

УДК 581.1

**ЭКСПРЕССИЯ АТФаз Р-ТИПА МОРСКОЙ ЗЕЛЁНОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ
DUNALIELLA MARITIMA В УСЛОВИЯХ ГИПЕРОСМОТИЧЕСКОГО СОЛЕВОГО ШОКА****Д. Е. Храмов, Д. А. Маталин, И. В. Карпычев, Ю. В. Балнокин, Л. Г. Попова***

Представлено академиком РАН В.П. Скулачевым 13.03.2019 г.

Поступило 13.03.2019 г.

Из морской микроводоросли *Dunaliella maritima* клонировали частичные последовательности АТФаз Р-типа: двух, предположительно, H^+ -АТФаз (*DmHA1* и *DmHA2*) и двух Ca^{2+} -АТФаз (*DmCA1* и *DmCA2*). О вероятной функции клонированных белков судили по сходству их первичной структуры со структурами белков, функции которых хорошо охарактеризованы. Методом количественной ОТ-ПЦР исследовали изменения экспрессии генов клонированных АТФаз *D. maritima* в ответ на резкое повышение концентрации NaCl в среде культивирования (от 100 до 500 мМ). Гиперосмотический солевой шок приводил к существенному увеличению экспрессии *DmHA2* и незначительному росту экспрессии *DmCA2*, тогда как экспрессия двух других АТФаз, *DmHA1* и *DmCA1*, была подавлена. Полученные данные указывают на то, что АТФаза *DmHA2* вовлечена в ионное гомеостатирование клеток *D. maritima* в условиях гиперосмотического солевого шока.

Ключевые слова: АТФазы Р-типа, ионное гомеостатирование, клонирование, морские микроводоросли, *Dunaliella maritima*.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524884446-451>

Живые клетки, как прокариоты, так и эукариоты, поддерживают низкие концентрации Na^+ в цитоплазме. Локализованные в клеточных мембранах Na^+ -транспортирующие белки экспортируют ионы Na^+ из цитоплазмы с затратой метаболической энергии. В животных клетках эту функцию выполняет Na,K-АТФаза плазматической мембраны (ПМ), а в клетках высших растений – Na^+/H^+ -антипортеры ПМ и тонопласта, использующие для экспорта Na^+ энергию протонного градиента [1]. Последний создается на ПМ растительной клетки H^+ -АТФазой Р-типа (на тонопласте – H^+ -АТФазой V-типа, а также H^+ -транслоцирующей пирогосфатазой) [1]. Как Na,K-АТФаза животных клеток, так и H^+ -АТФаза плазмалеммы растительных клеток относятся к семейству АТФаз Р-типа, образующих в каталитическом цикле фосфорилированный интермедиат. АТФазы Р-типа характерны для ПМ эукариотических клеток и переносят через мембрану малые катионы (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , H^+), ионы тяжелых металлов и фосфолипиды [2].

У эволюционных предшественников высших растений – зелёных галотолерантных микроводорослей, обитающих в солёных средах, внутриклеточные концентрации Na^+ также поддерживаются на существенно более низком уровне, чем в наружной среде [3]. Показано, что у этих организмов в

плазматической мембране функционирует Na^+ -транспортирующая АТФаза Р-типа [4], которая, как предполагается, и отвечает за экспорт Na^+ из цитоплазмы в наружную среду. Подобный фермент у высших растений не обнаружен.

Галотолерантная микроводоросль *Dunaliella maritima* относится к большому семейству одноклеточных зелёных водорослей *Dunaliellaceae*, которые в большинстве своем обитают в средах с высокими концентрациями NaCl и используются как модельные объекты в исследованиях механизмов Na^+ -гомеостатирования клеток растений, в частности в исследованиях механизмов транспорта Na^+ [5]. Особенностью клеток микроводорослей рода *Dunaliella* является отсутствие крупной центральной вакуоли, и поэтому основные механизмы ионного гомеостатирования у этих водорослей расположены в ПМ. У представителя этого рода, *D. maritima*, в экспериментах на выделенных везикулах ПМ обнаружена Na^+ -транспортирующая АТФаза Р-типа [6].

