ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ им. К.А. ТИМИРЯЗЕВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

БАИК

Алина Святославовна

Характеристика пролин-специфичной аминопептидазы из одноклеточной цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803

(03.01.05 – физиология и биохимия растений)

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель –
кандидат биологических наук
Пожидаева Елена Станиславовна

Москва – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

стр.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 6

ВВЕДЕНИЕ **8**

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ **16**

1.1. Роль протеолиза в клетке 16

1.1.1. Классификация пептидаз 16

1.1.2. Типы протеолиза белков 17

1.1.3. Пептидазы цианобактерий 20

1.1.3.1. Аминопептидазы 27

1.1.3.2. Пролиновые аминопептидазы 31

1.2. Роль N-концевых аминокислотных остатков в биогенезе белков 39

1.2.1. Правило N-концевой последовательности в клетках фотосинтезирующих эукариот 42

1.2.2. Правило N-концевой последовательности в клетках прокариот 47

1.3. Цианобактерия как модельный объект исследования 51

1.3.1. Структура цианобактериальной клетки 53

1.3.2. Светособирающий комплекс (фикобилисомы) цианобактерий 57

1.3.3. Фикобилисомы цианобактерий в условиях стресса 61

Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ **64**

2.1. Бактериальные штаммы и плазмиды 64

2.2. Питательные среды и условия культивирования микроорганизмов 64

2.3. Питательная среда, лишённая азота 65

2.4. Количественный анализ пигментов 67

2.5. Биоинформационный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей 68

2.5.1. Базы данных и инструменты их анализа 68

2.5.2. Построение филогенетических деревьев и компьютерное моделирование трёхмерной структуры белка PepP *Synechocystis* 69
2.6. Анализ нуклеиновых кислот 71
2.6.1. Выделение геномной ДНК из клеток *Synechocystis* 71
2.6.2. Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli* щелочным методом 71
2.6.3. Электрофорез ДНК в агарозном геле 72
2.6.4. Очистка фрагментов ДНК из геля или реакционных смесей 72
2.6.5. Выделение тотальной РНК из *Synechocystis* 73
2.6.6. Электрофорез РНК в агарозном геле 74
2.6.7. Определение количества и оценка качества препаратов нуклеиновых кислот 74
2.6.8. ОТ-ПЦР 75
2.6.8.1. Обработка РНК-содержащих образцов ДНКазой I 75
2.6.8.2. Синтез кДНК 76
2.6.8.3. Полимеразная цепная реакция 77
2.6.9. Рестрикция ДНК 78
2.6.10. Секвенирование ДНК 79
2.7. Клонирование фрагментов ДНК в плазмидные вектора 79
2.7.1. Приготовление компетентных клеток *E. coli* кальциевым методом 80
2.7.2. Трансформация *E. coli* 80
2.8. Трансформация клеток *Synechocystis* 81
2.9. Световая микроскопия в проходящем свете 81
2.10. Трансмиссионная электронная микроскопия 82
2.11. Выделение белков и белковых комплексов цианобактерий 83
2.11.1. Выделение фракции растворимых белков из клеток *Synechocystis* 83
2.11.2. Выделение тилакоидных мембран из клеток *Synechocystis* 83
2.11.3. Выделение фикобилисом из клеток *Synechocystis* 84
2.11.4. Количественное определение содержания белка 85
2.12. Анализ образцов белков методом электрофореза 87

2.12.1. Нативный ПААГ электрофорез 87
2.12.2. Голубой нативный ПААГ электрофорез 88
2.12.3. Двумерный (2DE) электрофорез белков 89
2.12.4. Электрофорез белков в денатурирующих условиях 90
2.12.5. Окрашивание белковых гелей раствором коллоидного Кумасси-G ... 91
2.12.6. Негативное окрашивание белковых гелей 92
2.13. MALDI-TOF анализ 92
2.14. Экспрессия белка PepP *Synechocystis* 92
2.15. Очистка рекомбинантного белка 93
2.15.1. Удаление GST-последовательности 93
2.16. Полусухой перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану 94
2.17. Иммунохимический анализ 94
2.18. Анализ протеолитической активности белка pepP *in vitro* 95
2.18.1. Гидролиз флуоресцентного субстрата 95
2.18.2. Влияние температуры и pH 96
2.18.3. Влияние ионов двухвалентных металлов 96
2.18.4. Влияние ингибиторов 96
2.18.5. Гидролиз азоказеина 97
2.19. Статистический анализ 97
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 98
3.1. Характеристика гена *sll0136* с использованием биоинформационных ресурсов 98
3.2. Анализ протеолитических свойств и субстратной специфичности белка PepP 105
3.2.1. Получение чистого препарата рекомбинантного белка PepP 105
3.2.1.1. Получение экспрессионной конструкции pET-41a(+)-*sll0136* 105
3.2.2. Очистка рекомбинантного белка PepP 108
3.3. Анализ природы протеолитической активности белка PepP *in vitro* 113

3.4. Компьютерное моделирование трёхмерной структуры белка PepP 122
3.4.1. Создание моделей аминопептидазы P 122
3.4.2. Структура доменной организации белка PepP 123
3.4.3. Взаимодействие PepP с марганцем 124
3.4.4. Взаимодействие PepP с субстратом и продуктом 126
3.4.5. Свойства поверхности и интерфейс димеризации белка PepP 127
3.5. Получение мутантного штамма Δ*pepP Synechocystis* с инактивированным геном *sll0136* 131
3.6. Физиологический анализ клеток мутантного штамма *ΔpepP Synechocystis*.....137
3.6.1. Аминопептидаза PepP вовлечена в регуляцию скорости роста и размера клеток 137
3.6.2. В клетках, дефектных по аминопептидазе PepP, изменена структура и распределение тилакоидных мембран.....145
3.6.3. Инактивация гена *pepP Synechocystis* привела к изменению соотношения фотосистем (ФСII/ФСI) в тилакоидах 150
3.6.4. Аминопептидаза PepP вовлечена в регуляцию уровня белков фикобилисом у *Synechocystis*.....153
3.6.5. У мутанта *ΔpepP* изменён профиль фракции растворимых белков 160
3.6.6. Аминопептидаза PepP не участвует в адаптации клеток *Synechocystis* к дефициту азота.....162
3.7. Потенциальные прямые субстраты для аминопептидазы PepP.....164
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 166
ВЫВОДЫ 173
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 174
ПРИЛОЖЕНИЕ.....212

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

а. о. – аминокислотные остатки

АРР – аминопептидаза Р, Х-пролил-аминопептидаза

АФЦ – аллофикоцианин

ДДС – додецилсульфат натрия

ДДС-ПААГ – электрофорез белков в денатурирующих условиях

ДДТ – дихлордифенилтрихлорэтан

ДМ – n-додецил-β-D-мальтозид

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК/РНК – дезоксирибонуклеиновая/рибонуклеиновая кислота

ДНКаза/РНКаза – дезоксирибонуклеаза/рибонуклеаза

дНТФ – дезоксирибонуклеозидтрифосфат

ИПТГ – изопропил-b-тиогалактопиранозид

КАР – каротиноиды

МАР – метониновая аминопептидаза

МРР – митохондриальная процессирующая пептидаза

ОП – оптическая плотность

ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией

п. н. – пары нуклеотидов

ПААГ– полиакриламидный гель

ССК – светособирающий комплекс

ТЕМЕД – N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин

ТХУ – трихлоруксусная кислота

ФИТЦ – зелёный флуоресцентный краситель флюороизотиоционат

ФНР – ферродоксин-НАДФ-редуктаза

ФСI – фотосистема 1

ФСII – фотосистема 2

ФЦ/С-ФЦ – С-фикоцианин

$ХЛ_a$ – хлорофилл a

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

Ap – ампицилин

APS – персульфат аммония

BG-11 – питательная среда blue-green для роста цианобактерий

BSA – бычий сывороточный альбумин

Cm – хлорамфеникол

DPPII/IV – дипептидил пептидаза II/IV

DUB – деубиквитинилирующий фермент

IEF – изоэлектрическое фокусирование

Km – канамицин

Km^R-кассета – кассета устойчивости к канамицину

LAP – лейциновая аминопептидаза

LB – бактериальная питательная среда lysogeny broth

MOPS – 3-морфолинопропансульфоновая кислота

PIP/PAP – пролин-иминопептидаза или пролил-аминопептидаза

PMSF – фенилметан-сульфонил флюорид

Ribolock – рекомбинантный ингибитор РНКазы

RNaseH – рибонуклеаза H

RNaseOUT – рекомбинантный ингибитор РНКазы

SOB – бактериальная питательная среда superoptimal broth

SOC – бактериальная питательная среда superoptimal broth catabolite repression

Tet – тетрациклин

Ub – убиквитин

X-gal – 5-бром-4-хлор-3-индолил-b-D-галактозид

ВВЕДЕНИЕ

В клетках всех живых организмов протеолиз участвует в поддержании белкового гомеостаза за счёт активности особой группы ферментов, протеаз или пептидаз, которые катализируют расщепление пептидных связей в молекулах-мишенях. Необратимость протеолитической реакции позволяет клетке осуществлять однонаправленную координацию биологических процессов, которая необходима на различных этапах биогенеза белка: синтеза, его функционального созревания и завершающей деградации. Однако, несмотря на кажущуюся простоту рассматриваемых реакций, протеолиз остаётся одним из сложных процессов, требующих определённых условий среды и активности ферментов. Особое затруднение в понимании роли протеолиза в клетке вносят как разнообразие протеолитических ферментов, с одной стороны, так и большое количество гидролизуемых субстратов, имеющих различную степень деградации, с другой. Тем не менее, современная биология протеолиза использует в своём арсенале не только классические методы анализа специфичности ферментативного катализа. Сочетание с новейшими методами исследования свойств ферментов, а также получение дополнительной информации из смежных областей знаний, таких, например, как протеомика и биоинформатика, вносят существенный вклад в понимание молекулярных механизмов протеолиза и его роли в жизнедеятельности организма.

В настоящее время различают полный и ограниченный протеолиз. В ходе полного или неограниченного протеолиза происходит удаление аномальных и повреждённых белков, образующихся либо в результате мутаций и ошибок биосинтеза, либо в случае адаптивных перестроек в клетке, подвергнутой стрессу. Также в результате полного протеолиза клеточных белков происходит накопление пула свободных аминокислот, которые в дальнейшем будут использованы для синтеза новых белковых молекул.

Однако основная регуляторная роль принадлежит ограниченному протеолизу, катализируемому пептидазами различной субстратной специфичности. В частности, протеолитические ферменты, осуществляя селективное расщепление пептидной цепочки в целевых белках, участвуют в ряде посттрансляционных модификаций, что, к примеру, обеспечивает транспортировку белков к месту их функциональной активности (Albiniak *et al.*, 2012), созревание белков в результате процессинга белков-предшественников (Teixeira, Glaser, 2013), а также регулирует скорость распада белков или коротких пептидов за счёт преобразования N-концевых аминокислотных остатков (а. о.) (Varshavsky, 2011). В последнем случае в зависимости от природы N-концевых а. о. время жизни новосинтезированного белка может составлять всего несколько минут, а в отношении долгоживущих молекул – до нескольких часов. В данный процесс вовлечены ферменты семейства аминопептидаз, чья жизненно важная функция подробно описана на примере действия метиониновых аминопептидаз (MAP) (Chang *et al.*, 1989; Piatkov *et al.*, 2015).

Существует ряд протеолитических ферментов, обладающих строгой субстратной специфичностью в отношении пептидных связей, образованных пролином. В данную группу входят пролин-специфичные аминопептидазы, в том числе аминопептидаза P (APP), которая гидролизует высвобождение любого первого а. о. в том случае, если после него находится пролин (Lin, Brandts, 1979).

Наблюдаемый в последние годы интерес исследователей к данному ферменту способствовал расширению наших знаний о фундаментальной роли пролин-специфичной аминопептидазы в различных организмах. В настоящее время в литературе подробно описаны каталитические свойства и субстратная специфичность фермента APP (AMPPII) из гетеротрофной бактерии *Escherichia coli* (*E. coli*) (Wilce *et al.*, 1998). В то время как среди фотосинтезирующих организмов аминопептидаза P охарактеризована только у растения *Lycopersicon esculentum* (LeAPP2) (Hauser *et al.*, 2001). Ещё два гомолога идентифицированы в клетках *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*), благодаря биоинформационному анализу,

в том числе протеаза ICP55 (Intermediate Cleavage Peptidase 55), чья каталитическая активность, в отличие от LeAPP2, направлена на процессинг митохондриальных белков и осуществляется по эукариотическому типу (Huang *et al.*, 2015; Carrie *et al.*, 2015). Однако у фотосинтезирующих бактерий аминопептидаза P остаётся экспериментально не охарактеризованной.

В рамках настоящего исследования впервые будет изучена природа ферментативной активности и субстратная специфичность белка PepP, предположительно аминопептидазы P, из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*). Одноклеточная цианобактерия *Synechocystis*, благодаря полностью аннотированному геному (Kaneko *et al.*, 1996; Kaneko *et al.*, 2003), быстрому росту в широком диапазоне условий (Vermaas, 1996) и природной способности к трансформации экзогенной ДНК (Grigorieva, Shestakov, 1982), является удобным модельным объектом для изучения механизма действия и функциональной направленности протеолитических ферментов. Согласно литературным данным, геном *Synechocystis* содержит 62 гена пептидаз различного типа, только один из которых кодирует, предположительно, аминопептидазу P (Sokolenko *et al.*, 2002).

В соответствии с эндосимбиотической теорией происхождения эукариот, растительные клетки и их геномы (как и все эукариотические клетки) представляют собой результат эндоцитобиоза между цианобактерией и гетеротрофным эукариотом. Принято считать, что именно цианобактерии являлись предшественниками хлоропластов высших растений. Об этом также свидетельствует значительное структурное и функциональное сходство их фотосинтетических аппаратов (Martin, Herrmann, 1998). Данный процесс сопровождался частичным переносом генетического материала предшественника в клетку хозяина. В результате этого, около 18% от всего генома *A. thaliana* были получены от цианобактериального предка пластид (Martin *et al.*, 2002). В ходе эволюции часть генов подверглась дупликации, что привело к функциональной дивергенции и избыточности, в том числе, ряда протеолитических ферментов

(Sokolenko *et al.*, 2002). Данное утверждение справедливо и для генов, кодирующих аминопептидазы P у эукариот. Переход к эукариотическому типу клеточной оргнизации привёл к увеличению числа APP белков, причём с различной функциональной направленностью и локализацией в клетке (*https://www.arabidopsis.org/*; Li *et al.*, 2008; Molinaro *et al.*, 2005; O'Toole *et al.*, 2010).

Раннее в Лаборатории экспресии генома растений были проведены исследования по выяснению путей действия аминопептидазы P (PepP) в клетках фотосинтезирующей бактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 штамм GS (Пожидаева *и др.*, 2013), но белок не был охарактеризован и его точная роль в клетках цианобактерий не установлена.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы было охарактеризовать протеолитические свойства предполагаемой пролин-специфичной аминопептидазы (PepP), кодируемой геном *sll0136* у одноклеточной цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 штамм GT-L, а также изучить функциональную роль этого белка. Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить рекомбинантный штамм *Escherichia coli*, являющийся продуцентом белка PepP *Synechocystis*.
2. Подобрать условия экспрессии белка PepP и оптимальный метод его очистки с учётом сохранения ферментативной активности препарата.
3. Изучить природу и оптимальные условия ферментативной активности, а также субстратную специфичность полученного препарата белка PepP *in vitro*.
4. Провести структурный анализ белка PepP с использованием биоинформационных ресурсов.

5. Сконструировать мутантный штамм *ΔpepP Synechocystis*, дефектный по гену *sll0136*, и оценить влияние инактивации гена на физиолого-биохимические характеристики мутанта.
6. Выявить и охарактеризовать предполагаемые субстраты белка PepP.

Научная новизна. Настоящая работа, посвящённая функциональному анализу пролин-специфичной аминопептидазы, кодируемой геном *sll0136* у одноклеточной цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 (GT-L), является оригинальным научным исследованием.

В ходе изучения протеолитической активности рекомбинантного белка PepP *in vitro*, экспрессированного в клетках *E. coli* и очищенного на глутатион-сефарозе, определена его субстратная специфичность в реакциях с флуоресцентным субстратом Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA. Установлено, что исследуемый белок является Mn^{2+}-зависимой *Xaa-Pro* аминопептидазой, оптимум активности которой находится в пределах 32°C и pH 7,6. С использованием биоинформационных ресурсов построена трёхмерная модель мономера/димера белка PepP в комплексе с лигандом.

Морфофизиологический анализ показал, что инактивация гена *sll0136* привела к формированию мутантным штаммом *ΔpepP Synechocystis* колоний меньшего размера, что является следствием уменьшения размеров клеток и пролонгированным периодом деления цианобактерий. Потеря активности пептидазы PepP нарушила организацию тилакоидных мембран в результате изменения содержания белков фотосинтетических комплексов и композиции светособирающего комплекса (ССК) цианобактерий.

Практическая значимость. Данные, полученные в работе, имеют фундаментальный характер и позволяют расширить понимание функциональной роли пролин-специфичной аминопептидазы в клетках цианобактерий. Изучение процессов протеолиза на примере модельного объекта *Synechocystis* sp. PCC 6803 позволяет проследить эволюционную дивергенцию APP белков, функциональная

направленность и механизм действия которых различается между прокариотическими и эукариотическими организмами.

Материалы, изложенные в диссертации, могут быть использованы в качестве лекционного материала для подготовки обучающихся по основным дисциплинам в рамках курсов физиологии и биохимии растений в высших учебных заведениях.

Степень достоверности работы. Выполнение данной работы сопровождалось применением современных физиологических и биохимических методов, ранее прошедших апробацию, либо оптимизированных в ходе проведения исследования. Постановка экспериментов проводилась в достаточной биологической и аналитической повторности. Выводы базируются на объективных данных, полученных в ходе исследования, и изложены в печатных работах. Достоверность результатов подкреплена использованием в работе различных методических подходов: биологических и биоинформатических методов исследования, а также методов статистической обработки данных.

Апробация результатов. Результаты диссертационной работы представлены на: V съезде физиологов СНГ, V съезде биохимиков России и международной конференции ADFLIM «Современные методы флуоресцентного молекулярного имиджинга» (Сочи-Дагомыс, 2016); Межинститутском научном молодёжном семинаре «Актуальные проблемы физиологии, молекулярной биологии и биотехнологии растений» (Москва, 2016); VIII Съезде Общества физиологов растений России, Всероссийской научной конференции с международным участием и школе для молодых учёных «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015); 9-м Европейском семинаре по молекулярной биологии цианобактерий (Тексель, Нидерланды, 2014); VII Всероссийской конференции «Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция» (Петрозаводск, 2014); Международной научной конференции и школе молодых учёных «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и

фитобиотехнологий» в рамках годичного собрания Общества физиологов растений России (Калининград, 2014); 67-й Международной студенческой научной конференции, посвящённой 120-летию со дня рождения академика В.С. Немчинова (Москва, 2014); XXI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2014» (Москва, 2014); Межинститутском научном молодёжном семинаре «Актуальные проблемы физиологии, молекулярной биологии и биотехнологии растений» (Москва, 2014); XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2013» (Москва, 2013); Международной конференции «Физиология и биотехнология микроводорослей», посвящённой 80-летию В.Е. Семененко (Москва, 2012); Международном Конгрессе по биологии растений, совместно организованном FESPB и EPSO (Фрайбург, Германия, 2012); 65-й Международной студенческой научно-практической конференции, посвящённой 125-летию со дня рождения академика Н.И. Вавилова (Москва, 2012).

Положения, выносимые на защиту:

1. Полученный очищенный препарат белка PepP *Synechocystis* обладает *Xaa-Pro* аминопептидазной активностью, кинетические параметры которого в реакции с флуоресцентным пептидом Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA составляют K_M = 8,83 ± 0,94 мкМ и V_{max} = 19,46 ± 0,67 мкМ·сек$^{-1}$, соответственно. Белок PepP относится к Mn^{2+}-зависимым металлоферментам с оптимумом действия в пределах 32°C и pH 7,6.
2. Построение трёхмерной модели белка PepP в комплексе с лигандом показывает, что в связывании двух ионов Mn^{2+} участвуют высококонсервативные аминокислотные остатки активного сайта белка Glu385, Glu415, Asp271, His354, Asp260, а также функционально значимые Thr273 и Thr383. Анализ олигомеризации белка демонстрирует образование гомодимера.
3. Получен гомозиготный мутантный штамм *ΔpepP*, несущий инсерцию в гене *sll0136*, кодирующем аминопептидазу PepP. Мутант *ΔpepP* характеризуется

пониженной скоростью роста уже в стандартных условиях (32°C, 70 мкЕ/м^2·с$^{-1}$), а также изменёнными размерами и ультраструктурой клеток по сравнению с ДТ. Обнаруженные у мутанта *ΔpepP* нарушения в структуре и расположении тилакоидов являются следствием изменений в композиции и содержании белков светособирающего комплекса, а также в соотношении ФСI/ФСII. Предполагется участие PepP в биогенезе белков тилакоидных комплексов.

Связь с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа выполнялась в 2012-2015 гг. в соответствии с планом научных исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (ИФР РАН) по теме: «Характеристика пролин-специфичной аминопептидазы из одноклеточной цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803» (номер государственной регистрации № 0106-2018-0011). Исследования автора как исполнителя поддержаны грантом РФФИ № 12-04-00049 «Исследование роли пролин-специфичных аминопептидаз в биогенезе белков фотосинтетических организмов». Научные положения, выводы и апробация результатов диссертации основаны на анализе данных собственных исследований автора.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 работ, из которых 4 – в рецензируемых изданиях; 3 – в изданиях, рекомендуемых ВАК.

Структура диссертации. Диссертация состоит из разделов: Содержание, Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Объекты и методы исследования, Результаты и их обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы, Приложение. Работа изложена на 221 страницах машинописного текста, включает 53 рисунка и 17 таблиц. Список литературы включает 342 наименований, из которых – 329 на иностранных языках.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Роль протеолиза в клетке

1.1.1. Классификация пептидаз

Белки, обладающие протеолитической активностью, в литературе обозначены как протеазы, протеиназы или пептидазы (Rawlings, Barrett, 1993). Согласно ЕС номенклатуре (Enzyme Nomenclature, 1992; *http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/*) все протеолитические ферменты относятся к пептид-гидролазам (ЕС 3.4) (Garcia-Carreno, Navarrete del Toro, 1997). В настоящее время существует ряд трудностей, связанных с определением специфичности подобных ферментов, которая может зависеть от природы нескольких а. о. вокруг гидролизуемой связи и конформации полипептидной цепи субстрата. Поэтому, помимо типа реакции, в системе классификации учитывают также механизм катализа пептидаз (Tipton, Boyce, 2000; McDonald, Tipton, 2014).

По типу реакции различают (рис. 1) экзопептидазы (ЕС 3.4.11-19) и эндопептидазы (ЕС 3.4.21-24 и 3.4.99). Экзопептидазы подразделяются на амино- и карбоксипептидазы. Первые действуют на N-конце молекулы субстрата, вторые – на С-конце белка или полипептида, соответственно. В процессе гидролиза экзопептидазы могут высвобождать один а. о., ди- или трипептид. В свою очередь, эндопептидазы катализируют расщепление связей внутри полипептидной цепочки.

Разделение пептидаз по механизму катализа включает четыре основных типа ферментов: сериновые, цистеиновые, аспартатные и металлопептидазы (Hartley, 1960; Barrett, 1999) (рис. 1). Также были обнаружены треониновые пептидазы (Seemüller *et al.*, 1995) и, в дальнейшем, экулизины грибов – глутаматные протеазы (Fujinaga *et al.*, 2004). Последнюю группу образуют протеазы с неизвестным типом катализа. Выделяют также седьмой каталитический тип протеолитических ферментов – аспарагиновые пептид-лиазы (ЕС 4.3). Данные белки способны

самостоятельно расщеплять пептидные связи в обход протеолитического пути и поэтому не относятся к «настоящим» протеазам (Rawlings *et al.*, 2011).

Рис. 1. Схема классификации протеаз по типу реакции и механизму катализа.

Появление данных рентгеноструктурного анализа, а также развитие методов определения аминокислотных последовательностей белков позволило создателям базы данных пептидаз MEROPS (*http://merops.sanger.ac.uk/*) разработать классификацию пептидаз на основе их эволюционного происхождения. Иерархическая структура данной классификации учитывает сходство аминокислотных последовательностей белков, их структурные особенности, а также механизм катализа ферментов. База данных постоянно пополняется. В настоящий момент MEROPS содержит информацию о различных протеолитических ферментах, их субстратах и ингибиторах.

1.1.2. Типы протеолиза белков

Биогенез любого белка неизменно включает его протеолитическое расщепление: в процессе функционального созревания или завершающей деградации. Протеолиз белка может протекать как котрансляционно, так и на посттрансляционном уровне, приводя к активации, инактивации белка или полному изменению его функциональных свойств. Например, полипептидная цепь,

несущая убиквитиновую метку, способна подвергаться деградации, будучи ассоциированной с рибосомальной тРНК (Turner, Varshavsky, 2000).

Различают два типа протеолиза белков: полный и ограниченный. Полный (или неограниченный) протеолиз предполагает полную деградацию белков-мишеней до дипептидов или аминокислот. В то время как ограниченный протеолиз характеризуется гидролизом одной или нескольких определённых пептидных связей в молекулах субстратов.

Полный протеолиз бывает селективным и неселективным. С помощью селективной белковой деградации происходит регуляция клеточных процессов, удаление повреждённых и ненужных белков. Неселективная белковая деградация обеспечивает поставку пула свободных аминокислот для синтеза новых белков, осуществляя их круговорот в клетке. Например, в лизосомах эукариот, под воздействием гидролаз различной специфичности неселективной деградации подвергаются неправильно свёрнутые и другие аномальные белки. Исключение составляют конформационно изменённые или агрегированные молекулы белков, которые стали токсичными для клетки. Такие белки не могут быть репарированы или удалены, поэтому их накопление приводит к старению и возникновению специфических заболеваний человека (Gregersen *et al.*, 2006). Цитоплазматические белки доставляются в лизосомы путём аутофагии: шаперон-зависимой аутофагии, макроаутофагии или микроаутофагии (Kroemer *et al.*, 2010).

Селективный протеолиз белков в клетках эукариот включает убиквитин-протеасомную деградацию. Убиквитиновая система принимает участие в различных физиологических процессах: регуляции клеточного цикла (Reed, 2003), в ответе на повреждение ДНК, синтезе белка, регуляции транскрипции, при воздействии стрессовых факторов (Flick, Kaiser, 2012). Однако ведущая роль данной системы заключается в контроле концентрации белков в клетке.

Убиквитин (Ub) – это небольшой белок размером 76 а. о., который способен узнавать первичные сигналы деградации в молекулах-мишенях и ферментативно связываться с ними. В качестве сигналов деградации могут выступать

аминокислотные последовательности белка или его конформационные участки. Механизм убиквитинилирования белка связан с затратой АТФ. Активация Ub происходит за счёт образования тиэфирной связи между последним а. о. в Ub (Gly76) и белком E1 (активатор убиквитина). Молекула активированного Ub переносится на остаток Cys одного из убиквитин-коньюгирующих ферментов E2 и далее через изопептидную связь на остаток Lys субстрата. Образование полиубиквитиновой цепочки может катализироваться либо самим E2, либо E2 в комплексе с убиквитин-протеин лигазой E3. Меченый убиквитином белок деградирует в камере 26S протеасомы. Геномы некоторых млекопитающих содержат не менее тысячи E3 белков, основная функция которых заключается в распознавании специфичных сигналов деградации субстратов (Varshavsky, 2012).

Протеасомы также обнаружены в археях и актинобактериях, где они вовлечены в контроль качества белков за счёт деградации неправильно свёрнутых или иным образом повреждённых белков (Volker, Lupas, 2002).

В отличие от эукариот, прокариоты не кодируют убиквитин, однако способны синтезировать два типа небольших белков-модификаторов, которые связываются с соответствующими мишенями через изопептидную связь. Первый тип представлен Pup белками (prokaryotic ubiquitin-like protein) актинобактерий. Данные модификаторы взаимодействуют с а. о. Lys субстрата, что приводит к направленной деградации меченого белка протеасомой. Данный процесс отличается от убиквитинилирования в эукариотах. Другая биологическая роль Pup заключается в регуляции активности самой протеасомы, опосредованное взаимодействие с которой приводит к её дезактивации за счёт диссоциации гексамерного кольца на мономеры. Вторую группу модификаторов образуют белки: SAMP (small archaeal modifier proteins) архей и TtuB (tRNA-two-thiouridine B) *Thermus thermophilus*. Особенность данных белков заключается в том, что их последовательности отличаются от последовательности Ub, но имеют схожую область структурной поверхности, которая и обеспечивает связывание модификаторов с целевыми белками путём образования изопептидной связи.

Данный механизм представляет собой «упрощённую» версию убиквитинилирования, основанную на участии гомологов E1 лигазы (но не E2 или E3). Помимо направленной деградации, данные белки-модификаторы также являются носителями серы и необходимы для образования ряда биомолекул (Maupin-Furlow, 2014).

В свою очередь, многие виды бактерий (Horwich *et al.*, 1999), в том числе цианобактерии, характеризуются отсутствием протеасом, однако содержат протеасомоподобные структуры – комплексы ClpAP/XP протеаз (см. главу 1.1.3).

Протеолитический комплекс протеасомы обладает высокой субстратной специфичностью, которая достигается за счёт участия в нём шаперона как регуляторного компонента. Расщепление субстрата происходит внутри протеолитической камеры, предотвращая, тем самым, непреднамеренную деградацию нецелевых белков. При этом регуляторный компонент обеспечивает селективное связывание белковых субстратов, их разворачивание и доставку в протеолитическую камеру для деградации. Помимо протеасомы, подобный механизм катализа лежит в основе семейств Deg-, FtsH- и Clp- протеаз.

Клеточные белки также могут подвергаться ограниченному протеолизу за счёт действия протеаз различной специфичности. Такое разнообразие ферментов связано с выполнением различных биологических процессов в клетке. Например, для импорта белков в места, отличные от их синтеза, для активации белковых молекул, а также для направленной деградации молекул-мишеней.

1.1.3. Пептидазы цианобактерий

Современные представления об эволюции эукариотической клетки базируются на эндосимбиотической теории происхождения (Martin *et al.*, 2015; Archibald, 2015), которая берёт своё начало с идей Мережковского (Проворов, 2016). Согласно данной теории, пластиды всех растений и водорослей имеют единое происхождение (Zimorski *et al.*, 2014).

Анализ 51 генома современных цианобактерий выявил 18 000 генов семейств и 47 000 негомологичных генов. Среди 65 000 генов всего генофонда цианобактерий, только 5000 оказались общими для всех видов (Dagan *et al.*, 2013). Предположительно, около 4500 белок-кодирующих генов (18% от всего генома) *A. thaliana* были получены от цианобактериального предка пластид (Martin *et al.*, 2002).

В процессе поглощения цианобактерии клеткой-хозяином, геном эндосимбионта был сведён к небольшому набору генов. Некоторые гены исходного эндосимбионта, необходимые для функционирования и поддержания хлоропластов, были перенесены в ядро, другие – остались в органелле. Однако большинство из них были утрачены. Поэтому геном хлоропластов высших растений кодирует всего около 60-200 белков (в зависимости от организма), в то время как цианобактериальный геном включает более 3000 открытых рамок считывания.

Многократная дупликация генетического материала в процессе эволюции привела к функциональной избыточности генов, о чём свидетельствует появление генных семейств. В свою очередь, мутации в дублированных генах способствовали возникновению двух видов гомологов:

- паралогов – аналогичных генов одного и того же вида в результате дупликации генетического материала;
- ортологов – гомологов генов в различных организмах, имеющих сходную функцию.

В работе Sokolenko с соавт. (Sokolenko *et al.*, 2002) был проведён сравнительный анализ функциональной роли всех генов, кодирующих белки протеаз у цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. Количество генов протеаз в геноме *Synechocystis* составляет 2% (62 гена) от всего генома цианобактерии, в то время как у *A. thaliana* данное значение достигает 1,2% (более 300 генов). Причём, 53 гена пептидаз цианобактериального происхождения в *A. thaliana*, предположительно, находятся в хлоропласте. Систематизация данных пептидаз

позволила выделить следующие общие семейства: Clp-пептидазы, Deg-пептидазы, FtsH-пептидазы, процессирующие пептидазы и аминопептидазы. Интересно, что количество генов пептидаз, относящихся к семействам Clp, Deg и FtsH, в геноме *A. thaliana* возврастает в сравнении с цианобактериальными гомологами (Sokolenko *et al*., 2002). К тому же, если протеолитические комплексы Clp-, FtsH-протеаз в *E. coli* являются малокомпонентными и представлены гомоолигомерными структурами, то цианобактериальные протеазы, а вслед за ними и хлопластные протеазы наземных растений, увеличивают число паралогов пептидаз, что приводит к появлению более сложно устроенных гетероолигомерных комплексов (Nishimura *et al.*, 2016).

Семейства Clp- и FtsH-пептидаз обладают процессивным механизмом деградации белковых субстратов. Данные пептидазы образуют комплексы из шаперонного кольца с AAA+ модулем и бочкообразного протеолитического компонента. Для избежания неспецифической деградации белков каталитический центр протеазы расположен внутри протеолитической камеры, доступ субстрата к которой регулируется АТФ-зависимыми шаперонными субъединицами. Данные белки способными распознавать соответствующие субстраты, разворачивать и транслоцировать их внутрь камеры протеазы, где они подвергаются эндопротеолитическому расщеплению (Nishimura *et al.*, 2016).

Семейство Clp-пептидаз

Семейство Clp является одним из наиболее известных АТФ-зависимых протеаз серинового типа (S14 MEROPS), которое сохраняется в эубактериях и большинстве эукариот.

Цианобактериальная клетка *Synechocystis* sp. PCC 6803 включает 8 белков семейства Clp-пептидаз, тогда как у *A. thaliana* число хлоропластных гомологов достигает 13 (Sokolenko *et al.*, 2002; van Wijk, 2015).

Уровни экспрессии белков семейства Clp-пептидаз увеличиваются в ответ на стресс, например, при высокой или низкой температуре (Schelin *et al.*, 2002; Clarke

et al., 1998; Porankiewicz *et al.*, 1998). Однако в настоящее время недостаточно изучены возможные мишени Clp белков в цианобактериях. Недавние исследования показывают, что ClpX протеаза участвует в контроле циркадных ритмов цианобактерий путём регулирования транскрипции генов рибосомного белка (Imai *et al.*, 2013). Белки комплекса Clp протеазы вовлечены в деградацию светособирающего комплекса цианобактерий в ответ на нехватку азота в питательной среде (см. главу 1.3.3).

Семейство FtsH-пептидаз

Семейство FtsH-пептидаз представляет собой класс белков, которые интегрированны в тилакоидную мембрану через одну или две трансмембранные спирали в N-концевой области молекулы. Они содержат модуль AAA+, за которым следует протеазный домен, включающий сайт связывания ионов Zn^{2+} (Erzberger, Berger, 2006).

В геноме *Synechocystis* sp. PCC 6803 присутствует 4 гена FtsH-пептидаз: FtsH1 (*slr1390*), FtsH2 (*slr0228*), FtsH3 (*slr1604*) и FtsH4 (*sll1463*). Летальность мутантных штаммов цианобактерий с инактивированными генами *slr1390* и *slr1604* указывает на жизненно важную роль белков FtsH1 и FtsH3 в клетке (Mann *et al.*, 2000). На примере мутантов цианобактерий, лишённых пептидазы FtsH2, показано участие этой субъединицы в деградации белка D1 во время восстановления ФСII *in vivo* (Silva *et al.*, 2003; Komenda *et al.*, 2006), в ответ на тепловой стресс (Kamata *et al.*, 2005), УФ-облучение (Cheregi *et al.*, 2007); в контроле качества белков тилакоидной мембраны (Komenda *et al.*, 2006, 2010), а также осморегуляции *Synechocystis* (Stirnberg *et al.*, 2007). Белки FtsH могут образовывать стабильные гетероолигомеры: FtsH2/FtsH3 и FtsH1/FtsH3 (Boehm *et al.*, 2012) Комплекс протеаз FtsH1/FtsH3, локализованный в цитоплазматической мембране, играет важную роль в адаптации цианобактерий к дефициту железа в питательной среде (Krynická *et al.*, 2014). Все белки FtsH сконцентрированы в отдельных участках тилакоидных или цитоплазматических мембран. *Pull-down* эксперименты указывают на

локализацию FtsH1 в цитоплазматической мембране, а FtsH2 – в мембране тилакоидов. Оба белка FtsH3 и FtsH4 в условиях низкого освещения цианобактерий сосредоточены на дистальном краю тилакоидной мембраны, прилегающем к мембране цитоплазмы. Однако под воздействием света высокой интенсивности распределение этих белков смещается внутрь клетки от её периферии (Sacharz *et al.*, 2015).

Семейство Deg-пептидаз

Семейство Deg- (degradation of periplasmic proteins) или HtrA-пептидаз (high-temperature requirement A) первоначально было идентифицировано из-за их роли в деградации аномальных периплазматических белков и необходимости для выживания клетки *E. coli* в условиях теплового шока (Lipinska *et al.*, 1988, Strauch, Beckwith, 1988). Данная группа АТФ-независимых эндопептидаз серинового типа обнаружена почти во всех организмах, включая археи, бактерии и эукариоты.

В *Synechocystis* данное семейство представлено белками: DegP/HtrA (*slr1204*), DegQ/HhoA (*sll1679*) и DegS/HhoB (*sll1427*). Все три содержат C-концевой PDZ домен, который, на примере гомологов в *E. coli*, необходим для связывания с субстратом и вовлечён в регуляцию протеолитической активности протеазы (Sheng, Sala, 2001; Wilken *et al.*, 2004). Белок HtrA дополнительно содержит N-концевой трансмембранный домен, в то время как HhoA и HhoB, предположительно, имеют сигнальный пептид (Kieselbach, Funk, 2003; Huesgen, 2011). Белок HhoA локализуется в периплазматическом пространстве (Fulda *et al.*, 2000) и, вероятно, связан с наружной мембраной (Huang *et al.*, 2004). Позднее результаты работы Roberts с колл. (Roberts *et al.*, 2012) показали, что все три Deg-пептидазы расположены либо в периплазме, либо в люмене тилакоида.

Пептидазы HhoA, HtrA, и HhoB обладают высокой гомологией с Deg-пептидазами растений: Deg1, Deg5 и Deg8 (Walsh *et al.*, 2003). Однако цианобактериальные ортологи, в отличие от растительных белков, не играют

существенной роли в восстановлении ФСII, но могут быть вовлечены в оптимизацию репарации в условиях теплового стресса (Barker *et al.*, 2006).

Белки Deg-пептидаз у *Synechocystis* необходимы для выживания клеток цианобактерий под воздействием света высокой интенсивности и теплового стресса (Miranda *et al.*, 2013) и выполняют частично перекрывающиеся функции (Huesgen *et al.*, 2011). Поиск возможных белков-мишеней показал, что все три пептидазы предпочитают одни и те же субстраты, но используют различные сайты гидролиза (Lam *et al.*, 2015). Тройной мутант *Synechocystis*, дефектный по генам Deg-пептидаз, оказался чувствителен к световому, тепловому и окислительному стрессу и имел нарушения фототаксиса (Barker *et al.*, 2006). Позднее было установлено, что цианобактериальные белки HhoA, HhoB и HtrA влияют на образование пептидогликана и секрецию белков во внеклеточное пространство (Cheregi *et al.*, 2015).

Процессирующие пептидазы

Геном *Synechocystis* включает 18 генов процессирующих пептидаз, в то время как в хлоропластах *A. thaliana* было найдено всего 8 белков, представленных семейством Ctp-пептидаз, трансмембранных процессирующих металлопептидаз (сайт-2-протеаз) и SppA-пептидаз.

Карбокси-процессирующие пептидазы (Ctp) принадлежат к особой группе сериновых протеаз (семейство S41 MEROPS), так как вместо каталитической триады Ser/His/Asp активный сайт фермента образован а. о. Ser/Lys (Jansèn *et al.*, 2003). В геноме *Synechocystis* идентифицировано 3 гена Ctp-пептидаз: *ctpA* (*slr0008*), *ctpB* (*slr0257*) и *ctpC* (*slr1751*) (Kaneko *et al.*, 1996), регуляция транскрипции которых зависит от условий окружающей среды (Jansèn *et al.*, 2003). Белки Ctp-процессирующих пептидаз содержат транзитный сигнальный пептид, который указывает на люминальную или периплазматическую локализацию ферментов. Действительно, белок CtpA активен в люмине тилакоидов (Jansèn *et al.*,

2002), а белки CtpB и CtpC находятся в периплазматическом пространстве (Fulda *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2003).

Известно, что CtpA играет важную роль в биогенезе ФСII, так как участвует в процессинге белка D1 реакционного центра (Satoh, Yamamoto, 2007). В отличие от CtpA, роль CtpB и CtpC в клетке остаётся неясной. Различия в функциях генов Ctp-пептидаз продемонстрированы на примере мутантных штаммов цианобактерий с инактивированными генами *ctpA, ctpB* и *ctpC*. Мутанты *ΔctpA* и *ΔctpA/ctpB Synechocystis* были не способны к автотрофному росту, в то время как мутант *ΔctpC* оказался вовсе нежизнеспособным (Ivleva *et al.*, 2002).

Сайт-2-протеазы (S2P) – представляют собой семейство I-CLIPS (intramembrane-cleaving protease), вовлечённых в протеолиз трансмембранных транскрипционных факторов или сигнальных пептидов (Brown *et al.*, 2000; Chen, Zhang, 2010). S2P или трансмембранные процессирующие металлопептидазы имеют характерную доменную организацию. Один трасмембранный домен содержит консервативный мотив His/Glu/x/x/His (где x – любой а. о.), другой – аминокислотную последовательность Asn/x/x/Pro/x/x/x/Leu/Asp/Gly/Gly. Оба мотива необходимы для связывания и координации ионов металлов.

В клетках *Synechocystis* обнаружено 4 гена S2P протеаз: *sll0528, slr0643, sll0862, slr1821*. S2P протеаза, кодируемая геном *slr0643,* участвует в адаптации цианобактерий в условиях повышенной кислотности среды (Zhang *et al.*, 2012). Данный белок является жизненно необходимым для фотоавтотрофного и миксотрофного роста цианобактерий. В ряде опытов было показано, что в условиях солевого, холодового и гиперосмотического стрессов значительно возрастает экспрессия гена *sll0528*. Мутантный штамм *Synechocystis*, дефектный по гену *sll0528*, оказался чувствительным к воздействию повышенных концентраций соли, сорбитола и пониженных температур (Lei *et al.*, 2014).

Сигнальные пептид пептидазы SppA относятся к сериновым эндопептидазам, их процессирующая активность не требует гидролиза АТФ. Семейство SppA-пептидаз в *Synechocystis* представлено двумя генами, *sll1703* и

slr0021, кодирующими белки SppA1 и SppA2, соответственно. Известно, что в условиях повышенной освещённости у цианобактерий происходит деградация фикобилисом. В опытах *in vivo* и *in vitro*, у мутанта *ΔsppA1* в ответ на повышенное освещение не происходила деградация линкерных белков: L_R^{33} и L_{CM}^{99}. Интересно, что в системе *in vitro* линкерные белки подвергались протеолизу при повышенном освещении, в то время как оставались стабильными в темноте. Очевидно, регуляция активности пептидазы SppA1 зависит от света. Описанные результаты свидетельствуют об участии SppA1 в адаптации цианобактерий к световому стрессу за счёт деградации линкерных белков фикобилисом (Pojidaeva *et al.*, 2004). Последующие исследования показали, что SppA1 также может напрямую или опосредованно регулировать светозависимое накопление второго гомолога, белка SppA2, точная роль которого в клетке остаётся неизученной (Пожидаева, Соколенко, 2017).

1.1.3.1. Аминопептидазы

Аминопептидазы гидролизуют пептидные связи на N-конце молекулы белка (Lowther, Matthews, 2002). Данные экзопептидазы принимают участие в ключевых физиологических процессах в живой клетке. В зависимости от своей субстратной специфичности и от природы N-концевых а. о. белков или пептидов, аминопептидазы способны осуществлять протеолиз молекул-мишеней с различной скоростью, влияя, тем самым, на период полураспада белков (Bachmair et al., 1986).

Данная группа ферментов широко распространена среди бактерий, грибов, растений и млекопитающих. Аминопептидазы могут быть локализованы в различных компартментах клетки, включая цитоплазму, хлоропласты, митохондрии, лизосомы и мембраны, а также способны секретироваться в межклеточное пространство (Jankiewicz, Bielawsi, 2003; Sanz, 2007). Различают аминопептидазы с узкой субстратной специфичностью, которые распознают и отщепляют только один а. о. в белках и пептидах, например, метиониновые или пролиновые аминопептидазы, и с широкой субстратной специфичностью, как

аминопептидаза N. На основе механизма катализа аминопептидазы подразделяются на сериновые, цистеиновые и металлопротеазы. Последние, в свою очередь, включают метиониновые, лейциновые и пролиновые аминопептидазы.

Во всех живых организмах, независимо от своей локализации, синтез белка начинается с инициирующего метионина (Giglione, Meinnel, 2001; Giglione *et al.*, 2004). Однако в большинстве молекул белков Met специфически удаляется с помощью метиониновых аминопептидаз (MAP). Удаление инициаторного Met является основным протеолитическим механизмом, обеспечивающим разнообразие N-концевых а. о. в полипептидах. Как один из важнейших клеточных процессов, он необходим для биологической активности белков, их внутриклеточной локализации и деградации некоторых молекул субстратов. Считается, что около 80% всех синтезированных *de novo* белков теряют инициаторный Met (Giglione *et al.*, 2003).

Общий механизм действия метиониновых аминопептидаз хорошо изучен в дрожжах и бактериях (Giglione *et al.*, 2004). Известно, что в бактериях и эукариотических органеллах (митохондриях, хлоропластах) N-концевой остаток Met подвергается формилированию с помощью формил-трансферазы. Последующее деформилирование первого Met деформилазой делает его доступным для MAP белков. Удаление или сохранение инициирующего Met определяется вторым а. о. в белке (Giglione *et al.*, 2004). Для отщепления Met с помощью метиониновых аминопептидаз необходимо, чтобы а. о. в позиции 2 (P2) молекулы белка был не больше Val (Frottin *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2010). Деформилаза и MAP действуют последовательно в процессе котрансляции, конкурируя за сайт связывания на рибосоме (Sandikci, 2013). Наличие у новосинтезированного полипептида непроцессированного метионина является сигналом для деградации этого белка (см. главу 1.2.2) (Piatkov *et al.*, 2015). MAP белки играют важную роль в жизнеспособности клетки. Мутации по генам, кодирующим метиониновые аминопептидазы, как правило, летальны (Chang *et al.*, 1989).

