

На правах рукописи

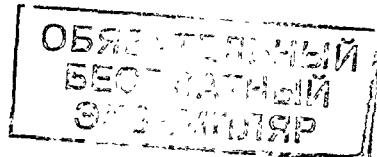
Кирик Инесса Анатольевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛАСТЕРА
ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ
К МЕТИЛВИОЛОГЕНУ И ФОТОТАКСИС
ЦИАНОБАКТЕРИИ *SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803***

Специальность 03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2006



Работа выполнена на кафедре генетики Биологического факультета
Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

кандидат биологических наук

Бабыкин Михаил Михайлович

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук

Лось Дмитрий Анатольевич

кандидат биологических наук

Полуэктова Елена Ульриховна

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов

Зашита диссертации состоится «___» 2006г. в ___ ч. на заседании
Диссертационного совета Д 002.214.01 при Институте общей генетики
им. Н.И.Вавилова РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, д. 3.
Факс: (095) 132-89-62.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, д. 3.

Автореферат разослан « » 2006 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,

кандидат биологических наук

Г.Н. Полухина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Процессы аэробного дыхания и оксигенного фотосинтеза сопряжены с образованием активных форм кислорода (АФК), таких как синглетный кислород, анион-радикал супероксида (O_2^-), пероксид водорода и гидроксильный радикал. Эти токсичные соединения способны индуцировать в клетке окислительный стресс (ОС), повреждая нуклеиновые кислоты, белки и мембранны. У фотосинтезирующих организмов образование O_2^- происходит в основном за счет прямого восстановления кислорода фотосистемой I. Мощным ингибитором роста фотосинтезирующих организмов на свету является гербицид паракват, или метилвиологен (MV), способный эффективно акцептировать электроны от фотосистемы I и восстанавливать кислород до O_2^- . Образование АФК может также стимулироваться различными факторами внешней среды, в частности, повышенным освещением, экстремальной температурой, а также нарушением водного и солевого режимов. Цианобактерии и растения обладают эффективными механизмами адаптации к изменению интенсивности света, которые позволяют оптимизировать фотосинтез и ограничить повреждения, связанные с фотоокислением. Одним из таких механизмов является фототаксис цианобактерий и хлоропластов растений, положительный – к свету, и отрицательный – от света высокой интенсивности.

С помощью геномного анализа и современных методов биоинформатики у модельной цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 (далее *Synechocystis*) установлено наличие не менее 15 генов, кодирующих белки с антиоксидантными функциями. Вместе с тем выявлено около 150 регуляторных генов; почти половина из них кодирует транскрипционные регуляторы, у большинства из которых функции предполагаемы или неизвестны (CyanoBase Website). Значительная часть регуляторных генов (80 генов) представляет двухкомпонентные системы, которые в клетках прокариот контролируют различные адаптивные ответы, такие как хемотаксис, осморегуляцию, споруляцию, развитие компетентности при трансформации, патогенность, вирулентность и др. В последние годы представления о координированной экспрессии генов фотосинтезирующих организмов в ответ на стрессовые воздействия существенно расширились благодаря использованию метода ДНК-микрочипов (микроэррэй-анализ транскрипции ДНК), позволяющего оценить степень активации или репрессии всех генов организма. С помощью данного подхода исследованы глобальные изменения экспрессии генов *Synechocystis* при солевом, гиперосмотическом и холодовом шоке, при адаптации клеток к высокой интенсивности света и обработке их MV и пероксидом водорода. В результате выявлены целые ансамбли генов, специфически реагирующие на различные стрессовые воздействия. В связи с этим

идентификация функций генов, вовлеченных в регуляцию работы систем жизнеобеспечения, в том числе защитных, у цианобактерий, является актуальной задачей современной генетики.

В нашей лаборатории показано, что в контроль устойчивости клеток *Synechocystis* к индуктору ОС MV вовлечен ген *prqR*, кодирующий регулятор транскрипции семейства TetR (Бабыкин и др., 2003). Этот ген негативно контролирует оперон *prqR-prqA*, в котором ген *prqA* кодирует белок с предполагаемой функцией Na^+/MV -антитранспортера. Более того, выявлено индуцируемое MV усиление авторепрессии гена *prqR*, сопряженное с существенным повышением транскрипции других генов с защитными функциями: *sodB*, кодирующего супероксиддисмутазу, и *turA*, кодирующего предполагаемый белок-транспортер токсичных соединений (Нефедова и др., 2003). В данной работе нами показано, что мутация в гене *prqR* обуславливает отрицательный фототаксис клеток, независимый от интенсивности света. Таким образом, ген *prqR* вовлечен в контроль систем адаптивного ответа цианобактерий на ОС и изменения интенсивности света.

Цель и задачи работы. Целью данной работы являлось изучение механизмов генетической регуляции защитных систем цианобактерий с участием гена *prqR* и генов, входящих с ним в один кластер. Для достижения указанной цели решали следующие задачи:

1. Молекулярно-генетический анализ авторегуляторной функции гена *prqR* с помощью сайт-направленного мутагенеза и генов-репортеров.

2. Выявление стрессового фактора или возможного индуктора, стимулирующего экспрессию оперона *prqR-prqA*, истинная защитная роль которого в клетках цианобактерий требует выяснения.

3. Анализ методом ДНК-микрочипов изменений в тотальном профиле транскрипции у мутантов с нарушенной функцией *prqR* для обнаружения новых генов, экспрессия которых контролируется геном *prqR*.

4. Функциональный анализ генов, входящих в один кластер с геном *prqR* (*sll0887*, *sll0886* и *prqA*), для установления их роли в регуляции фототаксиса у цианобактерий.

Научная новизна. Получены новые данные о регуляторной функции гена *prqR* и характере экспрессии оперона *prqR-prqA*, вовлеченного в контроль устойчивости клеток к индуктору ОС MV. Выявлено, что репрессорная функция белка PrqR обеспечивается как N-концевым ДНК-связывающим доменом, так и C-концевым доменом. Установлено, что ген *prqA* может транскрибироваться как с промотора оперона *prqR-prqA*, так и с собственного конститутивного промотора.

Впервые показано, что солевой стресс на ранней стадии развития стимулирует в клетках цианобактерий существенное повышение экспрессии оперона *prqR-prqA*. Это указывает на защитную роль белка PrqA при адаптации клеток к солевому стрессу.

Впервые установлено участие генов *prqR* и *sll0886* в контроле фототаксиса цианобактерий. Также впервые показано, что ген *prqR* вовлечен в регуляцию экспрессии генов, продукты которых необходимы для функционирования пилей, обеспечивающих подвижность клеток.

Впервые для изучения поверхностных структур клеток цианобактерий был использован новый метод атомно-силовой микроскопии, имеющей ряд существенных преимуществ по сравнению с традиционной электронной микроскопией. Этот метод позволяет эффективно выявлять изменения в морфологии пилей, обеспечивающих подвижность цианобактерий.

Научно-практическая значимость работы. Данные, полученные в работе, значительно дополняют сведения о системах устойчивости клеток фотосинтезирующих организмов к окислительному и другим видам стресса. Выявленные новые механизмы генетического контроля устойчивости клеток к стрессовым воздействиям могут служить основой для разработки практических подходов к конструированию трансгенных растений с повышенной резистентностью к неблагоприятным факторам внешней среды.

Апробация работы. Основные результаты исследования были представлены: на международном симпозиуме “Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология” (Москва, 2001 г.); на III Съезде Всероссийского общества генетиков и селекционеров ВОГиС (Москва, 2004 г.); на всероссийском симпозиуме «Автотрофные микроорганизмы» (Москва, 2005 г.); на семинаре кафедры генетики МГУ (протокол № 04-06, 2006 г.); на межлабораторном семинаре “Молекулярные и клеточные основы генетических процессов” (ИОГен им. Н.И. Вавилова, 2006 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 работ.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 110 страницах, состоит из введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы» и «Результаты и обсуждение», заключения, выводов, списка литературы, включающего 194 источника, и 1 приложения. Работа содержит 27 рисунков и 7 таблиц.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований (№99-04-48291, №01-04-48081, №02-04-48398, 05-04-49371) и ФЦП «Ведущие научные школы» (№00-15-97791; №4202.2006.4).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Питательные среды и культивирование микроорганизмов. Клетки *E.coli* инкубировали при 37⁰С в жидкой или плотной (1,5% агара) среде LB (Миллер, 1976).

