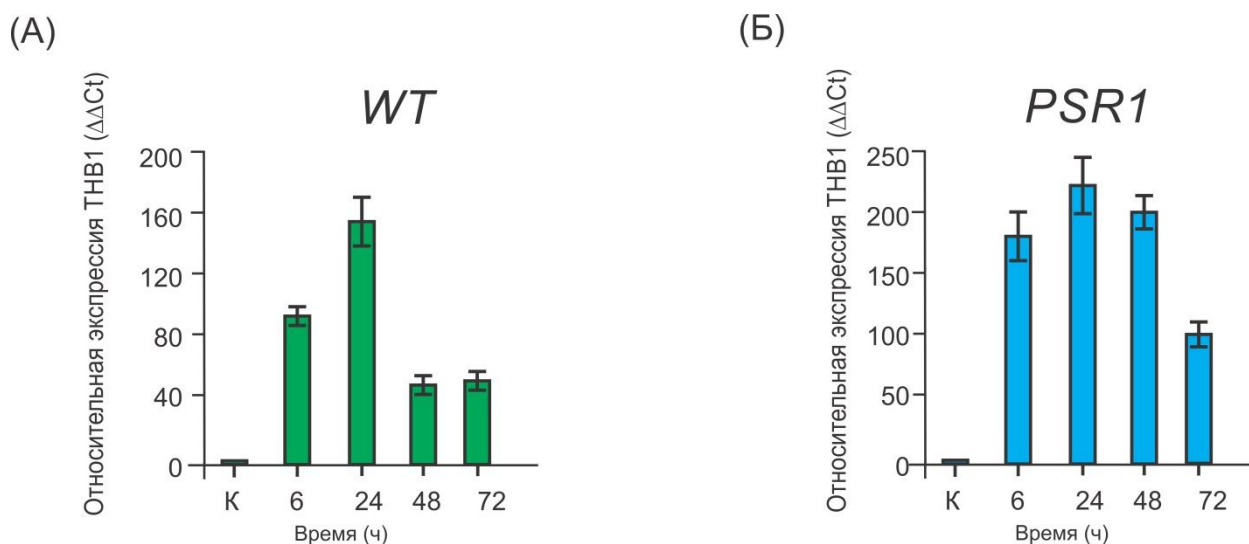


Рис. 6. Экспрессия гена *THB1* в мутанте *CC4267* по регулятору транскрипции *PSR1*. В качестве дикого типа использован штамм 21gr. Уровни экспрессии генов даны относительно референс-гена *RACK1*, значение экспрессии которого принято за 1.

Как видно из результатов рис. 6, ген *THB1* индуцировался в клетках, мутантных по гену *PSR1*, что свидетельствует о том, что экспрессия данного гена не контролируется *PSR1*. Напротив, уровни транскрипции *THB2* были значительно снижены в штамме *CC4267* (рис. 7), что предполагает включение *PSR1* в транскрипционную регуляцию. Для дополнительной проверки этого предположения были проанализированы два мутанта, дефектных по регулятору *PSR1* и двум компонентам регуляторного пути, контролирующего ответ на голодание по сере, *sac3* и *snrk2.1* соответственно (рис. 7), мутации в которых не влияют на экспрессию *THB2*. Полученные данные подтверждают роль *PSR1* в контроле транскрипции *THB2*.

