

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ В КЛЕТКАХ КАЛЛУСА СОИ И ЗЕЛеной ВОДОРосЛИ ХЛАМИДОМОНаДЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭКЗОГЕННОГО АММОНИЯ

© А. П. Смолов,^{1,*} А. М. Бутанаев,¹ Г. А. Семенова,² Г. Н. Шишкиова¹

¹ Институт фундаментальных проблем биологии РАН и

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская обл.

* электронный адрес: smap49@mail.ru

Проведен сравнительный анализ полученных экспериментальных данных по влиянию экзогенного аммония на содержание белка, хлорофилла, количество рибосомальных структур и экспрессию рибосомальных генов, кодирующих белок малой субъединицы 6S и 18S рРНК в клетках каллусной культуры сои *Glycine max* и одноклеточной зеленой водоросли хламидомонады *Chlamydomonas reinhardtii*. Показано, что под влиянием экзогенного аммония уменьшение количества рибосомальных структур в клетках каллуса сои, как и в клетках водоросли, не вызвано снижением активности соответствующих рибосомальных генов. Обсуждаются возможные механизмы влияния аммония как на содержание рибосом в клетках, так и на содержание в них белка и хлорофилла.

Ключевые слова: каллусная культура сои, хламидомонада, аммоний, рибосомы, рибосомальные гены.

Для своего роста и развития высшие растения могут использовать как окисленную (нитрат), так и восстановленную (аммоний) форму минерального азота. Однако использование той или иной формы в качестве его единственного источника приводит к торможению активности ростового процесса или даже к гибели клеток, если, например, концентрация аммония в среде превышает допустимый предел. Экспериментально установлено, что сочетание нитратной и аммонийной форм является лучшим способом обеспечения растительной клетки минеральным азотом (Marshner, 1986). Оптимальное соотношение аммония и нитрата в азотном снабжении клеток растения, по-видимому, специфично для каждого вида и колеблется в пределах от 1 : 10 до 1 : 1. Тем не менее некоторые низшие растения, например водоросли, вполне способны расти исключительно на нитратсодержащей безаммонийной питательной среде (Саут, Уиттик, 1990).

Давно установлено, что именно аммоний является одним из участников процесса синтеза первых азотсодержащих органических соединений — аминокислот, тогда как ассимиляция нитрата в органические соединения возможна лишь после восстановления его в аммонийную форму (Кретович, 1987). Следовательно, активный рост клеток водоросли на нитрате может быть обеспечен только наличием в клетках активной, восстанавливающей нитрат системы, способной обеспечить образование аммония в необходимом количестве. Отсюда становится очевидным: главная роль аммония в жизнедеятельности растительной клетки сводится к его субстратной функции, а именно к участию аммония в реакциях аминирования кетокислот (т. е. синтеза аминокислот).

Ранее при изучении влияния экзогенного аммония на миксотрофные каллусные клетки сои *G. max* было пока-

зано, что присутствие аммония в питательной среде (даже в небольших концентрациях — меньше 0.1 мМ) вызывало значительное (в 5—10 раз) повышение числа рибосом в них и увеличивало количество мембранных образований в других органеллах клетки (хлоропластах и митохондриях) (Смолов, Семенова, 2008).

Однако культура клеток *in vitro* — это искусственно созданная модельная система, метаболические процессы в которой не всегда полностью идентичны процессам, происходящим в растениях *in vivo*. Оценить влияние аммония на формирование и функционирование рибосом в надземной части высшего растения достаточно непросто, поскольку поглощенный корнями высших растений аммоний может транспортироваться в надземные органы как в ионной форме, так и в виде аминов органических соединений, синтезированных в клетках корня (Измайлов, 1986).

Аналогичный результат действия аммония на содержание рибосомальных структур (т. е. увеличение их содержания в клетке) был показан и на одиночных клетках зеленой водоросли хламидомонады *C. reinhardtii* (Смолов и др., 2012).

Следовательно, сходные результаты, полученные на столь различающихся растительных объектах (клетки каллуса высшего растения и клетки водоросли), давали основание предположить существование иной, «несубстратной», функции аммония, которая связана с формированием и, возможно, функционированием рибосомально-го белоксинтезирующего аппарата клетки.

Формирование рибосомального комплекса клетки — многоэтапный процесс, происходящий в трех различных ее компартментах (ядрышке, нуклеоплазме и цитоплазме) (Leary, Huang, 2001), и начинается он с экспрессии генов

рибосомального комплекса. Учитывая, что последовательности генов рРНК и рибосомальных белков известны для многих видов растений, появляется возможность провести сравнительный анализ влияния аммонийного компонента питательной среды на экспрессию генов, ответственных за начальные этапы формирования рибосом в клетках низшего (хламидомонада) и высшего (клетки каллуса сои) растительных объектов.

Известно, что у эукариот последовательности 28S, 5.8S и 18S рРНК составляют единую транскрипционную единицу, а рибосомальные белки должны присутствовать в клетке в эквимольных количествах (Holstege et al., 1998). Поэтому, исследуя уровень экспрессии гена одной рРНК и уровень экспрессии гена одного рибосомального белка, можно достаточно надежно судить о влиянии аммония на экспрессию генов всего рибосомального комплекса клетки на начальном этапе процесса их формирования.

Таким образом, целью проделанной работы было сравнительное исследование влияния экзогенного аммония на содержание рибосом, общего белка и хлорофилла, а также на уровень экспрессии генов, кодирующих белок малой субъединицы ррS6 и 18S рРНК при формировании рибосомального комплекса в клетках суспензии хламидомонады и каллусных клетках сои.

