

На правах рукописи

**ШУМСКАЯ
Мария Анатольевна**

**ДВУХКОМПОНЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ
ОТВЕТА ЦИАНОБАКТЕРИИ *SYNECHOCYSTIS* НА
ГИПЕРОСМОТИЧЕСКИЙ И СОЛЕВОЙ СТРЕССЫ**

03.00.12 – Физиология и биохимия растений

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук**

МОСКВА-2004

Работа выполнена в Лаборатории молекулярных основ внутриклеточной регуляции Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва и в Лаборатории клеточной регуляции Национального Института общей биологии, г. Оказаки, Япония.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор биологических наук, профессор Лось Дмитрий Анатольевич

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук

Новикова Галина Викторовна

доктор биологических наук

Еланская Ирина Владимировна

ВЕДУЩЕЕ УЧРЕЖДЕНИЕ:

Институт биоорганической химии
им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова

Защита состоится «1» июня 2004 г. в 13 часов на заседании Диссертационного совета К 002.210.01 при Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу:
127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (095) 977-80-18

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан «22» апреля 2004 г.

Учёный секретарь
Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

М.И. Азаркович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В ответ на стрессовые воздействия организмы регулируют экспрессию множества генов, что позволяет им адаптироваться к меняющимся условиям среды. Гены, экспрессия которых изменяется в результате стресса, в основном хорошо известны, однако механизмы восприятия и передачи стрессового сигнала до сих пор мало изучены. Известно, что у бактерий большую роль в восприятии и передаче стрессовых сигналов играют двухкомпонентные системы, состоящие из гистидин-киназ и регуляторов ответа (Egger et al., 1997; Wood, 1999).

Участие двухкомпонентных систем автотрофной цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 в регуляции ответа на абиотические стрессы до сих пор остается малоизученным. Известно, что гистидин-киназа 33 (Hik33) является сенсором холодового и гиперосмотического стрессов (Mikami et al., 2002). Кроме того, показано, что Hik33, а также Hik34, Hik16 и Hik41 являются сенсорами солевого стресса (Marin et al., 2003). Однако, регуляторы ответа, принимающие сигналы от этих гистидин-киназ, все еще оставались неизвестными.

Анализ экспрессии генов при стрессах у мутантов по регуляторам ответа и гистидин-киназам с помощью методов слот-блота и ДНК-микрочипов позволяет идентифицировать возможных участников двухкомпонентных систем, воспринимающих и передающих стрессовые сигналы.

Цели и задачи работы. Целью работы являлась идентификация двухкомпонентных систем регуляции, участвующих в восприятии и передаче сигналов при гиперосмотическом и солевом стрессах, в клетках *Synechocystis*. В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

1. Получение библиотеки мутантов, дефектных по генам, кодирующим регуляторы ответа.
2. Исследование экспрессии генов у мутантов под действием гиперосмотического и солевого стрессов.
3. Идентификация сенсорных гистидин-киназ и принимающих от них сигналы регуляторов ответа, отвечающих за экспрессию генов под воздействием гиперосмотического и солевого стрессов.

Научная новизна. Впервые идентифицированы регуляторы ответа, входящие в состав двухкомпонентных систем регуляции ответа на солевой и гиперосмотический стрессы. Предложена схема восприятия и

передачи сигналов при солевом и гиперосмотическом стрессах с участием пяти двухкомпонентных систем регуляции.

Научно-практическое значение. Полученные результаты могут быть использованы для дальнейшего изучения механизмов развития ответа на гиперосмотический и солевой стрессы. Идентификация компонентов, осуществляющих передачу сигналов в клетке, является одним из важнейших шагов на пути к пониманию молекулярных механизмов работы регуляторных систем организма.

Апробация работы. Материалы, вошедшие в диссертационную работу, были представлены на Международных симпозиумах по Молекулярной генетике и биотехнологии (Москва, 2001) по фототрофным прокариотам (Токио, 2003), на Всероссийском съезде генетиков (Москва, 2004), на Съезде японского общества физиологов растений (Токио, 2004).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 6 работ в отечественных и зарубежных изданиях.

Структура диссертации. Диссертация состоит из разделов: Введение, Обзор литературы, Объекты и методы исследований, Результаты и их обсуждение, Заключение, Выводы, Литература. Работа изложена на 90 страницах машинописного текста, включает 14 рисунков, 5 таблиц; список литературы включает 107 наименований.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы цианобактерий. Штаммы цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 были предоставлены Национальным Институтом Общей Биологии (NIBB, Окаэки, Япония) и Московским Государственным Университетом, кафедра Генетики. Мутантные штаммы $\Delta Rre1-42$ с инактивированными генами регуляторов ответа были получены путем сайт-специфического мутагенеза с использованием кассеты устойчивости к антибиотику спектиномицину (Sp) или канамицину (Km). Штаммы мутантов *Synechocystis* sp. PCC 6803 по гистидинкиназам Nik1-Nik43 также были предоставлены Национальным Институтом Общей Биологии (NIBB, Окаэки, Япония).