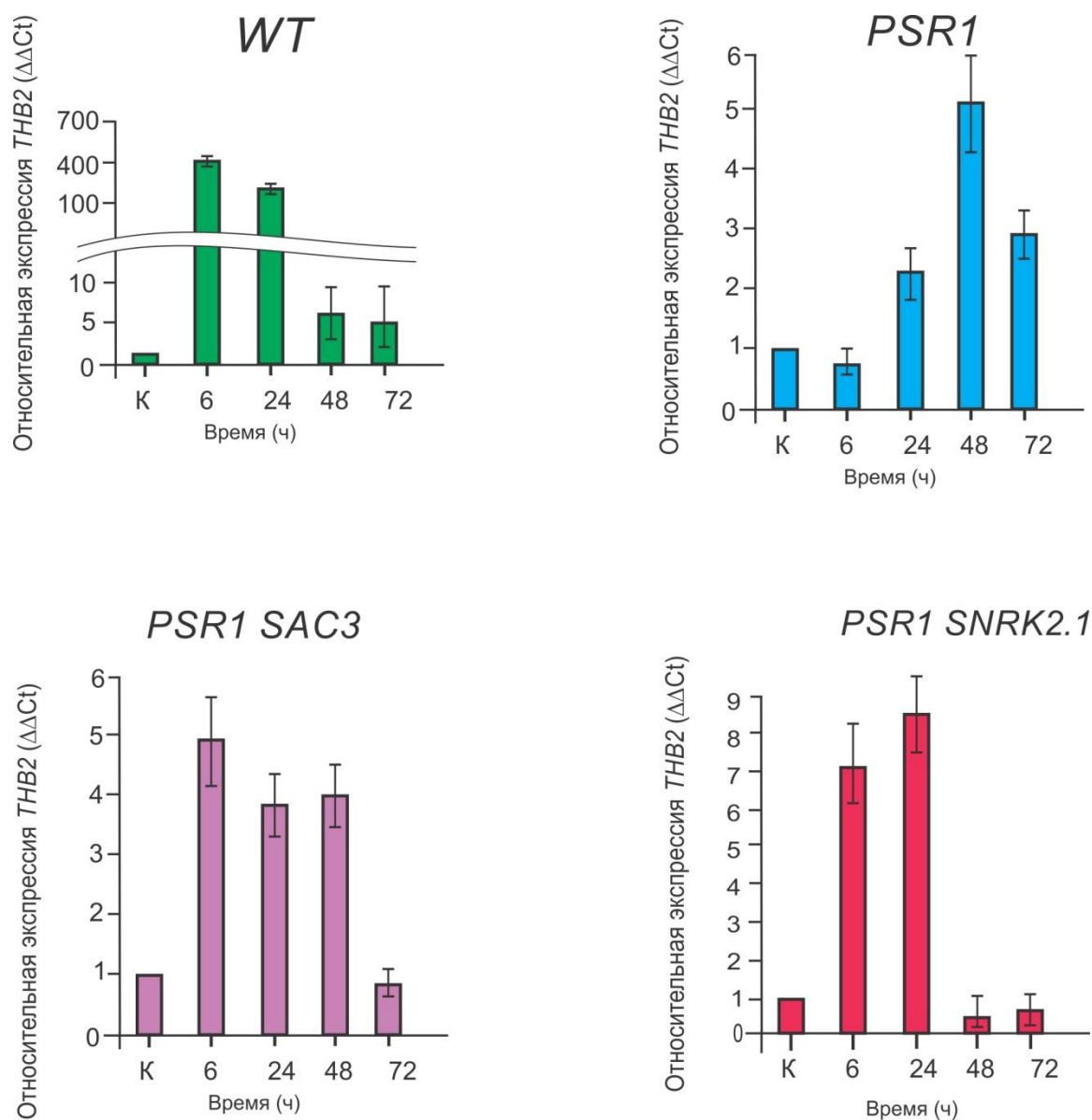


Рис. 7. Экспрессия гена *THB2* в мутантах по гену *PSR1*. В качестве дикого типа использован штамм 21 gr. Уровни экспрессии генов даны относительно референс-гена *RACK1*, значение экспрессии которого принято за 1.

3.3. Роль окиси азота (NO) в контроле экспрессии *THB1* и *THB2* в условиях дефицита фосфора

Поскольку экспрессия *THB1* и *THB2* контролируется NO в условиях голодания по сере (Minaeva et al., 2017), было высказано предположение, что окись азота может быть вовлечена в контроль транскрипции *THB1* и *THB2* при удалении фосфора из среды.

Чтобы проверить высказанное предположение, клетки дикого типа обрабатывали DEA NONOate, который является донором NO (Floryszak-Wieczorek et al., 2006). В течение 1 ч после добавления DEA NONOate уровень транскриптов генов *THB1* и *THB2* увеличился в 296,11 и 504,9 раз, соответственно, что превышало уровни индукции в среде

без фосфора или в TAP с внесением генератора NO (рис. 8). Примечательно, что ген *PNOX* также индуцировался при внесении DEA NONOate, однако уровни его экспрессии составляли 2-3 раза (рис. 8).

