



© В. В. Зинченко¹,
В. М. Глазер¹, С. В. Кряжов¹,
П. В. Лучкин¹, М. М. Бабыкин¹,
Н. В. Белавина¹, Д. А. Лось²

¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова;

²Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН.

✿ Наличие полной нуклеотидной последовательности генома цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803, которая является модельным объектом молекулярно-генетического изучения фотосинтеза и адаптации клеток к стрессовым воздействиям, позволяет исследовать функцию любого гена этого организма с помощью направленной инактивации предсказанных генов. В статье приведены основные результаты исследований авторов по функциональной геномике *Synechocystis*, основанных на создании и изучении коллекций мутантов с инсерционной инактивацией генов, кодирующих пептидазы, транслоказы и белки двухкомпонентных систем регуляции.

✿ **Ключевые слова:** цианобактерии; *Synechocystis*; инсерционный мутагенез; функциональная геномика

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИЙ МУТАНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ АДАПТАЦИИ К СТРЕССОВЫМ ФАКТОРАМ У *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC 6803

ВВЕДЕНИЕ

Цианобактерии являются представителями эволюционно наиболее древних организмов, и их фоссилизированные остатки имеют возраст около 3,5 миллиардов лет (Schopf, 1993). Очевидно, они были первыми фотосинтетическими организмами с оксигенным типом фотосинтеза и сыграли центральную роль в увеличении уровня кислорода в земной атмосфере, что кардинально повлияло на эволюцию жизни. Согласно эндосимбиотической теории, хлоропласты высших растений произошли от предков современных цианобактерий, чем и обусловлено сходство их фотосинтетических аппаратов. Цианобактерии — это многочисленная группа микроорганизмов, которые благодаря своим метаболическим особенностям широко распространены в природе и обитают в разнообразных экологических нишах от почвы и пресных вод до океанов, внося существенный вклад в первичную продукцию органического вещества на Земле. Все это делает цианобактерии привлекательными для исследования различных биологических процессов, свойственных фотосинтезирующим организмам, включая оксигенный фотосинтез, азотфиксацию, биогенез мембран, клеточную дифференцировку, молекулярную эволюцию, восприятие стрессовых факторов и адаптацию к ним. В настоящее время полностью секвенированы геномы 28 видов цианобактерий и осуществляются проекты по секвенированию геномов еще 12 видов (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi).

Одним из наиболее популярных организмов для исследования таких процессов является одноклеточная неазотфиксирующая цианобактерия *Synechocystis* sp. PCC6803 (далее *Synechocystis*). Её широкое использование в качестве модельного организма обусловлено двумя основными причинами. Во-первых, эта бактерия обладает природной способностью трансформироваться экзогенной ДНК (Grigorieva and Shestakov, 1982), что используется для генетического анализа и инсерционного мутагенеза. Во-вторых, она проявляет особый тип гетеротрофного роста при низкой интенсивности света, недостаточной для поддержания фотоавтотрофного роста в средах, содержащих глюкозу в качестве источника энергии (Anderson and McIntosh, 1991), что позволяет получать и исследовать мутанты, дефектные по фотосинтезу. В 1996 году *Synechocystis* стала первым фотосинтезирующим организмом, у которого была установлена полная нуклеотидная последовательность генома (Kaneko et al., 1996). Это открыло принципиально новые возможности для функционального анализа генов и сделало *Synechocystis* объектом номер один в области функциональной геномики цианобактерий.

Исследования в области функциональной геномики цианобактерии *Synechocystis*, проводимые на кафедре генетики МГУ и в лаборатории молекулярных основ внутриклеточной регуляции Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, направлены на расшифровку механизмов ко-

Поступила в редакцию 17.06.08
Принята к публикации 02.10.2008

ординированного действия генов при адаптивных ответах фототрофных клеток на действие стрессовых факторов. Одним из направлений этих исследований является создание наиболее полных коллекций мутантов с инактивацией генов, относящимся к определенным группам с целью функционального анализа генов. В данной статье приведены основные результаты по созданию и изучению коллекций мутантов с инсерционной инактивацией генов, кодирующих пептидазы и белки двухкомпонентных систем регуляции. Эти результаты получены нами в сотрудничестве с лабораториями проф. Р. Германна (Институт ботаники Мюнхенского университета, Германия), проф. Р. Б. Клосгена (Университет Мартина Лютера, г. Халле, Германия) и проф. Н. Мураты (Национальный институт фундаментальной биологии, г. Осака, Япония).

НАПРАВЛЕННАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ГЕНОВ У *SYNECHOCYSTIS*

В геноме *Synechocystis* идентифицировано 3264 потенциальных гена, кодирующих белки (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/Synechocystis/>). Хотя функция гена в ряде случаев может быть предсказана на основании сравнения его продукта с ранее охарактеризованным, довольно часто сделать этого не удается из-за отсутствия функционально охарактеризованных гомологов или из-за отсутствия гомологов вообще. Так, в геноме *Synechocystis* около 49 % генов аннотированы как гипотетические. Следует учитывать, что предсказание функции гена с помощью биоинформатического анализа в большинстве случаев указывает лишь на возможные биохимические свойства его белкового продукта, но не на его конкретную роль в клетке. В отсутствие экспериментального доказательства такую информацию всегда следует расценивать как гипотетическую.

