

Т. В. Лапина, Ж. М. Залуцкая, А. В. Аникина, Е. В. Ермилова

АККУМУЛЯЦИЯ И ЭКСПОРТ ГЛИЦЕРИНА ОДНОКЛЕТОЧНОЙ ЗЕЛЕННОЙ ВОДОРОСЛЬЮ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

Одно из фундаментальных свойств микроорганизмов состоит в их способности быстро и эффективно адаптироваться к изменениям в окружающей среде, большинство из которых воспринимаются одноклеточными организмами как стрессовые воздействия [1]. Процессы адаптации происходят на разных уровнях регуляции, и один из компонентов, вовлеченных в адаптивные системы многих микроорганизмов, как прокариот, так и эукариот, представлен специфической группой органических соединений, получивших название «совместимые растворимые вещества». Спектр соединений, используемых микроорганизмами в качестве совместимых, достаточно ограничен. К ним относятся некоторые сахара (трегалоза), полиолы (глицерин и гликозилглицерин), аминокислоты (пролин и глутамат) и их производные (пролинбетаин, эктоин), а также четвертичные амины и их серосодержащие аналоги (глицинбетаин, карнитин, диметилсульфониопропионат), N-ацелированные диаминокислоты и небольшие пептиды (Nд-ацетилорнитин и N-ацетилглутиминилглутимин амид). Эти соединения предотвращают отток воды из цитоплазмы клетки наружу и выполняют протекторную функцию, которая лучше всего проанализирована при действии гиперосмотического стресса. В этом случае их называют также осмолитами или осмопротекторами. Некоторые из них могут быть также криопротекторами и термопротекторами. Такая мультифункциональность в адаптивных ответах микроорганизмов показана, в частности для глицерина.

Роль глицерина в процессах адаптации наиболее подробно изучена у бактерий и дрожжей. У *Chlamydomonas reinhardtii* также была описана способность к синтезу глицерина в условиях гиперосмотического стресса [2, 3]. Вместе с тем неизвестно, синтезируют ли глицерин другие типы клеток, например гаметы. Не изучалась также возможная роль этого осмопротектора в адаптации *Chlamydomonas* к другим стрессовым воздействиям, таким как гипо- и гипертермия.

Нами проанализирована способность гамет синтезировать глицерин в условиях гиперосмотического стресса, а также действие гипо- и гипертермии на аккумуляцию/экспорт глицерина вегетативными клетками *C. reinhardtii*.

Лапина Татьяна Викторовна — канд. биол. наук, научный сотрудник, Санкт-Петербургский государственный университет; e-mail: t.lapina@yahoo.com

Залуцкая Жаннета Михайловна — канд. биол. наук, старший научный сотрудник, Санкт-Петербургский государственный университет; e-mail: zsalutskaya@rambler.ru

Аникина Арина Витальевна — студентка, Санкт-Петербургский государственный университет; e-mail: aav87@mail.ru

Ермилова Елена Викторовна — д-р биол. наук, профессор, Санкт-Петербургский государственный университет; e-mail: ermilova@bio.pu.ru, ermilova@ee6439.spb.edu

© Т. В. Лапина, Ж. М. Залуцкая, А. В. Аникина, Е. В. Ермилова, 2013

Материалы и методы исследования

Штаммы и условия культивирования. В работе использовали штаммы *C. reinhardtii*: CC-124 (*nit1agg1mt-*) и CC-1690 (*mt+*), любезно предоставленные профессорами Э. Харрис (Коллекция Культур *Chlamydomonas* Университета г. Дюк, США) и Э. Фернандес (Коллекция Культур *Chlamydomonas* Университета г. Кордоба, Испания). Вегетативные клетки выращивали синхронно в среде ТАР [4] в режиме освещения люминесцентными лампами 12 ч свет : 12 ч темнота при 23 °С (освещенность 2000 лк) [5]. Прегаметы, незрелые гаметы, получали из синхронной культуры вегетативных клеток, находящихся в логарифмической фазе роста. Для этого клетки ресуспендировали в среде ТАР без азота и инкубировали в темноте в течение 24 ч. Гаметы получали из прегамет путем их освещения в течение 2 ч (освещенность 2000 лк) [6].