Клетки *Synechocystis* выращивали как в жидкой, так и агаризованной (1% агар Difco) среде BG11 (Ripka *et al.*, 1979) при температуре 34⁰С и интенсивности света широкого спектра около 75 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. Клоны-трансформанты *Synechocystis* отбирали на BG11-агаре, содержащем MV (3 мкг/мл), Km (10 мкг/мл) или Gm (2 мкг/мл), а транскононьюганты – на среде с Gm (2 мкг/мл) или Sm (1 мкг/мл). Для выполнения условий, эквивалентных тем, что обеспечивают светоактивируемый гетеротрофный рост (LAHG) цианобактерий, клетки инкубировали в жидкой или агаризованной среде в присутствии 5 мМ глюкозы и при постоянной освещенности 0,25 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ (Kong *et al.*, 2004). В тестах на подвижность клеток *Synechocystis* (фототаксис) использовали агаризованную среду BG11 (0,8% агар Difco), содержащую 5 мМ глюкозу.

Трансформацию клеток проводили стандартными методами. Клетки *E. coli* трансформировали, как описано у (Манинатис и др., 1984), а клетки *Synechocystis* в логарифмической фазе роста смешивали с ДНК, инкубировали 20 час в стандартных условиях и высевали на селективные среды.

Обработка ДНК ферментами. Рестрикционный анализ и конструирование рекомбинантных ДНК проводили стандартными методами (Манинатис и др., 1984).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). ПЦР использовали для амплификации и клонирования участков хромосомы, сайт-направленного мутагенеза и анализа сегрегации мутантных копий гена с делецией или инсерцией в клетках *Synechocystis* (имеет до 12 копий хромосомы на клетку; Labarre *et al.*, 1989).

Сайт-направленный мутагенез на основе ПЦР проводили с использованием набора “Quick-Change Site-Directed Mutagenesis Kit” фирмы “Stratagene” согласно прилагаемой инструкции.

Определение последовательности нуклеотидов в ДНК выполняли сотрудники группы автоматического секвенирования Центра коллективного пользования при Институте молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН.

Получение специфических ДНК-зондов и Нозерн-блот-гибридизацию проводили по стандартным методикам (Манинатис и др., 1984).

Анализ профилей транскрипции в клетках *Synechocystis* с помощью ДНК-микрочипов проводили как описано в работах (Inaba *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2001).

Атомно-силовая микроскопия. Анализ поверхностных структур клеток проводили с помощью атомно-силового микроскопа Nanoscope IIIa (Digital Instruments, USA) в контактном и полуконтактном режимах сканирования. Анализ изображений клеток и их поверхностных структур осуществляли с помощью программы ФемтоСкан Онлайн (Filonov *et al.*, 2001).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С-концевой участок необходим для функционирования белка PrqR в качестве репрессора транскрипции

Ранее было установлено, что ген *prqR* контролирует устойчивость к MV клеток *Synechocystis*, негативно регулируя транскрипцию оперона *prqR-prqA* (Бабыкин и др., 2003; Нефедова и др., 2003). Репрессорная функция белка PrqR согласуется с наличием в его N-концевом участке ДНК-связывающего домена, характерного для белков-репрессоров семейства TetR. Известно, что система *tetR-tetA*, контролирующая устойчивость к тетрациклину (Tc) у грамотрицательных бактерий, индуцируется антибиотиком. В результате взаимодействия с Tc белок TetR инактивируется, что приводит к дерепрессии гена *tetR* и гена *tetA*, кодирующего H+/Tc-антисортер (Hillen, Berens, 1994). Однако MV, развитие устойчивости к которому связано с функцией гена *prqA*, не индуцирует экспрессию оперона *prqR-prqA*, а, напротив, даже усиливает авторепрессорную активность белка PrqR в клетках штамма ДТ *Synechocystis* (Бабыкин и др., 2003). Таким образом, для выяснения истинной клеточной функции оперона *prqR-prqA* важно идентифицировать природу индуктора, стимулирующего и экспрессию этого оперона, и повышение соответствующей устойчивости у цианобактерий. Между тем не меньшее значение может иметь информация о молекулярных механизмах репрессорной активности белка PrqR. С этой целью авторегуляторную функцию гена *prqR* исследовали с помощью сайт-направленного мутагенеза и генетического анализа взаимодействия аллелей с использованием рекомбинантных плазмид и генов-репортеров.

Поскольку MV, генератор супероксида, модулирует авторегуляторную функцию гена *prqR* (Бабыкин и др., 2003), нельзя было исключать, что белок PrqR является редокс-чувствительным регулятором транскрипции. Этот белок содержит единственный остаток цистеина, Cys-134 (C134), расположенный в С-концевом участке. Было предположено, что C134 – редокс-чувствительный центр, при окислении которого между двумя молекулами белка PrqR образуется дисульфидная связь, инициирующая димеризацию и активацию белка PrqR в качестве репрессора транскрипции. Для выяснения функциональной значимости

остатка C134 в С-концевом участке белка PrqR с помощью сайт-направленного мутагенеза заменили цистein на серин (C134S). Чтобы определить участвует ли С-концевой домен белка PrqR в обеспечении функции репрессора транскрипции, в ген *prqR* ДТ ввели мутацию C134^{fs}, вызывающую сдвиг рамки считывания, начиная с нуклеотида 400 в кодирующей области гена. Для решения этих задач использовали рекомбинантную плазмиду pW6 на основе вектора pTZ18R, в составе которой клонировали *Bam*H-*Sph*I-фрагмент (1,3 т.п.н.) хромосомы штамма ДТ *Synechocystis*, содержащий ген *prqR* и начальный участок гена *prqA* (рис. 1). Ген *prqR* с мутацией L17Q из генома устойчивого к MV мутанта Prq20 клонировали аналогичным образом в составе рекомбинантной плазмиды pP7 (рис. 1).

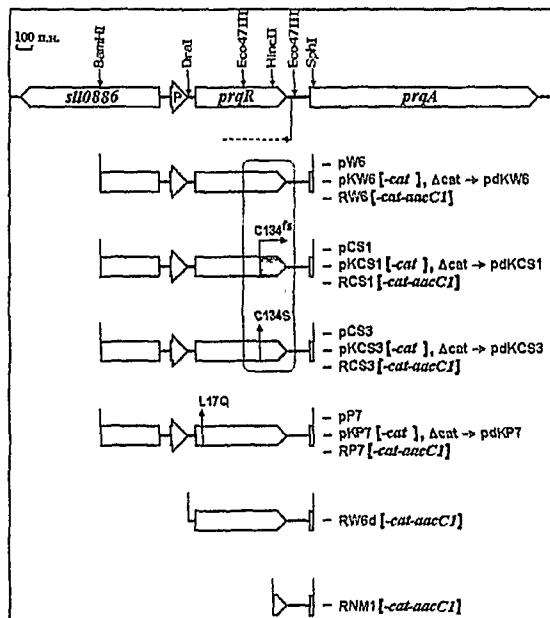


Рис. 1. Физическая карта участка хромосомы *Synechocystis*, содержащего гены *sll0886*, *prqR* и *prqA*. Показаны фрагменты ДНК, клонированные в составе рекомбинантных плазмид на основе векторов pTZ18R (р-производные), pKK232-8 (рК- и pdK-производные) и R30 (R-производные); квадратные скобки обозначают транскрипционное слияние клонированного фрагмента с бесспромоторным геном-репортером *cat*, одиночным или объединенным с маркерным геном *aacC1*. Р – предполагаемый промотор оперона *prqR-prqA*. C134^{fs}, C134S и L17Q – точечные мутации в гене *prqR*. Закрашенная часть гена *prqR* за мутацией C134^{fs} обозначает измененный участок кодирующей последовательности. Выделена область субклонирования для введения сайт-направленных мутаций в ген *prqR*; загнутая стрелка с пунктиром указывает район контрольного определения последовательностей нуклеотидов в плазмidaх pCS1 и pCS3.

*Eco*47III-фрагменты (313 п.н.) плазмид, производных pW6, полученных при сайт-направленном мутагенезе гена *prqR*, клонировали в вектор pTZ18R и секвенировали с полным перекрыванием в обоих направлениях. После идентификации ожидаемых мутаций, C134^{f6} или C134S, эти же фрагменты встроили в плазмиду pW6 с замещением ее *Eco*47III-фрагмента. Таким способом получили рекомбинантные плазмиды pCS1 и pCS3, содержащие ген *prqR* с мутациями C134^{f6} и C134S (рис. 1).

