

На правах рукописи

НИКИТИН Максим Михайлович

**Регуляция хемотаксиса в жизненном цикле
одноклеточной зеленой водоросли
*Chlamydomonas reinhardtii***

03.00.07 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург - 2006

Работа выполнена в лаборатории микробиологии Биологического научно-исследовательского института Федерального государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет» Федерального агентства по образованию и в отделе биохимии и молекулярной биологии университета г. Кордоба (Испания).

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор
Ермилова Елена Викторовна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Симаров Борис Васильевич

доктор биологических наук, профессор
Карпов Сергей Алексеевич

Ведущая организация:

Институт Цитологии РАН

Защита состоится «11» мая 2006 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 212 232.07 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора биологических наук при Санкт-Петербургском государственном университете по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9, Биолого-почвенный факультет СПбГУ, аудитория 133

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке имени А. М. Горького Санкт-Петербургского государственного университета.

Автореферат разослан «5» апреля 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



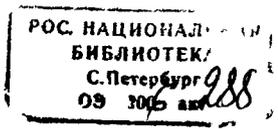
Е. И. Шарова

2006А
7193

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Направленное движение клеток в ответ на действие внешних стимулов, определяемое в литературе как поведение, описано у многих одноклеточных организмов на разных стадиях их развития. Поведение является наиболее сложной формой жизнедеятельности организма и в самом общем виде представляет собой формируемый организмом отклик на сигналы, поступившие к нему из окружающей среды (Гаазе-Раппопорт, Поспелов, 1987). В последние годы предпринимаются многочисленные попытки определения механизмов, лежащих в основе взаимодействия подвижных клеток с окружающей средой и последующей ориентированной относительно внешнего раздражителя двигательной реакции – поведенческой реакции. Поведенческие реакции часто называют таксисами. Таксисы описаны у различных представителей архей, бактерий и эукариотических микроорганизмов. Способность к поведенческим реакциям позволяет микроорганизмам искать питательные субстраты и избегать вредных воздействий. Особый интерес к изучению механизмов контроля двигательных поведенческих ответов можно объяснить как важной биотогической ролью данного явления, так и выявленными взаимосвязями регуляции поведения одноклеточных организмов с такими фундаментальными процессами как дифференцировка клеток и межклеточная сигнализация при половом размножении.

В настоящее время наиболее подробно исследованы молекулярные механизмы зависимого от жизненного цикла контроля систем направленного движения бактерий (Ермилова и др., 2004). У эукариотических микроорганизмов регуляция подвижности и поведения в жизненном цикле изучена главным образом у клеточного миксоциста *Dictyostelium discoideum* с амебодным типом движения (Williams, Harwood, 2003; Strmecki et al., 2005). Вместе с тем, у одноклеточных эукариот, обладающих жгутиками и ресничками, исследовалась в основном структурно-функциональная организация систем движения. Подобное ограничение связано с особыми требованиями, предъявляемыми к объектам исследования, и, прежде всего, с точки зрения знаний биологии, физиологии, частной генетики и наличия разработанных методов молекулярно-генетического анализа. В этом отношении *Chlamydomonas reinhardtii* является уникальным модельным организмом для проведения молекулярно-генетических исследований поведенческих реакций. В последние годы достигнуты значительные успехи в расшифровке молекулярных механизмов, контролирующих у этого модельного микроорганизма светозависимые поведенческие ответы (Ehlenbeck et al., 2002) и хемотаксис к органическим соединениям (Ermilova et al., 2000). С целью расширения, углубления и детализации механизмов контроля направленного движения *C. reinhardtii* необходим анализ дополнительных систем рецепции и передачи сигналов на разных этапах жизненного цикла организма.



Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось комплексное исследование хемотаксиса *C reinhardtii* к наиболее предпочтительному для микроорганизма источнику азота, ионам аммония, на разных этапах жизненного цикла, а также выявление физиологической основы взаимосвязи между процессами ассимиляции аммония и направленного движения к аммонiu (хемотаксиса). Задачи работы были связаны с решением принципиальных вопросов, ранее не освещенных в литературе. В частности, предполагалось экспериментально исследовать и теоретически проанализировать:

- 1 Хемотаксис к аммонiu подвижных клеток, представляющих разные стадии жизненного цикла: вегетативные клетки, прегаметы (некомпетентные гаметы), гаметы
- 2 Действие сигналов (голодание по источнику азота, свет), регулирующих формирование зрелых гамет, на характер реакции хемотаксиса к аммонiu
- 3 Два типа транспортных систем для переноса аммония в клетки, транспортеров с низким сродством к аммонiu (LATS) и транспортеров с высоким сродством к аммонiu (HATS), у вегетативных клеток, прегамет и гамет
- 4 Возможную роль транспортеров аммония в контроле реакции хемотаксиса к аммонiu.

Научная новизна. Впервые показано, что хемотаксическое поведение одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* изменяется на разных этапах жизненного цикла. Предложена модель контроля хемотаксиса к аммонiu/метиламмонiu в ходе гаметогенеза, согласно которой регуляция изменений в системе хемотаксиса включает два этапа: первый, контролируемый аммонием и независимый от света этап, и второй этап, контролируемый действием света. Впервые проанализирована активность двух типов транспортных систем на разных этапах жизненного цикла *C. reinhardtii* и охарактеризованы особенности экспрессии восьми генов семейства *Amt1*. В работе выявлена совершенно новая область использования фототрофными организмами транспортеров аммония – контроль двигательной поведенческой реакции.

