

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ, МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 577.218

Е. С. Минаева, Е. В. Ермилова

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *AMT1;6*, КОДИРУЮЩЕГО ТРАНСПОРТЕР АММОНИЯ У *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

Аммоний представляет собой наиболее предпочтительный источник азота для многих организмов, включая одноклеточную зеленую водоросль *Chlamydomonas reinhardtii*. Поэтому неудивительно, что транспортные системы аммония широко распространены среди различных организмов: бактерий, грибов и высших растений. У *C. reinhardtii* перенос аммония, так же как у высших растений, осуществляется двумя транспортными системами: с высоким сродством к аммонiu (HATS) и с низким сродством к аммонiu (LATS). В геноме *C. reinhardtii* выявлено 8 генов семейства *AMT1* (*CrAMT1*), кодирующих белки-транспортёры аммония [1]. Филогенетический анализ генов показал, что семейство *CrAMT1* имеет промежуточное эволюционное положение между *Amt1*-белками высших растений и дрожжей, с одной стороны, и бактерий — с другой.

Наличие у *C. reinhardtii* такого набора транспортёров аммония, вероятно, отражает стратегию одноклеточного организма, направленную на обеспечение клеток азотом в меняющихся условиях среды за счет различных, дополняющих друг друга систем с разной активностью и сродством к субстрату. Одноклеточный организм должен контролировать поступление аммония в клетку, где он может быть ассимилирован в цитоплазме или хлоропласте, аккумулирован в вакуолях или экспортирован обратно в среду. Кроме того, клетки *Chlamydomonas*, как и высшие растения, должны выводить избыток аммония из цитоплазмы и хлоропласта, а также из митохондрий при активном фотодыхании [2–6]. Другой причиной, объясняющей наличие большого числа *Amt1*-белков у *Chlamydomonas* по сравнению с высшими растениями, может быть необходимость для одноклеточного организма заново поглощать выведенный аммоний. В отличие от высших растений, у которых межклеточные взаимодействия и система апопласта обеспечивают процессы разбавления / концентрирования избыточного или недостающего аммония, *Chlamydomonas* нуждается в эффективных механизмах вывода аммония при высоких и токсических концентрациях, а также в наличии систем его повторного поглощения даже при очень низкой внеклеточной концентрации [7]. Эти процессы могли бы осуществлять *Amt1*-транспортёры, локализованные в плазматической мембране, которые, однако, регулируются иначе, чем транспортёры, ответственные за поглощение аммония.

Системы активного экспорта аммония из клеток мало изучены и пока описаны только у некоторых высших растений, например ячменя [4–6]. Одним из подходов для выбора кандидата на роль экспортера аммония из клеток является анализ экспрессии генов, кодирующих транспортеры аммония при выращивании организмов на средах с разными источниками азота. Насыщение клеток азотом ингибирует дальнейшее поглощение аммония и экспрессию генов *AMT1* [6, 8–10]. По нашим данным ген, *CrAMT1;6* в отличие от других *CrAMT1*-генов демонстрировал высокий уровень экспрессии в среде с аммонием [11], что предполагает его роль как экспортера аммония. Для проверки этого предположения проанализирована экспрессия гена *CrAMT1;6* при разном содержании аммония в среде и цитоплазме.

Материалы и методы исследования

Штаммы и условия культивирования. В работе использовались штаммы *C. reinhardtii* 6145c (WT), CC-124 и 305cw15, любезно предоставленные профессором Э. Фернандесом (Испания). Вегетативные клетки выращивали синхронно в режиме освещения люминесцентными лампами 12 ч свет : 12 ч темнота при 23°C (освещенность 2000 лк) [12]. Для получения прегамет жидкую культуру синхронно растущих клеток в начале светового периода отмывали средой без азота, ресуспендировали в среде без азота и инкубировали в темноте в течение 24 ч. Гаметы получали из прегамет путем их освещения на протяжении 2 ч (освещенность 2000 лк).