Наилучшим способом выяснения функции гена является определение фенотипа, возникающего в результате генной мутации. Для *Synechocystis* разработаны эффективные генетические системы, основанные на использовании разнообразных методов мутагенеза, векторных плазмид, переноса генов с помощью трансформации, электропорации и конъюгации и позволяющие исследовать функции генов, контролирующих различные биологические процессы (Thiel, 1994; Vermaas, 1996; Koksharova and Wolk, 2002). Естественно, что до 1996 года, то есть до секвенирования генома *Synechocystis*, мутагенез у этого организма проводили, в основном, с помощью традиционных подходов генетики, а использование таких эффективных методов обратной генетики как ген-направленный и сайт-направленный мутагенез было ограничено ранее клонированными генами и знанием нуклеотидной последовательности исследуемых участков. В постгеномную эпоху направленная инактивация генов с целью их функционального анализа стала основным методом мутагенеза у *Synechocystis*.

Суть этого метода заключается в следующем. Исследуемый ген амплифицируют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя в качестве матрицы хромосомную ДНК штамма дикого типа, и клонируют в векторную плазмиду, не способную автономно реплицироваться в клетках *Synechocystis*. Затем в подходящий сайт (или сайты) рестрикции внутри гена встраивают кассету устойчивости к антибиотику и полученную конструкцию с помощью трансформации вводят в клетки дикого типа. Клетки *Synechocystis* поглощают ДНК в однокитевой форме (Barten, Lill, 1995), и поэтому эффективность трансформации кольцевыми или линейными плазмидами различается несущественно. Интеграция ДНК у *Synechocystis* осуществляется за счет двойной гомологичной рекомбинации, что приводит к замещению хромосомного гена дикого типа на мутантный ген из плазмиды (Williams, 1988; Labarre et al., 1989). Клетки *Synechocystis* содержат до 12 идентичных хромосомных копий (Labarre et al., 1989), и поэтому при введении мутаций сохраняют гетерозиготность до тех пор, пока в результате репликации и последующей сегрегации все хромосомы с геном дикого типа будут замещены на таковые с мутантным аллелем. Невозможность достижения полной сегрегации указывает на необходимость данного гена для жизнедеятельности клетки.

Наряду с традиционным подходом ген-направленного мутагенеза, описанного выше, в настоящее время разработаны альтернативные методы, основанные на использовании линейных, так называемых ген-конверсионных кассет, синтезируемых с помощью ПЦР (Taroncher-Oldenburg, Stephanopoulos, 2000; Kong, Xu, 2002). Такие конверсионные кассеты содержат ген устойчивости к антибиотику, фланкированный длинными участками гомологии, обеспечивающими эффективную рекомбинацию с хромосомной ДНК. При этом встраивание кассеты устойчивости к антибиотику не ограничивается наличием удобного сайта рестрикции внутри исследуемого гена, что дает возможность вводить делеции, желаемые сайты рестрикции и получать слияния генов.

Следует отметить, что основная стратегия подходов функциональной геномики выходит за рамки изучения отдельных генов или белков и ставит перед собой цель изучить работу всех генов или белков как единой системы. Использование описанного выше подхода позволяет осуществлять масштабные программы по созданию коллекций мутантов с инактивацией любого из предсказанных генов, что дает возможность исследовать определенный клеточный процесс или класс генов.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ПЕПТИДАЗЫ

Пептидазам принадлежит важная роль в поддержании клеточного гомеостаза, поскольку они участвуют в протеолизе разнообразных регуляторных белков или в процес-

синге ключевых ферментов метаболизма, устраняют аномальные полипептиды, возникающие в результате ошибок трансляции или в результате посттрансляционных повреждений. Значение пептидаз для клеточного гомеостаза становится особенно очевидным при нарушении процессов протеолиза, что приводит к коренным преобразованиям в клеточной физиологии (Kirschner, 1999; Kopito, Sitia., 2000). Известно, что в клетках фотосинтезирующих организмов функционирование фотосинтетического аппарата приводит к повреждению составляющих его белков. Физиологические стрессы, такие как повышение температуры и освещенности, существенно интенсифицируют этот процесс. Поврежденные белки специфически разрушаются протеазами и замещаются молекулами, синтезированными *de novo*. В настоящее время идентифицированы лишь отдельные компоненты протеолитической системы, вовлеченной в этот процесс.

Пептидазы широко представлены в клетках фотосинтезирующих организмов. Так, в геноме *Synechocystis* выявлено 62 кодирующих их гена. В целом, у этой бактерии пептидазы представляют около 2 % всех генных продуктов.

С помощью методов функциональной геномики и биоинформатики нами впервые проведен сравнительный анализ функциональной роли всех 62 генов, кодирующих пептидазы у цианобактерии *Synechocystis*, и их гомологов у растения *Arabidopsis thaliana*. Полученные данные позволили заключить, что в процессе эволюции растений гены пептидаз цианобактериального происхождения подвергались дупликациям, вероятно, в связи с потребностью в увеличении разнообразия протеолитических белков в отношении их субстратной специфичности и внутриклеточной локализации (Sokolenko et al., 2002).