С целью идентификации гена Na^+ -АТФазы у *Dunaliella* мы провели поиск in silico возможных последовательностей АТФаз Р-типа в собранном нами de novo транскриптом родственной микроводоросли *D. tertiolecta* [7]. Массивы коротких прочтений РНК для сборки транскриптома *D. tertiolecta* были взяты в информационной базе Sequence Read Archive, NCBI.

Наличие Na^+ -АТФаз у морских микроводорослей не вызывает в настоящее время сомнений [4], однако вопреки ожиданиям в транскриптом *D. tertiolecta*

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева
Российской Академии наук, Москва

* E-mail: lora_gp@mail.ru

Таблица 1. Список праймеров, использованных в работе

Последовательность	Праймеры для амплификации фрагментов кодирующих последовательностей АТФаз (5'–3')	
<i>DmHA1</i>	F	CCCGTGCAGATTGACCAAGC
	R	TCGCCAGCATCTCCCACT
<i>DmHA2</i>	F	AGCCCAGACCTGCACGAA
	R	CCACACGAGCAGACATTCGGAT
<i>DmCA1</i>	F	GCTGTTATCACCCACCTGCCT
	R	TTGTTGTCGCCAGTGATGACCA
<i>DmCA2</i>	F	GCCACACCCCTGTCACCT
	R	AGCTTGAGCACCTCGTCCA
Праймеры для регистрации относительного количества транскриптов АТФаз (5'–3')		
β -тубулин	F	CAGATGTGGGATGCCAAGAACAT
	R	GTTCAGCATCTGCTCATCCACCT
<i>DmHA1</i>	F	TCAGCACGCGAACACCCCT
	R	GCGCCCTGTCTGCCAACACA
<i>DmHA2</i>	F	AGGATGATGTGCTGCTTTACTCC
	R	GTGATCAGCTTCTCGCCAGT
<i>DmCA1</i>	F	CATCAAGTATGGCAGAAACCAG
	R	TTGCCACCAAATCAACAGG
<i>DmCA2</i>	F	GCCACACCCCTGTCACCT
	R	CCGGTCGTAAAGTAGTCACA

не было обнаружено последовательности, которую можно было бы однозначно отнести к группе Na^+ -АТФаз. Однако в транскриптом *D. tertiolecta* были обнаружены наряду с различными АТФазами Р-типа транскрипты двух разных H^+ -АТФаз и двух Ca^{2+} -АТФаз. О предполагаемой функции этих белков судили по сходству их первичной структуры со структурами белков, функции которых хорошо охарактеризованы. Сходство как нуклеотидных, так и аминокислотных последовательностей двух H^+ -АТФаз *D. tertiolecta* между собой оказалось относительно невелико (около 40% идентичных нуклеотидов в кодирующей последовательности и около 40% идентичных аминокислотных остатков), что не позволяет рассматривать эти АТФазы как изоформы одного фермента. Функционирование двух различных протонных помп в плазмалемме микроводоросли *D. tertiolecta* маловероятно, поэтому мы предположили, что из двух предсказанных H^+ -АТФаз один фермент переносит протоны, тогда как другой — ионы Na^+ . Также в качестве кандидата на роль Na^+ -АТФазы у *Dunaliella* можно рассматривать один из ферментов, которые были идентифицированы *in silico* как Ca^{2+} -АТФазы [7]. Последнее предположение основано на близком сходстве структур Na^+ - и Ca^{2+} -АТФаз [8]. Данная работа была предпринята с целью проверки выдвинутой гипотезы.