Конструирование рекомбинантных штаммов. Нами были сконструированы 24 рекомбинантных штамма *Synechocystis*, дефектных по генам, кодирующим регуляторы ответа. Амплификация фрагментов, включающих в себя гены регуляторов ответа с фланкирующими областями, проводилась из геномной ДНК *Synechocystis* при помощи соответствующих праймеров (нуклеотидные последовательности

приведены в диссертации) ДНК-полимеразой AmpliTaqGold (Perkin Elmer, США). Полимеразная цепная реакция (ПЦР) включала в себя предварительную денатурацию ДНК (2 мин, 95°C), и 30 циклов, состоящих из последовательных стадий: денатурации ДНК (1 мин, 95°C), отжига праймеров (1 мин, 55-57°C) и синтеза цепи ДНК (2 мин, 72°C); с последующим дополнительным синтезом цепи ДНК в течение 10 мин при 72°. Полученные в результате ПЦР фрагменты ДНК были клонированы в векторе pT7Blue-T/A (Novagen, США). Для мутантов $\Delta Rre18$, $\Delta Rre31$, $\Delta Rre37$ и $Rre39$ кассета устойчивости к спектиномицину была получена из плазмиды pAL (Prentki et al., 1984) Для остальных мутантов кассета устойчивости к канамицину была получена из плазмиды pUC4KIXX (Pharmacia). Кассеты были клонированы по сайтам рестрикции, находящимся в кодирующих районах генов (Рис. 1).

Рестрикция и лигирование ДНК проводились ферментами фирмы ТаKaRa (Япония) и Fermentas (Литва), согласно протоколам фирм-изготовителей.

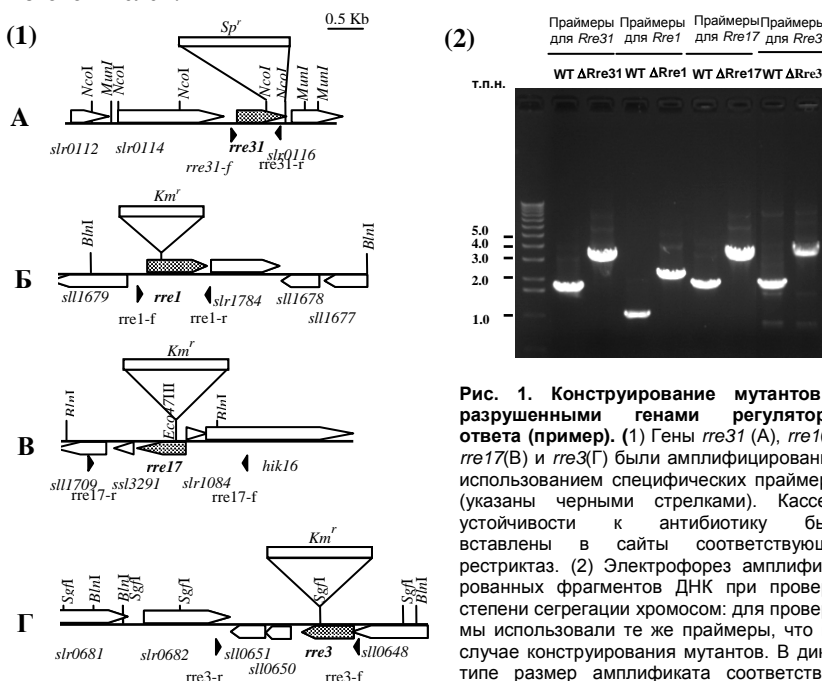


Рис. 1. Конструирование мутантов с разрушенными генами регуляторов ответа (пример). (1) Гены *rre31* (А), *rre1* (Б), *rre17* (В) и *rre3* (Г) были амплифицированы с использованием специфических праймеров (указаны черными стрелками). Кассеты устойчивости к антибиотику были вставлены в сайты соответствующих рестриктаз. (2) Электрофорез амплифицированных фрагментов ДНК при проверке степени сегрегации хромосом: для проверки мы использовали те же праймеры, что и в случае конструирования мутантов. В диком типе размер амплификата соответствует длине гена *rre*, а в мутанте он больше на 1400-1600 нуклеотидов, в зависимости от вставленной в него кассеты устойчивости к антибиотику.

Трансформация клеток цианобактерий. Трансформацию клеток *Synechocystis* проводили методом Вильямса (Williams, 1988). Клетки из 100 мл интенсивной культуры осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 2 мл среды BG11. К суспензии добавляли 5-10 мкг ДНК, инкубировали 4 ч в темноте, затем 10 ч на свету. После этого клетки высевали на чашки с агаризованной средой BG11, содержащей 5 мкг мл⁻¹ спектиномицина или канамицина. Первичные клоны последовательно пересеивали с увеличением концентрации антибиотика от 5 до 20 мкг мл⁻¹ (при селекции на спектиномицине) и до 25 мкг мл⁻¹ (при селекции на канамицине). Полученные рекомбинантные штаммы растили на среде, содержащей 20 мкг мл⁻¹ спектиномицина или 25 мкг мл⁻¹ канамицина.

Сегрегацию хромосом в мутантных штаммах Δ Rre проверяли ПЦР с использованием фермента ExTaq DNA Polymerase (TaKaRa). Условия реакции были следующими: предварительная денатурация ДНК (2 мин, 95°C); 30 циклов, состоящих из денатурации ДНК (1 мин, 95°C), отжига праймеров (1 мин, 55-57°C) и синтеза цепи ДНК (5-6 мин, 72°C); дополнительный синтез ДНК (10 мин, 72°C). Для проверки использовали пары праймеров, специфичных для каждого гена регулятора ответа. Информация о сконструированных мутантах доступна в сети Интернет (www.kazusa.or.jp/cyano/Synechocystis/mutant).

Условия культивирования. Культуры цианобактерий поддерживали на агаризованной среде BG11 (с содержанием агарозы 1,2 %), забуференной 20 mM HEPES-NaOH, pH 7,5 (Stainer et al., 1971) на чашках Петри при температуре 34°C и постоянном освещении люминесцентными лампами интенсивностью 70 мкМ квантов света м⁻²с⁻¹. Мутантные штаммы поддерживали на среде с добавлением спектиномицина до конечной концентрации 20 мкг мл⁻¹ или канамицина - до концентрации 25 мкг мл⁻¹.