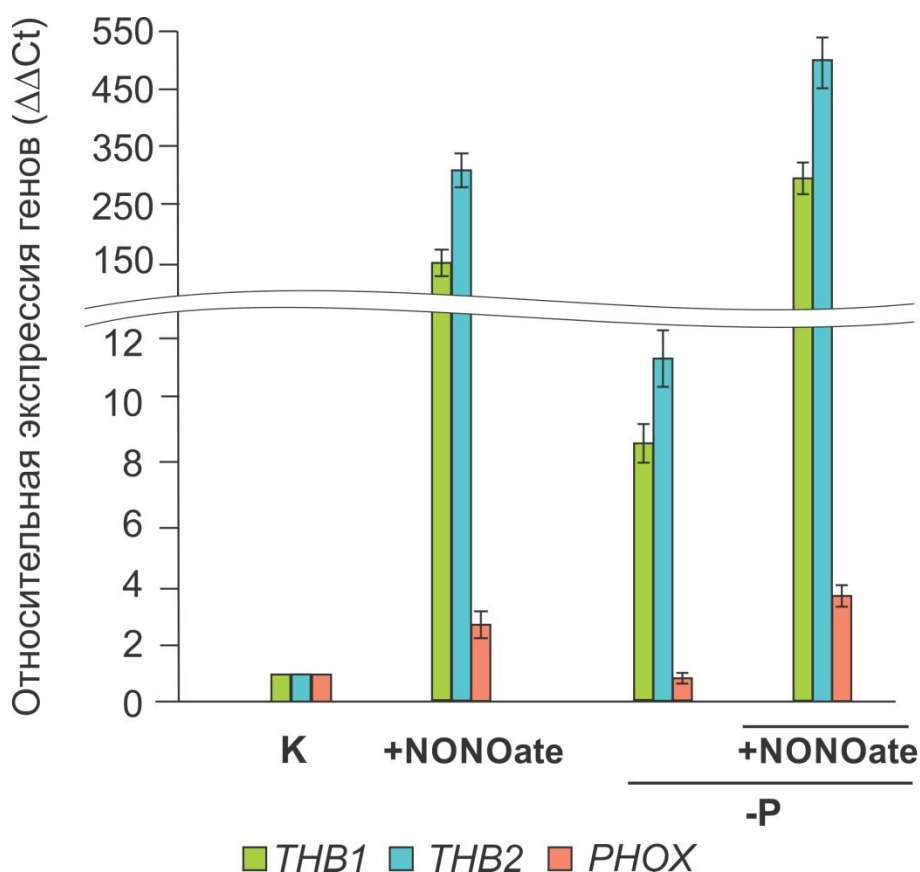


Рис. 8. Роль окиси азота в экспрессии *THB1* и *THB2* в условиях дефицита фосфора. Влияние DEA NONOate на транскрипцию *THB1*, *THB2* и *PNOX*-генов. Клетки штамма 21gr, выращенные в TAP, отмывали в среде без фосфора и инкубировали в течение 1 ч в среде с добавлением 50 мкМ DEA-NONOate. В качестве контроля DEA NONOate вносили в TAP. За единицу был взят уровень экспрессии референс-гена *RACK1* в каждом опыте.

Дополнительно в экспериментах был проанализирован штамм CC124 (рис. 9). При удалении фосфора в клетках CC124 не фиксируется увеличение экспрессии *THB1* и *THB2*. Однако CC124 представляет собой двойной мутант, который дефектен по гену *nit2*, кодирующему транскрипционный регулятор NIT2 и гену *nit1*, кодирующему нитратредуктазу. Для разграничения действия мутаций нами дополнительно был проанализирован штамм 305, который несет мутацию только в гене *nit1* (рис. 9). Поскольку в указанном штамме с нефункциональной нитратредуктазой также была нарушена индукция *THB1* и *THB2*, можно предположить ее потенциальную роль в генерации окиси азота не только в условиях голодания по сере, но и при дефиците фосфора в среде.