Научно-практическое значение. Полученные результаты могут быть использованы для дальнейшего изучения механизмов регуляции транспортных систем, обеспечивающих перенос аммония. Идентификация компонентов, осуществляющих передачу сигналов в клетке, является одним из важнейших шагов на пути к пониманию молекулярных механизмов работы регуляторных систем организма. Предложенный оригинальный метод определения стадий гаметогенеза на основе выявленного отличия в поведенческих ответах между вегетативными клетками и зрелыми гаметами может быть применен в исследованиях механизмов

дифференцировки Ряд данных может быть использован в учебном процессе на кафедре Микробиологии СПбГУ.

Апробация работы. Материалы, вошедшие в диссертационную работу, были представлены на международной конференции «Molecular mechanisms of genetic processes and biotechnology» (Москва, Минск, 2001), на X международной конференции «Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*» (Ванкувер, 2002), на конференции «Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития» (Москва, 2004), на международном симпозиуме «Biological Motility» (Пушино, 2004)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 4 статьи и 8 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях

Структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературных данных, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 112 страницах, содержит 10 таблиц и 33 рисунка, список литературы включает 187 наименований

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы Штаммы *Chlamydomonas reinhardtii*, использованные в работе, любезно предоставлены: CC-124 – Э Харрис (Коллекция Культур *Chlamydomonas* Университета г Дюк, США); 620, 621 – С Пиртоном (Лондонский Университет, Великобритания), CF3, CF5 и CF46 – К Бекон (Университет г Фрайбурга, Германия), CR02, CR39 и CR40 – К. Кимом (Университет Калифорнии, США).

Условия культивирования Культуры водорослей выращивали в среде TAP или TMP (без Три-ацетата) (Harris, 1989). В экспериментах использовали культуры, выращенные синхронно в режиме освещения люминесцентными лампами 12 ч свет · 12 ч темнота при 23°C (освещенность 2000 люкс). Для опытов культуры пересеивали каждые 72 часа.

Оценка хемотаксиса Реакции хемотаксиса изучали капиллярным методом с использованием плоскостенных капилляров Перфильева (Emilova et al, 1993). Для характеристики определяемой величины по имеющейся выборке использовали среднее арифметическое $X = \bar{X} \pm S_x t_p$, где S_x – среднеквадратичное отклонение по выборке, t_p – коэффициент Стьюдента для уровня значимости $P = 0,05$.

Получение и определение процента образовавшихся гамет Процент зрелых гамет, способных к формированию зигот, рассчитывали по формуле (Beck, Asker, 1992):

$$\% = \frac{Q}{B + 2Q} \cdot 100, \text{ где } Q - \text{ количество четырехжгутиковых клеток, } B - \text{ количество}$$

двухжгутиковых клеток, a – коэффициент, определяемый как отношение количества тестируемых гамет к общему количеству гамет

Получение мутанта методом инсерционного мутагенеза. Для трансформации была использована плазмида pSP124S, содержащая бактериальный ген *ble*, придающий клеткам устойчивость к антибиотик-зеомицину (Lumbreteras et al, 1998) Трансформацию проводили линейной формой плазмиды методом встряхивания со стеклянными шариками (Kindle et al, 1989) Устойчивые к зеомицину трансформанты использовали в последующем отборе мутантов, резистентных к метиламмоний и демонстрирующих замедленный рост на среде, содержащей в качестве источника азота глутамин. Процедуры скрещиваний и тетрадного анализа выполнялись стандартными методами (Harris, 1989).

Определение поглощения [¹⁴C]-метиламмония. Вегетативные клетки из логарифмической фазы роста (15-20 мкг хлорофилла) осаждали центрифугированием и ресуспендировали в среде TMP без азота Для получения прегамет и гамет клетки инкубировали 18 ч в темноте или на свету, соответственно Затем к 2 мл суспензии добавляли [¹⁴C]-метиламмоний (NEN, США) до конечных концентраций 6, 8, 12,5, 25, 50, 100 и 200 мкМ Каждые 3 минуты при постоянном перемешивании отбирали по 250 мкл суспензии, которую центрифугировали (12000 об/мин, 1 мин) в удлинённых эппендорфах с 80 мкл смеси динонилфталата (Fluka, Швейцария) с силиконом (Fluka, 60-40) Затем 50 мкл супернатанта добавляли к 2 мл специального буфера (Ready Gcl, Beckman), и оценивали количество распадов ядра изотопа ¹⁴C в счетчике LS 6000TA (Beckman) Начальную скорость поглощения V вычисляли для каждого временного отрезка по следующей формуле

$$(Franco et al, 1988). V = \frac{cpm1 - cpm2}{R \cdot (t_2 - t_1)},$$
 где $cpm1$ и $cpm2$ – число распадов/мин [¹⁴C]-метиламмония

в моменты времени t_1 и t_2 , соответственно; R – исходное число распадов/мкмоль/мин Значения V_{max} и K_m определяли графическим способом

Выделение тотальной ДНК и РНК. Вегетативные клетки (50 мл) из логарифмической фазы роста осаждали центрифугированием, осадок ресуспендировали в 1 мл буфера (50 мМ Трис-НСl, рН 8, 0,3 М NaCl; 5 мМ ЭДТА, 2% SDS) и после центрифугирования супернатант отбирали, трижды обрабатывали смесью фенола, хлороформа и изоамилового спирта (25:24:1), после чего нуклеиновые кислоты переосаждали в хлороформе (Sambrook et al, 1989) Для выделения ДНК образцы оставляли в 95° этаноле на 30 мин при -20°С, затем переосаждали 70° этанолом. Осадок высушивали и растворяли в воде MilliQ Для выделения РНК образцы обрабатывали 95° этанолом 3-4 часа при -20°С, после чего ресуспендировали в 4М LiCl и оставляли на 4 ч при -4°С Затем РНК осаждали из раствора двойным объемом 70° этанола и растворяли в воде MilliQ с 0,1% диэтилпирикарбонатом

Блот-гибридизация по Саузеру. Выделенная тотальная ДНК обрабатывалась рестриктазами *ApaI*, *PstI* или *PvuII* (Fermentas, Канада), после чего образовавшиеся фрагменты разделяли электрофорезом в 0,7%-агарозном геле и переносили на нейлоновую мембрану Nitran N (Schleicher&Shuell, США). Изготовление меченого зонда (ПЦР продукт гена *ble*) с использованием дУТФ-диоксигенина, а также отмывку мембраны проводили согласно рекомендации фирмы-производителя (Boehringer Mannheim, Германия) Детекцию сигнала производили на фотопленке XAR-5 (Kodak, США).