Интенсивные культуры выращивали в сосудах в жидкой среде BG11, забуференной 20 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, при температуре 34°C, постоянном освещении лампами накаливания интенсивностью 70 мкМ квантов света м⁻²с⁻¹ и аэрации стерильной газо-воздушной смесью, обогащенной CO₂ до концентрации 1%. Клетки растили в данных условиях до ОП₇₃₀ = 0,3-0,4 (контрольные условия) и затем проводили эксперименты по солевому и гиперосмотическому стрессам.

Экспериментальные условия. Экспериментальные условия гиперосмотического стресса создавались добавлением к среде культивирования 5M раствора сорбита в среде BG11 до конечной концентрации 0,5M. Выбор данного вещества для создания

гиперосмотических условий связан с тем, что сорбит не токсичен для клеток, не проникает внутрь и не взаимодействует с клеточными рецепторами.

Экспериментальные условия солевого стресса создавали добавлением к среде культивирования 5М раствора NaCl в BG11 до конечной концентрации 0,5М. Длительность экспериментов составляла 20 мин.

Выделение РНК. Выделение общей клеточной РНК проводили согласно общепринятой методике. Для этого 50 мл суспензии клеток *Synechocystis* (ОП₇₃₀= 0,3-0,4) фиксировали с помощью добавления равного объема охлажденного этанола, содержащего 5% фенола. Клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 3000 об мин⁻¹ при 4°C (центрифуга К-23, Германия). Осадок ресуспендировали в 1 мл буфера TE 50/100 (50 mM Трис-НСl, рН 7.5, 100 mM ЭДТА), переносили в пробирки типа эппендорф, осаждали центрифугированием, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C. Перед выделением нуклеиновых кислот осадок ресуспендировали в 0,6 мл STE (50 mM Трис-НСl, рН 8, 5 mM ЭДТА, 50 mM NaCl, 0,5 % SDS) буфера и инкубировали с 0,55 мл фенола, насыщенного TE, 10 мин при 65°C. Затем смесь центрифугировали в течение 3-5 мин, супернатант отделяли и трижды обрабатывали смесью фенола с хлороформом (1:1). Нуклеиновые кислоты осаждали двойным объемом этанола, растворяли в воде и обрабатывали свободной от РНКазы ДНКазой I (Nippon Gene, Япония), согласно рекомендациям производителя, для освобождения от геномной ДНК, после чего дважды обрабатывали смесью фенола, хлороформа и изоамилового спирта (25:24:1). РНК осаждали из раствора двойным объемом этанола.

Слот-блот гибридизация. В экспериментах использовали по 10 мкг общей клеточной РНК, денатурированной при 65°C 10 мин. РНК наносили на нейлоновую мембрану Hybond N (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция) с помощью вакуумного аппарата PR 648 Slot Blot Filtration Manifold (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция), согласно рекомендациям производителя.

Мембрану с нанесенной РНК гибридизовали с несколькими зондами. В качестве зондов использовались ПЦР-продукты генов, индуцируемых исследуемыми стрессами. В случае солевого стресса использовали *slr1544*, *dnaK-2* (*sl10170*), *slr0967* и *htrA* (*slr1204*), в случае гиперосмотического стресса помимо названных зондов использовали также *hspA* (*sl11514*) и *fabG* (*sl10330*). Изготовление меченого зонда, гибридизацию и отмывку мембраны проводили с помощью набора AlkPhos Direct Labelling and Detection System with CDP-star (Amersham

Pharmacia Biotech, Швеция), согласно рекомендациям производителя. Детекцию сигнала производили с помощью люминисцентного анализатора LAS-1000 (Fuji Photo Film, Япония).

Нозерн-блот гибридизация. В экспериментах использовали по 15 мкг общей клеточной РНК, которую денатурировали, а затем разделяли электрофорезом в 1,2%-агарозном геле, содержащем формальдегид, и переносили на нейлоновую мембрану Hybond N (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). Приготовление меченого зонда, гибридизацию, отмывку мембраны и детекцию сигнала проводили так же, как и в экспериментах по слот-блот гибридизации. Для контроля равномерности нанесения образцов на мембрану проводили гибридизацию с генами 16S рибосомальной РНК (*16S rRNA*) и субъединицы В РНКазы Р (*mpB*).

Анализ экспрессии генов с помощью ДНК-микрочипов (DNA microarray). Для реакции обратной транскрипции использовали следующую реакционную смесь: 100 ед. обратной транскриптазы AMV Reverse Transcriptase XL (TaKaRa Co. Ltd., Киото, Япония), 1x реакционный буфер, смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов с низким содержанием dCTP (2 mM dCTP, 5 mM dTTP, 5 mM dGTP, 5 mM ATP), 3 mM Су3-dCTP (или Су5-dCTP), (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция), 300 пМ случайного гексамерного праймера, 100 ед. ингибитора РНКаз (RNasin I, TaKaRa Co. Ltd., Киото, Япония), 20 мкг общей РНК. Су3 и Су5 – флуорофоры с различными спектрами поглощения и эмиссии. РНК, выделенную из контрольного образца, метили Су5-dCTP, выделенную из экспериментального образца - Су3-dCTP. Реакцию обратной транскрипции проводили при 42°C 2 ч. Не включившиеся в цепь кДНК нуклеотиды удаляли путем гель-фильтрации на колонках Centri-Sep (Princeton Separations, США) (Kanesaki et al., 2002; Yamaguchi et al., 2002). Полученную меченую кДНК освобождали от РНК щелочным гидролизом (200 mM NaOH 40 минут при 65°C) с последующей нейтрализацией щелочи 3 М ацетатом натрия (рН 5,5) и переосаждением этанолом (Heller et al., 1997; Ye et al., 2000).

