

УДК 581.1

ОБРАТНАЯ СВЯЗЬ МЕЖДУ ТЕКУЧЕСТЬЮ МЕМБРАН И ТРАНСКРИПЦИЕЙ ГЕНА *desB*, КОДИРУЮЩЕГО ω 3-ДЕСАТУРАЗУ ЖИРНЫХ КИСЛОТ У ЦИАНОБАКТЕРИИ *Synechocystis*

© 2012 г. К. С. Миронов¹, Е. Г. Максимов², Г. В. Максимов², Д. А. Лось^{1*}

¹ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, 127276

² Московский государственный университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

Поступила в редакцию 19.07.2011 г.

Принята к печати 24.08.2011 г.

Клетки прокариот, в том числе и цианобактерий, отвечают на снижение температуры окружающей среды активацией множества генов низкотемпературного ответа. Снижение температуры вызывает уменьшение текучести клеточных мембран, которая поддерживается на оптимальном уровне за счет активности десатураз жирных кислот (ЖК). Нами исследована температурозависимая экспрессия гена ω 3-десатуразы ЖК, *desB*, у цианобактерии *Synechocystis*, обладающей способностью синтезировать полиненасыщенные ЖК, а также у ее двойного мутанта, *desA*⁻/*desD*⁻, дефектного по генам Δ 12- и Δ 6-десатураз ЖК, для которого характерно наличие лишь мононенасыщенных ЖК. При снижении температуры в клетках дикого типа увеличивалось количество мРНК *desB*, достигая максимального значения при 24°C. У двойного мутанта *desA*⁻/*desD*⁻ накопление транскрипта *desB* характеризовалось максимумом при 28–30°C. Таким образом, на примере гена *desB*, кодирующего ω 3-десатуразу ЖК, показано, что температурозависимая экспрессия генов, отвечающих за поддержание оптимальной текучести клеточных мембран, определяется физическим состоянием этих мембран и регулируется по принципу обратной связи.

Ключевые слова: *Synechocystis*, текучесть мембран, холодовой стресс, экспрессия генов.

A FEEDBACK BETWEEN MEMBRANE FLUIDITY AND TRANSCRIPTION OF THE *desB* GENE FOR THE ω 3 FATTY ACID DESATURASE IN THE CYANOBACTERIUM *Synechocystis*, by K. S. Mironov¹, E. G. Maksimov², G. V. Maksimov², D. A. Los^{1*} (¹Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia, *e-mail: losda@ippras.ru; ²Moscow State University, Moscow, 119991 Russia). Prokaryotic cells, including cyanobacteria, respond to a decrease in ambient temperature by activation of numerous cold shock genes. Low temperatures cause a decrease in membrane fluidity, which is maintained at some optimal level mainly by fatty acid (FA) desaturases. Here, temperature-dependent expression of the *desB* gene for the ω 3-desaturase in *Synechocystis*, which synthesized polyunsaturated FAs, and in its mutant, *desA*⁻/*desD*⁻, which is defective in genes for Δ 12- and Δ 6-desaturases and is capable of synthesizing only monounsaturated FAs was studied. Low temperatures caused the increase in the amount of the *desB* mRNA in the wild-type cells with the maximum observed at 24°C. In the double mutant *desA*⁻/*desD*⁻ cells, the maximum amount of this mRNA was accumulated at 28–30°C. Thus, our studies of the *desB* gene for the ω 3-desaturase demonstrated that temperature-dependent expression of genes, which are responsible for the maintenance of the optimal membrane fluidity, depends on physical state of these membranes and is regulated by a feedback mode.

Keywords: *Synechocystis*, cold stress, gene expression, membrane fluidity.

Цианобактерии – это прокариоты с фотоавтотрофным или факультативно-гетеротрофным способом извлечения энергии из окружающей среды. Одноклеточная цианобактерия *Synechocystis* sp. PCC 6803 (далее *Synechocystis*) – типичный представитель данной группы организ-

мов. Этот организм удобен для изучения процессов метаболизма и особенностей адаптации к изменениям окружающей среды, поскольку условия его существования могут быть весьма разнообразными [1–4]. В 1996 году определена полная нуклеотидная последовательность генома *Syn-*

Принятые сокращения: ЖК – жирные кислоты; ПНЖК – полиненасыщенные ЖК.

*Эл. почта: losda@ippras.ru

echocystis, что предвосхитило изучение аспектов восприятия и передачи стрессовых сигналов в его клетках [5].

Известно, что при изменении температуры быстро меняются физико-химические свойства клеточной мембраны, включая и ее текучесть (вязкость) [1, 4, 6]. У прокариот основная стратегия адаптации к пониженным температурам строится на механизмах, приводящих к увеличению степени ненасыщенности остатков жирных кислот (ЖК) в составе липидов мембран [6, 7]. Полиненасыщенные ЖК увеличивают текучесть мембран, компенсируя увеличение их вязкости, вызванное понижением температуры. Главную роль в этом процессе играют десатуразы ЖК, которые осуществляют реакции дегидрирования насыщенных углеродных цепей, повышая количество двойных связей в ЖК [7].

Известно, что между количеством остатков ненасыщенных ЖК и активностью десатураз (*des*) существует обратная связь [4, 7]. При каталитическом гидрировании ЖК липидов мембран *Synechocystis* наблюдали индукцию экспрессии гена $\Delta 12$ -десатуразы [8]. С другой стороны, действие пониженных температур также усиливало экспрессию группы индуцибельных *des*-генов *Synechocystis* [7, 8]. Все это наводило на мысль о наличии сенсора холодового стресса, способного воспринимать температурозависимые изменения физических свойств мембран и регулировать экспрессию *des*-генов [9]. Такой сенсор был идентифицирован. Им оказалась гистидин-киназа *Hik33* мембранной локализации [9].