Метод ПЦР с предшествующей обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Для синтеза одноцепочечной кДНК из тотальной РНК, выделенной из разных штаммов, использовали N-(polyT)_{20mer} праймеры в соответствии с инструкцией фирмы-производителя (Invitrogen, Нидерланды). Синтезированной кДНК хранили при -40°C Реакции амплификации методом ПЦР осуществлялись в объеме 25 мкл со следующими компонентами: 0,2 пМ каждого праймера; 0,2 мМ смеси дезоксирибонуклеотидилфосфатов; 0,5 ед *Taq* ДНК-полимеразы (Biotoools, Испания), 2,5 мМ MgCl₂; 1-2 мкл одноцепочечной кДНК, 2,5 мкл реакционного буфера и 2-3% диметилсульфоксида (ДМСО) Условия реакций были следующими: 95°C, 5 мин; 40 циклов: 95°C, 30 с, 53-68°C, 30 с, 72°C, 15 с; 72°C, 10 мин Продукты ПЦР реакции разделяли электрофорезом в 0,8%-агарозном геле Анализ гелей проводился с помощью оптической системы GelDoc 2000 (BioRad, США) и программного обеспечения Quantity One v. 4.1.

Метод ПЦР в режиме реального времени. ПЦР реакции проводились на установке LightCycler Instrument (BioRad iCycler iQ Real-Time PCR Detection System) в соответствии с правилами производителя (Molecular Probes, Нидерланды), в качестве флуоресцирующего красителя использовался SYBR Green I Реакции осуществлялись в объеме 25 мкл со следующими компонентами: 0,2 пМ каждого праймера, 0,2 мМ смеси дезоксирибонуклеотидилфосфатов, 0,5 ед *Taq* ДНК-полимеразы (Biotoools, Испания); 2,5 мМ MgCl₂; 1-2 мкл кДНК, 1,25 мкл SYBR Green I, 2,5 мкл реакционного буфера. Условия реакций были следующими: 95°C, 5 мин, 40 циклов: 95°C, 30 с 53-68°C, 30 с, 72°C, 15 с, измерение флуоресценции (84°C, 10 с), 72°C, 10 мин Специфичность синтеза цепей ДНК проверялась программой iCycler iQ, Optical System Software v 3 В качестве контроля использовался ген убиквитинлигазы *Scimhardtii*, который экспрессируется конститутивно Скорость синтеза цепи ДНК каждого транскрипта (Ct) вычислялась по методу PCR Base Line программного обеспечения LightCycler (iCycler iQ, Optical System Software v 3) при постоянном уровне флуоресценции Значения Ct определялись по трем образцам по три повтора в каждом Относительная разница уровней экспрессии генов вычислялась по формуле: $\Delta = 2^{-(Ct_{\text{образец}} - Ct_{\text{контроль}})}$

сайт-специфическая амплификация методом ПЦР (ССА-ПЦР). Для идентификации участков, отличающихся маркерную ДНК в мутанте *hat1*, были использованы праймеры, содержащие на 3'-

конце специфические последовательности, которые соответствовали сайтам рестрикции ферментов (рис 1) Выделенная тотальная ДНК использовалась в двухэтапном ПЦР (González-Ballester et al , 2005)

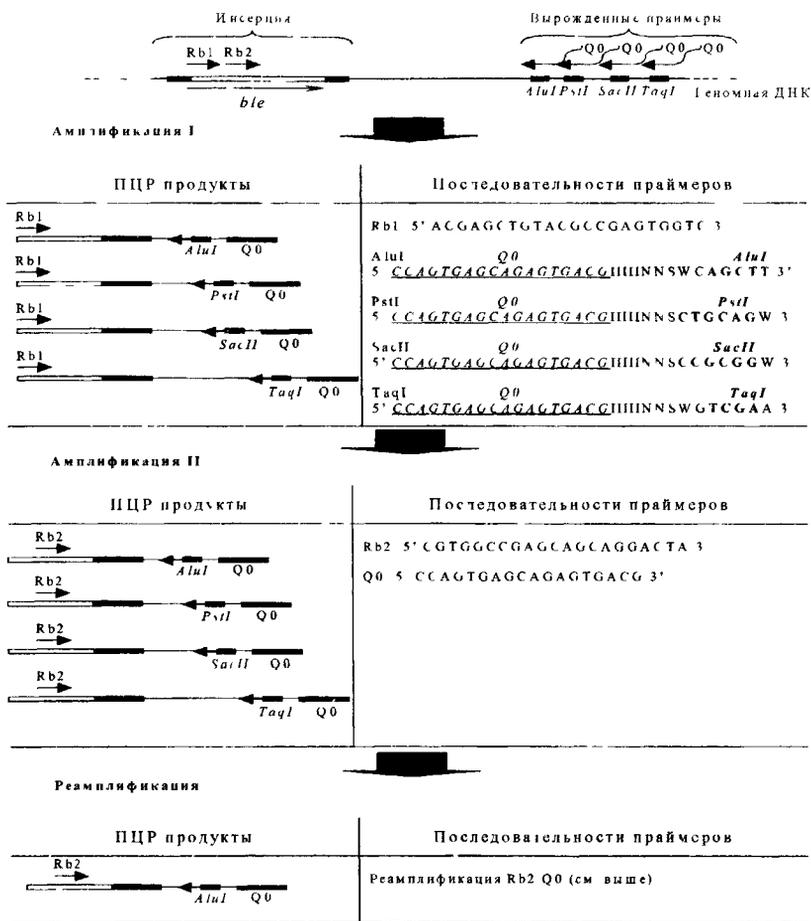


Рис. 1. Схема сайт-специфической амплификации методом ПЦР (ССА-ПЦР)