Цианочипы версии 1.4 (CyanoCHIP v. 1.4) были предоставлены компанией TaKaRa. Микрочипы прегибридизовали в буфере, содержащем, 4x SSC, 0,2% SDS, 5x раствор Денхардта, 100 нг мл⁻¹ ДНК спермы лосося, при температуре 65°C 1 ч. Гибридизацию проводили при тех же условиях в течение 12 ч. Гибридизованные чипы отмывали в 2x SSC (1x SSC содержит 150 mM NaCl и 15 mM цитрата натрия) при комнатной температуре, 2x SSC 10 мин при 60°C, затем в 0,2x SSC и

0,1% SDS 10 мин при 60°C и в 0,2 x SSC 2 мин при комнатной температуре.

Микрочипы сканировали на сканере GMS418 (Affimetrix, США) с последующим анализом интенсивности сигналов индивидуальных генов при помощи программы AutoGene V. 4.1 software (BioDiscovery, Лос-Анджелес, США). Интенсивность сигнала каждого гена нормализовали по сумме интенсивностей сигналов всех генов за исключением генов рРНК. Затем рассчитывали изменения в количестве транскрипта каждого гена по отношению к общему уровню мРНК. Все эксперименты проводили в двух повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование библиотеки мутантов, дефектных по генам регуляторов ответа. Для идентификации регуляторов ответа, принимающих участие в двухкомпонентных системах, которые контролируют ответ на солевой и гиперосмотический стрессы, мы создали библиотеку мутантов, дефектных по генам *rre1-rre42*.

Всего геноме *Synechocystis* было найдено 45 генов регуляторов ответа (42 гена в хромосоме и 3 – в плаزمиде цианобактерии). Восемнадцать штаммов, дефектных по генам, кодирующим регуляторы ответа, были получены на Кафедре генетики МГУ (Москва). Нами было завершено конструирование делеционных мутантов по регуляторам ответа, закодированным в хромосоме.

Нам удалось успешно инактивировать практически все гены *rre*. Исключение составили гены *rre23*, *rre25* и *rre26*. В случае генов регуляторов ответа 23 и 26 нам не удалось достичь полной сегрегации хромосомом цианобактерии, и у мутантов всё ещё оставались копии гена дикого типа. В случае гена *rre25* мутанта получить не удалось. Это говорит о том, что данные гены являются необходимыми для жизнедеятельности *Synechocystis* в нормальных условиях.

Анализ экспрессии генов мутантов по Rre при солевом и гиперосмотическом стрессе с помощью слот-блот и нозерн-блот гибридизации. Для того чтобы идентифицировать регуляторы ответа, принимающие участие в передаче сигнала солевого и гиперосмотического стресса на соответствующие гены стрессовых ответов, мы провели скрининг библиотеки мутантов под воздействием стрессов методом слот-блот гибридизации. В качестве гибридизационных зондов использовали фрагменты генов, индуцируемых солевым и гиперосмотическим стрессами у дикого типа. Мы выбрали гены *slr0967*, *slr1544*, *htrA* и *dnaK-2*, в случае

гиперосмотического стресса использовали также *hspA* и ген *fabG*, который индуцируется только гиперосмотическим стрессом (Рис. 2, 3).

dnaK-2



slr1544



slr0967



htrA

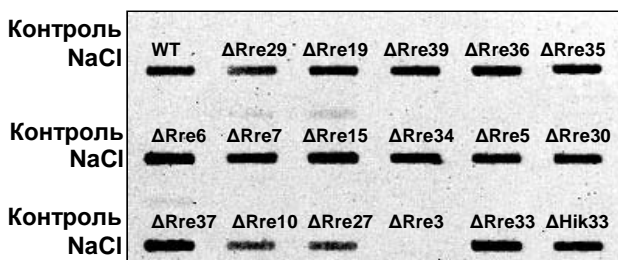
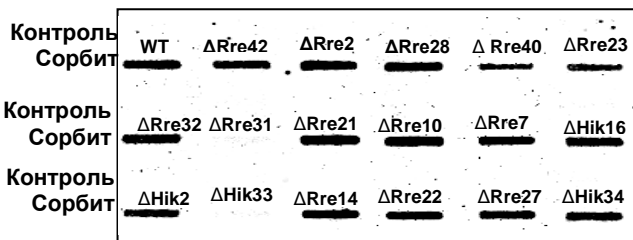
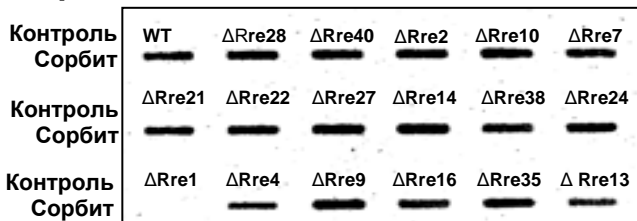


Рис. 2. Слот-блот анализ экспрессии генов у мутантов по регуляторам ответа при солевом стрессе. WT - дикий тип; Δ Rre№ – мутанты по регуляторам ответа.

fabG



hspA



slr0967



16S rRNA

(пример)

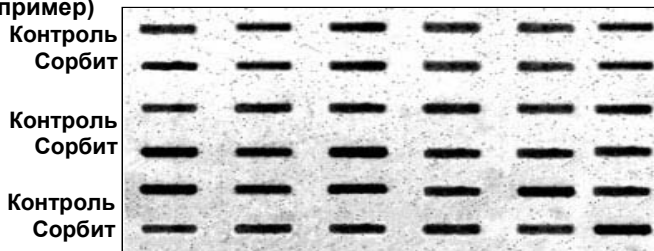


Рис. 3. Слот-блот анализ экспрессии генов у мутантов по регуляторам ответа при гиперосмотическом стрессе. WT- дикий тип; $\Delta RreN$ – мутанты по регуляторам ответа.