Различают 2 типа метиониновых аминопептидаз: MAPI и MAPII (Chen *et al.*, 2002; Giglione *et al.*, 2000), главным структурным отличием которых является наличие вставки из 60 а. о. в С-концевой области каталитического домена белка (Vetro *et al.*, 2004). MAPI подразделяются на четыре подтипа: Ia, Ib, Ic и Id. Белки метиониновых аминопептидаз Ia и Ic обнаружены в клетках прокариотических организмов, в то время как Ib и Id найдены только в клетках эукариот (Addlagatta *et al.*, 2005). Белки MAPII идентифицированы в эукариотах и археях (Bradshaw *et al.*, 1998; Lowther, Matthews, 2002).

Геномы большинства бактерий содержат только один ген метиониновой аминопептидазы, в то время как в клетках *Synechocystis* sp. PCC 6803 их число достигает трёх: *mapA* (*slr0918*), *mapB* (*slr0786*), *mapC* (*sll0555*) (Atanassova *et al.*, 2003). Однако физиологическая функция удаления инициирующего Met у цианобактерий остаётся неясной. На сегодняшний день известно, что ингибирование процессинга N-концевого формил-метионина в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* и хлоропластах *A. thaliana* может влиять на стабильность субъединиц ФСII (Giglione *et al.*, 2003). Сравнение аминокислотных последовательностей белков метиониновых аминопептидаз показало, что цианобактериальные MAP обладают большим сходством с прокариотическими белками (идентичность 50%) и принадлежат к подтипу MAPIa, так как не содержат вставки, состоящей из 60-ти а. о., характерной для MAP эукариот (Atanassova *et al.*, 2003).

Drath с колл. (Drath *et al.*, 2009) удалось получить гомозиготные мутантные штаммы *Synechocystis* с инактивированными генами *mapA* и *mapB*, но не *mapC*. Это свидетельствует о жизненно важной роли белка MAPC в клетках цианобактерий.

В свою очередь, ген *mapA* был необходим *Synechocystis* в условиях повышенной освещённости и дефицита азота в среде. Длительная инкубация мутантного штамма *ΔmapA* на среде, лишённой азота, привела к гибели цианобактерий. При выращивании *Synechocystis* в условиях повышенной освещённости активность ФСII в клетках мутанта *ΔmapA* была снижена.

Полученные данные коррелируют с данными транскрипционного анализа дикого типа *Synechocystis*. В условиях дефицита азота или высокой освещённости наблюдалась индукция экспрессии *mapB* и *mapA* генов, в то время как экспрессия гена *mapC* была снижена после 24 ч роста цианобактерий в условиях эксперимента. Стоит отметить, что ген *mapC* экспрессировался преимущественно в экспоненциально растущей культуре цианобактерий. Функция MAPB в клетках *Synechocystis* остается неопределённой.

К лейциновым аминопептидазам (LAP) относятся экзопептидазы, которые осуществляют гидролиз первого а. о. лейцина (Leu) на N-конце белка или пептида. Данная группа пептидаз обнаружена в клетках животных, растений и прокариот (Colloms, 2004; Sträter, Lipscomb, 2004; Walling, 2004). Известно, что бактериальные и животные LAP участвуют не только в отщеплении инициирующих а. о. в полипептидах, но и выступают в качестве транскрипционных репрессоров, факторов сайт-специфичной рекомбинации, вирусных и токсичных рецепторов для визикулярного транспорта (Matsui *et al.*, 2006).

Лейциновые пептидазы образуют два семейства белков (MEROPS): M1 и M17. Согласно базе данных CyanoBase, геномы цианобактериальных клеток содержат гены лейциновых пептидаз (*pepA*). Tsuboi с колл. (Tsuboi *et al.*, 2016) разработали универсальные праймеры, позволяющие идентифицировать гены *pepA* в различных бактериальных филах: *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, *Deltaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Chlamydiae*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Spirochetes*. В результате удалось идентифицировать ген, кодирующий белок лейциновой аминопептидазы у S*cytonema*, аминокислотная последовательность которой обладала высоким сходством с LAP-подобными белками, относящимися к семейству M17 (Tsuboi *et al.*, 2016). Данные белки могут играть существенную роль в разложении органических полимеров в водных экосистемах (Caruso, 2010).

1.1.3.2. Пролиновые аминопептидазы

Пролин-специфичные пептидазы принадлежат к различным семействам протеаз, действующим на пептидные связи, образованные Pro (пролином). Главное отличие пролина (рис. 2) от других протеиногенных аминокислот заключается в том, что это иминокислота, чья боковая цепь является частью пятичленного пироллидинового кольца, которое включает как α-углеродный атом (C’), так и атом аминоазота. Полученная структура колец ограничивает свободное вращение вокруг C’-N связи, а присутствие вторичного амина означает, что азот не может участвовать в образовании водородных связей с карбонилами (Vanhoof *et al.*, 1995).

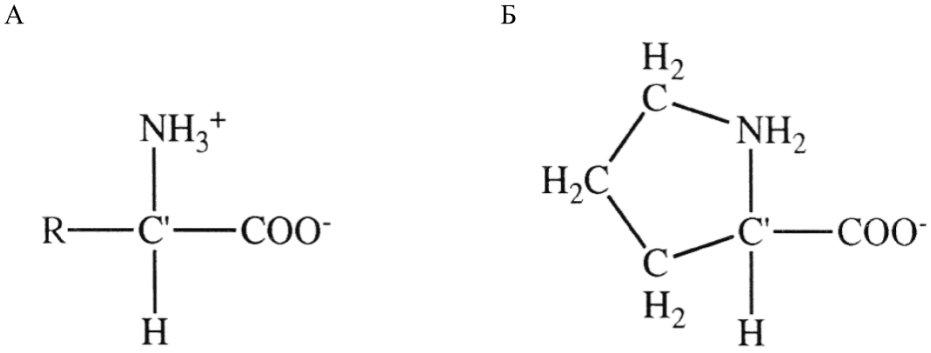

Рис. 2. Структурные отличия пролина от других аминокислот (адаптировано по Cunninghm, O’Connor, 1997).

Обозначения: общая структурная формула любой аминокислоты (А) включает карбоксильную (COO^-) группу, аминогруппу (NH_3^+) и соответсвующий для каждой аминокислоты боковой радикал (R), которые связаны с α-атомом углерода (C’). В случае пролина (В) боковая группа ($-CH_2-CH_2-CH_3$) связана не только с α-атомом углерода (C’), но и с аминогруппой (NH_3^+), в результате чего образуется циклическая структура. Вторичная природа атома азота в молекуле пролина делает её иминокислотой.

Вследствие конформационной жёсткости, обеспечиваемой циклической боковой цепью, пептидные связи, содержащие Pro, часто устойчивы к гидролизу различными пептидазами (Walter *et al.*, 1980; Cunninghm, O’Connor, 1997). Защита, обеспечиваемая позиционированием пролина в пептидной последовательности, нередко используется в природе для стабилизации биологически активных

пептидов от нежелательной деградации и инактивации. Однако существует потребность в активности пролин-специфичных пептидаз, которые выполняют ряд биологических функций, например, высвобождают остаток пролина для синтеза белков в бактериях или участвуют в регуляциии гормонов у млекопитающих (Sanz *et al.*, 2007).

В зависимости от своей специфичности, данные ферменты способны распознавать остаток пролина в строго определённом положении пептидного субстрата. Различают пролин-специфичные экзопептидазы (карбокси-, амино- и дипептидазы) и эндопептидазы (Cunninghm, O'Connor, 1997; Беседин, Руденская, 2003) (рис. 3). К пролиновым аминопептидазам относятся: дипептидил пептидазы II и IV, пролин-иминопептидаза и аминопептидаза P. В свою очередь, пролиновые дипептидазы включают пролиназу и пролидазу. Пролин-специфичные пептидазы также можно разделить на *Xaa-Pro* пептидазы, к которым относятся дипептидил пептидазы II и IV, аминопептидаза P и пролидаза, и *Pro-Xaa* пептидазы.

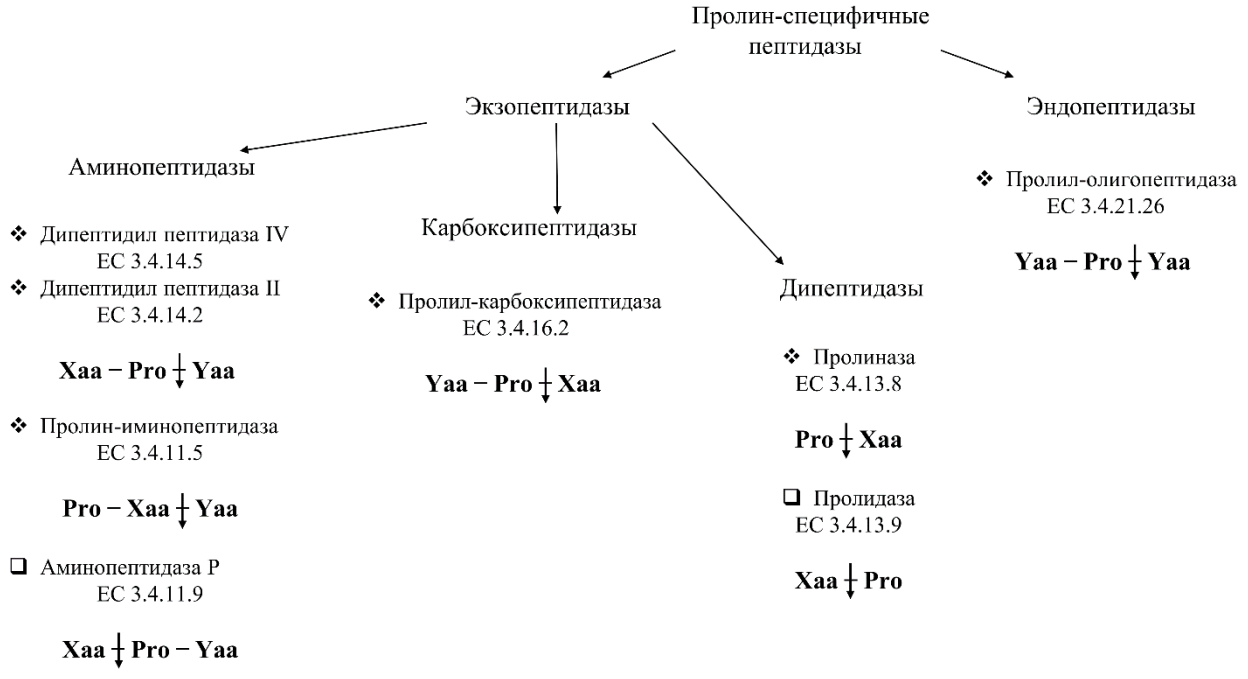

Рис. 3. Пролин-специфичные пептидазы растений и бактерий.

Обозначения: ❖ – пептидазы серинового типа; ❑ – металлопептидазы; Pro – остаток пролина; Xaa – любой аминокислотный остаток; Yaa – остаток пептида.

Согласно базе данных пептидаз MEROPS, и аминопептидаза P и пролидаза относятся к одному семейству металлопептидаз M24B, в то время как остальные пролин-специфичные пептидазы принадлежат к различным семействам сериновых протеаз (*http://merops.sanger.ac.uk/*). Стоит также отметить, что только небольшая группа пролин-специфичных пептидаз способна гидролизовать Pro-Pro связи, это дипептидил пептидаза II, аминопептидаза P и пролин-иминопептидаза (Simpson, 2001).

Ввиду ограниченного числа исследований, функция пролин-специфичных аминопептидаз у фотосинтезирующих организмов до сих пор остаётся неясной. Согласно биоинформационному анализу, ряд штаммов цианобактерий содержит гены предполагаемых пролин-специфичных аминопептидаз, но ни одна из них до сих пор не подтверждена экспериментально. Немногочисленные литературные данные способны пролить свет на предполагаемую роль *Xaa-Pro* пептидаз только в растительных клетках.

Дипептидил пептидазы II и IV

Данная группа ферментов встречается в клетках как прокариот, так и эукариот. Дипептидил пептидаза IV (DPPIV) катализирует удаление дипептидов на N-конце пептидов, образованных тремя и более а. о., при наличии Pro и Ala в позиции P2. Дипептидил пептидаза II (DPPII или DPP7) обладает той же субстратной специфичностью, что и DPPIV, но гидролизует преимущественно трипептиды. Интересно, что в базе данных пептидаз MEROPS DPP7 человека отнесена к семейству карбоксипептидаз S28, однако её активность в отношении трипептидных субстратов доказывает её принадлежность к аминопептидазам (Maes *et al.*, 2007). Растительный белок дипептидил пептидазы II впервые был выделен из семян *Vigna radiata*. Примечательно, что DPPII *Vigna radiata* не способна гидролизовать синтетический трипептид Gly-Pro-Leu-βNA, в отличие от фермента млекопитающих (Khaket *et al.*, 2015).

Дипептидил пептидазы IV относятся к семейству сериновых пептидаз S9. Ряд работ посвящён изучению активности растительных DPPIV *Papaver somniferum*, саженцев *Cucumis sativus* и каллуса *Panax ginseng* (Simpson, 2001). В настоящее время охарактеризован белок DPPIV, очищенный из солода *Hordeum vulgare* (Davy *et al.,* 2000). Несмотря на то, что функция растительных дипептидил пептидаз чётко не установлена, предполагается, что они участвуют в мобилизации и/или иммобилизации белков при прорастании (Simpson, 2001; Khaket *et al.,* 2015).

Пролин иминопептидазы

Пролин-иминопептидазы (PIP), также называемые пролил-аминопептидазами (PAP), катализируют расщепление пролина на N-конце белка или пептида. К настоящему времени PAP идентифицированы в бактериях (Kitazono *et al.,* 1994; 1996), грибах (Li *et al.,* 2010) и растениях (Ovando *et al.,* 2004; Szawłowska *et al.,* 2006; Marinova *et al.,* 2008; Tishinov *et al.*, 2010; Szawłowska *et al.,* 2011). В базе данных пептидаз MEROPS, PAP помещены в семейство сериновых пептидаз S33, так как содержат каталитическую триаду Ser/Asp/His (Li *et al.,* 2010). Основываясь на различиях в молекулярной массе и субстратной специфичности, Kitazano (Kitazono *et al.,* 1994) разделил бактериальные PAP на две группы. Первая группа включает небольшие мономерные ферменты (30-35 кД) с жёсткой специфичностью в отношении N-концевого остатка Pro, в то время как вторая группа состоит из мультимерных белков (100-370 кД), способных катализировать расщепление как пролина, так и гидроксипролина.

Ранее пролин-иминопептидазы были идентифицированы в *Arachis hypogaea* (Ovando *et al.,* 2004), *Secale cereale* (Szawłowska *et al.,* 2006), *Brassica oleraceae* (Marinova *et al.,* 2008), *Helianthus annuus* (Tishinov *et al.,* 2009; 2010), × *Triticosecale* (Szawłowska *et al.*, 2011). Однако биологическая функции PAP белков до сих пор остаётся неясной.

В работе Sun (Sun *et al.*, 2013) было показано, что пролин-иминопептидаза AtPAP1 *A. thaliana*, кодируемая геном *At2g14260*, вовлечена в регуляцию

устойчивости растений к солевому стрессу и засухе. Для анализа использовали трансгенные растения, дефектные по гену *At2g14260*, а также мутантные растения арабидопсиса с избыточной экспрессией гена *pap1* в условиях 15-ти дневного засоления и засухи. Результаты исследования показали повышенную выживаемость растений со сверхэкспрессией гена *pap1*, в то время как выживаемость *knok-out* мутантов оказалась ниже контрольных форм. В ответ на засуху и засоление также наблюдалась быстрая индукция экспресии гена *At2g14260* и повышенная активность PAP. Похожие данные были получены при изучении PAP × *Triticosecale*: увеличение уровня транскрипта гена TsPAP1 и активности пролил-аминопептидазы наблюдалось в ответ на солевой стресс и засуху, а также в присутствии ионов кадмия и аллюминия в питательной среде (Szawłowska *et al.*, 2011, 2012).

Аминопептидаза P

Аминопептидазы P (APP или X-пролил-аминопептидазы) гидролизуют пептидную связь между любой первой аминокислотой и последующим остатком Pro на N-конце олигопептидов и белков. Для катализа реакции необходима свободная аминогруппа на N-конце субстрата и *trans*-конфигурация расщепляемой связи (Lin, Brandts, 1979). Аминопептидаза P способна гидролизовать поли-L-пролин, медленно высвобождать Arg и Pro от N-конца брадикинина (Arg-Pro-Pro-Gly-), Ile в папаине (Ile-Pro-Glu-Tyr-), а также удалять первый а. о. из трипептидов. APP также катализирует расщепление дипептидов, таких как Gly-Pro и Ala-Pro, но значительно медленнее. Пептиды, содержащие гидроксипролин, не гидролизуются (Walter *et al.,* 1980).

Впервые аминопептидаза P была выделена из гетеротрофной бактерии *Escherichia coli* (Wilce *et al.,* 1998). В клетках эукариот имеется три гомолога APP белков, растворимая цитозольная форма, известная как APP1 (Li *et al.,* 2008), мембранносвязанная форма, называемая APP2 (Molinaro *et al.*, 2005), и митохондриальная APP3 (O'Toole *et al.*, 2010). Интересно, что APP3 эволюционно

отличается от других Х-пролил-аминопептидаз, последовательность белка APP3 человека идентична последовательностям APP1 и APP2 только на 12% и 16%, соответственно. На сегодняшний день с помощью рентгеноструктурной кристаллографии определены трёхмерные структуры четырёх ферментов Х-пролил-аминопептидаз: AMPII *E. coli* (Wilce *et al.*, 1998; Graham *et al.*, 2003; 2004; 2005), цитозольной APP1 и митохондриальной APP3 человека (Li *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2017) и APP1 нематоды (Iyer *et al.*, 2015).

В базе данных MEROPS аминопептидаза P (AMPPII) *E. coli* отнесена к подсемейству металлопептидаз M24B. Известно, что AMPPII имеет структуру полой сферы или так называемого «pita-bread» типа («хлебной лепёшки»), для которого характерно наличие консервативного мотива Asp/Asp/His/Glu/Glu. Данный мотив способен связываться с ионами двухвалентных металлов, необходимых для активности фермента. AMPPII представляет собой тетрамер как в растворе, так и в кристаллической форме. Каждая субъединица аминопептидазы P II *E. coli* содержит каталитический сайт, в центре которого расположен двухъядерный марганцевый кластер (Wilce *et al.*, 1998). Кроме того, этот белок обладает высокой гомологией к своему человеческому ортологу – APP3, белку XPNPEP3 (X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P 3)), нарушение функции которого приводит к аутосомно-рецессивному заболеванию почек – нефропатии (O'Toole *et al.*, 2010).

В геноме томата *Lycopersicon esculentum* присутствуют два гена, кодирующие, предположительно, белки аминопептидаз P: LeAPP1 и LeAPP2. Растительные APP оказались идентичны цитозольной и мембраносвязанной аминопептидазам P человека (степень гомологии более 40%). В настоящее время идентифицирована только LeAPP2, которая является Mn^{2+}-зависимым ферментом. Её каталитические свойства, а также структурные особенности указывают на более тесную связь с цитозольными формами APP млекопитающих. Оптимум активности pH 7,5 для LeAPP2 согласуется с её локализацией в цитоплазме. Изучение субстратной специфичности аминопептидазы P томата показало, что она способна

гидролизовать *Xaa-Pro* связи на N-конца брадикинина, а также обладает эндопептидазной активностью, так как способна расщеплять связи -Phe-Gli- в субстанции P (Hauser *et al.*, 2001).

Недавние исследования показали, что растительная аминопептидаза P *A. thaliana* вовлечена в процессинг митохондриальных белков (Huang *et al.*, 2015; Carrie *et al.*, 2015).

Большинство белков, импортируемых в митохондрии, синтезируются в виде белков предшественников, которые содержат N-концевой сигнальный пептид. В матриксе митохондрий сигнальная последовательность предшественника удаляется с помощью митохондриальной процессирующей пептидазой (MPP). В свою очередь, некоторые предшественники белков, после удаления сигнального пептида, могут подвергаться дальнейшим изменениям с помощью промежуточной пептидазы ICP55 (Intermediate Cleavage Peptidase 55). Гомологи ICP55 были найдены в дрожжах (Naamati *et al.*, 2009), растениях (Huang *et al.*, 2015) и млекопитающих (O'Toole *et al.*, 2010).

В зависимости от положения остатка Arg по отношению к сайту расщепления MPP выделяют четыре группы сигнальных последовательностей для митохондриальных белков. Две основные группы сигнальных пептидов содержат Arg либо в положении - 2 (- 2Arg), либо в положении - 3 (- 3Arg) и имеют слабо консервативный мотив вокруг места разрезания Arg-X↓X (где X – любая аминокислота, ↓ – сайт гидролиза пептидной связи) или Arg-X-Phr/Tyr/Leu↓Ala/Ser-X, соответственно. Третья группа включает последовательности, лишённые консервативного Arg рядом с сайтом гидролиза, в то время как четвёртая группа содержит Arg в позиции - 10 и имеет мотив Arg-X↓Phr/Leu/Ile/-X2-Thr/Ser/Gly-X4-X (Teixeira, Glaser, 2013).

Впервые ICP55 была идентифицирована в дрожжах и отнесена к семейству аминопептидаз P (M24B в базе данных пептидаз MEROPS) (Naamati *et al.*, 2009; Vogtle *et al.*, 2009). Интересно, что данный белок имеет двойную локализацию – в митохондриях и ядре клетки (Naamati *et al.*, 2009). В работе Vogtle (Vogtle *et al.*,

2009) было показано, что ICP55 удаляет одну аминокислоту на N-конце митохондриальных предшественников белков в том случае, если они содержат консенсусную последовательность Tyr/Leu/Phr↓Ser/Ala вокруг сайта расщепления. Это отличается от протеолитической активности AMPPII *E. coli*, которая требует остатка Pro строго в позиции P2 молекулы белка (Wilce *et al.,* 1998). ICP55 действует после MPP, которая удаляет сигнальный пептид предшественника, а Arg в позиции - 3 этой последовательности является сигналом не для активности MPP, а указывает на необходимость удаления ещё одного а. о. В результате чего образуются зрелые белки с новыми N-концевыми а. о. (Vogtle *et al.,* 2009).

Анализ сигнальных последовательностей митохондриальных белков в арабидопсисе и рисе показал, что основная их группа также содержит - 3Arg и мотив расщепления, схожий с мотивом гидролиза для ICP55 дрожжей (Huang *et al.*, 2009). Позднее был идентифицирован белок AtICP55, кодируемый одной из форм кДНК гена *At1g09300* в *A. taliana*. Главная функция данного белка заключалась в процессинге митохондриальных белков-предшественников. Анализ деградации белков в изолированных митохондриях *knock-out* мутантов арабидопсиса, дефектных по гену *At1g09300*, показал, что отсутствие AtICP55 изменяет стабильность митохондриальных белков (Huang *et al.*, 2015). С использованием метода ChaFRADIC (charge-based fractional diagonal chromatography, фракционная диагональная хроматография на основе зарядов) были идентифицированы 88 предполагаемых субстратов для AtICP55 с указанием возможных сайтов гидролиза Phr↓Ser и Tyr↓Ala для - 3Arg группы белков, что согласуется с результатами, ранее полученными на дрожжах (Carrie *et al.*, 2015).

Геном цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 содержит ген *sll0136*, который, предположительно, кодирует белок пролин-специфичной аминопептидазы P (PepP) (Sokolenko *et al.,* 2002). В исследовании Пожидаевой с соавт. (Пожидаева *и др.*, 2013), послужившем предпосылкой для данной диссертационной работы, обсуждается роль PepP в биогенезе белков фотосинтетических комплеков.

С использованием глюкозочувствительного немотильного штамма *Synechocystis* авторами был получен инсерционный мутант *ΔpepP*, дефектный по гену *sll0136*. В отличие от ДТ культура клеток мутантного штамма имела желтоватый оттенок, клетки отличались замедленным ростом и пониженным содержанием пигментов. Кроме того, мутант *ΔpepP* оказался чувствительным к повышенному освещению и температуре, что выражалось в обесцвечивании цианобактериальной культуры (Sokolenko *et al.*, 2002; Пожидаева *и др.*, 2013). Исследование ряда белков обеих фотосистем показало, что в клетках мутанта *ΔpepP Synechocystis* содержание белков CP47, D2 комплекса ФСII и белка С-фикоцианина фикобилисом было значительно снижено в сравнении с ДТ, в то время как содержание белков PsaA, PsaD, PsaF комплекса ФСI было, наоборот, увеличено. Так как данные различия могли быть вызваны нарушениями в синтезе и/или стабильности анализируемых белков, были проведены эксперименты по кинетике их накопления с использованием [^{35}S]-метионина. Полученные результаты показали, что у мутанта *ΔpepP* синтез или стабильность белка С-фикоцианина фикобилисом, а также белка D2 комплекса ФСII были снижены, а накопление [^{35}S]-меченых полипептидов PsaD и PsaF комплекса ФСI было несколько выше, чем у ДТ.

1.2. Роль N-концевых аминокислотных остатков в биогенезе белков

Время жизни новосинтезированных белков зависит от многих факторов: структуры, конформационных изменений белковой молекулы, посттрансляционных модификаций белковой цепи и активности протеаз.

Изменения первичной структуры белков в результате мутации генов или ошибок в транскрипции или трансляции, а также определённые посттрансляционные модификации отдельных аминокислотных остатков в белках значительно сокращают время жизни таких белков. В то же время существует ряд посттрансляционных модификаций аминокислот в полипептидах, которые обеспечивают увеличение времени их жизни.

Процесс селективной деградации белков регулируется за счёт формирования и узнавания специфических сигналов деградации (дегронов) в молекуле субстрата. Первичными дегронами могут выступать аминокислотные последовательности белка и/или его конформационные детерминанты, которые делают белок метаболически нестабильным (Varshavsky, 2012). Обычно сигналы деградации расположены внутри одной молекулы-мишени, предназначенной для протеолиза. Однако в ряде случаев, из-за *trans* положения субстрата, части дегрона могут функционировать вместе, даже если они разделены на две полипептидные цепи в составе белкового комплекса. В результате, специфической деградации способна подвергаться определённая белковая субъединица, в то время как остальные останутся нетронутыми (Schrader *et al.*, 2009). Кроме того, скрывать сигналы деградации могут структурные особенности самой молекулы-мишени, доступность которых возможна только после эндопротеолитического расщепления белка, например, сепаразами, каспазами или кальпаинами (Varshavsky, 1997; Ditzel *et al.*, 2003).

Подобные дегроны белков у эукариот узнаются Ub-лигазами, обеспечивающими коньюгацию молекулы Ub с субстратом, что приводит к АТФ-зависимой деградации под действием 26S протеасомы. В клетках прокариот, лишённых системы убиквитинилирования белков, за распознавание дегронов отвечают специфические адаптерные белки, которые доставляют белковые субстраты в камеру деградации Clp протеазы (Tasaki *et al.*, 2012).

Впервые зависимость скорости деградации белка от природы его N-концевого а. о. была продемонстрирована Варшавским, на примере гибридных белков Ub-Xaa-β-галактозидазы (Xaa – любая аминокислота) в клетках *Saccharomyces cerevisiae*. Оказалось, что при помещении некоторых аминокислот на N-конце β-галактозидазы время полураспада белка после естественного деубиквитинилирования было сопоставимо с неубиквитилированной формой субстрата и превышало 20 ч. В случае с другими N-концевыми а. о. время полужизни гибридного белка резко сокращалось до 2-30 мин, а его деградация

проходила по убиквитин-зависимому пути. Описанные заключения породили термины «дестабилизирующих» и «стабилизирующих» а. о., которые позднее были подкреплены наблюдением авторов, заметивших, что N-концевые а. о. метаболически стабильных белков представлены стабилизирующими а. о., в то время как N-концевые а. о. нестабильных белков – дестабилизирующими. В дальнейшем было сформулировано правило N-концевой последовательности или правило Варшавского, указывающее на то, что скорость деградации белка определяется природой его N-концевого остатка (Bachmair *et al.,* 1986; Varshavsky, 1997). Данное правило оказалось справедливым для различных типов клеток и определено для бактерий (Tobias *et al.*, 1991), растений (Bachmair *et al.*, 1993) и млекопитающих (Gonda *et al.,* 1989).

Как и большинство протеолитических каскадов, правило N-концевого пути деградации включает несколько ключевых этапов (рис. 4): 1) условное воздействие N-дегрона на белок-мишень; 2) своевременное и специфическое распознавание сигнала деградации определённым белком; и, наконец, 3) доставка меченого белка к соответствующей протеолитической машине для последующей деградации (Dougan *et al.,* 2010).

Позднее было обнаружено, что помимо первичных дестабилизирующих а. о. существуют также вторичные, а в случае эукариот и третичные дестабилизирующие а. о. Главное отличие последних от первичных заключается в том, что они не являются сигналами для непосредственной деградации молекул-мишеней, а, вместо этого, преобразуются в первичные дестабилизирующие а. о. через ферментативные реакции. Третичные а. о. сначала преобразуются во вторичные дестабилизирующие а. о. с последующим добавлением первичных дестабилизирующих остатков, тем самым маркируя белок для деградации. Интересно, что такая иерархическая организация «правила N-концевой последовательности» эволюционно консервативна, несмотря на различия ферментативных каскадов, вовлечённых в процесс преобразования (Mogk *et al.*, 2007).

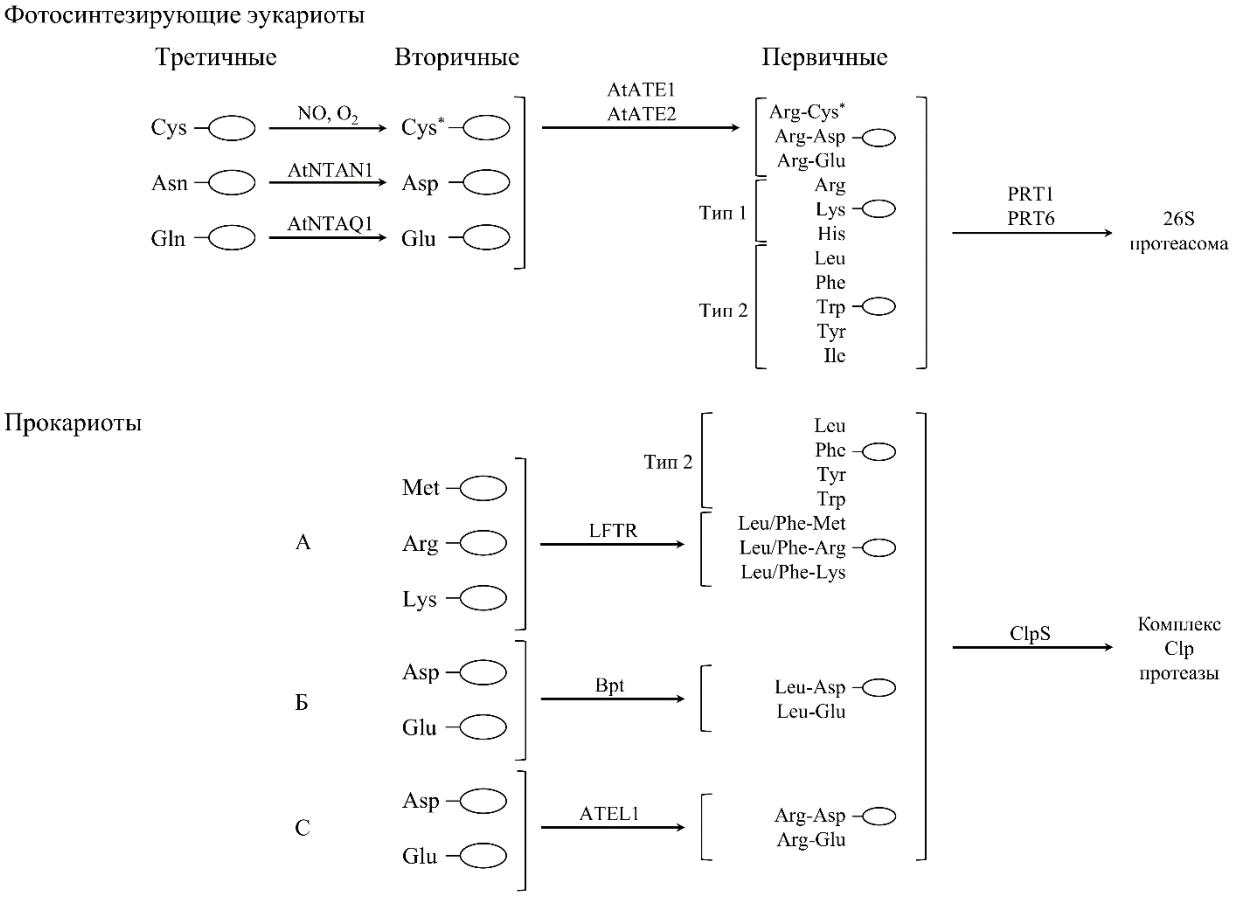

Рис. 4. Правило N-концевой последовательности белков в клетках прокариот (А – *Escherichia coli*, Б – *Vibrio vulnificus*, С – *Plasmodium falciparum*) и фотосинтезирующих эукариот (описание в тексте; адаптировано по Graciet *et al.*, 2010; Dougan *et al.*, 2012). Обозначения: Cys^* – окисленный остаток Cys; Arg, Lys, His – аминокислотные остатки 1-го типа (основные); Leu, Phe, Trp, Tyr, Ile – аминокислотные остатки 2-го типа (гидрофобные); AtNTAN1, AtNTAQ1 – Nt-амидазы; AtATE1, AtATE2, LFTR, Bpt, ATEL1 – тРНК-трансферазы; PR1, PR6, ClpS – белки, распознающие N-концевые дестабилизирующие а. о.; 26S протеасома, Clp – протеолитический комплекс.

1.2.1. Правило N-концевой последовательности в клетках фотосинтезирующих эукариот

В клетках эукариот классификация аминокислотных остатков на дестабилизирующие и стабилизирующие достаточно постоянна, однако ряд структурных компонентов между организмами (дрожжами, животными и

растениями) может различаться (Gibbs *et al.*, 2014). Особое внимание в данном разделе будет уделено растительным организмам.

Для того чтобы определить полный набор стабилизирующих и дестабилизирующих а. о. в растениях, Graciet с коллегами использовали репортерные конструкции, состоящие из Ub, слитого с белком люциферазы светлячка (LUC), которые соединялись через определённый вариабельный а. о. – Xaa. В результате естественного деубиквитинилирования Ub-Xaa-LUC, а. о. Xaa становится N-концевым в репортере Xaa-LUC. Данные репортеры также делают возможной экспрессию долгоживущего белка β-глюкуронидазы (GUS), который необходим для нормализации уровня люциферазы. Таким образом, используя конструкции, описанные в работах Worley (Worley *et al.*, 1998), были получены экспрессионные вектора для репортеров Xaa-LUC со всеми возможными N-концевыми а. о. Затем данными плазмидами осуществлялась агроинфильтрация листьев табака или арабидопсиса с последующим измерением активности GUS и LUC клеточного экстракта в стационарном состоянии (Graciet *et al.*, 2010). В результате Met, Gly, Val, Thr, Ser, и Ala были определены как стабилизирующие а. о., а Gln, Asn, Cys, Glu, Asp, Arg, Lys, His, Leu, Ile, Phe, Trp, и Tyr – как дестабилизирующие. Несмотря на то, что активность репортера Pro-LUC в образцах оказалась очень низкой, авторы не отнесли N-концевой остаток Pro к дестабилизирующим. Данное заключение основывалось на предыдущих работах, показывающих, что деубиквитинилирующие ферменты (DUBs) гидролизуют пептидную связь Ub-Pro медленнее, чем аналогичные пептидные связи между Ub и любой другой аминокислотой (Bachmair *et al.*, 1986).

Белок или а. о., слитый с молекулой убиквитина, в котором N-концевой фрагмент Ub не удаляется с помощью DUBs (например, вследствие изменения последнего остатка Ub) или удаляется медленно (как в случае с Ub-Pro) предназначен для деградации по особому пути – Ub-связывающей деградации (UFD) (Johnson *et al.*, 1992; Hwang *et al.*, 2009). Вероятно, данный путь присутствует и в растениях. Кроме того, в своей работе Worley с коллегами

показал, что экспрессия репортерного белка Ub*-Met-LUC, в котором последние 4 а. о. Ub были удалены (Ub*), была неустойчивой в сравнении с его эквивалентом Met-LUC (Worley *et al.*, 1998).

Таким образом, низкий уровень активности LUC в Ub-Pro-LUC, вероятно, был результатом направленной деградации репортера по UFD пути или вследствие потери активности люциферазы из-за отсутствия деубиквитинилирования (Graciet *et al.*, 2010).

Возвращаясь к Ub-связывающей деградации, стоит отметить, что впервые она была описана у дрожжей (Johnson *et al.*, 1992). Ключевыми компонентами этой системы деградации являются UFD белки. В клетках *S. cerevisiae* были обнаружены 5 генов, кодирующие белки UFD1-UFD5 (Johnson *et al.*, 1995). В растениях гомолог UFD1, кодируемый геном *tufd1*, впервые был идентифицирован у *Triticum aestivum* (Xian-Zhong *et al.*, 2004).

К настоящему времени установлено, что в растительных белках N-концевые Asn, Gln и Cys являются третичными дестабилизирующими а. о. Причём данные остатки становятся N-концевыми только после котрансляционного удаления инициирующего Met с помощью метиониновых аминопептидаз (Bradshaw *et al.*, 1998).

У растений и млекопитающих третичный дестабилизирующий а. о. Cys преобразуется во вторичный при его окислении с участием NO и кислорода, после чего окисленный Cys подвергается аргинилированию (Hu *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Graciet *et al.*, 2010; Gibbs *et al.*, 2011; Gibbs *et al.*, 2014).

Остатки Asn и Gln могут подвергаться дезамидированию с помощью различных N-концевых амидогидролаз (Nt-амидаз): аспарагин-специфичной Nt-амидазы NTAN1 и глутамин-специфичной NTAQ1. Гены *At2g44420* и *At2g41760*, кодирующие белки AtNTAN1 и AtNTAQ1 у *A. thaliana*, соответственно, были идентифицированы Graciet как ортологи Nt-амидаз млекопитающих (Graciet *et al.*, 2010). Третичные дестабилизирующие а. о. Asn и Gln, через их дезамидирование, преобразуются во вторичные а. о.: Asp и Glu, соответственно. В свою очередь,

вторичные дестабилизирующие а. о. подвергаются аргинилированию. В данном процессе участвуют Arg-тРНК-трансферазы (R-трансферазы), которые переносят остаток Arg с тРНК на N-конец α-аминогруппы первого а. о. белка.

В геноме *A. thaliana* присутствуют два родственных гена, *At5g05700* и *At3g11240*, которые кодируют белки R-трансфераз AtATE1 и AtATE2, соответственно (Yoshida *et al.*, 2002; Graciet *et al.*, 2009 b). Эволюционный анализ последовательностей ATE белков выявил ортологи генов растительных R-трансфераз в *Chlamydomonas reinhardtii* (Domitrovic *et al.*, 2017). Причём в отличие от зелёных водорослей, *knock-out* мутанты по ATE белкам не приводят к потере жизнеспособности растений. В мутантных растениях арабидопсиса *dls1* (*Arabidopsis senescence 1*), дефектных по гену *At5g05700*, и возрастное и индуцированное темнотой старение листьев оказалось замедленным в отличие от растений дикого типа (Yoshida *et al.*, 2002).

Первичные дестабилизирующие а. о. Arg, Lys, His (основные) и Leu, Phr, Thr, Tyr, Ile (гидрофобные) узнаются E3 лигазой. У растений обнаружено два консервативных белка, различающихся по своей структуре PRT1 и PRT6 (proteolysis 1 и 6), способных распознавать гидрофобные и основные N-концевые дестабилизирующие а. о., соответственно (Potuschak *et al.*, 1998; Stary *et al.*, 2003; Garzon *et al.*, 2007). В ряде работ было показано, что PRT6, AtATE1 и AtATE2 участвуют в прорастании семян *A. thaliana*, контролируемом абсцизовой кислотой (Holman *et al.*, 2009), а также в регуляции морфологии листьев, апикальном доминировании и удлинении стебля (Graciet *et al.*, 2009 b; Graciet, Wellmer, 2010).

В то же время, мутантные растения *A. thaliana Δate1/ate2* или *Δprt6* были не способны деградировать чувствительный к этилену транскрипционный фактор VII (ERFVII), что приводило к повышенной экспрессии генов, восприимчивых к гипоксии (Gibbs *et al.*, 2011; Licausi *et al.*, 2011). В дальнейшем был предложен механизм регуляции ERFVII, который заключался в том, что окисленный N-концевой остаток Cys данного белка подвергался аргинилированию, в результате чего происходила деградация субстрата. Данная реакция катализируется в

присутствии цистеиновых оксидаз растений, которые способны окислять N-концевые остатки Cys, используя кислород в качестве ко-субстрата (Weits *et al.*, 2014). Действительно, все пять белков ERF группы VII *A. thaliana* имели идентичные N-концевые участки Met-Cys, накапливались в условиях низкого содержания кислорода и дестабилизировались в его присутствии (Gibbs *et al.*, 2011, 2015). Позднее было показано, что данные белки также «дестабилизируются» при наличии оксида азота (Gibbs *et al.*, 2014). По всей видимости, механизм регулирования стабильности ERFVII белков тот же, что и у млекопитающих: в присутствии NO и кислорода происходит убиквитин-зависимая деградация субстрата вследствие преобразования N-концевого Cys в молекуле белка в Cys-сульфоновую кислоту и последующего аргинилирования (Hu *et al.*, 2005; Jaba *et al.*, 2013).

Одной из модификаций первых а. о. в растительных белках, приводящих к их деградации, также является ацетилирование, в процессе которого участвуют N-концевые ацетил-трансферазы (NAT). Роль NAT белков заключается в переносе ацетильной группы из ацетил-кофермента А на N-конец α-аминогруппы первого а. о. белка (Starheim *et al.*, 2012). Ацетилированной аминокислотой может быть инициаторный Met или другой первый остаток (Ala, Cys, Ser, Thr, Val, Pro, Gly) белка после удаления метионина MAP. В свою очередь, N-концевые остатки Gly и Pro в дрожжах редко подвергаются ацетилированию. Большое количество и разнообразие субстратов для подобного ацетилирования в значительной степени обусловлено наличием различных N-концевых ацетил-трансфераз NATA-NATF, а также локализованной в хлоропласте AtNaa70 (Dinh *et al.*, 2015). Потеря функции NATA, NATB или NATC в растениях приводит к летальности или возникновению негативных плейотропных эффектов (Gibbs, 2015). В своей работе Xu с соав. показал, что иммунный рецептор SNC1 *A. taliana* содержит два различных N-концевых варианта белка, начинающихся с Met-Met-Asp и Met-Asp, которые дифференциально регулируются NATA и NATB ацетил-трансферазами, соответственно (Xu *et al.*, 2015). Более интересно, что NATA ацетилирует первый

а. о. на N-конце белка SNC1, начинающегося с Met-Met-Asp, и запускает его деградацию, а NATB, напротив, стабилизирует SNC1 путём ацетилирования Met-Asp (Gibbs, 2015; Xu *et al.*, 2015). Стоит отметить, что растительные белки, способные распознавать подобные N-дегроны, ещё не обнаружены.

1.2.2. Правило N-концевой последовательности в клетках прокариот

В отличие от эукариот, у прокариот выделяют только первичные и вторичные N-концевые дестабилизирующие а. о. (рис. 4). Первоначально в качестве вторичных дестабилизирующих а. о. бактерий были опеределены Arg и Lys (Tobias *et al.*, 1991), позднее к ним также были отнесены Met (Ninnis *et al.*, 2009), Asp и Glu (Graciet *et al.*, 2006).

Вторичные дестабилизирующие а. о. способны подвергаться лейцилированию или фенилаланилированию с помощью аминоацил-тРНК-трансфераз. В данном процессе участвуют два класса белков: лейцин/фенилаланил-тРНК-транфераза (L/F-трансфераза, LFTR) и лейцин-тРНК-трансфераза (L-трансфераза).

Белок LFTR в клетках *E. coli*, кодируемый геном *aat*, переносит остатки Leu или Phe на акцепторы Arg и Lys (Leibowitz, Soffer 1971; Watanabe *et al.*, 2007a). Однако, дальнейшее изучение субстратной специфичности EcLFTR привело к неожиданному открытию: N-концевой акцепторный остаток в идентифицированном природном субстрате – путресцин аминотрансферазе (PAT) был ни аргинином и ни лизином, а метионином (Ninnis *et al.*, 2009). Это позволило предположить, что инициирующий Met может действовать как вторичный дестабилизирующий а. о. В свою очередь, стоит отметить, что Met-β-галактозидаза не является субстратом для L/F-трансферазы и остаётся стабильной в клетках *E. coli* (Ninnis *et al.*, 2009), следовательно, идентификация белков-мишеней для EcLFTR требует дальнейшего изучения.

Вероятно, сохранение инициирующего Met в молекулах белков вследствие неспособности его удаления под действием метиониновых аминопептидаз

позволяет коньюгировать Leu или Phe с помощью белка LFTR, как в случае с путресцин аминотрансферазой. Однако несмотря на то, что около 20% всех белков *E. coli*, в том числе и PAT, должны сохранять N-терминальный Met (Frottin *et al.*, 2006), данный путь образования N-дегронов нельзя назвать основным. Скорее всего, инициирующий Met действует как «условный» акцепторный остаток для LFTR (Ninnis *et al.*, 2009), а связывание L/F-трансферазы зависит от биохимической природы следующего за Met а. о. (Dougan *et al.*, 2010).

Другая бактериальная аминоацил-тРНК-трансфераза была идентифицирована в человеческом патогене *Vibrio vulnificus*. Белок данной L-трансферазы, кодируемый геном *bpt*, обладает сходством с эукариотической R-трансферазой ATE1 и проявляет «гибридную» специфичность. Подобно ATE1, Bpt распознаёт N-концевые Asp или Glu в качестве вторичных дестабилизирующих а. о., но добавляет к ним Leu вместо остатка Arg, как и LFTR *E. coli*. Интересно, что у *Vibrio vulnificus* гены обеих аминоацил-тРНК-трансфераз (Aat и Bpt) транскрибируются в рамках одного оперона (Graciet *et al.*, 2006). Такая тандемная структура гена *aat-bpt* характерна для ряда β- и γ-протеобактерий, но не для *E. coli* и других энтеробактерий (Tasaki *et al.*, 2012).