На первом этапе ПЦР проводились с праймером *Rb1* (специфичным к гену *ble*) и вырожденными праймерами к сайтам рестрикции ферментов *AluI*, *PstI*, *SacII* и *TaqI* (в четырех параллельных реакциях) На втором этапе ПЦР проводились со специфичными праймерами *Rb2* и *Q0* В качестве матрицы использовался ПЦР-продукт первого этапа ПЦР-продукты разделялись электрофорезом в 0,8%-агарозном геле Анализ гелей проводился с помощью оптической системы GelDoc 2000

(BioRad) и программного обеспечения Quantity One v 4.1. В случае недостаточного количества продукта проводили реамплификацию (аналогично второму этапу ПЦР)

Секвенирование продуктов ПЦР. Для секвенирования использовали ДНК, выделенную из замороженного (-20°C, 30 мин) фрагмента геля, соответствующего ПЦР продукту. Секвенирование осуществлялось в Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) Университета Кордоба (Испания) на автоматических секвенаторах ABI 377 (Applied Biosystems; Perkin-Elmer Co., США). Анализ полученных последовательностей проводился с помощью программного обеспечения DNASTAR v 4.05, NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) и Chlamy JGI Blast (http://genome.jgi-psf.org/chlre2/chlre2_home.html)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

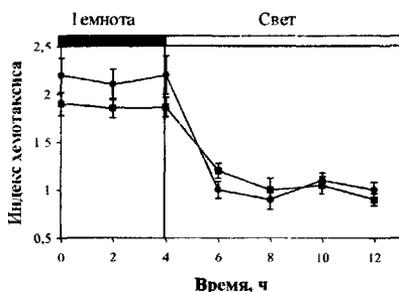


Рис. 2. Хемотаксис к аммонии (●) и метиламмонии (■) прегамет *C. reinhardtii*, освещенных белым светом. Освещенность света 2000 лк

как и вегетативные клетки, демонстрировали реакции хемотаксиса к аммонии/метиламмонии; действие света на прегаметы приводило к полной утрате хемотаксиса через 2 часа

Необходимость света для завершения гаметогенеза может быть связана с его энергетической или сигнальной функцией в этом процессе. Для выяснения этого вопроса гаметогенез был проведен в минеральной среде без ацетата Na (TMP-N) и в среде, содержащей ацетат Na (TAP-N). В обоих вариантах опыта через 24 часа освещения сформировались гаметы, утратившие хемотаксис к аммонии. Добавление ингибитора фотосистемы II, 3'-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевны (ДХММ), привело к нарушению процесса дифференцировки в минеральной среде без ацетата Na. В присутствии ацетата Na и ДХММ клетки полностью утратили хемотаксическую активность к аммонии, что свидетельствует о том, что (1) как свет, так и ацетат могут служить экзогенными источниками энергии для процесса дифференцировки, и (2)

необходимость света в присутствии ацетата и ДХММ не может быть связана с его энергетической функцией. Таким образом, процессы преобразования систем, отвечающих за формирование состояния компетентности и утрату хемотаксиса к аммонии у гамет, регулируются одними внешними сигналами: отсутствием источника азота (аммония) и светом. Впоследствии в работе коллег было показано, что сигнал света, приводящий к утрате реакции хемотаксиса, воспринимается фоторецептором синего света фототропином (Ermllova et al., 2004).

Установлено, что как mt^+ , так и mt гаметы полностью утрачивали хемотаксис к ионам аммония, т.е. этот процесс находится под контролем гамета-специфичных генов, общих для обоих типов гамет.

Характеристика мутантов, способных к гаметогенезу в отсутствие светового сигнала

Были изучены хемотактические ответы трех *lrg* мутантов, которые дифференцировались в компетентные гаметы, как на свету, так и в отсутствие светового сигнала (Glockner, Beck, 1995). В отличие от дикого типа, вегетативные клетки *lrg* штаммов в среде без азота в темноте полностью утратили хемотаксис к аммонии/метиламмонии. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что в контроль изменений в системе хемотаксиса и приобретение состояния компетентности у гамет вовлечены общие компоненты.

Роль аммония в процессе преобразования системы хемотаксиса при гаметогенезе. Выявлено нарушение утраты хемотактической активности в присутствии ассимилируемых *S. reinhardtii* аминокислот в среде с ацетатом

Na. Это может быть связано с аккумуляцией ионов аммония в среде при дезаминировании аминокислот неспецифической оксидазой L-аминокислот (рис. 3). Сделан вывод о ключевой роли ионов аммония в контроле преобразования системы хемотаксиса в процессе гаметогенеза.

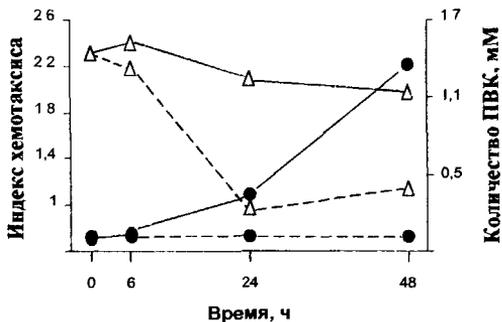


Рис. 3. Кинетика образования пирувиноградной кислоты и изменение хемотактической активности вегетативных клеток

Вегетативные клетки из логарифмической фазы роста были ресуспендированы в безазотной среде (TAP-N (сплошная линия) и TMR-N (пунктирная линия)), содержащей 2 мМ аламина. В указанные промежутки времени определялись индекс хемотаксиса (Δ) и содержание в среде пирувиноградной кислоты (ПВК, ●).