При гибридизации образцов РНК с зондом *dnaK-2* было обнаружено, что под действием солевого и гиперосмотического стрессов почти у всех мутантов экспрессия этого гена была на том же уровне, что и у дикого типа.

Исключение составлял мутант $\Delta Rre1$, у которого индукция экспрессии этого гена не наблюдалась (рис.2). Это означает, что продукт гена *rre1* необходим для индукции экспрессии *dnaK-2* при солевом и гиперосмотическом стрессе.

Известно, что индукция *dnaK-2* при солевом стрессе также контролируется гистидин-киназой Hik34 (Marin et al., 2003). На этом этапе исследований был сделан вывод, что, по-видимому, Hik34 и Rre1 составляют единую двухкомпонентную систему, необходимую для передачи сигнала солевого стресса и индукции экспрессии гена *dnaK-2*. Поскольку при гиперосмотическом стрессе в мутанте $\Delta Rre1$ индукция *dnaK-2* также отсутствует (не показано), мы предположили, что двухкомпонентная система Hik34/Rre1 также участвует в ответах клетки на гиперосмотический стресс.

При гибридизации мембран с зондом *slr1544* было обнаружено, что экспрессия этого гена при солевом стрессе отсутствует у мутанта $\Delta Rre31$. Предположительно, Rre31 является партнером Hik33, контролирующей экспрессию гена *slr1544* при солевом стрессе (Marin et al., 2003). При гиперосмотическом стрессе $\Delta Rre31$ отсутствует экспрессия гена *fabG*, контролируемого в этих условиях Hik33 (Kanesaki et al., 2002). По-видимому, пара Hik33/Rre31 является единой двухкомпонентной системой, регулирующей ответы на солевой и гиперосмотический стрессы.

Аналогичные выводы были сделаны для Rre17, у которого отсутствовала экспрессия гена *slr0967* при обоих стрессах, и пары гистидин-киназ Hik16/Hik41, которые регулируют экспрессию этого гена в условиях солевого стресса (Marin et al., 2003). По-видимому, Hik16/Hik41 и Rre17 могут составлять одну регуляторную систему, контролирующую индукцию экспрессии гена *slr0967*.

При скрининге мутантов по Rre с использованием зонда *htrA*, мы обнаружили отсутствие экспрессии этого гена у мутанта $\Delta Rre3$, однако гистидин-киназа, контролирующая экспрессию этого гена, была на тот момент неизвестна.

Поиск гистидин-киназы - партнера для Rre3. Для поиска гистидин-киназы – партнера Rre3, мы воспользовались результатами экспериментов с дрожжевой двугибридной системой (Tabata, 2003; Sato et al., 2003), позволяющей экспериментально выявить возможные белок-белковые взаимодействия. Эта система была недавно разработана для

белков *Synechocystis* в Институте исследования ДНК (Kazusa DNA Research Institute, Япония). Согласно результатам, полученным с применением этой системы, белком, взаимодействующим с белком Rre3, может являться Hik10.

Нозерн-блот анализ. Для подтверждения предположения о возможном партнерстве Rre1/Hik34, Rre17/Hik16/Hik41, Rre31/Hik33 и Rre3/Hik10, был проведен нозерн-блот анализ экспрессии индуцируемых стрессом генов у мутантов по исследуемым гистидин-киназам и регуляторам ответа. В качестве гибридизационных проб использовали фрагменты тех же генов, которые мы применяли в экспериментах по слот-блоту. Результаты нозерн-блоттинга полностью подтвердили предположение о том, что Rre1/Hik34, Rre17/Hik16/Hik41, Rre31/Hik33 и Rre3/Hik10 являются партнерами, составляющими пять двухкомпонентных систем, которые принимают участие в регуляции ответа на солевой и гиперосмотический стресс.

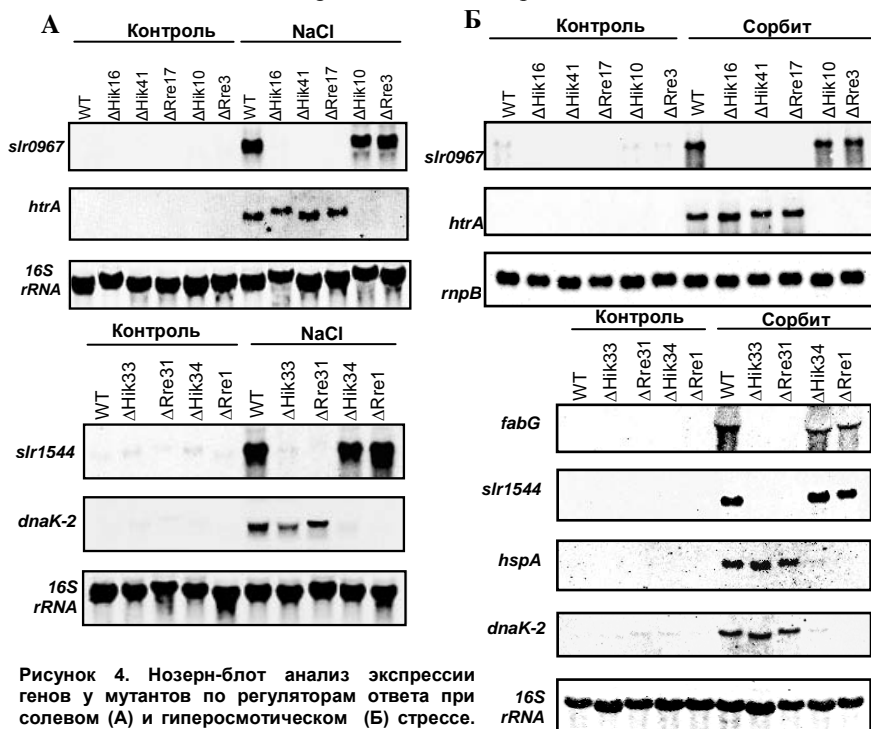


Рисунок 4. Нозерн-блот анализ экспрессии генов у мутантов по регуляторам ответа при солевом (А) и гиперосмотическом (Б) стрессе. WT- дикий тип; ΔRre№ – мутанты по регуляторам ответа, ΔHik№ - мутанты по гистидин-киназам