С использованием ДНК-микрочипов выявили ряд генов, которые индуцируются в клетках *Synechocystis* в условиях холодового стресса. Инактивация *Hik33* позволила выделить гены, находящиеся под контролем данной гистидин-киназы [10]. Вскоре получили данные, свидетельствующие в пользу того, что *Hik33* способна воспринимать не изменение температуры, а, возможно, изменение текучести мембран, в которых локализована эта гистидин-киназа. С этой целью сконструировали двойной мутант по генам $\Delta 12$ - и $\Delta 6$ -десатураз (*desA* и *desD* соответственно) [11]. Известно, что реакции десатурации в клетках *Synechocystis* подчинены строгому порядку, поэтому отключение упомянутых генов приводило к исчезновению полиненасыщенных ЖК (ПНЖК) [7]. Методом Фурье-инфракрасной спектроскопии зарегистрировали снижение текучести клеточных мембран в таком мутанте и показали, что как в мутанте *desA⁻/desD⁻*, так и в тройном мутанте *desA⁻/desD⁻/hik33⁻* экспрессия генов, находящиеся под контролем *Hik33*, может зависеть от текучести клеточных мембран [11, 12].

Следует отметить, что мутант *desA⁻/desD⁻* получали путем инактивации генов десатураз с ис-

пользованием касет устойчивости к канамицину и хлорамфениколу. Последний был заявлен в качестве ингибитора фотосинтеза, поскольку опосредует передачу электронов с фотосистемы I на молекулярный кислород [13]. Таким образом, *desA⁻/desD⁻* не вполне подходит для изучения жизнедеятельности *Synechocystis* sp. в автотрофных условиях культивирования.

В данной работе нами получен новый мутант *desA⁻/desD⁻* без использования касеты устойчивости к хлорамфениколу. Ростовые характеристики этого мутанта при оптимальной и пониженной температурах исследованы в сравнении с клетками дикого типа. Также проанализирован состав ЖК мембран, определена вязкость клеточных мембран мутанта *desA⁻/desD⁻* и дикого типа и исследовано влияние физических свойств мембран на индукцию транскрипции гена *desB* терминальной $\omega 3$ -десатуразы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что температурозависимая экспрессия генов десатураз ЖК, действительно, зависит от текучести клеточных мембран, а текучесть клеточных мембран и экспрессия генов, отвечающих за ее поддержание, регулируются по принципу обратной связи.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования и условия культивирования. В качестве объекта исследования использовали нечувствительный к глюкозе штамм цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 (GT) [14]. Аксеничные культуры цианобактерий поддерживали на агаризованной среде BG-11 [15], забуференной 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.5, на чашках Петри при температуре 36°C и постоянном освещении люминесцентными лампами интенсивностью 70 мкмоль/(м² с) квантов. Мутантные штаммы цианобактерий поддерживали на данной среде с добавлением соответствующих антибиотиков.

Интенсивные культуры цианобактерий выращивали асептически в культуральных сосудах при температуре 36°C, освещенности 70 мкмоль/(м² с) квантов, с постоянным барботированием стерильной газовой смеси, обогащенной CO₂ до концентрации 1.6%. Для перевода в условия интенсивной культуры суспензию цианобактерий, выращенную в фотоавтотрофных условиях в колбах, разбавляли в необходимом объеме свежей стерильной среды BG-11, тщательно перемешивали и разливали по культуральным сосудам. Таким способом осуществляли синхронизацию роста культур в нескольких сосудах.

Направленный мутагенез генов десатураз ЖК. Клетки *Synechocystis* могут быть трансформированы путем интеграции экзогенной ДНК в хромосому по принципу двойной гомологичной рекомбинации [16, 17]. Для инактивации генов десату-

раз ЖК их фрагменты амплифицировали с помощью ПЦР, клонировали в составе Т-вектора pTZ57R/T (“Fermentas”, Литва). В эту конструкцию интегрировали кассету устойчивости к антибиотикам так, чтобы по обе стороны от этой кассеты оставалось не менее 300 п.н. последовательности целевого гена. Полученную конструкцию использовали для трансформации цианобактерии, для чего 1–3 мл интенсивной культуры в начале экспоненциальной фазы роста (3 сут культивирования) промывали свежей средой, ресуспендировали в 1/10 начального объема среды и добавляли 1 мкг плазмидной ДНК, несущей полученную ранее конструкцию, содержащую разрушенный ген, инкубировали в течение 1 сут при 36°C на свету, после чего рассеивали на чашки Петри с агаризованной средой BG-11 в присутствии 1/5 от рабочей концентрации антибиотика. По мере роста клонов концентрацию антибиотика постепенно повышали до нормы. Полной сегрегации ДНК, несущей мутированный ген, добивались рассеиванием цианобактерий до единичных колоний. Событие замены гена дикого типа на мутантный детектировали по результатам ПЦР.

Выделение ДНК. 50 мл культуры цианобактерий с оптической плотностью (OD) 1–2 ОЕ при длине волны 750 нм использовали для выделения ДНК методом экстракции смесью фенол–хлороформ [18]. РНК из препарата удаляли с помощью РНКазы I (“Fermentas”).

Клонирование генов десатураз цианобактерий. Нуклеотидные последовательности генов *Synechocystis* доступны по адресу <http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/Synechocystis> [18]. В качестве праймеров использовали синтетические олигонуклеотиды (табл. 1). Фрагменты генов десатураз ЖК амплифицировали с помощью ПЦР. Реакционная смесь содержала 0.3 ед. Hot Start *Taq*-полимеразы (“Fermentas”), однократный ПЦР-буфер (“Applied Biosystems”, США), 0.2 мМ *GeneAmp* dNTP Mix (“Applied Biosystems”), прямой и обратный праймеры (по 10 пмоль каждого); объем реакционной смеси составлял 20 мкл. В качестве матрицы использовали 10 нг геномной ДНК *Synechocystis*, выделенной по описанным выше методикам. Реакцию проводили в амплификаторе *GeneAmp* 2720 (“Applied Biosystems”). Протокол реакции включал предварительный прогрев смеси при 94°C 10 мин, последующие 35 циклов: 94°C

(30 с), 65°C (30 с), 72°C (1–2 мин), затем инкубацию при 72°C в течение 10 мин.