Выделение РНК. Тотальная РНК была выделена из каждого образца с использованием TRIZOL Reagent Invitrogen™ в соответствии с инструкциями производителя. После экстракции пробы РНК были растворены в 20 мкл сверхчистой воды (Тип I), обработанной 0,1% диэтилпирикарбонатом (DEPC). Пробы РНК были обработаны ДНКазой I (Fermentas) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрации РНК до и после обработки ДНКазой I, а также соотношения A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} были определены спектрофотометром (SmartSpec Bio-Rad). Для анализа использовались образцы с соотношениями: A_{260}/A_{280} от 1,9 до 2,1 и A_{260}/A_{230} более 2,0. Оценку качества РНК до и после обработки ДНКазой I проводили с помощью электрофореза в агарозном геле с последующей визуализацией с использованием гель-документационной системы BioDoc-It™ Imaging System (UVP).

Проведение обратной транскрипции. кДНК были синтезированы из 2 мкг тотальной РНК с использованием OligodT и обратной транскриптазы SuperScriptIII (Invitrogen™) в соответствии с инструкциями производителя. Количество синтезированной кДНК определяли с использованием спектрофотометра (SmartSpec Bio-Rad, США).

ПЦР в реальном времени. Реакции ПЦР в реальном времени проводили в стрипованных оптических пробирках для ПЦР в реальном времени (Bio-Rad, США) с использованием SYBRGreen I (Amersham™) для визуализации синтеза двухцепочечных ДНК. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 2,5 мкл 10-кратного реакционного буфера; 1,25 мкл 0,5 мМ смеси dNTP; 1 мкл смеси прямого и обратного праймеров (10 мкМ); 1,25 мкл 50 мМ раствора $MgCl_2$; 0,1 мкл HotStart Taq полимеразы (5 е.а./мкл); 1,25 мкл 0,1 мМ раствора SYBRGreenI в DMSO; 200 нг кДНК. Реакции ПЦР в реальном времени проводили, применяя амплификатор MiniOpticon RealTime PCR System (Bio-Rad), в следующих условиях: 96°C 5 мин; 40 циклов (96°C 30 с, 60°C 30 с, 72°C 1 мин); 72°C 5 мин; 4°C. Каждая реакция ПЦР была проведена в тройном повторе. Для оценки

специфичности амплификации с использованием программного обеспечения прибора были сняты кривые плавления продуктов амплификации со следующими параметрами: температура — от 65 до 95 °С, шаг 0,2 °С, время удержания 0,5 с.

Для реакций ОТ-ПЦР и ПЦР в режиме реального времени использовались следующие пары праймеров — *AMT1*;6 (прямой 5'-CGCCGCGCTGGTGTTTATAATG-CAC-3', обратный 5'-CGGTGCCGGTGTGTGGCTGGAGTA-3') и *UBI* (прямой 5'-GTACAGCGGCGGCTAGAGGCAC-3', обратный 5'-AGCGTCAGCGGCGGTTGCA-GGTATCT-3')

Для ПЦР в реальном времени была использована кДНК, полученная из РНК, выделенной в трех независимых экспериментах.

Эффективность амплификации и определение *Ct* проводили с помощью программного обеспечения *Orticon3* (Bio-Rad). Полученные данные использовали далее в *Microsoft Excel* для анализа экспрессии генов.

Для оценки уровня экспрессии генов интереса применяли показатели ΔCt и $\Delta\Delta Ct$ с геном *UBI* в качестве референс-гена по формулам (1) и (2)

$$\text{Уровень экспрессии гена интереса} = 2^{Ct(UBI) - Ct(\text{ген интереса})}, \quad (1)$$

$$\text{Уровень экспрессии гена интереса} = 2^{-\Delta\Delta Ct}, \quad (2)$$

где $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (прегаметы или гаметы) – ΔCt (вегетативные клетки). $\Delta Ct = Ct$ (ген интереса, прегаметы или гаметы) – $Ct(UBI, \text{ прегаметы или гаметы})$.

Определение активности глутаминсинтетазы. Активность глутаминсинтетазы определялась по описанному ранее методу [13]. Суспензию клеток *Chlamydomonas* (10 мкг хлорофилла) центрифугировали (3000 g, 5 мин) и ресуспендировали в 0,8 мл раствора 1 (HEPES 66,7 мМ, рН 7,0 доводится NaOH, L-глутамин 40 мМ, MnCl₂ 4 мМ, ADP 0,5 мМ). Замораживали на 10 мин (–70 °С). После размораживания вносили 0,1 мл свежеприготовленного раствора 2 (1,2 М : 1,2 М гидроксилламин хлорид : NaOH) перемешивали на вортексе в течение 10 с. Далее вносили 50 мкл раствора 3 (Na₂HAsO₄ · 7H₂O 124,8 мг/мл), перемешивали на вортексе и инкубировали суспензию на свету при 30 °С в течение 10 мин. После этого добавляли 2 мл раствора 4 (37% HCl 3,87 мл, ТХУ 6 г, FeCl₃ · 6H₂O 16,65 г, вода до 500 мл), центрифугировали 10 мин (10 000 g) и измеряли поглощение при A₅₄₀ на спектрофотометре (Bio-Rad, США). Активность глутаминсинтетазы (мкмоль/мин · мг хлорофилла) вычисляли по формуле:

$$\text{Активность GS} = A_{540} / (0,32 \cdot \text{Хл} \cdot t),$$

где A₅₄₀ — длина волны, Хл — количество хлорофилла (мг), t — время инкубации (мин).

Для определения концентрации хлорофилла 1 мл культуры центрифугировали (3 мин, 5000 g) и ресуспендировали в 1 мл 95°-ного спирта, затем перемешивали на вортексе и центрифугировали (5 мин, 12 000 g). Поглощение полученного супернатанта измеряли на спектрофотометре (Bio-Rad, США) при длине волны 665 и 649 нм.

Концентрацию хлорофилла рассчитывали по формуле:

$$C = 6,1 \cdot A_{665} + 20,04 \cdot A_{649}.$$

Результаты исследования и их обсуждение

Как отмечалось, у *Chlamydomonas* выявлено восемь генов семейства *CrAMT1* [1]. Анализ экспрессии *CrAMT1;6* на разных этапах гаметогенеза показал, что в отличие от других генов семейства *CrAMT1* [11], уровни мРНК снижались в прегаметах и гаметах по сравнению с вегетативными клетками, выращенными в среде, содержащей 7,5 мМ аммония (рис. 1). Мы предположили, что наблюдаемый эффект связан с отсутствием

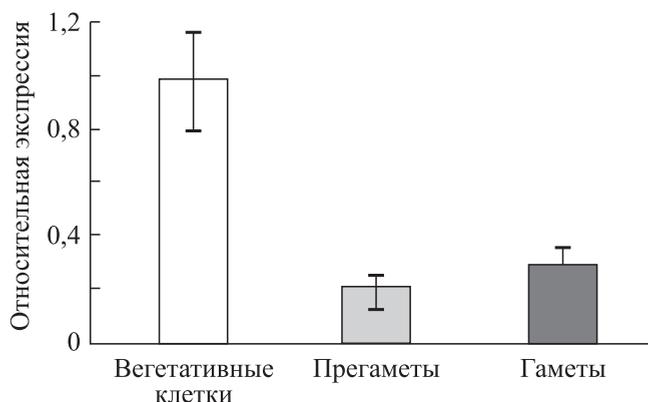


Рис. 1. Уровни относительной экспрессии гена *CrAMT1;6* на разных стадиях жизненного цикла *C. reinhardtii*

аммония в среде, а не с процессом дифференцировки в ходе гаметогенеза. Для проверки предположения клетки штамма 305, синхронно выращенные в среде с аммонием, в начале световой фазы были перенесены в среду с нитратом в качестве источника азота и в среду без азота. Как видно из данных, представленных на рис. 2, уровень экс-

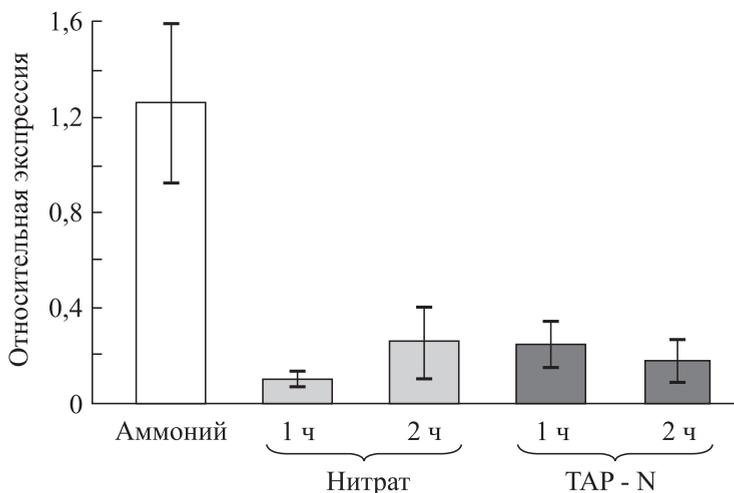


Рис. 2. Уровни относительной экспрессии гена *CrAMT1;6* в клетках штамма 305 *C. reinhardtii*, инкубированных в средах с аммонием и нитратом в качестве источников азота

Среда без азота (TAP-N) использовалась в качестве контроля.