Анализ экспрессии генов мутантов по Rre при солевом и гиперосмотическом стрессе с помощью ДНК-микрочипов. Для выявления всего спектра генов, контролируемых найденными нами двухкомпонентными системами, экспрессия генов при солевом и гиперосмотическом стрессе у мутантов по Hik и Rre была исследована с помощью ДНК-микрочипов. Полученные результаты можно суммировать следующим образом (полные данные приведены в диссертации):

1. Профили экспрессии генов при солевом и гиперосмотическом стрессах в мутантах $\Delta Rre31$ и $\Delta Hik33$ совпадают. В этих мутантах при солевом стрессе не индуцируется экспрессия 7 генов, среди которых гены *hliA*, *hliB*, *hliC* и ген, кодирующий альтернативный сигма-фактор РНК-полимеразы, *sigD*. При солевом стрессе Rre31 и Hik33 регулируют одни и те же гены и, следовательно, составляют одну двухкомпонентную систему. При гиперосмотическом стрессе в этих мутантах не индуцируется экспрессия 12 генов: шести генов, индуцируемых соевым стрессом, и шести генов, индуцируемых только гиперосмотическим стрессом (например, *fabG*). При гиперосмотическом стрессе Rre31 и Hik33 также регулируют одни и те же гены и составляют одну двухкомпонентную систему.

2. Профили экспрессии генов в мутантах $\Delta Rre1$ и $\Delta Hik34$ совпадают лишь частично. В мутанте $\Delta Rre1$ при солевом стрессе не наблюдается индукция 21 гена, находящегося также под контролем Hik34. В эту группу входят гены *hspA*, *dnaK-2*, *groEL1* (индуцируемые также и при тепловом стрессе) и другие. На основании этого можно заключить, что Hik34 и Rre1 составляют одну двухкомпонентную систему.

Однако, в условиях солевого стресса $\Delta Rre1$ нарушена также индукция 5 генов, для которых сенсорная гистидин-киназа неизвестна - например, *sigB*, кодирующий сигма-фактор РНК-полимеразы. Вероятно, Rre1 способен взаимодействовать не только с Hik34, но и с другой какой-то другой гистидин-киназой, что даёт ему возможность регулировать экспрессию разных групп генов. Данные, полученные с использованием дрожжевой двугибридной системы показывают, что вероятным партнером Rre1 может являться Hik2. К сожалению, инактивация гена *hik2* у мутанта $\Delta Hik2$, который мы использовали в работе, оказалась неполной - в хромосоме мутанта всё еще присутствует копия гена дикого типа (соотношение копий мутантного гена к копиям гена дикого типа по данным ПЦР-анализа составляет 3:7). Благодаря наличию работающих копий гена *hik2* мутант

демонстрировал фенотип дикого типа. В связи с этим мы можем лишь предполагать, что вероятным партнером для Rre1 может являться Hik2.

В условиях гиперосмотического стресса под контролем двухкомпонентных систем Hik34/Rre1 и предполагаемой Hik2/Rre1 находятся 17 и 5 генов, соответственно. Некоторые из них перекрываются с генами, находящимися под контролем этой системы в условиях солевого стресса.

3. У мутантов $\Delta Rre17$ и $\Delta Hik16/\Delta Hik41$ при солевом и гиперосмотическом стрессе нарушена индукция двух генов – *slr0939* и *slr0967*. На основании этого можно сделать вывод о том, что Rre17 и пара Hik16/Hik41 являются единой регуляторной системой, контролирующей экспрессию этих двух генов при обоих стрессах.

4. У мутантов $\Delta Rre3$ и $\Delta Hik10$ при солевом и гиперосмотическом стрессах нарушена индукция гена *htrA*. Это означает, что Rre3 и Hik10 составляют одну двухкомпонентную систему, регулиующую экспрессию этого гена при обоих стрессах.

Кроме того, обнаружено, что индукция большой группы генов при стрессах не изменилась у исследуемых мутантов. Среди генов этой группы – индуцируемые обоими стрессами *glpD* и *ggpS*, продукты которых принимают участие в метаболизме глицерина, необходимого для адаптации клетки к стрессовым условиям; *rlpA*, индуцируемый при гиперосмотическом стрессе; индуцируемый солевым стрессом *ndhR*, кодирующий важный транскрипционный регулятор. Это означает, что в регуляции экспрессии всех этих генов принимают участие еще не найденные нами двухкомпонентные системы. Возможно также, что их экспрессия управляется неизвестным механизмом, не связанным с двухкомпонентными системами. Общая схема регуляции ответа на солевой и гиперосмотический стресс у *Synechocystis* представлена на Рис. 4.