Материал и методика

Объектом исследования служили одноклеточная зеленая водоросль хламидомонада *C. reinhardtii* (штамм gr—21), содержащая в геноме ген нитратредуктазы *nit1*, и каллусная культура клеток сои *G. max*.

Условия культивирования. Клетки *C. reinhardtii* выращивали на среде ТАР с различным составом компонентов минерального азота (вариант 1 — с NH_4Cl , вариант 2 — с NH_4NO_3 и вариант 3 — с KNO_3). Суммарное содержание азота в каждом варианте среды выравнивалось и не превышало 7 мМ. Для чистоты эксперимента аммонийсодержащий компонент микроэлементов $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ заменяли на $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Другие компоненты среды сохраняли на уровне стандартной среды ТАР.

Клеточную суспензию хламидомонады культивировали в конических колбах объемом 300 мл со 100 мл питательной среды при 25 °С и слабой освещенности (около 1—2 клк) в течение 10—12 сут на безаммонийной (нитратной) среде. Затем равные количества инокулята клеток из безаммонийной среды помещали на среды с разным составом минерального азота (варианты 1—3) и вновь культивировали в тех же условиях в течение 2 нед. Только после такой процедуры клетки использовали для анализа.

Другой объект исследования — миксотрофную каллусную культуру клеток сои, выращивали на среде МС в двух вариантах: в первом использовали стандартный состав минеральных солей (среда содержала NH_4NO_3 и KNO_3 — вариант 2), во втором — минеральная форма азота была представлена исключительно KNO_3 (вариант 3). Общее содержание минерального азота в обеих средах было равным и составляло 60 мМ. Питательную среду МС с аммонием в качестве единственного источника азота (вариант 1) в эксперименте не использовали, поскольку собственный опыт и данные других авторов (Edit, Laszlo, 1992) указывали на подавление ростовой активности у клеток *in vitro* таким составом минерального азота. Гидролизат казеина — органическую форму азота — не вносили в составы обеих сред. Другие компонен-

ты питательной среды соответствовали стандартной среде МС. Клетки выращивали при 25 °С и освещенности 4—5 клк в режиме: 16 ч свет + 8 ч темнота.

Образцы для определения экспрессии соответствующих генов представляли собой в одном случае массу целых неразрушенных клеток хламидомонады, полученную после центрифугирования 1 мл суспензии возраста 10—12 сут, а в другом — кусочки каллусной ткани около 100 мг сырой массы возрастом 3—4 нед.

Анализ экспрессии генов. Выделение суммарной РНК проводили с использованием реагента TRIzol (Invitrogen, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Для синтеза первой цепи кДНК использовали набор First Strand cDNA Synthesis Kit Enhanced (Fermentas, Литва) так, как рекомендовано производителем. Амплификацию кДНК, а также анализ продуктов амплификации в режиме реального времени, проводили на приборе iCycler IQ5 (Bio-Rad, США) с использованием готовой реакционной смеси с интеркалирующим красителем SYBR Green I (SYBR Green JumpStart ReadyMix for Quantitative PCR (Sigma, США). В качестве внутреннего контроля использовали ген актина (ACTB) хламидомонады. Праймеры к нуклеотидным последовательностям исследуемых генов были подобраны с использованием программы Oligo. Условия ПЦР в реальном времени: 95 °С — 3 мин (1 цикл); 95 °С — 30 с, 60 °С — 30 с, 72 °С — 30 с (50 циклов). В конце каждой реакции проводили анализ кривых плавления для контроля чистоты продукта и специфичности амплификации. Обработку результатов выполняли так, как описано в инструкции к прибору iCycler IQ5.

Последовательности праймеров: ррS 6 (5'-TCCGCAAGATGTTCAACCTGG-3', 5'-TCTCCTGGCGCTTCTTC-3'); 18S rRNA (5'-GCGACCAACGAGCCTATCCTT-3', 5'-CTTACCAGCACACCCCAATCG-3'); актин (5'-GATGTGGACATCCGCAAGGAC-3', 5'-GACTTGGCGATCCACATTTGC-3').

Вся информация о генах хламидомонады была получена из баз данных Chlamydomonas Center (<http://www.chlamy.org>) и National Center for Biotechnological Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Содержание сухой массы клеток (суспензии и каллуса) в анализируемом объекте определяли взвешиванием после высушивания проб при 95 °С до получения постоянного значения сухой массы.

Содержание белка в клетках определяли по (Breadford, 1976) при длине волны 595 нм.

Содержание хлорофилла в клетках определяли по (Arnon, 1949) при длине волны 652 нм.

Подсчет числа рибосом в клетках осуществлялся на электронно-микроскопических фотографиях срезов клеток, выполненных с помощью микроскопа JEM 100B (Япония) и фиксированных по описанному ранее способу (Ладыгин, Семенова, 1993).