Кроме того, в геноме *Plasmodium falciparum*, который вызывает малярию у человека, обнаружен третий тип трансфераз ATEL1. Белок ATEL1, подобно прокариотической L/F-трансферазе, распознаёт N-концевые Asp и Glu, но обладает ферментативной специфичностью эукариотических R-трансфераз и связывает с вторичными дестабилизирующими а. о. Arg (Graciet *et al.*, 2006).

Первичные дестабилизирующие а. о., к которым относятся Leu, Phe, Tyr и Trp, распознаются бактериальным адаптерным белком ClpS. N-дегрон молекулы-мишени попадает в небольшую гидрофобную полость на поверхности белка ClpS и доставляется к сайту связывания ClpA комплекса ClpAP протеазы (в случае *E. coli*) для последующей деградации (Dougan *et al.*, 2010).

Позднее, в работе Piatkov (Piatkov *et al.*, 2015) было показано, что формилированный первый остаток Met (fMe) в белках способен действовать как

сигнал N-концевой деградации в бактериальных клетках, митохондриях и хлоропластах эукариот. В качестве примера можно привести описанный fMet сигнал деградации белка D2. Когда данный белок эскпрессируется в хлоропластах растений, его N-концевой Met подвергается формилированию, подобно бактериальным белкам, после чего деформилируется двумя хлоропластными деформилазами, а остаток Met удаляется с помощью MAP. Удаление деформилированного метионина становится возможным, так как за ним следует остаток Thr. Данный белок является относительно долгоживущим в нормальных условиях, однако стал короткоживущим в присутствии актинонина, который ингибирует действие деформилаз (Giglione *et al.*, 2003; Adam *et al.*, 2011). В свою очередь, замена второго остатка Thr в молекуле белка на Asp или Glu привела к тому, что мутантный белок D2 стал короткоживущим в хлоропластах даже в отсутствие актинонина, то есть в отсутствие ингибирования деформилаз (Giglione *et al.*, 2003; Adam *et al.*, 2011). Первоначально полагали, что ускоренная деградация мутантного белка D2 связана с неспособностью MAP удалять деформилированный Met, вследствие больших а. о. Asp или Glu в позиции 2 белка, в отличие от белка D2 дикого типа (Adam *et al.*, 2011). Однако результаты Piatkov (Piatkov *et al.*, 2015) позволили предположить иную интерпретацию приведённых выше данных, основанную на существовании fMet N-дегрона. Ключевой момент исследования заключался в том, что быстро и медленно формилируемые репортерные белки подвергались деградации с различной скоростью в клетках в *E. coli* дикого типа, в то время как данный эффект отсутствовал в клетках мутанта, лишённого деформилазы.

К настоящему времени не удалось идентифицировать белки, способные узнавать формилированный остаток метионина в качестве сигнала деградации. Существует предположение, что в качестве подобного фермента может выступать протеасом-подобная протеаза FtsH (Piatkov *et al.*, 2015). Ранние исследования идентифицировали FtsH, как протеазу, разрушающую белок YfgM *E. coli* (Bittner *et al.*, 2015). Piatkov с коллегами полагает, что N-дегрон YfgM на самом деле

представляет собой формил-метионин (Piatkov *et al.*, 2015). Стоит отметить, что протеаза ClpXP не способна узнавать fMet, поскольку её активность *in vitro* не зависела от присутствия или отсутствия N-концевого формилирования тестового белка (Spector *et al.*, 2003).

Большинство исследователей полагает, что для клеток цианобактерий характерен прокариотический путь направленной деградации белков, согласну правилу N-концевой последовательности Варшавского. Данное утверждение также подтвержает тот факт, что геном *Synechocystis* содержит гомолог гена *aat E. coli*, кодирующего L/F-трансферазу. В опытах Ichetovkin (Ichetovkin *et al.*, 1997) рекомбинантная L/F-трансфераза *Synechocystis in vivo* была способна восстанавливать мутантный штамм *Δaat E. coli.*

Известно, что цианобактериальная клетка лишена 26S протеасомы, функцию которой выполняет комплекс Clp-протеазы. В отличие от *E. coli, Synechococcus elongatus* PCC 7942 содержит несколько паралогов ClpP (ClpP1, ClpP2 и ClpP3), а также ClpP-подобный белок ClpR, который не имеет каталитической триады, типичной для протеаз серинового типа (Schelin *et al.*, 2002). Каждая Clp-протеаза образована уникальным протеолитическим ядром, которое ассоциировано с конкретным белком-партнёром (шапероном Hsp100): ClpP1/ClpP2 взаимодействует с ClpX, а ClpP3/ClpR – с ClpC. В свою очередь с шапероном ClpC способен взаимодействовать один из двух низкомолекулярных адаптерных белков, ClpS1 или ClpS2, что позволяет специфически изменять связывающие свойства регуляторной субъединицы и целенаправленно деградировать отдельные белки в определённое время (Stanne *et al.*, 2007). Что также подтверждается различной субстратной специфичностью ClpS белков в *Synechococcus elongatus* PCC 7942: ClpSl распознавал а. о. Phe, Tyr, Trp на N-конце субстратов, тогда как ClpS2 – инициаторные а. о. Leu, Phe, Tyr, Val или Ile в молекулах-мишенях (Tryggvesson *et al.*, 2012; Stein *et al.*, 2016). Отметим, что распознавание адаптерным белком Val и Ile не характерно для прокариотических организмов и может быть связано с различиями в аминокислотной последовательности ClpS белков. Например, в

отличие от консервативного Met у ClpS1 *Synechococcus elongatus* или ClpS *E. coli*, который исключает попадание а. о. с разветвлёнными боковыми цепями (Leu, Val, Ile) в связывающий карман белка, у ClpS2 данное положение занимает Phe74 (Stein *et al.*, 2016).

Таким образом, в цианобактериях распознавание определённых дестабилизирующих а. о. может достигаться за счёт экспрессии различных ClpS белков по аналогии с E3 убиквитин лигазами эукариот. Подобный механизм мог возникнуть вследствии эволюционных изменений связывающих свойств адаптерных белков ClpS, повлёкших, в свою очередь, расширение или сужение их субстратной специфичности (Stein *et al.*, 2016).

1.3. Цианобактерия как модельный объект исследования

Цианобактерии включают многочисленную и разнообразную группу фотосинтезирующих прокариотических организмов, которые широко используются в качестве модельных систем для фундаментальных исследований механизмов фотосинтеза, стрессовых ответов и эволюционных процессов. Благодаря высокой скорости самовозобновления и способности к образованию различных веществ они также нашли своё практическое применение в биотехнологии (Sarsekeyeve *et al.*, 2015; Wijffels *et al.*, 2013).

Среди всего разнообразия цианобактерий выделяют одноклеточную неазотфиксирующую *Synechocystis* sp. PCC 6803. Благодаря полному секвенированию генома, включая четыре эндогенные плазмиды, к настоящему времени аннотировано более 3000 цианобактериальных генов (Kaneko *et al.*, 1995, 1996, 2003). Клетки *Synechocystis* демонстрируют универсальный углеродный метаболизм и характеризуются быстрым ростом в широком спектре условий, о чём свидетельствует способность к фотоавтотрофному, миксотрофному и гетеротрофному культивированию (Vermaas, 1996). Кроме того, *Synechocystis* sp. PCC 6803 отличается природной компетентностью (Zang *et al.*, 2007). Благодаря такой способности к естественной трансформации экзогенной ДНК (Grigorieva,

Shestakov, 1982) бактерия часто применяется для генетического анализа и инсерционного мутагенеза. В настоящее время база данных WoS (Web Of Science, *http://apps.webofknowledge.com*; поиск по забросу «*Synechocystis* 6803») содержит свыше 4800 иследований из более 1300 лабораторий, в которых используется *Synechocystis*.

Оригинальный штамм *Synechocystis* («Berkeley») был выделен Kunisawa в Окленде (Калифорния, США) в 1968 г. (Stanier *et al.*, 1971), после чего – внесён в Коллекцию культур Института Пастера (штамм PCC 6803) и в Американскую коллекцию типовых культур (штамм ATCC 27184). Однако последующее культивирование микроорганизмов в лабораториях привело к появлению подштаммов, имеющих различия как на уровне фенотипа, так и на уровне генотипа. В результате повторного секвенирования геномов удалось выявить некоторые мутации в генах, вовлечённых в процессы фотосинтеза, транспорта или подвижности цианобактерий (Ding *et al.*, 2015; Zavřel *et al.*, 2017).

В настоящем исследовании использовали *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT-L, геном которого идентичен геному GT-Kazusa (Миронов, 2011). Цианобактерия характеризуется оптимальным ростом при температуре 32-35°C (Zavřel *et al.*, 2015). Исследование различных подштаммов *Synechocystis* показало, что GT-L особо чувствителен к присутствию соли в питательной среде, что выражалось в ингибировании роста клеточной культуры при добавлении 0,5 M NaCl (Zavřel *et al.*, 2017). Стоит отметить, что для всех немотильных подштаммов *Synechocystis* характерно наличие однонуклеотидной делеции в гене *slr0162*, кодирующем белок PilC (полипептид, необходимый для сборки всех компонентов пилей). Как известно, инактивация гена *pilC* у *Synechocystis* приводит к потере подвижности цианобактериальной клетки (Bhaya *et al.*, 2000). Однако, генотип GT-Kazusa (и GT-L, соответственно) содержит 1 п. н. инсерцию в гене *slr0162*, приводящую к мутации со сдвигом рамки считывания, и, как следствие, к формированию укороченного белка PilC (Ding *et al.*, 2015).

1.3.1. Структура цианобактериальной клетки

Согласно существующей классификации, цианобактерии относятся к группе грамм-отрицательных бактерий. Цианобактериальная клетка (рис. 5) имеет клеточную оболочку, состоящую из цитоплазматической мембраны, пептидогликанового слоя и наружной мембраны (Hoiczyk, Hansel, 2000). Между оболочкой и наружной мембраной расположен S-слой гликанов, который играет важную роль в архитектонике клетки (Trautner, Vermaas, 2013). Тем не менее, эти

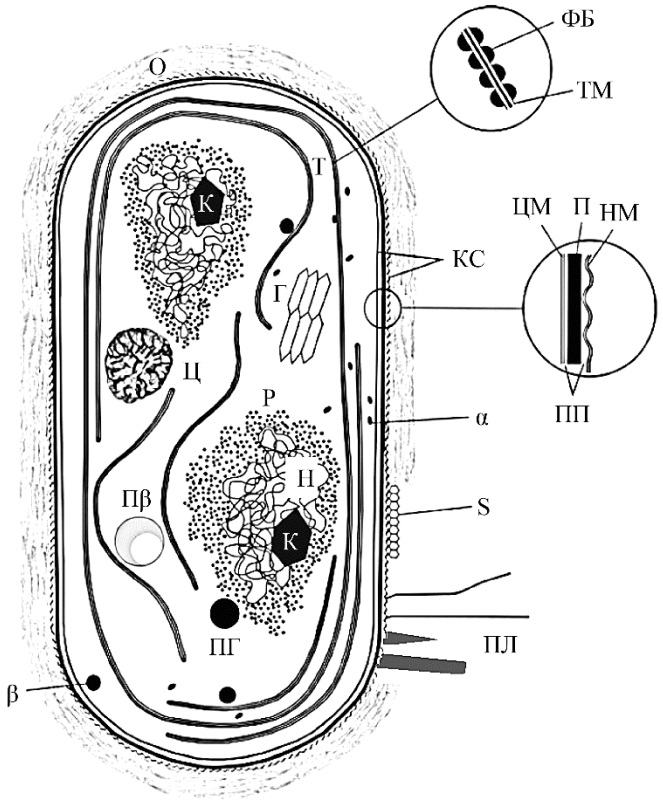

Рис. 5. Схематическое изображение цианобактериальной клетки (Baulina, 2012). Обозначения: α – гранулы α-гликогена; β – липидные β-гранулы; Ц – гранула цианофицина; ЦМ – цитоплазматическая мембрана; К – карбоксисома; КС – клеточная стенка; Г – газовые визикулы; Н – нуклеоид; НМ – наружная мембрана; П – пептидогликан; ФБ – фикобилисома; Пβ – гранулы поли-β-гидроксибутирата, ПЛ – пили; ПГ – гранула полифосфата; ПП – периплазматическое пространство; Р – рибосомы, S – S-слой, О – оболочка; Т – тилакоид; ТМ-тилакоидная мембрана.

организмы являются уникальными среди данной группы бактерий, так как обладают внутренней системой тилакоидных мембран, содержащих крупные белковые комплексы фотосинтетической и дыхательной цепи переноса электронов.

Цианобактерии *Synechocystis* представляют собой клетки сферической формы диаметром около 2,3-2,6 мм (Herdman *et al.*, 2013), изучение внутриклеточной организации которых стало возможным благодаря результатам электронной микроскопии (Liberton *et al.*, 2006, van de Meene *et al.*, 2006).

Для адаптивных перестроек или в качестве защитного механизма в различных условиях окружающей среды цианобактериальная клетка способна изменять свою морфологию для поддержания максимального роста и размножения (Singh, Montgomery, 2011; Montgomery, 2015). Известно, что размер клетки координируется компонентами цитоскелета, белками пептидогликанового слоя и участниками клеточного деления.

В число белков, необходимых для синтеза пептидогликанового слоя, входят пенициллинсвязывающие белки (PBP). Ранее было показано, что PBP белки класса А в *E. coli* вовлечены в удлинение клетки и формирование септы в процессе цитокинеза (den Blaauwen *et al.*, 2008). Изучение мутантных штаммов цианобактерий, дефектных по PBP-подобным белкам различных классов, показало (PBP1-8) их важную роль в клетках *Synechocystis* (Marbouty *et al.*, 2009a). Мутанты, лишённые белка PBP2 (класс А PBP-белков), кодируемого геном *slr1710*, оказались в 1,5 раза меньше клеток ДТ. В то время, как инактивация гена *sll1833*, кодирующего белок FtsI (или PBP4, класс PBP-белков), наоборот, приводила к формированию гигантских клеток *ΔftsI*, образующих клеверные структуры. Такой фенотип был вызван замедленным цитокинезом, в результате чего дочерние клетки начинали новый процесс деления, не завершив септацию (Marbouty *et al.*, 2009a).

Ключевым механизмом бинарного деления материнской клетки на две дочерние служит формирование септы, в процессе которого участвует белок FtsZ (тубулин-подобная ГТФаза). FtsZ, нуклеотид-связывающий белок, способен к полимеризации-деполимеризации и формированию Z-кольца в плоскости деления.

В данном процессе также участвуют *min*-гены, определяющие экваториальное положение будущей септы. Контролируемое изменение экспрессии генов min-системы может приводить к нарушению клеточного деления за счёт ингибирования полимеризации FtsZ и, как следствие, к формированию удлинённых клеток *Synechococcus elongatus* (Jordan *et al.*, 2017).

В число белковых компонентов, вовлечённых в контроль клеточного деления, также входят белки Ftn2 и Ftn6. Примечательно, что в составе первого обнаружен N-концевой шаперонный домен DnaJ (6-70 а. о.). Инактивация генов *ftn2* и *ftn6* у *Synechococcus* sp. PCC 7942 приводила к изменениям в процессе деления клеток, образованию длинных филаментов, а также к ультраструктурным нарушениям цианобактерий (Gorelova *et al.*, 2013).

Обсуждаемый ранее шаперонный домен опосредует взаимодействие Ftn2 с белком DnaJ, инактивация гена которого также приводит к филаментному фенотипу. Помимо *Synechococcus*, данный мотив также присутствует в составе гомолога Ftn2 – белка ZipN, кодируемого геном *sll0169* у *Synechocystis* (Koksharova, Wolk, 2002; Gorelova *et al.*, 2013). Экспериментально показано, что DnaJ домен белка необходим для связывания ZipN с филаментными структурами, образованными молекулами FtsZ (Mazouni *et al.*, 2004; Marbouty *et al.*, 2009a). Отсюда следует, что белок Ftn2 вовлечён в шаперонную систему *in vivo* и стабилизирует сборку филаментов FtsZ.

К увеличению размера клеток также может приводить изменение секреции экзополисахаридов (Foster *et al.*, 2009) и метаболизма углерода (Lea-Smith *et al.*, 2016).

Ряд филогенетических исследований различных штаммов цианобактерий на основе последовательностей 16S рРНК показал сходство *Synechocystis* и *Merisamopedia* (Wilmotte, Herdman, 2001), которая способна формировать колонии из 4-64 клеток (Roy, Pal, 2015).

Цианобактерия *Synechocystis* sp. PCC 6803 подразделяется на мотильные и не мотильные подштаммы. Первые за счёт наличия пилей IV типа могут осуществлять

светонаправленный фототаксис и проявлять адгезивные свойства, прилипая к абиотическим поверхностям и другим клеткам (Bhaya *et al.*, 2000; Yoshihara *et al.*, 2001; Yoshihara, Ikeuchi, 2004). В свою очередь, оседание цианобактериальной культуры на поверхности вегетационных сосудов также характерно и для немотильного подштамма GT-L (Zavřel *et al.*, 2015). Например, инактивация компонентов ABC-транспортёра – генов *slr0977* и *slr0982* у мутантных штаммов *Synechocystis*, вовлечённых в транслокацию О-антигенов (О-специфических полисахаридных цепей, структурных компонентов липополисахаридов) через внутреннюю мембрану, также приводила к усилению адгезивных свойств цианобактериальных клеток (Fisher *et al.*, 2013). Мутантные штаммы цианобактерий, дефектные по гену рецептора этилена SynEtr1 (Synechocystis Ethylene Response1) с изменённой секрецией экзополисахаридов были склонны к образованию клеточной взвеси, которая, однако, меньше прилипала и легче смывалась со стеклянной поверхности в отличие от клеток ДТ (Lacey, Binder, 2016). С другой стороны, адсорбирование цианобактериальных клеток может быть вызвано действием различных стрессоров: повышенное содержание этанола (Qiao *et al.*, 2012) или бутанола (Tian *et al.*, 2013) в среде также приводило к видимой агрегации клеток *Synechocystis*.

Большая часть внутриклеточного пространства цианобактерии заполнена тилакоидными мембранами. Тилакоидные мембраны *Synechocystis* в поперечном сечении выглядят как тонкие двухслойные нити с отчётливым люменальным пространством 5-7 нм (Liberton *et al.*, 2006). В отличие от мембран хлоропластов, тилакоиды цианобактерий не образуют стопки гран и стромы ламелей (Gantt, 1994).

У *Synechocystis* большинство тилакоидных мембран располагается в виде концентрических слоёв вдоль плазматической мембраны, часть из них образует большие петли и завитки во внутренее пространство клетки. В обоих случаях, тилакоиды находятся на определённом расстоянии друг от друга и от плазматической мембраны (Liberton *et al.*, 2006). Это пространство составляет

около 50 нм, что соответствует ранее установленному размеру фикобилисом, ассоциированных с фотосистемами и выполняющих функцию светособирающего комплекса в цианобактериях (Anderson, Toole, 1998). В клетках *Synechocystis* тилакоидные мембраны чаще всего образуют от 3 до 6 слоев, реже 8. Помимо упорядоченных мембранных слоёв клетки цианобактерий также могут содержать одиночные тилакоиды (Liberton *et al.*, 2006).

Тилакоидные мембраны цианобактерий, как динамичная система, претерпевают значительные и быстрые структурные изменения в процессе биогенеза и в ответ на изменения окружающей среды. Например, прямое или опосредованное изменение содержания белков фотосинтетических комплексов может приводить к нарушениям в морфологии тилакоидных мембран *Synechocystis* (Nilsson *et al.*, 1992; van de Meene *et al.*, 2012; Rast *et al.*, 2016, Collins *et al.*, 2012; Fuhrmann *et al.*, 2009; Barthel *et al.*, 2012).

На стромальной стороне внутренней мембраны тилакоидов расположены небольшие гранулы – фикобилисомы (Gannt, Conti, 1966), выполняющие функцию светособирающего комплекса. Фикобилисомы связаны с цитоплазматической стороной фотосинтетических мембран, поэтому между тилакоидными мембранами достаточно пространства для двух рядов фикобилисом, смещённых относительно друг друга (Anderson, Toole, 1998).

1.3.2. Светособирающий комплекс (фикобилисомы) цианобактерий

В цианобактериальных клетках поглощение световой энергии для фотосинтеза и её перенос в направлении фотосистем внутренних мембран осуществляется с помощью гигантских мультисубъединичных пигмент-белковых комплексов – фикобилисом (3-7 МД) (Стадничук *и др.*, 2015). Фикобилисомы являются высокомолекулярными белковыми комплексами, присутствующими в цианобактериях, красных водорослях и цианеллах (Adir, 2005; Glazer, 1989). Они могут составлять до 40% от общего клеточного белка.

С помощью электронной микроскопии были визуализированы фикобилисомы, различающиеся по своей морфологии. Полудисковидные фикобилисомы характерны для большинства видов цианобактерий. Форма полудисков обусловлена наличием центрального ядра, которое формирует треугольный контур, и больших цилиндров одинакового диаметра, расположенных в виде веера вокруг ядра (Стадничук *и др.*, 2015). В частности, у *Synechocystis* ядро светособирающего комплекса состоит из трёх цилиндров (Elmorjani *et al.*, 1986), в то время как у других видов цианобактерий оно может включать два (Yamanaka *et al.*, 1980) или пять цилиндров (Glauser *et al.*, 1992).

В состав фикобилисом входят уникальные светособирающие белки – фикобилипротеины, которые отсутствуют у высших растений (Middepogu *et al.*, 2012). Именно они определяют цвет цианобактериальной клетки. Фикобилисома *Synechocystis* содержит только два типа фикобилипротеинов: аллофикоцианин (АФЦ) в ядре и С-фикоцианин (С-ФЦ) в лучах. Такое расположение пигментов не является случайным, а отвечает условию оптимальности миграции энергии от коротких длин волн к более длинным: С-ФЦ (λ_{max} = 620 нм) → АФЦ (λ_{max} = 652 нм) → Хлорофилл а (λ_{max} = 680 нм).

Фикобилипротеины – это яркие, растворимые в воде белки, несущие различное число хромофоров (или кофакторов). Все кофакторы фикобилисом принадлежат к семейству билинов. Они относятся к линейным тетрапирролам, которые отличаются друг от друга числом и положением сопряжённых двойных связей (Adir, 2008). Фикобилины являются основными светособирающими пигментами цианобактерий. В отличие от хлорофиллов, они не содержат атомы металлов (Быховский, Зайцева, 1989). Есть три типа фикобилинов: фикоцианобилин, фикоэритробилин и фикоуробилин. В цианобактериях присутствуют только первые два типа хромофоров (Middepogu *et al.*, 2012). В структуре фикобилисом билин-содержащие белки необходимы для настройки области спектра поглощения света цианобактериальной клеткой.

У *Synechocystis* аллофикоцианин, и фикоцианин содержат только один тип кофакторов – фикоцианобилин, имеющий восемь сопряжённых двойных связей. В фикобилипротеине хромофоры ковалентно связываются с а. о. Cys апопротеина через тиэфирную связь: АФЦ имеет два хромофора; а С-ФЦ – три (Стадничук *и др.*, 2015).

Фикобилисома, связанная с тилакоидной мембраной, представлена на рис. 6. Основным строительным компонентом в сборке фикобилисомы является мономер. Мономер белка состоит из двух одинаковых, но не идентичных полипептидных цепей, обозначающихся как α и β-субъединицы. В результате объединения трёх мономеров образуется триммерное кольцо или триммер. Взаимодействуя через α-субъединицы, два таких кольца формируют гексамер С-фикоцианина. Четыре

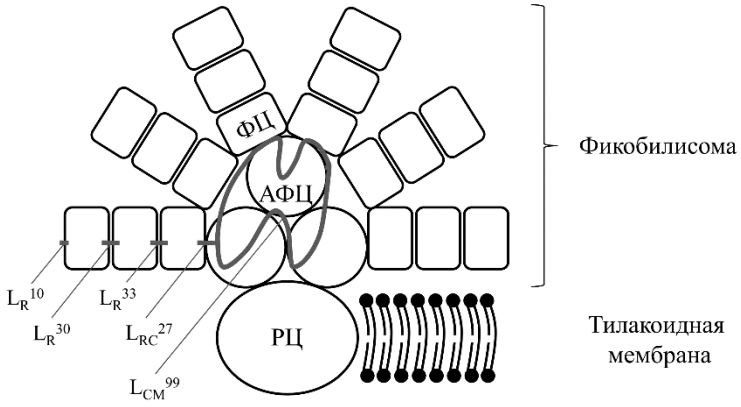

Рис. 6. Схематическое изображение фикобилисомы из одноклеточной цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 (адаптировано по Marx *et al.*, 2014).

Обозначения: ФЦ – фикоцианин; АФЦ – аллофикоцианин; РЦ – реакционный центр ФСII; L_R – линкерные белки, связывающие дистальные блоки фикоцианина; L_{RC} – линкерный белок, соединяющий лучи фикобилисом с ядром аллофикоцианина; L_{CM} – линкерный белок, соединяющий ядро фикобилисомы с тилакоидной мембраной.

триммера аллофикоцианина образуют центральный цилиндр. В формировании ядра фикобилисомы участвуют 3 цилиндра аллофикоцианина. Шесть стержней или лучей ССК *Synechocystis* состоят из гексамеров, уложенных друг на друга через взаимодействия β-субъединиц фикоцианина. Цилиндры ядра и лучей образуют

структуры, которые напоминают полые трубки с достаточным пространством для размещения линкерных белков (Marx *et al.*, 2014).

В сборке фикобилисомы принимают участие различные линкерные белки непигментной природы. Полипептиды боковых цилиндров с мол. масс. от 10 до 33 кД обозначаются L_R (rod – цилиндр). Они участвуют в сборке дистальных блоков С-фикоцианина в лучи фикобилисомы. Терминальный L_R^{10} обеспечивает ограничение роста боковых цилиндров, контролируя их число и количество дисков в них. Белок L_{RC} (core – ядро, rod – цилиндр) с мол. масс. 27 кД соединяет боковые цилиндры с ядром. Линкер L_{CM} (core – ядро, membrane – мембрана) с мол. масс. 99 кД обеспечивает связывание дисков аллофикоцианина в ядро. Данный полипептид также играет ключевую роль: 1) в закреплении фикобилисомы на фотосинтетической мембране (возможно, через прямое взаимодействие с ФСII) и 2) при настройке свойств фикобилинов таким образом, что поглощённые кванты световой энергии направляются в сторону фотосистем. Помимо направленного связывания фикобилисомных структур в единую органеллу, линкерные белки, соединяясь с агрегатами фикобилипротеинов, меняют их спектральные свойства, обеспечивая длинноволновые сдвиги максимумов поглощения; участвуют в образовании пигментных субкомплексов – конечных акцепторов энергии в ядре фикобилисом (Стадничук *и др.*, 2015).

В настоящее время в исследованиях ФКБ активно используются мутантные штаммы цианобактерий с различной архитектурой и композицией ССК. Благодаря многочисленным исследованиям, известно, что в формировании лучей фикобилисом участвуют гены, образующие *cpc* оперон: *cpcB* (кодирует β субъединицу ФЦ) → *cpcA* (кодирует α субъединицу ФЦ) → *cpcC*2 (кодирует L_R^{30}) → *cpcC1* (кодирует L_R^{33}) → *cpcD* (кодирует L_R^{10}). В синтез α и β субъединиц АФЦ вовлечены гены *apcA* и *apcB*, соответственно. Оставшиеся линкерные полипептиды кодируются генами: L_{RC} – *cpcG*, L_{CM} – *apcE*. В ходе инактивации различных компонентов фикобилисом удалось получить мутантные штаммы цианобактерий с изменённой структурой ССК. Основные культуры, используемые в работах,

представлены мутантными штаммами: *ΔCK* (*ΔcpcBAC2C1*) – полностью лишён антенн ФЦ; *ΔcpcC2* – содержит два блока ФЦ, *ΔCB* (*ΔcpcC2C1*) – только один блок ФЦ в структуре фикобилисом, в *ΔPAL/olive* (*ΔapcABE*) отсутствует сборка ФКБ и их связь с мембраной (Ughy, Ajlani, 2004; Collins *et al.*, 2012; Lea-Smith *et al.*, 2014; Kirst *et al.*, 2014).

1.3.3. Фикобилисомы цианобактерий в условиях стресса

Фикобилисома представляет собой лабильный высокомолекулярный белковый комплекс, способный быстро адаптироваться к условиям окружающей среды за счёт изменения своей структуры и композиции. В литературе широко описаны примеры деградации светособирающего комплекса цианобактерий в ответ на недостаток питательных веществ (Richaud *et al.*, 2001; Sandström *et al.*, 2002), изменение температурного и светового режима (Stoitchkova *et al.*, 2007). Подобная деградация фикобилисом и протеолиз фикобилипротеинов способствуют выживанию цианобактериальной клетки в условиях стресса. Однако немногочисленные данные об участии протеаз в биогенезе ССК цианобактерий указывают на необходимость более детального изучения данной проблемы.

Протеолиз фикобилисом в условиях азотного голодания выполняет две главные функции: 1) приводит к накоплению пула свободных аминокислот в клетке, которые необходимы для синтеза белков, запускающих механизмы акклиматизации цианобактерий и 2) предотвращает фотоповреждение цианобактерий в условиях стресса. Это было показано на примере *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kiyota *et al.*, 2014).

Стоит отметить, что в условиях дефицита азота, процесс разрушения светособирающего комплекса цианобактерий происходит упорядоченно, от лучей фикобилисом к их ядру, и является обратимым. Это приводит к изменению фенотипа клеток цианобактерий от сине-зелёного к жёлто-зелёному («обесцвечиванию» или хлорозису). Как только содержание азота в питательной среде восстанавливается, запускается повторный синтез фикобилисом (Yamanaka,

et al., 1980; Collier, Grossman, 1992). Ключевую роль в данном процессе играет белок NblA, не обладающий протеолитической активностью, а также комплекс Clp протеазы.

Геномы большинства цианобактерий и красных водорослей содержат, как правило, только один ген *nblA*, однако у *Nostoc* sp. PCC 7120 и *Synechocystis* было обнаружено по два гомолога *nblA* (Baier *et al.*, 2001; Li, Sherman, 2002; Baier *et al.*, 2004). Определение кристаллической структуры белка NblA показало, что он состоит из двух α-спиралей: короткой N-концевой и более протяжённой C-концевой. Две молекулы NblA образуют димер, в олигомеризацию которого вовлечён C-концевой участок спирали белка (Bienert *et al.*, 2006). Исследования *in vitro* показывают, что C-концевой участок спирали NblA взаимодействует с α-субъединицей фикобилисом (Luque *et al.*, 2003; Bienert *et al.*, 2006). В свою очередь, N-концевой участок спирали белка, несущий высококонсервативные а. о., способен связываться с шапероном ClpC. Он играет важную роль в процессе деградации фикобилисом в условиях азотного голодания и может выступать адаптером, направляющим фикобилипротеины для деградации в камеру Clp протеазы (Bienert *et al.*, 2006, Karradt *et al.*, 2008).

В течение первых часов инкубации на среде без азота, гетеродимер NblA1/NblA2 *Synechocystis* экспрессируется на высоком уровне, образуя комплекс с шапероном ClpC и α-субъединицей фикоцианина. После полной деградации фикобилисомы в комплексе Clp протеазы (ClpC/ClpP1/ClpR) белки NblA также подвергаются протеолизу (Baier *et al.*, 2014).

Позднее была предложена возможная модель деградации фикобилисом с участием белка NblA. Гексамеры лучей и ядра фикобилисом имеют достаточно пространства для внедрения димера белка NblA (Dines *et al.*, 2008). Такая структура белка позволяет нарушить взаимодействие между соседними гексамерами фикоцианина и приводит к диссоциации небольших фрагментов лучей фикобилисом, связанных с NblA. Вслед за разрушением антенн фикобилисом, для NblA становится доступным ядро аллофикоцианина. После отрыва фикоцианин и

аллофикоцианин, связанные с NblA белком, при участии регуляторной субъединицы ClpC направляются для деградации в комплекс Clp протеазы (Sendersky, 2015).

Таким образом, исследования протеолитических ферментов последних лет в различных организмах демонстрируют важную роль этих белков в регуляции физиологических процессов в клетке, адаптации к стрессовым условиям и, наконец, в её жизнеспособности. В настоящее время ведущая регуляторная роль в клетке принадлежит ограниченному протеолизу. Наибольший интерес в данном процессе представляют пептидазы с узкой субстратной специфичностью, функция большинства из которых в клетках фотосинтезирующих организмов остаётся до конца невыясненной. Несмотря на имеющийся задел в изучении роли пролин-специфичных аминопептидаз в растениях и цианобактериях, их анализ требует более пристального внимания со стороны исследователей. В рамках данной работы были охарактеризованы протеолитические свойства пролин-специфичной аминопептидазы у одноклеточной цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 (GT-L) и исследована её возможная функциональная роль в клетке.

Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Бактериальные штаммы и плазмиды

Штаммы и плазмиды, использованные в работе, представлены в табл. 1.

2.2. Питательные среды и условия культивирования микроорганизмов

Клетки *E. coli* выращивали в жидкой (10 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl на 1 л ddH_2O) или агаризованной (+ 1,5% агар) среде LB (Миллер, 1976) при 37°C. После стерилизации в агаризованную среду, охлаждённую до 50°C, вносили соответствующий антибиотик в конечной концентрации (мкг/мл): ампициллин (Ap) – 100, канамицин (Km) – 50, тетрациклин (Tet) – 15, хлорамфеникол (Cm) – 25. В стерильную жидкую среду LB антибиотиков добавляли вдвое меньше. В случае бело-голубой селекции использовали X-gal и ИПТГ в конечной концентрации 20 мкг/мл и 0,1 мМ, соответственно.

Для получения компетентных клеток BL21 (DE3)pLysS использовали среду SOB (20 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 0,5 г NaCl на 1 л ddH_2O). После автоклавирования в охлажденную среду добавляли стерильные растворы 10 мл 1 М $MgCl_2$ и 10 мл 1 М $MgSO_4$. Непосредственно перед процедурой трансформации бактерий *E. coli* готовили SOC среду (1 мл 2 М глюкозы на 100 мл SOB среды).

Культуру клеток *Synechocystis* sp. PCC 6803 (GT-L) выращивали фотоавтотрофно в агаризованной (1,2% агара «Difco», США) или жидкой среде BG-11 (табл. 2; Rippka *et al.*, 1979) с добавлением 20 мМ Hepes-NaOH, pH 7,5 при температуре 32°C и при постоянном освещении люминесцентными лампами интенсивностью 70 мкЕ/$м^2$·с (стандартное освещение, СО). Мутантный штамм Δ*pepP* поддерживали на той же среде, содержащей Km в концентрации 5-100 мкг/мл.

Анализ роста и размера колоний *Synechocystis* проводили в 1,5%-ой агаризованной среде. Для повышения эффективности формирования колоний

цианобактерий в питательную среду добавляли 0,3% (вес/объём) $Na_2S_2O_3$ (Thiel *et al.*, 1989). Клеточную культуру исследуемых штаммов предварительно выравнивали по оптической плотности при длине волны 750 нм ($ОП_{750}$). Исходную культуру 10^0 ($ОП_{750}$ = 0,2) использовали для серии разведений: 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}. Нанесение образцов клеток на твёрдую среду проводили по методике, описанной у Dörrich (Dörrich, Wilde, 2015).

Интенсивные культуры (Владимирова, Семененко, 1962) клеток *Synechocystis* выращивали в культуральных сосудах в жидкой среде BG-11 с добавлением 20 мМ Hepes-NaOH, pH 7,5 при стандартных условиях (32°C, 70 мкЕ/м^2·с) и с постоянным барботированием стерильной газовоздушной смесью, обогащенной CO_2 в концентрации до 1,6%.

Для перевода в условия интенсивной культуры цианобактерии разводили в необходимом объёме стерильной среды BG-11, перемешивали, и разливали по культуральным сосудам. Таким образом, осуществляли синхронизацию роста культур в нескольких сосудах. Интенсивность роста цианобактерий оценивали по оптической плотности в 1 мл суспензии клеток с учётом разведения культуры (Widdel, 2010) при длине волны 750 нм. В качестве показателя роста использовали зависимость $ОП_{750}$ суспензии клеток от времени (в сутках культивирования). Измерения проводили на спектрофотометре GENESYS 10 UV Scanning («Thermo Scientific, Life Technologies»).

2.3. Питательная среда, лишённая азота

Для анализа цианобактерий в условиях азотного голодания, интенсивную клеточную культуру дикого типа и мутанта в экспоненциальной стадии роста (плотность оценивали по $ОП_{750}$), осаждали центрифугированием при 2500 *g* в течение 5 мин при комнатной температуре и ресуспендировали в стерильной среде BG-11, лишённой определённых микроэлементов. Для приготовления среды без азота (-N), $Fe(NH_4)_3(C_6H_5O_7)_2$, $NaNO_3$ и $Co(NO_3)_2 \times 6H_2O$ заменяли эквимолярно на $FeCl_3$, NaCl и $CoCl_2 \times 6H_2O$, соответственно.

Таблица 1. Бактериальные штаммы и плазмиды

Штаммы/плазмиды	Генотип/фенотип	Источник
Escherichia coli		
XL1-Blue	*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lac^{q}ZΔM15 Tn10(Tet^R)*	Stratagene, США
BL21 (DE3)pLysS	*F$^-$ ompT hsdS$_B$ (r_B-, m_B-) gal dcm (DE3) pLysS (Cm^R)*	Novagen, США
DH5α	*F$^-$ φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK–, mK+) phoA supE44 λ– thi-1 gyrA96 relA1*	Life Technologies, США
***Synechocystis* sp. PCC 6803**		
Дикий тип	*GT-L (glucose-tolerant)*	IPPAS B-1400
Δ*pepP*	*sll0136:Km^R*	Данная работа
Плазмиды		
pAL-TA	*Ap^R T7lac*	Евроген, Россия
pUC4K	*Km^R*	GE Healthcare Bio-Sciences, США
pET-41a(+)	*Km^R* T7*lac N-GST-Tag, His-Tag, T7-Tag*	Novagen, США
Рекомбинантные плазмиды для трансформации		
pET-41a(+)-sll0136	*Km^R* T7*lac N-GST-Tag, His-Tag, T7-Tag*	Данная работа
pAL-TA-sll0136	*Ap^R T7lac*	Данная работа
pAL-TA-sll0136/Km^R	*Ap^R T7lac Km^R*	Данная работа

Таблица 2. Среда для *Synechocystis* sp. PCC 6803 BG-11

Макро-элементы (1 × раствор)	**г/л**
$NaNO_3$	1,500
K_2HPO_4	0,040
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,075
$CaCl_2 \times 2H_2O$	0,036
$C_6H_8O_7$	0,006
$Fe(NH_4)_3(C_6H_5O_7)_2$	0,006
Na_2-ЭДТА	0,001
Na_2CO_3	0,020
Микро-элементы (1000 × раствор)	**г/л**
H_3BO_3	2,860
$MnCl_2 \times 4H_2O$	1,810
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	0,222
$NaMoO_4 \times 2H_2O$	0,390
$CuSO4 \times 5H_2O$	0,079
$Co(NO_3)_2 \times 6H_2O$	0,049

2.4. Количественный анализ пигментов

Определение содержания пигментов в экстрактах исследуемых образцов цианобактерий проводили на спектрофотометре GENESYS 10 UV Scanning.

Хлорофилл *a* ($ХЛ_a$) и каротиноиды (КАР) экстрагировали из клеток 90% метанолом и определяли их концентрацию согласно (Lichtenthaler, 1987). Для этого 1 мл суспензии клеток *Synechocystis* осаждали (10 мин при 10 000 *g*, 4°C) и осадок ресуспендировали в 1 мл 90% метанола. Пробы выдерживали при - 20°C в течение 2 ч в темноте. После центрифугирования (10 мин, 10 000 *g*, 4°C) оптическую плотность экстрактов измеряли при 470, 652 и 665 нм. Полученные значения использовали для расчёта концентрации пигментов по следующим формулам (Lichtenthaler, 1987):

$$ХЛ_a\left(мг/мл\right) = 16{,}82 \times ОП_{665} - 9{,}28 \times ОП_{652},$$

$$КАР\ \left(мг/мл\right) = \left(1000 \times ОП_{470} - 1{,}91 \times \left[ХЛ_a\right]\right)/225,$$

где $ОП_{470}$, $ОП_{665}$, $ОП_{720}$, – значения оптической плотности при соответствующих длинах волн.

Содержание фикоцианина (ФЦ) определяли по методу (Collier, Grossman, 1992). Измерение абсорбции в 1 мл суспензии клеток цианобактерий проводили при трёх длинах волн – 750, 678 и 620 нм до и после инкубации образцов при 75°С в течение 10 мин. Содержание фикоцианина в образцах рассчитывали по формуле:

$$ФЦ\ (мг/мл) = 138{,}79 \times (ОП_{620} - ОП_{750})_{\substack{до \\ нагревания}} - 35{,}58 \times (ОП_{678} - ОП_{750})_{\substack{после \\ нагревания}},$$

где $ОП_{620}$, $ОП_{678}$, $ОП_{750}$ – значения оптической плотности при соответствующих длинах волн.

Спектры поглощения целых клеток цианобактерий в среде BG-11 в диапазоне длин волн от 350 до 800 нм измеряли на спектрофотометре UV2401 UV/VISIBLE («Shimadzu Biotech», Япония). Для анализа использовали 1,0 мл интенсивной культуры клеток *Synechocystis* при $ОП_{750}$ = 0,2. Получаемые спектры корректировали для сравнения между собой на светопоглощение при длине волны 750 нм. Обработку полученных спектров проводили в программе Origin (*http://www.originlab.com/*).

Спектры флуоресценции целых клеток *Synechocystis* измеряли при комнатной температуре на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301PC (Япония) при длинах волн: λ_{ex} = 658 нм и λ_{em} = 590-780 нм. Клеточную суспензию предварительно выравнивали по $ОП_{750}$ = 0,2.

2.5. Биоинформационный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

2.5.1. Базы данных и инструменты их анализа

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности *Synechocystis* sp. PCC 6803 получали из банка данных CyanoBase (*http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/Synechocystis*). При анализе аминокислотных последовательностей протеаз также использовали базу данных пептидаз MEROPS

(*http://merops.sanger.ac.uk*) и ресурс UniProt (*http://www.uniprot.org/*). Шаблонные структуры белков получали из PDB (Protein Data Bank, *https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do*).

Выравнивание и сравнение аминокислотных последовательностей белков, а также построение эволюционных деревьев проводили с помощью программы Clustal W2 (*http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/*) методом ближайших соседей (Neighbor-joining, NJ).

Анализ ко-транскрипции нуклеотидных последовательностей в геноме *Synechocystis* sp. PCC 6803 осуществляли с использованием базы данных оперонов прокариот DOOR^2 (Database of prOkaryotic OpeRons, *http://csbl.bmb.uga.edu/DOOR/*).

Анализ гидрофобности белка PepP *Synechocystis* с использованием алгоритма Kyte и Doolittle (Kyte, Doolittle, 1982) проводили в программе BioEdit (Tippmann, 2004; *http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html*). Для предсказания возможной клеточной локализации белка применяли ряд программ: Gneg-mPLoc (*http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Gneg-multi/*), PSLpred (Bhasin *et al.*, 2005; *http://www.imtech.res.in/raghava/pslpred/*) и PSORTb (*http://www.psort.org/psortb/*).

Подбор праймеров для амплификации фрагментов ДНК анализируемых генов, построение рестрикционных карт, сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы Vector NTI («Invitrogen», США).

2.5.2. Построение филогенетических деревьев и компьютерное моделирование трёхмерной структуры белка PepP *Synechocystis*

Для построения пространственных структур аминопептидазы P *Synechocystis* методом моделирования по гомологии использовали программу Modeller 9.15 (Sali, Blundell, 1993), класс моделирования *automodel*. Для каждого варианта было построено 200 моделей, лучшая из которых выбиралась на основании значения

DOPEscore (Shen, Sali, 2006) определяемого программой Modeller. В качестве шаблона для мономерных структур без лиганда, с лигандом (2 иона марганца) и в комплексе с субстратом (трипептид Val-Pro-Leu) использовали кристаллическую структуру AMPPII *E. coli* – PDBid: 2V3X, для мономерной структуры с продуктом (дипептид Pro-Leu) другую структуру того же белка – PDBid: 2V3Y (Graham, Guss, 2008). Гомодимер был построен с использованием шаблонной структуры аминопептидазы P II *Yersinia pestis* – PDBid: 4PV4 (Osipiuk *et al.*, 2014). Стереохимическую достоверность и качество упаковки проверяли в программах ProCheck (Laskowski *et al.*, 1993) и ProSA-web (Wiederstein, Sippl, 2007). Энергетическую минимизацию структур проводили в программе USCFChimera 1.10.2 (Pettersen *et al.*, 2004) в силовом поле AMBERff14SB (Maier *et al.*, 2015) после добавления атомов водорода в структуру, в два этапа: 300 шагов метода скорейшего спуска и 300 шагов метода сопряженных градиентов; длина шага, в обоих случаях – 0,02 Å. Визуализацию и суперпозицию моделей также осуществляли с помощью USCFChimera. Для построения топографической схемы аминопептидазы P*Synechocystis* использовали программу TopDraw (Bond, 2003). Схемы взаимодействия белка с лигандом получены с использованием сервиса LigPlot (Wallace *et al.*, 1996). Анализ белок-белковых и белок-лигандных взаимодействий и расчёт их энергии проводили с помощью программы QtPISA (Krissinel, Henrick, 2007). Поверхность белка окрашивали в USCFChimera. Окраска по электростатическому потенциалу проводилась с использованием функции Coulombic Surface Coloring, в диапазоне от - 10 до 10 ккал/моль. Подготовку модели для окраски поверхности по консервативности осуществляли с помощью сервиса ConSurf (Ashkenazy *et al.*, 2016). Виртуальный аланиновый мутагенез проводили с использованием сервиса ROBETTA (Kortemme *et al.*, 2004).