Нами создана коллекция мутантов с инсерционной инактивацией 20 генов, кодирующих пептидазы, относящиеся к различным семействам (за исключением лидерных пептидаз, описанных в следующем разделе) (табл. 1). Полная сегрегация прошла только у 14 мутантов. Для 6 инактивированных генов не удалось получить полностью

сегрегированных мутантов, что указывает на жизненно важные функции этих генов. К их числу относятся 5 генов (*clpB1*, *clpB2*, *clpP3*, *clpP4* и *clpX*) пептидаз семейства Clp, а также ген *htrA*, кодирующий пептидазу семейства Deg.

Было проведено исследование ростовых характеристик полностью сегрегированных мутантов, а также их способности адаптироваться к ряду стрессовых факторов, таких как изменение светового режима, повышенная температура, недостаток питательных веществ (табл. 2). В результате была впервые установлена физиологическая роль ряда пептидаз. Пептидазы HhoA и HhoB, представители Deg-семейства, различаются по своим функциям у *Synechocystis*. Пептидаза HhoA участвует в адаптации клеток к тепловому стрессу и недостатку железа, тогда как пептидаза HhoB — к недостатку фосфора. Пептидазы SppA2 и PerP вовлечены в адаптацию к изменению светового режима, а пептидаза PerP также и в адаптацию к повышенной температуре. Не исключено, что эти пептидазы участвуют в посттрансляционной модификации белков, включая те, которые индуцируются при световом и тепловом стрессах. Пептидаза Ape2 участвует в ответе на недостаток железа и меди (Sokolenko et al., 2002).

Детальный анализ функции пептидазы SppA1 выявил, что она отвечает за деградацию определенных линкерных белков фикобилисом, обеспечивая тем самым их укорочение, что лежит в основе адаптации клеток цианобактерий к свету повышенной интенсивности (Pojidaeva et al., 2004). Установлено, что количество белка SppA2 остаётся стабильным в клетках с инсерционной инактивацией гена *sppA1* даже при их длительной инкубации в условиях светового стресса. Это дает основание полагать, что экспрессия или деградация белка SppA2 регулируется пептидазой SppA1 (Пожидеева и др., 2007). Еще одной компонентой, обеспечивающей адаптацию клеток *Synechocystis* к свету повышенной интенсивности, является пептидаза ClpP1, поскольку инактивация кодирующего её гена приводит к дисбалансу транспорта электронов между фотосистемами

Таблица 1

Коллекция инсерционных мутантов по генам, кодирующим пептидазы у *Synechocystis* sp. PCC 6803

Семейство пептидаз	Предполагаемая функция	Количество генов в геноме	Количество сконструированных мутантов	Количество полностью сегрегированных мутантов
Clp	Протеолитические субъединицы Регуляторные субъединицы Шапероны	8	8	3
Deg	Пептидазы теплового шока	3	3	2
Процессирующие металлопептидазы	Процессирующие пептидазы	5	5	5
SppA	Процессирующие пептидазы	2	2	2
Аминопептидазы	Амино-, карбокси- и олигопептидазы	26	2	2
Всего		44	20	14

Таблица 2

Роль пептидаз в адаптации клеток *Synechocystis* sp. PCC 6803 к стрессовым факторам по данным фенотипического анализа

Семейство пептидаз	ОПС	Мутант	Световой стресс	Тепловой стресс	Недостаток азота	Недостаток фосфора	Недостаток железа	Недостаток меди
Clp	<i>slr0542</i>	$\Delta clpP1$	+	но	но	но	но	но
	<i>slr0535*</i>	$\Delta clpP2$	+	—	+	+	—	—
	<i>slr1641</i>	$\Delta clpB2$	+	—	—	—	—	—
Deg	<i>slr1679</i>	$\Delta hhoA$	—	+	—	—	+	—
	<i>slr1427</i>	$\Delta hhoB$	—	—	—	+	—	—
Процессирующие металлопептидазы	<i>slr2008</i>	$\Delta prp1$	—	—	—	—	—	—
	<i>slr2009</i>	$\Delta prp2$	—	+	—	—	—	—
	<i>slr0055</i>	$\Delta prp3$	—	—	—	—	—	—
	<i>slr1331</i>	$\Delta ymxG$	—	—	—	—	—	—
	<i>slr0915</i>	$\Delta prqE$	—	—	—	—	—	—
SppA	<i>slr1703</i>	$\Delta sppA1$	+	—	—	—	—	—
	<i>slr0021</i>	$\Delta sppA2$	+	—	—	—	—	+
Аминопептидазы	<i>slr1343</i>	$\Delta pre2$	—	—	—	—	+	+
	<i>slr0136</i>	$\Delta preP$	+	+	—	—	—	—

Условные обозначения: + — участвует, — — не участвует, но — не определяли.

* — Фенотип мутанта $\Delta clpP2$ обусловлен полярным эффектом на экспрессию гена *clpX* (*slr0535*); объяснение приведено в тексте

I и II, и, как следствие, к высокой светочувствительности (наши неопубликованные данные).