Статистический анализ данных осуществляли в программе Exel (Microsoft, США). Все результаты представлены в виде среднеарифметической величины из не менее трех биологических экспериментов \pm стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

Согласно современным представлениям, процесс биогенеза рибосомального комплекса эукариотической клетки осуществляется в трех ее компартаментах — яд-

Влияние формы минерального азота на содержание белка, хлорофилла и количество рибосом
в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* и *Glycine max*

Показатель	<i>C. reinhardtii</i>			<i>G. max</i>	
	NH ₄ Cl (вариант 1)	NH ₄ NO ₃ (вариант 2)	KNO ₃ (вариант 3)	NH ₄ NO ₃ (вариант 2)	KNO ₃ (вариант 3)
Содержание белка, мкг на 1 мг сухой массы	110 ± 19	91 ± 26	106 ± 22	94 ± 12	42 ± 9
Содержание хлорофилла, мкг на 1 мг сухой массы	35 ± 3	37 ± 6	45 ± 5	125 ± 11	38 ± 8
Число рибосом на 1 мкм ²	1250 ± 50	1367 ± 67	697 ± 15	351 ± 90	56 ± 10

рышке ядра, нуклеоплазме ядра и цитоплазме. Исходно предполагается, что процесс биогенеза рибосом начинается с экспрессии соответствующих рибосомальных генов, затем происходит синтез пре-рРНК и рибосомальных белков, формирование прерибосомальных частиц, объединение сформированных субчастиц и созревание обра-

зовавшейся структуры в функционально способную рибосому (Спирин, 2011). Хотя в настоящее время активно исследуются этапы и факторы биогенеза рибосом, многое в механизмах регуляции этого процесса остается пока неясным (Henras et al., 2008).

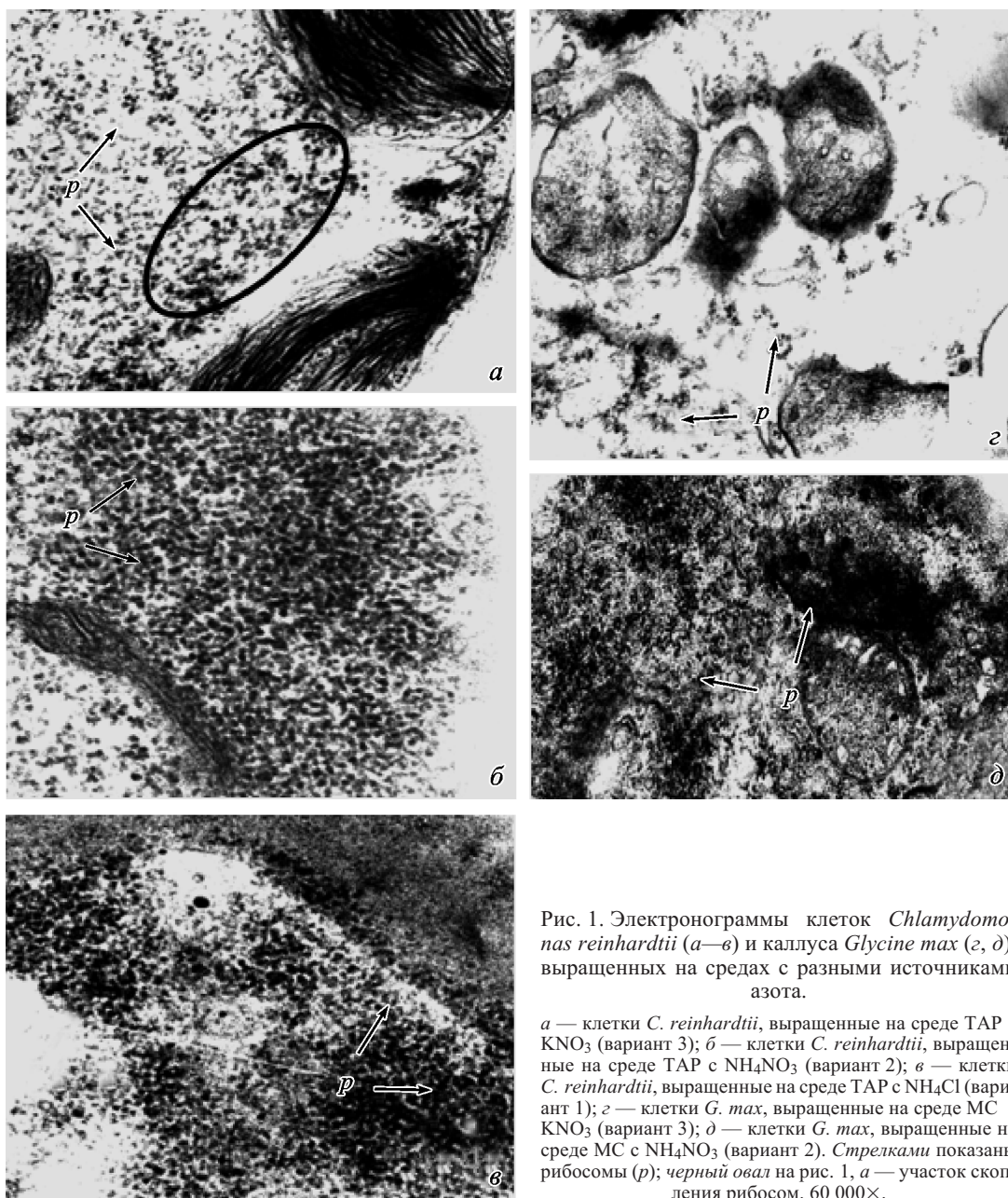


Рис. 1. Электронограммы клеток *Chlamydomonas reinhardtii* (a–в) и каллуса *Glycine max* (г, д), выращенных на средах с разными источниками азота.

a — клетки *C. reinhardtii*, выращенные на среде TAP с KNO₃ (вариант 3); б — клетки *C. reinhardtii*, выращенные на среде TAP с NH₄NO₃ (вариант 2); в — клетки *C. reinhardtii*, выращенные на среде TAP с NH₄Cl (вариант 1); г — клетки *G. max*, выращенные на среде MC с KNO₃ (вариант 3); д — клетки *G. max*, выращенные на среде MC с NH₄NO₃ (вариант 2). Стрелками показаны рибосомы (p); черный овал на рис. 1, а — участок скопления рибосом. 60 000×.