Контроль дедифференцировки гамет аммонием.

Внесение в суспензию гамет аммония инициирует процесс их дедифференцировки, при этом гаметы утрачивают агглютинины, структуры, обеспечивающие формирование пар и литический фермент, отвечающий за гидролиз клеточной

стенки (Matsuda et al., 1987, 1990). Нами установлено, что добавление аммония в среду полностью

восстановито реакцию хемотаксиса через 1 час; наименьшая концентрация аммония, которая необходима для восстановления хемотаксиса, составила 0,1 мМ

Действие мочевины на изменение хемотаксиса к аммонiu в процессе гаметогенеза. Мочевина переносится в клетки специальной транспортной системой (Williams, Hodson, 1977), после чего гидролизуется ферментным комплексом АТФ:амидолиаза мочевины (Lefley, Syrett, 1973) Добавление мочевины в безазотную среду полностью блокировало потерю хемотаксиса к аммонiu, т.е. процессы преобразования систем хемотаксиса и компетентности гамет, контролируются внутриклеточным аммонием Гаметы, обработанные D,L-метионин-D,L-сульфоксимином (MSX), который блокирует ассимиляцию аммония путем ингибирования глутаминсинтеза, полностью восстанавливали хемотаксис после добавления в среду аммония. Следовательно сами ионы аммония, а не продукты их метаболизма, ответственны за контроль преобразования системы хемотаксиса Полученные нами данные позволяют сделать вывод, что существуют внутриклеточные пороговые концентрации ионов аммония, при превышении которых аммоний репрессирует регуляторные компоненты, вовлеченные в контроль систем компетентности и хемотаксиса у гамет (рис. 4).

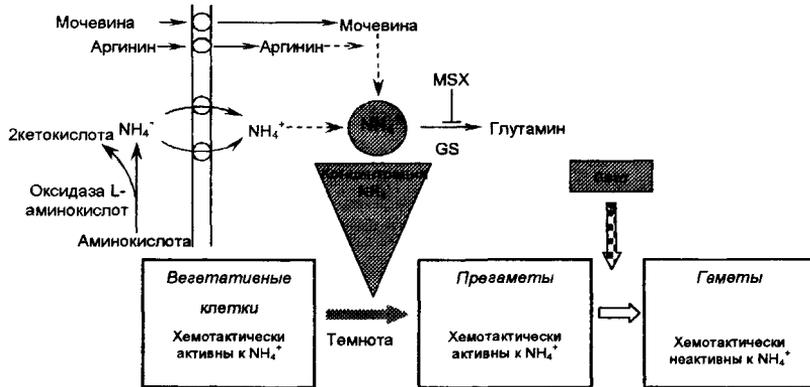


Рис. 4. Схема вероятных этапов дифференцировки клеток, приводящей к утрате реакции хемотаксиса к ионам аммония у гамет *C. reinhardtii*

Транспортеры аммония и их роль на разных этапах жизненного цикла *C. reinhardtii*.

Анализ поглощения [¹⁴C]-метиламмония *C. reinhardtii* показал, что в вегетативных клетках, выращенных в среде TAP, функционирует только система с низким сродством к аммонiu/метиламмонiu, LATS (с высокими значениями K_m и V_{max}); тогда как в гаметах появляется вторая система с высоким сродством к аммонiu/метиламмонiu, HATS (с высокими значениями K_m и V_{max}).

Представители NATS описаны у высших растений, грибов и бактерий, и выделены в семейство белков AMT (ammonium and methylammonium transport proteins) У *C. reinhardtii* охарактеризовано восемь генов семейства *Amt1* (González-Ballester et al., 2004) Методом ПЦР в режиме реального времени нами был проведен сравнительный анализ особенностей регуляции экспрессии восьми генов *Amt1* на разных этапах жизненного цикла вегетативных клеток, прегаметах и гаметах (рис. 5) Установлено, что транскрипция генов *Amt1,3*, *Amt1,7* и *Amt1,8* не зависит от стадии цикла, причем уровни мРНК *Amt1,3* и *Amt1,8* зафиксированы на низком уровне. Транскрипция генов *Amt1,1*, *Amt1,2*, *Amt1,4*, и *Amt1,5* репрессирована в вегетативных клетках, а гена *Amt1,6* – в прегаметах и гаметах. Кроме того, выявлена дополнительная световая регуляция экспрессии генов *Amt1,1* и *Amt1,5*, которая у прегамет ниже уровней, зафиксированных у гамет. Таким образом, утрата реакции хемотаксиса у гамет не вызвана блоком экспрессии *Amt1,1-1,8* на уровне транскрипции.

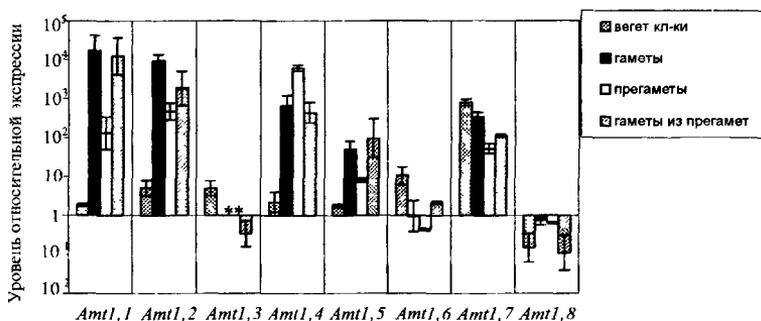


Рис. 5. Уровни относительной экспрессии *Amt1*-генов у дикого типа *C. reinhardtii* на разных стадиях жизненного цикла

* - не выявлено

Хемотаксис мутантов с повреждениями транспортера AMT1;4. Анализ хемотаксиса к аммонию спонтанных, устойчивых к метиламмонию мутантов с поврежденным транспортером AMT1;4 (Kim et al., 2005) свидетельствует о том, что этот транспортер не является ключевым звеном в передаче хемотактического сигнала, и его нарушение не сказывается на поведении клеток в целом.