2.6. Анализ нуклеиновых кислот

2.6.1. Выделение геномной ДНК из клеток *Synechocystis*

Для выделения геномной ДНК 3-5 мл интенсивной культуры клеток *Synechocystis* ($ОП_{750}$ = 1) осаждали центрифугированием при 5000 *g* (5 мин), осадок промывали 1 мл буфера ТЕ (10 мМ Трис-HCl, 1 мМ Na_2-ЭДТА, pH 7,5) и ресуспендировали в 270 мкл STET-буфера (8% сахароза, 5% тритон X-100, 50 мМ Na_2-ЭДТА, 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0). К суспензии добавляли 15 мкл хлороформа, интенсивно перемешивали в течение 5 мин и вносили 30 мкл раствора лизоцима (20 мг/мл). Смесь инкубировали 30 минут при 37°C до побурения суспензии. Полный лизис клеток осуществляли последовательным добавлением к образцам (при мягком перемешивании) ДДС до конечной концентрации 2% и NaCl до конечной концентрации 0,5 М. Смесь инкубировали при 65°C в течение 30 мин. Депротеинизацию осуществляли добавлением к лизату равного объёма хлороформа с последующим встряхиванием, центрифугированием и отбором водной фазы (повторяли 2-3 раза). ДНК из водной фазы осаждали добавлением равного объёма изопропанола. Смесь инкубировали 15 мин при комнатной температуре и центрифугировали 15 мин при 10 000 *g*. Осадок ДНК дважды промывали 70% этанолом и растворяли в ТЕ-буфере. Образцы ДНК сохраняли при - 20°C.

2.6.2. Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli* щелочным методом

Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli* осуществляли щелочным методом согласно (Birnboim, Doly, 1979). Для этого ночную культру клеток *E. coli* осаждали центрифугированием при 10 000 *g* (5 мин). Осадок расуспендировали в 200 мкл раствора I (50 мМ глюкоза, 25 мМ Трис-HCl, pH 8,0; 10 мМ ЭДТА, pH 8,0) и инкубировали 15 мин на льду. Добавляли 300 мкл свежеприготовленного раствора II (0,2 N NaOH, 1% ДДС), аккуратно инвертировали пробирку и выдерживали в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем добавляли

300 мкл раствора III (3,0 М ацетата натрия, pH 4,8-5,2), перемешивали и инкубировали на льду 15 мин. После центрифугирования при 10 000 g (15 мин) надосадочную жидкость переносили в чистую пластиковую пробирку. Вносили 10 мкл РНКазы (10 мг/мл) и инкубировали 30 мин при 37°С. Полученную смесь дважды очищали равным объёмом хлороформа. ДНК переосаждали добавлением 1 объёма 100% изопропанола и 1/10 объёма 3,0 М ацетата натрия (pH 6,0) в течении 60 мин при - 20°С и центрифугированием при 10 000 g (15 мин). Осадок промывали 300 мкл 75% этанола, высушивали, растворяли в ddH_2O и хранили при - 20°С.

Выделение плазмидной ДНК для последующего секвенирования производили с помощью набора GeneJET Plasmid Minipret Kit («Thermo Scientific, Life Technologies») согласно рекомендациям фирмы-производителя.

2.6.3. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофоретическое разделение молекул ДНК проводили в 0,8-2% агарозном геле с использованием буфера ТАЕ (40 мМ Трис, 20 мМ ацетат натрия, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0) при напряжённости электрического поля 3-6 В/см^2. Для визуализации фрагментов ДНК в гель добавляли бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Перед нанесением на гель образцы прогревали при 65°С в течение 10 мин. Для определения размеров линейных фрагментов ДНК в качестве стандартов использовали 100 п. н. и 1000 п. н. ДНК-маркеры («Сибэнзим», Россия). Результаты электрофореза анализировали на приборе Phosphoimager Typoon Trio+ («GE Healthcare», США).

2.6.4. Очистка фрагментов ДНК из геля или реакционных смесей

Очистку фрагментов ДНК после ПЦР анализа или рестрикции проводили с помощью набора GeneJET PCR Purification Kit («Thermo Scientific, Life Technologies») согласно рекомендациям фирмы-производителя.

2.6.5. Выделение тотальной РНК из *Synechocystis*

Тотальную РНК изолировали из клеток цианобактерий с использованием реагента TRIZOL (38% фенол, 0,8 М гуанидинтиоционат, 0,4 М аммонийтиоционат, 0,1 М ацетат натрия, pH 5,0; 5% глицерин). Для этого 50 мл интенсивной культуры *Synechocystis* осаждали центрифугированием (5000 *g*, 5 мин при 4ºС), осадок замораживали в жидком азоте и либо сохраняли при - 80°С, либо сразу использовали для выделения РНК. Для этого образцы растирали в жидком азоте до порошкообразного состояния и, не дожидаясь размораживания, добавляли 1 мл реагента TRIZOL (из расчёта 1 мл раствора на каждые 50 мл клеточной суспензии). Смесь повторно растирали и, после размораживания, инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин для полной диссоциации белков от нуклеиновых кислот. К полученному лизату добавляли равный объём смеси фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25 : 24 : 1), инкубировали в течение 5 минут при 4°С и центрифугировали 5 мин при 12 000 *g* 4°С. Верхнюю водную фазу, содержащую РНК, смешивали с 1/10 объёма 3 М ацетата натрия (pH 5,0), добавляли равный объём хлороформа и инкубировали в течение 5 мин при 4°С и центрифугировали. РНК осаждали из раствора добавлением равного объёма изопропанола. После инкубации смеси в течение 30 мин при - 20°С образец центрифугировали 30 мин при 12 000 *g* 4°С. Осадок, содержащий РНК, промывали 75% этанолом, высушивали и растворяли в ddH_2O. Хранили РНК при - 20°С не более 5 дней, для длительного хранения образцы помещали на - 80°С.

В условиях стресса тотальную РНК из клеток цианобактерий изолировали с помощью горячего фенола по методике, описанной в работе Mironov (Mironiv, Los, 2015).

2.6.6. Электрофорез РНК в агарозном геле

РНК фракционировали с помощью электрофореза в 1,2% агарозном геле, содержащем 2,5 М формальдегид в MEN-буфере (20 мМ MOPS, 5 мМ ацетат натрия, 1 мМ ЭДТА, pH 7,0). Напряжение тока составляло 2 В/см^2 геля.

Образцы РНК до нанесения на гель смешивали в пропорции 1 : 1 : 6 с краской для РНК (97% глицерин, 1% бромфеноловый синий, 1% ксиленцианол) и буфером (38% формамид, 11,3% формальдегид, 10% MEN-буфер, бромистый этидий до конечной концентрации 13,3 мкг/мл). Перед нанесением на гель образцы денатурировали при 70°С в течение 5 мин. Результаты электрофореза анализировали на приборе Phosphoimager Typoon Trio+ («GE Healthcare»).

2.6.7. Определение количества и оценка качества препаратов нуклеиновых кислот

Определение количества и оценку чистоты нуклеиновых кислот в образцах проводили спектрофотометрическим методом с использованием прибора Nanodrop ND-1000 («Thermo Scientific, Life Technologies»). Количество нуклеиновых кислот определяли пересчётом показателя ОП при длине волны 260 нм на соответствующий коэффициент (для ДНК – 1 оптическая единица соответствует концентрации ДНК – 50 мкг/мл, кДНК – 33 мкг/мл, РНК – 40 мкг/мл, а для смеси НК – 45 мкг/мл).

Для качественной оценки образцы измеряли при трёх различных длинах волн: 230, 260 и 280 нм. Числовое значение отношения $ОП_{260}/ОП_{230}$ характеризует наличие примеси полисахаридов, а $ОП_{260}/ОП_{280}$ - показывает примесь белка в препарате нуклеиновых кислот. При хорошем качестве выделенного образца ДНК эти показатели должны быть не менее 1,7-1,8, а РНК – около 2. Также качество выделенных нуклеиновых кислот оценивали с помощью агарозного гель-электрофореза (см. главы 2.6.3 и 2.6.6).

2.6.8. ОТ-ПЦР

Уровень экспрессии исследуемого гена *sll0136* в штаммах ДТ и мутанта *ΔpepP Synechocystis* анализировали методом обратной транскрипции в сочетании с полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР).

2.6.8.1. Обработка РНК-содержащих образцов ДНКазой I

Перед синтезом кДНК образцы тотальной РНК обрабатывали ДНКазой I («Fermentas») в течение 60 мин при 37°C для удаления молекул ДНК. Для предотвращения деградации РНК из-за присутствия рибонуклеаз в реакционную смесь добавляли ингибитор РНКаз, RiboLock RNase Inhibitor («Thermo Scientific, Life Technologies») (табл. 3). Реакцию останавливали прогреванием образцов при 65°C в течение 10 мин.

Отсутствие ДНК в препаратах РНК проверяли с помощью ПЦР-анализа (см. главу 2.6.8.3). В качестве матрицы использовали образцы РНК, до и после обработки ферментом.

Таблица 3. Состав реакционной смеси при обработке РНК-содержащих образцов ДНКазой I

Компоненты	Количество
РНК	5 мкг
10 × реакционный буфер с $MgCl_2$	1 ×
ДНКаза I (1 ед. акт/мкл)	1 ед. акт./мкг РНК
Ribolock (40 ед. акт./мкл)	1 ед. акт./мкл
ddH_2O	до 50 мкл

2.6.8.2. Синтез кДНК

Синтез кДНК проводили с помощью набора SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR («Invitrogen») с использованием ген-специфичных антисмысловых праймеров (табл. 5) согласно протоколу фирмы-производителя.

Для синтеза образцов кДНК реакционную смесь (табл. 4), содержащую РНК, ген-специфичный антисмысловой праймер, дНТФ и деионизованную воду, прогревали в течение 5 мин при 65°С. Добавляли остальные компоненты смеси: реакционный буфер, $MgCl_2$, ДТТ, рекомбинантный ингибитор РНКаз (RNaseOUT) и обратную транскриптазу (SuperScript III), - инкубировали 50 мин при 50°С. Для остановки реакции пробы прогревали 5 мин при 85°С. Чтобы повысить чувствительность ПЦР путём удаления из препаратов кДНК гибридных молекул кДНК : РНК, использовали RNAse H. Образцы выдерживали в течение 20 мин при 37°С.

Для постановки стандартной ПЦР использовали 100-200 нг кДНК.

Таблица 4. Состав реакционной смеси для синтеза кДНК

Компоненты	Количество
РНК	0,5 мкг (0,1 мкг/мкл)
ген-специфичный праймер	10 пкмоль
10 мМ дНТФ смесь	0,5 мМ
ddH_2O	до 10 мкл
10 × реакционный буфер	1 ×
25 мМ $MgCl_2$	5 мМ
0,1 М ДТТ	10 мМ
RNaseOUT (40 ед. акт./мкл)	2 ед. акт./мкл
SuperScript III (200 ед. акт/мкл)	10 ед. акт./мкл
RNase H (2 ед. акт./мкл)	0,1 ед. акт./мкл

2.6.8.3. Полимеразная цепная реакция

ПЦР проводили в 20-50 мкл реакционной смеси с использованием термостабильной ДНК полимеразы Encyclo («Евроген»), соответствующего ей буфера, набора дНТФ («Сибэнзим»), ген-специфичных праймеров (табл. 5) и матрицы в амплификаторе Eppendorf Personal Cycle («Eppendorf», Германия). Праймеры были синтезированы в компаниях «Синтол», «Литех», «Евроген».

Таблица 5. Праймеры, используемые для анализа методом ПЦР и ОТ-ПЦР

Название праймера	**Нуклеотидная последовательность 5´-›3´**	**Ген**
sll0136_sense[1)]	ATGCATCCGGTTGTTAGTTCC	*pepP Synechocystis* sp. PCC 6803
sll0136_antisense[1)]	GGATGGGAATTCACTAAAGCTT	
XhoI_pepP[2)]	aatctcgagTCAATGTTCTAAATCGGCGAT	
SacI_pepP[2)]	aatgagctcATGCATCCGGTTGTTAGTTC	
T7 term[3)]	TGCTAGTTATTGCTCAGCGGT	терминатор РНК полимеразы фага Т7
S-tag[3)]	CGAACGCCAGCACATGGACA	S-пептидный фрагмент РНКазы А из поджелудочной железы быка

Примечания:

1. праймеры для клонирования гена *sll0136* в вектор pAL-TA;
2. модифицированные праймеры для клонирования гена *sll0136* в вектор экспрессии pET-41a(+), содержащие сайты рестрикции;
3. праймеры для секвенирования гена, клонированного в вектор pET-41a(+).

Состав и схема проведения стандартной ПЦР представлена в табл. 6 и табл. 7, соответственно. При постановке реакции использовали отрицательный контроль, не содержащий матрицы. После ПЦР фрагменты ДНК анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле (см. главу 2.6.3).

Таблица 6. Состав реакционной смеси для проведения ПЦР

Компоненты	Количество
матрица	100-200 нг
50 × раствор Encyclo полимеразы	1 ×
прямой праймер	0,2-0,5 мкМ
обратный праймер	0,2-0,5 мкМ
10 × реакционный буфер	1 ×
2 мМ дНТФ смесь	0,2 мМ
ddH_2O	до конечного объёма

Таблица 7. Схема проведения стандартной ПЦР

Стадия	Температура (°C)	Продолжитель-ность	
Предварительная денатурация ДНК	94	2-5 мин	
Денатурация ДНК (в цикле)	94	15-30 сек	40 циклов
Отжиг праймеров	Tm	15-30 сек	
Синтез	72	1 мин/1500 п. н.	
Досинтез	72	3-10 мин	
Хранение	4	неограниченно	

2.6.9. Рестрикция ДНК

В настоящей работе использовали эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI, *Xho*I, *Sac*I («Fermentas») и соответствующие им буферные растворы, согласно рекомендациям фирмы-производителя. Обработку ДНК рестриктазами проводили в 20-50 мкл смеси, содержащей 1-5 мкг ДНК, 1-5 ед. акт. фермента и

1 × реакционный буфер. Смесь инкубировали 2 ч при 37°С. Ферменты инактивировали прогреванием в течение 20 мин при 80°С (для *Xho*I) и 65°С (для *Bam*HI, *Sac*I). Разделение полученных фрагментов ДНК и установление их точного размера проводили с помощью агарозного гель-электрофореза (см. главу 2.6.3).

2.6.10. Секвенирование ДНК

Для доказательства отсутствия точечных замен в последовательности гена *sll0136*, клонированного в вектор экспрессии pET-41a(+), образцы ДНК подвергали секвенированию в биотехнологической компании «Евроген». Процедуру проводили с использованием праймеров T7 term и S-tag (табл. 5). Конечная концентрация ДНК в пробе составляла 250-300 нг/мкл. Анализ результатов проводили с помощью программы ClustalW (П. 1).

2.7. Клонирование фрагментов ДНК в плазмидные вектора

Очищенные из геля или реакционной смеси фрагменты ДНК клонировали в плазмидные вектора: pAL-TA или pET-41a(+). Для этого использовали соотношение вставки к вектору – 3 : 1. Полученную смесь, включающую целевой фрагмент ДНК, векторную конструкцию, Т4 ДНК-лигазу и реакционный буфер («Thermo Scientific, Life Technologies»), готовили на льду, тщательно перемешивали и оставляли для лигирования.

Элюированные фрагменты ДНК, несущие выступающие 3’А-концы лигировали с линеризованным вектором pAL-TA, имеющим добавочные 3’Т-концы, при 10°С 16-18 ч согласно инструкции фирмы-производителя («Евроген»).

Для клонирования фрагментов ДНК в вектор pET-41a(+) по сайтам рестрикции проводили предварительную обработку соответствующих компонентов рестриктазами (см. главу 2.6.9). Очищенные из геля фрагменты линеризованных векторов лигировали с целевыми фрагментами ДНК при 4-8°С 16-18 ч согласно рекомендациям «Thermo Scientific, Life Technologies».

Соответствующие лигазные смеси использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli*.

2.7.1. Приготовление компетентных клеток *E. coli* кальциевым методом

Ночную культуру клеток *E. coli* выращивали в течение 12-16 ч в 1,5 мл жидкой среды LB (DH5α, XL1-Blue) или в среде SOB (BL21 (DE3)pLysS), лишённой глюкозы, с добавлением соответствующих антибиотиков при 37ºС без качания.

Затем, ночную культуру *E. coli* разводили той же стерильной средой в 50 раз и подращивали в течение 2,5 ч при постоянном встряхивании до $ОП_{600}$ = 0,6-0,8. Клетки в полученном объёме среды осаждали при 4000 *g* 4°С в течение 10 мин. Затем осадок бактерий ресуспендировали в ледяном стерильном 100 мМ $CaCl_2$ в объёме 1/4 от исходного объёма суспензии клеток. Инкубировали 5 мин на льду. Клетки осаждали 10 мин при 4000 *g* 4°С и повторно ресуспендировали в растворе $CaCl_2$ в объёме 1/20 от исходного объёма клеточной суспензии. Образцы выдерживали 20 мин на льду, добавляли еще 1/5 объёма ледяного раствора $CaCl_2$ и хранили при 4°С не более двух недель. Для длительного хранения при - 80°С (не более полугода) дополнительно вносили стерильный глицерин до конечной концентрации 15%. Полученные компетентные клетки использовали для трансформации плазмидными конструкциями.

2.7.2. Трансформация *E. coli*

Реакционную смесь, содержащую 10-30 мкл лигационной смеси или плазмиды и 100 мкл компетентных клеток *E. coli*, инкубировали на льду 40 минут. Затем образцы прогревали при 42°С в течение 90 сек и резко охлаждали на льду. К клеткам добавляли 500 мкл жидкой среды LB (для XL1-Blue или DH5a) или SOC среды (для BL21 (DE3)pLysS) без антибиотика. Клетки подращивали в течение 1,5-3 ч при 37°С при постоянной аэрации для запуска экспрессии генов ферментов, инактивирующих антибиотики. Трансформационную смесь высевали на чашки

Петри с агаризованной средой LB, содержащей необходимые для селекции антибиотики и растворы (см. главы 2.1 и 2.2). Отбор клонов-трансформантов проводили при 37°C в течение 16-18 ч. Анализ положительных колоний клеток *E. coli* осуществляли с помощью ПЦР или рестрикционного анализа (см. главы 2.6.8.3 и 2.6.9).

2.8. Трансформация клеток *Synechocystis*

Штамм *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT-L способен к спонтанной трансформации за счёт двойной гомологичной рекомбинации между хромосомной и экзогенной ДНК (Grigorieva, Shestakov, 1982).

Цианобактерии трансформировали векторной конструкцией pAL-TA, содержащей фрагмент гена *sll0136*, с встроенной в него кассетой устойчивости к Km. Для этого 3 мл интенсивной культуры клеток в начале экспоненциальной фазы роста осаждали и промывали свежей средой BG-11. После чего клетки ресуспендировали в 100 мкл BG-11 и добавляли 1 мкг плазмидной ДНК. Суспензию инкубировали в течение суток при 32°C при стандартном освещении, после чего рассевали на чашку Петри с агаризованной средой BG-11 в присутствии Km (конечная концентрация Km составляла 5 мкг/мл). Первичные колонии, устойчивые к канамицину, пересевали с последовательным повышением содержания антибиотика (от 5 до 50 мкг/мл) для полной сегрегации геномной ДНК *Synechocystis*, несущей ген с инсерцией Km^R. Наличие гена устойчивости к Km в гене *sll0136* в полученных рекомбинантных клонах определяли с помощью ПЦР (см. главу 2.6.8.3).

2.9. Световая микроскопия в проходящем свете

Временные препараты дикого и мутантного штаммов *Synechocystis* анализировали в белом проходящем свете при 100 × увеличении на микроскопе Axio Imager Z2 («Carl Zeiss», Германия). Для работы использовали 5 мкл интенсивной культуры клеток цианобактерий (не нормированные по $ОП_{750}$) при

стандартных условиях роста. Измерение диаметра клеток проводили в прогрмамме AxioVision LE.

2.10. Трансмиссионная электронная микроскопия

Изучение ультраструктурных особенностей клеток штаммов дикого типа и мутанта Δ*pepP Synechocystis* проводили при помощи трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) как описано в работе Sarsekeeva (Sarsekeyeva *et al.*, 2014). Пробы объёмом 2 мл отбирали на 2-е и 5-е сутки роста. Клетки осаждали центрифугированием 3 мин при 4000 *g,* промывали стерильной водой и фиксировали в свежеприготовленном растворе, содержащем 4% формальдегид и 0,1 М натрий-фосфатный буфер (pH 7,2), в течение 96 ч при 4°C. Зафиксированные образцы трижды промывали тем же буфером и осуществляли постфиксацию в 1% растворе тетраоксида осмия (OsO_4) в течение 1 ч при 4°C. Затем образцы обезвоживали в градиенте спиртов: 30% этиловый спирт – 5 мин, 50% этиловый спирт – 5 мин, 70% этиловый спирт – 10 мин, 96% этиловый спирт – 10 мин, 100% этиловый спирт – 10 мин, - и затем в 100% ацетоне. Для заливки образцов готовили исходную смолу из Epon 812 и ангидридов: додецилового ангидрида янтарной кислоты (DDSA) и метилового эфира надовой кислоты (MNA). Обезвоженный материал проводили по серии смол, разведённых ацетоном, и заключали в капсулы с исходной смолой, содержащие ускоритель – 2,4,6-трис (диметиламинометил)фенол (DMP). Полученные срезы на сетках последовательно контрастировали насыщенным раствором уранил-ацетата в 50% спирте 1,5 ч и 2,5% цитратом свинца 5 мин по Reynolds (1963). Препараты анализировали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа Libra 200 («Carl Zeiss», Германия).

2.11. Выделение белков и белковых комплексов цианобактерий

2.11.1. Выделение фракции растворимых белков из клеток *Synechocystis*

Выделение клеточных экстрактов из *Synechocystis* проводили согласно Пожидаевой (Пожидаева, 2014) с изменениями. Для этого 250 мл интенсивной культуры клеток *Synechocystis* ($ОП_{750}$ = 1) осаждали центрифугированием 5 мин при 4000 *g* 4°C. Супернатант удаляли, осадок промывали в 20 мл буфера для экстракции (50 мМ Hepes-NaOH, pH 7,5; 0,5 М сахароза, 10 мМ $CaCl_2$, 10 мМ $MgCl_2$, 0,001% раствор ингибиторов протеиназ «Fermentas»). На 1 г осадка добавляли 10 мл буфера для экстракции, ЭДТА и PMSF до конечной концентрации 5 мМ и 1 мМ, соответственно.

Для разрушения клеток использовали пресс Френча или стеклянные бусы (размер кристаллов 0,10-0,25°мм, «Sigma», США). В первом случае образцы дважды разрушали с помощью охлаждённого пресса под давлением 50 МПА. Во втором случае клетки разбивали в стеклянных пробирках на вортексе 2 мин с перерывом на 1 мин на льду до полного разрушения.

Полученную суспензию освобождали от неразрушенных клеток и крупного дебриса центрифугированием при 5000 *g* 4°C (5 мин). Фракцию растворимых белков отделяли от мембранных осаждением в течение 30 мин при 38 000 *g* 4°C.

2.11.2. Выделение тилакоидных мембран из клеток *Synechocystis*

Мембранные фракции из *Synechocystis* выделяли по методике Gombos (Gombos *et al.*, 1994). Для этого 250 мл интенсивной культуры клеток *Synechocystis* ($ОП_{750}$ = 1) осаждали центрифугированием 8 мин при 6000 *g* 4°C и дважды промывали 50 мл промывочного буфера (50 мМ Hepes-NaOH, pH 7,5; 30 мМ $CaCl_2$). Осадок ресуспендировали в 15 мл изолирующего буфера (50 мМ Hepes-NaOH, pH 7,5, 30 мМ $CaCl_2$, 800 мМ Д-сорбитол, 1 мМ ε-аминокапроновая кислота), переносили в закрытые фольгой стеклянные пробирки и добавляли равный объём стеклянных бус (0,10-0,25 мм, «Sigma»). Клетки трижды разрушали

на вортексе по 2 мин с перерывом на 1 мин на льду. Остатки крупного дебриса, неразрушенные клетки и стекляные бусы удаляли центрифугированием при 550 *g* 2 мин (4°C). Тилакоидные мембраны осаждали в течение 40 мин при 12 000 *g* (4°C), растворяли в буфере для хранения (50 мМ Трицин-NaOH, pH 7,5; 600 мМ сахароза, 30 мМ $CaCl_2$) и сохраняли при - 80°C.

2.11.3. Выделение фикобилисом из клеток *Synechocystis*

Фикобилисомы выделяли из клеток цианобактерий по методике Gantt (Gantt *et al.*, 1976) с изменениями. Для этого 250 мл интенсивной культуры клеток *Synechocystis* ($ОП_{750}$ = 1) осаждали центрифугированием 5 мин при 5000 *g* (20°C) и промывали в 5 мл калий-фосфатного буфера (0,75 М K_2HPO_4, 0,75 М KH_2PO_4, pH 7,0; 0,001% раствор ингибиторов протеиназ («Fermentas»). Осадок ресуспендировали в 1-3 мл того же буфера и переносили в закрытые фольгой стеклянные пробирки. К клеточной суспензии добавляли равный объём стеклянных бус (0,10-0,25 мм, «Sigma») и затем клетки разрушали на вортексе 2 мин с паузой на 1 мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Неразрушенные клетки, клеточный дебрис и стеклянный песок удаляли центрифугированием (550 *g* 2 мин 20°C). Полученный клеточный экстракт солюбилизировали добавлением раствора 20% тритона X-100 (в калий-фосфатном буфере) до конечной концентрации 2% в течение 20 мин при комнатной температуре при равномерном перемешивании. Нерастворившийся материал удаляли центрифугированием при 15 000 *g* в течение 30 мин (20°C).

Надосадочную фракцию сине-зелёнового цвета, содержащую фикобилисомы, наносили на свежеприготовленный 12-30% градиент плотности йодиксанола – OptiPrep («Sigma»). Для создания градиента использовали 40% OptiPrep в калий-фосфатном буфере (табл. 8).

Материал ультрацентрифугировали в бакетном роторе SW55Ti («Beckman», США) при 170 000 *g* в течение 3 ч при 20°C. Для проверки полученного градиента

Табл. 8. Растворы для приготовления 12-30% градиента плотности OptiPrep

OptiPrep, %	Объём 40% OptiPrep, мл	Объём калий-фосфатного буфера, мл
12	1,2	2,8
14	1,4	2,6
16	1,6	2,4
18	1,8	2,2
20	2,0	2,0
22	2,2	1,8
24	2,4	1,6
26	2,6	1,4
28	2,8	1,2
30	3,0	1,0

с помощью рефрактометра определяли коэффициент преломления в отобранных фракциях (табл. 9) и сопоставляли с табличными значениями производителя («Sigma»). Фракцию интактных фикобилисом разводили в 6 раз калий-фосфатным буфером. Затем фикобилисомы концентрировали ультрацентрифугированием в течение 3,5 ч при 147 000 *g* (4°C). Полученные образцы фикобилисом ресуспендировали в 20 мкл воды для дальнейшего анализа. На ДДС-ПААГ наносили пробы, нормированные по $ОП_{645}$ = 5.

2.11.4. Количественное определение содержания белка

Содержание белка в пробах определяли при помощи бицинхонинового реагента (Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination, «Sigma») или по методу Bradford (Bradford, 1976) при помощи реагента Bradford («Sigma») согласно протоколам производителя, анализируя пробы на GENESYS 10 UV Scanning («Thermo Scientific, Life Technologies»). В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (BSA).

Концентрацию очищенного препарата белка PepP определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм с использованием прибора Nanodrop ND-1000 («Thermo Scientific, Life Technologies»). Расчёт коэффициента экстинкции производили по формуле (Gill, von Hippel, 1989):

$$\varepsilon\left(M^{-1}/см^{-1}\right) = 5690 \times n_W + 1280 \times n_Y + 120 \times n_C ,$$

где n_W – количество а. о. триптофана, n_Y – количество а. о. тирозина, n_Y – количество а. о. цистеина в молекуле белка, цифры – соответствующие коэффициенты экстинкции а. о.

Для концентрирования препаратов белков использовали ультрофильтрационные колонки Nanosep 3k или 10k Omega («Pall Life Sciences», США).

Табл. 9. Определение фактической плотности OptiPrep по коэффициенту преломления

Фракция №	**Коэфф. преломления (η)**	**Сахароза, %**	**Плотность (ρ), г/мл**	**OptiPrep, % (факт.)**
1	1,362	19,0	1,100	18
2	1,366	21,2	1,111	20
3	1,369	23,0	1,121	22
4	1,371	24,2	1,132	24
5	1,374	26,0	1,137	26
6	1,376	27,0	1,142	26
7	1,379	28,7	1,153	28
8	1,381	30,0	1,163	30
9	1,384	31,6	1,174	32
10	1,410	45,0	-	>40

2.12. Анализ образцов белков методом электрофореза

2.12.1. Нативный ПААГ электрофорез

Разделение белков клеточных экстрактов проводили в нативных условиях в трис-боратном (ТВ) буфере (45 мМ Трис-HCl, pH 8,3; 45 мМ борная кислота) (Пожидаева, 2014) при помощи 4-10% градиентного ПААГ. Для заливки 5 гелей размером 8,3 × 6,8 см (спейсеры 0,75 мм) использовали Mini-Protean 3 Multi-Casting Chamber («Bio-Rad»).

Градиентный гель-электрофорез готовили по схеме, представленной в табл. 10 с помощью системы сообщающихся сосудов («Bio-Rad») и перистальтического насоса («Heidolph», Германия). Перед нанесением их смешивали с равным объёмом краски (20% глицерин и 0,02% бромфеноловый синий в ТВ-буфере). Электрофорез белков проводили в ТВ-буфере с добавлением 1 мМ ЭДТА при постоянном токе 15 мА (около 6 ч) и 4°С.

Табл. 10. Растворы для нативного ПААГ электрофореза

Исходные растворы	**Объём раствора**		
	Для 4% верхнего геля, мл	**Для градиентного геля**	
		4% геля, мл	**10% геля, мл**
H_2O	7,609	13,707	8,537
40% Акриламид (29 : 1)	1,000	1,800	4,500
10 × ТВ-буфер	1,000	1,800	1,800
глицерин	-	0,620	3,090
10% APS	0,037	0,0664	0,0664
TEMED	0,0037	0,0066	0,0066
Конечный объём	10	18	18

Для определения молекулярных масс белков в нативных условиях в качестве стандартов использовали маркерные белки: окрашенный ферритин (440 кД – мономер, 880 кД – димер), NativeMark Unstained Protein Standard («Invitrogen»).

2.12.2. Голубой нативный ПААГ электрофорез

Для разделения нативных комплексов мембранных белков *Synechocystis* использовали голубой нативный ПААГ электрофорез, описанный в работе Schagger (Schagger, von Jagow, 1991) с некоторыми модификациями.

Разделяющий градиентный ПААГ (T = 49,5%, C = 3%) готовили с помощью системы сообщающихся сосудов и перистальтического насоса. Для заливки 6 гелей размером 8,3 × 6,8 см (спейсеры 0,75 мм) в системе Mini-Protean 3 Multi-Casting Chamber (Био-Рад) использовали растворы, представленные в табл. 11.

Табл. 11. Растворы для голубого нативного ПААГ электрофореза

Исходные растворы	**Объём раствора**		
	4% гель для образцов (верхний), мл	**Разделяющий гель (нижний)**	
		4% геля, мл	**13% геля, мл**
H_2O	6,9737	11,6227	4,186
49,5% Акриламид (29:1)	0,9697	1,616	5,515
3 × гель-буфер	4,000	6,667	7,000
глицерин	-	-	4,200
10% APS	0,0514	0,0857	0,090
TEMED	0,0052	0,0086	0,009
Конечный объём	12	20	21

Солюбилизацию образцов проводили по Järvi (Järvi *et al.*, 2011). Фракции тилакоидных мембран (см. главу 2.11.2), содержащие 8 мкг хлорофилла, осаждали центрифугированием в течение 4 мин при 5000 *g* (4°C) и растворяли в 8 мкл буфера

25BTH20G (25 мМ BisTris-HCl, pH 7,0; 20% глицерин, 0,001% раствор ингибиторов протеиназ («Fermentas»). Таким образом, конечная концентрация хлорофилла в образцах составляла 1 мкг/мкл. Для солюбилизации к белковым пробам добавляли 10% раствор ДМ (в 25BTH20G буфере) до конечной концентрации 1% и инкубировали не более 5 мин на льду. Образцы центрифугировали в течение 20 мин при 18 000 g (4°C). Перед внесением в лунки к полученному супернатанту или непосредственно к клеточному экстракту добавляли 2 мкл краски (100 мМ BisTris-HCl, pH 7,0; 0,5 М ε-аминокапроновая кислота, 30% сахароза, 50мг/мл красителя Кумасси синего G).

Электрофорез белков проводили в присутствии анодного (15 мМ BisTris-HCl, pH 7,0) и катодного буфера 1 (50 мМ Трицин, 15 мМ BisTris-HCl, pH 7,0; 0,02% краситель Кумасси синий G) первые 30 мин при напряжении 75 В и далее по схеме: 30 мин при 100 В, 30 мин при 125 В, 1 ч при 150 В. Затем заменяли катодный буфер 1 на катодный буфер 2, не содержащий красителя. Электрофорез образцов продолжали 30 мин при 175 В, далее при 200 В до полного выхода краски из геля.

2.12.3. Двумерный (2DE) электрофорез белков

Препараты белков клеточных экстрактов разделяли при помощи двумерного (2DE) электрофореза по O′Farrell (O′Farrell, 1945). Проводили фракционирование белков в первом направлении методом изоэлектрического фокусирования (IEF) на гелевых стрипах длиной 11 см и градиентом pH 4-7 (ReadyStrip IPG Strips, «Bio-Rad»). Для этого пробы очищали с помощью набора ReadyPret 2-D Cleanup Kit («Bio-Rad») согласно протоколу фирмы-производителя. Препараты белков (200 мкг – для 11 см стрипов) растворяли в Rehydration buffer B (8 М мочевина, 2% CHAPS, 50 мМ ДТТ, 0,002% бромфеноловый синий, 0,2% амфолитов с pH, соответствующей pH стрипов) и наносили на поверхность гелевых полосок. Во избежание испарения образца, на стрипы наслаивали 1 мл иммерсионного масла.

IEF проводили в аппарате Protean IEF Cell («Bio-Rad») по следующей схеме (программа «Rapid»):

- активная регидратация (50 В) при 25°С в течение 12 ч без прерывания
- S1 (подготовительный этап): 250 В – 15 мин
- S2 (линейно изменяемое напряжение): 11 см: 8000 В – 2,5 ч
- S3 (финальное фокусирование): 11 см: 8000 В – 60 000 В
- S4 (хранение): 500 В

По завершению IEF гелевые стрипы инкубировали 2 раза по 15 мин в растворе 1 (50 мМ Трис-HCl, pH 8,8; 6 М мочевина, 30% глицерин, 10% ДДС, 1% ДТТ), затем аналогичным образом в растворе 2 (50 мМ Трис-HCl, pH 8,8; 6 М мочевина, 30% глицерин, 10% ДДС, 4,8% йодацетамид). Во втором направлении проводили электрофорез белков в денатурирующих условиях (см. главу 2.12.4). Подготовленные стрипы выкладывали на поверхность разделяющего геля и фиксировали 1% агарозой, приготовленной на электрофорезном буфере с добавлением бромфенолового синего.

2.12.4. Электрофорез белков в денатурирующих условиях

Разделение белков растворимых фракций, тилакоидных мембран и фикобилисом цианобактерий, а также клеточных белков *E. coli* проводили с помощью электрофореза в денатурирующих условиях (ДДС-ПААГ) согласно Laemmli (Laemmli, 1970). Концентрации растворов и схема их приготовления приведены в табл. 12.

Перед внесением в лунки белковые пробы смешивали с равным объёмом буфера для образцов (62,5 мМ Трис-HCl, 2% ДДС; 10% глицерин, 5% β-меркаптоэтанол, 0,004% бромфеноловый синий, pH 6,8) и инкубировали в течение 5 мин при 94°С. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием (10 000 *g*) при комнатной температуре. Электрофорез белков проводили в присутствии Laemmli буфера (25 мМ Трис-HCl; 192 мМ глицерин; 0,1% ДДС, pH 8,3) при постоянном напряжении 50 В на гель.

Для фракционирования белков в денатурирующих условиях также использовали готовые растворы: 10% или 12,5% NEXT Gel kit («Amresco», США) согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Табл. 12. Растворы для ДДС-ПААГ электрофореза

Исходные растворы	**Конечная концентрация растворов**	
	Для разделяющего геля	**Для концентрирующего геля**
2 М Трис-HCl, pH 8,8	0,375 М	-
1 М Трис-HCl, pH 6,8	-	0,125 М
40% Акриламид (29:1)	10% или 12,5%	5%
10% ДДС	0,1%	0,1%
10% APS	0,06%	0,08%
TEMED	0,006%	0,008%
H_2O	Довести до конечного объёма	

Для определения молекулярной массы полипептидов в качестве стандартов применяли белковые маркеры: Novex Sharp Pre-Stained Protein Standart («Invitrogen»), Precision Plus Protein Standards («Bio-Rad»), Prestained Protein Molecular Weight Marker или Unstained Protein Molecular Weight Marker («Thermo Scientific, Life Technologies»).

2.12.5. Окрашивание белковых гелей раствором коллоидного Кумасси

Перед окрашиванием гель отмывали горячей ddH_2O (15 мин). Затем помещали в раствор коллоидного Кумасси (2,5 г красителя кумасси синего G растворить в 250 мл 96% спирта, довести до 1 л 15% ТХУ) и подогревали до 60°С. Окрашивание белков проводили в течение 40 мин, затем гели отмывали ddH_2O до визуализации полос белков.

2.12.6. Негативное окрашивание белковых гелей

Для визуализации белковых полос в ПААГ перед их переносом на мембрану гель инкубировали в течение 10 мин в растворе 0,2 М имидазола, затем помещали в раствор 0,3 М $ZnSO_4$ до появления негативного окрашивания. Реакцию останавливали водой, гель отмывали буфером для переноса, не содержащим ДДС и метанола (см. главу 2.16).

2.13. MALDI-TOF анализ

После фракционирования в ПААГ белковые полосы соответствующих молекулярных весов, окрашенные раствором коллоидного Кумасси, вырезали из геля и подвергали MALDI-TOF анализу (Shevchenko *et al.*, 1996) в центре «Постгеномные и нанотехнологические инновации» (Россия).

2.14. Экспрессия белка PepP *Synechocystis*

Для анализа белка PepP была получена генетическая конструкция на основе вектора pET-41a(+), содержащая полноразмерную кодирующую область гена *sll0136*. После переноса рекомбинантной плазмиды pET-41a(+)-*sll0136* в экспрессирующие клетки BL21 (DE3)pLysS *E. coli* единичные колонии трансформантов использовали для тест-анализа экспрессии белка PepP.

Для процедуры очистки отобранный положительный клон, экспрессирующий рекомбинантный белок PepP, инокулировали в 200 мл жидкой среды LB (25 мкг/мл Km, 12,5 мкг/мл Cm) и оставляли на ночь (37°C) на медленном качании. На следующий день культуру клеток разводили в 17 раз свежим раствором LB (25 мкг/мл Km, 12,5 мкг/мл Cm) и подращивали около 5 ч при 37°C. По достижении $ОП_{600}$ = 0,2-0,3 клеточную суспензию охлаждали до комнатной температуры и вносили ИПТГ до конечной концентрации 0,1 мМ. Белок экспрессировали при 25°C в течение 16-18 ч при медленном встряхивании. После окончания индукции экспрессию целевого белка анализировали с помощью ДДС-

ПААГ (см. главу 2.12.4), используя контрольные пробы, отобранные до и после индукции.

2.15. Очистка рекомбинантного белка

Культуру клеток *E. coli* после индукции осаждали центрифугированием (10 мин, 4000 *g*, 4°C), полученный осадок ресуспендировали в PBS буфере (50 мМ NaH_2PO_4, 150 мМ NaCl, pH 7,2). Клеточную суспензию дважды разрушали на прессе Френча при 50 Мпа. Полученный лизат центрифугировали в течение 20 мин при 50 000 *g* (4°C), супернатант фильтровали через 0,45-мкм фильтр (Millex-HV Syringe Driven Filter Unit PVDF, «Merck Millipore», Германия). Белок очищали методом аффинной хроматографии, используя колонку Bio-ScaleTM Mini Profinity GST Cartridge («Bio-Rad») при комнатной температуре.

Для этого колонку уравновешивали 5 объёмами PBS буфера и пропускали через неё лизат в течение ночи. Затем колонку последовательно промывали 20 объёмами PBS буфера, далее 10 объёмами АТФ буфера (50 мМ Трис-HCl, pH 7,4; 2,5 мМ АТФ, 10 мМ $MgCl_2$) и 5 объёмами 50 мМ Трис-HCl (pH 7,4). Белок с колонки элюировали буфером (50 мМ Трис-HCl, pH 8,0, 100 мМ NaCl, 50 мМ восстановленный глутатион). Количество белка определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм на приборе Nanodrop ND-1000 («Thermo Scientific, Life Technologies»). Фракции элюированного белка анализировали в ДДС-ПААГ (см. главу 2.12.4).

2.15.1. Удаление GST-последовательности

Элюированный препарат белка диализовали против 20 мМ Трис-HCl (pH 8,0) в течение ночи при 4°C с помощью мембраны (Dialysis tubing cellulose membrane, «Sigma»). Реакцию проводили в 50 мкл смеси в реакционном буфере (20 мМ Трис-HCl, pH 8,0; 2 мМ $CaCl_2$, 50 мМ NaCl): на 101,2 мкг белка использовали 1 ед. акт. энтерокиназы («Sigma»), разведённой в буфере для хранения (20 мМ Трис-HCl, pH 8,0; 2 мМ $CaCl_2$, 200 мМ NaCl, 50% глицерин). Гидролиз проводили в течение

48 ч при 25°C. Реакцию останавливали добавлением раствора 100 мМ PMSF до конечной концентрации 1 мМ и анализировали с помощью SDS-PAGE (см. главу 2.12.4).

Реакционную смесь диализовали против PBS буфера в течение ночи при 4°C. Белок очищали методом аффинной хроматографии, используя глутатион-сефарозу (Glutation Sepharose 4B, «GE Healthcare») при комнатной температуре согласно рекомендациям фирмы-производителя.

2.16. Полусухой перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану

Электрофоретический полусухой перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond-C, размер пор – 0,45 мкм, «GE Healthcare») проводили с помощью аппарата Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell («Bio-Rad») согласно методике фирмы-производителя. Для этого бумагу (Extra Thick Blot Filter Paper, 8 × 13,5 см, «Bio-Rad»), мембрану и гель предварительно инкубировали в течение 10 мин в буфере для переноса (25 мМ Трис, 192 мМ глицин, pH 8,3; 20% метанол, 0,1% ДДС). Перенос с мини-геля (8,3 × 6,8 см) проводили в течение 30 мин при 3,3 мА/см^2 и 25 В. Для контроля качества электроблотинга белков, гели после переноса окрашивали по стандартной схеме раствором коллоидного Кумасси (см. главу 2.12.5). Равномерность переноса белков на мембрану оценивали окрашиванием блоттов в 0,05-1% растворе Ponceau C в 1% уксусной кислоте и отмывали ddH_2O до появления белковых полос. Отмытые от Ponceau C мембраны использовали для иммунохимического анализа (см. главу 2.17).

2.17. Иммунохимический анализ

Нитроцеллюлозную мембрану с иммобилизованными белками инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре в блокирующем растворе TBS (10 мМ Трис-HCl, pH 7,7; 150 мМ NaCl, 0,1% Tween-20, 1% BSA). Первичные поликлональные антитела кролика против человеческой X-пролил аминопептидазы

3 (Anti-XPNPEP3 antibody, «Sigma») разводили в блокирующем растворе 1 : 800 и гибридизовали с белками на мембране в течение ночи при 4°C.

Для удаления первичных антител мембрану промывали TBS, без блокирующего реагента (4 раза по 10 мин при комнатной температуре) и инкубировали в блокирующем растворе с флуоресцентными кроличьими IgG-антителами, конъюгированными с ФИТЦ («Медгамал», Россия) в течение 50 мин. Не связавшиеся антитела удаляли повторным промыванием (15 мин) в TBS без блокирующего реагента. Мембрану высушивали, сигнал регистрировали на приборе Phosphoimager Typoon Trio+ с использованием фильтра 525SP опции Fluorescein, Cy2, AlexFluor488.

2.18. Анализ протеолитической активности белка pepP *in vitro*

Для характеристики природы протеолитической активности белка PepP использовали специфичный для пролиновых аминопептидаз синтетический субстрат Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA («Bachem», Швейцария) и неспецифический субстрат для сериновых протеаз – азоказеин («Sigma»).

2.18.1. Гидролиз флуоресцентного субстрата

Активность очищенного препарата белка PepP определяли с помощью флуоресцентного субстрата Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA (Abz – 2-аминобензойная (антраниловая) кислота; pNA – n-нитроанилин). В структуре подобных субстратов использован принцип внутримолекулярного тушения флуоресценции, так как Abz – флуорофор и pNA – тушитель находятся в составе одной молекулы. При гидролизе пептидной связи Lys(Abz)-↓-Pro-Pro-pNA фрагмент молекулы, содержащий группу-тушитель, отщепляется, и происходит резкое возрастание интенсивности флуоресценции лизина, несущего флуорофор. Флуоресценцию высвобождаемого продукта реакции гидролиза детектировали при λ_{ex} = 310 нм и λ_{em} = 410 нм в 40 мМ Трис-HC (pH 7,5) при 30°C на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301PC (Япония).

Для ферментативной реакции использовали 13,7 нМ очищенного препарата белка PepP и 10 мкМ растворённого в ДМСО субстрата. Предварительную замену буфера для элюции в образце белка (см. главу 2.15) на соответствующий раствор 40 мМ Трис-HCl проводили с использованием хроматографических колонок (Micro Bio-Spin Chromatography Column, «Bio-Rad»). Перед реакцией гидролиза белок инкубировали в течение 15 мин при 30°C. Кинетические параметры белка PepP, такие как K_M и V_{max}, оценивали для Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA с использованием концентраций субстрата в диапазоне от 1 до 50 мкМ. Для определения K_M были построены графики в двойных обратных величинах по Лайнуиверу-Берку.

2.18.2. Влияние температуры и pH

Для нахождения температурного оптимума активности белка PepP, реакцию гидролиза проводили в 40 мМ Трис-HCl (pH 7,5) при температуре от 10 до 60°C. Для нахождения pH оптимума реакцию гидролиза проводили в 40 мМ Трис-HCl в диапазоне pH от 5,5 до 8,5 при 30°C.