В наших экспериментах факт влияния экзогенного аммония на количество рибосомальных структур в клетках каллуса сои (Смолов, Семенова, 2008) получил подтверждение и на клетках зеленой водоросли *C. reinhardtii* (Смолов и др., 2012) (см. таблицу).

На рис. 1, а—в) представлены электронно-микроскопические снимки срезов клеток *C. reinhardtii*, выращенных в присутствии и в отсутствие экзогенного аммония. Подсчет числа рибосом на фотоснимках срезов показал двукратное превышение содержания этих органелл у клеток, выращенных на NH_4^+ -содержащей среде (варианты 1 и 2), по сравнению с количеством рибосом у клеток, выращенных на безаммонийной среде (вариант 3) (см. таблицу). Аналогичные результаты были получены и на каллусных клетках сои (рис. 1, г, д). Однако в этом случае отсутствие аммония в среде вызывало более значительное снижение количества рибосом в клетках (в 5—10 раз) (см. таблицу).

Учитывая, что при удалении аммония из состава питательной среды столь разные биологические объекты показывают аналогичные результаты (т. е. снижение числа рибосом в клетке), появляется основание предположить, что такая реакция может быть типичной и для других растительных клеток в ответ на дефицит аммония в питательной среде. Исходя из этого возникает вопрос о месте и способе аммонийного фактора на процесс, связанный с формированием белоксинтезирующих структур.

Формирование любой клеточной структуры начинается с синтеза ее структурных компонентов. Ожидалось, что поступление экзогенного аммония в клетку должно приводить к активации генов рибосомального комплекса и увеличению синтеза структурных компонентов рибосом. Попытка обнаружить связь между экспрессией генов, ответственных за синтез белка малой субъединицы рибосомы grS6 , 18S рРНК и количеством рибосом в клетках суспензии *C. reinhardtii* или каллуса *G. max* (см. таблицу), не показала такой зависимости. Уровни экспрессии генов, кодирующих белок малой субъединицы grS6 и 18S рРНК как у клеток *C. reinhardtii*, так и у каллусных клеток *G. max*, выращенных на аммонийсодержащей и безаммонийной средах, практически не различались между собой (рис. 2, а, б). Следовательно, на стадии синтеза компонентов рибосомы аммоний не влиял на формирование рибосомальных структур, и поэтому регуляторный механизм действия аммония следует искать на стадиях образования прерибосомальных частиц, транспорта обеих субъединиц в цитоплазму и формирования в цитоплазме уже зрелых рибосом растительной клетки.

Если уровень экспрессии гена рибосомального белка grS6 и уровень экспрессии гена 18S рРНК не меняются под действием экзогенного аммония (рис. 2), то можно предположить, что и уровни экспрессии других генов, ответственных за синтез рибосомальных РНК (28S рРНК, 5.8S рРНК и 5S рРНК) и других рибосомальных белков, также не подвергаются аммонийному воздействию.

Проведенный анализ содержания общего белка в клетках *C. reinhardtii* не показал различий между вариантами клеток, выращенными в присутствии и в отсутствие аммония в питательной среде, тогда как в клетках каллуса содержание белка существенно снижалось, если в питательной среде отсутствовал аммоний (см. таблицу).

Биохимический показатель содержания общего белка в клетках отражает содержание в них как структурных, так и растворимых белков. И хотя соотношение этих белков у различных биологических видов и типов клеток,