У *Synechocystis* гены *clpP2* и *clpX*, кодирующие пептидазную и регуляторную субъединицы пептидазы ClpPX, входят в состав супероперона *tig-clpP2-clpX* и транскрибируются с основного промотора, расположенного перед геном *tig*, который кодирует так называемый триггер-фактор (пептидилпропилизомеру, катализирующую фолдинг белков и способствующую работе шаперона GroEL) (Лучкин, 2008). Функция регуляторной субъединицы ClpX является незаменимой для жизнедеятельности клетки, поскольку полная инактивация гена *clpX* приводит к летальному эффекту. Мутант с инсерционной инактивацией гена *clpP2* проявляет высокую светочувствительность, что дало основание предположить участие пептидазы ClpP2 в защите клеток *Synechocystis* от фотоингибирования (Паничкин и др., 2001). С помощью молекулярно-генетического анализа нами установлено, что этот фенотип обусловлен не инактивацией гена *clpP2*, а полярным эффектом инсерции на экспрессию гена *clpX*. Таким образом, регуляторная субъединица ClpX пептидазного комплекса ClpPX вовлечена в защиту клеток от фотоингибирования, тогда как функция пептидазной субъединицы ClpP2 пока остается неясной (Лучкин, 2008).

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ТРАНСЛОКАЗЫ И СИГНАЛЬНЫЕ ПЕПТИДАЗЫ

Биогенез многих прокариотических белков включает их транслокацию через клеточные мембраны. Многие из таких белков имеют на N-конце сигнальную или лидер-

ную последовательность, благодаря которой они доставляются к плазматической или тилакоидной мембранам. После транслокации белка через или в мембрану, сигнальная пептидаза удаляет сигнальную последовательность. Этот этап необходим не только для образования зрелого белка, но и для его освобождения из мембраны (Dalbey, Wickne, 1985; Sambasivarao et al., 2001).

В геноме *Synechocystis* идентифицировано 11 генов, кодирующих субъединицы транслоказ белков SecA, SecD, SecE, SecF, SecG, SecY, TatA, TatB, TatC, Ffh и FtsY и 3 гена, кодирующих лидерные пептидазы LepB1, LepB2 и LspA. Нами была сконструирована коллекция инсерционных мутантов по 12 из этих генов (табл. 3). Однако полная сегрегация мутаций прошла только у мутанта по гену *lepB1*, тогда как у остальных мутантов полностью элиминировать копию гена дикого типа не удалось (табл. 3). Таким образом, большая часть транслокационных белков является незаменимой для обеспечения жизнедеятельности клеток *Synechocystis*, в отличие от целого ряда других нефототрофных бактерий. В принципе этот вывод вполне объясним, поскольку проведенный нами биоинформатический анализ показал, что 13 % всех предсказанных белков у *Synechocystis* имеют N-терминальный сигнальный пептид. Среди них 4 % приходится на белки фотосинтетического аппарата (Zhbanko, 2006).

Фенотипический анализ мутанта $\Delta lepB1$ показал, что он неспособен к фотоавтотрофному росту и является светочувствительным. Установлено, что фотосинтетическая активность мутанта постепенно снижается с увеличением времени его инкубации на свету в стандартных условиях освещения и резко падает при высокой интенсивности

Таблица 3

Коллекция инсерционных мутантов по генам, кодирующим транслоказы и сигнальные пептидазы у *Synechocystis* sp. PCC 6803

Группа белков	Белок	Предполагаемая функция	ОПС	Полная сегрегация мутанта
Sec	SecA	АТФ-зависимая транслоказа	<i>sll0616</i>	—
	SecE	Субъединица транслоказы SecYEG	<i>ssl3335</i>	—
	SecG	Субъединица транслоказы SecYEG	<i>ssr3307</i>	—
	SecY	Субъединица транслоказы SecYEG	<i>slr1814</i>	—
Tat	TatA	Субъединица транслоказы TAT	<i>slr1046</i>	—
	TatB	Субъединица транслоказы TAT	<i>ssl2823</i>	—
	TatC	Субъединица транслоказы TAT	<i>sll0194</i>	—
SRP	Fih	Белок сигнал-распознающего комплекса SRP	<i>slr1531</i>	—
	FtsY		<i>slr2102</i>	—
SP	LepB1	Сигнальная пептидаза I	<i>sll0716</i>	+
	LepB2	Сигнальная пептидаза I	<i>slr1377</i>	—
	LspA	Сигнальная пептидаза II	<i>slr1366</i>	—

света. Эти данные указывают, что светочувствительность мутанта обусловлена накоплением фотоокислительных повреждений в результате снижения эффективности замещения поврежденных компонентов фотосинтетического аппарата. Это предположение было подтверждено с помощью масс-спектрометрии, результаты которой свидетельствуют о нарушении у мутанта процессинга ряда белков, в том числе и белка PsbO, являющегося одной из субъединиц кислород-выделяющего аппарата, ассоциированного с фотосистемой II (Zhbanko et al., 2005). Таким образом, лидерная пептидаза LepB1 вовлечена в биогенез функциональной цепи фотосинтетического транспорта электронов. Интересно, что экспрессия в клетках мутанта ΔlepB1 гомологичного белка LepB из *Escherichia coli* восстанавливала фотоавтотрофный рост и полный процессинг белка PsbO. Эти данные свидетельствуют о функциональном сходстве этих лидерных пептидаз у циано- и энтеробактерий (Zhbanko, 2006).