Плазмида pCS1 (с *prqRC134^{f6}*) проявила такую же, как у плазмиды pP7 (с *prqRL17Q*), способность трансформировать клетки штамма ДТ *Synechocystis* по признаку повышенной устойчивости к MV. Плазмида pCS3 (с *prqRC134S*), напротив, такой способностью не обладала, как и исходная плазмида pW6 с клонированным в ней геном *prqR* ДТ. Таким образом, по результатам определения трансформирующей активности рекомбинантных плазмид можно заключить, что мутант *Synechocystis* с *prqRC134^{f6}* фенотипически не отличается от штамма Prq20 с мутацией *prqRL17Q*, приводящей к выраженному нарушению авторегуляторной функции гена *prqR* (Бабыкин и др., 2003). Полученные данные свидетельствуют о том, что репрессорная активность белка PrqR связана с функционированием не только N-концевого ДНК-связывающего домена, но и С-концевого участка.

Системы анализа экспрессии и взаимодействия аллелей гена *prqR*

Характер экспрессии аллелей гена *prqR* (ген ДТ и его мутантные производные) изучали с помощью транскрипционных слияний с беспромоторным геном-репортером *cat* в составе рекомбинантных плазмид, сконструированных на основе двух векторов клонирования промоторов pKK232-8 и R30. Копии дикого и мутантных аллелей гена *prqR* вместе с оперонным промотором и началом гена *prqA* клонировали в составе *Bam*HI-*Sph*I-фрагментов (1,3 т.п.н.), донорами которых служили соответствующие р-производные, полученные на основе вектора pTZ18R (рис. 1). Для проверки наличия собственного промотора у гена *prqA* сконструировали на основе вектора R30 рекомбинантные плазмиды RW6d и RNM1, содержащие разные субфрагменты pW6: *Dra*I-*Sph*I (0,76 т.п.н.) и *Hinc*II-*Sph*I (0,25 т.п.н.) (рис. 1).

В данной работе определяли влияние на экспрессию аллеля *prqR* в R-плазмиде другого аллеля в составе плазмиды на основе вектора pKK232-8, у которого делетирован *Rvi*II-фрагмент размером 1,28 т.п.н. (рДК-производные), содержащий ген *cat*.

Обладая репликоном RSF1010, плазмида R30 и ее производные способны автономно реплицироваться в клетках цианобактерии. В неселективных условиях роста клетки *Synechocystis* стабильно наследуют 5-10 копий R-плазмиды в автономном состоянии на одну хромосому. При анализе взаимодействия аллелей

гена *prqR* в клетках *Synechocystis* транскрипционную активность аллеля в составе R-плазмиды оценивали по экспрессии гена-репортера *cat*, а характер экспрессии хромосомных копий гена *prqR* (штамм ДТ или мутант Prq20) – по активности гена *prqA*, измеряемой уровнем устойчивости клеток к MV.

Результаты проведенного исследования показали, что аллели *prqR* ДТ и *prqRC134S*, *prqRL17Q* и *prqRC134^f*, а также делеционные производные гена *prqR* в плазмидах RNM1 и RW6d составляют пары с идентичным характером поведения при равных уровнях экспрессии (в границах доверительных интервалов). Вместе с тем каждый аллель гена *prqR* экспрессируется с одинаковой эффективностью в составе рекомбинантных плазмид на основе pKK232-8 и R30. Поэтому для каждой группы равноценных вариантов гена *prqR* представлены результаты анализа одного варианта в качестве типичного представителя всей группы.

Негативная авторегуляция гена *prqR* в клетках *E. coli*

Результаты измерения уровней чувствительности/устойчивости к См одноплазмидных штаммов *E. coli*, содержащих транскрипционные слияния различных вариантов гена *prqR* с геном-репортером *cat*, показали, что ген *prqR* экспрессируется и авторегулируется в гетерологичной системе. Клетки штаммов, содержащих рекомбинантные плазмиды RW6 или pKW6 с геном *prqR* ДТ, значительно более устойчивы к антибиотику, чем клетки исходного бесплазмидного штамма и штаммов с плазмидами R30 или pKK232-8 (контроль). В 3-4 раза более высоким уровнем устойчивости к См обладают штаммы, несущие плазмиды RP7 (или pKP7) и RCS1 (или pKCS1) с мутантными аллелями *prqRL17Q* и *prqRC134^f*, которые характеризуются, соответственно, повреждениями ДНК-связывающего и С-концевого доменов белка-репрессора PrqR. Обе мутации приводят к дерепрессии гена *prqR* в клетках *Synechocystis*. Следовательно, более низкий уровень устойчивости к См у штаммов *E. coli*, содержащих плазмиды с геном *prqR* ДТ, чем у штаммов, несущих мутантные аллели, свидетельствует о проявлении авторепрессорной функции белка PrqR в гетерологичной системе. Одинаковый уровень экспрессии у аллеля *prqRC134S* и гена ДТ в составе плазмид RCS3/pKCS3 и RW6/pKW6 указывает на то, что замена C134S в С-концевом домене белка PrqR не оказывает существенного влияния на его активность.

Одноковое поведение гена *prqR* в составе двух совместимых векторных плазмид позволило адекватно оценить характер взаимодействий между его аллелями. С этой целью были измерены уровни устойчивости к См штаммов *E. coli* с R-плазмидами в компаундах с pdK-производными (рис. 2). Экспрессия мутантных аллелей *prqRL17Q* и *prqRC134^f* в плазмидах RP7 и RCS1 не изменяется в присутствии их собственных экстракопий (pdKP7/pdKCS1), но полностью подавляется (до уровня экспрессии гена *prqR* ДТ) в присутствии дополнительных

аллелей ДТ или *prqRC134S* в составе производных pdKW6/pdKCS3 (рис. 2). Следовательно, в клетках *E. coli* ген *prqR* ДТ полностью доминирует над своими мутантными аллелями, то есть белок PrqR проявляет свойства транс-действующего репрессора транскрипции. Ни один из аллелей гена *prqR* в транс-положении не влияет на экспрессию его делециональных производных в составе рекомбинантных плазмид RNM1 и RW6d (рис. 2). Следовательно, дополнительный промотор гена *prqA*, как и предполагалось ранее (Бабыкин и др., 2003), является слабым конститутивным промотором, не регулируемым белком PrqR. Полученные данные позволяют заключить, что в клетках *E. coli* ген *prqR* подвержен специфической авторегуляции, обусловленной связыванием белка PrqR с операторными участками в области *prqR*-промотора.

Таким образом, результаты генетического анализа взаимодействия аллелей гена *prqR* служат прямым доказательством наличия авторепрессорной функции у белка PrqR. В гетерологичной системе, в клетках *E. coli*, ген *prqR* ДТ подавляет (транс-активность) дерепрессированную транскрипцию его мутантных аллелей. Данные, полученные при изучении экспрессии делециональных производных гена *prqR*, показывают, что внутри оперона *prqR-prqA* находится дополнительный конститутивный промотор, с которого может экспрессироваться ген *prqA*, контролирующий устойчивость клеток *Synechocystis* к MV.

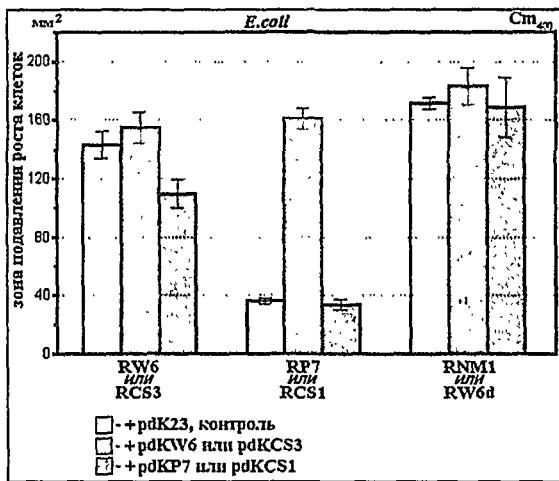


Рис. 2. Уровни чувствительности к Cm (400 мкг/диск) (зоны подавления роста клеток вокруг бумажных дисков с антибиотиком) двухплазмидных штаммов *E. coli*, содержащих рекомбинантную плазмиду R-серии совместно с рекомбинантной плазмидой на основе вектора pKK232-8 с делецией гена *cat*, pdK23 (pdK-производные). В составе плазмид клонированы аллели гена *prqR* – ДТ (RW6, pdKW6), *prqRC134S* (RCS3, pdKCS3), *prqRL17Q* (RP7, pdKP7) и *prqRC134^s* (RCS1, pdKCS1), а также делециональные производные гена *prqR* (RNM1 и RW6d).