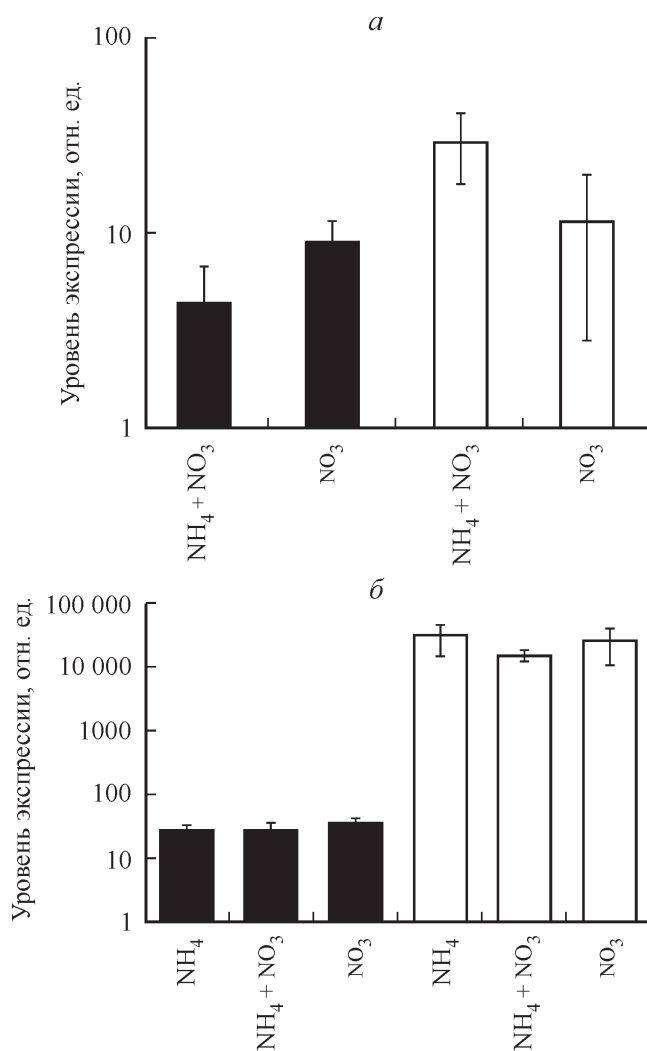


Рис. 2. Гистограммы усредненных значений экспрессии генов, кодирующих белок малой субъединицы рибосом grS6 (черные столбцы) и 18S РНК (белые столбцы) в клетках каллуса сои (а) и хламидомонады (б).

По горизонтали — формы минерального азота в среде культивирования: NH_4^+ ; по вертикали — уровень экспрессии генов, выраженный в нормированных значениях (отн. ед. флуоресценции), согласно инструкции к амплификатору IQ5.

по-видимому, различно, внутри одного вида и типа клеток это соотношение в популяции должно быть стабильно. Поэтому можно ожидать, что если действие того или иного фактора отражается на общем содержании белка в клетке, то это воздействие может проявиться и на белоксодержащих структурных образованиях.

Поскольку мембранные структуры хлоропластов (ламеллы, стромы и гран) представляют собой белково-липидные образования, дефицит белкового компонента мембран клеток сои должен существенно влиять на количество фотосинтезирующих мембран у хлоропластов. Такой эффект наблюдался у хлоропластов клеток каллусной культуры сои (рис. 3, г, д), хлоропластов листьев пшеницы и гороха (Зернова, 1993), тогда как структура хлоропластов у клеток *C. reinhardtii* не менялась после замены одной формы минерального азота на другую (рис. 3, а—в). Схожие изменения в содержании белковых структур отмечались и у митохондрий каллусных клеток *G. max*, выращенных без аммонийного компонента. Од-

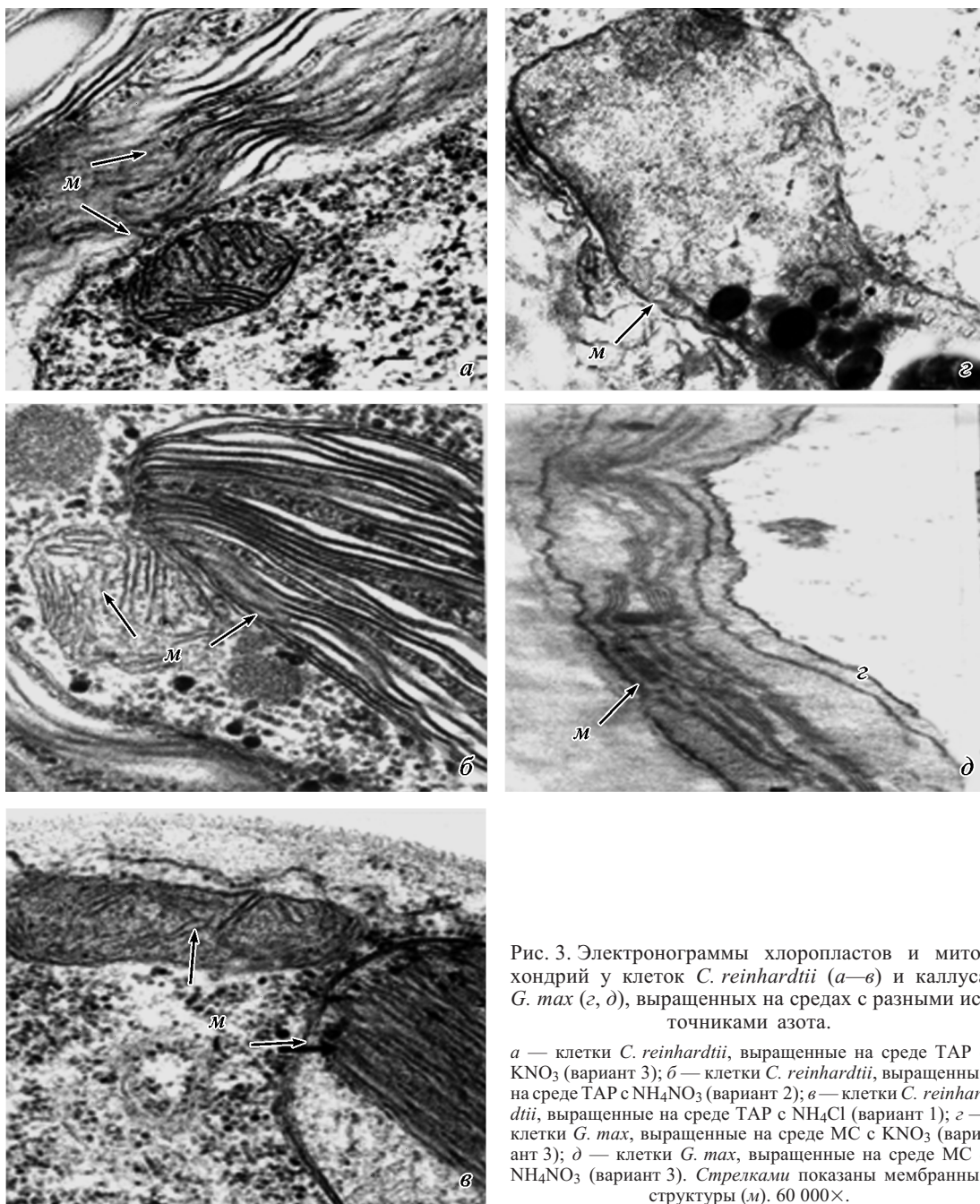


Рис. 3. Электронограммы хлоропластов и митохондрий у клеток *C. reinhardtii* (а—в) и каллуса *G. max* (z, д), выращенных на средах с разными источниками азота.