Получение и характеристика мутанта с нарушенной активностью системы NATS. В результате трансформации было получено 1276 клонов, устойчивых к зеомисину. На 1-м этапе нами было отобрано 12 резистентных к метиламмонию штаммов. На 2-м этапе был отобран штамм, который при росте на глутамине демонстрировал задержку роста и время генерации мутантного штамма составляло 22 ч, по сравнению с 13 ч для исходного штамма.

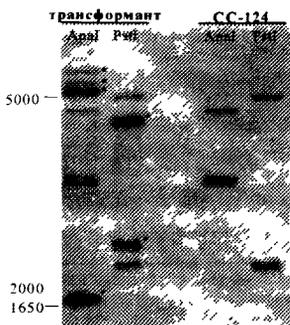


Рис. 6. Гибридизация по Саузерну с использованием в качестве зонда участка гена *ble* «*» обозначены дополнительные инсерции трансформирующего вектора

Гибридизация по Саузерну с использованием в качестве зонда участка гена *ble* выявила наличие у трансформанта нескольких инсерций плазмидного вектора (рис. 6). Сравнительный анализ кинетик поглощения [¹⁴C]-метиламмония у дикого типа и мутанта показал, что тогда как у дикого типа присутствуют оба типа транспортных систем для переноса аммония/метиламмония в клетки (LATS и HATS), у трансформанта активна только система LATS. В связи с этим мутант был назван *hat1* (от англ. defective in HATS). На основе полученных данных были вычислены кинетические параметры для *hat1* (табл. 1).

Таблица 1. Кинетические параметры транспорта метиламмония СС-124 и *hat1*

Стадия цикла	Система	СС-124		<i>hat1</i>	
		K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
Вегет. клетки	LATS	1210,0±31,3	53,3±7,23	396,2±30,45	12,4±0,77
	HATS	-	-	-	-
Гаметы	LATS	528,0±20,1	78,2±2,5	150,6±8,20	153,7±7,38
	HATS	2,16±0,12	1,96±0,02	-	-

Примечание K_m – константа Михаэлиса-Ментена (мкМ), V_{max} – максимальная скорость поглощения (мкМ/мг хл-ч)

В настоящее время ни у одного организма система LATS не охарактеризована на молекулярном уровне. В отличие от

дикого типа при инкубации штамма *hat1* в среде TAP с ингибитором K^+ -каналов тетраэтиламмонием (ТЭА), клетки полностью сохраняли подвижность, но утрачивали хемотактическую активность и у них

блокировалось поступление [¹⁴C]-метиламмония (рис. 7) Полученные данные показывают, что LATS-система у *hat1* включает K^+ -каналы, чувствительные к ТЭА.

Если вегетативные клетки *hat1* были выращены в среде, содержащей в качестве единственного источника азота мочевины (в этих условиях транспортеры аммония не функционируют), клетки полностью утратили хемотактическую активность. Это свидетельствует о том, что для восприятия/передачи хемотактического сигнала требуется активно функционирующая транспортная система LATS.

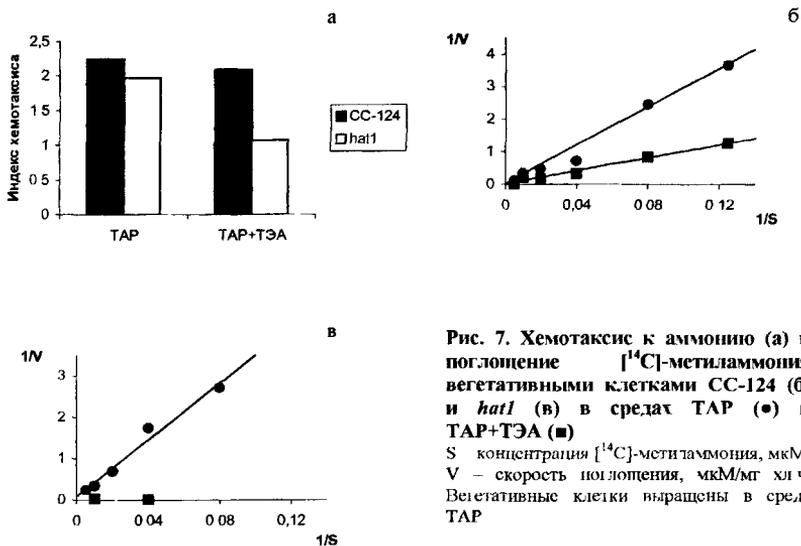


Рис. 7. Хемотаксис к аммонии (а) и поглощение $[^{14}\text{C}]$ -метиламмония вегетативными клетками CC-124 (б) и *hat1* (в) в средах TAP (●) и TAP+ТЭА (■)
 S – концентрация $[^{14}\text{C}]$ -метиламмония, мкМ
 V – скорость поглощения, мкМ/мг хлч
 Вегетативные клетки выращены в среде TAP

С целью выявления уровня экспрессии компонентов HATS, на котором произошло нарушение(я), приведшее к блоку активности этой системы, нами была проанализирована экспрессия *Amt1* генов в *hat1* методом ПЦР с предшествующей обратной транскрипцией. Результаты свидетельствуют о том, что все гены *Amt1* в мутанте не нарушены и экспрессируются (рис 8)

Анализ потомков из скрещиваний *hat1* со штаммом дикого типа показал, что нарушение в активности системы HATS не вызвано единичной мутацией. Таким образом, в мутанте *hat1* нарушены несколько компонентов, вовлеченных в контроль экспрессии *Amt1* генов на пост-транскрипционном уровне.