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ ДВУХКОМПОНЕНТНЫХ СИСТЕМ РЕГУЛЯЦИИ

Ведущая роль в адаптивном ответе клеток бактерий на воздействие факторов внешней среды принадлежит двухкомпонентным системам регуляции, схема функционирования которых показана на рисунке 1. Типичная двухкомпонентная система восприятия и передачи сигнала состоит из сенсорной гистидинпротеинкиназы (**Hik**) и соответствующего ей регулятора ответа (**Rre**). В клетках эубактерий, таких как *E. coli* и *Bacillus subtilis*, пары регуляторных генов, кодирующих эти белки, в большинстве случаев тесно сцеплены и формируют опероны. Hik воспринимает изменения окружающей среды через сенсорный домен, фосфорилируя остаток гистидина в консервативном гистидинкиназном домене (Stock and Da Re, 2000.). Затем эта фосфатная группа переносится

от Hik к остатку аспартата, содержащемуся в консервативном домене соответствующего Rre, что приводит к изменению его функциональной активности. Многие Rre являются транскрипционными факторами и в активной форме связываются с ДНК, активируя (позитивный тип регуляции) или репрессируя (негативный тип регуляции) транскрипцию регулируемых ими генов.

Двухкомпонентные системы регуляции широко распространены у прокариотов (включая цианобактерии), архей и эукариотов, за исключением царства животных, у которых эти системы не обнаружены (Koretke et al., 2000). У бактерий двухкомпонентные системы регуляции опосредуют адаптивный ответ на изменение разнообразных факторов внешней среды и регулируют такие

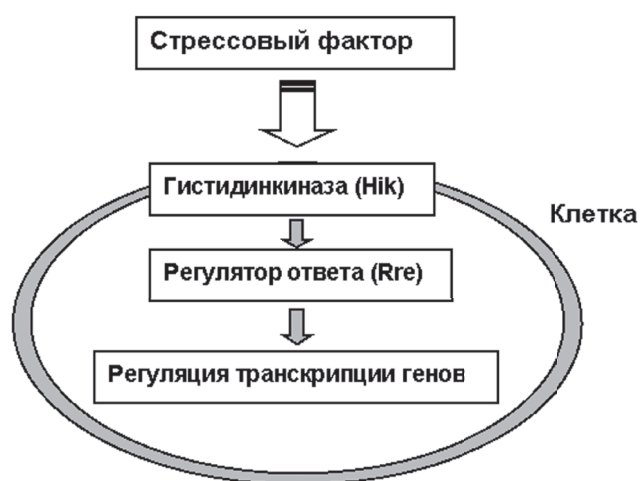


Рис. 1. Схема функционирования двухкомпонентных систем регуляции у бактерий. Сенсорные гистидинпротеинкиназы (Hik) осуществляют мониторинг параметров внешней среды и передают сигнал, модулируя функции белков-регуляторов ответа (Rre), регулирующих транскрипцию различных генов

процессы как хемотаксис, осморегуляцию, азотный и фосфорный метаболизм, споруляцию, развитие компетентности при трансформации, патогенность, вирулентность и т. д. (Parkinson and Kofoed, 1992; Goudreau and Stock, 1998). Кроме того, у цианобактерий идентифицировано несколько специфических двухкомпонентных систем, вовлеченных в адаптацию клеток к изменению интенсивности и спектра света (Kehoe and Grossman, 1977; Collier and Grossman, 1994; Dolganov and Grossman, 1999; Schwarz and Grossman, 1988).

В последнее время представления об изменении экспрессии генов под действием различных стрессовых факторов существенно расширились благодаря разработке новых методов анализа экспрессии генов в геномах. Одним из таких методов является микроэрей-анализ, позволяющий оценить степень активации или репрессии всех генов организма с использованием ДНК-микрочипов и, следовательно, выявить участие новых генов в том или ином биологическом процессе. Данный метод позволяет исследовать изменения экспрессии генов в динамике, а также изучать влияние кратковременных и долговременных стрессов. Метод микрочипов был успешно использован для изучения изменения экспрессии генов в клетках *Synechocystis* под действием различных стрессовых факторов. В результате этих экспериментов были выявлены группы генов, экспрессия которых индуцируется или репрессируется только специфическим стрессовым фактором, а также группы генов, экспрессия которых изменяется двумя и более стрессовыми факторами (см. обзор Los et al., 2008).

Следует отметить, что анализ штаммов дикого типа с помощью метода микрочипов позволяет выявить только общие закономерности в изменении экспрессии всех генов организма в ответ на действие какого-либо фактора внешней среды. Однако полученная информация не позволяет идентифицировать компоненты сигнальных путей, воспринимающие внешний сигнал и формирующие адаптивный ответ клетки. Для решения этих задач значительно более информативным является подход, основанный на использовании методики ДНК-микрочипов для анализа коллекций мутантов, дефектных по генам, которые могут контролировать адаптивный ответ клетки на транскрипционном уровне.

В геноме *Synechocystis* идентифицировано 86 генов двухкомпонентных систем регуляции; 44 гена кодируют Hik-белки и 42 гена — Rre-белки. Полная коллекция инсерционных мутантов по hik-генам создана в лаборатории Н. Мураты, а по rre-генам — в лабораториях Д. Лося (Институт физиологии растений РАН) и В. Зинченко (МГУ). Функции генов *hik2*, *hik11*, *hik26*, *rre23*, *rre25* и *rre26* являются жизненно важными, поскольку не удалось получить полностью сегрегированных мутантов с их инсерционной инактивацией.