2.18.3. Влияние ионов двухвалентных металлов

Для изучения влияния ионов двухвалентных металлов на активность очищенного препарата белка PepP использовали водные растворы $ZnCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $CdCl_2$, $CaCl_2$, в концентрациях 0,01, 0,1 и 5 мМ. Белок предварительно инкубировали в течении 15 мин при 30°C, затем ещё 5 мин в присутствии соответствующего хлорида металла.

2.18.4. Влияние ингибиторов

Для изучения влияния ингибиторов на активность очищенного препарата белка PepP использовали растворы PMSF, ЭДТА, пепстатин А, бестатин, 1,10-фенантролин в концентрациях 0,1 мМ и 5 мМ. Белок предварительно инкубировали

в течение 15 мин при 30°С, затем ещё 5 мин в присутствии соответствующего ингибитора.

2.18.5. Гидролиз азоказеина

Гидролиз неспецифического субстрата для сериновых протеаз азоказеина («Sigma») проводили в присутствии очищенного препарата белка PepP или контрольного белка - трипсина согласно рекомендациям фирмы-производителя в 60 мМ $NaHCO_3$ (pH 8,3) при 37°С или в 40 мМ Трис-HCl буфере (pH 7,5) при 30°С в течение 16 ч. Реакцию останавливали раствором 5% ТХУ, после чего пропускали образец через мембранный фильтр с размером пор – 0,45 мкм («Merck Millipore»). Для усиления окраски добавляли 0,5 М NaOH и анализировали высвобождение красителя по поглощению при 440 нм на спектрофотометре GENESYS 10 UV Scanning («Thermo Scientific, Life Technologies»).

2.19. Статистический анализ

Все эксперименты проводились в трёхкратной биологической повторности. Рисунки и таблицы содержат среднеарифметические значения и их стандартные ошибки. Для расчёта достоверностей различий между средними арифметическими использовали *t*-критерий Стьюдента. Оценку данных в случае двухфактрного дисперсионного анализа проводили в программе Exel (пакет «Анализ данных»).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Характеристика гена *sll0136* с использованием биоинформационных ресурсов

Согласно базе данных CyanoBase ген *sll0136* (*http://genome.microbedb.jp/cyanobase/Synechocystis/genes/sll0136*) цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 кодирует, предположительно, белок пролин-специфичной аминопептидазы, обозначенный как PepP (WP_010873192.1). Протяжённость гена, локализованного на хромосоме в районе 2 207-2 208 тыс. п. н., составляет 1326 п. н. Генное окружение *pepP* образуют (рис. 7): *slr0165*, кодирующий протеолитическую субъединицу ClpP3 комплекса Clp протеазы, и *sll0135*, кодирующий, предположительно, фосфорилазу MtnP. Анализ генома *Synechocystis* с помощью программы DOOR^2 позволил предсказать вхождение *sll0136* в состав оперона размером 2 825 п. н. Вероятно, данный ген образует кластер с соседними генами *sll0135*, *sll0242* и *sll0241* (где *sll0242* и *sll0241* кодируют гипотетические белки) и занимает в нём конечное положение (рис. 7). Белок PepP состоит из 441 а. о. с ожидаемой мол. массой 48,5 кД.

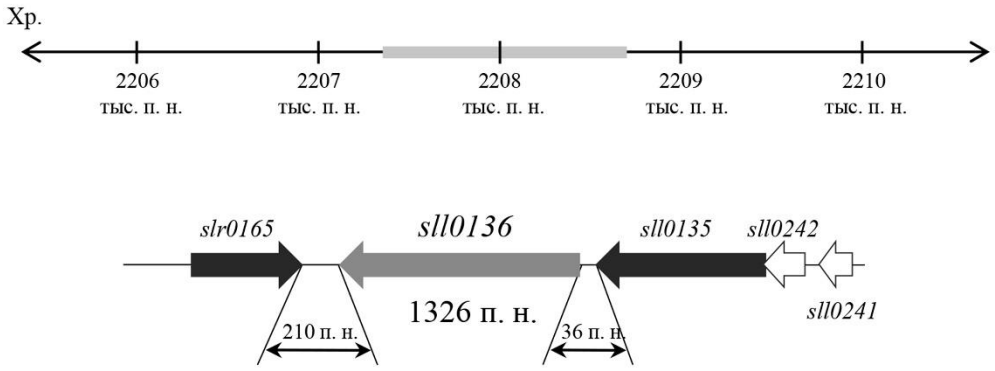

Рис. 7. Физическая карта участка хромосомы *Synechocystis* sp. PCC 6803, содержащая ген *sll0136.*

Аминокислотные последовательности белков, кодируемых генами, указанными на рис. 7, приведены в П. 2.

Компьютерный анализ аминокислотной последовательности белка PepP с помощью алгоритма Kyte и Doolittle (Kyte, Doolittle, 1982) показал, что исследуемый белок не содержит гидрофобных участков протяжённостью не менее 18-20 а. о., характерных для трансмембранных доменов (рис. 8). Вероятно, белок PepP является растворимым и локализован в цитоплазме, так как лишён сигнальных последовательностей, необходимых для транспорта фермента через мембрану в люмен. Биоинформационный анализ аминокислотной последовательности PepP *Synechocystis* с использованием ряда программ (Gneg-mPLoc, PSLpred и PSORTb) также предсказал высокую вероятность цитоплазматической локализации белка. Предполагаемая локализация фермента в цитоплазме клетки была отмечена и в работе Sokolenko (Sokolenko *et al.*, 2002).

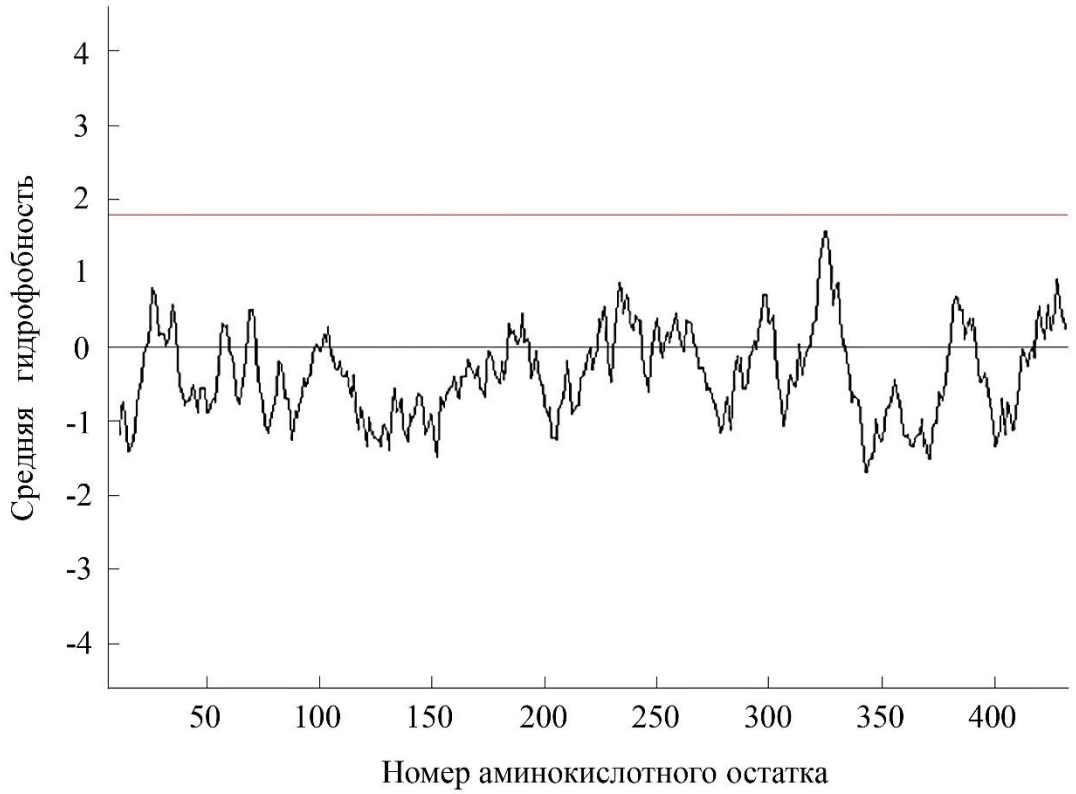

Рис. 8. Профиль гидрофобности белка PepP *Synechocystis* sp. PCC 6803 согласно Kyte и Doolittle (1982).

Обозначения: размер окна – 19, отсутствие пиков выше значения 1,8 (красная линия) исключает наличие трансмембранных регионов в белке.

Однако, из литературы известно, что аминопептидазы P также могут быть представлены мембраносвязанными белками (Cottrell *et al.,* 2000b). Данные APP содержат в своей последовательности N-концевой сигнальный пептид, который необходим для транслокации молекулы в эндоплазматический ретикулум. После удаления гидрофобной последовательности фермент прикрепляется своим C-концевым участком к липидному бислою через GPI-якорный белок (гликозилфосфатидилинозитол). Однако мембраносвязанные формы аминопептидаз P характерны для клеток млекопитающих, но не прокариот (Hooper *et al.*, 1990; Molinaro *et al.*, 2005). В настоящее время известно, что близкий гомолог анализируемого белка PepP – AMPPII *E. coli* локализована в цитоплазме бактериальной клетки (Wilce *et al.,* 1998). Среди растворимых белков эукариотических APP следует особо отметить митохондриальные формы: XPNPEP3 *H. sapiens*, ICP55 *A. thaliana* и ICP55 *S. cerevisiae* (O'Toole *et al.,* 2010; Carrie *et al.,* 2015; Naamati *et al.,* 2009). Несмотря на то, что аминокислотные последовательности данных белков обладают сходством с PepP (см. рис. 9 и 11), механизм действия митохондриальных APP отличается от бактериальных X-пролил-аминопептидаз.

Нужно отметить, что опубликованные в настоящее время результаты протеомного анализа мембранных белков различных фракций (плазматической и тилакоидной мембраны, Liberton *et al.*, 2016; наружной мембраны, Huang *et al.*, 2004) *Synechocystis* не содержат данных о PepP. Таким образом, исследуемый в данной работе белок PepP, скорее всего, локализован в цитоплазме. Это позволяет предположить, что возможные субстраты для данного белка также находятся в этом компартменте.

Поиск гомологичных белков на сервере NCBI показал сходство аминокислотной последовательности белка PepP с белками семейства M24: пролиновыми аминопептидазами, пролидазами и метиониновыми аминопептидазами. Среди гетеротрофных бактерий наибольшее сходство было найдено с бактериальной аминопептидазой P II *E. coli* (AMPPII) – 44% (Пожидаева

и др., 2013). Для выяснения эволюционных взаимоотношений ряда белков, принадлежащих к семейству M24, с аминопептидазой P *Synechocystis* было проведено выравнивание и сравнение полноразмерных аминокислотных последовательностей белков, и построение их общего филогенетического дерева методом ближайших соседей (neighbor joining) (рис. 9).

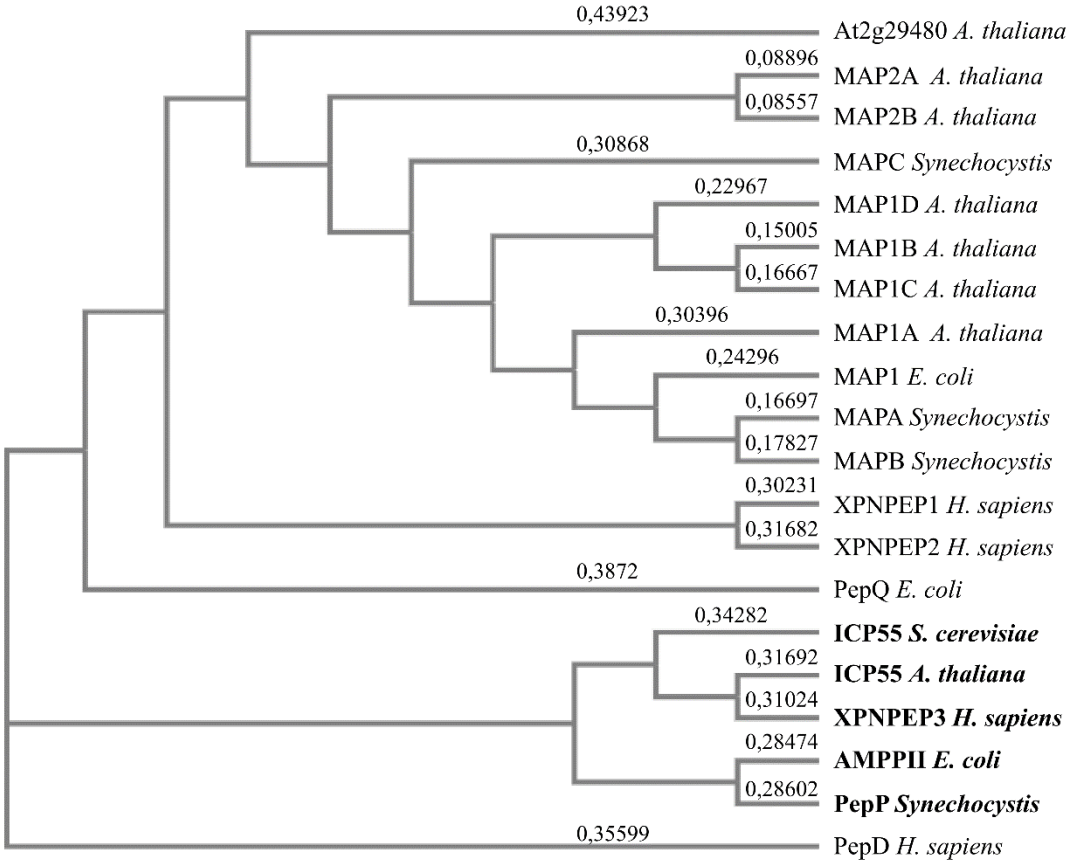

Рис. 9. Филогенетическое дерево белков семейства M24, основанное на сравнении аминокислотных последовательностей пролин-специфичных аминопептидаз P (ICP55, XPNPEP, AMPPII, PepP, At2g29480), пролидаз (PepQ, PepD) и метиониновых аминопептидаз (MAP).

Обозначения: цифрами указаны относительные длины ветвей дерева. Жирным шрифтом выделены эволюционно близкородственные белки.

Филогенетический анализ показал, что PepP *Synechocystis* и бактериальная аминопептидаза P II *E. coli* (AMPPII) эволюционно связаны между собой, так как образуют единый кластер. Наиболее близкородственными также оказались белки не цитозольных, а митохондриальных X-пролил-аминопептидаз эукариот:

XPNPEP3 человека, ICP55 дрожжей и её гомолога в *A. thaliana*. Наряду с бактериальной аминопептидазой P II, они показали высокую степень гомологии к белку PepP: аминопептидаза P3 *H. sapiens* (35%), ICP55 *A. thaliana* (33%) и ICP55 *S. cerevisiae* (32%). Как уже было отмечено, механизм действия митохондриальных белков отличается от механизма действия бактериальных аминопептидаз P. Для гидролиза пептидных связей AMPPII *E. coli* требуется присутствие остатка пролина в строго определённом положении молекулы-субстрата (Wilce *et al.*, 1998), в то время как ICP55 *A. thaliana* обладает более широкой субстратной специфичностью и не требует а. о. Pro в положении, соседнем с N-концевым (Carrie *et al.*, 2015). Такое различие прокариотического и эукариотического путей может быть интересно с точки зрения эволюции организмов и изменения функции гомологичных белков в клетке.

С помощью программы Pfam (*http://pfam.sanger.ac.uk/*) у белка PepP было выявлено два домена, разделённых междоменным участком (рис. 10). N-концевой домен характерен для аминопептидаз P и состоит из 134 а. о. (Val5-Asn138), а более протяжённый С-концевой каталитический домен (Ala182-Ala422), включающий 251 а. о., является типичным для металлопептидаз (Пожидаева *и др.*, 2013).

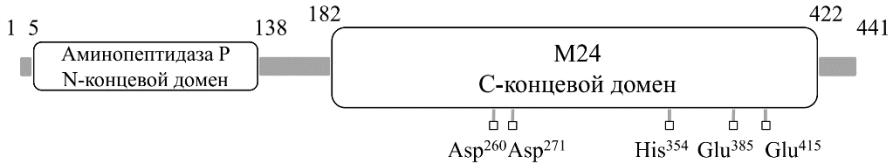

Рис. 10. Доменная организация белка PepP *Synechocystis* sp. PCC 6803.
Обозначения: цифрами указаны номера а. о. в белке; отмечены позиции а. о., образующих активный сайт белка.

Структура С-концевого домена AMPPII *E. coli* содержит высококонсервативные а. о. Asp260, Asp271, His354, Glu383, Glu406 (Graham *et al.*, 2006), о чём также свидетельствует анализ сравнения аминокислотных последовательностей белков аминопептидаз P, эволюционно схожих с PepP

Synechocystis (рис. 11). Особую роль играют а. о. активного центра белка, которые участвуют в образовании комплекса с ионами двухвалентных металлов (рис. 10).

Биоинформационный анализ также показал высокую степень гомологии белка PepP с метиониновыми аминопептидазами (MAPA, MAPB, MAPC), особенно в области каталитического домена. Это позволяет предположить, что пролин-специфичная аминопептидаза цианобактерий способна частично заменять функцию MAP белков, гидролизуя пептидные связи, образованные инициаторным Met и вторым а. о. Pro (Пожидаева *и др.*, 2013).

Роль аминокислотных остатков в активном центре X-пролил-аминопептидаз подтверждается в работе Cottrell (Cottrell *et al*., 2000b), показывающей, что мутация любой из пяти аминокислот, вовлечённых в связывание ионов металла у мембраносвязанной аминопептидазы P, выделенной из почек свиньи, приводит к полной инактивации фермента. Замена других функционально значимых а. о. His243→Leu243 и His361→Lys361 лишала фермент протеолитической активности (Cottrell *et al.*, 2000b). Позднее были изучены 7 форм AMPPII *E. coli*, у которых консервативные а. о. His243, Asp260, Asp271, His350, His354, His361, Glu383 замещались на аланин. Только мутация His243→Ala243 позволила наблюдать каталитическую активность фермента (Graham *et al.*, 2006). Предполагается, что аминокислотные остатки His243 и His361 в AMPPII *E. coli*, которые не образуют комплекс с ионами металла, играют важную роль в механизме катализа фермента (Wilce *et al.*, 1998).

Иная роль принадлежит а. о. His350 и Arg404 в AMPPII *E. coli*. Они образуют гидрофобный карман, который в процессе катализа правильно ориентирует комплекс фермента с субстратом. Другие консервативные аминокислотные остатки, вероятно, участвуют в поддержании структурной целостности активного центра фермента (Graham *et al.*, 2006).

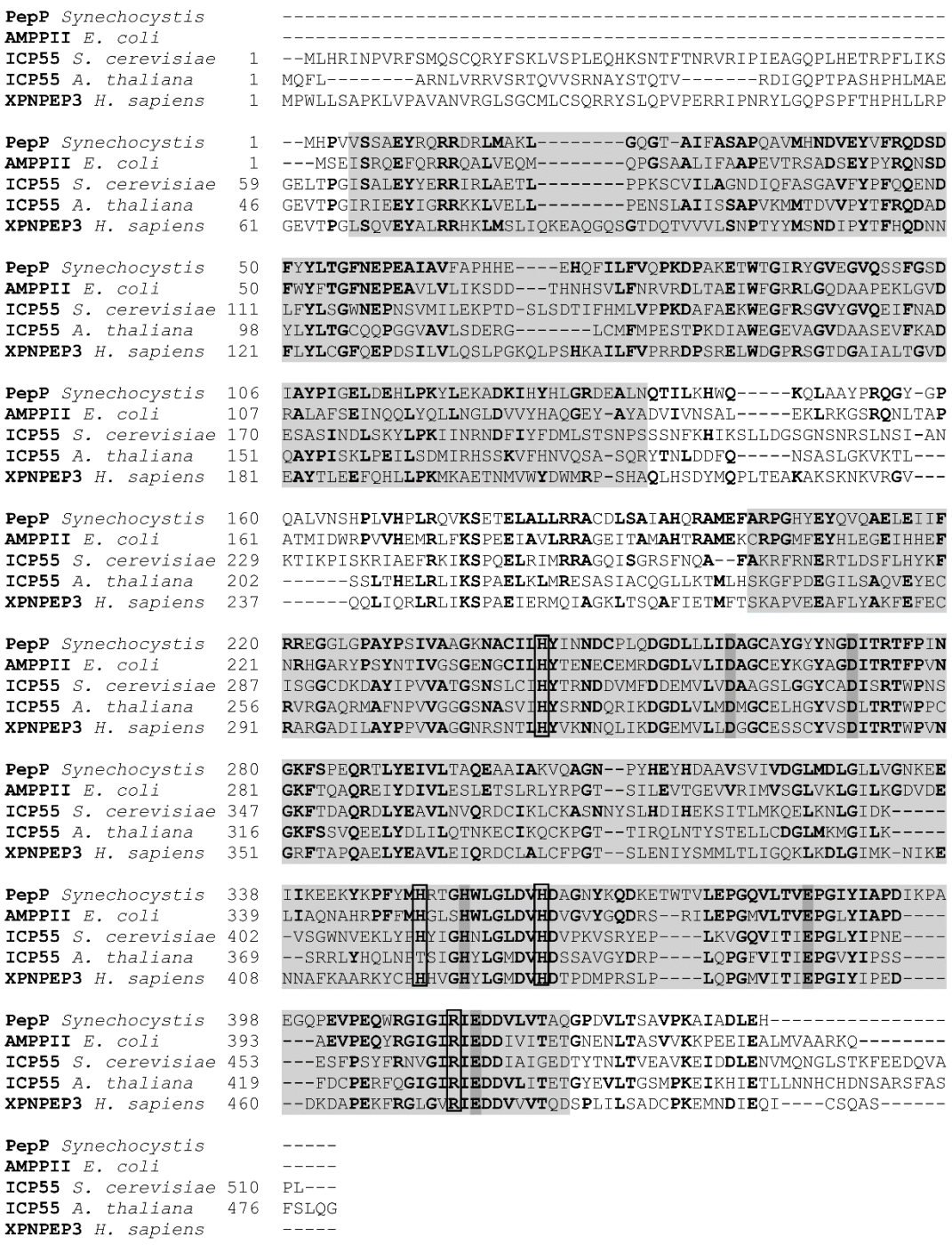

Рис. 11. Сравнение аминокислотных последовательностей белков аминопептидаз P: PepP *Synechocystis*, AMPPII *E. coli*, ICP55 *S. cerevisiae*, ICP55 *A. thaliana* и XPNPEP3 *H. sapiens*. Выравнивание и сравнение аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы ClustalW.

Обозначения: жирным шрифтом выделены идентичные а. о.; тёмно-серым цветом обозначены а. о. активного центра белка, участвующие в связывании двухвалентных ионов металла; заключены в рамку – функционально значимые консервативные а. о.; светло-серым цветом обозначены домены белков.

Таким образом, определение функциональной роли консервативных а. о. в каталитических доменах уже охарактеризованных белков-гомологов из различных организмов в дальнейшем может помочь в идентификации соответствующих а. о. в цианобактериальном белке PepP *Synechocystis*. Для проверки данной гипотезы *in silico* нами было проведено компьютерное моделирование пространственной структуры белка PepP, которое будет рассмотрено в главе 3.4.

3.2. Анализ протеолитических свойств и субстратной специфичности белка PepP

3.2.1. Получение чистого препарата рекомбинантного белка PepP

3.2.1.1. Получение экспрессионной конструкции pET-41a(+)-*sll0136*

Для анализа природы протеолитической активности предполагаемой аминопептидазы P *Synechocystis*, кодируемой геном *sll0136*, требуется чистый препарат белка PepP. Для этого была получена рекомбинантная плазмида в составе экспрессионного вектора pET-41a(+), содержащая последовательность целевого гена *sll0136*. Схема проведения данной работы представлена на рис. 12.

Первоначально, фрагмент гена *sll0136* длиной 1326 п. н. клонировали в Т-вектор pAL-TA размером 3015 п. н. Для этого с помощью ПЦР-анализа на матрице ДНК дикого типа *Synechocystis* была амплифицирована полноразмерная нуклеотидная последовательность гена. Реакцию проводили с использованием ген-специфичных праймеров, комплементарных 5’- и 3’-концам кодирующей области гена (SacI_PepP, XhoI_PepP, табл. 5) и дополнительно содержащих сайты рестрикции: *Sac*I и *Xho*I, отсутствующие в pAL-TA. Синтезированный фрагмент ДНК, очищенный из ПЦР-смеси, лигировали с векторной плазмидой, после чего полученную смесь использовали для трансформации компетентных клеток XL1-Blue *E. coli*.

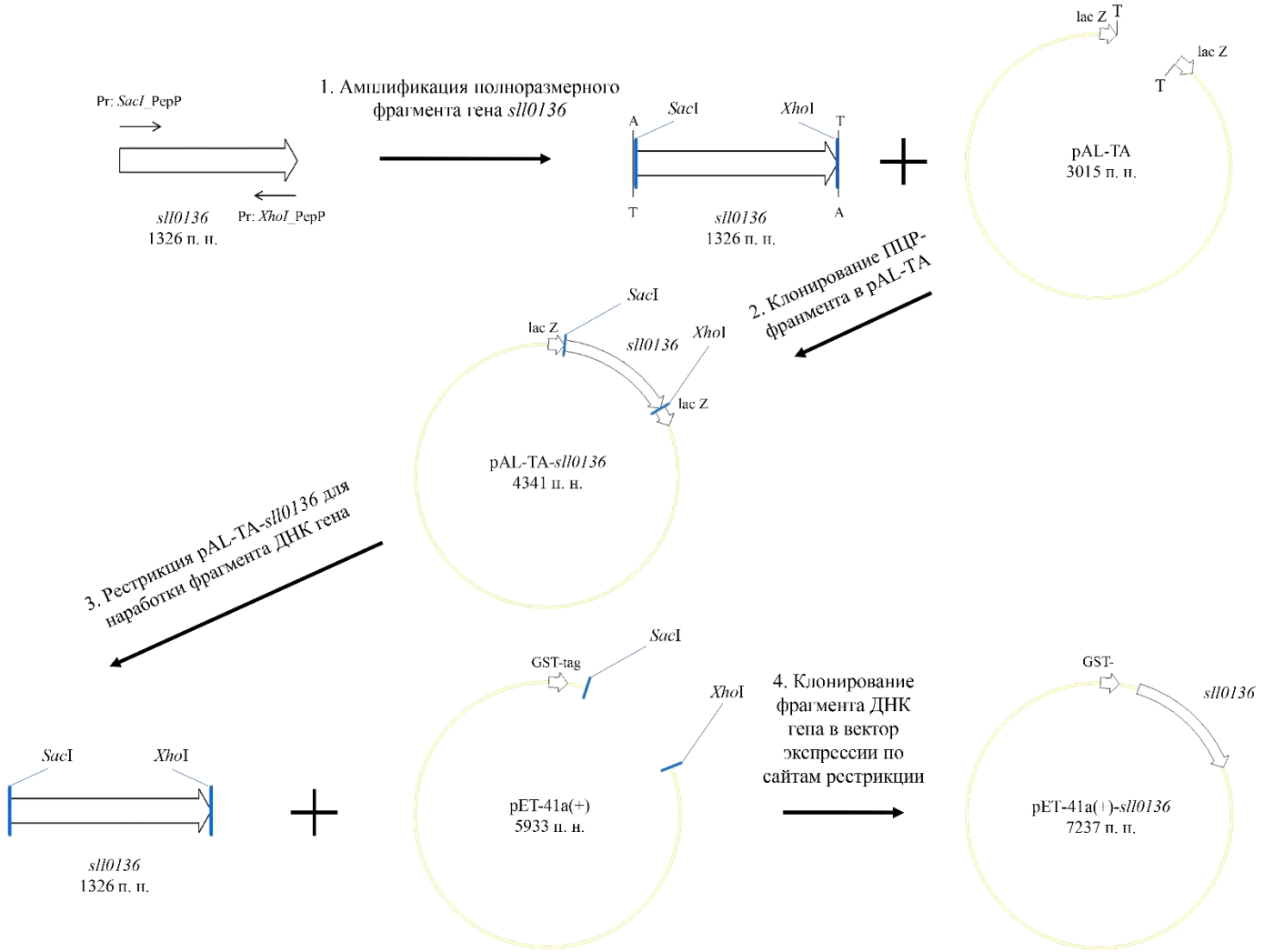

Рис. 12. Схема получения рекомбинантной плазмиды pET-41a(+)-*sll0136* для экспрессии полноразмерного белка PepP *Synechocystis* (описание в тексте).

Положительные клоны, несущие инсерционные фрагменты гена *sll0136*, отбирали методом бело-голубой селекции в присутствии ампицилина и тетрациклина в питательной среде LB. Для подтверждения наличия вставки в полученных рекомбинантных плазмидах pAL-TA-*sll0136* размером 4341 п. н. использовали ПЦР-амплификацию с ген-специфичными праймерами (SacI_PepP, XhoI_PepP, табл. 5).

Для клонирования фрагмента гена *sll0136* в вектор pET-41a(+) размером 5933 п. н. генетические конструкции подвергали предварительному рестрикционному анализу. Рекомбинантные плазмиды pAL-TA-*sll0136* и pET-41a(+) рестрицировали по *Sac*I и *Xho*I. Затем фрагменты ДНК, соответствующие гену *sll0136* и вектору экспрессии pET-41a(+), очищали из геля и лигировали между собой. Полученной смесью трансформировали компетентные клетки DH5α *E. coli*, последующий отбор которых вели на агаризованной среде LB, содержащей канамицин. Данные клетки являются «промежуточными» на этапе получения экспрессионных конструкций, так как в них отсутствуют генетические элементы, необходимые для индуцированной экспрессии целевого белка. В частности, для инициации транскрипции клонированного в pET-41a(+) гена *sll0136*, находящегося под контролем сильного промотора фага T7, требуется соответствующая РНК-полимераза. Бактериальные клетки лишены гена подобной РНК-полимеразы, поэтому в них невозможно провести индуцированную экспрессию пептида. Однако существуют генетически модифицированные штаммы *E. coli*, способные справляться с данной задачей. В качестве таких клеток были выбраны BL21 (DE3)pLysS *E. coli*, содержащие ген РНК-полимеразы фага T7, *lac*-регулируемый промотор и *lac*-оператор. Для активации данного гена необходимо добавление синтетического аналога лактозы (ИПТГ) в бактериальную среду. Кроме того, данный штамм содержит плазмиду pLysS с геном лизоцима фага T7, который подавляет активность РНК-полимеразы и, тем самым, существенно снижает начальный уровень экспрессии целевого белка.

Наличие инсерционной вставки гена *sll036* в составе вектора pET-41a(+) проверяли с помощью рестрикции по эндонуклеазным сайтам *Sac*I и *Xho*I (рис. 13). Ожидаемый размер фрагментов, соответствующий целевому гену и плазмидному вектору, составлял 1326 п. н. и 5933 п. н., соответственно. Плазмидную ДНК pET-41a(+)-*sll036*, выделенную из положительных клонов DH5α *E. coli*, использовали для трансформации компетентных клеток BL21 (DE3)pLysS *E. coli*. Селективный отбор клонов вели на чашках с LB средой, содержащей хлорамфеникол и канамицин. Для подтверждения инсерции гена *sll0136* в составе вектора pET-41a(+) также проводили рестрикционный анализ по описанной ранее схеме. Единичные клоны-трансформанты pET-41a(+)-*sll036* в BL21 (DE3)pLysS использовали для экспрессии полноразмерного белка PepP.

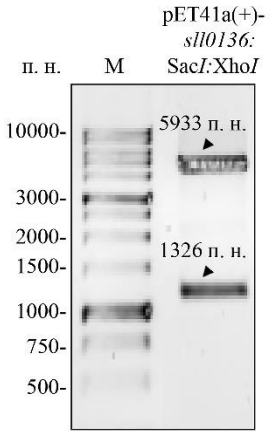

Рис. 13. Электрофореграмма анализа рестрикции рекомбинантной плазмиды pET-41a(+)-*sll0136* по эндонуклеазным сайтам *Sac*I и *Xho*I.

Обозначения: ДНК фрагменты размером 5933 п. н. и 1326 п. н. соответствуют последовательностям гена *sll0136* и вектора pET-41a(+) после рестрикции рекомбинантной плазмиды pET-41a(+)-*sll036* по *Sac*I и *Xho*I. M – маркер 1 тыс. п. н. («Сибэнзим»).

3.2.2. Очистка рекомбинантного белка PepP

Экспрессию полноразмерного рекомбинантного белка PepP *Synechocystis* с мол. массой 48,5 кД в составе вектора pET-41a(+) проводили в клетках

BL21 (DE3)pLysS *E. coli*. Нам не удалось детектировать значительное накопление целевого пептида в белковых пробах после их фракционирования в ДДС-ПААГ (рис. 14). После индуцированной экспрессией цианобактериального белка PepP проводили его хроматографическую очистку.

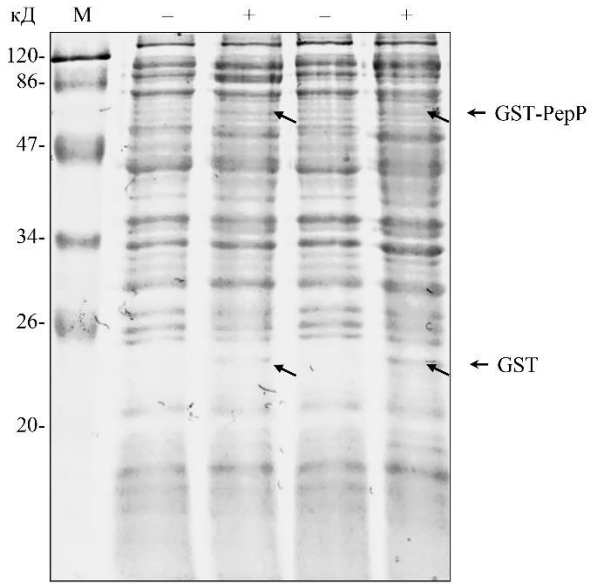

Рис. 14. 12,5% ДДС-ПААГ клеток BL21 (DE3)pLysS *E. coli*, экспрессирующих рекомбинантный белок PepP.

Обозначения: индукцию проводили в течение 16 ч при 25°C добавлением ИПТГ (+) до конечной концентрации 0,1 мМ. Для контроля использовали клетки до внесения ИПТГ (-). Стрелкой обозначены экспрессированный целевой полипептид GST-PepP размером 81,4 кД и GST размером 23,9 кД; M – белковый маркер («Thermo Scientific, Life Technologies»).

Для очистки рекомбинантного белка PepP использовали метод аффинной хроматографии со специфической меткой. Генетическая конструкция pET-41a(+)-*sll036* содержит на N-конце якорный участок – последовательность глутатион-S-трансферазы (GST) перед целевым белком (рис. 15). GST-последовательность (GST-tag) обеспечивает прочное и избирательное связывание экспрессированного полипептида с носителем колонки на основе сефарозы благодаря высокому сродству с иммобилизованным на сорбенте глутатионом. Нуклеотидная последовательность полипептида GST-PepP представлена в П. 3.

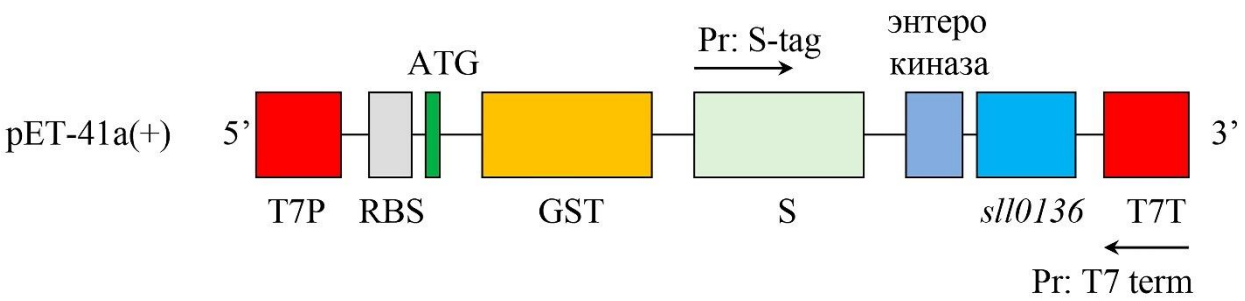

Рис. 15. Схема рекомбинантной плазмидной конструкции pET-41a(+)-*sll036* для экспрессии полноразмерного белка PepP *Synechocystis.*

Обозначения: T7P – T7 промотор; RBS – сайт связывания с рибосомой; ATG – старт-кодон; GST – последовательность глутатион-S-трансферазы (аффинная метка); S – последовательность (аффинная метка); энтерокиназа – сайт расщепления энетрокиназы; *sll0136* – целевой ген; T7 – T7 терминатор; S-tag, T7 term – праймеры, используемые при секвенировании генетической конструкции.

Исследуемый цианобактериальный белок PepP, слитый с GST-tag, очищали из клеточного лизата. Электрофоретическое разделение белковых проб в ДДС-ПААГ после первичной очистки представлено на рис. 16. Известно, что некоторые шапероны, например DnaK 70 кД (Rial, Ceccarelli, 2002), способны связываться с участками пептидного региона, который в векторах экспрессии содержит сайты узнавания различных пептидаз (тромбин, энтерокиназа, фактор Xa). Поэтому для удаления неспецифически связывающихся шаперонных белков, подверженных диссоциации в присутствие АТР и ионов Mg^{2+}, в процедуру очистки добавляли дополнительный шаг промывки колонки АТФ буфером, содержащим АТФ и $MgCl_2$. Для дальнейшей биохимической характеристики белка PepP необходимо удаление аффинной метки (GST-tag) из полученного гибридного полипептида GST-PepP. Для протеолитического расщепления целевого белка от белка-носителя в состав рекомбинантной плазмиды pET-41a(+)-*sll0136* включён сайт узнавания высокоспецифичной эндопептидазой (энтерокиназой) (рис. 15) – Asp/Asp/Asp/Asp/Lys. Данный фермент гидролизует пептидную связь после сайта узнавания. Поэтому первично очищенный белок GST-PepP обрабатывали энтерокиназой. Реакцию ограниченного протеолиза терминировали добавлением

ингибитора сериновых протеаз PMSF, внесение которого в пробу полностью подавляло активность фермента. Затем целевой белок отделяли от GST-последовательности на глутатион-сефарозе.

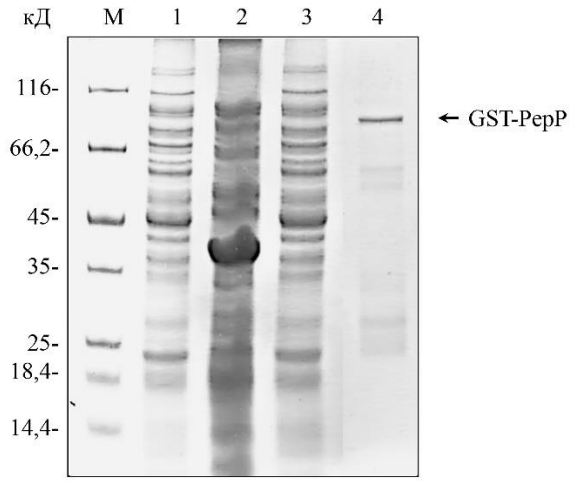

Рис. 16. 12,5% ДДС-ПААГ образцов белков, полученных после первичной хроматографической очистки рекомбинантного белка PepP *Synechocystis.*

Обозначения: 1 – неочищенный клеточный лизат; 2 – осадок, содержащий тельца включений; 3 – несвязавшиеся с колонкой белки; 4 – элюированный полипептид GST-PepP с мол. массой 81,4 кД; M – белковый маркер («Thermo Scientific, Life Technologies»).

Таким образом, нами был получен чистый препарат белка PepP (рис. 17). Идентификацию образцов проводили с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. MALDI-TOF анализу подвергали белковые пробы, полученные после первичной (рис. 16, 4 дорожка) и вторичной очистки (рис. 17, стрелками обозначены белковые полосы 1 и 2) пептида на глутатион-сефарозе. Анализ подтвердил, что первично выделенный гибридный белок является аминопептидазой P *Synechocystis*, связанной с последовательность GST вектора pET-41a(+) (П. 4, GST-PepP) и имеет суммарную мол. массу более 81 кД. Затем, в ходе протеолитического расщепления энтерокиназой был получен чистый препарат белка PepP, лишённый GST-tag (рис. 17, PepP). Нужно отметить, что в ходе вторичной очистки наблюдали автопротеолиз белка PepP на два полипептида (на рис. 17 отмечены как 1 и 2). Последующий MALDI-TOF анализ идентифицировал

соответствующие полипептиды как белок PepP одноклеточной цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 (см. П. 4, PepP 1/2).

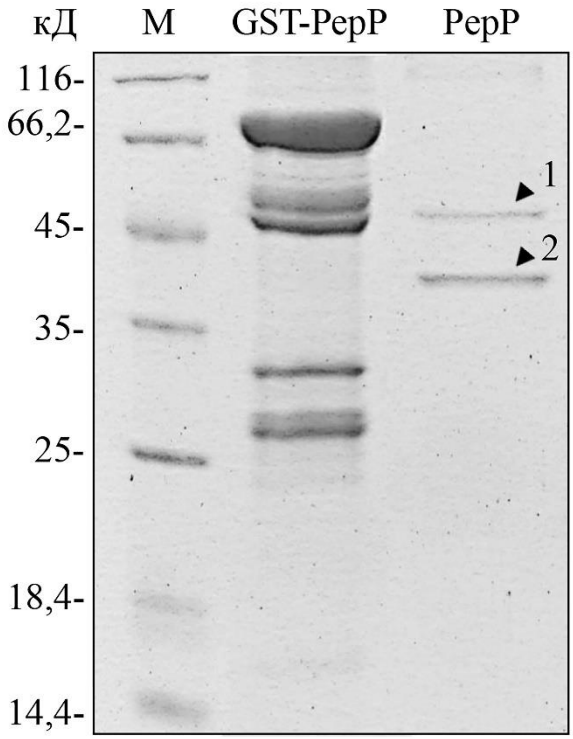

Рис. 17. 10% ДДС-ПААГ образцов после протеолитического расщепления гибридного белка GST-PepP энтерокиназой и последующей очистки PepP на глутатион-сефарозе. Обозначения: GST-PepP – первично очищенный полипептид GST-PepP с мол. массой 81,4 кД; PepP – результат обработки гибридного белка GST-PepP энтерокиназой с последующей очисткой на глутатион-сефарозе, продукты протеолиза которого (указаны стрелками) соответствуют белку PepP согласно MALDI-TOF масс-спектрометрии (П. 4, PepP 1/2); M – белковый маркер («Thermo Scientific, Life Technologies»).

С использованием коммерчески доступных антител к аминопептидазе P3 (XPNPEP3) человека было проверено, действительно ли очищенный белок является аминопептидазой P, так как сравнительный анализ антигенных эпитопов XPNPEP3 *H. sapiens* продемонстрировал сходство с антигенами белка PepP *Synechocystis*. Иммунохимический анализ показал взаимодействие гибридного белка GST-PepP с anti-XPNPEP3 (рис. 18), что подтверждает свойства выделенного рекомбинантного белка PepP, как возможной аминопептидазы.

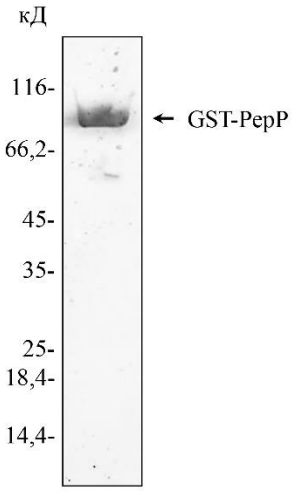

Рис. 18. Иммунохимический анализ гибридного белка GST-PepP с антителами против XPNPEP3 *H. sapiens.*

Обозначения: для анализа использовали фракцию первично очищенного белка GST-PepP; стрелкой указан полипептид, мол. масса которого соответствует гибридному белку GST-PepP. М – белковый маркер («Thermo Scientific, Life Technologies»).

Таким образом, в ходе данного исследования были подобраны условия экспрессии цианобактериального белка PepP в клетках *E. coli*, а также выбран оптимальный метод получения чистого нативного препарата для дальнейшего исследования природы протеолитической активности фермента. В отличие от APP других организмов (Hauser *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2006; Nandan, Nampoothiri, 2014) максимальная экспрессия PepP *Synechocystis* в клетках *E. coli* наблюдалась при 25°C через 16 ч инкубации. Для оптимальной очистки рекомбинантного белка PepP хроматографическим методом с использованием GST-сефарозы необходимо проводить дополнительную промывку колонки АТФ буфером, содержащим АТФ и $MgCl_2$.

3.3. Анализ природы протеолитической активности белка PepP *in vitro*

Для биохимической характеристики очищенного препарата белка PepP был использован специфичный для пролиновых аминопептидаз флуоресцентный субстрат Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA и неспецифичный для сериновых протеаз белок азоказеин.

Выбор специфичного субстрата Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA был основан, в первую очередь, на результатах бионформационного анализа (см. главу 3.1). Как правило, для анализа природы субстратной специфичности пептидаз *in vitro* используют амиды аминокислот, содержащих хромофор (pNA – 4-нитроанилин) или флуорофор (производные кумарина). Наличие флуоресцентной метки в синтетическом субстрате позволяет детектировать реакцию протеолиза спектрофлуориметрически, поскольку амиды и продукты гидролиза такого субстрата различаются по своим спектральным свойствам. Пролиновые пептидазы в специфичном для данной группы белков субстрате Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA расщепляют пептидную связь, разделяющую фторогенный аминобензоильный остаток и внутренний тушитель pNA.

Среди пролин-специфичных амипептидаз (рис. 3) данный субстрат способны расщеплять аминопептидаза P (Lys(Abz)-↓-Pro-Pro-pNA), высвобождая N-концевой а. о. Lys, и дипептидил пептидаза II (Lys(Abz)-Pro-↓-Pro-pNA) с высвобождением дипептида. Дипептидил-пептидазы IV, пролил-карбоксипептидаза и пролил-иминопептидаза не гидролизуют Lys(Abz)-Pro-↓-Pro-pNA с отщеплением Lys-Pro. В отношении первых двух ферментов это связано с неспособностью расщеплять Pro-Pro связи, а в отношении третьего – с требуемым а. о. пролина (и/или гидроксипролина) на N-конце молекулы белка или пептида. Флуоресцентный субстрат также не гидролизуется в присутствии *Xaa-Pro* дипептидаз. Однако в работе Stöckel-Maschek (Stöckel-Maschek *et al.*, 2003) было показано, что пролил-олигопептидаза в реакции с Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA высвобождает Pro-pNA.