Жизнеспособность вегетативных клеток и гамет оценивали в процентах и определяли их окрашиванием растворами метиленового синего (0,2%) или эванс голубого (0,1%) с использованием светового микроскопа (окуляр $\times 12$, объектив $\times 20$) [7].

Линейные размеры клеток определяли микроскопически (объектив $\times 40$, окуляр $\times 12$) с помощью окуляр-микрометра. Объем клеток рассчитывали по формуле $V = 4/3\pi r_1^2 r_2$, где r_1 — малый радиус клетки, r_2 — большой радиус клетки как среднее значение по результатам измерения 300 клеток.

Определение глицерина при гиперосмотическом стрессе. В опытах была использована концентрация соли, при которой секреция глицерина вегетативными клетками *Chlamydomonas* близка к максимальной [3]. Клетки в экспоненциальной фазе роста осаждали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 мин, и образовавшийся осадок ресуспендировали в среде ТАР, содержащей 200мМ NaCl.

Для определения глицерина использовали ферментативный метод, в котором глицерин фосфорилируется глицеринкиназой в присутствии АТФ [8]. Полученный глицерин-3-фосфат затем превращается в дегидроацетонфосфат под действием глицерофосфатдегидрогеназы, что приводит к возрастанию концентрации НАДН, поглощение которого измеряли при длине волны 340 нм. Секретируемый глицерин определяли в супернатанте. Аккумулированный глицерин определяли в пробах, полученных из 2×10^7 клеток, после прогревания пробы в течение 10 мин при 80 °С и последующего осветления центрифугированием при 12000 об/мин в течение 10 мин [3].

Результаты исследования и их обсуждение

Секреция/аккумуляция глицерина гаметами в условиях гиперосмотического стресса. В природе переход *C. reinhardtii* к половому циклу развития является ответом микроорганизма на неблагоприятные условия, и, прежде всего, на недостаток азота в среде. При отсутствии в среде источников азота в вегетативных клетках запускается программа гаметогенеза, приводящая к формированию на свету гамет, фенотипически неотличимых от вегетативных клеток [6].

При формировании зиготы гаметы противоположных типов слияния сливаются, утрачивая при этом клеточную стенку. Для того чтобы клетки не разрушались после утраты клеточной стенки, необходимо поддержание осмотического баланса. Роль осмотического баланса в регуляции процесса объединения гамет показана, например у *Saccharomyces cerevisiae* [9]. Нас интересовало, не увеличивается ли уровень глицерина в образующихся гаметах по сравнению с вегетативными клетками, и обла-

дают ли они способностью к осмоадаптации. Как видно из результатов, представленных на рис. 1, оба типа клеток демонстрировали сходную динамику накопления/секреции глицерина в течение первых 6 ч действия стресса: внутриклеточное увеличение глицерина фиксировалось уже через один час. При этом уровень глицерина в гаметах по сравнению с вегетативными клетками не возрастал.