Цис-доминантный характер проявления мутантного аллеля *prqRL17Q*

в клетках *Synechocystis*

Как видно из рис. 3а, в клетках трансконьюгантов штаммов ДТ и Prq20 *Synechocystis* уровни транскрипционной активности плазмидных аллелей *prqR* ДТ (RW6) и *prqRC134S* (RCS3), а также делеционных вариантов гена *prqR* (RNM1 и RW6d) практически не отличаются от уровня фоновой экспрессии гена-репортера *cat* (R30, контроль). Вместе с тем в клетках мутанта Prq20 содержащиеся в плазмидах RP7 и RCS1 мутантные аллели *prqRL17Q* и *prqRC134^b* дерепрессированы, о чем свидетельствует высокий уровень устойчивости к См соответствующих трансконьюгантов (рис. 3а). Следовательно, в клетках обоих штаммов *Synechocystis* транскрипция плазмидных аллелей *prqR* ДТ и *prqRC134S* специфически репрессирована, а ген-репортер *cat*, как и в случае делеционных производных гена *prqR* (RNM1 и RW6d), скорее всего, экспрессируется с конститутивного промотора гена *prqA*. В клетках штамма ДТ транскрипционная активность мутантных аллелей в составе рекомбинантных плазмид частично подавляется, не достигая уровня репрессии гена ДТ (RW6) (рис. 3а). Полудоминантный характер поведения плазмидных копий мутантных аллелей гена *prqR* может быть обусловлен тем, что они численно превосходят хромосомные копии гена ДТ (до 10 плазмид на одну хромосому). Однако, с другой стороны, мутантный хромосомный аллель *prqRL17Q* полностью доминирует над локализованными в плазмидах RW6 и RCS3 аллелями ДТ, несмотря на их численное превосходство. Этот вывод следует из результатов определения транскрипционной активности аллелей гена *prqR* в хромосоме по проявлению признака устойчивости клеток к MV (репортер – ген *prqA*; рис. 3б). На дерепрессированную экспрессию мутантного аллеля *prqRL17Q* в хромосоме у трансконьюгантов штамма Prq20 (высокий уровень устойчивости к MV) не оказывают подавляющего действия ни аллель ДТ, ни все производные гена *prqR*, введенные в клетку на автономных плазмидах. Практически не подвержена воздействию плазмидных аллелей экспрессия гена *prqR* в хромосоме штамма ДТ (низкий уровень устойчивости к MV).

Сохранение функциональной активности плазмидных аллелей гена *prqR* ДТ в трансконьюгантах мутанта Prq20 было подтверждено обратным переносом плазмид RW6 и RCS3 в клетки *E. coli*, где вновь проявилась авторегулируемая экспрессия гена *prqR*. Следовательно, в клетках мутанта Prq20 *Synechocystis* аллели *prqR*, клонированные в составе плазмид RW6 и RCS3, негативно контролируют собственную транскрипцию, но не действуют на мутантный аллель *prqRL17Q*, локализованный в хромосоме. Эти данные свидетельствуют о возможности цис-действующей авторегуляции гена *prqR* у цианобактерии *Synechocystis*.

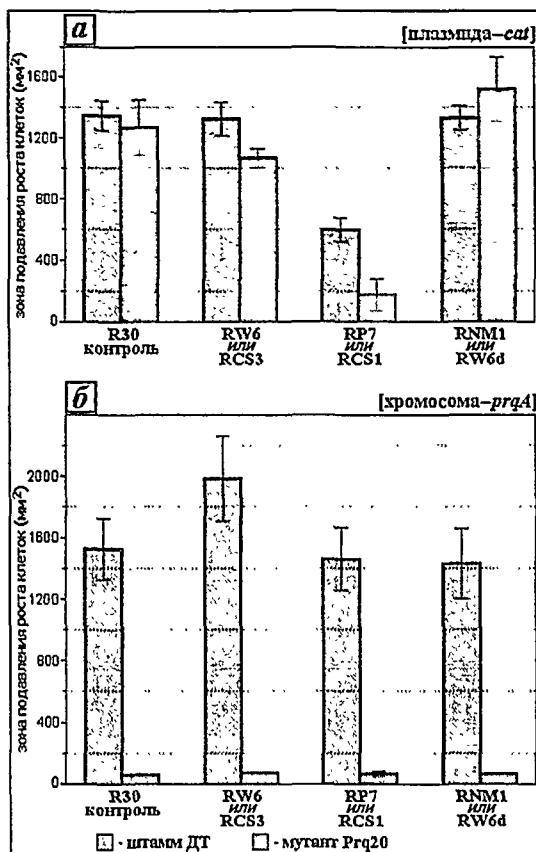


Рис. 3. Уровни чувствительности трансконъюгантов *Synechocystis* штамма ДТ и мутанта Prq20 к См (а) и MV (б). Экспрессию производных гена *prqR* в составе автономных плазмид оценивали по активности гена устойчивости к См [плазмида-*cat*], а экспрессию дикого и мутантного аллелей *prqR*, локализованных в хромосоме штамма ДТ и мутанта Prq20 – по активности гена устойчивости к MV [хромосома-*prqA*]. Контрольные штаммы содержали плазмиду R30. Доза См – 400 мкг/диск; MV – 20 мкг/диск.

Согласно полученным данным, ни характер, ни уровень репрессорной активности белка PrqR не определяются редокс-чувствительным остатком цистеина. Следовательно, стимулируемое MV усиление авторепрессии гена *prqR* в клетках *Synechocystis* (Бабыкин и др., 2003), скорее всего, не связано с модификацией белка PrqR в результате его окисления. Между тем мутация сдвига рамки считываивания C134^{f8} в гене *prqR* нарушает его авторегуляцию и приводит к повышению резистентности клеток к MV за счет дерепрессии оперона *prqR-prqA*. Эти данные свидетельствуют об участии С-концевого домена в функционировании

белка PrqR в качестве репрессора транскрипции. При изучении характера взаимодействий между аллелями гена *prqR* в клетках *Synechocystis* выявлена цис-действующая авторепрессия гена *prqR* ДТ в составе автономной плазмиды. Возможно, у цианобактерий повышение авторепрессии гена *prqR* в условиях ОС связано не с активацией белка PrqR, как такового, а со стимуляцией его цис-активности. Усиление негативной авторегуляции гена *prqR* *in cis* должно приводить к снижению внутриклеточной концентрации свободного трансактивного белка-репрессора PrqR, и, вследствие этого, к дерепрессии негативно регулируемых белком PrqR генов, к которым могут относиться и гены защитных функций.

Оперон *prqR-prqA* вовлечен в адаптивный ответ клеток на солевой стресс

У мутанта Prq20 *Synechocystis*, характеризующегося дерепрессией оперона *prqR-prqA* и повышенной устойчивостью к MV, не удалось выявить перекрестной устойчивости к другим ингибиторам роста клеток, несмотря на испытание широкого спектра антибиотиков, индукторов ОС и различных токсичных соединений. Был только обнаружен в 1,5-2 раза повышенный уровень резистентности к куменигидропероксиду, стимулирующему перекисное окисление липидов (Нефедова, 2004). Исследования с помощью ДНК-микрочипов профилей транскрипции в клетках *Synechocystis* выявили существенное стимулирующее действие на экспрессию гена *prqR* солевого стресса (Marin *et al.*, 2004; Shoumskaya *et al.*, 2005) и обработки клеток бензилалкоголем, повышающим текучесть мембран (Inaba *et al.*, 2003). По имеющимся сведениям наиболее ярко выраженный стимулирующий эффект на экспрессию гена *prqR* в клетках штамма ДТ оказывает солевой стресс (NaCl в концентрации 4%). Содержание транскриптов этого гена повышалось в 45 раз после 30 мин стресса и через два часа снижалось до начального уровня (Marin *et al.*, 2004). Вместе с тем на основании данных, полученных с помощью ДНК-микроэррэй анализа, нельзя было однозначно заключить, что NaCl или бензилалкоголь могут играть роль индуктора оперона *prqR-prqA*, поскольку отсутствовали какие-либо указания на повышение экспрессии гена *prqA* (Inaba *et al.*, 2003; Marin *et al.*, 2004; Shoumskaya *et al.*, 2005).