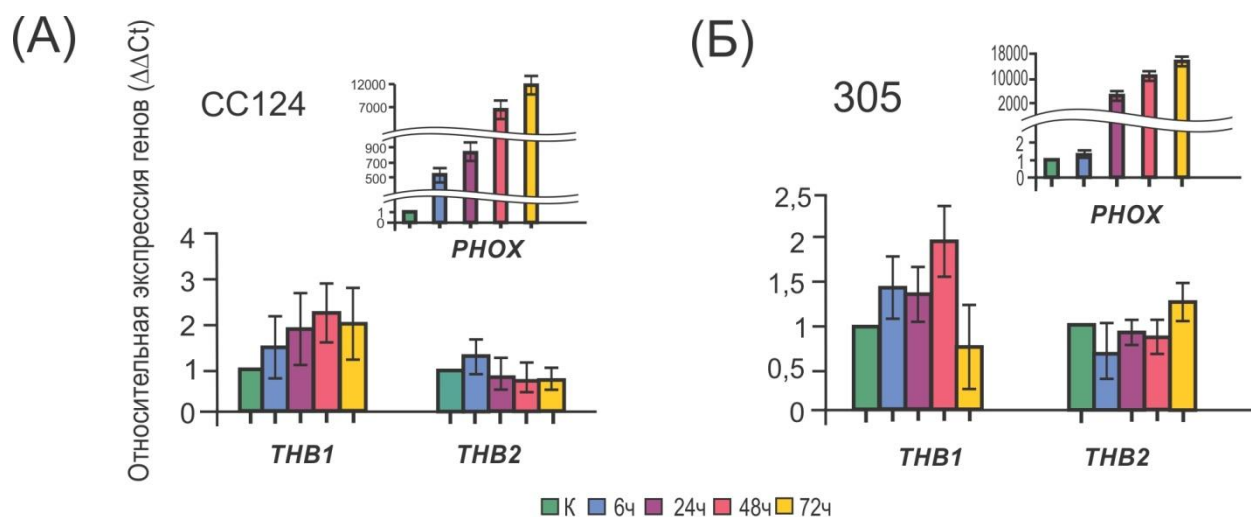


Рис. 9. Экспрессия генов *THB1*, *THB2* и *PHOX* в штаммах CC124 (А) и 305 (Б) в среде без фосфора. Уровни экспрессии генов даны относительно референс-гена *RACK1*, значение экспрессии которого принято за 1. Вставки: Относительная экспрессия гена *PHOX* у штаммов CC124 и 305 в среде без фосфора.

3.4. Генерация NO в клетках в условиях дефицита фосфора

Поскольку ранее было показано, что в условиях голодания по азоту и сере клетки *C. reinhardtii* генерируют NO (Wei et al., 2014; Minaeva et al., 2017), мы предположили, что ее формирование может происходить также при удалении из среды источника фосфора. Как видно из данных рис. 10, в клетках дикого типа действительно происходит возрастание уровней флуоресценции уже через 15 мин, после чего фиксируется дальнейшее увеличение, которое через 30 мин приблизительно в 40 раз превышало уровни окиси азота, формируемые в контрольных клетках (среда TAP). При дальнейшем инкубировании уровни флуоресценции снижались до значений в 2-4 раза, превышающих уровни контроля.

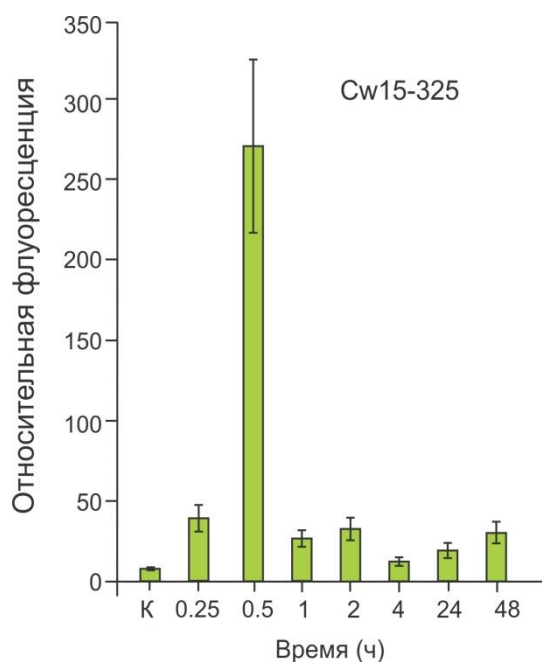


Рис. 10. Генерация окиси азота в клетках, инкубированных в среде без фосфора. Интенсивность флуоресценции определялась после внесения $1 \mu\text{M}$ DAF FM DA и выражалась в относительных единицах, пересчитанных на $1 \mu\text{кг}$ хлорофилла. Автофлуоресценция вычиталась из значений полученной флуоресценции.