Объектом настоящего исследования была морская микроводоросль *Dunaliella maritima* Massjuk. Водоросль культивировали в среде, содержащей 0,46 М

NaCl , как описано ранее [9]. Суммарную РНК выделяли методом, описанным в работе [10]. Первую цепь кДНК получали на матрице суммарной РНК с помощью набора MMLV RT kit (“Евроген”, Россия). На матрице, полученной кДНК с помощью набора Encyclo Plus PCR kit (“Евроген”, Россия) и с использованием ген-специфичных праймеров (табл. 1) амплифицировали частичные последовательности двух, предположительно, протонных и двух Ca^{2+} -АТФаз (обозначены нами как *DmHA1*, *DmHA2*, *DmCA1*, *DmCA2*). Подбор ген-специфичных праймеров осуществляли на основе последовательностей, кодирующих H^+ - и Ca^{2+} -АТФазы, идентифицированных *in silico* в собранном нами *de novo* транскриптом микроводоросли *D. tertiolecta* [7]. Амплифицированные фрагменты ДНК при помощи набора Quick-TA kit (“Евроген”, Россия) клонировали в вектор pAL2-T и размножали в клетках *E. coli*.

Клонированные частичные последовательности АТФаз *D. maritima* были секвенированы (“Евроген”, Россия) и аннотированы (приведены идентификаторы в GenBank): *DmHA1* — AQM50089.1, *DmHA2* (полноразмерная последовательность) — AQM50087.1, *DmCA1* — AQM50088.1, *DmCA2* — MK510927. Сравнение (сервис BLAST/NCBI) клонированных последовательностей с идентифицированными *in silico* последовательностями соответствующих АТФаз микроводоросли *D. tertiolecta* (собственные неопубликованные данные) показало практически полную идентичность соответствующих