Таким образом, гидролитическое расщепление флуоресцентного субстрата Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA белком PepP может указывать на то, что данный белок относится к группе пролин-специфичных аминопептидаз (аминопептидазе P или дипептидил пептидазе II) или эндопептидаз (пролил-олигопептидазе).

На рис. 19 представлены спектральные характеристики продукта реакции гидролиза Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA в присутствии 13,7 нМ PepP.

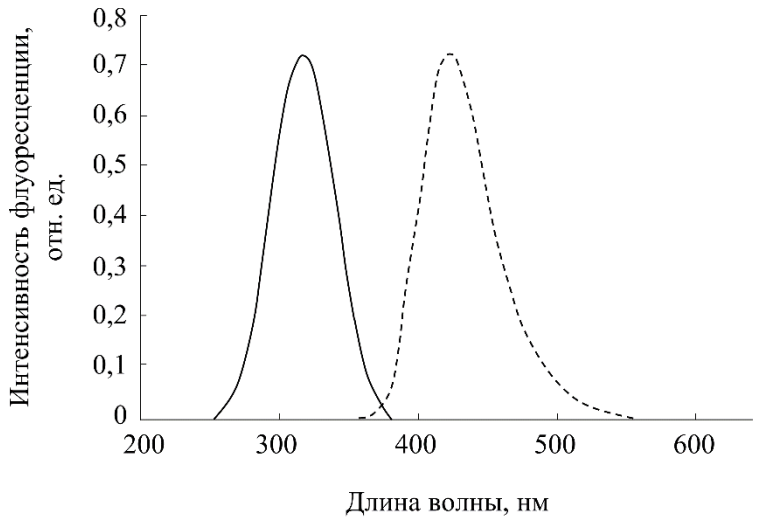

Рис. 19. Спектральные характеристики продукта реакции гидролиза Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA в присутствии белка PepP *Synechocystis.*

Обозначения: спектры возбуждения (λ_{ex} = 310 нм, сплошная линия) и испускания (λ_{em} = 410 нм, прерывистая линия) высвобождаемого Lys(Abz) детектировали при гидролизе 10 мкМ Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA в присутствии 13,7 нМ PepP в буфере, содержащем 40 мМ Tris-HCl (pH 7,5) при 30°C.

Изучение pH- и температурной зависимости PepP *Synechocystis* показало (Баик *и др.*, 2018), что оптимум активности белка находится в пределах 32°C и pH 7,6 (рис. 20 и 21). Литературные данные показывают, что большинство аминопептидаз P в отношении флуоресцентного субстрата активны при pH, близкой к нейтральной: LeAPP2 томата (pH 7,5) (Hauser *et al.*, 2001), AMPPII *E. coli* (pH 7,4) (Stöckel-Maschek *et al.*, 2003), APP *Plasmodium falciparum* (pH 7,5) (Drinkwater *et al.*, 2016), APP *Thermococcus* sp. strain NA1 (pH 6,5) (Lee *et al.*, 2006). В свою очередь, температурные оптимумы активности пролин-специфичных аминопептидаз значительно различаются. Например, протеолитическая активность аминопептидазы P термофильной бактерии *Thermococcus* sp. strain NA1 при гидролизе Met-Pro достигает максимума при 100°C (Lee *et al.*, 2006). Таким образом, температурные оптимумы APP белков зависят от организма.

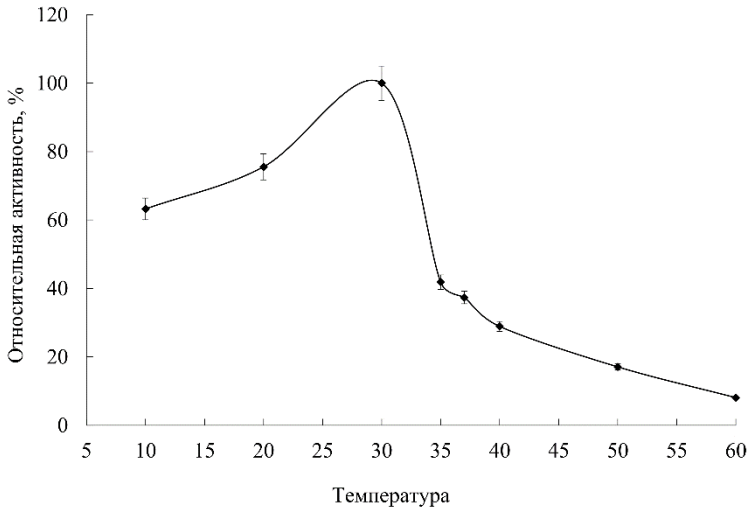

Рис. 20. Влияние температуры на протеолитическую активность белка PepP *Synechocystis.* Обозначения: реакцию гидролиза 10 мкМ Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA в присутствии 13,7 нМ PepP проводили в 40 мМ Трис-HCl (pH 7,5) при температуре от 10 до 60°C; $M \pm m$, $n = 3$, $p < 0{,}05$.

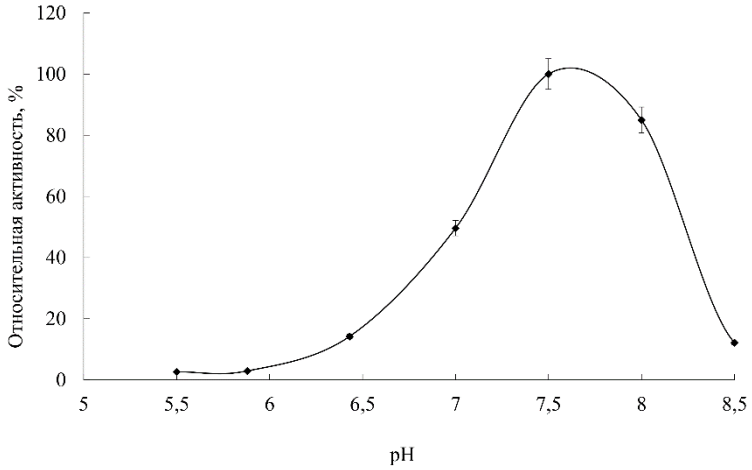

Рис. 21. Влияние pH на протеолитическую активность белка PepP *Synechocystis.* Обозначения: реакцию гидролиза 10 мкМ Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA в присутствии 13,7 нМ PepP проводили в 40 мМ Трис-HCl в диапазоне pH от 5,5 до 8,5 при 30°C; $M \pm m$, $n = 3$, $p < 0{,}05$.

Для определения кинетических параметров для Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA в присутствии белка PepP была изучена зависимость скорости реакции гидролиза аминопептидазы P от концентрации субстрата и построен график двойных обратных величин Лайнуивера-Берка (рис. 22 и 23). Рассчитанные

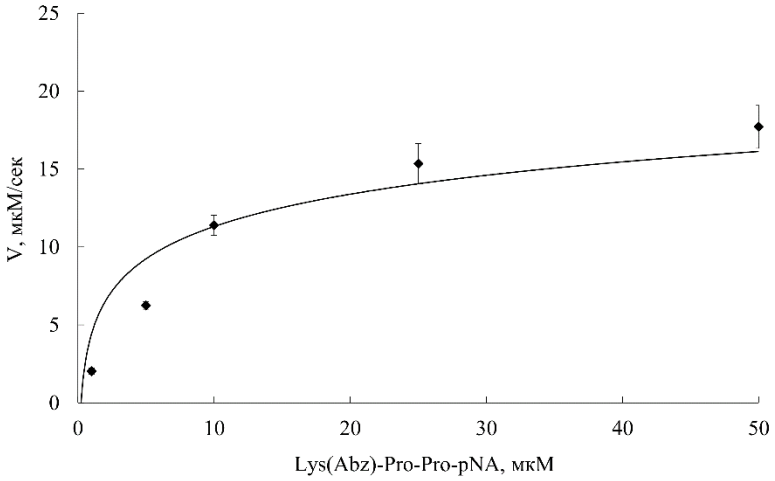

Рис. 22. Зависимость скорости реакции гидролиза белком PepP (V) от концентрации субстрата Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA ([S]).

Обозначения: реакцию проводили в 40 мМ Трис-HCl (pH 7,5) в присутствии 13,7 нМ PepP при 30°C; $M \pm m$, $n = 3$, $p < 0,05$.

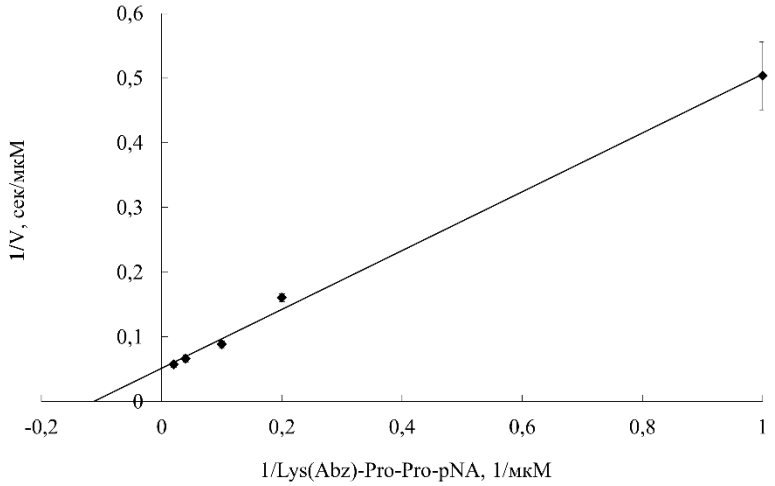

Рис. 23. График Лайнуивера-Берка в двойных обратных координатах (зависимость 1/V от 1/[S]).

Обозначения: реакцию проводили в 40 мМ Трис-HCl (pH 7,5) с использованием субстрата Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA в диапазоне концентраций от 1 до 50 мкМ в присутствии 13,7 нМ PepP при 30°C; $M \pm m$, $n = 3$, $p < 0,05$.

K_M = 8,83 ± 0,94 мкМ и V_{max} = 19,46 ± 0,67 мкМ·сек$^{-1}$ свидетельствовали о высоком сродстве PepP к флуоресцентному пептиду (Баик *и др.*, 2018). Стоит отметить, что значение K_M PepP к Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA превышало K_M AMPPII *E. coli* (K_M = 40,7 ± 3,2 мкМ) к тому же субстрату более чем в 4 раза, а в случае с LeAPP2

(K_M = 15,27 ± 2,4 мкМ), более чем 1,8 раза (Stöckel-Maschek *et al.*, 2003; Hauser *et al.*, 2001). Сходство кинетических параметров цианобактериального белка PepP с ранее охарактеризованными бактериальной и растительной аминопептидазами P подтверждают *Xaa-Pro* пептидазную активность исследуемого белка.

Изучение влияния водных растворов хлоридов металлов $ZnCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $CdCl_2$, $CaCl_2$ в концентрациях от 0,01 до 5 мМ показало (Баик *и др.*, 2018), что подавляющее большинство ионов, за исключением Mn^{2+}, оказывают ингибирующее действие на активность очищенного препарата белка PepP (табл. 13). Ионы Zn^{2+} и Cd^{2+} полностью подавляли каталитическую активность цианобактериального белка, в то время как ионы Ca^{2+}оказывали ингибирующее действие в концентрациях 1-5 мМ. В свою очередь, мы наблюдали возрастание протеолитической активности очищенного препарата белка PepP более чем в 4 раза в присутствии ионов Mn^{2+} в отличие от контроля. Необходимо отметить, что активность ряда аминопептидаз P в ответ на добавление ионов Mn^{2+} также возрастала в опытах *in vitro*: APPII *E. coli* (Yoshimoto *et al.*, 1988), APP *Thermococcus* sp. strain NA1 (Lee *et al.*, 2006), APP *Streptomyces lavendulae* (Nandan, Nampoothiri, 2014), растительной LeAPP2 томата (Hauser *et al.*, 2001), APP1 и APP3 *H. sapiens* (Cottrell *et al.*, 2000a; Singh *et al.*, 2017). Очевидно, что исследуемый белок PepP *Synechocystis* относится к металлопротеазам, для активности апофермента которых необходимы ионы двухвалентного марганца.

Известно, что активность большинства металлопротеаз подавляется металл хелатирующими агентами (Yoshimoto *et al.*, 1988; Cottrell *et al.*, 2000a; Nandan, Nampoothiri, 2014; Hauser *et al.*, 2001; Laurent *et al.*, 2001). В таком случае, ингибирование фермента происходит за счёт удаления иона металла из структуры белка. Как мы и предполагали, при добавлении в реакционную смесь 1,10-фенантролина или ЭДТА наблюдалось значительное подавление активности цианобактериального белка (табл. 14).

Таблица 13. Влияние ионов двухвалентных металлов на протеолитическую активность белка PepP *Synechocystis*

Реагенты	Концентрация, мМ	Относительная активность, %
Контроль	-	100
$ZnCl_2$	0,01	0*
	0,1	0*
	1	0*
	5	0*
$CdCl_2$	0,01	0*
	0,1	0*
	1	0*
	5	0*
$MnCl_2$	0,01	470,4 ± 10,3*
	0,1	427,3 ± 8,5*
	1	334,1 ± 11,3*
	5	229,7 ± 28,1*
$MgCl_2$	0,01	77,8 ± 2,2*
	0,1	84,4 ± 3,3*
	1	48,6 ± 4,6*
	5	40,9 ± 3,3*
$CaCl_2$	0,01	82,4 ± 7,7
	0,1	98,7 ± 14,3
	1	44,3 ± 3,9*
	5	26,1 ± 2,8*

Указана (%) начальная скорость ферментативной реакции (V_0), $M \pm m$, $n = 3$, * обозначены достоверные различия между средними значениями при $p < 0,05$.

Таблица 14. Влияние ингибиторов на протеолитическую активность белка PepP

Реагенты	Концентрация, мМ	Относительная активность, %
Контроль	-	100
1,10-фенантролин	0,1	27,6 ± 1,7*
	5	0*
PMSF	0,1	69,7 ± 1,2*
	5	32,2 ± 6,0*
Пепстатин А	0,1	0*
	5	0*
Бестатин	0,1	47,6 ± 0,1*
ЭДТА	0,1	8,9 ± 1,1*
	5	5,1 ± 0,1*

Указана (%) начальная скорость ферментативной реакции (V_0), $M \pm m$, $n = 3$, * обозначены достоверные различия между средними при $p < 0,05$.

Бестатин, ингибитор металлопротеаз, селективно действующий в отношении белков с аминопептидазной активностью, в концентрации 1 мМ в 2 раза подавлял каталитическую активность белка PepP. В то время как пепстатин А, ингибитор ферментативного катализа кислых протеаз (с кислой *pI*), строго не влияющий на нейтральные протеазы (с нейтральной *pI*), а также на ферменты серинового или цистеинового типа, полностью подавлял активность цианобактериального белка в отношении флуоресцентного субстрата. В отличие от белка PepP *Synechocystis*, активность бактериальной AMPPII при добавлении бестатина (1 мМ) снижалась незначительно, а при добавлении пепстатина А (1 мМ) подавлялась в 1,7 раза (Yoshimoto *et al.*, 1988).

Мы также наблюдали падение ферментативной активности белка PepP в присутствии ингибитора сериновых протеаз, PMSF, что вероятно связано с его взаимодействием с флуоресцентным субстратом. Данное предположение

подтверждает работа Lloyd (Lloyd *et al.*, 1996), где показано подавление активности аминопептидазы P, выделенной из почек свиньи, в присутствии PMSF в опытах с трипептидом Gly-Pro-Hyp, и отсутствие подобного эффекта в реакции с брадикинином. Таким образом, данный результат является спорным и требует дальнейших исследований. Поэтому следующим шагом необходимо было подтвердить или опровергнуть принадлежность исследуемого препарата белка к семейству сериновых пептидаз.

Согласно базе данных пептидаз MEROPS, APP относятся к семейству металлопептидаз, в то время как остальные пролин-специфичные пептидазы принадлежат к различным семействам сериновых протеаз (см. рис. 3). Отсутствие реакции гидролиза неспецифического субстрата для сериновых протеаз, азоказеина, белком PepP *Synechocystis*, в отличие от реакции с контрольным трипсином (табл. 15), исключает его принадлежность к аминопептидазам серинового типа.

Табл. 15. Гидролиз азоказеина в присутствии очищенного препарата белка PepP и трипсина

Образец белка	**Относительная активность, %**	
	40 мМ Трис-HCl (pH 7,5) 30°C	**60 мМ $NaHCO_3$ (pH 8,3) 37°C**
Трипсин	100	100
PepP	0*	0*

$M \pm m$, $n = 3$, * обозначены достоверные различия между средними при $p < 0,05$.

Следовательно, несмотря на снижение протеолитической активности белка PepP в присутствии пепстатина А и PMSF, данный белок нельзя отнести к пептидазам серинового типа. Это также подтверждается отсутствием каталитической диады/триады, характерной для сериновых или цистеиновых аминопептидаз, в составе аминокислотной последовательности белка. Высокое эволюционное родство PepP к X-пролил-аминопептидазам, характерная доменная

организация для данной группы белков и наличие высококонсервативного аминокислотного мотива активного центра указывают на принадлежность исследуемого белка к аминопептидазам P. Однако, результаты опытов *in vitro* показывают, что специфичность цианобактериального фермента отличается от уже известных аминопептидаз P. Подобная активность цианобактериального белка может быть следствием автопротеолиза, в результате которого происходит его распадание (рис. 17, PepP 1 и 2) на два полипептида. Это не приводит к ингибированию фермента, но, возможно, изменяет свойства его каталитической активности; один из пептидов может приобретать свойства характерные для аминопептидаз других типов, например пролидаз.

Таким образом, в ходе анализа природы протеолитической активности белка PepP *Synechocystis* установлено, что исследуемый белок обладает *Xaa-Pro* аминопептидазной активностью и не относится к ферментам серинового типа, что подтверждается его способностью гидролизовать флуоресцентный субстрат Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA и отсутствием катализа в реакции с азоказеином, соответственно. Цианобактериальный белок является Mn^{2+}-зависимым металлоферментом, максимальная активность которого наблюдалась в присутствии ионов при 32°C и pH 7,6.

3.4. Компьютерное моделирование трёхмерной структуры белка PepP

3.4.1. Создание моделей аминопептидазы P *Synechocystis*

Близкое эволюционное родство бактериальной AMPII *E. coli* и цианобактериального белка PepP *Synechocystis*, (см. главу 3.1, рис. 9) также предполагает сходство пространственных структур данных белков. Трёхмерная структура AMPII, полученная методом рентгеноструктурного анализа (Wilce *et al.*, 1998; Graham *et al*., 2003; 2004; 2005; 2008) и опубликованная в базе данных PDB, была выбрана в качестве основы для моделирования структуры белка PepP по гомологии. При построении моделей белка PepP в комплексах с потенциальными

субстратом и продуктом, шаблонами для комплексов служили структуры аминопептидазы AMPII *E. coli* ко-кристаллизованные с трипептидом Val-Pro-Leu и дипептидом Pro-Leu. Идентичность аминокислотных последовательностей моделируемого белка и шаблонных структур AMPII составляет 45,18%. В отсутствие кристаллической структуры олигомерной формы AMPII *E. coli* для получения модели димера аминопептидазы PepP в качестве шаблона был использован гомодимер аминопептидазы P II *Yersinia pestis*, который также имеет высокое сходство первичной структуры с моделируемым белком (идентичность 45,79%).

Таким образом, были построены модели аминопептидазы P *Synechocystis* в следующих вариантах: 1) мономер белка PepP без лиганда, 2) мономеры белка с лигандами (Mn^{2+}, Mn^{2+} с субстратом, Mn^{2+} с продуктом), а также 3) димер белка PepP. Полученные модели имели высокие показатели стереохимической корректности. Более 90% а. о. располагались в наиболее благоприятных регионах карты Рамачандрана.

3.4.2. Структура доменной организации белка PepP

Как уже было отмечено в главе 3.1, структура аминопептидазы P *Synechocystis* консервативна и состоит из двух доменов: N- и C-концевого (рис. 10). На рис. 24 представлена топология доменной организации белка PepP. Установлено, что N-концевой домен состоит из центрального β-листа, образованного шестью параллельными/антипараллельными β-цепями. По обе стороны от листа располагаются семь α-спиралей. C-концевой каталитический домен включает сайт связывания ионов двухвалентного марганца и субстрата (пептида). Домен включает восемь β-цепей, четыре крупных и пять небольших α-спиралей.

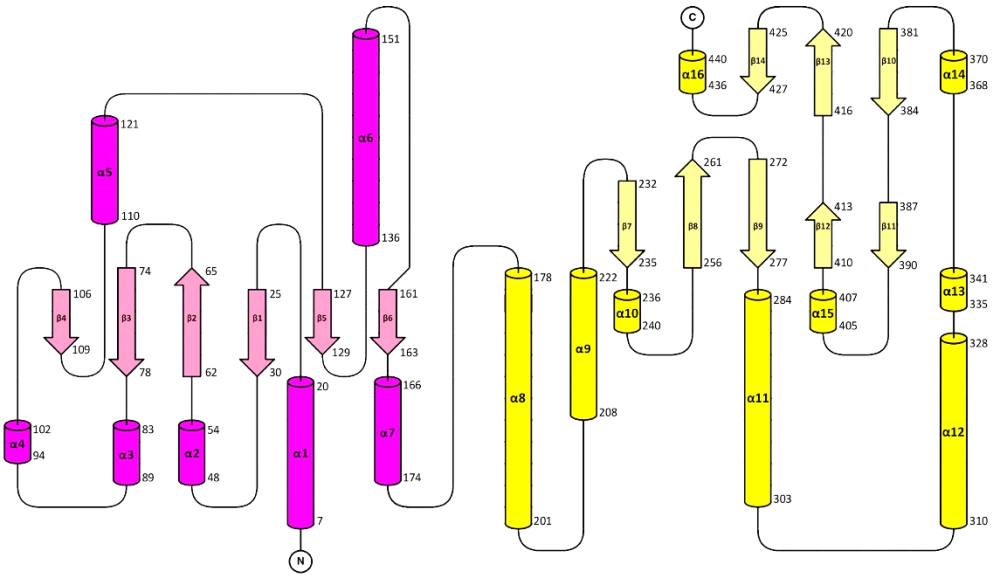

Рис. 24. Топология доменной организации белка PepP.

Обозначения: на схеме изображены элементы вторичной структуры белка PepP: N-концевой (фиолетовый) и С-концевой домены (жёлтый), α-спирали и β-листы.

3.4.3. Взаимодействие PepP с марганцем

Известно, что аминокислоты активного сайта аминопептидазы P высококонсервативны (Bazan *et al.*, 1994). В связи с этим, ранее нами было сделано предположение, что а. о. в позициях Asp260, Asp271, His354, Glu385, Glu415 в PepP *Synechocystis*, соответствующие аминокислотным остаткам Asp260, Asp271, His354, Glu383, Glu406 у AMPPII *E. coli* также способны участвовать в образовании каталитического центра белка (Пожидаева *и др.*, 2013). Кроме того, анализ протеолитической активности белка PepP *in vitro* показал высокое сродство цианобактериального белка к ионам Mn^{2+}, что также согласуется с результатом компьютерного моделирования (Баик *и др.*, 2018).

Активный сайт аминопептидазы P *Synechocystis* образует комплекс с двумя ионами Mn^{2+}. На рис. 25 представлена трёхмерная модель мономера белка PepP, каталитический домен которого содержит ионы металла. Один из них удерживается за счёт взаимодействия с четырьмя аминокислотами: через кислороды боковых цепей Glu385, Glu415 и Asp271, а также через азот в ε2 положении кольца His354. В связывании второго иона марганца участвуют

кислороды боковых цепей Glu415, Asp271 и Asp260. Расчётная энергия связи составляет - 5,7 ккал/моль с первым ионом Mn^{2+} и - 4,7 ккал/моль – со вторым ионом, соответственно.

Согласно компьютерному моделированию, аминокислотные остатки Thr273 и Thr383 также могут играть роль в удержании ионов марганца в активном сайте белка. В настоящее время в литературе отсутствуют данные о значимости соответствующих аминокислот в белках аминопептидаз P. Однако сравнение аминокислотных последовательностей X-пролил-аминопептидаз указывает на высокую консервативность данных а. о. (рис. 11).

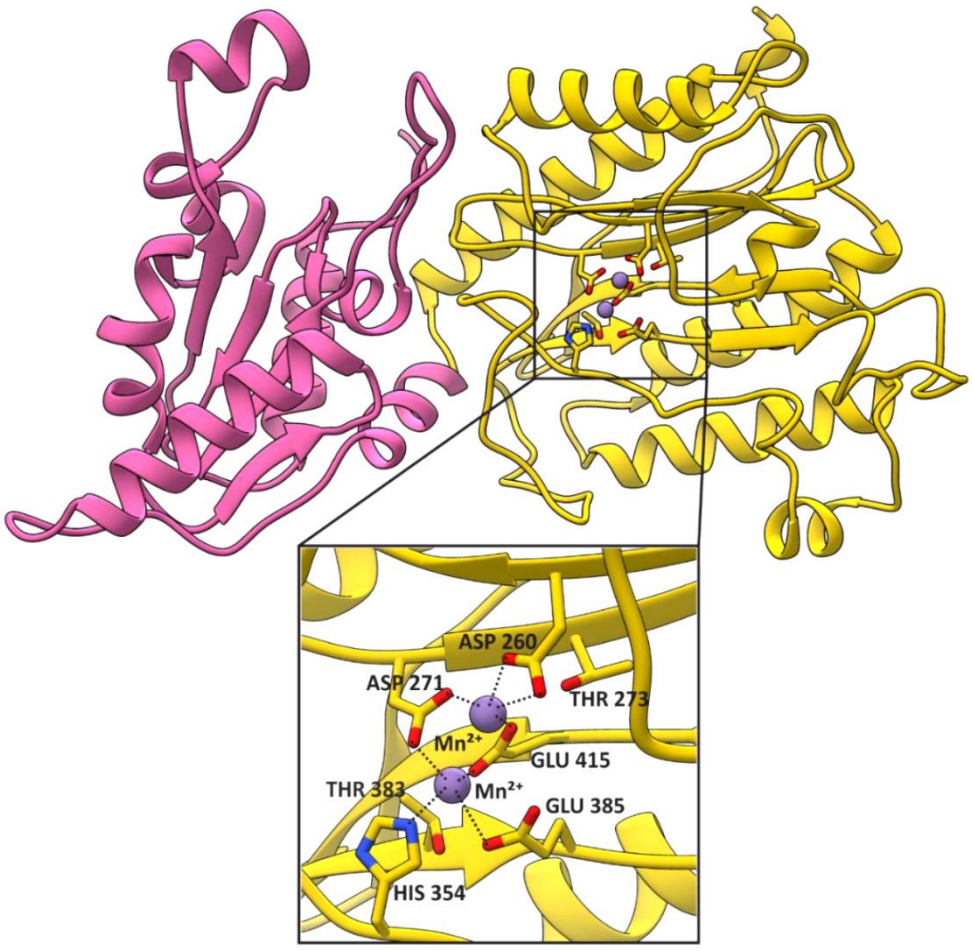

Рис. 25. Трёхмерная модель мономера белка PepP *Synechocystis* в комплексе с ионами марганца.

Обозначения: рамкой выделен активный сайт белка, содержащий аминокислотные остатки Asp260, Asp271, Thr273, His354, Thr383, Glu385, Glu415, участвующие в связывании двух ионов Mn^{2+}.

3.4.4. Взаимодействие PepP с субстратом и продуктом.

Согласно компьютерному моделированию, трипептид Val-Pro-Leu удерживается в сайте связывания белка PepP (рис. 26), во-первых, за счёт взаимодействия ионов марганца с азотом и кислородом основной цепи первой аминокислоты (Val) пептида. Во-вторых, за счёт водородных связей с четырьмя аминокислотами белка PepP: Asp271, Asp260, His361 и Arg351. В-третьих, за счёт гидрофобных контактов с ещё семью аминокислотными остатками. Расчётная энергия связывания PepP с Val-Pro-Leu составляет - 9,5 ккал/моль.

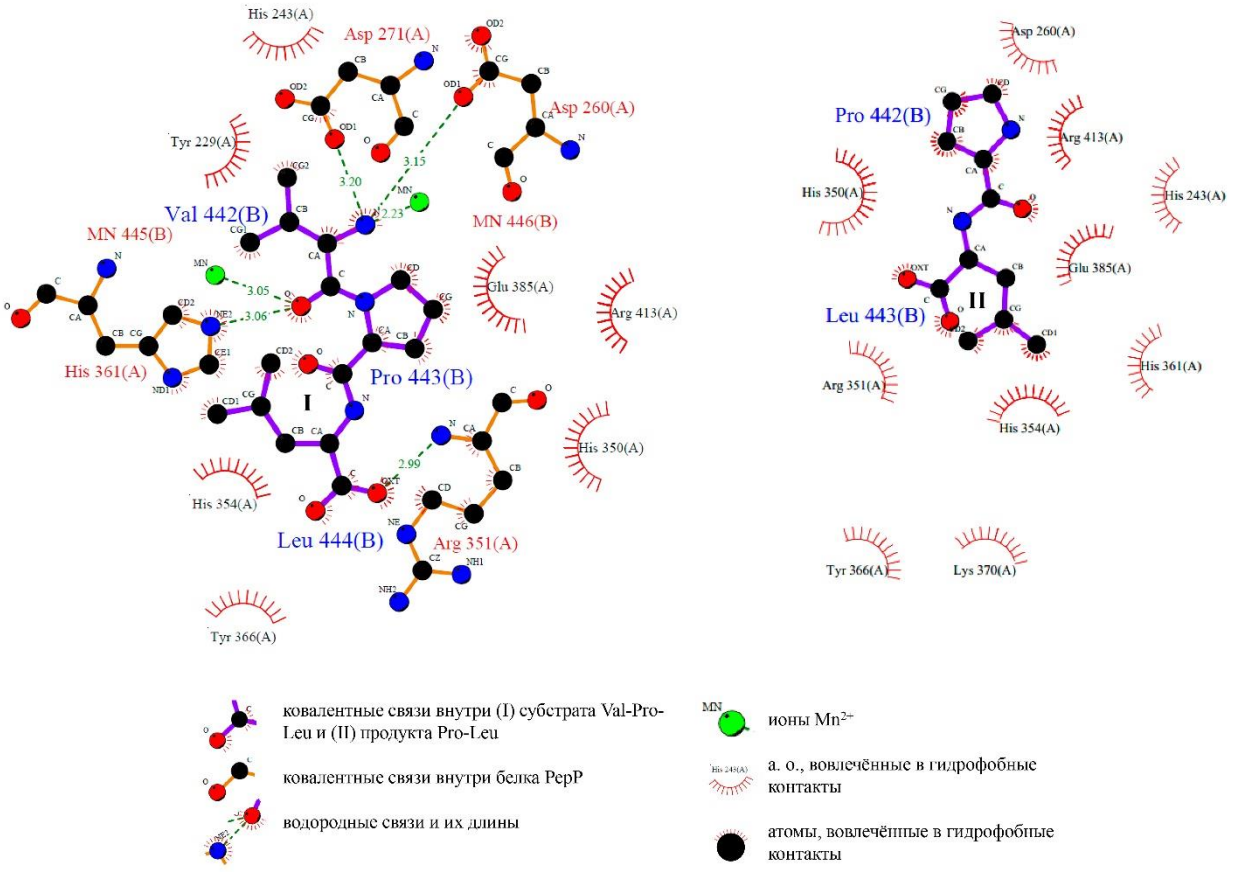

Рис. 26. Взаимодействие белка PepP *Synechocystis* с субстратом Val-Pro-Leu (I) и продуктом Pro-Leu (II).

Продукт гидролиза субстрата, дипептид Pro-Leu, уже не связан с марганцем и не образует водородных связей с белком. Его взаимодействие с десятью а. о. цианобактериальной аминопептидазы P осуществляется только за счёт

гидрофобных контактов. Расчётная энергия взаимодействия составляет - 4,9 ккал/моль.

3.4.5. Свойства поверхности и интерфейс димеризации белка PepP

Для изучения особенностей олигомеризации белка PepP *Synechocystis*, моделирование по гомологии проводили с использованием шаблонной структуры гомодимера аминопептидазы P II *Yersinia pestis* (рис. 27). Согласно результатам анализа модели, полученным с помощью программы QtPISA, интерфейс гомодимеризации PepP имеет площадь поверхности 2128 Å, значение ΔG - 23 ккал/моль, энергия взаимодействия составляет - 31,7 ккал/моль и включает 8 водородных связей и 14 солевых мостиков. Интерфейс образован аминокислотами β1α2-, α3α4-, β5α6-, α9β7-, α10β8-, α13α14- и β11α15-петель, α2-, α3-, α7-, α8-, α9- и α10-спиралей.

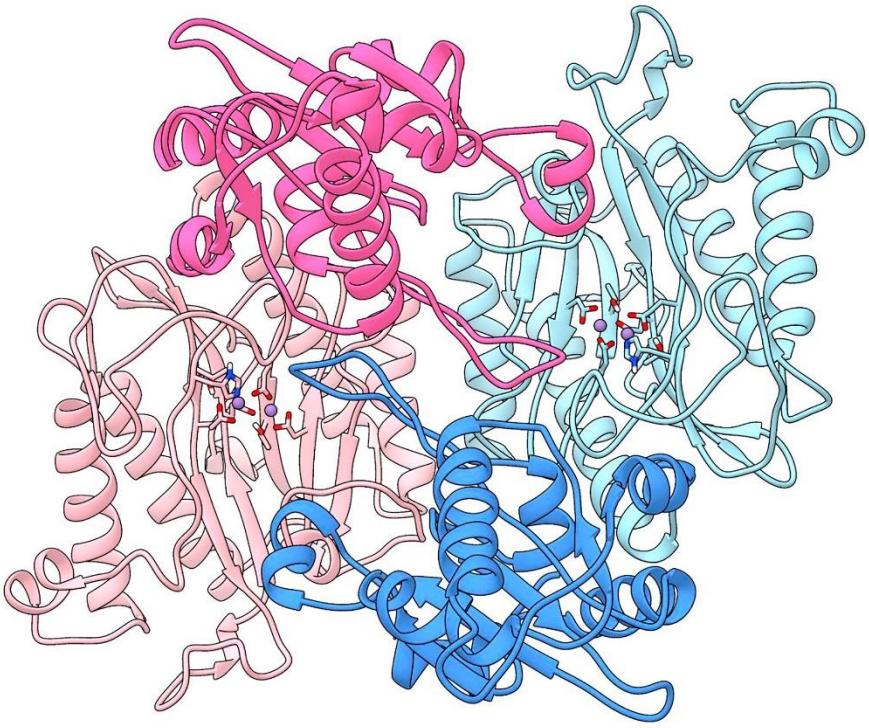

Рис. 27. Трёхмерная модель гомодимера белка PepP *Synechocystis*.

Обозначения: яркими цветами обозначены N-концевые домены мономеров, светлыми цветами – С-концевые домены мономеров белка PepP.

При димеризации PepP, активный сайт остаётся открытым, и лишь Trp88 находится в такой близости с активным центром другой субъединицы, что может взаимодействовать с субстратом, связанным с ней. Помимо этого, стоит отметить Asp39, который может взаимодействовать с His361, входящим в активный сайт контрпартнёра.

Аминокислотная последовательность белка PepP содержит четыре а. о. Cys (Cys188, Cys240, Cys249, Cys263). Однако анализ полученных моделей цианобактериальной аминопептидазы P не показал образования дисульфидных мостиков между остатками Cys ни в процессе фолдинга, ни в процессе олигомеризации белка.

В области интерфейса димеризации поверхность белка PepP *Synechocystis* (рис. 28) имеет как консервативные, так и вариабельные зоны, наиболее консервативный участок располагается в непосредственной близости к активному сайту, который также высококонсервативен, но в основном не входит в димеризационный интерфейс. Значительная часть поверхности димеризационного интерфейса гидрофильна, но есть и локальные гидрофобные участки. Активный сайт имеет гидрофильную поверхность. Можно также говорить о преобладании отрицательного и нейтрального электростатического потенциала в интерфейсе и выраженном отрицательном заряде в активном сайте.

Виртуальное аланиновое сканирование позволило выявить предположительные аминокислоты-детерминанты димеризации PepP (рис. 29). Так, в субъединице «B» 7 аминокислот (His37, Tyr42, Trp88, Tyr209, Glu216, Asn247 и Asp359) при точечной замене на аланин давали значение ΔΔG (ΔG - изменение свободной энергии при формировании комплекса, ΔΔG – изменение ΔG при точечной мутации) в диапазоне от 2 до 4 кДж/моль («тёплые кластеры») и ещё три (Gln212, Glu214, Arg220) – более 4 кДж/моль («горячие кластеры»). Пять из этих десяти аминокислот образуют интермолекулярные водородные связи, или солевые мостики (His37, Gln212, Glu214, Glu216, Arg220). В субъединице «A» имеются небольшие отличия. Так, Tyr209 и Glu214 дают при замене на аланин

значение ΔΔG менее 2 кДж/моль, а в случае Glu216, ΔΔG наоборот имеет значение более 4 кДж/моль.

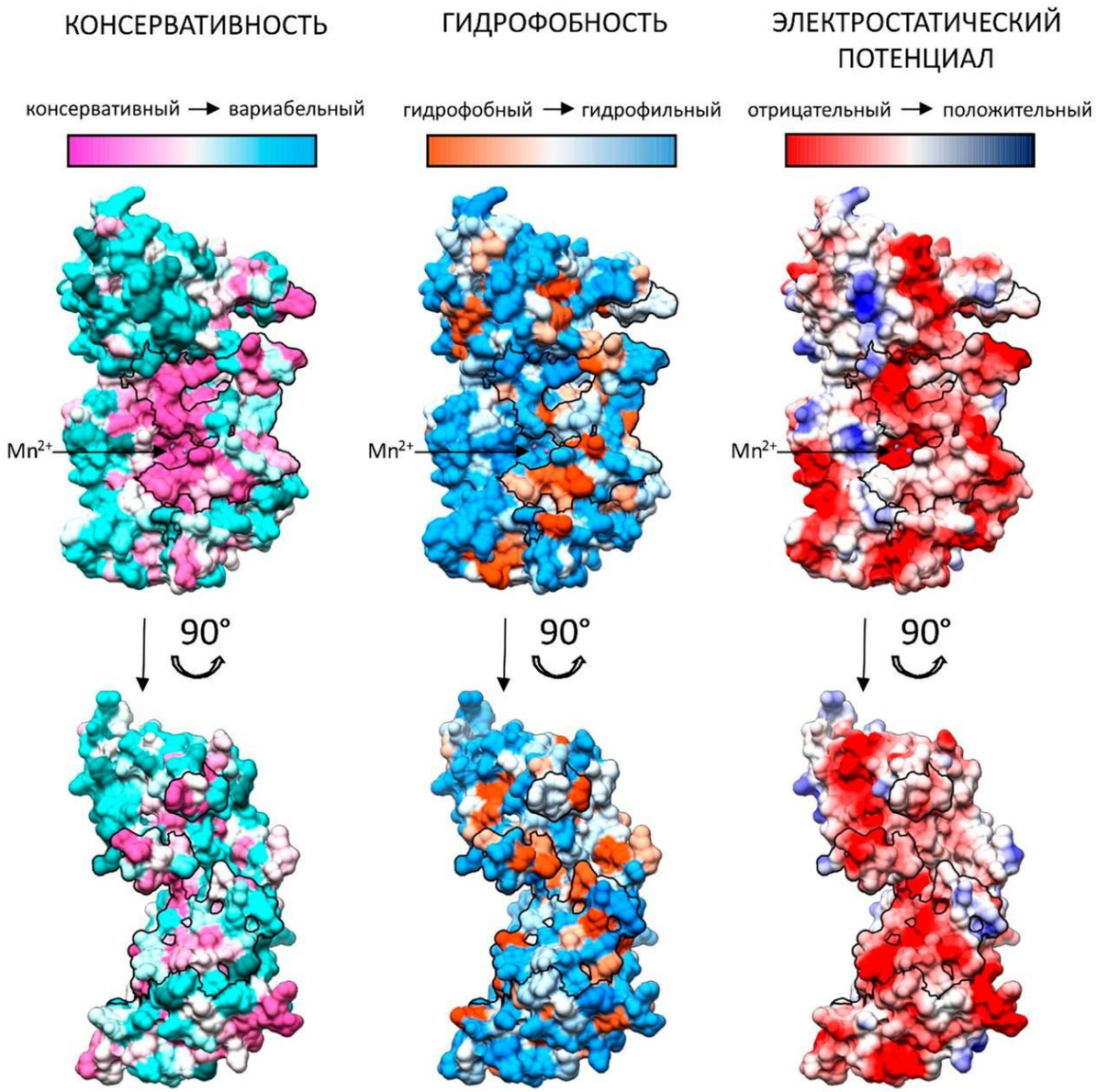

Рис. 28. Поверхность аминопептидазы PepP *Synechocystis* в двух проекциях, окрашенная по консервативности аминокислотных остатков, гидрофобности и электростатическому потенциалу.

Обозначения: интерфейс гомодимеризации выделен жирной линией. Ионы марганца, локализованные в активном центре фермента, отмечены горизонтальной стрелкой.

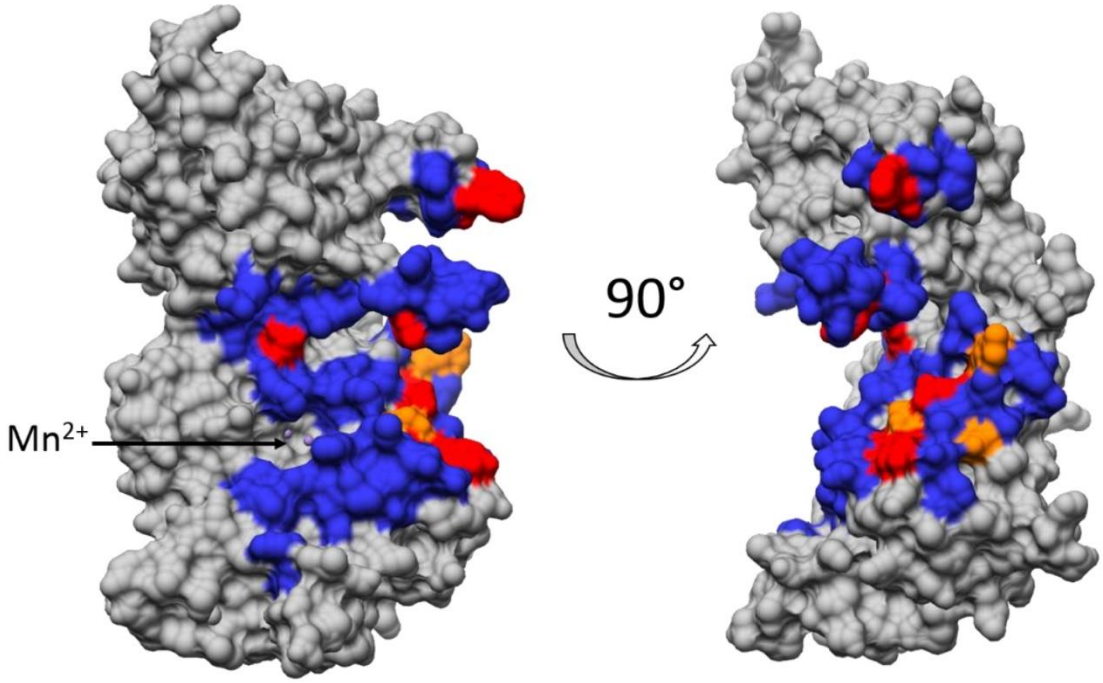

Рис. 29. Поверхность аминопептидазы PepP *Synechocystis* в двух проекциях. Обозначения: синим цветом выделены участки, образованные аминокислотами, входящими в димеризационный интерфейс, но при точечной замене на аланин, приводящие к значению ΔΔG менее 2 кДж/моль; красным – «тёплые кластеры», от 2 до 4 кДж/моль; оранжевым – «горячие кластеры» – более 4 кДж/моль, серым – участки, не входящие в димеризационный интерфейс.

Таким образом, с использованием биохимических подходов и биоинформационных ресурсов была определена предполагаемая природа протеолитической активности белка PepP. В реакциях *in vitro* с использованием флуоресцентного трипептида Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA установлена *Xaa-Pro* аминопептидазная активность фермента, субстратная специфичность которого оказалась шире активности гомологов APP белков прокариот, на что указывает ингибиторный анализ. Белок PepP относится к металлопептидазам, требующим наличия ионов марганца в качестве кофактора. Полученные данные согласуются с результатом компьютерного моделирования, подтверждающим участие двух ионов Mn^{2+} в образовании активного сайта каталитического домена белка. В удержании лигандов участвуют высококонсервативные а. о. протеолитического центра Asp260, Asp271, His354, Glu385, Glu415, а также Thr273 и Thr383, чья

функциональная роль на сегодняшний день остаётся неясной и требует дальнейшего изучения. Компьютерное моделирование показало, что ионы марганца вовлечены в связывание субстрата при катализе Val-Pro-Leu, но уже не образуют связей с соответствующим продуктом реакции – дипептидом.

Как было установлено ранее (рис. 8, глава 3.1) белок PepP является растворимым белком. На это также указывает тот факт, что оптимум протеолитической активности очищенного препарата белка PepP находится в пределах pH 7,6 (Баик *и др.*, 2018). Таким образом, полученные данные позволяют определить, что PepP *Synechocystis* скорее всего локализован в цитоплазме клетки и нацелен на каталитическое расщепление белков, находящихся в том же компартменте.

3.5. Получение мутантного штамма Δ*pepP Synechocystis* с инактивированным геном *sll0136*

Для поиска предполагаемых субстратов белка PepP был использован подход «обратной генетики», который с успехом применяется исследователями для выяснения роли целевых белков, в том числе у цианобактерий (Sokolenko *et al.*, 2002). В этих случаях функция продукта исследуемого гена изучается в мутантных штаммах цианобактерий, у которых полностью или частично отсутствует активность целевого белка. С помощью сайт-направленого мутагенеза был сконструирован мутантный штамм Δ*pepP*, дефектный по аминопептидазе P, в глюкозоустойчивом штамме *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT-L. Для инактивации анализируемого гена использовали кассету устойчивости к канамицину (Km^R), источником которой является плазмида pUC4K. Общая схема получения рекомбинантной конструкции представлена на рис. 30. Концевое положение исследуемого гена в опероне свидетельствует о том, что его инактивация не приведёт к подавлению экспрессии соседних генов (см. главу 3.1, рис. 7).