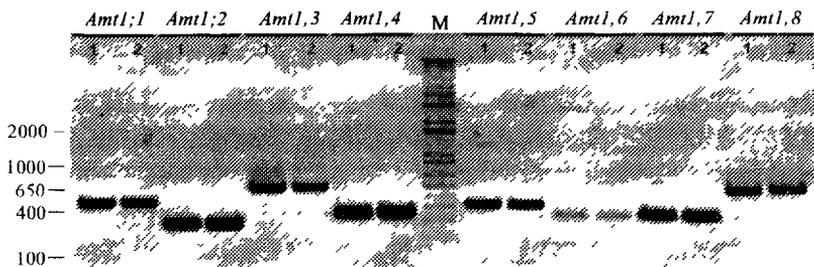


Рис. 8. Результаты ОТ ПЦР для генов *Amt1*
 1 – CC-124, 2 – *hat1*, M – маркер молекулярной массы ДНК 1 kb

Для характеристики компонентов, нарушение которых блокировало активность системы HATS у мутанта *hat1*, нами была предпринята попытка клонирования соответствующих генов. С помощью сайт-специфической амплификации методом ПЦР было получено несколько специфических продуктов и было осуществлено секвенирование одного из них. При помощи программы BLAST JGI Chlamy v 2.0 установлено, что данный фрагмент имеет гомологию с геном EBNA-1 вируса герпеса человека (50,0%). Компьютерный анализ секвенированной последовательности *hat1* позволяет предположить, что данный ген может кодировать ядерный глицин-богатый белок, предположительно являющийся транскрипционным фактором.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ реакций хемотаксиса на разных стадиях жизненного цикла одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* позволяет прийти к следующему заключению.

Вегетативные клетки *C. reinhardtii* обнаруживают способность к восприятию не только разнообразных хемосигналов органической природы (Ermilova et al., 2000), но и неорганических соединений. Охарактеризованы два хемозффектора, аммоний и метиламмоний, установлены концентрационные зависимости и закономерности процессов адаптации. Причем кинетика адаптации к хемосенсорным сигналам сходна с закономерностями адаптационных процессов, описанных ранее для органических соединений.

Из полученных нами результатов следует, что организация аппарата хемотаксиса изменяется на разных этапах жизненного цикла. В частности показано, что вегетативные клетки и прегаметы демонстрируют хемотаксис к аммонию/метиламмоню, тогда как зрелые гаметы утрачивают хемотаксическую активность к ним. По нашему мнению, подобный контроль имеет биологический смысл, поскольку отсутствие у гамет способности двигаться направленно к соединениям, приводящим к их дедифференцировке в вегетативные клетки, обеспечивает тем самым наиболее благоприятные условия для выполнения этим типом специализированных клеток их основной биологической функции – образованию пары с гаметой противоположного типа спаривания в ходе полового цикла развития организма. В пользу этого предположения свидетельствует также то, что в ходе гаметогенеза у *C. reinhardtii* процессы преобразования систем, ответственных за приобретение состояния компетентности (т.е. способности к формированию пары с гаметой другого типа спаривания) и утрату хемотаксиса к аммоню/метиламмоню, регулируются одними внешними сигналами: отсутствием источника азота в среде и светом, и находятся под контролем гамета-специфических генов, общих для обоих типов гамет. Анализ полученных данных позволяет предполагать, что существуют внутриклеточные пороговые концентрации ионов аммония, при превышении которых аммоний репрессировывает дифференцировку систем компетентности и хемотаксиса у гамет.

На основе сравнительного анализа особенностей регуляции экспрессии восьми генов *Amt1* на разных этапах жизненного цикла (вегетативные клетки, прегаметы, гаметы) методом ПЦР в режиме реального времени, установлено, что утрата реакции хемотаксиса у гамет не вызвана блоком экспрессии *Amt1, 1-1, 8* на уровне транскрипции. Для понимания функционального значения каждого из транспортеров семейства AMT1 в ходе жизненного цикла необходимо выявление их точной субклеточной локализации и кинетических характеристик.

Методом инсерционного мутагенеза изолирован трансформант *hat1* с нарушенным транспортом аммония. Сравнительный анализ кинетик поглощения [¹⁴C]-метиламмония у дикого типа и мутанта показал, что если у дикого типа присутствуют оба типа транспортных систем для переноса метиламмония/аммония в клетки (LATS и HATS), то у *hat1* активна только система LATS. Полученные в работе данные свидетельствуют, что у *hat1* (1) активность HATS блокирована на пост-транскрипционном уровне в результате нарушения нескольких регуляторных компонентов; (2) LATS-система у *hat1* включает неспецифические K⁺-каналы, чувствительные к ТЭА; (3) активность этой системы ответственна за контроль реакции хемотаксиса у *hat1*. Тот факт, что ТЭА хотя и привел к изменению кинетики поглощения метиламмония у CC124, однако полностью не блокировал ни поглощение соединения, ни реакцию хемотаксиса, позволяет предположить участие другого компонента(ов) в системе LATS и контроле хемотаксиса у вегетативных клеток дикого типа, возможно из семейства *Amt1*. Мы предполагаем, что в клетках *Chlamydomonas* активность нескольких транспортеров принимает участие в контроле реакций хемотаксиса к аммонiu/метиламмонiu.