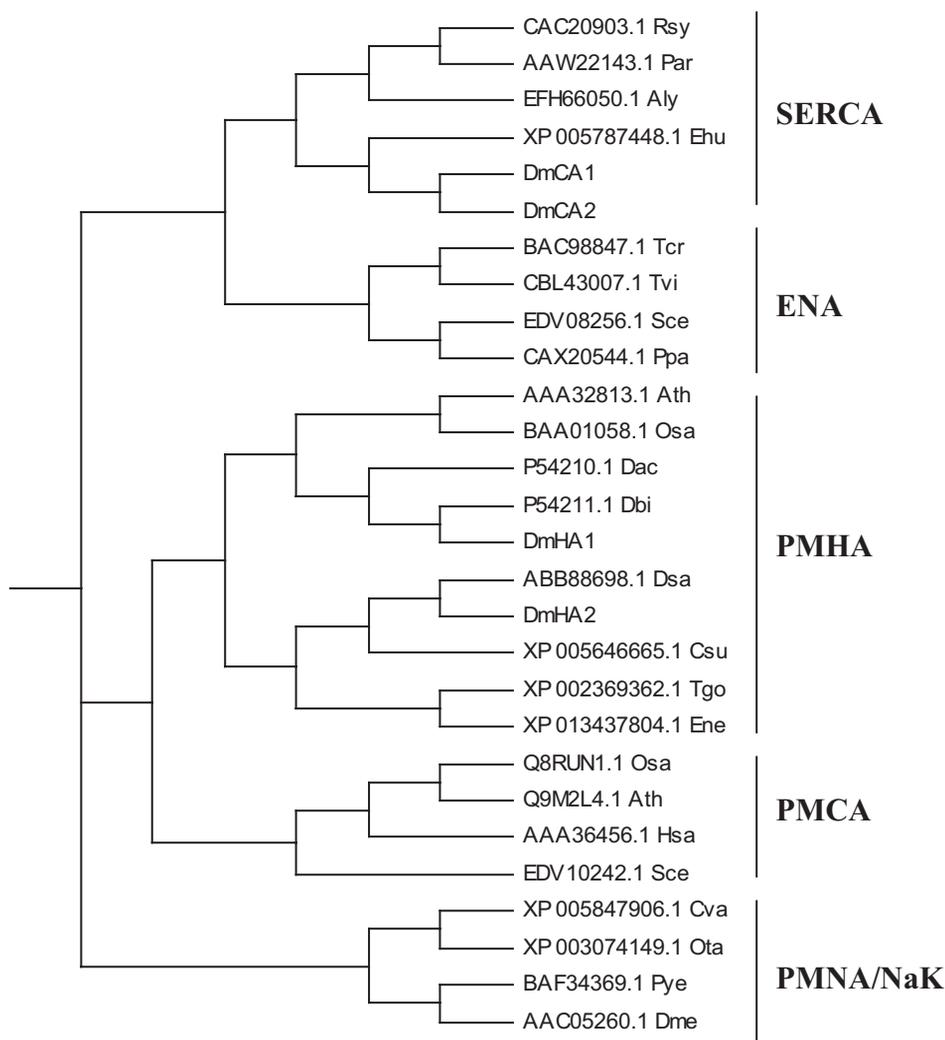


Рис. 1. Кладогрaмма Ca^{2+} -, Na^+ - и H^+ -АТФаз Р-типа. **SERCA** – Ca^{2+} -АТФазы сарко/эндоплазматического ретикулума; **ENA** – Na^+ -АТФазы дрожжевого типа; **PMHA** – H^+ -АТФазы плазматических мембран; **PMCA** – Ca^{2+} -АТФазы плазматических мембран; **PMNA/NaK** – Na^+ -АТФазы, схожие с Na,K -АТФазой животных клеток. Организмы: Aly – *Arabidopsis lyrata*, Ath – *Arabidopsis thaliana*, Csu – *Coccomyxa subellipsoidea*, Cva – *Chlorella variabilis*, Dac – *Dunaliella acidophila*, Dbi – *Dunaliella bioculata*, Dme – *Drosophila melanogaster*, Dsa – *Dunaliella salina*, Ehu – *Emiliania huxleyi*, Ene – *Eimeria necatrix*, Hsa – *Homo sapiens*, Osa – *Oryza sativa*, Ota – *Ostreococcus tauri*, Par – *Panulirus argus*, Ppa – *Physcomitrella patens*, Pye – *Pyropia yezoensis*, Rsy – *Runa sylvatica*, Sce – *Saccharomyces cerevisiae*, Tcr – *Trypanosoma cruzi*, Tvi – *Tetraselmis viridis*.

АТФаз двух родственных видов водорослей. Клонированные частичные последовательности АТФаз из *D. maritima* продемонстрировали также высокую степень сходства с АТФазами из других видов *Dunaliella*. Так, *DmHA1* оказалась практически идентична H^+ -АТФазе из *D. bioculata* (P54211.1 UniProtKB/SwissProt, 99% идентичных аминокислотных остатков (а.о.)) и показала высокую степень сходства с H^+ -АТФазой из ацидофильной водоросли *D. acidophila* (P54210.1 UniProtKB/SwissProt, 82% идентичных а.о.). В свою очередь, *DmHA2* оказалась практически идентична АТФазе из экстремально галотолерантной водоросли *D. salina* (ABB88698.1,

99% идентичных а.о.), тогда как её сходство с H^+ -АТФазами из *D. bioculata* (P54211.1) и *D. acidophila* (P54210.1) оказалось относительно невелико (менее 40% идентичных а.о.). Последовательность *DmCA1* обнаружила высокую степень идентичности (99%) с катион-транспортирующей АТФазой из *D. bioculata* (P54209.1 UniProtKB). Последовательность *DmCA2* оказалась сходной (до 70% идентичных а.о.) с Ca^{2+} -АТФазами эндоплазматического ретикулума из различных видов водорослей и высших растений. На рис. 1 представлена кладогрaмма различных H^+ -АТФаз, Ca^{2+} -АТФаз и Na^+ -АТФаз,