В дальнейшем предстоит выяснить: за счет какого механизма может происходить формирование окиси азота?

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее было также установлено, что усеченный гемоглобин 1, вовлечен в систему ответа на голодание по сере (Minaeva et al., 2017). По нашим данным при удалении фосфора из среды происходит индукция семи генов (рис. 4), кодирующих усеченные гемоглобины, примечательно, что наибольшие уровни транскрипции демонстрировали три *THB*: *THB1*, *THB2* и *THB12*, которые экспрессировались и в условиях голодания по сере (Minaeva et al., 2017). Биохимический анализ *THB1* и *THB2* установил наличие у них диоксигеназной активности. Примечательно, что при удалении фосфора транскрипция обоих генов индуцируется дополнительно при обработке клеток генератором NO - DEA NONOate (рис. 8), что указывает на роль окиси азота в регуляции транскрипции. Однако транскрипция *THB2* находится также под контролем транскрипционного регулятора PSR1 (рис. 7), что предполагает наличие двойного контроля экспрессии *THB2* в условиях дефицита фосфора.

Предыдущие исследования показали, что одним из триггеров адаптивных ответов *C. reinhardtii* на удаление макроэлементов (азота или серы) является окись азота (Wei et al., 2014; Minaeva et al., 2017, PLOS One; Zalutskaya et al., 2018, Protistology). Наши данные однозначно свидетельствуют о том, что окись азота (NO) формируется также при удалении фосфора из среды, причем динамика процесса сходна с зафиксированной ранее динамикой для условий дефицита серы (рис. 10; Zalutskaya et al., 2018, Protistology). Это позволяет нам предполагать, что генерация NO относится к категории «общего», а не специфического элемента в системах адаптации *C. reinhardtii* к условиям дефицита основных макроэлементов.

В дальнейшем запланировано выяснить, за счет какого механизма может происходить формирование окиси азота, провести анализ уровней формирования NO в клетках, мутантных по *THB1* и *THB2*, а также анализ жизнеспособности указанных мутантов, что позволит сделать вывод о роли двух гемоглобинов в адаптации к дефициту фосфора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ регуляции транскрипции ТНВ-генов, кодирующих усеченные гемоглобины, *Chlamydomonas reinhardtii* в условиях дефицита фосфора, позволяет прийти к следующему заключению:

В условиях голодания клеток по фосфору происходит увеличение транскрипции семи генов, из которых уровни экспрессии трех (*THB1*, *THB2* и *THB12*) превышают 10-50 раз, а уровни еще четырех (*THB3*, *THB4*, *THB5* и *THB6*) увеличиваются только в 2-3 раза.

Анализ штаммов, мутантных по гену *PSR1* показал, что при удалении фосфора из среды транскрипция *THB1* не контролируется регулятором *PSR1*, тогда как экспрессия *THB2* находится под контролем этого транскрипционного фактора.

Впервые показано, что адаптация *C. reinhardtii* к дефициту фосфора в среде сопровождается генерацией окиси азота, которая вовлечена в контроль индукции *THB1* и *THB2*.

По нашему мнению окись азота и усеченные гемоглобины ТНВ1 и ТНВ2 могут представлять общие компоненты ответов *C. reinhardtii* на дефицит в среде основных макроэлементов: азота, серы и фосфора.

ВЫВОДЫ:

1. В условиях голодания *C. reinhardtii* по фосфору в клетках происходит увеличение транскрипции семи генов, из которых уровни экспрессии трех (*THB1*, *THB2* и *THB12*) возрастают в 17-50 раз, а уровни еще четырех (*THB3*, *THB4*, *THB5* и *THB6*) увеличиваются только в 2-3 раза.
2. Адаптация *C. reinhardtii* к дефициту фосфора в среде сопровождается генерацией окиси азота (NO).
3. При удалении фосфора из среды индукция транскрипции гена *THB1* контролируется окисью азота и не регулируется транскрипционным фактором PSR1.
4. В условиях дефицита фосфора экспрессия гена *THB2* находится под двойным контролем: регулируется белком PSR1 и NO.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность научному руководителю Елене Викторовне Ермиловой за предоставленную мне возможность выполнять научную работу в лаборатории адаптации микроорганизмов, за уделенное внимание и за помощь на всех этапах выполнения выпускной квалификационной работы.