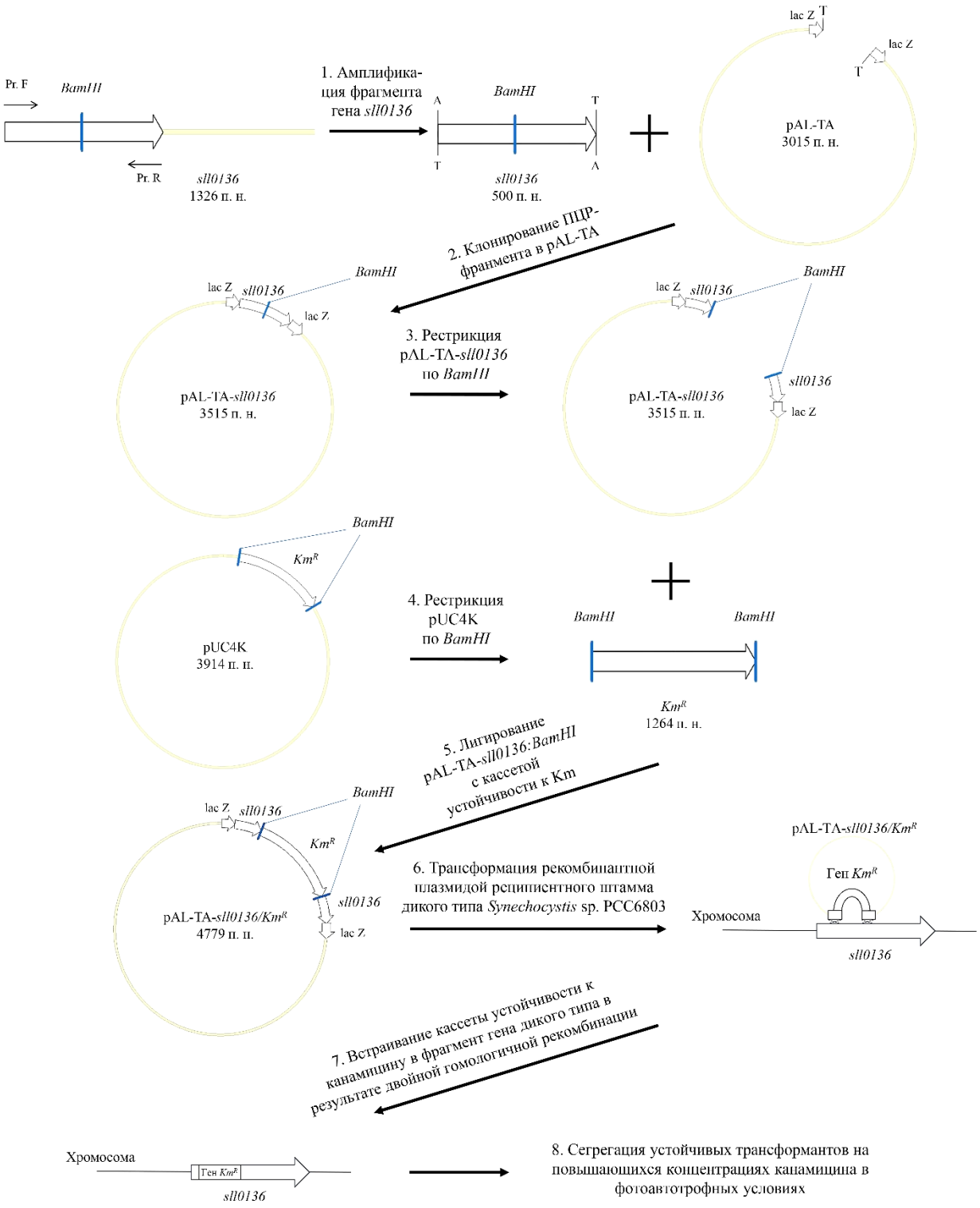

Рис. 30. Схема получения инсерционного мутанта Δ*pepP Synechocystis*, дефектного по гену *sll0136* (описание в тексте).

Инсерционный мутагенез гена *sll0136* проводили по схеме, представленной на рис. 30 и 31. Для этого, с помощью ПЦР анализа и пары ген-специфичных праймеров (sll0136_sense; sll013_antisense, табл. 5) на матрице ДНК дикого штамма *Synechocystis* был амплифицирован фрагмент гена *sll0136* размером 500 п. н. Для создания *knock-out* мутанта кассету устойчивости к антибиотику канамицину (Km^R-кассета) встраивали в ген *sll0136* по сайту рестрикции *Bam*HI. Сайт рестрикции был выбран с учётом его отсутствия в векторе клонирования pAL-TA. Кроме того, праймеры подбирали таким образом, чтобы нуклеотидная последовательность по обе стороны от сайта встраивания Km^R-кассеты составляла не менее 200 п. н. (рис. 31). Такая протяжённость участков ДНК вокруг инсерции необходима для прохождения оптимальной гомологичной ДНК рекомбинации и встраивания Km^R-кассеты в искомый ген.

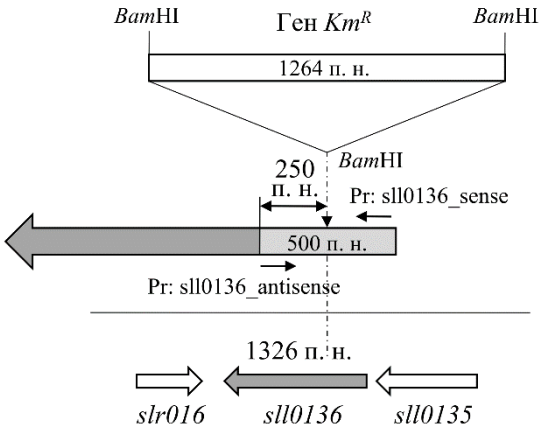

Рис. 31. Схематическое изображение инсерционной вставки Km^R-кассеты в гене *sll0136*. Обозначения: серым цветом обозначен полноразмерный ген *sll0136*; светло-серым цветом выделен фрагмент гена *sll0136*. Указаны позиции праймеров для амплификации фрагмента гена и сайты рестрикции для получения векторной конструкции.

После очистки из реакционной смеси ПЦР-фрагмент гена *sll0136* (рис. 32) лигировали с ТА-вектором pAL-TA размером 3015 п. н. Затем лигационную смесь использовали для трансформации компетентных клеток XL1-Blue *E. coli*. Данный тип клеток позволяет вести отбор клонов, несущих инсерционные фрагменты, методом бело-голубой селекции в присутствии X-Gal и ИПТГ – субстрата и

индуктора, соответственно. Наличие вставки определяли с помощью ПЦР анализа с ген-специфичными праймерами (sll0136_sense; sll013_antisense, табл. 5).

Далее, Km^R-кассету размером 1264 п. н. вырезали из вектора pUC4K по двум сайтам рестрикции *Bam*HI и очищали из агарозного геля (рис. 32). Для получения инсерции внутри фрагмента гена *sll0136*, рекомбинантную плазмиду pAL-TA-*sll0136* размером 3515 п. н. линеризовали по сайту *Bam*HI (рис. 32) и лигировали с Km^R-кассетой, фланкированной по краям *Bam*HI. Полученной конструкцией трансформировали клетки XL-Blue *E. coli*. Селективный отбор клонов вели на чашках с LB средой, содержащей канамицин. Для доказательства инсерции Km^R-кассеты в составе гена *sll0136* генетической конструкции pAL-TA-*sll0136* использовали ПЦР анализ с ген-специфичными праймерами (sll0136_sense; sll013_antisense, табл. 5, рис. 33).

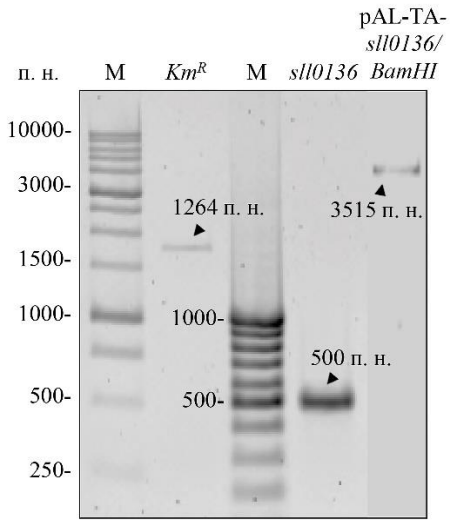

Рис. 32. Электрофореграмма фрагментов ДНК для получения векторных конструкций. Обозначения: Km^R – Km^R-кассета размером 1264 п. н. вырезана из вектора pUC4K по сайту *Bam*HI; *sll0136* – ПЦР-фрагмент гена *sll0136* размером 500 п. н.; pAL-TA-*sll0136/Bam*HI – линеризованная по сайту *Bam*HI плазмида pAL-TA-*sll0136* размером 3515 п. н.; M – маркер 1 тыс. п. н. («Сибэнзим»).

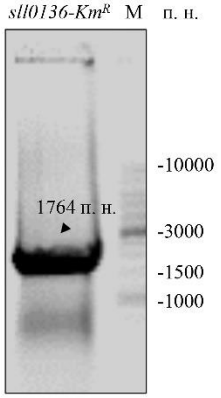

Рис. 33. Электрофореграмма амплифицированного фрагмента ДНК, встроенного в pAL-TA-*sll0136/Km*^{R}.

Обозначения: размер амплифицированного фрагмента ДНК с рекомбинантной плазмиды pAL-TA-*sll0136/Km*^{R} соответствует суммарному размеру фрагмента гена *sll0136* (500 п. н.) и *Km*^{R}-кассеты (1264 п. н.); М – маркер 1 тыс. п. н. («Сибэнзим»).

Культуру клеток дикого штамма *Synechocystis* трансформировали рекомбинантной плазмидой pAL-TA-*sll0136/Km*^{R}. Инактивация гена *sll0136* у ДТ путём встраивания кассеты устойчивости к канамицину происходила за счёт двойной гомологичной рекомбинации между участками геномной ДНК *Synechocystis* и участками ДНК гена *sll0136* в составе генетической конструкции pAL-TA-*sll0136/Km*^{R}. Отбор клонов-трансформантов проводили на твёрдой среде BG-11, содержащей канамицин в концентрации 5 мкг/мл. Сегрегацию устойчивых колоний проводили путём их последовательного пересева на среду с повышающейся концентрацией антибиотика. После повторного пересева на среду, содержащую канамицин в концентрации 50 мкг/мл, из клонов-трансформантов выделяли геномную ДНК и использовали для анализа.

ПЦР-фрагменты, амплифицированные с геномной ДНК дикого типа, имели размер 500 п. н., в то время как ПЦР-фрагменты мутантного штамма – 1764 п. н., что соответствует размеру исходного фрагмента с клонированной в него *Km*^{R}-кассетой (рис. 34 Б).

Для анализа степени сегрегации мутанта Δ*pepP Synechocystis* выделяли тотальную РНК из клеток цианобактерий (рис. 34 А). Методом ОТ-ПЦР с

использованием ген-специфичных праймеров (sll0136_sense; sll013_antisense, табл. 5) и кДНК дикого штамма *Synechocystis* получили ожидаемый фрагмент ДНК размером 500 п. н. (рис. 34 Б). Геном цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 содержит до 12 идентичных хромосом. Отсутствие амплифицированного фрагмента с образца кДНК мутантного штамма *Synechocystis* (рис. 34 Б) свидетельствует о полной инактивации всех копий гена *sll0136* в мутанте Δ*pepP*.

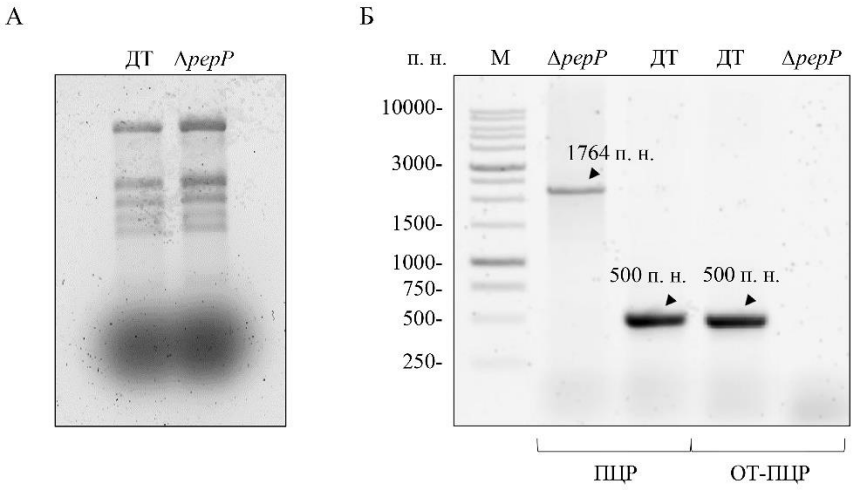

Рис. 34. Электрофореграмма (А) препаратов тотальной РНК, изолированных из клеток штаммов ДТ и мутанта Δ*pepP Synechocystis* и (Б) продуктов ПЦР и ОТ-ПЦР анализа, где в качестве матрицы использовали ДНК и кДНК штаммов ДТ и Δ*pepP*, соответственно. Обозначения: ПЦР-анализ с ДНК цианобактерий показывает наличие инсерционной вставки Km^R-кассеты в гене *sll0136* в образцах Δ*pepP* (размер фрагмента 1764 п. н.). ОТ-ПЦР анализ указывает на полную сегрегацию мутантного штамма и отсутствие копий мРНК гена *pepP* ДТ (размер фрагмента 500 п. н.) в образцах мутанта Δ*pepP*. М – маркер 1 тыс. п. н. («Сибэнзим»).

Получение жизнеспособного гомозиготного мутантного штамма Δ*pepP Synechocystis*, дефектного по гену *sll0136*, указывает на то, что функция кодируемого им белка PepP в стандартных условиях роста не является жизненно важной. Жизнеспособным также был мутант Δ*pepP*, ранее полученный на основе глюкозочувствительного неподвижного штамма *Synechocystis* (Пожидаева *и др.*, 2013).

3.6. Физиологический анализ клеток мутантного штамма *ΔpepP Synechocystis*

3.6.1. Аминопептидаза PepP вовлечена в регуляцию скорости роста и размера клеток

Для выяснения путей действия протеазы PepP и её возможных субстратов в цианобактериальной клетке был проведён физиологический анализ мутантного штамма Δ*pepP* в сравнении со штаммом дикого типа *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT-L.

Для оценки физиологических показателей роста клеток ДТ и мутанта Δ*pepP* использовали клеточную культуру цианобактерий, выращенную в фотоавтотрофных условиях в жидкой и на агаризованной среде BG-11 при стандартном освещении (70 мкЕ/м^2·с, 32°C).

Первоначальному анализу подвергали жидкую культуру цианобактерий, инкубированную в вегетационных сосудах при постоянной аэрации газовоздушной смесью (содержащей 1,6% CO_2). Клетки мутанта Δ*pepP* оказались склонны к более выраженному оседанию и адгезии на поверхности культуральных сосудов по сравнению с ДТ. Данный эффект проявлялся на 3-и сутки роста мутантного штамма в барботёрах (рис. 35 В). Кроме того, в отсутствие аэрации газовоздушной смесью и без постоянного качания культура мутантного штамма Δ*pepP* формировала взвесь, образованную крупными скоплениями клеток, которая сохранялась даже после интенсивного встряхивания сосудов (рис. 35 А). Длительное выращивание мутанта в таких условиях приводило к оседанию цианобактерий на дне культуральных колб, на что указывают фотографии двадцатидневной культуры *Synechocystis* (рис. 35 Б).

Нужно отметить, что полученный ранее в штамме GS мутант *ΔpepP* не обладал склонностью к агрегации (Пожидаева *и др.*, 2013). В настоящее время установлено, что культивируемые в ряде лабораторий субкультуры *Synechocystis* sp. PCC 6803 имеют расхождения их протеомов, что может определять фенотипические различия цианобактерий: чувствительность к глюкозе,

подвижность, стрессовый ответ или функции в первичном метаболизме (Trautmann *et al.*, 2012; Morris *et al.*, 2014; Zavřel *et al.*, 2017). Штамм GT-L *Synechocystis* sp. PCC 6803 также обладает рядом морфофизиологических особенностей (Zavřel *et al.*, 2015). Поэтому наблюдаемые отличия в поведении клеток Δ*pepP* штамма GT-L от GT-S связаны не только с мутацией в гене *pepP*, но и с особенностями самого штамма, которые усилились в мутантном штамме.

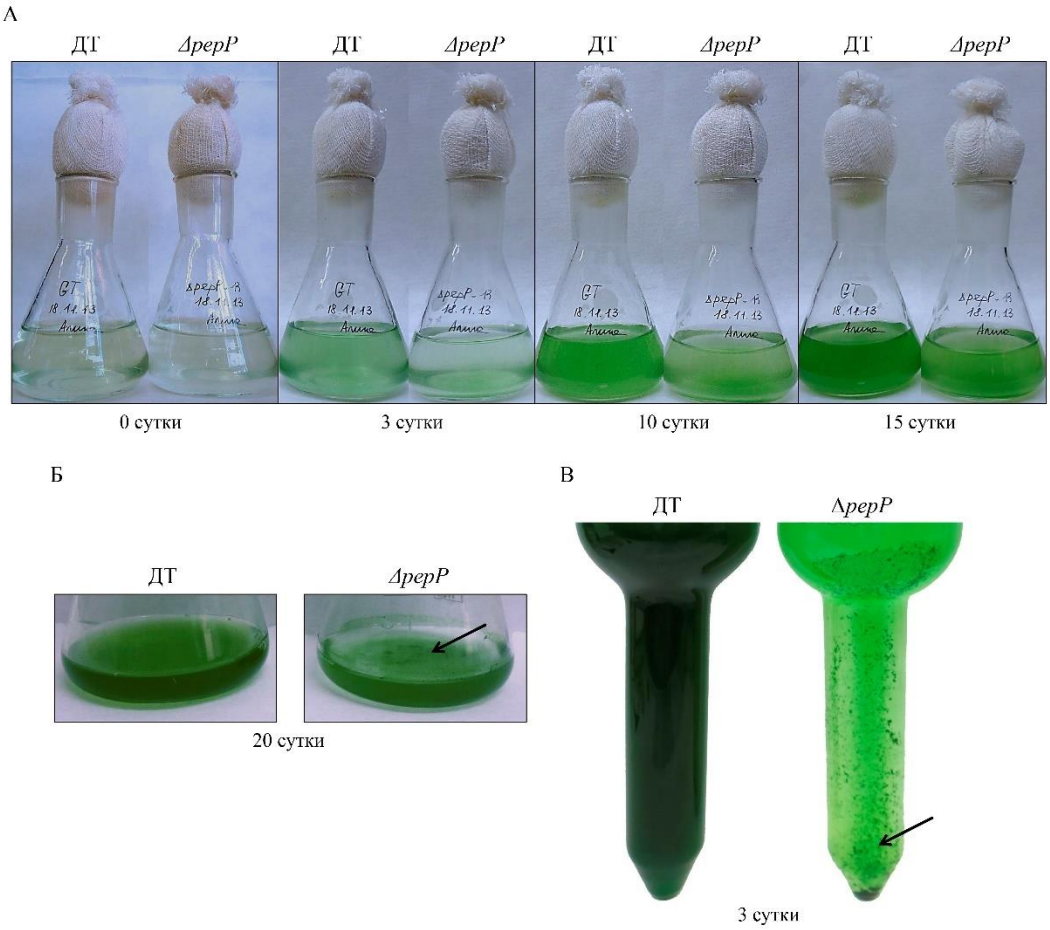

Рис. 35. Культура клеток штаммов дикого типа и мутанта Δ*pepP Synechocystis*, выращенная в жидкой среде BG-11 в отсутствие аэрации (А, Б) и при постоянной аэрации газовоздушной смесью, содержащей 1,6% CO_2 (В).

Обозначения: А – динамика роста клеточной культуры в течение 15 суток; Б – фенотип клеточных культур после 20 дней роста в отсутствие аэрации; В – фенотип клеточных культур, выращенных в барботёрах. Стрелки указывают на образование клеточных скоплений и адгезию на стенках вегетационных сосудов в образцах мутанта *ΔpepP*.

Для выявления причин оседания клеток и адгезии мутанта *ΔpepP*, в том числе из-за возможных нарушений в морфологии и делении клеток, была проведена световая микроскопия препаратов *Synechocystis* на 1, 2 и 3-и сутки инкубации в условиях интенсивной культуры. Полученные результаты не показали существенных различий в клетках ДТ и мутанта Δ*pepP* (рис. 36). Культура *Synechocystis* обоих штаммов состояла из одиночных, в том числе, делящихся клеток, а также содержала клеточные агрегаты, количество и общий объём которых одинаково увеличивался по мере роста цианобактерий обоих штаммов.

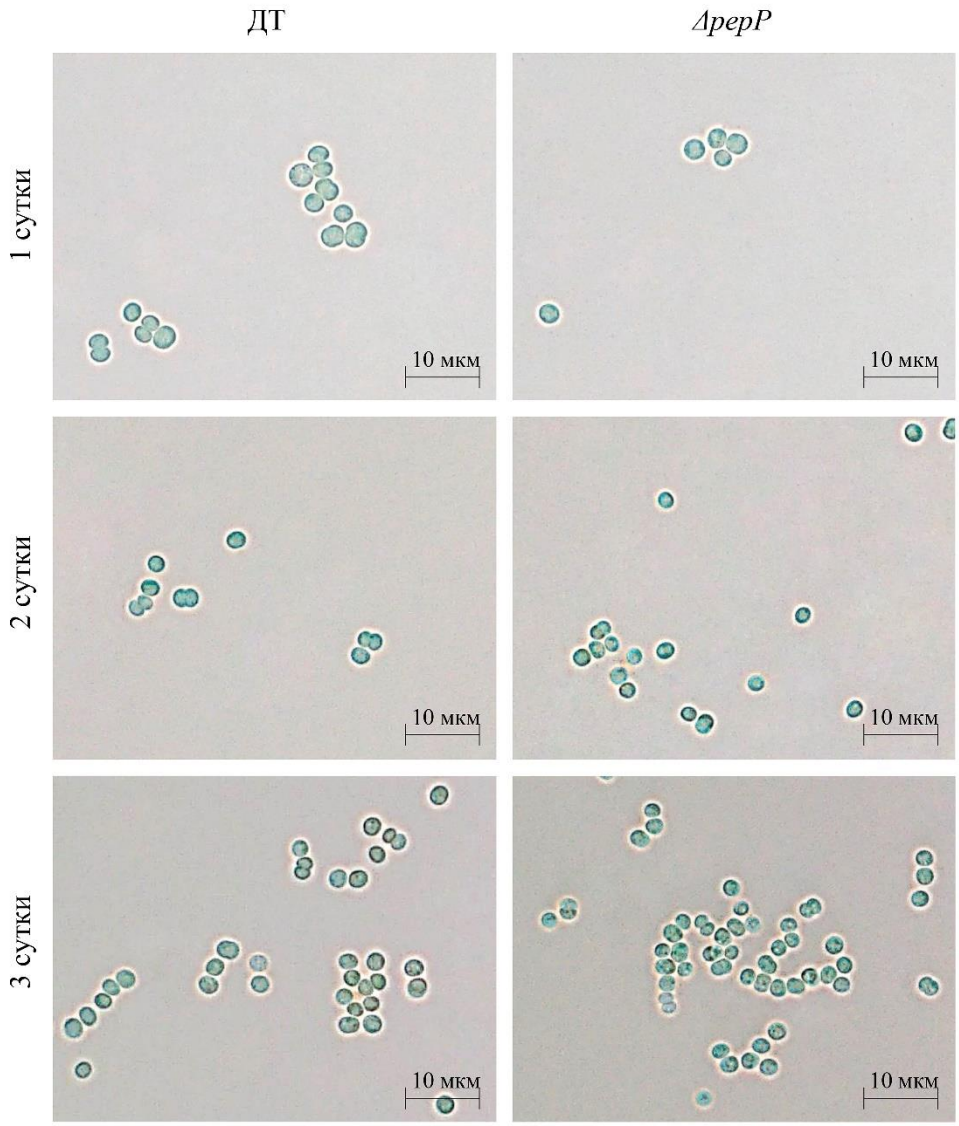

Рис. 36. Световая микроскопия клеток штаммов дикого типа и мутанта *ΔpepP Synechocystis* в белом проходящем свете при 100-кратном увеличении. Масштаб указан на изображениях.

В ходе анализа препаратов с помощью световой микроскопии мы не наблюдали нарушений в делении клеток мутантного штамма Δ*pepP*. Таким образом, мутация в гене *pepP* не может служить причиной образования клеточных скоплений в образцах мутанта Δ*pepP*, как в случае формирования «клеверных» структур у штамма *ΔftsI* (Marbouty *et al.*, 2009a), а, вероятно, является особенностью GT-L клеток.

Помимо усиленного оседания клеточной суспензии мутант *ΔpepP* характеризовался замедлением в росте после 20-и часов культивирования в условиях интенсивной культуры по сравнению с ДТ. Анализ показателей роста цианобактерий при постоянной аэрации газовоздушной смесью (содержащей 1,6% CO_2) показал различия, детектируемые по абсорбции клеточных суспензий исследуемых штаммов *Synechocystis* в 1 мл объёма при длине волны 750 нм, которые отражены на графиках динамики роста (рис. 37). Полученные данные

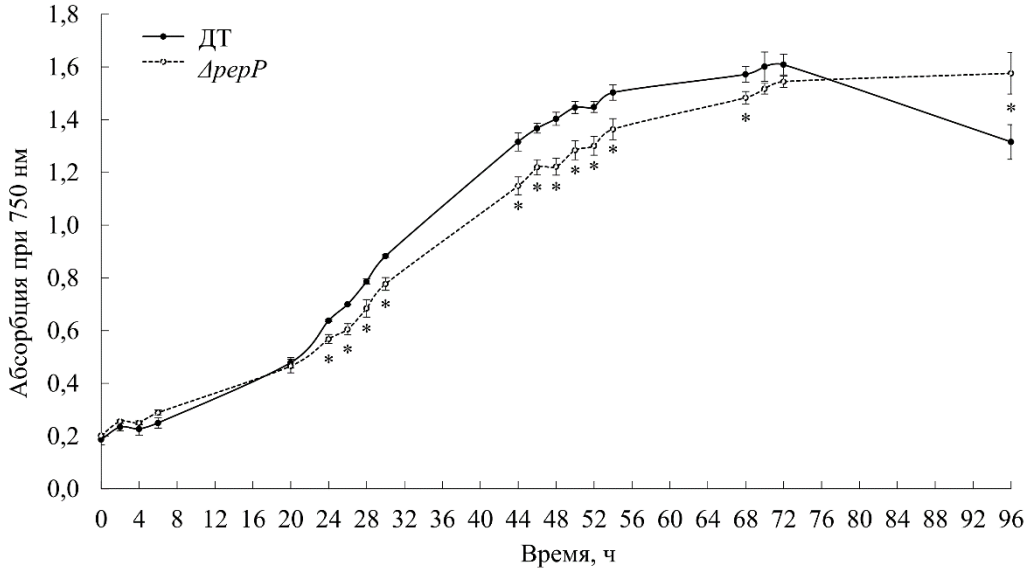

Рис. 37. Динамика роста клеточной культуры штаммов дикого типа и мутанта Δ*pepP Synechocystis*.

Обозначения: $M \pm m$, $n = 3$, * обозначены достоверные различия между средними при $p < 0{,}05$.

свидетельствуют о замедленном росте мутанта *ΔpepP* в сравнении с ДТ, что достоверно детектируется после 20-и ч роста цианобактерий. На это также

указывают показатели времени удвоения клеток (рис. 38), анализируемые по результатам абсорбции клеток обоих штаммов *Synechocystis* в промежутке между 20 -ю и 30-ю часами роста. В образцах мутанта этот показатель был увеличен на 47,86% по сравнению с ДТ. Дальнейший анализ позволил установить, что на 3 сутки выращивания цианобактерий культура мутанта почти достигла плотности клеточной суспензии, соответствующей плотности культуры клеток ДТ. На 4 сутки инкубации *Synechocystis* в условиях интенсивной культуры анализируемые штаммы находились на различных стадиях роста бактерий: в отличие от естественного старения культуры ДТ (фаза отмирания), культура мутанта перешла в стационарную фазу роста.

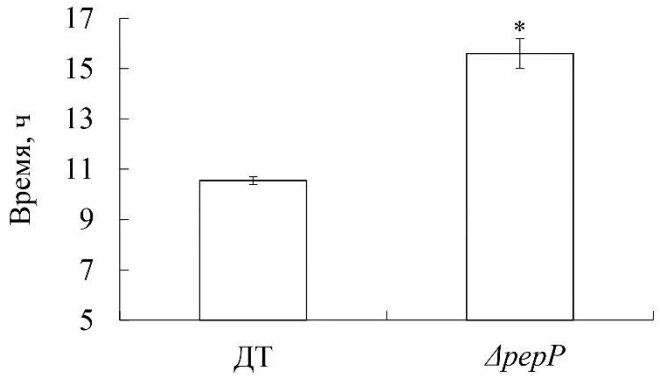

Рис. 38. Диаграмма показателей времени удвоения клеток штаммов дикого типа и мутанта Δ*pepP Synechocystis*.

Обозначения: для расчёта времени удвоения клеток использовали значения абсорбции клеточных суспензий исследуемых штаммов при длине волны 750 нм в промежутке от 20 ч до 30 ч роста цианобактерий; $M \pm m$, $n = 3$, * обозначены достоверные различия между средними при $p < 0,05$.

Различия в скорости роста и формировании колоний, включая их размер, между контрольным и мутантным штаммами *Synechocystis* оценивали также визуально на чашках Петри, питательная среда в которых дополнительно содержала 0,3% $Na_2S_2O_3$ (рис. 39 А) для формирования чётких колоний. Для этого аликвоты (по 5 мкл) клеточных суспензий обоих штаммов с разведением в диапазоне от 10^{-1} до 10^{-5} и без разведения 10^0 (по 3 повтора каждый) высевали на

агаризованную среду. На 5-е сутки инкубации цианобактерий в климатической камере при постоянном освещении проводили оценку роста клеток *Synechocystis* по плотности и площади пятна. Визуальное сравнение штаммов цианобактерий показало различия в размерах колоний ДТ и мутанта. Мутант Δ*pepP* формировал колонии меньшего размера в сравнении с ДТ, о чём свидетельствует анализ разбавленной фракции цианобактерий (рис. 39 Б). Средняя площадь пятна, образованная клетками мутантного штамма, оказалась на 40,9% меньше соответствующего показателя у ДТ.

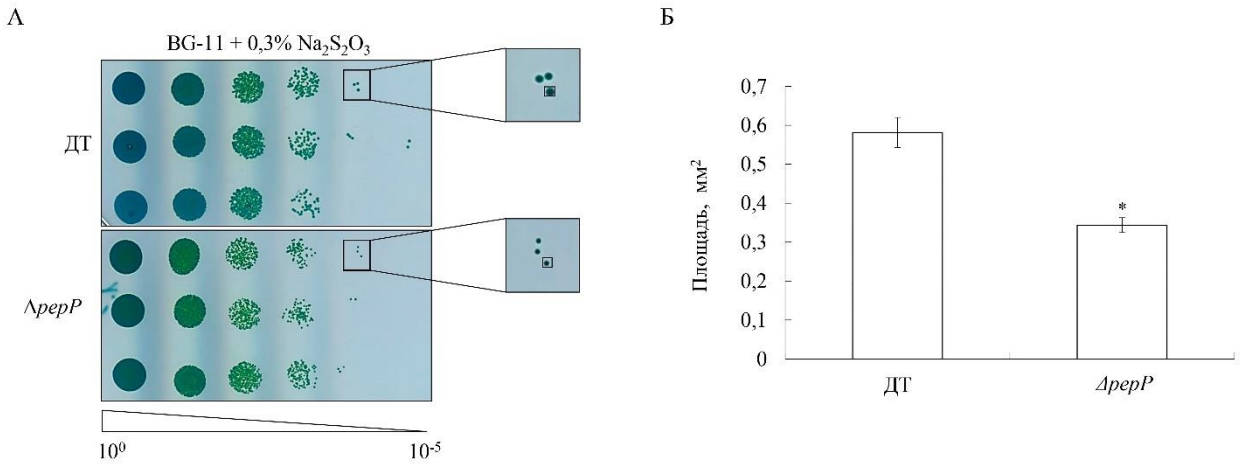

Рис. 39. Пятидневная культура клеток штаммов дикого типа и мутанта Δ*pepP Synechocystis*, выращенная на агаризованной среде BG-11 в присутствии 0,3% $Na_2S_2O_3$ в стандартных условиях; (Б) диаграмма показателей площади колоний штаммов дикого типа и мутанта Δ*pepP Synechocystis*.

Обозначения: на рис. А указано разведение клеточной суспензии 10^{-1}-10^{-5}; 10^0 – соответствует пробе без разведения при $ОП_{750}$ = 0,2; рамкой выделены единичные колонии штаммов *Synechocystis* в увеличенном масштабе. На рис. Б: $M \pm m$, $n = 20$, * обозначены достоверные различия между средними при $p < 0,05$.

Известно, что цианобактерии *Synechocystis* при росте на агаризованной среде способны формировать единичные колонии, образованные скоплениями из 4-64 одиночных клеток (Roy, Pal, 2015). Размер и плотность таких колоний могут зависеть от скорости роста клеток, а также их размера.

Поэтому с использованием программы AxioVision LE были проанализированы препараты суспензионных культур ДТ и мутанта *ΔpepP* (рис. 40), полученные с помощью световой микроскопии (рис. 36). Это позволило определить диаметр клеток цианобактерий и, соответственно, оценить их размер. Наблюдаемые у дикого и мутантного штаммов *Synechocystis* различия в диаметре клеток (рис. 40) составляли 2,733 ± 0,012 мкм и 2,544 ± 0,012 мкм, соответственно. Клетки мутанта оказались достоверно меньше клеток ДТ на 7,8%.

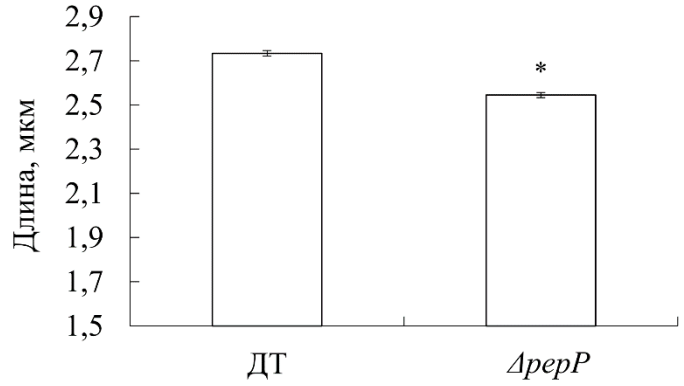

Рис. 40. Диаграмма диаметра клеток штаммов дикого типа и мутанта *ΔpepP Synechocystis*. Обозначения: $M \pm m$, $n = 246$, * обозначены достоверные различия между средними при $p < 0,05$.

Таким образом, в ходе исследования было установлено, что инактивация гена *sll0136* у *Synechocystis* GT-L привела к формированию колоний меньшего размера, что легко визуализируется на агаризованной питательной среде. Это вызвано замедленным ростом мутантных клеток *ΔpepP*, а также их меньшим размером по сравнению с ДТ. Наблюдаемая у *ΔpepP* агрегация клеток не является следствием явных нарушений в клеточном делении, о чём свидетельствуют результаты световой микроскопии (рис. 36). В то же время, выявленные эффекты могут влиять на точную оценку скорости роста мутантных цианобактерий, так как показатель периода удвоения клеток оценивается по поглощению образца при $ОД_{750}$. Ранее, замедленный рост также наблюдали у мутантного штамма *ΔpepP* (GS) (Пожидаева *и др.*, 2013). Как было отмечено выше, клетки мутанта *ΔpepP* (GS) не обладали адгезивными свойствами при выращивании в жидкой среде. В связи с

этим, несмотря на экспериментальные ограничения, мы предполагаем, что помимо изменений в размере клеток инактивация гена *sll0136* привела к тому, что клеточный цикл у мутанта *ΔpepP* штамма GT-L увеличился по сравнению с ДТ.

При выращивании *Synechocystis* в условиях аэрации газовоздушной смесью (1,6-2% CO_2) время дупликации клеток варьирует между 9 и 12 ч (Kim *et al.*, 2011). Для ДТ данный показатель может изменяться в зависимости от состава питательной среды и её объёма или от условий роста (свет, температура, аэрация) культуры, однако все эти ограничения лишь косвенно влияют на снижение темпов роста цианобактерий во время логарифмической фазы и последующего перехода к стационарной фазе роста. Поиск детерминантов, ограничивающих рост *Synechocystis*, в настоящее время является одним из приоритетных направлений в биотехнологии цианобактерий, так как использование штаммов с пролонгированным клеточным циклом успешно применяется в производстве природных вторичных метаболитов (Frommeyer *et al.*, 2016), биотоплива (Baebprasert *et al.*, 2011) и др.

Последние исследования предполагают гипотезу существования клеточного сигнала, который обеспечивает остановку деления клеток на логарифмической стадии роста в случае их повышенной плотности в среде. Предполагается, что цианобактерии способны «распознавать» постепенное увеличение плотности клеточной культуры посредством взаимодействия клеток между собой (cell-cell interaction). Это приводит к постепенному снижению скорости клеточного деления ещё до начала наступления стационарной фазы роста *Synechocystis* (Esteves-Ferreira *et al.*, 2017).

Учитывая, что в течение первых 20-и ч мутантный штамм *ΔpepP* рос приблизительно с той же скоростью, что и штамм ДТ (рис. 37), наблюдаемое в дальнейшем замедление его роста при сохранении тех же условий культивирования может быть следствием нарушений в вышеописанном процессе. Вероятно, в отсутствие протеазы PepP клетки *Synechocystis* начинают вырабатывать преждевременный сигнал, способствующий снижению скорости деления во время

логарифмической фазы роста цианобактерий. Интересно, что, несмотря на увеличение времени дупликации, плотность суспензии клеточной культуры мутанта со временем достигала значений ДТ (72 ч), а на стадии поздней стационарной фазы (96 ч) даже становилась более интенсивной (рис. 37). Одним из возможных объяснений может служить то, что в течение роста часть клеток мутанта *ΔpepP* оседала на поверхности барботёра (Рис. 35 В) и тем самым создавался эффект разведения, который, как указывают авторы статьи (Esteves-Ferreira *et al.*, 2017), необходим для поддержания быстрых скоростей деления в течение длительного периода онтогенеза цианобактерий. Роль протеазы PepP в регуляции логарифмического роста клеток и механизм её действия пока не ясны. Можно предположить, что среди белков, участвующих в клеточном делении и сигналинге, координирующем процесс цитокинеза, есть субстраты для пептидазы PepP.

3.6.2. В клетках, дефектных по аминопептидазе PepP, изменена структура и распределение тилакоидных мембран

Как было установлено в главе 3.2, белок PepP является *Xaa-Pro* специфичной экзопротеазой, и мишенями для этого фермента могут быть белки или пептиды, у которых в *N*-концевом положении (P2 или P3) находится пролин. Так как размер клетки координируется компонентами цитоскелета, белками, вовлечёнными в цитокинез, а также структурой и композицией белковых комплексов тилакоидных мембран, то поиск потенциальных белков-мишеней для аминопептидазы PepP был проведён среди участников перечисленных процессов.

Механизм деления клеток *Synechocystis* подробно изучен и описан ранее (см. главу 1.3.1). С использованием биоинформационных ресурсов (*http://genome.annotation.jp/cyanobase/Synechocystis/genes/category?class=D&subclass=D1*) нами были проанализированы аминокислотные последовательности белков, напрямую или опосредованно вовлечённых в клеточное деление у *Synechocystis* (Marbouty *et al.*, 2009b). Среди кандидатов присутствует белок PBP2 (Slr1710),

инактивация которого привела к уменьшению размера клеток мутированного штамма цианобактерий (Marbouty_*et al.*, 2009a). Белок PBP2 участвует в синтезе пептидогликанового слоя, необходимого для нормального роста клеток. Также были рассмотрены аминокислотные последовательности взаимодействующих друг с другом белков ZipN (Sll0169) и FtsZ (Sll1633), функция которых является критической для цитокинеза (Marbouty *et al.*, 2009a). Проведённый анализ не выявил белков, чья аминокислотная последовательность содержала бы остаток Pro в положении P2 или P3 (считая от инициирующего метионина P1), тем самым исключая их из предполагаемых прямых субстратов для действия пролин-специфичной аминопептидазы PepP. Отсутствие прямого влияния PepP на цитокинез также подтверждается результатами электронной микроскопии образцов клеток штаммов ДТ и мутанта *ΔpepP* (П. 5, рис. 50 и 52). Как видно из фотографий, в препаратах обоих штаммов присутствуют клетки на разных стадиях цитокинеза (П. 5, рис. 50 и 52). В образцах *ΔpepP* наблюдаются делящиеся клетки с ассиметрией (П. 5, рис. 50), однако статистически достоверных различий с препаратами ДТ мы не наблюдали. Это свидетельствует о том, что данные нарушения, скорее всего, связаны с приготовлением срезов образцов.

Известно, что белок ZipN *Synechocystis* (Mazouni *et al.*, 2004) является гомологом растительного белка Ftn2, основного компонента клеточного деления, и содержит в своей структуре N-концевой DnaJ домен протяжённостью 64 а. о. Данный домен обеспечивает связывание ZipN с филаментными структурами, образованными молекулами FtsZ (Mazouni *et al.*, 2004; Marbouty *et al.*, 2009a). Учитывая эти данные, нами также были проанализированы последовательности всех DnaJ-белков (Mary *et al.*, 2004). Среди них подходящим кандидатом оказался канонический белок теплового шока DnaJ4 (Sll0897; Hsp40), у которого в позиции P2 присутствует пролин (см. П. 6). Инактивация гена *sll0897*, кодирующего белок DnaJ4 у *Synechocystis*, приводит к нарушению роста клеток цианобактерий в условиях теплового и холодового стрессов (Düppre *et al.*, 2011). Нужно отметить, что у ранее изученного мутанта *ΔpepP* (GS) наблюдалась остановка клеточного

роста в условиях теплового стресса, которая сопровождалась выцветанием культуры (Sokolenko *et al.,* 2002). Поэтому нельзя исключить, что описанный эффект может быть результатом нарушений в посттрансляционном созревании белка DnaJ4 при отсутствии в клетке активности фермента PepP.

Также субстратом для PepP протеазы может выступать DnaJ-подобный белок (DnaJ3; Sll1666), у которого а. о. Pro находится в позиции P3 (П. 6). Функция этого белка не так критична, как в случае его гомологов или отсутствие DnaJ3 комплементируется другими DnaJ-белками (Düppre *et al.,* 2011). Известно, что все DnaJ-белки являются Hsp40 шаперонами и образуют белок-белковые комплексы, участвующие в выполнении различных регуляторных функций. Интересно, что Hsp40 могут взаимодействовать с другими функционально схожими белками, в частности, с белками семейства Hsp70 (DnaK). Так, например, с использованием двухгибридного анализа *in vitro* было показано, что светоиндуцируемые белки DnaK2 и DnaJ2 *Synechococcus elongatus* 7942 могут участвовать в стабилизации *psbAII* транскрипта, подавляя активность РНКазы E в условиях высокой освещённости (Watanabe *et al.,* 2007b). DnaK-белки участвуют в различных фундаментальных клеточных процессах, включая фолдинг новосинтезированных белков *de novo*, предотвращение ошибочной укладки и агрегации белков, транспорт и перенос белков, контроль за функциональной активностью регуляторных белков и многое другое (суммировано у Mayer, Bukau, 2005). Ранее было установлено, что в клетках мутанта *ΔpepP* (GS) был изменён синтез и (или) стабильность белков тилакоидных мембран (Пожидаева *и др.,* 2013).

Биоинформационный анализ показал, что среди DnaK-белков есть потенциальный субстрат для исследуемой аминопептидазы PepP; белок DnaK1, который кодируется геном *slr0086* и содержит а. о. пролина в положении P2 (П. 6), чья роль в клетке до конца не выяснена. Известно, что ген *slr0086* транскрибируется как часть оперона SynAlh1 (альдегиддегидрогеназы, кодируемой геном *slr0091*), состоящего из восьми ORF (Slr0086/DnaK-Slr0096/DnaJ), включая

гены, кодирующие белки биосинтеза токоферола и каротиноидов, которые обеспечивают защиту клеток от окислительного стресса (Trautmann *et al.*, 2013).

Таким образом, несмотря на изменённый в сравнении с ДТ рост мутантного штамма, мы не нашли свидетельств прямого участия пептидазы PepP в цитокинезе. Однако нами были выявлены потенциальные белки-мишени для протеазы PepP. К ним относятся белки теплового шока, DnaJ4 (Sll0897; Hsp40), DnaJ-подобный белок (DnaJ3, Sll1666) и DnaK-подобный белок (DnaK1, Slr0086), которые могут опосредованно участвовать либо в клеточном делении, либо в сигнальных механизмах, обеспечивающих остановку деления клеток на логарифмической стадии роста.

Как уже отмечалось, у бактерий размер клеточных колоний зависит не только от скорости роста отдельных клеток, но и от их размера. Вариабельность размера клеток напрямую связана с изменениями в составе, распределении и активности белковых комплексов, расположенных в тилакоидной мембране или ассоциированных с ней. Подобный эффект был продемонстрирован в ряде работ на примере *Nostoc* sp. (Gao, Ai, 2004), и визуально с помощью методов микроскопии регистрируется на уровне организации и расположения тилакоидных мембран (Fuhrmann *et al.*, 2009; Collins *et al.*, 2012). В связи с этим, в ходе исследования нами также были проанализированы структура и расположение тилакоидных мембран в клетках обоих штаммов *Synechocystis* с использованием электронной микроскопии. Результаты показали, что, в отличие от ДТ, клеточная суспензия мутанта *ΔpepP* представлена клетками трёх типов (рис. 41): 1) клетками с периферийным расположением тилакоидных мембран, характерным для ДТ; 2) клетками с нарушенной ориентацией и расположением тилакоидных мембран, и увеличенным цитоплазматическим интервалом между слоями тилакоидов; 3) клетками с разрушенными внутриклеточными компонентами (П. 5, рис. 51).