Нами были воспроизведены условия воздействия солевым стрессом на клетки штамма ДТ *Synechocystis* и с помощью Нозерн blot-гибридизации выявлена существенная индукция генов оперона *prqR-prqA* (рис. 4). Согласно результатам денситометрического анализа сигналов гибридизации на радиоавтографах содержание транскриптов гена *prqR* возрастает при солевом стрессе примерно в 40 раз, а гена *prqA* – в 20 раз. Наличие общего для *prqR* и *prqA* транскрипта размером около 2,1 т.н., перекрывающего оба гена и соответствующего двухцистронной

МРНК *prqR-prqA*, указывает на координированную индукцию этих генов с общего оперонного промотора в стрессовых условиях.

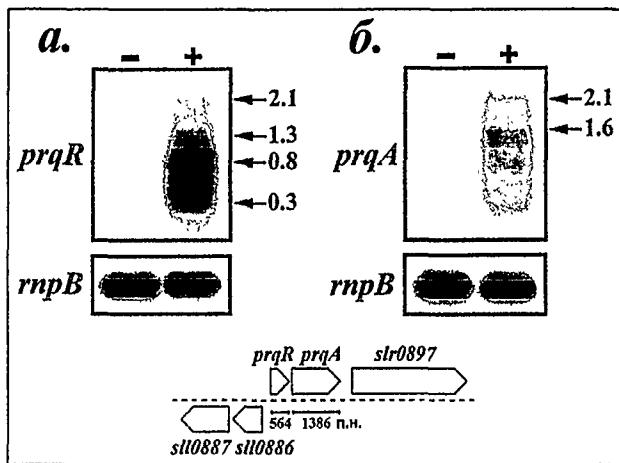


Рис. 4. Содержание транскриптов генов *prqR* (а) и *prqA* (б) в клетках штамма ДТ *Synechocystis* без обработки NaCl (—) и после 30 мин инкубации в присутствии 4% NaCl (+). Стрелками справа указаны основные транскрипты генов в т.н. Уровни МРНК гена *rnpB* приведены в качестве контроля равных количеств тотальной РНК в пробах. Внизу представлена карта участка хромосомы, содержащего оперон *prqR-prqA*, с указанием размера генов.

Как было отмечено, три работы (из одной лаборатории) свидетельствуют об индукции солевым стрессом и бензилалкоголем экспрессии гена *prqR*, однако не содержат каких-либо указаний на дерепрессию гена *prqA* (Inaba *et al.*, 2003; Marin *et al.*, 2004; Shoumskaya *et al.*, 2005). Эти сведения не согласуются с нашими данными о координированной транскрипции генов *prqR* и *prqA* в составе одного оперона. Не исключено, что у варианта штамма ДТ, использованного в упомянутых исследованиях, экспрессия *prqA* в составе оперона нарушена спонтанной мутацией или инсерцией мобильного элемента, тогда как наш вариант штамма ДТ содержит интактный оперон *prqR-prqA*. Вероятно, по этой причине именно нам, а не другим авторам, удалось выявить индукцию данного оперона при солевом стрессе. Поскольку мутант Prq20 с дерепрессированным геном *prqA* не проявляет повышенной устойчивости к NaCl, можно заключить, что непосредственно белок PrqA не отвечает за резистентность цианобактерий к солевому стрессу. Тем не менее, нельзя при этом исключать защитную роль транзитной индукции оперона *prqR-prqA*. Возможно, белок PrqA, являющийся предполагаемым Na^+ -зависимым антипортером (Нефедова и др., 2003), способен секвестрировать Na^+ и тем самым защищать клетки от цитотоксического действия этих ионов (на ранней стадии солевого стресса).

Поскольку белок PrqA относится к транспортерам множественной лекарственной устойчивости (CyanoBase Website), и показано его участие в защите клеток от MV, было бы неправомерным считать связывание ионов Na^+ основной предполагаемой функцией этого белка. Вместе с тем факт дерепрессии оперона *prqR-prqA* при солевом шоке (и, возможно, при обработке клеток бензилалкоголем) может свидетельствовать об образовании в клетке некого токсичного соединения, которое должно быть индуктором репрессора PrqR и в то же время субстратом для антипортерной активности белка PrqA. Это неизвестное соединение и следует идентифицировать в качестве истинного индуктора оперона *prqR-prqA*.

В настоящее время у бактерий хорошо изучено более 80 TeiR/AcrR-систем устойчивости с участием белков-транспортеров с различным механизмом действия (Ramos *et al.*, 2005), причем участие антипортеров семейства MATE (Multidrug and toxic compounds extrusion) в работе таких систем показано, по-видимому, впервые на примере белка PrqA. Активное изучение белков семейства MATE начато сравнительно недавно, и функции многих из них еще неизвестны. Однако установлено, например, участие белков этого семейства в детоксикации ионов переходных металлов и защите от антибиотиков, синтезируемых в природных сообществах микроорганизмов (Li *et al.*, 2002; Burse *et al.*, 2004).

Плейотропный характер мутации *prqRL17Q*: повышенная устойчивость клеток к MV и отрицательный фототаксис, независимый от интенсивности света

Нами обнаружено, что наряду с повышенной устойчивостью к MV мутант Prq20 *Synechocystis* характеризуется отрицательным фототаксисом, не зависящим от интенсивности света. Для доказательства связи измененной подвижности клеток с нарушением гена *prqR*, а не какого-либо другого гена, клетки штамма ДТ трансформировали рекомбинантной плазмидой pP7, содержащей ген *prqR* с мутацией L17Q. Полученный таким способом устойчивый к MV мутант Pq17 не отличается (как и мутант Prq20) от штамма ДТ по основным физиологическим параметрам: светочувствительности, скорости роста и составу пигментов. Однако отрицательный фототаксис мутанта Pq17 (как и Prq20) проявляется уже при 10 мкмоль фотонов· $\text{м}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, интенсивности света, близкой к пороговой для автотрофного роста клеток (рис. 5). Таким образом, ген *prqR* с миссенс-мутацией L17Q детерминирует конститтивно отрицательный фототаксис цианобактерий.

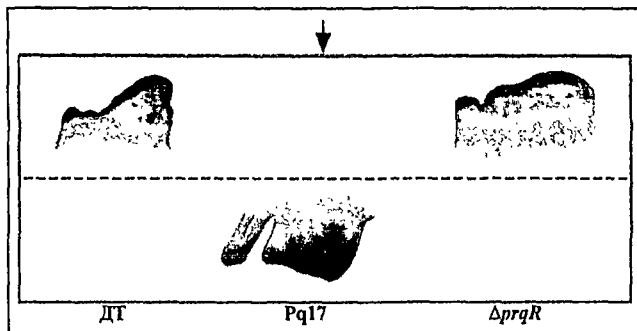


Рис. 5. Фототаксис клеток штамма ДТ и мутантов Pq17 и $\Delta prqR$ *Synechocystis* в ответ на облучение белым светом широкого спектра. Суспензии клеток наносили каплями на поверхность агаризованной среды и инкубировали 5 дней при одностороннем освещении ($10 \text{ мкмоль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). Стрелка указывает направление света, пунктир – исходное положение клеток.

Для выяснения роли в контроле фототаксиса гена *prqR* и генов, входящих с ним в один кластер, провели их направленную инактивацию у штамма ДТ и мутанта Pq17 (рис. 6). Все полученные мутанты (как и Pq17) не отличались от штамма ДТ по светочувствительности, скорости роста и составу пигментов.

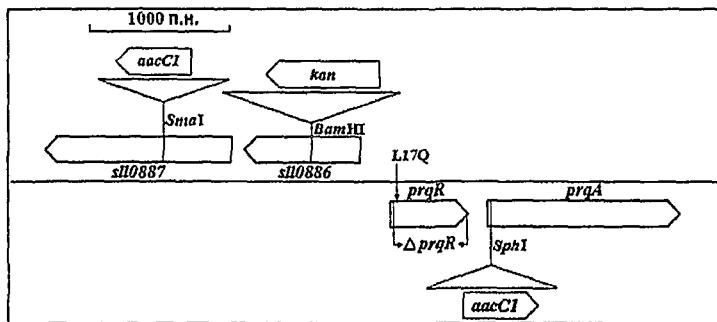


Рис. 6. Физическая карта участка хромосомы *Synechocystis* с указанием мутаций в регуляторном гене *prqR* и схемой инсерционной инактивации генов *sll0887*, *sll0886* и *prqA*, входящих в один кластер с геном *prqR*.