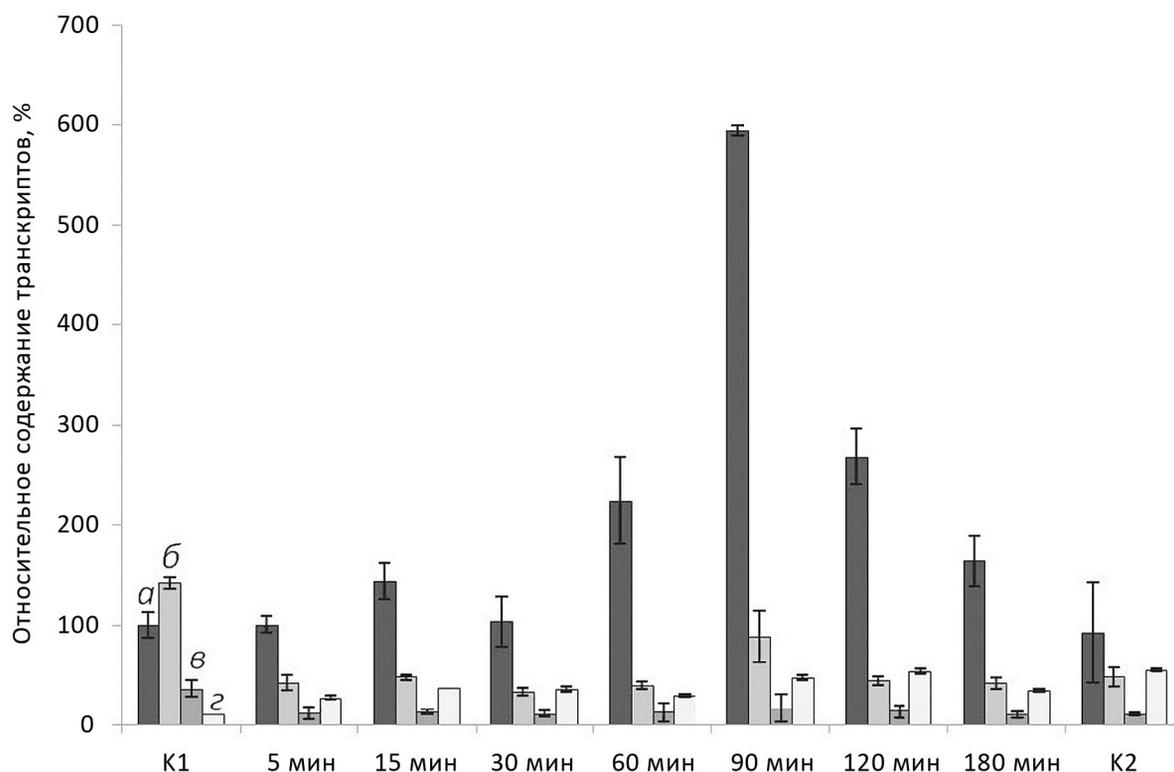


Рис. 2. Относительное содержание транскриптов АТФаз *DmHA1*, *DmHA2*, *DmCA1* и *DmCA2* в клетках водоросли *D. maritima* на разных стадиях ответной реакции на гиперосмотический солевой шок. Варианты: *a* – *DmHA2*, *б* – *DmHA1*, *в* – *DmCA1*, *г* – *DmCA2*. В нулевой момент времени концентрация NaCl в среде роста водорослей увеличена с 100 до 500 мМ. Контрольные варианты: K1 – образцы из культуры водоросли, растущей в среде, содержащей 0,1 М NaCl; K2 – образцы из культуры водоросли, растущей в среде, содержащей 0,5 М NaCl. Для каждого образца реакцию проводили в трёх аналитических повторностях. Приведены усредненные данные из трёх независимых экспериментов. В качестве погрешностей указаны стандартные отклонения.

демонстрирующая родство клонированных АТФаз *D. maritima* с АТФазами Р-типа из других организмов.