Также приношу благодарность старшим научным сотрудникам лаборатории адаптации микроорганизмов – Залуцкой Жаннете Михайловне и Лапиной Татьяне Викторовне и лаборанту-исследователю Филиной Валентине Юрьевне за оказанную мне помощь в организации плана работы и выполнении экспериментальных задач.

Выражаю признательность сотрудникам кафедры микробиологии Санкт-Петербургского государственного университета во главе с заведующих Александром Васильевичем Пиневицем.

Благодарность выражаю сотрудникам ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Санкт-Петербургского государственного университета.

Список литературы

1. Allen M. D. et al. Manganese deficiency in *Chlamydomonas* results in loss of photosystem II and MnSOD function, sensitivity to peroxides, and secondary phosphorus and iron deficiency // *Plant physiology*. – 2007. – Т. 143. – №. 1. – С. 263-277.
2. Ascenzi P. et al. Mycobacterial truncated hemoglobins: from genes to functions // *Gene*. – 2007. – Т. 398. – №. 1-2. – С. 42-51.
3. Ascenzi P. et al. Nitrite-reductase and peroxynitrite isomerization activities of *Methanosarcina acetivorans* protoglobin // *PLoS one*. – 2014. – Т. 9. – №. 5. – С. e95391.
4. Ascenzi P., Visca P. Scavenging of reactive nitrogen species by mycobacterial truncated hemoglobins // *Methods in enzymology*. – Academic Press, 2008. – Т. 436. – С. 317-337.
5. Atteia A. et al. Pyruvate formate-lyase and a novel route of eukaryotic ATP synthesis in *Chlamydomonas* mitochondria // *Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – Т. 281. – №. 15. – С. 9909-9918.
6. Auesukaree C. et al. Intracellular phosphate serves as a signal for the regulation of the PHO pathway in *Saccharomyces cerevisiae* // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Т. 279. – №. 17. – С. 17289-17294.
7. Bajhaiya A. K. et al. PSR1 is a global transcriptional regulator of phosphorus deficiency responses and carbon storage metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Plant physiology*. – 2016. – Т. 170. – №. 3. – С. 1216-1234.
8. Bari R. et al. PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants // *Plant physiology*. – 2006. – Т. 141. – №. 3. – С. 988-999.
9. Benemann J. R. et al. Hydrogen evolution by a chloroplast-ferredoxin-hydrogenase system // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1973. – Т. 70. – №. 8. – С. 2317-2320.
10. Blaby I. K. et al. The *Chlamydomonas* genome project: a decade on // *Trends in plant science*. – 2014. – Т. 19. – №. 10. – С. 672-680.
11. Catala R. et al. The Arabidopsis E3 SUMO ligase SIZ1 regulates plant growth and drought responses // *The Plant Cell*. – 2007. – Т. 19. – №. 9. – С. 2952-2966.
12. Chamizo-Ampudia A. et al. Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis // *Trends in plant science*. – 2017. – Т. 22. – №. 2. – С. 163-174.
13. Chamizo-Ampudia A. et al. Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis // *Trends in plant science*. – 2017. – Т. 22. – №. 2. – С. 163-174.
14. Chiou T. J. et al. Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in Arabidopsis // *The Plant Cell*. – 2006. – Т. 18. – №. 2. – С. 412-421.
15. Delhaize E., Randall P. J. Characterization of a phosphate-accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiology*. – 1995. – Т. 107. – №. 1. – С. 207-213.
16. Dong B., Rengel Z., Delhaize E. Uptake and translocation of phosphate by *pho2* mutant and wild-type seedlings of *Arabidopsis thaliana* // *Planta*. – 1998. – Т. 205. – №. 2. – С. 251-256.
17. Ermilova E. V. et al. Regulation by light of ammonium transport systems in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Plant, cell & environment*. – 2010. – Т. 33. – №. 6. – С. 1049-1056.
18. Floryszak-Wieczorek J. et al. Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? // *Planta*. – 2006. – Т. 224. – №. 6. – С. 1363-1372.