а — клетки *C. reinhardtii*, выращенные на среде ТАР с KNO_3 (вариант 3); б — клетки *C. reinhardtii*, выращенные на среде ТАР с NH_4NO_3 (вариант 2); в — клетки *C. reinhardtii*, выращенные на среде ТАР с NH_4Cl (вариант 1); z — клетки *G. max*, выращенные на среде МС с KNO_3 (вариант 3); д — клетки *G. max*, выращенные на среде МС с NH_4NO_3 (вариант 3). Стрелками показаны мембранные структуры (m). 60 000 \times .

нако подобных изменений не было обнаружено у соответствующих органелл клеток *C. reinhardtii* (рис. 3, а—в).

Поскольку эффект экзогенного аммония на содержание рибосомальных структур в клетках водоросли и культуры *in vitro* был идентичен, а реакции клеток на содержание общего белка существенно различались (влияние аммония наблюдали у каллусных клеток сои, но не у хламидомонады) (см. таблицу), логично предположить, что у клеток водоросли доля рибосомальных белков в общем количестве белка может быть ниже, чем у клеток каллуса сои. При низкой доле рибосомального белка в общем его содержании эффект экзогенного аммония (т. е. снижение количества рибосомального белка) может «скрываться» за высоким содержанием других, нерибосомальных, белков. Попытка подтвердить или опровергнуть этот тезис оказалась безрезультатной. Нам не удалось обнаружить

какие-либо экспериментальные данные по соответствующему вопросу, т. е. вопросу количественного соотношения нерибосомального и рибосомального белка в клетках растительных объектов. На наш взгляд, такое различие соотношения нерибосомального и рибосомального белка у объектов, стоящих на столь отдаленных ступенях эволюционного развития, вполне возможно. В природе у клеток одноклеточных водорослей не формируется запасной пул белкового компонента. Излишки продуктов обмена секретируются в окружающую среду. У высших растений после формирования структурных компонентов клетки наблюдаются транспорт и накопление белковых веществ в семенах (в нашем случае, вероятно, в каллусных клетках сои).

Аналогичной была реакция клеток *C. reinhardtii* и *G. max* по содержанию хлорофилла в ответ на замену од-

ной формы минерального азота на другую: равное содержание хлорофилла у клеток водоросли, выращенных на аммонийсодержащей и безаммонийной средах ТАР (см. таблицу), и снижение содержания хлорофилла у клеток сои, выращенных на безаммонийной среде МС, по сравнению с этим же показателем для клеток, выращенных на аммоний-содержащей среде МС (см. таблицу).

Хорошо организованная нативная структура хлоропластов у клеток водоросли, выращенных на безаммонийной нитратсодержащей питательной среде ТАР (рис. 3, а—в), позволяет предполагать, что такие хлоропласты вполне способны обеспечивать потребности клетки в аммонии за счет восстановленных продуктов реакций световых стадий фотосинтеза (реакции фотовосстановления нитратов), а не только за счет восстановителей темнового происхождения. Поскольку известно, что аминокислота глицин является одной из составляющих компонентов начальной стадии цепи реакций процесса биосинтеза молекул хлорофилла (Чайка, Савченко, 1981), при отсутствии дефицита эндогенного аммония вполне возможно образование достаточного количества глицина, а следовательно, синтез хлорофилла не будет ограничиваться поступлением образующегося глицина к месту биосинтеза хлорофилла. К тому же такой способ продукции эндогенного аммония (фотовосстановление нитрата), по-видимому, в значительной мере покрывает потребности клетки при формировании ее белоксинтезирующего аппарата. Разность между количеством рибосом у клеток, выращенных на аммонийсодержащей и безаммонийной средах, многократно снижается по сравнению с количеством рибосом у клеток, выращенных на аммонийсодержащей среде (с 5—10 раз у клеток сои до 2 раз у клеток хламидомонады) (см. таблицу).

Проведенные эксперименты показали, что рост точной суспензии *C. reinhardtii* также не прекращался при многократных пересадках на свежие нитратсодержащие питательные среды ТАР, лишенные аммонийного компонента, тогда как длительное пассирование клеток каллуса на питательной среде МС, лишенной аммония, приводит к гибели всей массы клеток (результаты не приведены).

Способность клеток водоросли *C. reinhardtii* расти исключительно на нитратсодержащей среде позволяет предполагать существование высокой нитрат-восстанавливающей способности у этого растительного объекта. У клеток каллусной культуры сои эта способность, по-видимому, чем-то существенно ограничена. Логично допустить, что низкая скорость реакции восстановления нитрата до аммония у клеток каллусной культуры сои сдерживает синтез аминокислот, белка и как следствие — рост клеток каллуса. Может быть, по этой причине к концу цикла выращивания каллусной культуры в питательной среде всегда присутствовало значительное количество свободного нитрата (Смолов, Олейникова, 2003), тогда как свободный аммоний исчезал из состава питательной среды еще на линейной стадии роста клеток (Campbell et al., 1984).