С помощью метода ДНК-микрочипов проведен сравнительный анализ ответа клеток *Synechocystis* ди-

кого типа и указанных выше инсерционных мутантов на гиперосмотический и солевой стрессы. Идентифицировано пять двухкомпонентных систем, состоящих из сенсорной Hik и белка Rre, которые воспринимают и передают сигналы о гиперосмотическом или солевом стрессе: Hik33-Rre31, Hik34-Rre1, Hik10-Rre3, Hik16-Hik41-Rre17 и Hik2-Rre1. Установлено, что в ответ на эти стрессы каждая индивидуальная двухкомпонентная система регулирует транскрипцию специфической группы генов. Сравнительный анализ уровней изменения экспрессии каждого гена из всех специфических групп показал, что клетки *Synechocystis* воспринимают солевой и осмотический стрессы как различные сигналы. На основании полученных данных построены генные сети координированной экспрессии генов цианобактерий при адаптации к гиперосмотическому и солевому стрессовым воздействиям (Paithoonrangsarit et al., 2004; Shoumskaya et al., 2005).

Гистидинкиназа Hik33 является сенсором холодового стресса у *Synechocystis* (Suzuki et al., 2000), а ее аналог DesK — у *B. subtilis* (Aguilar et al., 2001). Использование техники ДНК-микрочипов при исследовании экспрессии генов у мутанта $\Delta hik33$ показало, что гистидинкиназа Hik33 регулирует 21 из 35 генов, индуцируемых низкими температурами. Остальные 14 генов, экспрессия которых индуцируется холодом, по-видимому, находятся под контролем каких-то других регуляторных систем. Скрининг мутантов по генам, кодирующим регуляторы ответа, показал, что гистидинкиназа Hik33, по-видимому, регулирует низкотемпературную индукцию генов через транскрипционный фактор Rre26. По крайней мере, мутации в этих генах блокируют индукцию одинакового набора генов при низких температурах, что может свидетельствовать о функционировании двухкомпонентной системы Hik33-Rre26 восприятия и передачи сигнала холодового стресса (Murata and Los, 2006; Kappell and van Waasbergen, 2007).

У организмов с окисленным фотосинтезом особую роль играет марганец, поскольку он входит в каталитический центр расщепления воды кислород-выделяющего комплекса фотосистемы II. Недостаток марганца приводит к снижению фотосинтетической активности клеток цианобактерий, тогда как его избыток токсичен для них. Внутриклеточная концентрация ионов марганца поддерживается на оптимальном уровне за счет регуляции экспрессии генов оперона *mntCAB*, кодирующего белки транспортной системы. Нами установлено, что регуляция осуществляется двухкомпонентной системой, включающей сенсорную гистидинкиназу ManS и регулятор ответа ManR. При достаточной концентрации ионов марганца происходит их связывание с белком ManS, который в результате активируется и переводит белок ManR в форму активного репрессора. Активированный белок ManR подавляет транскрипцию оперона *mntCAB*. При недостатке ионов марганца белок ManR остается в

неактивной форме. В результате происходит дерепрессия оперона *mntCAB* и синтеза белков транспорта ионов марганца (Yamaguchi et al., 2002).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Бурное развитие геномики стимулировало разработку и внедрение новых технологий, позволяющих осуществлять более систематические подходы к анализу глобальных изменений в экспрессии генов на любом уровне, начиная от транскрипционного и до посттрансляционной модификации белков. К таким технологиям относятся, в частности, ДНК-микрочипы и двумерный гель-электрофорез белков в полиакриламидном геле с последующей масс-спектрометрией. Эффективность этих подходов многократно усиливается при сочетании с генетическими методами получения мутантов с инактивацией специфических генов, что дает в руки исследователей мощные средства для изучения адаптации организмов к факторам окружающей среды. Использование технологий функциональной геномики, как и последующий детальный анализ мутантов фотосинтезирующих организмов с помощью физиологических, биохимических, биофизических и молекулярно-генетических методов требует развитой экспериментальной базы и объединения усилий разных лабораторий.

Неоспоримым достоинством обратной генетики, основанной на инсерционной инактивации генов, является возможность получения стабильных мутантов, а также выявление жизненно важных генов, что в последнее время широко используется на разных модельных организмах для определения минимального набора генов, необходимых для жизнеобеспечения клетки. По имеющимся расчетам около 30 % (примерно 1000 генов) у *Synechocystis* являются жизненно важными (Poncelet et al., 1998). В частности, по полученным нами данным из 9 изученных генов, кодирующих транслоказы у *Synechocystis*, все являются необходимыми для жизнедеятельности клеток, из 3 генов лидерных пептидаз жизненно важны 2, из 20 генов пептидаз других семейств — 6.

Для исследования таких генов следует получать мутации других типов, которые могут приводить к частичной утрате или усилению их функций. Можно также использовать методы, позволяющие осуществлять контролируемое подавление экспрессии генов, например, с помощью антисмысловых РНК, экспрессируемых с регулируемых промоторов.

Другой проблемой обратной генетики является отсутствие фенотипических изменений у многих мутантов, особенно по регуляторным генам, что усложняет выявление функций генов. В большинстве случаев функции таких генов проявляются только в стрессовых, но не в нормальных условиях роста.