Продукты реакции разделяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле на основе *tris*-ацетатного буфера при постоянном токе напряженностью 7 В/см. Детекцию проводили в присутствии бромистого этидия в свете ультрафиолетовых ламп с максимумом излучения при 354 нм.

Фрагменты генов после очистки с *Glass Milk* (“Fermentas”) клонировали в составе Т-вектора pTZ57R (“Fermentas”), при этом использовали компетентные клетки *E. coli* штамма DH5 α . Все процедуры проводили согласно [19].

Для разрушения генов десатураз ЖК использовали гены устойчивости к канамицину (источник pUC4KIXX, “Pharmacia”, Швеция) или спектиномицину (pCR8, “Invitrogen”, США).

Определение содержания жирных кислот в глицерофосфолипидах мембран. Липиды экстрагировали в соответствии со стандартными методиками [20]. Глицеролипиды отделяли от остальных липидов с помощью тонкослойной хроматографии на силикагеле. В качестве элюирующего раствора использовали смесь хлороформ : метанол : 28%-ный аммиак (65 : 35 : 5, по объему). Для последующего анализа состава ЖК мембран липиды подвергали метанолизу, предварительно сделав соскоб силикагеля. Метанолиз липидов проводили в метаноле в присутствии 5% HCl в течение 2.5 ч при 80°C. Полученные метиловые эфиры жирных кислот анализировали с помощью газовой хроматографии. Разделение проводили на носителе Chromosorb W. Температуры колонки и пламенно-ионизационного детектора соответствовали 180 и 260°C. Расчет содержания ЖК проводили по величинам площадей пиков на хроматограммах. Индекс ненасыщенности рассчитывали по формуле $IN = \sum Pj/n/100$, где Pj – содержание ненасыщенных ЖК (% от суммы), n – количество двойных связей в каждой кислоте.

Ростовые показатели. В качестве параметра роста использовали зависимость величины оптической плотности суспензии клеток при длине волны 750 нм (OD₇₅₀) от времени культивирования (в сут). После измерения оптической плотности суспензии в аликвоте известного объема интенсивную культуру цианобактерий разбавляли средой культивирования до 0.05–0.1 ОЕ при упомя-

Таблица 1. Праймеры для ПЦР-амплификации участков генов *desA* и *desD*

Рамка считывания	Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность	ПЦР-продукт, п.н.
<i>slr1350</i>	<i>desA</i>	AF	ATGACTGCCACGATTCACCCCG	1053
		AR	AACATTTTTTCAGGGAGCCGAA	
<i>sll0262</i>	<i>desD</i>	DF	ATGCTAACAGCGGAAAGAATT	1077
		DR	CGATGCTTTGCCCTAGGCCTC	

нотой длине волны. Измерения проводили на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis (“Thermo Scientific”, США) при длине светового пути 1 см.

Выделение РНК из клеток *Synechocystis*. Для выделения РНК экспериментальные образцы (50 мл интенсивной культуры цианобактерий, $OD_{750} = 2$) фиксировали равным объемом холодного этилового спирта, содержащего 0.5% фенола, после чего клетки центрифугировали и из них выделяли РНК. Клетки разрушали нагреванием при температуре 65°C в течение 10 мин в эмульсии фенола, РНК отделяли осаждением в LiCl по стандартным методикам [19]. Чистоту РНК оценивали на спектрофотометре ND-1000 в соответствии с рекомендациями производителя (“Nanodrop”, США).

Анализ экспрессии генов методом нозерн-блот гибридизации проводили по стандартным методикам [19]. 20 мкг РНК разделяли электрофорезом в присутствии формальдегида в 1.2%-ном агарозном геле и переносили на мембрану Hybond N (“Amersham”, Великобритания). В качестве зонда использовали амплифицированные в ходе ПЦР фрагменты генов, меченные [α - 32 P]dATP при помощи фрагмента Клёнова, согласно методикам производителя (“Fermentas”). Для визуализации использовали пленку Kodak BioMax MR (США).

Спектроскопия комбинационного рассеяния. Спектры комбинационного рассеяния (КР) регистрировали с помощью КР-спектрометра, построенного на кафедре биофизики МГУ им. Ломоносова. Длина волны возбуждающего света 488 нм. При анализе спектров КР проводили коррекцию, в которой учитывали вклад флуоресценции фикобилипротеинов и хлорофилла, для чего регистрировали спектры флуоресценции соответствующих суспензионных культур клеток. Сигнал флуоресценции аппроксимировали суммой гауссовых кривых [20]. Таким образом, были получены необходимые параметры для учета флуоресценции в спектрах КР.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Получение *Synechocystis*, мутантного по генам десатураз*

Инактивацию генов десатураз *desA* и *desD* проводили последовательно. Сначала инактивировали ген, кодирующий $\Delta 12$ -десатуразу, *desA* (рис. 1а). Ген амплифицировали, используя праймеры AF и AR. В качестве последовательности, замещающей часть этого гена, использовали кассету устойчивости к канамицину (Km^r), фланкированную сайтами рестрикции *SgfI*, по которым фрагмент (456 п.н.) гена *desA* заменяли кассетой Km^r . Полученную конструкцию $pTZ57R/desA::Km^r$ использовали для трансформации клеток дикого типа. Встраивание

мутантного гена в хромосому цианобактерии происходило путем двойной гомологичной рекомбинации, в ходе которой ген дикого типа заменялся мутантным.

На рис. 1в (правая панель) приведены результаты ПЦР, доказывающие мутантность полученного штамма *desA*⁻. В реакции использованы праймеры AF и AR, а в качестве матрицы – ДНК, выделенная из клеток дикого типа “1”, длина фрагмента 1000 п.н.; плазмидная ДНК $pTZ57R/desA::Km^r$, “2”; а также ДНК, выделенная впоследствии из полученного мутанта *desA*⁻, “3”. Важно, что на дорожке “3” присутствует лишь одна полоса в районе 2.5 т.п.н. и отсутствует соответствующая ПЦР-продукту, соизмеримому с фрагментом гена дикого типа. Это свидетельствует о полной сегрегации мутантного гена в геноме *Synechocystis*.