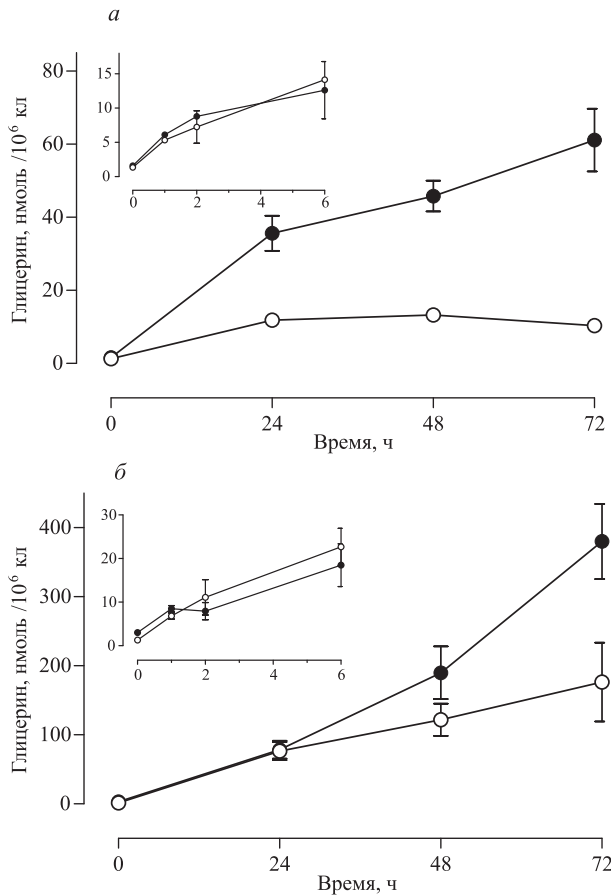


Рис. 1. Накопление (а) и секреция (б) глицерина вегетативными клетками (●) и гаметами (○) *C. reinhardtii* СС-124 в результате действия гиперосмотического стресса (0,2М NaCl)

Во вставках представлена динамика накопления/секреции глицерина в течение первых 6 ч действия стрессора.

Показано, что накопление глицерина гаметами (см. рис. 1) достигало максимальных значений через 24 ч, тогда как регулируемая секреция глицерина в окружающую среду начинала происходить через 1–2 ч и непрерывно увеличивалась в течение 72 ч с начала действия стрессора. Таким образом, гаметы, так же как вегетативные клетки, обладают способностью к осмоадаптации. Однако, как видно из полученных результатов, вегетативные клетки синтезируют большие количества глицерина, чем гаметы. Эти данные согласуются с результатами изменения объема гамет и вегетативных клеток в процессе адаптации к гиперосмотическому стрессу. Так, объем гамет, составляющий в среднем $30,99 \pm 8,5 \text{ мкм}^3$, после инкубирования в среде с 0,2М NaCl достигал значений $53,16 \pm 17,1 \text{ мкм}^3$, т.е. происходило его увеличение в 1,8–1,9 раза. Объем вегетативных клеток изменялся в 6 раз и через 72 ч действия стрессора достигал $498,25 \pm 363 \text{ мкм}^3$ (исходный объем клеток — $74,56 \text{ мкм}^3$). Не исключено, что разница в уровнях синтезированного глицерина отражает более низкую биосинтетическую способность гамет *C. reinhardtii* по сравнению с вегетативными клетками.

Действие высоких и низких температур на аккумуляцию/секрецию глицерина.

Известно, что у ряда организмов глицерин выполняет протекторную функцию не только в условиях осмотического стресса, но также при действии гипо- и гипертермии [10–12]. Для выяснения возможной роли глицерина в процессах адаптации *C. reinhardtii* к действию высоких и низких температур вегетативные клетки микроорганизма были подвергнуты тепловому и холодовому шоку.

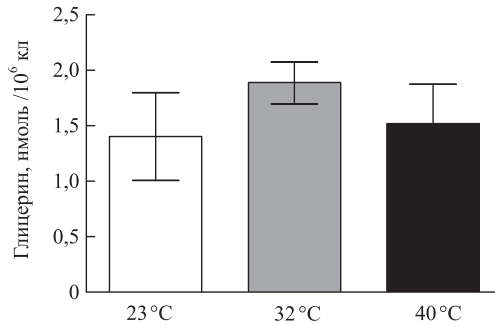


Рис. 2. Действие высокой температуры на накопление глицерина *C. reinhardtii* CC-124 (время действия стрессора 2 ч)

Как видно из рис. 2, при воздействии температуры 32 °С, блокирующей подвижность клеток, и 40 °С количество глицерина достоверно не изменялось. При этом также не происходило секреции соединения в среду, таким образом, глицерин не включен в адаптацию *C. reinhardtii* к гипертермии.