Исследования последних лет позволили существенно продвинуться в изучении и понимании регуляторных ге-

нетических механизмов, задействованных как в стрессовых ответах, так и в нормальном клеточном метаболизме. Тем не менее, глобальные регуляторные сети, включающие многокомпонентные системы регуляции, ожидают дальнейших исследований. Хотя и показано, что некоторые двухкомпонентные системы регуляции участвуют в восприятии и передаче различных сигналов, истинная физическая или химическая природа этого восприятия остается неизвестной. Несмотря на кажущуюся простоту устройства регуляторных систем цианобактерий, они, видимо, не сводятся к простому взаимодействию сенсорной гистидинкиназы с соответствующим регулятором ответа. По большей части остается неизвестной роль у *Synechocystis* серин-треониновых протеинкиназ эукариотического типа (12 генов) и транскрипционных факторов, не входящих в двухкомпонентные системы (38 генов). Полное понимание механизмов и путей стрессовых ответов в клетках возможно только при комплексном использовании физиологических, биохимических, молекулярно-биологических и генетических подходов.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (№№ 07-04-00117 и 06-04-48581), «Ведущие научные школы» (№ НШ-140.2008.4) и грантом Программы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН.

Литература

1. Лучкин П. В., 2008. Структурно-функциональный анализ кластера генов *tig-clpP2-clpX*, контролирующего фотоавтотрофный рост у *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Материалы Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов — 2008», секция «Биология». С. 72–73.
2. Паничкин В. Б., Глазер В. М., Зинченко В. В. и др., 2001. Ген *clpP2*, кодирующий пептидазу у цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803, контролирует чувствительность клеток к фотоингибированию // Известия АН. Серия биологическая. Т. 3. С. 312–317.
3. Пожидаева Е. С., Соколенко А. В., Зинченко В. В., 2007. Роль генов, кодирующих протеолитические ферменты у фотосинтетических организмов // Материалы XV Международной конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». С. 52–54.
4. Aguilar P. S., Hernandez-Arriaga A. M., Cybulski L. E., et al., 2001. Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis* // EMBO J. Vol. 20. P. 1681–1691.
5. Anderson S., McIntosh L., 1991. Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process // J. Bacteriol. Vol. 173. P. 2761–2767.
6. Barten R., Lill H., 1995. DNA-uptake in the naturally competent cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803 // FEMS Microbiol. Lett. Vol. 129. P. 83–88.

7. Collier J. L., Grossman A. R., 1994. A small polypeptide triggers complete degradation of light-harvesting phycobiliproteins in nutrient-deprived cyanobacteria // EMBO J. Vol. 13. P. 1039–1047.
8. Dalbey R. E., Wickner W., 1985. Leader peptidase catalyzes the release of exported proteins from the outer surface of the *Escherichia coli* plasma membrane // J. Biol. Chem. Vol. 260. P. 15925–15931.
9. Dolganov N., Grossman A. R., 1999. A polypeptide with similarity to phycocyanin alpha-subunit phycocyanobilin lyase involved in degradation of phycobilisomes // J. Bacteriol. Vol. 181. P. 610–617.
10. Goudreau P. N., Stock A. M., 1998. Signal transduction in bacteria: molecular mechanisms of stimulus-response coupling // Curr. Opin. in Microbiol. Vol. 1. P. 160–169.
11. Grigorieva G., Shestakov S., 1982. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803 // FEMS Microbiol Lett. Vol. 13. P. 367–370.
12. Kaneo T., Sato S., Kotani H. et al., 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions // DNA Res. Vol. 3. P. 109–136.
13. Kappell A. D., van Waasbergen L. G., 2007. The response regulator RpaB binds the high light regulatory 1 sequence upstream of the high light-inducible hliB gene from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 // Arch Microbiol. Vol. 187. P. 337–342.
14. Kehoe D. M., Grossman A. R., 1977. New classes of mutants in complementary chromatic adaptation provide evidence for a novel four-step phosphorelay system // J. Bacteriol. Vol. 179. P. 3914–3921.
15. Kirschner M., 1999. Intracellular proteolysis // Trends Cell Biol. Vol. 9. P. 42–45.
16. Koksharova O. A., Wolk C. P., 2002. Genetic tools for cyanobacteria // Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 58. P. 123–137.
17. Kong R., Xu X., 2002. Three-piece-ligation PCR and application in Disruption of chlorophyll synthesis genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Current Microbiol., Vol. 44. P. 241–245.
18. Kopito R. R., Sitia R., 2000. Aggresomes and Russell bodies // EMBO Rep. Vol. 1. P. 225–231.
19. Koretke K. K., Lupas A. N., Warren P. V. et al., 2000. Evolution of two-component signal transduction // Mol. Biol. Evol. Vol. 17. P. 1956–1970.
20. Labarre J., Chauvat F., Thuriaux P., 1989. Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 // J Bacteriol. Vol. 171. P. 3449–3457.
21. Los D. A., Suzuki I., Zinchenko V. V., Murata N., 2008. Stress responses in *Synechocystis*: Regulated genes and regulatory systems // The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution / Eds. Herrero A. and Flores E.: Caister Academic Press, P. 17–157.
22. Murata N., Los D. A., 2006. Histidine kinase Hik33 is an important participant in cold signal transduction in cyanobacteria // Physiol. Plant. Vol. 126, P. 17–27.
23. Paithoonrangsarid K., Shoumskaya M. A., Kanasaki Y. et al., 2004. Five histidine kinases perceive osmotic stress and regulate distinct sets of genes in *Synechocystis* // J. Biol. Chem. Vol. 279. P. 53078–53086.
24. Parkinson J. S., Kofoed E. C., 1992. Communication modules in bacterial signal proteins // Annu. Rev. Genet. Vol. 26. P. 71–112.
25. Pojidaeva E., Zinchenko V., Shestakov S. V., Sokolenko A., 2004. Involvement of the SppA1 peptidase in acclimation to saturating light intensities in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 // J. Bacteriol., Vol. 186. P. 3991–3999.
26. Poncelet M., Cassier-Chauvat C., Leschelle X. et al., 1998. Targeted deletion and mutational analysis of the essential (2Fe-2S) plant-like ferredoxin in *Synechocystis* PCC6803 by plasmid shuffling // Mol Microbiol. Vol. 28. P. 813–821.
27. Sambasivarao D., Dawson H. A., Zhang G. et al., 2001. Investigation of *Escherichia coli* dimethyl sulfide reductase assembly and processing in strains defective for the sec-independent protein translocation system membrane targeting and translocation // J. Biol. Chem. Vol. 276. P. 20167–20174.
28. Schopf J. W., 1993. Microfossils of the early archaean apex chert — new evidence of the antiquity of life // Science. Vol. 260. P. 640–646.
29. Schwarz R., Grossman A. R., 1988. A response regulator of cyanobacteria integrates diverse environmental signals and is critical for survival under extreme conditions // Proc Natl Acad Sci U S A. Vol. 95. P. 11008–11013.
30. Shoumskaya M. A., Paithoonrangsarid K., Kanasaki Y. et al., 2005. Identical Hik-Rre systems are involved in perception and transduction of salt signals and hyperosmotic signals but regulate the expression of individual genes to different extents in *Synechocystis* // J. Biol. Chem. Vol. 280. P. 21531–21538.
31. Sokolenko A., Pojidaeva E., Zinchenko V. et al., 2002. The gene complement for proteolysis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and Arabidopsis thaliana chloroplasts // Current Genetics., Vol. 41. P. 291–310.
32. Stock J., Da Re S., 2000. Signal transduction: response regulators on and off // Curr. Biol. Vol. 10. P. 420–424.
33. Suzuki I., Los D. A., Kanasaki Y. et al., 2000. The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis* // EMBO J. Vol. 19. P. 1327–1334.
34. Taroncher-Oldenburg G., Stephanopoulos G., 2000. Targeted, PCR-based gene disruption in cyanobacteria: inactivation of the polyhydroxyalkanoic acid synthase