Мутант *desA*⁻ в дальнейшем использовали для получения двойного мутанта по генам $\Delta 12$ - и $\Delta 6$ -десатураз, *desA* и *desD*, согласно схеме, представленной на рис. 1б. При этом использовали кассету устойчивости к спектиномицину (Sp^r), фланкированную сайтами рестрикции *NcoI*. Ген *desD* имеет два сайта рестрикции *NcoI*, но праймер DR подбирали таким образом, чтобы в ходе амплификации продукт ПЦР утрачивал концевой сайт *NcoI*. Кассету Sp^r интегрировали во фрагмент гена *desD*, клонированного в составе $pTZ57R$. В результате получили плазмидную конструкцию $pTZ57R/desD::Sp^r$, которую использовали для инактивации гена *desD* у мутанта *desA*⁻. Двойной мутант рос на среде, содержащей Km и Sp . На рис. 2б приведены результаты ПЦР, показывающие наличие кассет Km^r и Sp^r в генах $\Delta 12$ - и $\Delta 6$ -десатураз двойного мутанта *desA*⁻/*desD*⁻.

*Количественная оценка содержания остатков ЖК в составе мембран *desA*⁻/*desD*⁻*

Клетки выращивали в условиях интенсивной культуры при температуре 36°C, после чего определяли содержание ЖК в мембранах. В качестве контрольных использовали данные, полученные для клеток дикого типа, росших в тех же условиях. Для каждого типа клеток рассчитывали индексы ненасыщенности ЖК липидов мембран. Полученные данные приведены в табл. 2.

В клетках дикого типа, выращенных при 36°C, в составе фосфолипидов мембран обнаружены остатки моно-, ди- и триненасыщенных ЖК. В то время как мутант накапливает лишь мононенасыщенные остатки ЖК. В результате индекс ненасыщенности ЖК липидов мембран мутанта снижается более чем в полтора раза по сравнению с клетками дикого типа. Приведенные данные свидетельствуют