прессии гена снижался уже через 1 ч. В мутанте 305 нарушен ген *NIA1*, кодирующий нитратредуктазу — фермент, необходимый для ассимиляции нитрата [1]. Наблюдаемое уменьшение транскрипции гена интереса, по-видимому, связано с тем, что культивирование в среде с нитратом воспринимается клетками штамма 305 как условие голодания по источнику азота. Это подтверждается результатами, полученными на среде без источника азота, где также наблюдалось снижение экспрессии *CrAMT1;6* уже через 1 ч инкубирования (см. рис. 2). Однако при культивировании штаммов с нарушениями в нитратредуктазе в среде с нитратом происходит его аккумуляция в цитозоле [14]. Не исключено, что наблюдаемое снижение транскриптов *CrAMT1;6* в клетках на среде с нитратом может быть связано с ингибирующим действием нитрата.

Для оценки потенциального отрицательного действия нитрата экспрессия *CrAMT1;6* была дополнительно проверена у штамма дикого типа 6145 с (рис. 3). Экспрессия гена несколько снижалась через 1 ч, однако уже через 2 ч, с началом формирования внутриклеточного аммония из нитрата [14], ее уровни достигали исходных значений и не изменялись при более длительном культивировании. Таким образом, редукция нитрата в аммоний и его формирование представляют необходимый этап для экспрессии гена интереса.

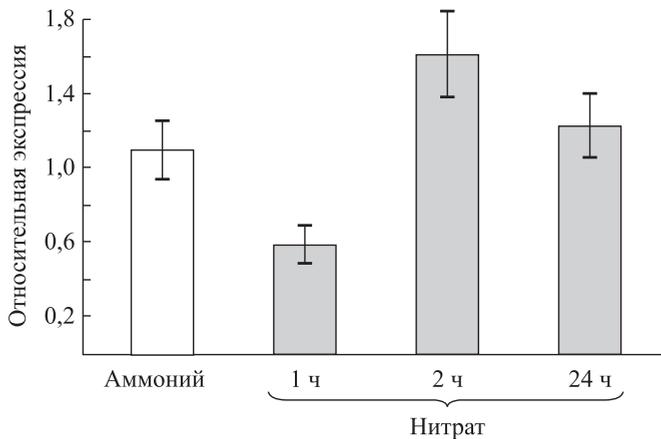


Рис. 3. Уровни относительной экспрессии гена *CrAMT1;6* в клетках штамма 6145с *C. reinhardtii*, выращенных на средах с аммонием и нитратом в качестве источников азота

Чтобы подтвердить, что аммоний выступает в роли сигнала, необходимого для транскрипции *CrAMT1;6*, уровни транскрипта были проверены в клетках, выращенных на среде с мочевиной в качестве единственного источника азота в присутствии ингибитора глутаминсинтетазы — метионинсульфоксимины (MSX). У *C. reinhardtii* мочевина в отличие от аминокислот транспортируется в клетки и затем в цитоплазме гидролизуется до аммония. Действие MSX в концентрации, блокирующей активность фермента (рис. 4), приводит к временному увеличению внутриклеточной концентрации аммония. В этих условиях происходило возрастание экспрессии гена *CrAMT1;6* (рис. 4). Таким образом, аммоний стимулирует экспрессию гена *CrAMT1;6*.