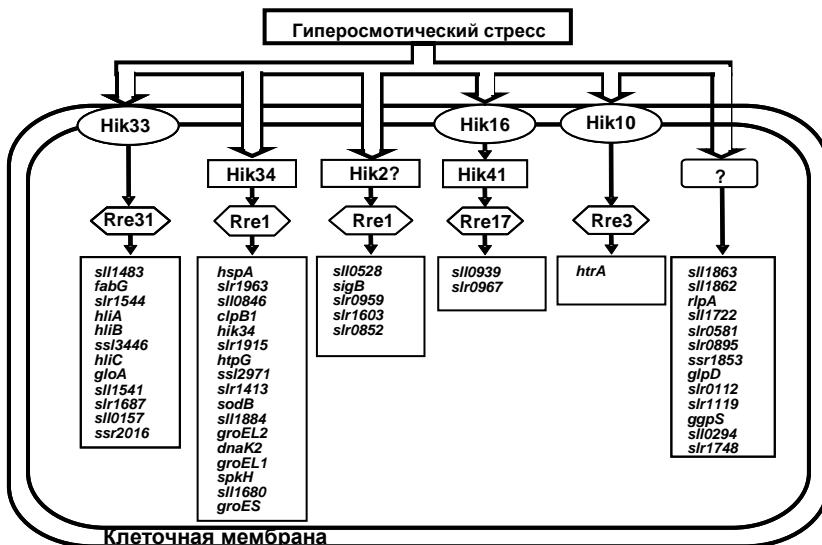
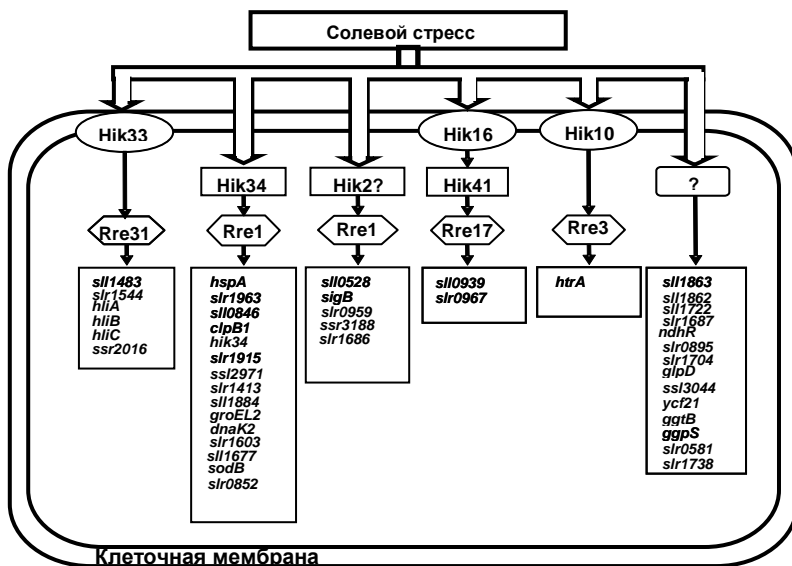


Рис. 4. Двухкомпонентные системы регуляции ответа на солевой и гиперосмотический стресс. Гипотетическая схема взаимодействия Hik и Rre.

Взаимодействие регуляторных систем, контролирующих экспрессию генов при солевом и гиперосмотическом стрессах. Из вышеприведенных данных можно заключить, что регуляцию ответа на солевой и гиперосмотический стрессы осуществляют пять двухкомпонентных систем: Hik33/Rre31, Hik34/Rre1, Hik10/Rre3 и Hik16/Hik41/Rre17. Однако, данные, полученные с применением ДНК-микрочипов, свидетельствуют о том, что при солевом и гиперосмотическом стрессах эти двухкомпонентные системы регулируют разные группы генов. Сравнение генов, находящихся под контролем двухкомпонентных систем при этих двух стрессах, представлено на Рис. 5.

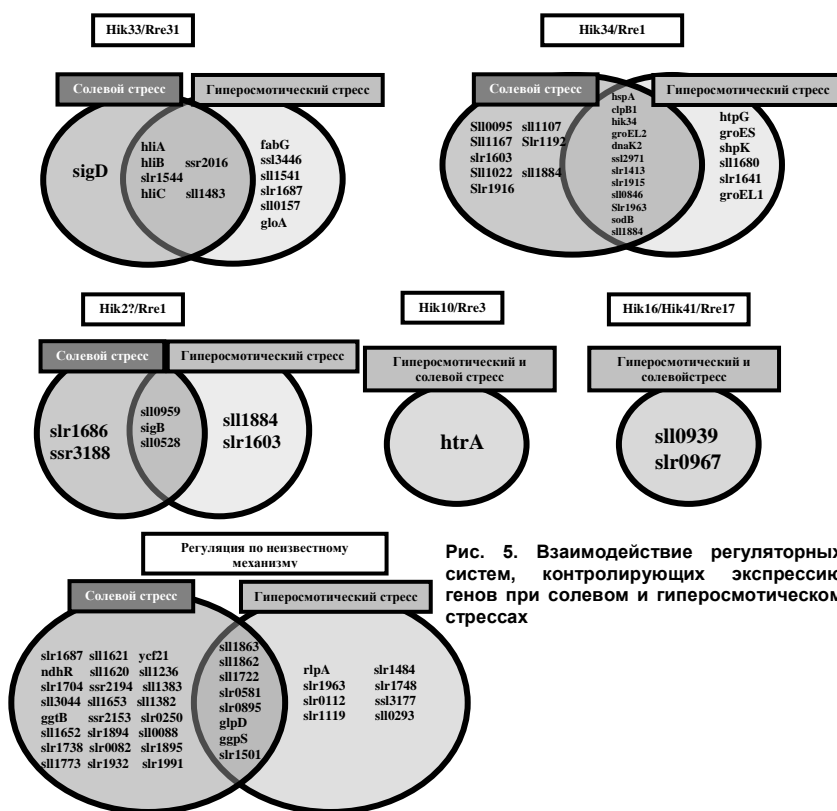


Рис. 5. Взаимодействие регуляторных систем, контролирующих экспрессию генов при солевом и гиперосмотическом стрессах

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате скрининга библиотеки мутантов, дефектных по регуляторам ответа, под действием солевого и гиперосмотического стресса нам удалось найти недостающие звенья в цепях двухкомпонентных систем, контролирующих ответ на эти стрессы – Rre1, Rre3, Rre17, Rre31.