ВЫВОДЫ

1. Способность одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* к хемотаксическому поведению изменяется на разных этапах жизненного цикла: вегетативные клетки и прегаметы (некомпетентные гаметы) демонстрируют хемотаксис к аммонiu/метиламмонiu, тогда как зрелые гаметы утрачивают хемотаксическую активность к ним.
2. Сигналы, регулирующие утрату реакции хемотаксиса к аммонiu/метиламмонiu, те же, что и в случае контроля формирования состояния компетентности у гамет: голодание по азоту и свет. Предложена модель контроля хемотаксического поведения в ходе гаметогенеза, согласно которой регуляция изменений в системе хемотаксиса включает два этапа: первый, контролируемый аммонием и независимый от света этап, и второй этап, контролируемый действием света.
3. Компоненты, регулирующие утрату хемотаксической активности у зрелых гамет, находятся под контролем гамета-специфичных генов, общих для обоих типов гамет.

- 4 Впервые проанализирована активность двух типов транспортных систем аммония, LATS и HATS, на разных этапах жизненного цикла, в частности, установлено, что в вегетативных клетках функционально активна только система LATS, тогда как в гаметах - обе системы
- 5 Охарактеризованы особенности экспрессии восьми генов семейства *Amt1* на разных этапах жизненного цикла (вегетативные клетки, прегаметы, гаметы) Методом ПЦР в режиме реального времени установлено, что транскрипция генов *Amt1,3*, *Amt1;7* и *Amt1;8* не зависит от стадии цикла, генов *Amt1,1*, *Amt1;2*, *Amt1,4* и *Amt1,5* репрессирована в вегетативных клетках, а гена *Amt1,6* – в прегаметах и гаметах Выявлена дополнительная регуляция светом транскрипции генов *Amt1,1* и *Amt1,5*
- 6 Показано, что LATS-система аммония у *C reinhardtii* включает неспецифичные чувствительные к ТЭА K^+ -каналы.
- 7 Изолирован мутант *hat1* с нарушенной активностью системы HATS аммония Установлено, что активность системы LATS ответственна за контроль реакции хемотаксиса к аммоний/метиламмоний у *hat1*
- 8 На основе экспериментальных данных предложена рабочая гипотеза, согласно которой транспортеры аммония *Chlamydomonas* играют ключевую роль в способности этого одноклеточного организма к реакции хемотаксиса к аммоний.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1 Ермилова Е В , Залуцкая Ж М , Лапина Т В , **Никитин М.М.**, Громов Б В Использование гена аргининсукцинатлиазы для получения хемотаксических мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* методом инсерционного мутагенеза // Физиология растений – наука III тысячелетия Тезисы докладов Москва, 4-9 октября 1999. С 577.
- 2 Ермилова Е В , Залуцкая Ж М , Лапина Т В , **Никитин М.М.**, Громов Б В Регуляция работы жгутиков в контроле таксисов *Chlamydomonas reinhardtii* // Физиол растений 2000 Т 47. С 752-756.
- 3 Ермилова Е.В, Залуцкая Ж.М, Лапина Т.В., **Никитин М.М.**, Громов Б.В Механизмы регуляции направленного движения одноклеточных зеленых водорослей // Автотрофные микроорганизмы Материалы Международной научной конференции Москва, 2000 С 79-80
- 4 **Никитин М.М.** Роль жгутиков в контроле поведенческих реакций одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* // Тезисы VII Молодежной Конференции ботаников С-Петербург, 15-19 мая 2000 С. 73-74
- 5 Ermilova E V , Zalutskaya Zh M , Lapina T V , **Nikitin M.M.**, Gromov B V Studies on motility and behavior an approach using genetic transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* //

- Molecular mechanisms of genetic processes and biotechnology International symposium Moscow, November 18-21, 2001; Minsk, November 22-24, 2001. P 205-206
- 6 E Ermilova, Z Zalutskaya, T Lapina, M. Nikitin Change in chemotactic behaviour of *Chlamydomonas reinhardtii* during gametogenesis // Abstracts of the Tenth International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas* 2002 Vancouver, B C Canada
 7. Ermilova E V , Zalutskaya Zh.M , Lapina T V . Nikitin M.M. Effects of nitrogen-containing compounds on change in chemotaxis mode during gametogenesis of *Chlamydomonas reinhardtii* // Protistology. 2003 V 3 P. 10-16
 8. Ermilova E V , Zalutskaya Z M , Lapina T V , Nikitin M.M. Chemotactic behavior of *C reinhardtii* is altered during gametogenesis // Curr Microbiol 2003 V 46 P 261-264
 - 9 ЕВ Ермилова, ЖМ Залутская, ТВ Лапина, М.М. Никитин, К Хуанг, КФ Бек Сенсорные фоторецепторы и их роль в контроле поведения одноклеточных фототрофных эукариот (подвижность и поведение в жизненном цикле *Chlamydomonas reinhardtii*) // Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития. Тезисы конференции Москва, 6-12 июня 2004 С. 283.
 - 10 E V Ermilova, Zh M Zalutskaya, C F Beck, K Huang, T V Lapina, M. M. Nikitin. Control of chemotactic behavior in the life cycle of phototrophic protist *Chlamydomonas reinhardtii* // Abstracts of the International Symposium on Biological Motility May 23-June 1 2004 Pushchino. P 171-173
 - 11 E. V Ermilova, M. M. Nikitin, T V Lapina, Zh M Zalutskaya *Cha1*, a DNA insertional transformant of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with altered chemotaxis to ammonium // Protistology 2004 V 3 P 230-240
 - 12 Ермилова ЕВ , Никитин М.М., Фернандес Э Получение и характеристика инсерционного мутанта *Cha2* одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* с нарушенной НАТС-системой транспорта аммония // Актуальные проблемы современной альгологии Тезисы конференции Харьков, 20-23 апреля 2005 С 56



Подписано в печать 31 03 2006. Формат бумаги 60x84 1/16.

Бумага офсетная. Печать Усл печ. л. 1,0.

Тираж 100 экз Заказ 3750.

Отпечатано в отделе оперативной полиграфии НИИХ СПбГУ.
198504, Санкт-Петербург, Старый Петергоф, Университетский пр 26

2006A
7193

№ - 7 1 9 3