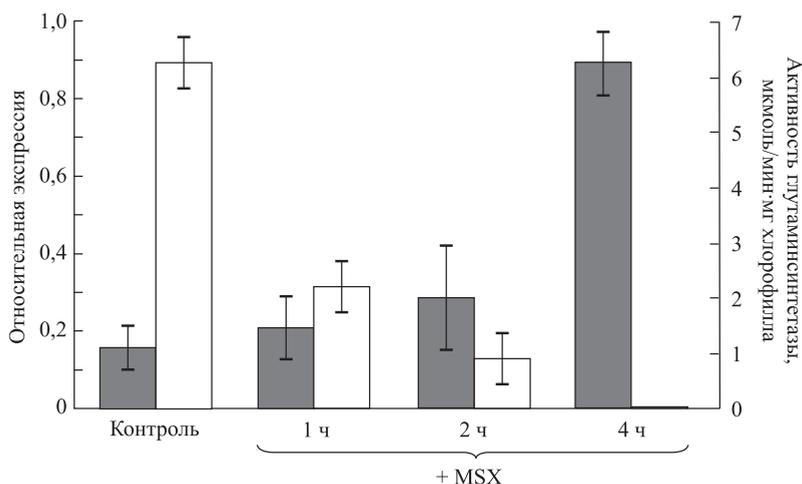


Рис. 4. Действие MSX на относительный уровень экспрессии гена *StAMT1;6* (■) и активность глутаминсинтетазы (□) в вегетативных клетках штамма *C. reinhardtii*, выращенных на среде с мочевиной в качестве источника азота

Полученные нами результаты позволяют предположить, что у *C. reinhardtii* транспортер *Amt1.6* может быть ответственен за вывод аммония из клеток.

Литература

1. González-Ballester D., Camargo A., Fernández E. Ammonium transporter genes in *Chlamydomonas*: the nitrate-specific regulatory gene *Nit2* is involved in *Amt1;1* expression // *Plant Mol. Biol.* 2004. Vol. 56. P. 863–878.
2. Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase-biochemical and genetic analysis / Wallsgrave R.M., Turner J.C., Hall N.P., Kendally A.C., and Bright S.W.J. // *Plant Physiol.* 1987. Vol. 83. P. 155–158.
3. Von Wirén N., Gazzarrini S., Gojon A., Frommer W.B. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2000a. Vol. 3. P. 254–261.
4. Britto D. T., Siddiqi M. Y., Glass A. D., Kronzucker H. J. Futile transmembrane NH_4^+ cycling: a cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001a. Vol. 98. P. 4255–4258.
5. Britto D. T., Glass A. D., Kronzucker H. J., Siddiqi M. Y. Cytosolic concentrations and transmembrane fluxes of $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$. An evaluation of recent proposals // *Plant Physiol.* 2001b. Vol. 125. P. 523–526.
6. Glass A. D. M. Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption // *Crit. Rev. Plant Sci.* 2003. Vol. 22. P. 453–470.
7. Wang M. Y., Siddiqi M. Y., Ruth T. J., Glass A. Ammonium uptake by rice roots (II. Kinetics of $^{13}\text{NH}_4^+$ influx across the plasmalemma) // *Plant Physiol.* 1993. Vol. 103. P. 1259–1267.
8. *AtAMT1* gene expression and NH_4^+ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels / Rawat S. R., Silim S. N., Kronzucker H. J., Siddiqi M. Y., Glass A. D. M. // *J. Plant.* 1999. Vol. 19. P. 143–152.
9. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into arabidopsis zoots / Gazzarrini S., Lejay L., Gojon A., Ninnemann O., Frommer W., Von Wirén N. // *The Plant Cell.* 1999. Vol. 11. P. 937–947.

10. Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato / Von Wirén N., Lauter F.R., Ninnemann O., Gillissen B., Walch-Liu P., Engels C., Jost W., Frommer W.B. // J. Plant. 2000b. Vol. 21. P. 167–175.

11. Regulation by light of ammonium transport systems in *Chlamydomonas reinhardtii* / Ermilova E.V., Zalutskaya Z.M., Nikitin M.M., Lapina T.V., Fernandez E. // Plant, Cell and Environment. 2010. Vol. 33. P. 1049–1056.

12. Gorman D.S., Levine R.P. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1965. Vol. 54. P. 1665–1669.

13. Shapiro B.M., Stadtman E.R. Glutamine synthetase (*Escherichia coli*) // Methods Enzymol. 1970. Vol. 17a. P. 910–922.

14. Five nitrate assimilation related loci are clustered in *Chlamydomonas reinhardtii* / Quesada A., Galván A., Schnell R.A., Lefebvre P.A., Fernández E. // Mol. Gen. Genet. 1993. Vol. 240. P. 387–394.

Статья поступила в редакцию 7 июня 2012 г.