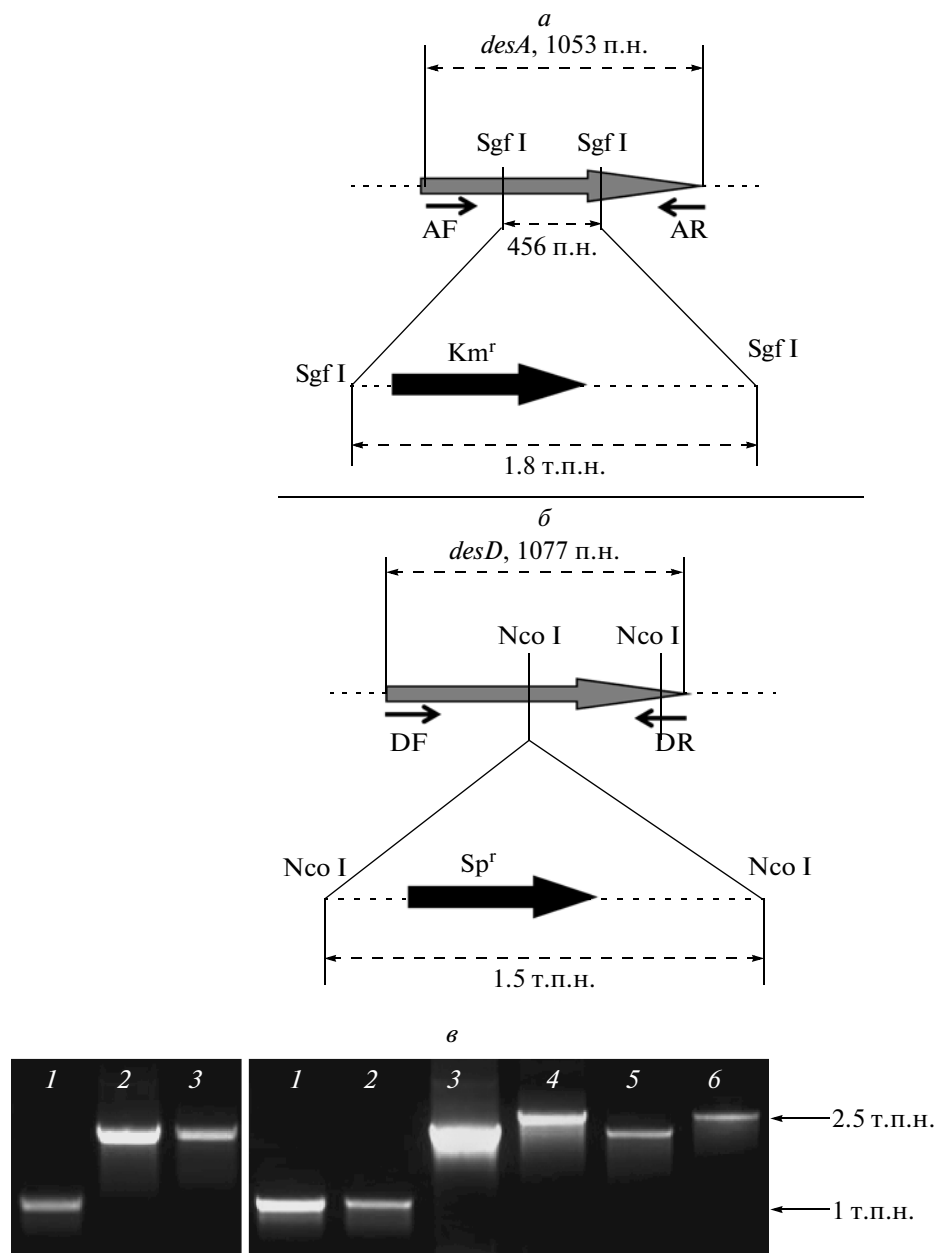


Рис. 1. Инактивация генов *desA* и *desD* *Synechocystis*. Плазмидные конструкции для получения мутанта *desA⁻* (рTZ57R/*desA*::*Km^r*) (а) и двойного мутанта *desA⁻/desD⁻* (рTZ57R/*desD*::*Sp^r*) (б). в – ПЦР-генотипирование мутантов *desA⁻* (правая панель) и *desA⁻/desD⁻* (левая панель). В качестве матрицы использовали ДНК дикого типа (1 и 2); плазмиды рTZ57R/*desA*::*Km^r* (3) и рTZ57R/*desD*::*Sp^r* (4); а также ДНК, выделенную из полученного двойного мутанта *desA⁻/desD⁻* (5 и 6). Реакции проводили с использованием пар праймеров AF и AR (1, 3, 5), а также DF и DR (2, 4, 6).

ют в пользу того, что в клетках *desA⁻/desD⁻* мутанта Δ12- и Δ6-десатуразы не активны.

КР-спектроскопия клеток *Synechocystis*

Типичная кривая КР-спектра суспензии клеток *Synechocystis* приведена на рис. 2а. Известно, что у цианобактерий основной вклад в сигнал КР при возбуждении лазерами вносят каротиноиды (в меньшей степени – хлорофилл). Спектр КР ка-

ротиноидов содержит три интенсивные полосы: 1050 см⁻¹ (вращение CH₃-групп); 1160 см⁻¹ (колебание связей –C–C–); а также 1525 см⁻¹ (движение связей –C=C–) [21]. При этом отношение интенсивностей полос [1526/1160] связывают с подвижностью молекул каротиноидов в мембране, т.е. с вязкостью липидного бислоя.

На рис. 2б графически показаны различия соотношений пиков КР [1526/1160] для клеток му-

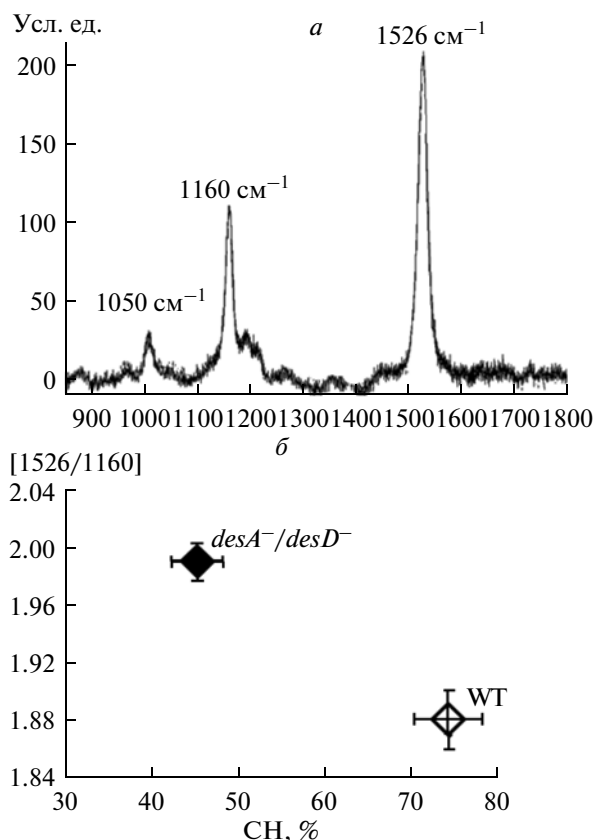


Рис. 2. Спектроскопия комбинационного рассеяния клеток *Synechocystis*. *a* – Типичный КР-спектр суспензии *Synechocystis* при возбуждении монохроматическим светом, $\lambda = 488$ нм. *б* – Зависимость отношения величин максимумов КР для клеток дикого типа (WT) и мутанта *desA⁻/desD⁻* от количества СН-остатков ЖК в составе липидов мембран.

танта и дикого типа в зависимости от количества СН-остатков ЖК в составе липидов мембран. Для клеток дикого типа $[1526/1160] = 1.88 \pm 0.02$; для мутанта *desA⁻/desD⁻* $[1526/1160] = 1.99 \pm 0.01$.

Таким образом, количество ненасыщенных ЖК в составе липидов мембран оказывает влияние на подвижность мембранных каротиноидов *Synechocystis*, что в свою очередь характеризует такой параметр, как “вязкость” клеточных мембран. Следовательно, мутант *desA⁻/desD⁻* характеризуется повышенной вязкостью (пониженной текучестью) клеточных мембран. Аналогичные результаты получены и при оценке вязкости мембран похожего мутанта с помощью метода инфракрасной Фурье-спектроскопии [11].

Характеристика роста клеток *desA⁻/desD⁻* при нормальной и пониженной температурах

Известно, что организмы, живущие в условиях пониженных температур, характеризуются повышенным содержанием ПНЖК, и наоборот – оби-

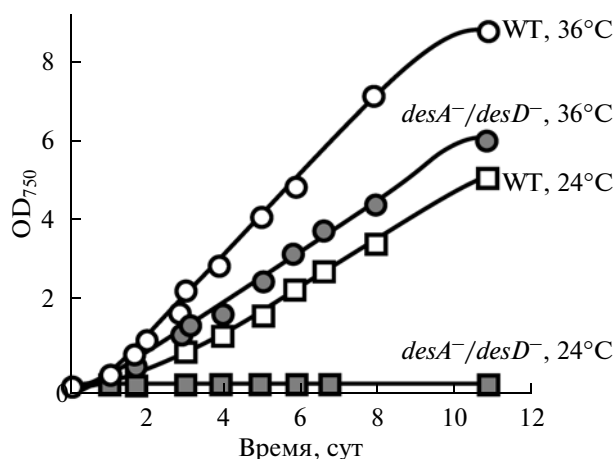


Рис. 3. Кривые роста клеток *Synechocystis* дикого типа (открытые символы) и мутанта *desA⁻/desD⁻* (темные символы) при оптимальной (36°C) и при пониженной (24°C) температуре. При достижении оптической плотности >0.5 ОЕ культуру разбавляли средой культивирования до 0.05–0.1 ОЕ – чтобы обеспечить достоверность результатов измерений. Таким образом, значения $OD_{750} > 0.5$ представляют собой результаты соответствующих вычислений, учитывающих разбавление суспензии клеток. Представлены усредненные результаты трех независимых экспериментов.