Чтобы выявить кандидата на роль Na^+ -транспортирующей АТФазы у водорослей *Dunaliella*, мы исследовали экспрессию генов клонированных АТФаз *D. maritima* в условиях гиперосмотического солевого шока. В данной серии экспериментов была использована культура водоросли, акклимированная к относительно низким концентрациям соли (0,1 М NaCl) в среде. Гиперосмотический солевой шок для клеток создавали, добавляя в суспензию водорослей NaCl до конечной концентрации 0,5 М. Аликвоты клеточной суспензии (200 мл) отбирали через определенные промежутки времени после добавления NaCl и из клеток выделяли суммарную РНК. Уровень экспрессии генов определяли методом количественной ПЦР в реальном времени (кОТ-ПЦР). Используемые праймеры (табл. 1) были комплементарны участкам, лежащим внутри секвенированных фрагментов АТФаз *DmHA1*, *DmHA2*, *DmCA1*, *DmCA2*. В качестве референсного гена был использован ген β -тубулина *Dunaliella*, последовательности

праймеров для которого были взяты из работы [11]. Полученные данные обрабатывали при помощи программного обеспечения к амплификатору АНК-32. Для анализа данных использовали пороговый метод, относительный уровень представленности транскриптов определяли по формуле $R = 2^{\Delta C_t}$.

В ходе ответной реакции клеток водоросли на гиперосмотический солевой шок происходила значительная индукция гена АТФазы *DmHA2* и уровень представленности транскриптов этого фермента был выше, чем для других исследуемых АТФаз. Наблюдалось также некоторое увеличение экспрессии гена *DmCA2*, тогда как экспрессия генов двух других АТФаз – *DmHA1*, *DmCA1* – снижалась и оставалась на относительно низком уровне (рис. 2). Максимум экспрессии гена *DmHA2* приходился на время 90 мин после внесения NaCl в клеточную суспензию. Далее уровень транскриптов *DmHA2* постепенно снижался и через 3 ч возвращался к приблизительно исходным значениям. Динамика экспрессии гена *DmHA2* соответствовала динамике внутриклеточных концентраций Na^+ у *D. maritima* в аналогичных условиях гипер-

осмотического солевого шока [12]. Согласно данным последней работы, возросшее в результате гиперосмотического солевого шока содержание Na^+ в клетках *D. maritima* возвращалось к исходному дошоковому уровню к 90-й минуте после резкого увеличения концентрации соли в среде, что по времени совпадает с максимумом экспрессии *DmHA2* (рис. 2).

Полученные результаты позволяют предложить кандидата на роль Na^+ -транспортирующей АТФазы микроводоросли *D. maritima*, а именно АТФазу *DmHA2*. Значительная индукция *DmHA2* при повышении концентрации NaCl в среде показывает, что кодируемый этим геном белок необходим для преодоления клетками гиперосмотического солевого стресса. Белок *DmHA2* является ион-транспортирующей АТФазой Р-типа и, по-видимому, несмотря на сходство с протонными АТФазами (рис. 1), может принимать непосредственное участие в транспорте ионов Na^+ , т.е. является Na^+ -транспортирующей АТФазой. Следует отметить в связи с этим, что у морских микроводорослей существуют термодинамические ограничения на экспорт Na^+ из клеток посредством Na^+/H^+ -антипортера — экспорта, который зависит от протонного градиента на мембране и создается H^+ -АТФазой [13]. Кроме того, известно, что при гиперосмотическом солевом шоке у галотолерантных микроводорослей происходит защелачивание цитоплазмы, являющееся, по-видимому, следствием поступления Na^+ в клетки через Na^+/H^+ -антипортер [14], а активность H^+ -АТФазы при щелочных рН минимальна. Оба эти обстоятельства свидетельствуют против индукции у *D. maritima* в этих условиях H^+ -АТФазы, выводящей протоны из клеток. Соответственно, при повышении концентрации NaCl в среде снижался уровень экспрессии АТФазы *DmHA1* (рис. 2), которая в большей степени, чем *DmHA2*, сходна с H^+ -АТФазами высших растений (рис. 1) и с большей вероятностью является ферментом, переносящим через мембрану протон.