Наличие (или отсутствие) аммония в составе питательной среды не влияло и на содержание мРНК, соответствующей белку малой субъединицы рР6, и на содержание 18S рРНК (рис. 2), что, по-видимому, справедливо и для других компонентов рибосомы. Известно, что в одних и тех же условиях содержание мРНК разных рибосомальных белков в клетках дрожжей может несколько варьировать, что, вероятно, связано с процессами, отличными от

биогеनेза рибосомы. Тем не менее скорости трансляции для этих белков близки по значению (Holstege et al., 1998). Авторы этой работы полагают, что эквивалентность рибосомальных белков достигается посредством разной скорости их деградации. По-видимому, хотя это и нельзя полностью исключить, возможность регуляции биосинтеза компонентов рибосом на уровне регуляции активности их генов представляется маловероятной.

Таким образом, на наш взгляд, влияние аммония на число рибосомальных структур в клетках водоросли может быть вызвано неким фактором, участвующим в формировании (или стабилизации?) структуры рибосомы. Например, фактором рН в цитоплазме, изменяющимся при поглощении аммония, непосредственно NH_4^+ -ионами или некими аминированными соединениями, образованными при участии аммония.

Известно, что поглощение экзогенного аммония растительной клеткой сопровождается выделением из нее H^+ -ионов, тогда как поглощение NO_3^- -ионов связывается с выходом из клетки OH^- -ионов (Marshner, 1986), т. е. наблюдается изменение цитоплазматического рН в щелочную или кислую сторону соответственно. Выход H^+ -ионов из клетки при поглощении аммония должен приводить к повышению активности ФЭП-карбоксилазы, рН-оптимум которой сдвинут в щелочную сторону (Романова, 1980). Повышение активности этого фермента должно приводить к усилению гетеротрофной фиксации углекислоты (Wright, Givan, 1988) и к увеличению образования органических кислот (например, малата), последующее превращение которых может при наличии аммония быть еще одним источником целого ряда аминокислот. Дополнительно образованные аминокислоты способны обеспечить и дополнительное образование белка. Такое явление наблюдалось в клетках *Acer pseudoplatanus* (Goodchild, Givan, 1990) и *Paul's Scarlet Rose* (Mohanty, Fletcher, 1980). Кроме того, показано, что эндогенный аммоний вызывал повышение содержания не только белка, но и мРНК ФЭП-карбоксилазы в клетках листьев растения *Zea maize* (Sugiharto, Sugiyama, 1992). Однако при высокой скорости образования эндогенного аммония и его быстрой утилизации в аминокислоты сдвиг рН в щелочную сторону в цитоплазме клеток водоросли *C. reinhardtii* вряд ли может объяснить различия в количественном содержании рибосом (как белоксодержащих структур). К тому же повышенный уровень образования белка еще не означает способности клетки формировать рибосомы. В наших экспериментах с клетками *C. reinhardtii* содержание белка не зависело от формы использованного клеткой минерального азота (см. таблицу).

С другой стороны, поскольку пространственные размеры пор ядерной оболочки не мешают поступлению в цитоплазму больших и малых субъединиц рибосом, образованных в ядрышке, то и для частиц меньших размеров (OH^- и H^+ -ионов) этот барьер не может быть преградой, а в нуклеоплазме ядра также должно происходить изменение рН. Как в этом случае реагируют РНК-полимераза I и РНК-полимераза III, функции которых заключаются в создании других структурных компонентов рибосомы — рибосомальных РНК?

Нельзя исключить и участие непосредственно NH_4^+ -ионов в формировании (или стабилизации?) структуры рибосомы, поскольку, например, равнозарядные K^+ -ионы необходимы для связывания компонентов рибосомы (Спирин, 1971). И может быть, совсем не случайно у клеток *C. reinhardtii*, выращенных на безаммонийной

среде (рис. 1, а), в местах образования складок у оболочек хлоропласта, где может быть повышенная концентрация фотосинтетически образованного аммония, наблюдалось большее скопление рибосомальных структур?

Наконец, причиной увеличения числа рибосом под действием экзогенного аммония может быть образование (при повышенных концентрациях аммония в клетках) большего количества аминированного компонента, необходимого для формирования (или стабилизации?) структуры рибосомы. Такими компонентами могли бы быть полиамины (путресцин, кадаверин, спермидин или др.). Их наличие в рибосомах клеток *E. coli* было показано достаточно давно (Спирин, 1971), но в растительных клетках такая возможность пока не рассматривалась. Какова природа воздействия этих соединений на формирование (или стабилизацию?) рибосомальной структуры, в настоящее время неизвестно, как не показано и их участие в организации самой структуры.

Итак, проведенные на клетках низшего и высшего растительных организмов (*C. reinhardtii* и *G. max*) исследования по влиянию различных форм минерального азота на содержание белка, хлорофилла, число рибосом в клетках и экспрессию некоторых рибосомальных генов показали, что аммонийная форма азота способна влиять на формирование рибосомального комплекса. Однако это, по-видимому, не связано с регуляцией активности генов, ответственных за синтез компонентов рибосом. На наш взгляд, более предпочтительна следующая версия: процесс биогенеза рибосом контролируется аммонийным фактором на более высоком, регуляторном, уровне, т. е. на уровне сборки (или стабилизации) всего рибосомального макромолекулярного комплекса, а идентичность ответной реакции на воздействие аммония (увеличение количества рибосом) у столь далеко отстоящих на эволюционной лестнице растительных организмов может указывать на значительный возраст (не менее 1.5 млрд лет) этого регуляторного механизма.