татели жарких районов склонны снижать степень ненасыщенности ЖК в липидах мембран. Способность регулировать вязкость клеточных мембран посредством десатурации остатков ЖК отражает важный механизм адаптации организмов к пониженным температурам. Поскольку мутант *desA⁻/desD⁻* характеризуется отсутствием в составе липидов остатков ПНЖК и повышенной вязкостью клеточных мембран, мы оценили его способность расти при пониженных температурах (рис. 3). Для этого суспензии цианобактерий, выращенные при температуре 36°C, разбавляли до $OD_{750} = 0.1$, после чего инкубировали при температуре 24°C. Контролем служили временные зависимости роста, полученные для клеток, растущих при 36°C.

Известно, что клетки цианобактерий испытывают состояние холодового стресса при снижении температуры окружающей среды более, чем на 6°C относительно той температуры, к которой их предварительно адаптировали [22]. Поскольку оптимальной температурой роста *Synechocystis* считается интервал 30–36°C, то 24°C следует считать условиями холодового стресса.

Кривые роста клеток дикого типа и мутанта, как при оптимальной, так и при пониженной температуре, отличались. Так, при 36°C клетки дикого типа, минуя лаг-фазу, переходили к экспоненциальной фазе роста, в то время как в культуре *desA⁻/desD⁻* значение оптической плотности некоторое время оставалась неизменным. На 6–8 сут

скорость роста мутанта приближалась к скорости роста клеток дикого типа (участки кривых параллельны). При 24°C клетки дикого типа росли приблизительно в 2 раза медленнее, чем при нормальной температуре. Мутант *desA⁻/desD⁻* оказался нежизнеспособным при культивировании в условиях пониженной температуры (рис. 3).

Таким образом, степень ненасыщенности остатков ЖК, и, как следствие – текучесть мембран, играют ключевую роль в способности клеток *Synechocystis* адаптироваться к условиям низкотемпературного стресса.

Анализ экспрессии гена *desB* при различных температурах

Анализ экспрессии гена *desB* проводили при помощи нозерн-блот гибридизации. В качестве контроля использовали ген рибосомной 16S РНК (рРНК) (рис. 4).

При снижении температуры в клетках дикого типа наблюдали увеличение количества мРНК *desB*, который достигал максимального значения при 24°C. У мутанта *desA⁻/desD⁻* максимальное накопление транскрипта *desB* регистрировали при 28–30°C; при дальнейшем снижении температуры уровень экспрессии этого гена заметно снижался (рис. 4).

Упомянутые различия экспрессионных профилей гена *desB* в клетках дикого типа и у *desA⁻/desD⁻* мутанта могут быть обусловлены как различиями в транскрипционной активности, так и различными временами жизни мРНК *desB*. На рис. 5 представлена динамика деградации мРНК *desB* в условиях холодного стресса (24°C) в присутствии ингибитора транскрипции рифампицина (150 мкг/мл). Таким способом – по разнице во времени деградации специфической мРНК – можно оценить время ее полужизни. В условиях данного эксперимента время полужизни мРНК гена *desB* составляло примерно 10 мин – как в клетках дикого типа, так и мутанта *desA⁻/desD⁻* (рис. 5). Различий динамики деградации транскрипта *desB* у мутанта и в клетках дикого типа также не наблюдалось. Таким образом, различия в количествах мРНК *desB* при разных температурах в клетках дикого типа и мутанта обусловлены различиями в транскрипционной активности промотора *desB*, которая зависит от текучести клеточных мембран.

Очевидно, что клетки мутанта “испытывают” состояние холодного стресса, подобное клеткам дикого типа, при более высоких температурах (разница в 4°C). Мы связываем данное явление с повышенной вязкостью мембран в клетках мутанта, что обусловлено отсутствием ПНЖК в составе его мембранных липидов. По всей видимости, клетки воспринимают не столько собственно

Таблица 2. Состав ЖК общих мембранных липидов клеток *Synechocystis* дикого типа и двойного мутанта *desA⁻/desD⁻*

Жирная кислота*	Относительное содержание жирных кислот, мол. %	
	Дикий тип	<i>desA⁻/desD⁻</i>
16:0	58 ± 3	53 ± 3
16:1 Δ ⁹	4 ± 1	3 ± 1
18:0	1	1
18:1 Δ ⁹	13 ± 1	42 ± 2
18:1 Δ ¹¹	1	1
18:2 Δ ^{9,12}	12 ± 1	0
α-18:3 Δ ^{9,12,15}	0	0
γ-18:3 Δ ^{6,9,12}	11 ± 1	0
18:4 Δ ^{6,9,12,15}	0	0
ИН	74 ± 4	45 ± 3

*Жирные кислоты обозначены условными символами “X:Y Δ^{N_i}”, где X – число углеродных атомов в остатке ЖК; Y – число *cis*-двойных связей в остатке ЖК; N_i – номера *i*-атомов углерода, образующих двойную связь, считая от карбоксильной группы: в данном случае двойная связь в положении Δ¹⁵ эквивалентна двойной связи в положении ω³. Двойная связь в положении Δ¹¹ образуется у прокариот неэнзиматическим путем. ИН – индекс ненасыщенности. Представлены результаты двух независимых экспериментов.

снижение температуры окружающей среды, сколько температурозависимое изменение физического состояния клеточных мембран.