Гипотеза о функционировании *DmHA2* как Na^+ -АТФазы подкрепляется экспериментальными данными, показывающими, что замена двух-трех аминокислот или даже одной аминокислоты в аминокислотной последовательности ион-транспортирующей АТФазы является достаточной для изменения ионной специфичности фермента [15]. Очевидно, однако, что требуются дальнейшие эксперименты для подтверждения функционирования белка *DmHA2* как Na^+ -транспортирующей АТФазы.

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 16–04–01544.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bassil E., Coku A., Blumwald E.* // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. P. 5727–5740
2. *Scarborough G.A.* // Curr. Opin. Cell Biol. 1999. V. 11. P. 517 – 522.
3. *Балнокин Ю.В.* // Ионный гомеостаз и солеустойчивость растений. 70-е Тимирязевское чтение. М.: Наука. 2012. 100 с.
4. *Попова Л.Г., Балнокин Ю.В.* // Физиология растений. 2013. Т. 60. С. 499–511.
5. *Oren A.* // Saline systems. 2005. V. 1. P. 1-14.
6. *Popova L.G., Shumkova G.A., Andreev I.M., Balnokin Y.V.* // FEBS Letters. 2005. V. 579. P. 5002–5006.
7. *Попова Л.Г., Беляев Д.В., Шувалов А.В., Юрченко А.А., Маталин Д.А., Храмов Д.Е., Орлова Ю.В., Балнокин Ю.В.* // Молек. биол. 2018. V. 52. P. 601–615.
8. *Barrero-Gil J., Garciadeblas B., Benito B.* // J. Bioenerg. Biomembr. 2005. V. 37. P. 269-278.
9. *Balnokin Y.V., Popova L., Myasoedov N.A.* // Plant Physiol. Biochem. 1993. V. 31. С. 159–168.
10. *De Vries S., Hoge H., Bisseling T.* // Plant Molecular Biology Manual. Eds. S.B. Gelvin, R.A. Schilperoort, D.P.S. Verma Dordrecht. The Netherlands: 1988. Kluwer Acad. Publ. P. 1–13.
11. *Lin H., Fang L., Low C.S., Chow Y., Lee Y.K.* // FEBS J. 2013. V. 280. P. 1064–1072.
12. *Захожий И.Г., Маталин Д.А., Попова Л.Г., Балнокин Ю.В.* // Физиол. растений. 2012. Т. 59. С. 48–56.
13. *Balnokin Y.V., Popova L.G., Gimmler H.* // J. Plant Physiol. 1997. V. 150. P. 264–270.
14. *Katz A., Bental V., Degani H., Avron M.* // Plant Physiol. 1991. V. 96. P. 110 – 115.
15. *Kaim G., Dimroth P.* // Eur. J. Biochem. 1994. V. 222. P. 615–623.

**EXPRESSION OF P-TYPE ATPASES OF MARINE GREEN MICROALGA
DUNALIELLA MARITIMA UNDER HYPEROSMOTIC SALT SHOCK****D. E. Khramov, D. A. Matalin, I. V. Karpichev, Y. V. Balnokin, L. G. Popova***K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences*

Presented by Academician of the RAS V.P. Skulachev March 3, 2019

Received March 3, 2019

Partial sequences of P-type ATPases were cloned from the marine microalgae *Dunaliella maritima*: two presumably H⁺-ATPases (*DmHA1* and *DmHA2*) and two putative Ca²⁺-ATPases (*DmCA1* and *DmCA2*). The functions of cloned proteins were estimated on the bases of their primary structure similarity with the proteins whose functions have been already characterized. The transcriptional response of cloned ATPase genes to a sharp increase in the NaCl concentration in the culture medium (from 100 to 500 mM) was investigated by quantitative RT-PCR. Hyperosmotic salt shock led to a significant increase in *DmHA2* expression and to a slight increase in *DmCA2* expression, while the expression of two other ATPases, *DmHA1* and *DmCA1*, was repressed. The obtained data indicate that *DmHA2* is involved in maintenance of ion homeostasis in *D. maritima* cells under hyperosmotic salt shock.

Keywords: P-type ATPases, ion homeostasis, ATPase cloning, marine microalgae, *Dunaliella maritima*.