Делекция *prqR* и инсерционная инактивация гена *prqA* не влияют на фототаксис

Не исключена возможность, что в высокой внутриклеточной концентрации мутантный белок PrqR с аминокислотной заменой L17Q проявляет регуляторную активность, причем с измененной специфичностью. В связи с этим был сконструирован мутант с практически полной делекцией гена *prqR* без нарушения рамки считываания – $\Delta prqR$ (рис. 6). Мутант $\Delta prqR$ сохраняет положительный фототаксис (рис. 5) и, более того, сходен со штаммом ДТ в том, что пороговые

интенсивности света для переключения положительного фототаксиса на отрицательный близки у обоих штаммов (в нашей лаборатории около 120 мкмоль фотонов· $\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$). Поскольку не исключалась возможность взаимосвязи измененного фототаксиса мутанта Pq17 со значительной дерепрессией гена *prqA*, этот ген инактивировали введением в начало кодирующей последовательности (в сайт *SphI*) кассеты устойчивости к гентамицину (несет ген *aacC1*) (рис. 6). Клетки этого мутанта утратили резистентность к MV, однако сохранили отрицательный фототаксис. Вместе с тем аналогичный инсерционный мутант, производный штамма ДТ, демонстрировал положительный фототаксис при повышенной чувствительности к MV. Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что отрицательный фототаксис мутанта Pq17 связан с особым эффектом мутации *prqRL17Q*, но не с нарушением функции *prqR* в целом, а также не с дерепрессией гена *prqA*.

В регуляцию фототаксиса вовлечен ген *sll0886*, контролирующий активируемый светом гетеротрофный рост клеток *Synechocystis*

Гены *prqR* и *sll0886* имеют общий межгенный участок ДНК (рис. 6), поэтому нельзя было исключать, что *prqR* может регулировать экспрессию *sll0886*. Ген *sll0886* и следующий за ним по направлению транскрипции ген *sll0887* были инактивированы в клетках штамма ДТ и мутанта Pq17. Установлено, что клетки мутантных штаммов с инактивированным геном *sll0886* нежизнеспособны в условиях активируемого светом гетеротрофного роста; при этом у мутанта S186::Km сохранился положительный фототаксис, а у двойного мутанта Pq17 S186::Km подвижность полностью отсутствовала (рис. 7).

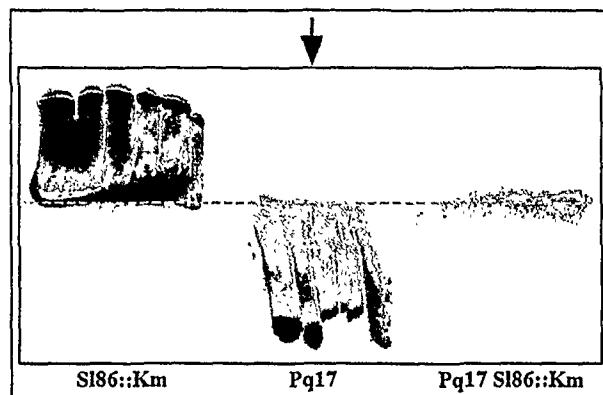


Рис. 7. Фототаксис клеток мутантов S186::Km, Pq17 и Pq17 S186::Km *Synechocystis* в ответ на облучение белым светом широкого спектра. Условия опыта и обозначения те же, что приведены под рис. 5.

Для доказательства того, что утрата клетками подвижности у мутанта Pq17 S186::Km связана с инсерцией в ген *sll0886*, но не с полярной инактивацией гена *sll0887*, последний инактивировали у мутанта Pq17. Клетки двойного мутанта Pq17 S187::Km сохранили отрицательный фототаксис. Кроме того, чтобы проверить, не обусловлено ли нарушение подвижности с неизвестной случайной мутацией, клетки мутанта Pq17 S186::Km трансформировали ПЦР-фрагментом ДНК, содержащим интактный ген *sll0886*. Трансформанты, отобранные по способности расти в гетеротрофных условиях (при активации светом), приобретали подвижность и отрицательный фототаксис, свойственные мутанту Pq17.

В совокупности полученные данные доказывают участие гена *sll0886* в контроле фототаксиса цианобактерий. Предполагается, что этот ген отвечает за передачу в клетке слабого светового (возможно, синей части спектра) сигнала гетеротрофного роста (Kong *et al.*, 2003). Не исключено, что тот же сигнал воспринимается системой, обеспечивающей зависимую от света подвижность клеток, и ген *sll0886* вовлечен одновременно в контроль активируемого светом гетеротрофного роста и контроль отрицательного фототаксиса клеток. Можно также полагать, что мутация *prqRL17Q* нарушает путь регуляции положительного фототаксиса, который, как известно, напрямую не связан с путем регуляции отрицательного фототаксиса (Bhaya *et al.*, 2001a). Согласно данной гипотезе для полной утраты клетками подвижности необходима инактивация обоих путей регуляции фототаксиса, как это, возможно, и происходит в случае двойного мутанта Pq17 S186::Km. Для понимания истинных молекулярных механизмов регуляции фототаксиса с участием генов *prqR* и *sll0886* требуются дополнительные исследования.

Изменения в регуляции генов, ответственных за функционирование пилей, у мутантов с нарушенной функцией гена *prqR*

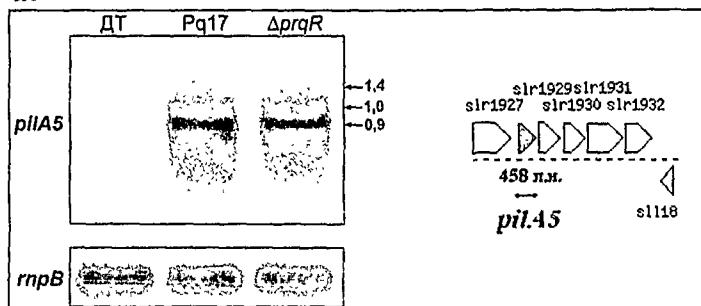
Нами в совместном исследовании с отделением регуляторной биологии Национального института фундаментальной биологии, Окайаки, Япония (руководитель отделения профессор Н. Мурата) с помощью метода ДНК-микрочипов был проведен сравнительный анализ тотальных профилей транскрипции в клетках, выращенных в стандартных условиях, у штамма DT и мутантов с нарушенной функцией гена *prqR*, Pq17 и Δ*prqR*. Как следует из результатов микроэррэй-анализа, инактивация гена *prqR* приводит у обоих мутантов к одинаковому изменению экспрессии целого ряда генов. К их числу относятся ген *prqA* (повышение транскрипции), а также опсроны *pilA5-pilA6* (повышение транскрипции) и *pilA9-pilA10-pilA11-slr2018* (понижение транскрипции), вовлеченные в контроль функционирования пилей, необходимых для подвижности цианобактерий (пили типа IV, Tfp). Вместе с тем у мутантов в 2

раза понижен уровень экспрессии гена *spkA*, который кодирует серин-треониновую протеинкиназу эукариотического типа, отвечающую за фосфорилирование мембранных белков и регуляцию подвижности клеток (Kamei *et al.*, 2001). Известным следствием инактивации генов *pilA9* и *spkA* является утрата клетками подвижности (Bhaya *et al.*, 2001b; Kamei *et al.*, 2001; Panichkin *et al.*, 2006). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что ген *prqR* вовлечен в регуляцию генов, ответственных за подвижность и фототаксис у цианобактерий: негативную регуляцию оперона *pilA5-pilA6* и позитивную – гена *spkA* и оперона *pilA9-pilA10-pilA11-slr2018*. Наряду с этим ген *prqR* может регулировать еще ряд генов, в основном с неизвестной функцией, причем по характеру изменений в экспрессии отдельных генов мутанты Pq17 и $\Delta prqR$ различаются. У мутанта Pq17, в отличие от мутанта $\Delta prqR$, в 2 раза повышена транскрипция гена *slr1071* и в 2 раза понижена транскрипция генов *slr1260* и *psaJ*. Напротив, у мутанта $\Delta prqR$ в 2,3 раза повышена экспрессия гена *cpcD* и в 2 раза понижена экспрессия генов *ssr2016* и *slr0442*. Такое расхождение в спектрах транскриptionных изменений может объясняться проявлением мутантным белком $\Delta prqR$ регуляторной активности в клетках штамма Pq17. Не исключено, что один из генов (или обеих), экспрессия которого специфически изменена в клетках мутанта Pq17, контролирует у *Synechocystis* механизм переключения фототаксиса (с положительного на отрицательный).