Обнаруженное нами ранее усиление экспрессии гена Δ12-десатуразы ЖК, *desA*, происходило по принципу обратной связи в ответ на химическое гидрирование остатков ЖК липидов мембран при оптимальной температуре роста клеток дикого типа [8]. Каталитическое насыщение двойных связей в ЖК липидов цитоплазматической мембраны уплотняло мембрану и тем самым имитировало снижение температуры, вызывая ответную индукцию транскрипции гена десатуразы ЖК.

В данной работе использован мутантный штамм *Synechocystis*, дефектный по генам Δ6- и Δ12-десатураз ЖК. В этом штамме остаются активными гены двух десатураз ЖК: *desC* (кодирует первую Δ9-десатуразу ЖК и экспрессируется конститутивно, независимо от температуры) и *desB* (кодирует терминальную ω3-десатуразу и индуцируется при низких температурах). При этом следует иметь в виду, что в клетках мутанта *desA⁻/desD⁻* субстраты для ω3-десатуразы (18 : 2 Δ^{9,12} или 18 : 2 Δ^{6,12}) отсутствуют. Следовательно, транскрипция гена *desB* с последующей трансляцией соответствующего фермента никак не может привести к восстановлению физических свойств мембран. Тем не менее, у мутанта продолжает работать механизм обратной связи, позволяющий индуциро-

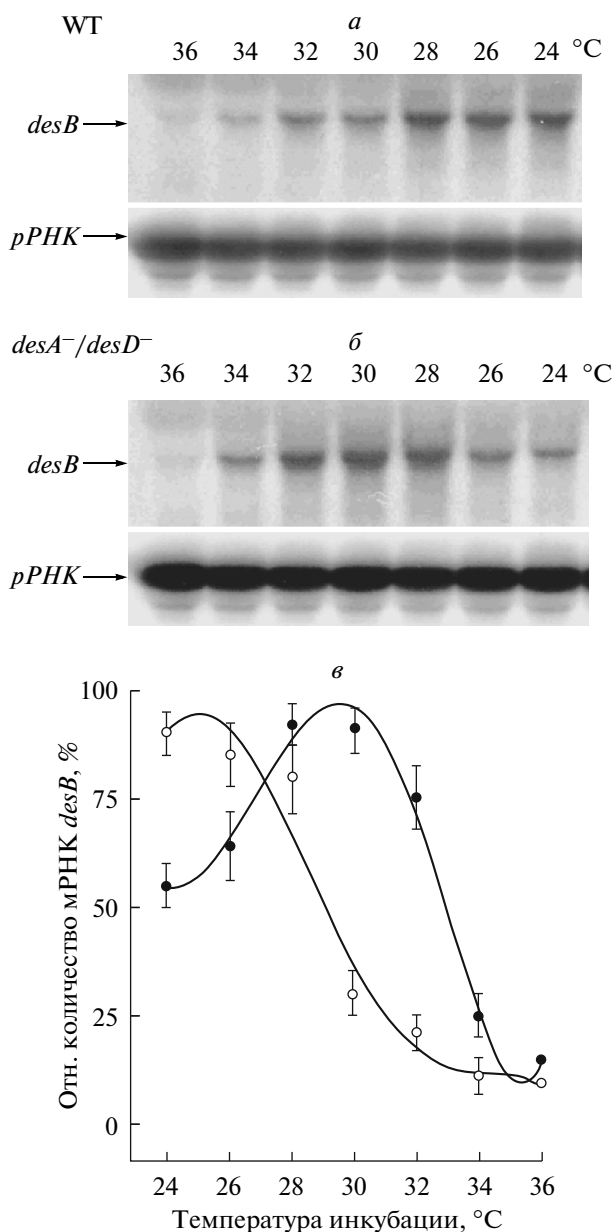


Рис. 4. Нозерн-блот анализ транскрипции гена *desB* в клетках *Synechocystis* дикого типа (WT) и мутанта *desA*⁻/*desD*⁻. *а* – Клетки выращивали при 36°C до оптической плотности 2 ОЕ (экспоненциальная фаза роста), после чего инкубировали при различных температурах (от 34°C до 24°C) в течение 20 мин. После этого из клеток выделяли РНК для нозерн-блотинга с использованием фрагментов генов *desB* и 16S рРНК в качестве зондов. *б* – Данные по экспрессии *desB* представлены графически как зависимость уровня экспрессии (в % от максимального) от температуры инкубации клеток дикого типа и мутанта *desA*⁻/*desD*⁻.

вать транскрипцию гена десатуразы при снижении температуры.

В данной работе показано, что транскрипция гена *desB*, кодирующего терминальную ω3-десатуразу ЖК, отвечающую за образование триено-

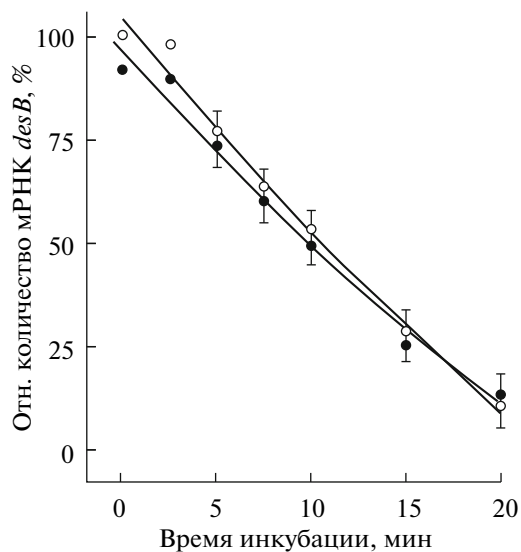


Рис. 5. Динамика деградации мРНК *desB* в присутствии рифампицина в клетках *Synechocystis* дикого типа (открытые символы) и мутанта *desA*⁻/*desD*⁻ (темные символы). Клетки выращивали при 36°C и инкубировали при 26°C в течение 30 мин. Затем к клеткам добавляли рифампицин до конечной концентрации 150 мкг/мл и аликвоты клеток отбирали через 5, 10, 15 и 20 мин. Из каждого образца выделяли суммарную клеточную РНК и проводили нозерн-блот анализ с использованием фрагмента гена *desB* в качестве зонда. Время полужизни мРНК *desB* определяли по исчезновению специфического сигнала на блотах. Представлены количественные результаты трех независимых экспериментов.