- genes in *Synechocystis* sp. PCC6803 // Appl Microbiol Biotechnol. Vol. 54. P. 677–680.
35. Thiel T., 1994. Genetic analysis of cyanobacteria // The Molecular Biology Of Cyanobacteria / Ed. Bryant D. A. Dordrecht; The Netherlands: Kluwer Academic publ., P. 581–611.
 36. Vermaas W., 1996. Molecular genetics of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: principles and possible biotechnology applications // J. Appl. Phycol. Vol. 8. P. 263–273.
 37. Williams J. G. K., 1988. Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803 // Meth. Enzymol. Vol. 167. P. 766–778.
 38. Yamaguchi K., Suzuki I., Yamamoto H. et al., 2002. A Two-component Mn(2+)-sensing system negatively regulates expression of the mntCAB operon in *Synechocystis* // Plant Cell. Vol. 14. P. 2901–2913.
 39. Zhibanko M., 2006. Functional analysis of the leader peptidases in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium. Halle (Saale), Germany.
 40. Zhibanko M., Zinchenko V., Gutensohn M., Schierhorn A., Klosgen R. B., 2005. Inactivation of a predicted leader peptidase prevents photoautotrophic growth of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 // J. Bacteriol. Vol. 187. P. 3071–3078.
- Creation of mutant collections for the study of genetic control of stress adaptation in *Synechocystis* sp.**
- V. V. Zinchenko, V. M. Glaser, S. V. Kryazhov, P. V. Luchkin, M. M. Babykin, N. V. Belavina, D. A. Los
- ✿ **SUMMARY:** The availability of the complete genome sequence of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 which has been used as a model organism for molecular-genetic studying oxygenic photosynthesis and cell adaptation to stresses gives the opportunity to investigate the function of each gene in this organism by the targeted inactivation of the predicted genes. This paper presents our main results on functional genomics of *Synechocystis* based on construction and study of mutant collections with insertion inactivation of the genes encoding peptidases, translocases and the proteins of two-component regulatory systems.
- ✿ **KEY WORDS:** cyanobacteria; *Synechocystis*; insertional mutagenesis; functional genomics

Информация об авторах:

Зинченко Владислав Владимирович, профессор, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы. E-mail: vzinchenko@mail.ru.

Глазер Вадим Моисеевич, доцент, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы. E-mail: vmglaser3@mail.ru.

Кряжов Сергей Васильевич, аспирант, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы. E-mail: seryik@rambler.ru.

Лучкин Павел Владимирович, аспирант, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы. E-mail: zakat@rambler.ru.

Бабыкин Михаил Михайлович, доцент, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы. E-mail: babykin@mail.ru.

Белавина Наталия Всеволодовна, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы. E-mail: nbel@yandex.ru.

Лось Дмитрий Анатольевич, заведующий, Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева, лаборатория молекулярных основ внутриклеточной регуляции, 127276, Москва, Ботаническая ул., д. 35. E-mail: losda@ippras.ru.