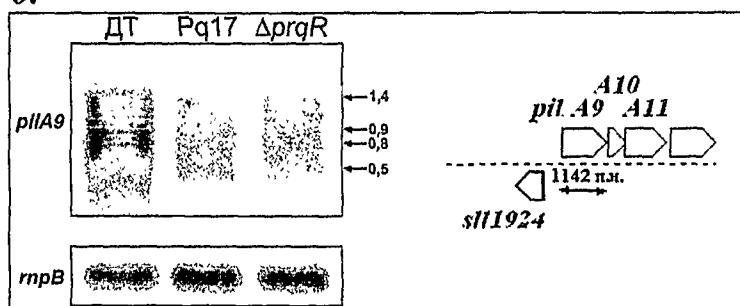
С целью подтверждения выявленных изменений в тотальном профиле транскрипции уровень экспрессии генов *pilA5*, *pilA9* и *spkA* исследовали с помощью Нозерн-блот-анализа в клетках мутантов Pq17 и $\Delta prqR$, выращенных в стандартных условиях. Относительное содержание мРНК анализируемых генов в клетках мутантов соответствует тому, что было установлено с помощью микроэррэй-анализа (рис. 8). Согласно результатам Нозерн-блот-гибридизации транскрипция гена *pilA5* (рис. 8 a) действительно повышена (примерно в 4 раза) у мутантов Pq17 и $\Delta prqR$, тогда как транскрипция генов *pilA9* (рис. 8 b) и *spkA* (рис. 8 c) у мутантов понижена (примерно в 2,5 и 2 раза, соответственно) в сравнении со штаммом ДТ. Следует также отметить полное совпадение данных об относительном уровне транскрипции оперона *prqR-prqA* в клетках штамма ДТ и мутантов Pq17 и $\Delta prqR$, полученных с помощью микроэррэй-анализа и Нозерн-блот-гибридизации. Для выяснения характера экспрессии оперона *pilA1-pilA2* в клетках штаммов Pq17 и $\Delta prqR$, а также в клетках двойного мутанта Pq17 S186::Km, клетки которого лишены подвижности, использовали Нозерн-блот-гибридизацию с зондом к гену *pilA1*. Как следует из полученных данных, уровень транскрипции гена *pilA1* (и, очевидно, оперона *pilA1-pilA2*) одинаков в клетках мутантных штаммов и штамма ДТ. Следовательно, мутации в генах *prqR* и *slr0886* не влияют

на экспрессию гена *pilA1*, кодирующего основной компонент Tfp в клетках цианобактерий, а потому гены *prqR* и *sll0886*, очевидно, контролируют не биогенез Tfp, а их функционирование при фототаксисе.

a.



b.



c.

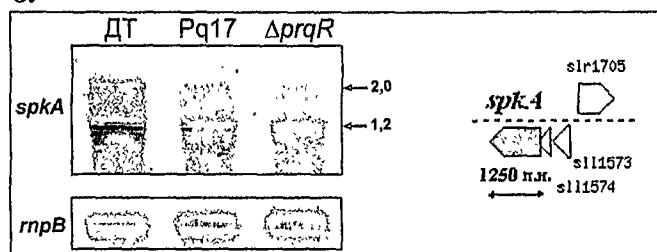


Рис. 8. Содержание транскриптов генов *pilA5* (а), *pilA9* (б) и *spkA* (в) в клетках штамма ДТ и мутантов Pq17 и $\Delta prqR$ *Synechocystis*. Стрелками справа указаны основные транскрипты генов в т.н. В правой части рисунков приведены карты участков хромосомы, содержащих анализируемые гены с указанием их размера.

Гены *prqR* и *sll0886* контролируют функционирование толстых пилей, но не их биогенез

Для того чтобы выяснить, участвуют ли гены *prqR* и *sll0886* в контроле биогенеза пилей, был выполнен сравнительный анализ поверхностных структур клеток штамма ДТ и мутантов с нарушенной функцией указанных генов. В наших исследованиях впервые для цианобактерий был применен новый метод атомно-силовой микроскопии (АСМ), которая имеет ряд существенных преимуществ по сравнению с традиционной растровой и просвечивающей электронной микроскопией. У *Synechocystis* описаны пили двух морфотипов, толстые и тонкие. Нами показано, что метод АСМ позволяет легко различать на поверхности цианобактерий пили двух разных морфотипов и идентифицировать изменения в морфологии толстых пилей (Tfp), обеспечивающих подвижность клеток при фототаксисе.

Компьютерный анализ распределения пилей штамма ДТ по высоте над поверхностью носителя (поперечный размер, толщина, или диаметр, пиля) выявил наличие двух основных пиков со средними значениями высот 2.1 ± 0.1 и 3.9 ± 0.2 нм. Эти величины соответствуют диаметрам тонких и толстых пилей. В целом трудно оценить точно общее количество тонких пилей, выявляемых АСМ. По измерениям, выполненным на клетках штамма ДТ *Synechocystis*, длина тонких пилей достигает 2 мкм, при этом толстые пили в среднем сравнимы по длине с тонкими. Согласно нашим сведениям функция тонких пилей до сих пор не известна. Для достоверной интерпретации данных АСМ-анализа клеток мутантов Pq17 и Pq17 S186::Km был дополнительно сконструирован мутант PilA1::Km с инсерционной инактивацией гена *pilA1*; клетки такого мутанта не должны образовывать Tfp.

Ни у подвижных клеток мутантов Pq17 и $\Delta prqR$, ни у неподвижных клеток двойного мутанта Pq17 S186::Km не выявлено отличий от клеток штамма ДТ в характере формирования и структуре Tfp (рис. 10). Эти данные подтверждают вывод о том, что гены *prqR* и *sll0886* контролируют не биогенез пилей, а их функционирование, возможно, в системах восприятия и передачи светового сигнала при фототаксисе.

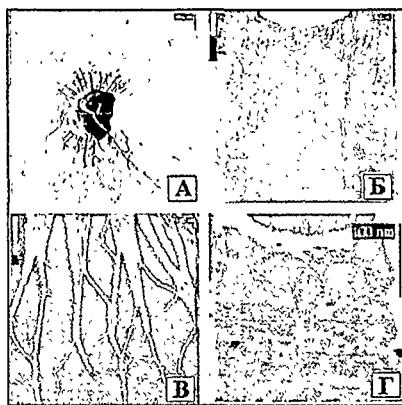


Рис. 9. Атомно-силовая микроскопия клеток штамма ДТ *Synechocystis*: (А) общий вид клетки; (Б) край клетки с толстыми пилиями, Tfp (отдельные нити с изгибами), и тонкими пилиями (в виде склеенных тонких нитей); (В) увеличенный участок изображения (Б) с тонкими пилиями; (Г) увеличенный фрагмент изображения (В) с филаментами, выходящими из тонких пилей.

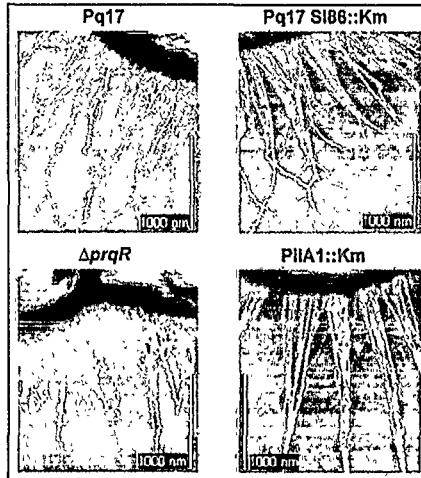


Рис. 10. Анализ с помощью атомно-силовой микроскопии морфологии пилей подвижных клеток мутантов *Pq17* и *ΔprqR*, а также неподвижных клеток мутантов *Pq17 SI86::Km* и *PilA1::Km* *Synechocystis*. Стрелки указывают на толстые пили, Tfp.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методами молекулярной генетики и функциональной геномики исследован кластер генов *sll0887-sll0886-prqR-prqA* цианобактерии *Synechocystis*. Получена новая информация о регуляторной функции гена *prqR* и характере экспрессии оперона *prqR-prqA*, вовлеченного в контроль устойчивости клеток к индуктору ОС MV. Показано, что авторепрессия гена *prqR*, стимулируемая MV (Бабыкин и др., 2003), не связана с наличием редокс-чувствительного остатка цистеина в белке PrqR. Однако доминантный характер мутации в гене *prqR* может свидетельствовать о наличии цис-действующей авторепрессии этого гена. Не исключено, что такой механизм авторегуляции гена *prqR* обеспечивает эффективное подавление его транскрипции при ОС, индуцируемом MV. Между тем установлено наличие дополнительного промотора, с которого осуществляется экспрессия гена *prqA*, необходимая для поддержания конститутивной устойчивости клеток к MV.