19. Fristedt U. et al. Studies of cytochrome c oxidase-driven H⁺-coupled phosphate transport catalyzed by the *Saccharomyces cerevisiae* Pho84 permease in coreconstituted vesicles //Biochemistry. – 1999. – T. 38. – №. 48. – C. 16010-16015.
20. Fujii H. et al. A miRNA involved in phosphate-starvation response in Arabidopsis //Current Biology. – 2005. – T. 15. – №. 22. – C. 2038-2043.
21. Gardner P. R. Assay and characterization of the NO dioxygenase activity of flavohemoglobins //Methods in enzymology. – Academic Press, 2008. – T. 436. – C. 217-237.
22. Hanikenne M. et al. A comparative inventory of metal transporters in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the red alga *Cyanidioschyzon merolae* //Plant Physiology. – 2005. – T. 137. – №. 2. – C. 428-446.
23. Harris E. H. *Chlamydomonas* as a model organism //Annual review of plant biology. – 2001. – T. 52. – №. 1. – C. 363-406.
24. Harris E. H. Culture and storage methods //The *Chlamydomonas* Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. – 1989. – C. 25-63.
25. Hemschemeier A. et al. Hypoxic survival requires a 2-on-2 hemoglobin in a process involving nitric oxide //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2013. – T. 110. – №. 26. – C. 10854-10859.
26. Hemschemeier A. et al. Hypoxic survival requires a 2-on-2 hemoglobin in a process involving nitric oxide //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2013. – T. 110. – №. 26. – C. 10854-10859.
27. Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts //Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2002. – T. 66. – №. 2. – C. 300-372.
28. Horikoshi K. et al. (ed.). Extremophiles handbook. – Springer Science & Business Media, 2011. – C. 120-139.
29. Huwald D. et al. Characterization of unusual truncated hemoglobins of *Chlamydomonas reinhardtii* suggests specialized functions //Planta. – 2015. – T. 242. – №. 1. – C. 167-185.
30. Jensen L. T., Ajuja-Alemanji M., Culotta V. C. The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by PHO84 also functions in manganese homeostasis //Journal of Biological Chemistry. – 2003.
31. Johnson E. A. et al. Characterization of THB1, a *Chlamydomonas reinhardtii* truncated hemoglobin: linkage to nitrogen metabolism and identification of lysine as the distal heme ligand //Biochemistry. – 2014. – T. 53. – №. 28. – C. 4573-4589.
32. Kobayashi I. et al. Insertional mutagenesis in a homologue of a Pi transporter gene confers arsenate resistance on *Chlamydomonas* //Plant and cell physiology. – 2003. – T. 44. – №. 6. – C. 597-606.
33. Kühn C., Klipp E. Zooming in on yeast osmoadaptation //Advances in systems biology. – Springer, New York, NY, 2012. – C. 293-310.
34. Li X. et al. An indexed, mapped mutant library enables reverse genetics studies of biological processes in *Chlamydomonas reinhardtii* //The Plant Cell. – 2016. – T. 28. – №. 2. – C. 367-387.
35. Lipsick J. S. One billion years of Myb //Oncogene. – 1996. – T. 13. – №. 2. – C. 223-235.
36. Minaeva E. et al. Truncated hemoglobin 1 is a new player in *Chlamydomonas reinhardtii* acclimation to sulfur deprivation //PloS one. – 2017. – T. 12. – №. 10. – C. e0186851.