вых ЖК, также зависит от текучести клеточных мембран, как и транскрипция гена второй десатуразы *desA* [8], отвечающей за образование диеновых ЖК. Уменьшение текучести мембран, как и снижение температуры, приводит к индукции экспрессии этих двух генов. Таким образом, мы подтвердили существование обратной связи между вязкостью/текучестью биологических мембран и экспрессией генов, отвечающих за поддержание оптимального физического состояния мембран при изменении температуры окружающей среды.

Ранее нами показано, что температурозависимая транскрипция генов *desA* и – в большей степени – *desB* зависит от уровня сверхспирализации геномной ДНК [23]. Функционирование сенсорной гистидин-киназы Hik33, по-видимому, воспринимающей уплотнение мембраны при снижении температуры [21, 22], также зависит от стресс-индуцированных изменений в сверхспирализации ДНК [24]. Следовательно, есть взаимосвязь между степенью сверхспирализации геномной ДНК и экспрессией стресс-зависимых генов, с одной стороны, и физическим состоянием (текучестью/вязкостью) клеточных мембран, с которыми ассоциирован прокариотический нук-

леоид, с другой. Выяснение молекулярных механизмов и физических основ такой зависимости станет предметом дальнейших исследований.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№12-04-00473-а), грантом Программы Президиума Российской академии наук “Молекулярная и клеточная биология” и грантом Министерства образования и науки (№16.740.11.0176).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Новикова Г.В., Мошков И.Е., Лось Д.А. 2007. Белковые сенсоры и передатчики холодового и гиперосмотического стресса у цианобактерий и растений. *Молекуляр. биология*. **41**, 478–490.
- Los D.A., Zorina A., Sinetova V., Kryazhov S., Mironov K., Zinchenko V.V. 2010. Stress sensors and signal transducers in cyanobacteria. *Sensors*. **10**, 2386–2415.
- Зорина А.А., Миронов К.С., Степанченко Н.С., Синетова М.А., Куприянова Е.В., Аллахвердиев С.И., Лось Д.А. 2011. Системы регуляции стрессовых ответов у цианобактерий. *Физиология растений*. **57**, 643–663.
- Los D.A., Zinchenko V.V. 2009. Regulatory role of membrane fluidity in gene expression. In: *Lipids in photosynthesis*. Eds Wada H., Murata N. Springer Science & Business Media B.V. pp. 329–348.
- Kaneko T., Sato S., Kotani H., Tanaka A., Asamizu E., Nakamura Y., Miyajima N., Hirosawa M., Sugiura M., Sasamoto S., Kimura T., Hosouchi T., Matsuno Ai, Muraki A., Nakazaki N., Naruo K., Okumura S., Shimpo S., Takeuchi C., Wada T., Watanabe A., Yamada M., Yasuda M., Tabata S. 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**, 109–136.
- Mansilla M.C., Cybulski L.E., Albanesi D., de Mendoza D. 2004. Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *J. Bacteriol.* **186**, 6681–6688.
- Los D.A., Murata N. 1998. Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim. Biophys. Acta*. **1394**, 3–15.
- Vigh L., Los D.A., Horvath I., Murata N. 1993. The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulates the expression of the *desA* gene in *Synechocystis* PCC6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**, 9090–9094.
- Suzuki I., Los D.A., Kanesaki Y., Mikami K., Murata N. 2000. The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis*. *EMBO J.* **19**, 1327–1334.
- Suzuki I., Kanesaki Y., Mikami K., Kanehisa M., Murata N. 2001. Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik33 in *Synechocystis*. *Mol. Microbiol.* **40**, 235–244.
- Inaba M., Suzuki I., Szalontai B., Kanesaki Y., Los D.A., Hayashi H., Murata N. 2003. Gene-engineered rigidification of membrane lipids enhances the cold inducibility of gene expression in *Synechocystis*. *J. Biol. Chem.* **278**, 12191–12198.
- Murata N., Los D.A. 2006. Histidine kinase Hik33 is an important participant in cold-signal transduction in cyanobacteria. *Physiol. Plant.* **126**, 17–27.
- Okada K., Satoh K., Katoh S. 1991. Chloramphenicol is an inhibitor of photosynthesis. *FEBS Lett.* **295**, 155–158.
- Williams J.G.K. 1988. Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods Enzymol.* **167**, 766–778.
- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J., Herdman M., Stanier R. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Gen. Microbiol.* **111**, 1–61.
- Grigorieva G., Shestakov S. 1982. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* **13**, 367–370.
- Zang X., Liu B., Liu S., Arunakumara K.K.I.U., Zhang X. 2007. Optimum conditions for transformation of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Microbiol.* **45**, 241–245.
- Nakamura Y., Kaneko T., Hirosawa M., Miyajima N., Tabata S. 1998. CyanoBase, a www database containing the complete nucleotide sequence of the genome of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Nucl. Acids Res.* **26**, 63–67.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition)*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bligh E.G., Dyer W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917.
- Marshall C.P., Leuko S., Coyle C.M., Walter M.R., Burns B.P., Neilan B.A. 2007. Integration of β -carotene molecules in small liposomes. *Astrobiology*. **7**, 631–643.
- Los D.A., Murata N. 2004. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochim. Biophys. Acta*. **1666**, 142–157.
- Los D.A. 2004. The effect of low-temperature-induced DNA supercoiling on the expression of the desaturase genes in *Synechocystis*. *Cell Mol. Biol.* **50**, 605–612.
- Prakash J.S.S., Sinetova M., Kupriyanova E., Zorina A., Suzuki I., Murata N., Los D.A. (2009) DNA supercoiling regulates the stress-inducible expression of genes in the cyanobacterium. *Mol. BioSystems*. **5**, 1904–1912.