Анализ накопления глицерина в процессе холодной адаптации в вегетативных клетках не выявил увеличения его внутриклеточной концентрации (рис. 3). При одновременном действии на клетки двух стрессоров, осмотического стресса и гипотермии,

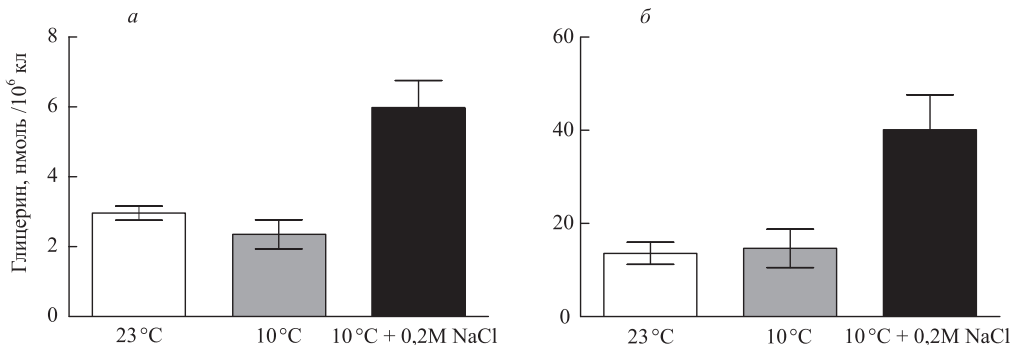


Рис. 3. Действие низкой температуры на накопление (а) и секрецию (б) глицерина *C. reinhardtii* CC-124

уровни накопления и секреции глицерина были ниже, чем при действии 0,2M NaCl при нормальных температурах (см. рис. 1). По-видимому, это связано с подавлением синтеза белков и снижением ферментативной активности в условиях действия пониженных температур. Можно предположить, что у *C. reinhardtii* в ходе холодной адаптации глицерин не является протекторной молекулой. Таким образом, по нашим данным, в условиях гиперосмотического стресса гаметы, так же как вегетативные клетки *C. reinhardtii*, способны к аккумуляции/экспорту глицерина, который не вовлечен в процессы адаптации к действию низких и высоких температур.

Литература

1. Ермилова Е. В. Молекулярные аспекты адаптации прокариот. СПб.: Химиздат, 2012. 340 с.
2. Ben-Amotz A., Avron M. Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potential // *Annu. Rev. Microbiol.* 1983. Vol. 37. P.95–119.
3. León R., Galván F. Halotolerance studies on *Chlamydomonas reinhardtii*: glycerol excretion by free and immobilized cells // *J. Appl. Phycol.* 1994. Vol. 6, N 1. P. 13–20.
4. Levine R. P., Ebersold W. T. Gene recombination in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol.* 1958. Vol. 23. P. 101–109.
5. León R., Galván F. Interaction between saline stress and photoinhibition of photosynthesis in the freshwater green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. Implications for glycerol photoproduction // *Plant Physiol. Biochem.* 1999. Vol. 37. P. 623–628.
6. Beck C. F., Haring M. A. Gametic differentiation of *Chlamydomonas reinhardtii* // *Int. Rev. Cytol.* 1996. Vol. 168. P. 259–301.
7. Castro-Concha L. A., Escorbedo R. M., de Lourdes Miranda-Ham M. Measurement of cell viability in *in vitro* cultures // *Meth. Mol. Biol.* Vol. 318. *Plant cell culture protocols, Second edition* / ed. by V.M. Loyola-Vargas and F. Vazquez-Flota. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2006. P. 71–76.
8. Wieland O. H. Glycerol: UV-method // Bergmeyer J., Brassl M. *Methods in enzymatic analysis. Metabolites 1: Carbohydrates.* Weinheim: Verlag-Chemie, 1984. Vol. VI. P. 504–510.
9. Philips J., Herskowitz I. Osmotic balance regulates cell fusion during mating in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Cell Biol.* 1997. Vol. 138. P. 961–974.
10. Tamas M. J., Hohmann S. The osmotic stress response of *Saccharomyces cerevisiae* // *Top. Curr. Genet.* 2003. Vol. 1. P. 121–200.
11. Hayashi M., Maeda T. Activation of the HOG pathway upon cold stress in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biochem.* 2006. Vol. 139 (4). P. 797–803.
12. Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress / Winkler A., Arkind C., Mattison C. P., Burkholder A., Knoche K., Ota I. // *Eukaryotic Cell.* 2002. Vol. 1. P. 163–173.

Статья поступила в редакцию 11 декабря 2012 г.