С помощью ДНК-микрочипов мы исследовали генную экспрессию при солевом стрессе у мутантов по регуляторам ответа и гистидинкиназам, являющихся сенсорами солевого стресса (Marin et al., 2003). Таким образом, установлено, что регуляторы ответа составляют с гистидин-киназами следующие двухкомпонентные системы: Hik33/Rre31, Hik16/Hik41/Rre17, Hik34/Rre1, Hik2/Rre1 и Hik10/Rre3. Возможная связь Rre1 с двумя различными гистидин-киназами, Hik34 и Hik2, позволяет предположить, что гистидин-киназы и регуляторы ответа не являются жесткими парами. Один регулятор ответа может взаимодействовать с несколькими гистидин-киназами и наоборот.

Совокупность полученных данных позволяет утверждать, что гиперосмотический и солевой стрессы воспринимаются одними и теми же двухкомпонентными системами. Однако различия в группах генов, регулируемых этими системами, означают, что эти сенсорные системы дифференцируют сигналы солевого и гиперосмотического стресса. Тем не менее, регуляция двухкомпонентными системами при разных стрессовых воздействиях сходных групп генов предполагает наличие универсальной общей компоненты в восприятии солевого и гиперосмотического стрессов. Возможно - это изменение физических свойств мембраны, связанное с уменьшением объема клеток на начальных стадиях солевого и гиперосмотического стрессов, что может являться сигналом активации мембранных гистидин-киназ Hik33, Hik16 и Hik10. Цитоплазматическая гибридная гистидин-киназа Hik41, по-видимому, принимает сигнал от Hik16 и передает его на Rre17, а сигналом активации внутриклеточной Hik34, вероятно, могут служить цитоплазматические факторы.

Двухкомпонентные системы, исследованные в нашей работе, контролируют только часть генов, индуцируемых солевым и гиперосмотическим стрессами. Это говорит о том, что на данном этапе мы обнаружили не все двухкомпонентные системы регуляции и, кроме того, множество генов может регулироваться без участия двухкомпонентных систем. Механизмы регуляции экспрессии этих генов требуют дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

1. Создана библиотека делеционных мутантов *Synechocystis*, дефектных по генам, кодирующим регуляторы ответа (Rre).
2. Идентифицированы регуляторы ответа, контролирующие экспрессию генов, индуцируемых при солевом и гиперосмотическом стрессе.
3. Идентифицированы 5 двухкомпонентных систем восприятия и передачи сигналов при солевом и гиперосмотическом стрессах: Hik33/Rre31, Hik16/Hik41/Rre17, Hik34/Rre1, Hik2/Rre1 и Hik10/Rre3.
4. Эти двухкомпонентные системы воспринимают сигналы солевого и гиперосмотического стрессов, но распознают их как различные сигналы.
5. Возможная связь Rre1 с двумя различными гистидин-киназами, Hik34 и Hik2, позволяет предположить, что гистидин-киназы и регуляторы ответа не являются жёсткими парами. Один регулятор ответа может взаимодействовать с несколькими гистидин-киназами и наоборот.
6. Предложена схема восприятия и передачи сигналов при солевом и гиперосмотическом стрессах с участием пяти двухкомпонентных систем регуляции.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Shoumskaya M.**, Lyukevich A., Bedbenov V.S., Los D.A. (2001) Fingerprinting of *Spirulina* genome after gamma irradiation. Abstr. Internat. Symp. on Molecular genetics and Biotechnology, Moscow, Russia, November 22-24, 2001. p. 136
2. **Shoumskaya M.**, Suzuki S., Shapiguzov A., Piven I, Zinchenko V.V., Los D.A., Murata N. (2003) A mutant library of response regulators in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. Abstr. 11th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Tokyo, Japan, August 24-29, 2003. p. 135.
3. Kanesaki Y., Yamamoto H., Paithoonrangsarid K., **Shoumskaya M.**, Suzuki I., Murata N. (2004) Four histidine kinases are main sensors of hydrogen peroxide-stress signals in *Synechocystis*" Abstr. 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists, Tokyo, Japan, March, 27-29, 2004. p. s53
4. Paithoonrangsarid K., **Shoumskaya M.**, Kanesaki Y., Los D., Zinchenko V., Sato S., Tanticharoen M., Suzuki I., Mikami K., Murata N. (2004) Two-component system involved in hyperosmotic signal transduction in *Synechocystis* sp. PCC6803" Abstr. 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists, Tokyo, Japan, March, 27-29, 2004. p. s53
5. **Шумская М.**, Шапигузов А., Сузуки Ш., Зинченко В.В., Мурата Н., Лось Д.А. (2004) Библиотека мутантов по респонс-регуляторным белкам цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. Тезисы Докл. Симпозиума «Генетика и селекция микроорганизмов» в рамках 3-го съезда ВОГИС, Москва, Россия, 7 июня 2004 г.
6. Paithoonrangsarid K., **Shoumskaya M.**, Kanesaki Y., Yamamoto H., Los D.A., Zinchenko V., Satoh S., Tanticharoen M., Mikami K., Suzuki I., Murata N. (2004) Five histidine kinases perceive osmotic stress and regulate distinct sets of genes in *Synechocystis*. *J. Biol. Chem.* 279: 53078-53086.
7. **Shoumskaya M.A.**, Paithoonrangsarid K., Kanesaki Y., Los D.A., Zinchenko V.V., Tanticharoen M., Suzuki I., Murata N. (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.* 280: 21531-21538.