Список литературы

- Зернова О. В. 1993. Влияние окисленной и восстановленной форм азотного питания на ультраструктуру фотосинтетического аппарата у гороха и пшеницы. Физиол. раст. 40 (3): 431—437.
- Измайлов С. Ф. 1986. Азотный обмен в растениях. М.: Наука. 320 с.
- Кретович В. Л. 1987. Усвоение и метаболизм азота у растений. М.: Наука. 486 с.
- Ладыгин В. Г., Семенова Г. А. 1993. Влияние дефицита железа на состав хлорофилл-белковых комплексов и ультраструктуру хлоропластов гороха. Физиол. раст. 40 (6): 841—849.
- Романова А. К. 1980. Биохимические методы изучения автотрофии у микроорганизмов. М.: Наука. 159 с.
- Саут Р., Уиттик А. 1990. Основы альгологии. М.: Мир. 595 с.
- Смолов А. П., Олейникова Т. А. 2003. Свет и утилизация нитрата каллусными клетками сои. Изв. АН. Сер. биол. (6): 670—674.
- Смолов А. П., Семенова Г. А. 2008. Влияние концентрации аммония на содержание белка, хлорофилла и количество рибосом в клетках миксотрофного каллуса сои. Физиол. раст. 55(3): 397—403.
- Смолов А. П., Семенова Г. А., Минакова Н. Ю., Бутанав А. М., Ширшикова Г. Н. 2012. Влияние экзогенного аммония на содержание белка, хлорофилла и количество рибосом в клетках *Chlamydomonas reinhardtii*. Физиология растений. 59 (6): 781—785.
- Спирин А. С. 2011. Молекулярная биология: рибосома и биосинтез белка. М.: Академия. 496 с.
- Спирин А. С., Гаврилова Л. П. 1971. Рибосома. М.: Наука. 254 с.
- Чайка М. Т., Савченко Г. Е. 1981. Биосинтез хлорофилла в процессе развития пластид. Минск. Наука и техника. 167 с.
- Arnon D. J. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24: 1—15.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Ann. Biochem. 72: 248—254.
- Campbell W. H., Ziegler P., Beck E. 1984. Development of nitrogen enzymes during photoautotrophic growth of *Chenopodium rubrum* suspension cultures. Plant Physiol. 74: 947—950.
- Edit T., Laszlo T. 1992. Effect of $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ratio on photosynthetic rate, nitrate reductase activity and chloroplast ultrastructure in three cultivars of red pepper (*Capsicum annuum* L.). J. Plant Physiol. 140: 298—305.
- Goodchild J. A., Givan C. V. 1990. Influence of ammonium and extracellular pH on the amino and organic acid contents of suspension culture cells of *Acer pseudoplatanus*. Physiol. Plantarum. 78: 29—37.
- Henras A. K., Soudet J., Gerus M., Lebaron S., Caizergues-Ferrer M., Mougin A., Henry Y. 2008. The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. Cell. Mol. Life Sci. 65: 2334—2359.
- Holstege F. C., Jennings E. G., Wyrick J. J., Lee T. I., Hengartner C. J., Green M. R., Golub T. R., Lander E. S., Young R. A. 1998. Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. Cell. 95: 717—728.
- Leary D. J., Huang S. 2001. Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. FEBS Lett. 509: 145—150.
- Marshner H. 1986. Mineral nutrition of higher plants. London ect.: Academic Press. 674 p.
- Mohanty B., Fletcher J. S. 1980. Ammonium influence on nitrogen assimilating enzymes and protein accumulation in suspension cultures of *Paul s Scarlet Rose*. Physiol. Plantarum. 48: 453—459.
- Sugiharto B., Sugiyama T. 1992. Effects of nitrate and ammonium on gene expression of phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrogen metabolism in maize leaf tissue during recovery from nitrogen stress. Plant Physiol. 98: 1403—1408.
- Wright K. M., Givan C. V. 1988. Regulation of nonautotrophic carbon dioxide assimilation by ammonia in cultured cell of *Acer pseudoplatanus* L. Plant Sci. 58: 151—158.

Поступила 29 IV 2013

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EXOGENOUS AMMONIUM INFLUENCE
ON SOYBEAN TISSUE AND CHLAMYDOMONAS CELLS

A. P. Smolov,^{1,*} A. M. Butanaev,¹ G. A. Semenova,² G. N. Shirshikova¹

¹ Institute of Basic Biological Problems RAS
and ² Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino;
* e-mail: smap49@mail.ru

In this work we studied the influence of exogenous ammonium on the total protein and chlorophyll contents, on the number of ribosomes and on the expression of ribosomal genes encoding the small subunit 18S rRNA and rpS6 protein in unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and in callus tissue of *Glycine max*. Comparative analysis of two sets of data showed that although the lack of ammonium resulted in reduction of the number of ribosomes in alga and plant cells, this effect was not caused by decreasing of the expression level of the ribosomal genes. Possible mechanisms of the ammonium regulatory role in the ribosome biogenesis are discussed.

Key words: callus soybean, chlamydomonas, ammonium, ribosomes, ribosomal genes.