37. Miura K. et al. The Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2005. – T. 102. – №. 21. – C. 7760-7765.
38. Molnar A. et al. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii* //Nature. – 2007. – T. 447. – №. 7148. – C. 1126.
39. Moseley J. L., Chang C. W., Grossman A. R. Genome-based approaches to understanding phosphorus deprivation responses and PSR1 control in *Chlamydomonas reinhardtii* //Eukaryotic cell. – 2006. – T. 5. – №. 1. – C. 26-44.
40. Ogawa N., DeRisi J., Brown P. O. New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis //Molecular biology of the cell. – 2000. – T. 11. – №. 12. – C. 4309-4321.
41. Persson B. L. et al. Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae* //Current genetics. – 2003. – T. 43. – №. 4. – C. 225-244.
42. Pesce A. et al. A novel two-over-two α -helical sandwich fold is characteristic of the truncated hemoglobin family //The EMBO journal. – 2000. – T. 19. – №. 11. – C. 2424-2434.
43. Pesce A., Bolognesi M., Nardini M. The diversity of 2/2 (truncated) globins //Advances in microbial physiology. – Academic Press, 2013. – T. 63. – C. 49-78.
44. Popov N. et al. Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates //Acta biologica et medica Germanica. – 1975. – T. 34. – №. 9. – C. 1441-1446.
45. Quisel J. D., Wykoff D. D., Grossman A. R. Biochemical characterization of the extracellular phosphatases produced by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* //Plant physiology. – 1996. – T. 111. – №. 3. – C. 839-848.
46. Rubio V. et al. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae //Genes & development. – 2001. – T. 15. – №. 16. – C. 2122-2133.
47. Sager R., Granick S. Nutritional control of sexuality in *Chlamydomonas reinhardtii* //The Journal of general physiology. – 1954. – T. 37. – №. 6. – C. 729-742.
48. Sanz-Luque E. et al. THB 1, a truncated hemoglobin, modulates nitric oxide levels and nitrate reductase activity //The Plant Journal. – 2015. – T. 81. – №. 3. – C. 467-479.
49. Shimogawara K. et al. *Chlamydomonas reinhardtii* mutants abnormal in their responses to phosphorus deprivation //Plant physiology. – 1999. – T. 120. – №. 3. – C. 685-694.
50. Stern D. (ed.). The *Chlamydomonas* sourcebook: organellar and metabolic processes. – Academic Press, 2009. – T. 2. – C. 189-215.
51. Storz G., Storz G., Spiro S. Sensing and Responding to Reactive Oxygen and Nitrogen Species //Bacterial stress responses. – 2010.
52. Sturms R., DiSpirito A. A., Hargrove M. S. Plant and cyanobacterial hemoglobins reduce nitrite to nitric oxide under anoxic conditions //Biochemistry. – 2011. – T. 50. – №. 19. – C. 3873-3878.
53. Vinogradov S. N. et al. A model of globin evolution //Gene. – 2007. – T. 398. – №. 1-2. – C. 132-142.
54. Vinogradov S. N. et al. A phylogenomic profile of globins //BMC Evolutionary Biology. – 2006. – T. 6. – №. 1. – C. 31.

55. Vinogradov S. N. et al. Bacterial and archaeal globins—a revised perspective //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. – 2013. – T. 1834. – №. 9. – C. 1789-1800.
56. Vinogradov S. N. et al. Three globin lineages belonging to two structural classes in genomes from the three kingdoms of life //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2005. – T. 102. – №. 32. – C. 11385-11389.
57. Vinogradov S. N., Moens L. Diversity of globin function: enzymatic, transport, storage and sensing //Journal of Biological Chemistry. – 2008.
58. Vuletich D. A., Lecomte J. T. J. A phylogenetic and structural analysis of truncated hemoglobins //Journal of molecular evolution. – 2006. – T. 62. – №. 2. – C. 196-210.
59. Wang Z. Y. et al. A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an Arabidopsis Lhcb gene //The plant cell. – 1997. – T. 9. – №. 4. – C. 491-507.
60. Wei W. et al. Melatonin enhances plant growth and abiotic stress tolerance in soybean plants //Journal of Experimental Botany. – 2014. – T. 66. – №. 3. – C. 695-707.
61. Wittenberg J. B. et al. Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes, and plants //Journal of Biological Chemistry. – 2002. – T. 277. – №. 2. – C. 871-874.
62. Wykoff D. D. et al. The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii* //Plant physiology. – 1998. – T. 117. – №. 1. – C. 129-139.
63. Yehudai-Resheff S. et al. Integration of chloroplast nucleic acid metabolism into the phosphate deprivation response in *Chlamydomonas reinhardtii* //The Plant Cell. – 2007. – T. 19. – №. 3. – C. 1023-1038.
64. Zalutskaya Z., Filina V., Ermilova E. Sulfur deprivation-induced expression of THB1, a *Chlamydomonas reinhardtii* truncated hemoglobin, is mediated by nitrate reductase-dependent NO production //Protistology. – 2018. – T. 12. – №. 2.
65. Zhang Z. et al. Insights into the survival of *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur starvation based on microarray analysis of gene expression //Eukaryotic cell. – 2004. – T. 3. – №. 5. – C. 1331-1348.
66. Zhao T. et al. A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* //Genes & development. – 2007. – T. 21. – №. 10. – C. 000-000.
67. Лось Д. А. Сенсорные системы цианобактерий. – 2010. – С. 217.