Важным условием выяснения природной функции оперона *prqR-prqA* у *Synechocystis* является идентификация его клеточного индуктора. В данной работе показано, что в ответ на солевой стресс на ранней стадии его развития происходит существенное повышение экспрессии оперона *prqR-prqA* в целом, а не только гена *prqR*, как сообщалось ранее. Это позволяет полагать, что белок PrqA, относящийся к недавно описанному семейству белков MATE, которые широко представлены в клетках растений, играет защитную роль в системе адаптации клеток к солевому стрессу. Однако, несмотря на наличие новой информации об адаптивном характере экспрессии оперона *prqR-prqA*, его истинный внутриклеточный индуктор и, соответственно, его основная функция в клетках цианобактерий остаются неясными и требуют дальнейшего исследования. При этом согласно имеющимся сведениям о роли белков MATE у бактерий и растений следует учитывать возможность вовлечения оперона *prqR-prqA* в контроль таких процессов, как нейтрализация ионов переходных металлов и защита от антибиотиков, синтезируемых в природных сообществах микроорганизмов.

Впервые выявлено участие генов *prqR* и *sll0886* в контроле фототаксиса цианобактерий, причем полученные в работе данные указывают на то, что эти гены вовлечены в два пути зависимой от света регуляции подвижности клеток. При этом не исключается, что ген *sll0886* вовлечен одновременно в контроль активируемого светом гетеротрофного роста и контроль отрицательного фототаксиса клеток. Вместе с тем установлено, что ген *prqR* участвует в регуляции генов, продукты которых необходимы для функционирования пилей, обеспечивающих подвижность клеток: негативную регуляцию оперона *pilA5-pilA6* и позитивную – гена *spkA* и оперона *pilA9-pilA10-pilA11-slr2018*.

При изучении поверхностных структур клеток цианобактерий был использован новый метод атомно-силовой микроскопии, имеющей ряд

существенных преимуществ по сравнению с традиционной растровой и просвечивающей электронной микроскопией. Данный метод успешно отработан в применении к различным штаммам *Synechocystis* и позволяет эффективно идентифицировать изменения в морфологии пилей, обеспечивающих подвижность клеток при фототаксисе. На основании результатов, полученных с помощью атомно-силовой микроскопии, подтвержден вывод о том, что гены *prqR* и *sll0886* контролируют не биогенез пилей, а их функционирование.

ВЫВОДЫ

У цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 исследовали кластер генов *sll0886-prqR-prqA*, в котором ген *prqR* негативно регулирует устойчивость клеток к индуктору окислительного стресса метилвиологену.

1. С помощью сайт-направленного мутагенеза и генетического анализа гена *prqR* установлено, что репрессорная функция белка PrqR обеспечивается как N-концевым ДНК-связывающим доменом, так и C-концевым доменом. Единственный остаток цистеина в C-концевом домене не влияет на функциональную активность белка PrqR.

2. Показано, что ген *prqA*, продуктом которого является предполагаемый Na^+ -зависимый антиporter метилвиологена, может транскрибироваться как с промотора оперона *prqR-prqA*, так и с собственного конститтивного промотора. Также выявлена индукция оперона *prqR-prqA* при обработке клеток хлоридом натрия, что указывает на возможность участия белка PrqA в адаптации клеток к солевому стрессу.

3. Обнаружено участие гена *prqR* в контроле фототаксиса клеток *Synechocystis*. Мутация L17Q в этом гене приводит к переключению фототаксиса с положительного на отрицательный. Показано, что ген *prqR* вовлечен в регуляцию экспрессии оперонов, продукты которых необходимы для функционирования пилей, обеспечивающих подвижность клеток: негативную регуляцию оперона *pilA5-pilA6* и позитивную – оперона *pilA9-pilA10-pilA11-slr2018*, а также гена *spkA*.

4. С помощью инсерционного мутагенеза выявлено, что в контроль фототаксиса вовлечен также ген *sll0886*, контролирующий активируемый светом гетеротрофный рост клеток.

5. У мутантов по генам *prqR* и *sll0886* не изменен биогенез пилей, что подтверждает участие этих генов в регуляции функционирования пилей, возможно, в системах восприятия и передачи светового сигнала при фототаксисе.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кирик И.А. Дифференциальная авторепрессия регуляторного гена *prqR*, контролирующего устойчивость к параквату у цианобактерии *Synechocystis* sp. РСС 6803 // Сборник тезисов международного симпозиума “Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология”. Москва, 2001. С. 76-78.
2. Кряжов С.В., Кирик И.А. Два типа авторепрессии гена *prqR*, негативно контролирующего устойчивость к индуктору окислительного стресса параквату у цианобактерии *Synechocystis* sp. РСС 6803 // Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов-2002”, Москва, 2002. С. 32-33.
3. Кирик И.А., Зинченко В.В., Бабыкин М.М. Мутационный анализ гена *prqR*, контролирующего устойчивость к метилвиологену // В приложении к журналу “Открытое образование”: Материалы XI Международной конференции и Дискуссионного научного клуба “Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии; ИТ + МЕ’2003”, Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, 2003. С. 46-48.
4. Кирик И.А., Зинченко В.В., Шестаков С.В., Бабыкин М.М. Транс- и цис-действующая авторепрессия гена *prqR* у цианобактерии *Synechocystis* sp. РСС 6803 // Молекулярная биология, 2003. т. 37(6). С. 1035-1044.
5. Кирик И.А., Зинченко В.В., Шпилев А.В., Бабыкин М.М. Исследование авторепрессорной функции гена *prqR* с применением технологии рекомбинантных ДНК и молекулярного клонирования // Научные труды МБЦ МГУ (Международного учебно-научного биотехнологического центра Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова) / Ред. Кол.: С.В. Шестаков и др. – М.: МАКС Пресс, 2003. С. 7-11.
6. Кирик И.А., Зинченко В.В., Шестаков С.В., Бабыкин М.М. Механизмы авторепрессии гена *prqR* у цианобактерии *Synechocystis* sp. РСС 6803 // Материалы III съезда ВОГИС “Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития”. Москва, 2004. т. 1. С. 338.
7. Dubrovin E. V., Kirik I. A., Babykin M. M., Yaminsky I. V. Atomic force microscopy study of pili in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. РСС 6803 // From cells to proteins: imaging nature across dimensions/ V. Evangelista, Barsanti, L., Passarelli, V., and P. Gualtieri (Eds.). Series: NATO Security through Science Series. Sub-Series B: Physics and Biophysics, 2005. V. 3. p. 405-414.
8. Кирик И. А., Бабыкин М. М. Ген, контролирующий устойчивость к метилвиологену, вовлеченный в регуляцию фототаксиса у цианобактерии *Synechocystis* sp. РСС 6803 // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием “Автотрофные микроорганизмы”. МАКС-ПРЕСС, Москва, 2005. С.41.
9. Babykin M.M., Kirik I.A., Nefedova L.N., Shestakov S.V. The *prqR* gene is involved in control of phototaxis in *Synechocystis* sp. РСС 6803 // International Meeting “Photosynthesis in the post-genomic era: structure and function of photosystems”. Pushchino, Moscow Region, Russia. 2006. p. 233.

Напечатано с готового оригинал-макета

Издательство ООО “МАКС Пресс”

Лицензия ИД N 00510 от 01.12.99 г.

Подписано к печати 06.10.2006 г.

Формат 60x90 1/16. Усл.печл. 1,5. Тираж 100 экз. Заказ 691.

Тел. 939-3890. Тел./Факс 939-3891.

**119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова,
2-й учебный корпус, 627 к.**

1006A
21807

F21807