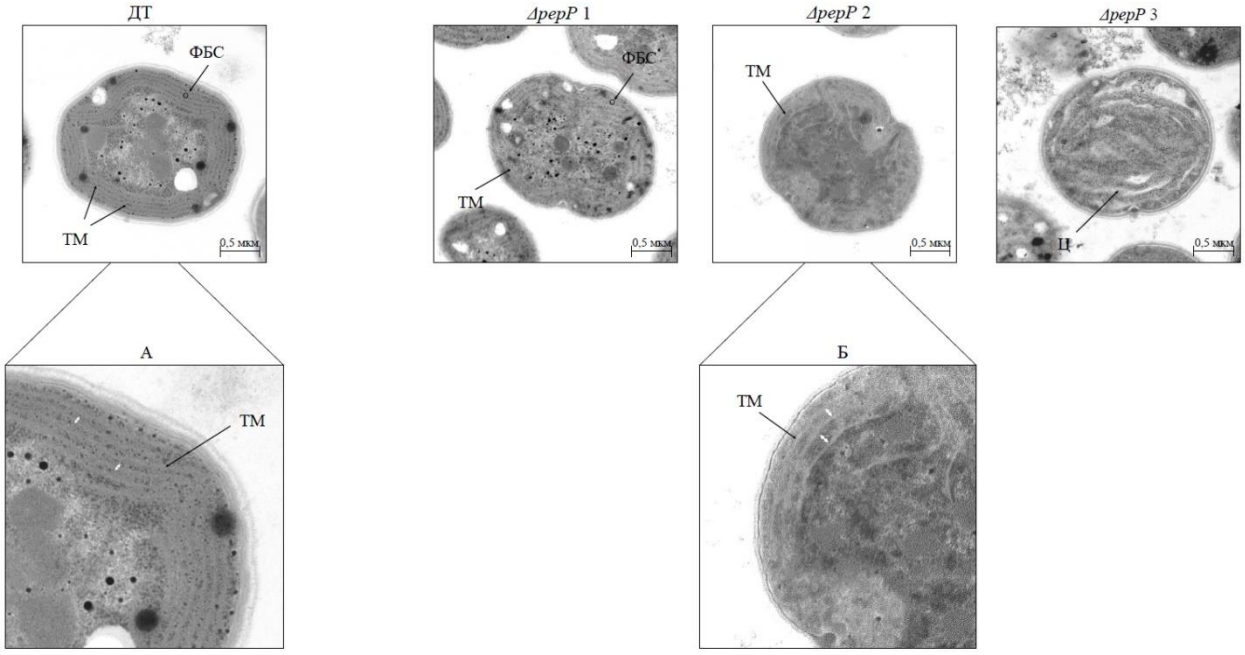

Рис. 41. Трансмиссионная электронная микроскопия клеток штаммов дикого типа и мутанта *ΔpepP Synechocystis*.

Обозначения: *ΔpepP* 1 – клетка с периферийной локализацией тилакоидных мембран; *ΔpepP* 2 – клетка с изменённым расположением тилакидных мембран; *ΔpepP* 3 – клетка с разрушенными внутриклеточными компонентами; ФБС – фикобилисомы, ТМ – тилакоидная мембрана; Ц – цитоплазма; А и Б – увеличенное изображение клеток, где ↔ обозначен цитоплазматический интервала между слоями ТМ. Масштаб указан на изображениях.

Количество клеток с резко нарушенной структурой фотосинтетических мембран у мутанта *ΔpepP* было незначительным, однако большая часть проанализированных препаратов состояла из клеток с изменённым расположением тилакоидов (рис. 41, *ΔpepP* 2), а также увеличенным цитоплазматическим интервалом между слоями тилакоидов (рис. 41, А и Б; П. 5, рис. 53).

Как известно, клетки дикого типа *Synechocystis* sp. PCC 6803 содержат по 4-6 слоёв тилакоидных мембран, которые находятся друг от друга на расстоянии 45 ± 10 нм (Olive *et al.,* 1997; Liberton *et al.,* 2006). Количество слоёв тилакоидных мембран у обоих штаммов было одинаковым, однако у мутанта *ΔpepP* тилакоиды располагались менее сжато, с увеличенным цитоплазматическим интервалом (П. 5,

рис. 53). Суммируя данные различных исследований, изменения цитоплазматического пространства между тилакоидами могут быть объяснены как минимум двумя факторами: 1) нарушениями в структуре фикобилисом (Collins *et al.*, 2012; Olive *et al.*, 1997); 2) изменением в распределении и соотношении комплексов ФСII и ФСI в тилакоидах (Fuhrmann *et al.*, 2009; Barthel *et al.*, 2013).

3.6.3. Инактивация гена *pepP Synechocystis* привела к изменению соотношения комплексов фотосистем (ФСII/ФСI) в тилакоидах

Поскольку изменения в локализации тилакоидных мембран у мутанта *ΔpepP*, наблюдаемые в ходе анализа препаратов электронной микроскопии, могут сопровождаться изменением в распределении и соотношении фотосистем (ФСII/ФСI) в тилакоидах, мы провели оценку содержания нативных комплексов ФСI и ФСII, выделенных из клеточной культуры мутанта *ΔpepP* и ДТ, методом голубого нативного ПААГ-электрофореза (рис. 42).

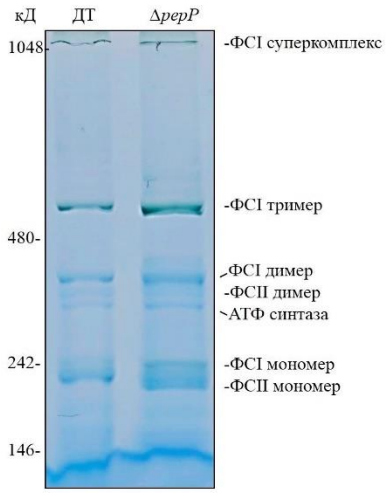

Рис. 42. Разделение тилакоидных комплексов в нативных условиях с помощью 4-13% градиентного ПААГ электрофореза.

Обозначения: гель окрашен коллоидным Кумасси-G. Для солюбилизации белковых проб, содержащих хлорофилл в концентрации 1 мкг/мкл, использовали 1% ДМ. На гель наносили 8 мкг $ХЛ_a$ образца. Справа обозначены позиции соответствующих комплексов белков фотосинтетических мембран; слева указаны мол. массы маркерных белков в кД.

Перед нанесением белковые пробы, содержащие хлорофилл в концентрации 1 мкг/мкл, солюбилизировали в присутствии 1% ДМ. Соответствующие образцы (8 мкг хлорофилла на дорожку) разделяли в градиенте 4-13% ПААГ (см. главу 2.12.1). Локализацию белковых полос в геле проводили по данным, опубликованным в работе (Dühring *et al.,* 2006).

Результаты фракционирования показали различия в соотношении белков комплексов ФСII/ФСI у мутанта и ДТ. В образцах мутантного штамма *ΔpepP Synechocystis* наблюдалось повышенное содержание белков комплекса ФСI на фоне пониженного содержания белков комплекса ФСII, что согласуются с результатами, ранее полученными на мутанте *ΔpepP* GS штамма (Пожидаева *и др.,* 2013). В данной работе было установлено, что, в отличие от ДТ, в клетках мутанта *ΔpepP* штамма GS содержание белков CP47, D2 комплекса ФСII было значительно снижено, в то время как содержание белков PsaA, PsaD, PsaF комплекса ФСI было, наоборот, увеличено. Помимо изменений в соотношении содержания белков комплексов ФСI и ФСII, мы также наблюдали уменьшение содержания хлорофилла в клетках мутанта (табл. 16), что также может быть следствием изменений в структуре тилакоидов и количестве фотосистем на клетку. Как известно, существует прямая корреляция между количеством тилакоидных мембран и содержанием хлорофилла на клетку (Barthel *et al.*, 2013).

К настоящему моменту исследованы и охарактеризованы лишь несколько белков, участвующих в биогенезе тилакоидной мембраны. Среди них белок Vipp1 (vesicle-inducing protein in plastids 1; Sll0617), чья, даже неполная инактивация, привела к появлению менее сжатых тилакоидов (Westphal *et al.*, 2001) из-за увеличения цитоплазматического пространства, а также к снижению числа тилакоидных слоёв (до 2-3) (Fuhrmann *et al.,* 2009). Однако в отличие от *ΔpepP*, в клетках дефектных по белку Vipp1, отмечается резкое снижение содержания ФСI в тилакоидах, которое сопровождается дестабилизацией триммера ФСI и накопления мономера ФСI (Fuhrmann *et al.,* 2009). Этот результат показывает, что белок Vipp1 в большей степени связан с биогенезом ФСI, чем с биогенезом самих мембран.

Далее, белок CurT (Curvature Thylakoid 1; Slr0483) также необходим клеткам *Synechocystis* для дифференциации мембранной архитектуры, включая образование центров биогенеза, связанных с ФСII. Инактивация гена *slr0483* приводит к нарушению тилакоидной организации и к менее эффективной сборке комплекса ФСII. Следует учитывать, что несмотря на изменения в структуре и распределении тилакоидов, размер и число мутантных клеток на $ОП_{750}$ не изменились, также, как и транспорт электронов от ФСII. Помимо участия в биогенезе ФСII, белок CurT вовлечён в адаптивные механизмы клетки к осмотическому стрессу (Heinz *et al.*, 2016).

Периплазматический белок PratA (processing-associated TPR protein; Slr2048) является ещё одним важным компонентом в биогенезе тилакоидов в целом, и в биогенезе ФСII, в частности (Klinkert et al., 2004). В своей структуре PratA белок содержит TPR (tetratricopeptide) мотив (34 а. о.), который был обнаружен в белках, участвующих в стабилизации мРНК хлоропластов (Das *et al.*, 1988). Белок PratA необходим для эффективной доставки ионов Mn^{2+} к ФСII и их предварительной ассоциации с белком D1, которая происходит в периплазме клетки. В клетках мутанта Δ*pratA* тилакоидные мембраны оказались менее сжатыми, а наружная и периплазматическая мембраны – бугристыми и менее организованными по сравнению с ДТ (Stengel *et al.*, 2012). Несмотря на схожий фенотип *ΔpepP* с мутантами Δ*pratA* и Δ*curT*, ни один из соответствующих белков не может быть прямым субстратом для исследуемой в данной работе аминопептидазы PepP ввиду композиции их аминокислотной последовательности в *N*-концевой области белка.

Оба белка PratA и CurT вовлечены в биогенез комплекса ФСII. Мы также предполагаем, что PepP может участвовать в биогенезе белков ФСII, исходя из результатов, полученных на мутанте *ΔpepP* штамма GS (Пожидаева *и др.*, 2013). Как известно, биогенез ФСII – это многоступенчатый и многокомпонентный процесс (суммировано в Nickelsen, Rengstl, 2013). Анализ аминокислотных последовательностей белков (Rast *et al.*, 2016), которые участвуют в биогенезе ФСII у *Synechocystis*, позволил выявить ещё один возможный субстрат для

аминопептидазы PepP, белок YCF48 (Slr2034), который является гомологом HCF136 *A. thaliana*. В последовательности YCF48 (П. 6) а. о. Pro занимает положение P2. Также, как и PratA, белок YCF48 вовлечён в сборку ФСII на ранних этапах биогенеза. YCF48 непосредственно взаимодействует с белком-предшественником белка D1, pD1, предположительно, участвуя в стабилизации новосинтезированного белка pD1 (Komenda *et al.*, 2008).

Нужно отметить ещё два потенциальных субстрата для аминопептидазы PepP – белок YCF3 (Slr0823) и YCF36 (Sll0584), в последовательности которых присутствует а. о. Pro в позиции P2 и P3, соответственно. Функция белка YCF36 в клетках фотосинтезирующих бактерий до сих пор не исследована. Белок YCF3 вовлечён в сборку ФСI, взаимодействуя с белками PsaB и PsaA, не влияя на их стабильность. Инактивация YCF3 приводит к двукратному снижению содержания триммера ФСI в мутантных клетках (Naver *et al.*, 2001). Однако в случае мутантного штамма Δ*pepP* мы наблюдали, наоборот, увеличенное содержание нативных комплексов ФСI (рис. 42). Это позволяет исключить влияние мутации в гене *pepP* на белок YCF3.

Таким образом, основываясь на результатах электронной микроскопии и голубого нативного гель-электрофореза в сочетании с биоинформационным анализом нами был выявлен ещё один возможный субстрат для протеазы PepP – белок YCF48, который вовлечён в биогенез ФСII.

3.6.4. Аминопептидаза PepP вовлечена в регуляцию уровня белков фикобилисом у *Synechocystis*

Как было отмечено выше, изменения в структуре и расположении тилакоидных мембран в клетке могут быть связаны с нарушениями в структуре и композиции фикобилисом – светособирающем комплексе *Synechocystis* (Olive *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 2012). Это также отражается на количестве пигмент-содержащих белков ФКБ: аллофикоцианина и фикоцианина. Сравнительный анализ пигментного состава трёхдневной культуры клеток *Synechocystis* показал,

что у мутанта Δ*pepP* достоверно снижено содержание фикобилипротеинов на 28,8% по сравнению с клетками ДТ (табл. 16).

Таблица 16. Содержание пигментов в клетках штаммов дикого типа и мутанта *ΔpepP Synechocystis* на 3 сутки роста цианобактерий

Содержание пигментов, мг/ОП$_{750}$	**ДТ**	**Δ*pepP***
Хлорофилл	11,62 ± 0,22	9,24 ± 0,35
Фикобилипротеины	88,24 ± 2,40	62,84 ± 0,75*
Каротиноиды	1,46 ±0,02	1,32 ± 0,08

M ± *m*, *n* = 3, * обозначены достоверные различия между средними при $p < 0,05$.

Полученные данные также согласуются со спектральным анализом целых клеток *Synechocystis*. Спектры поглощения, детектируемые в диапазоне 350-800 нм через 72 ч роста цианобактерий, характеризовались четырьмя пиками: хлорофилла (при 440 нм и 678 нм), каротиноидов (при 450 нм) и фикобилипротеинов (при 625 нм). Пики поглощения фикобилисом в образцах мутанта были снижены в сравнении со штаммом ДТ (рис. 43).

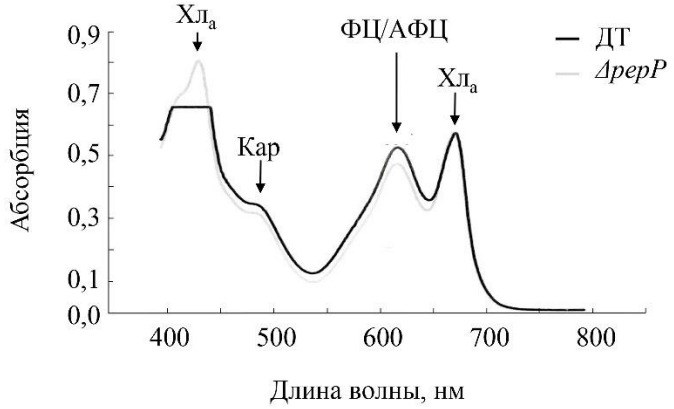

Рис. 43. Спектры поглощения целых клеток цианобактерий штаммов дикого типа и мутанта *ΔpepP Synechocystis* на 3 сутки роста цианобактерий.

Обозначения: стрелками обозначены пики поглощения хлорофилла (Хл$_a$) при 440 нм и 678 нм, каротиноидов (Кар) – при 450 нм и фикобилисом (ФЦ/АФЦ) – при 625 нм.

Результаты флуоресцентной спектроскопии клеточной суспензии *Synechocystis* соответствовали ранее полученным данным и показали снижение пика флуоресценции фикобилисом (λ_{ex} = 658 нм, λ_{em} = 590-780 нм) в образцах мутанта (рис. 44).

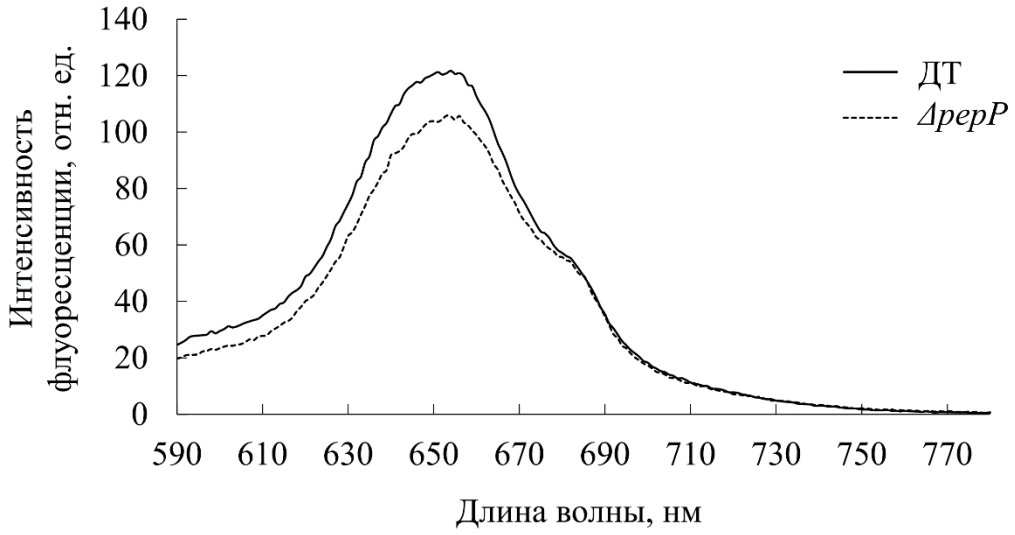

Рис. 44. Спектры флуоресценции фикобилисом клеточной культуры штаммов дикого типа и мутанта *ΔpepP Synechocystis* на 3 сутки роста цианобактерий.

Обозначения: детекцию флуоресценции в целых клетках цианобактерий проводили при длинах волн: λ_{ex} = 658 нм и λ_{em} = 590-780 нм.

Сниженное содержание белков АФЦ и ФЦ было обнаружено и у мутанта *ΔpepP* штамма GS (Пожидаева *и др.*, 2013). Однако детального исследования взаимосвязи PepP и фикобилипротеинов в этой работе не проводилось.

Как показано в главе 1.3.2, фикобилисомы являются сложно организованной структурой. Исследования мутантных штаммов *Synechocystis*, у которых в результате мутаций в генах линкерных белков нарушена структура лучей фикобилисом (*ΔCB* и *ΔCK*) или фикобилисомы полностью отсутствуют (*ΔPAL*), демонстрируют изменения в расположении и кривизне тилакоидов, а также протяжённости цитоплазматического пространства между тилакоидами. В двух случаях, у мутантов *ΔCK* и *ΔPAL*, расположение тилакоидных мембран отличается от наблюдаемой в данной работе ультраструктурной организации клеток (см.

рис. 41); мутантные штаммы *ΔCK* и *ΔPAL* обладали резко выраженным уменьшенным цитоплазматическим пространством, то есть фотосинтетические мембраны были плотно упакованы, но их концентрическое расположение было нарушено (Collins *et al.*, 2012). Кроме того, оба мутанта характеризовались бóльшим соотношением ФСII/ФСI на единицу площади тилакоидов (Lea-Smith *et al.*, 2014;) по сравнению с ДТ, что также не характерно для мутанта *ΔpepP* (см. главу 3.6.3). Это позволяет предположить, что, несмотря на сниженное содержание АФЦ и ФЦ в клетках, сама композиция ФКБ у мутанта *ΔpepP* не нарушена в той степени, как у мутантов *ΔCK* и *ΔPAL* (Collins *et al.*, 2012). Однако структурная организация фотосинтетических мембран в клетках мутанта *ΔpepP* похожа на расположение тилакоидов в клетках мутантного штамма *ΔCB,* у которого не хватает концевого блока ФЦ лучей ФКБ вследствие инактивации генов, кодирующих линкерные полипептиды L_R^{30} и L_R^{33}.

Для выяснения природы изменений в структуре ФКБ у мутанта *ΔpepP* был изучен профиль белков ССК и их количество в обоих штаммах *Synechocystis*. Для этого были выделены фракции интактных фикобилисом из клеток цианобактерий с использованием 12-30% градиента плотности OptiPrep. Как видно из рис. 45,

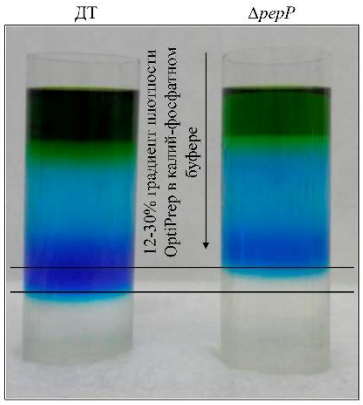

Рис. 45. Фракционирование фикобилисом в 12-30% градиенте плотности OptiPrep, выделенных из клеток штаммов дикого типа и мутанта *ΔpepP Synechocystis*.

Обозначения: линиями обозначены нижние границы распределения интактных фикобилисом в градиенте плотности OptiPrep.

интактные ФКБ мутанта находятся в менее плотной зоне градиента, что свидетельствует об их усечённой структуре. Схожий эффект наблюдался при фракционировании ФБС, выделенных из клеток различных мутантов (Lea-Smith *et al.*, 2014).

Спектральный анализ интактных фикобилисом дикого и мутантного штаммов цианобактерий показал, что максимум спектра абсорбции образца фикобилисом, полученного из клеток мутанта *ΔpepP*, был снижен по сравнению с максимумом образца ФБС дикого типа (рис. 46). Кроме того, спектр поглощения фикобилисом мутантного штамма *Synechocystis* содержал плечо в районе 650 нм, характерное для мутанта по гену *cpcC1 (*линкерный белок с мол. масс. 33 кД*)* (Ughy, Ajlani, 2004), однако оно выражено не так ярко, как в случае мутантов, у которых изменено содержание белков L_R^{30} и L_R^{33}. Этот результат предполагает изменения у мутанта *ΔpepP* не только в количестве АФЦ и ФЦ фикобилисом, но и в композиции линкерных полипептидов.

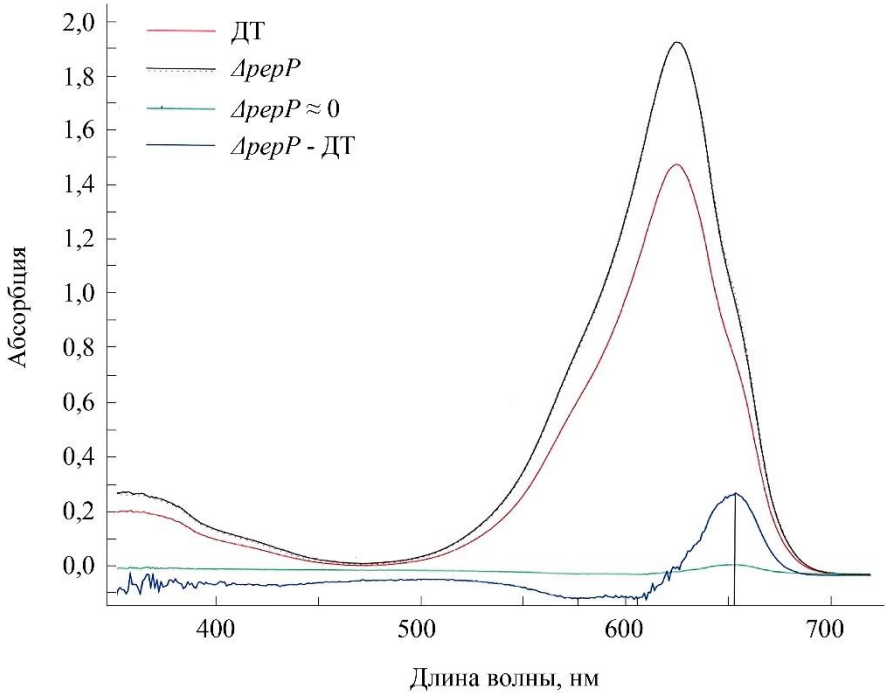

Рис. 46. Спектры поглощения интактных фикобилисом, выделенных из клеток цианобактерий штаммов дикого типа (ДТ) и мутанта *ΔpepP Synechocystis* на 3 сутки роста.

Об этом также свидетельствуют результаты фракционирования интактных фикобилисом с помощью денатурирующего 12,5% гель-электрофореза. ДДС-ПААГ анализ показал, что в клетках мутанта понижено содержание белков ФЦ и АФЦ, а также пяти линкерных полипептидов (рис. 47): якорного белка фикобилисомы L_{CM}^{99}, связывающего ядро АФЦ с тилакоидной мембраной; полипептидов боковых цилиндров L_R^{33}, L_R^{30} и L_R^{10}; линкерного белка L_{CR}^{27}, участвующего в прикреплении боковых цилиндров ФЦ к аллофикоцианиновому ядру. Полученные результаты согласуются с данными MALDI-TOF масс-спектрометрии, показавшими, что в клетках мутантного штамма *ΔpepP Synechocystis* снижено содержание полипептида с мол. массой 33 кД (П. 4, 1).

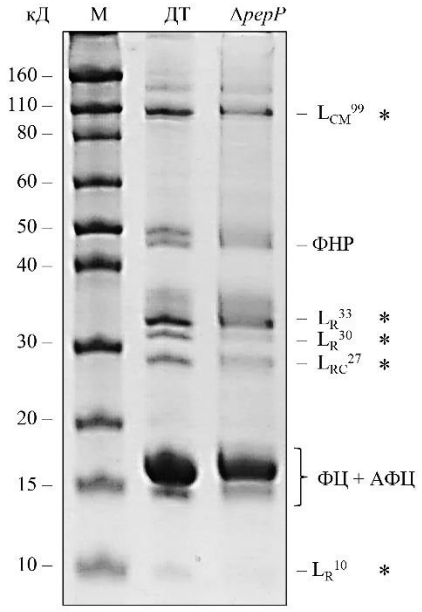

Рис. 47. Фракционирование интактных фикобилисом *Synechocystis* в 12,5% ДДС-ПААГ. Обозначения: L – линкерные полипептиды фикобилисом; ФЦ – фикоцианин; АФЦ – аллофикоцианин; ФНР – ферредоксин-НАДФ-редуктаза; М – маркерные белки («Thermo Scientific, Life Technologies»); * указаны линкерные белки фикобилисом, содержание которых снижено в образцах мутанта в сравнении с ДТ. Позиции белковых полос определяли на основе работы (Ughy, Ajlani, 2004).

Анализ аминокислотных последовательностей линкерных белков не выявил наличия а. о. Pro в позициях P2 или P3 молекул, что исключает их из

потенциальных прямых субстратов для аминопептидазы PepP. Однако, суммируя наши результаты и данные других исследований, предполагается, что исследуемый белок может быть вовлечён в посттрансляционные модификации соответствующих мишеней после действия пептидаз иной субстратной специфичности, либо других регуляторных белков, которые координируют биогенез фикобилисом.

Разделение индивидуальных белковых комплексов цитоплазмы проводили в нативных условиях с помощью 4-13% и 4-10% градиентного ПААГ электрофореза. Особый интерес представляли фикобилин-содержащие комплексы, которые легко детектировать в геле по природной голубой окраске. На дорожку наносили 60 мкг белка соответствующего образца. По окончании электрофоретического фракционирования проб сопоставляли нативно-окрашенные белковые полосы, а для визуализации остальных белковых комплексов использовали раствор коллоидного Кумасси G. Анализ данных электрофореграммы (рис. 48 А) показал

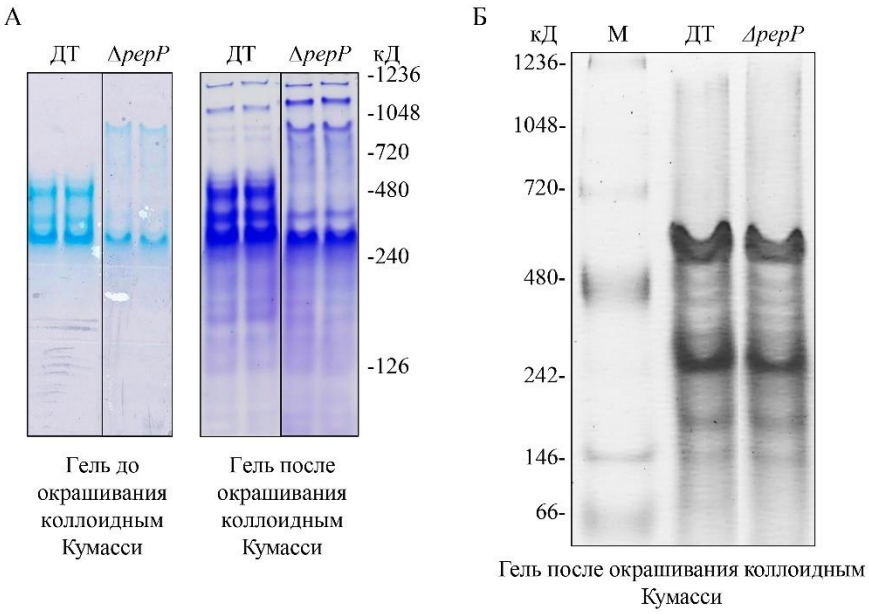

Рис. 48. Электрофореграмма разделения индивидуальных растворимых белковых комплексов в нативных условиях с помощью (А) 4-13% и (Б) 4-10% градиентного ПААГ электрофореза, выделенных из клеток цианобактерий штаммов дикого типа и мутанта *ΔpepP Synechocystis*.

Обозначения: М – маркерные белки («Thermo Scientific, Life Technologies»).

различия в содержании высокомолекулярных белковых комплексов, в том числе, содержащих фикобилипротеины, между мутантом *ΔpepP* и штаммом ДТ *Synechocystis*. Однако в ходе выполнения последующих экспериментов (рис. 48 Б) различия в содержании белковых комплексов между штаммами цианобактерий отсутствовали. Обнаруженные нами в ходе первых экспериментов изменения были связаны с агрегацией белковых комплексов в области выше 720 кД.

3.6.5. У мутанта *ΔpepP* изменён профиль фракции растворимых белков

Предполагаемая цитоплазматическая локализация исследуемого белка *ΔpepP* (см. главу 3.1) указывает на то, что возможные субстраты для аминопептидазы P *Synechocystis* следует искать среди белков цитоплазмы. Все ранее перечисленные шаперонные белки ко-локализуются в цитоплазме. Так как шапероны участвуют в биогенезе белков, то различия между ДТ и мутантом *ΔpepP* могут наблюдаться на уровне синтеза белков и посттрансляционных процессов, как это было показано у Пожидаевой с соавт. (Пожидаева *и др.*, 2013) на примере отдельных белков. Современные методы исследования позволяют шире и точнее оценить уровень индивидуальных белков и определить возможные субстраты путём сравнения протеомов штаммов ДТ и мутанта, в том числе, с помощью изоэлектрического фракционирования белковых проб в гелевых стрипах с различным градиентом pH в сочетании с ДДС-ПААГ и последующим MALDI-TOF анализом интересующих пятен.

На рис. 49 представлены результаты разделения цитоплазматических белков с помощью IEF/2DE электрофореза, которые показали различия в белковом профиле мутанта от ДТ. В частности, в образцах мутанта *ΔpepP* наблюдали пониженное содержание фикобилипротеинов в сравнении с ДТ (рис. 9). С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии нами выборочно были идентифицированы белки, содержание которых в образцах мутантного штамма *Synechocystis* было значительно снижено в отличие от ДТ: линкерный белок с мол.

массой 33 кД (L_R^{33}) и фактор элонгации Tu (EF-Tu) с мол. массой 43,7 кД (см. П. 4, 1 и 2).

Таким образом, полученные результаты ещё раз подтвердили участие белка PepP в биогенезе фикобилисом. Кроме того, наблюдаемые нами морфологические изменения в структуре тилакоидов у *ΔpepP* могут быть связаны с пониженным содержанием белков комплекса ФСII в клетках мутанта, что, вероятно, обусловлено нарушениями в синтезе/стабильности соответствующих белков из-за пониженного содержания EF-Tu (Баик *и др.*, 2014). Это также подтверждается данными MALDI-TOF анализа (П. 4, 2) и результатами по изучению кинетики накопления полипептидов фотосинтетических комплексов у *ΔpepP* GS штамма (Пожидаева *и др.*, 2013).

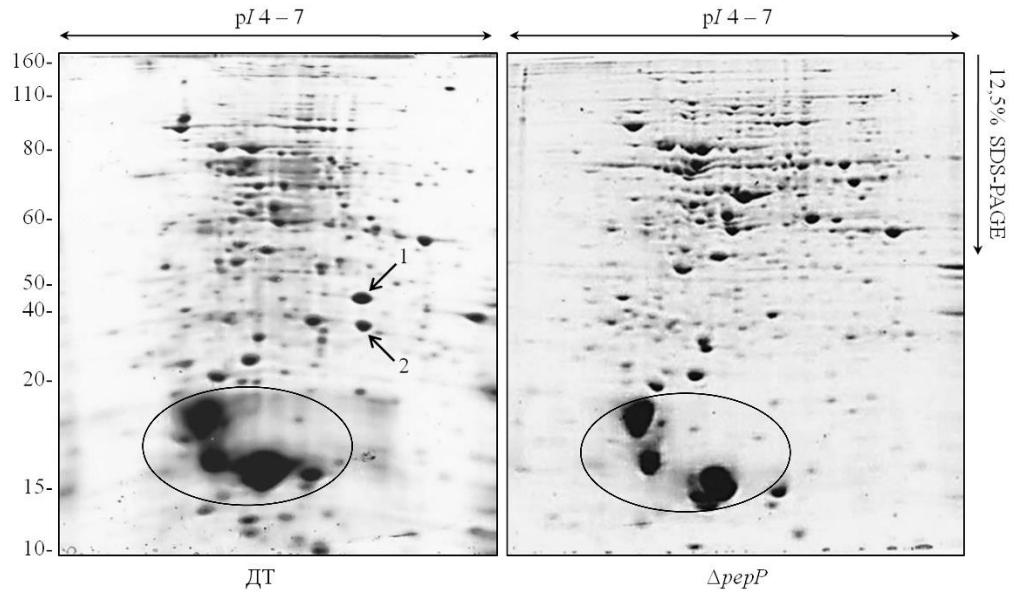

Рис. 49. Электрофореграмма разделения растворимых белков в 12,5% ДДС-ПААГ после их изоэлектрического фракционирования в гелевых стрипах длиной 11 см с pH 4-7.

Обозначения: цифрами указаны белки, идентифицированные в образцах штамма ДТ *Synechocystis*: 1 – фактор элонгации Tu (EF-Tu) с мол. массой 43,7 кД; 2 – линкерный белок с мол. массой 33 кДа (L_R^{33}); выделена область полипептидов, содержащих фикобилипротеины; справа указаны мол. массы маркерных белков в кД («Thermo Scientific, Life Technologies»).

3.6.6. Аминопептидаза PepP не участвует в адаптации клеток *Synechocystis* к дефициту азота

Фикобилисомы являются первичной мишенью для протеаз, особенно в условиях стресса. В частности, цианобактерии легко адаптируются к дефициту азота в питательной среде за счёт последовательной деградации белков фикобилисом, которые в этом случае становятся основным поставщиком аминокислот. Согласно данным сравнительного анализа транскриптома *Synechocystis* (Kopf *et al.*, 2014) в ответ на дефицит азота в питательной среде резко возрастает экспрессия гена *pepP*. Это может быть связано с необходимостью накопления отдельных аминокислот в результате *Xaa*-↓-*Pro*- N-концевого протеолиза белков или пептидов, но также аминопептидаза PepP может участвовать в посттрансляционном созревании регуляторных белков (шаперонов и протеаз), которые вовлечены в механизмы выживания цианобактерий в условиях азотного голодания.

Из литературных данных известно, что в условиях дефицита азота в питательной среде в деградацию фикобилисом вовлечены белки NblA и белки комплекса Clp-протеазы (Baier *et al.*, 2014). У *Synechocystis* sp. PCC 6803 идентифицированы два гена *nblA1* и *nblA2*, кодирующих соответствующие белки. Исследования показали, что оба белка, и NblA1 и NblA2, необходимы для образования гетеродимера и индукции процесса протеолиза фикобилисом в условиях азотного голодания (Baier *et al.*, 2001; Li, Sherman, 2002). Анализ аминокислотной последовательности данных белков выявил наличие а. о. Pro в положении P3 белка NblA1 (П. 6). Таким образом, NblA1 может выступать в качестве потенциального субстрата для белка PepP.

Как адаптерный белок, гетеродимер NblA1/NblA2 способен связываться с шапероном ClpC комплекса Clp-протеазы. В работе Baier (Baier *et al.*, 2014) NblA1/NblA2 опосредованно регулировал деградацию ФБС в комплексе ClpC/ClpP1/ClpR *in vitro*. Поэтому, компьютерному анализу также подвергались

белки Clp-семейства, функциональная роль которых была подробно рассмотрена ранее (см главы 1.1.3, 1.2.2, 1.3.3). Белки ClpP1, ClpX и ClpP3 (П. 6) содержат остаток пролина в положении P3 и P2, соответственно, таким образом, они могут выступать потенциальными субстратами для пептидазы PepP.

Основываясь на предварительных данных и учитывая, что аминопептидаза PepP вовлечена в биогенез белков фикобилисом, мы предположили, что белок PepP также может участвовать в адаптации цианобактерий к дефициту азота. В этом случае инактивация гена *pepP* может привести к неспособности мутантных клеток деградировать фикобилисомы, что визуально выражается в полном отсутствии выцветания клеточной суспензии, а также в отсутствие снижения пика в области 620 нм, соответствующего максимуму поглощения ФЦ в спектре абсорбции мутантных клеток.

Анализ штаммов *Synechocystis* в условиях азотного голодания проводили на 7 сутки выращивания цианобактерий. Фенотип мутанта *ΔpepP* характеризовался сильным выцветанием культуры в сравнении со штаммом ДТ (данные не представлены), что связано с изменением соотношения содержания фотосинтетических пигментов. Спектры абсорбции целых клеток цианобактерий показали, что пики поглощения хлорофилла и каротиноидов в образцах мутанта были незначительно снижены по сравнению с диким типом, но практически не различались между культурами мутантного штамма, выращенными при стандартных условиях (+ N) и в среде без азота (- N) (рис. 49). Длительная инкубация цианобактерий на среде без азота привела к деградации светособирающего комплекса обоих штаммов цианобактерий. Как видно из рис. 49, пики спектров в области 625 нм, соответствующие максимуму поглощения фикобилинсодержащих белков, у мутанта и ДТ значительно не различались (рис. 49, - N).

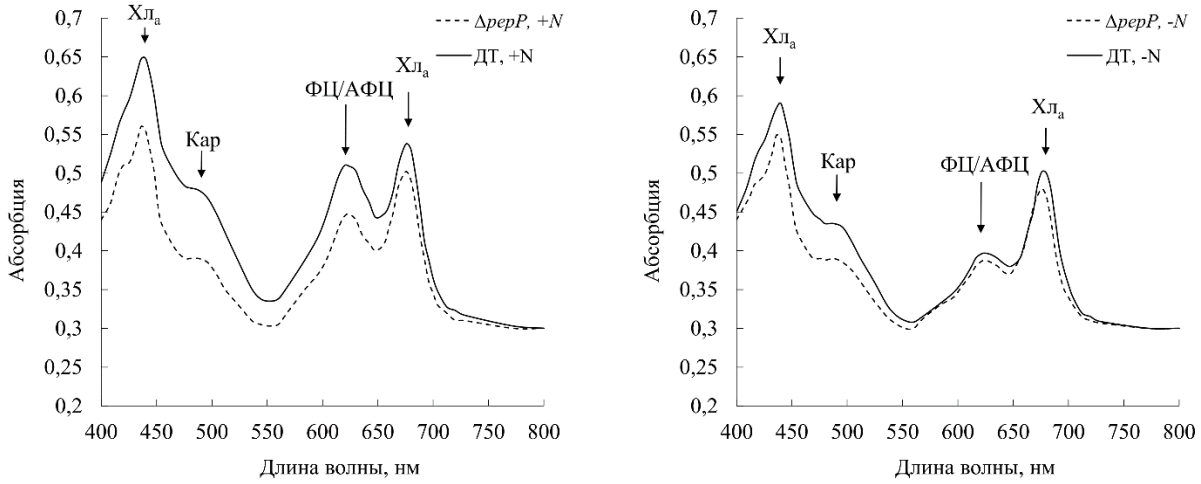

Рис. 49. Спектры поглощения целых клеток штаммов дикого типа и мутанта *ΔpepP Synechocystis* на 7 сутки роста цианобактерий.

Обозначения: слева – спектры клеток, выращенных в стандартных условиях (+ N); справа – спектры клеток, выращенных на питательной среде без азота (- N). Стрелками обозначены пики поглощения хлорофилла (Хл$_a$) при 440 нм и 678 нм, каротиноидов (Кар) – при 450 нм и фикобилисом (ФЦ/АФЦ) – при 625 нм.

Таким образом, данные спектроскопии демонстрируют схожий уровень деградации ФБС у мутанта и ДТ. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии влияния аминопептидазы PepP на деградацию ФКБ, и, как следствие, о возможной её роли в посттрансляционном созревании перечисленных белков в условиях дефицита азота.

3.7. Потенциальные прямые субстраты для аминопептидазы PepP

Установленная в данной работе субстратная специфичность белка PepP как *Xaa↓Pro*-металлозависимой аминопептидазы с предполагаемой цитоплазматической локализацией в клетке позволяет ожидать, что потенциальные прямые субстраты для анализируемого белка также находятся в цитоплазме и отвечают требованиям высокой избирательности действия APP белков. Как известно, аминопептидаза P гидролизует *trans*-изомеры белков, N-концевой участок пептидной связи в которых образован аминокислотным остатком пролина (Lin, Brandts, 1979). Основываясь на результатах биоинформационного анализа и

экспериментальных данных, полученных в ходе выполнения данной диссертационной работы, в Приложении 6 представлен список потенциальных белков-мишеней для белка PepP: это белки семейств DnaJ, DnaK и Ycf (см. главы 3.6.2 и 3.6.3) .

Также возможными субстратами для аминопептидазы PepP являются белки семейства Clp, которые выполняют различные функции, в частности, вовлечены в клеточный ответ на воздействие повышенных температур (Rajaram *et al.*, 2014). В работе Sokolenko показано, что белок PepP может участвовать в адаптацию цианобактерий к действию теплового стресса (Sokolenko *et al.*, 2002). Например, одним из первых генов у цианобактерии *Synechococcus* sp. strain PCC 7942, индуцируемых в условиях теплового шока, является *clpB*, продукт которого, предположительно, выполняет две функции (Clarke, Eriksson, 2000): деагрегирует крупные белковые комплексы (Eriksson *et al.*, 2001) и взаимодействует с DnaK2 при восстановлении повреждённых белков (Haslberger *et al.*, 2007). В геноме *Synechocystis* присутствуют два гена, *slr1641* и *slr0156*, кодирующие белки ClpB1 и ClpB2, соответственно. Показано, что ClpB1 индуцируется в ответ на тепловой шок в клетках *Synechocystis* (Suzuki *et al.*, 2006). Кроме того, иммунолокализация ClpB1 показала, что белок присутствует во всех клетках, но концентрируется в определенных областях цитоплазмы и вокруг тилакоидных мембран (Gonzalez-Esquer, Vermaas, 2013). Из этого можно предположить, что ClpB1 способен участвовать, например, в белковой сборке компонентов тилакоидных мембран, как в случае *A. thaliana*, у которого гомолог ClpB1, Apg3 (ClpB3) участвует в биогенезе тилакоидов (Myouga *et al.*, 2006). Анализ аминокислотной последовательности белков ClpB1 и ClpB2 (П. 6) подтвердил наличие у них остатков Pro в положение P3. Исходя из вышеперечисленного, мы предположили, что шапероны ClpB могут выступать потенциальными субстратами для белка PepP. Таким образом, нами были определены ещё одни возможные мишени для PepP: шапероны ClpB1 и ClpB2, которые необходимы для адаптации цианобактериальных клеток к воздействию высоких температур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Протеолитическое расщепление пептидных связей является одним из важнейших механизмов, направленных на поддержание белкового гомеостаза как неотъемлемого условия жизнеспособности клетки. Данный процесс регулируется особой группой белков – протеолитическими ферментами или пептидазами, которые распространены среди всех групп организмов. Широкий диапазон условий ферментативных реакций, обусловленных температурой, pH, наличием кофакторов, аминокислотной последовательностью субстратов, привёл к появлению большого разнообразия пептидаз, обладающих различными каталитическими механизмами. Непрекращающийся интерес исследователей в области изучения функциональной роли протеолитических ферментов отражает база данных MEROPS, которая, на данный момент, содержит информацию более чем о 4400 индивидуальных пептидазах и продолжает постоянно пополняться (*http://merops.sanger.ac.uk/*).

Особый интерес представляют ферменты, способные гидролизовать пептидные связи, образованные Pro. Данный процесс регулируется ограниченной группой белков – пролин-специфичными пептидазами (Cunningham, O'Connor, 1997; Беседин, Руденская, 2003), что связано с конформационными свойствами а. о. пролина (Walter *et al.*, 1980; Cunningham, O'Connor, 1997). В их число входит аминопептидаза P (EC 3.4.11.9, *Xaa-Pro* аминопептидаза), которая катализирует высвобождение любого N-концевого а. о. при *trans*-положении пептидной связи субстрата, в том случае, если в позиции P2 находится Pro (Lin, Brandts, 1979). Усложнение организации клетки от прокариот к эукариотам привело к увеличению числа белков APP, эволюционная дивергенция которых способствовала изменению их функциональной направленности и распределению по клеточным компартментам (Wilce *et al.*, 1998; *https://www.arabidopsis.org/*; Li *et al.*, 2008; Molinaro *et al.*, 2005; O'Toole *et al.*, 2010). Актуальность и важность изучения роли *Xaa-Pro* аминопептидаз подтверждается работами на млекопитающих, в клетках

которых отсутствие данного белка связано с рядом заболеваний, например, с почечной недостаточностью (O'Toole *et al.*, 2010). Многочисленные данные по секвенированию геномов различных организмов позволили идентифицировать гены APP белков, однако многие из них так и остались предсказанными *in silico*. У фотосинтезирующих организмов исследование *Xaa-Pro* аминопептидаз ограничивается работами на *Lycopersicon esculentum* (LeAPP2) (Hauser *et al.*, 2001) и *A. thaliana* (Huang *et al.*, 2015; Carrie *et al.*, 2015).

Биоинформационный анализ показал, что одноклеточная цианобактерия *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Sokolenko *et al.*, 2002), как и гетеротрофная бактерия *E. coli* (Wilce *et al.*, 1998), содержит только один белок аминопептидазы P. Цианобактериальный гомолог, обозначенный как PepP, кодируется геном *sll0136*, и до настоящего момента не был экспериментально охарактеризован.

Для определения субстратной специфичности исследуемого белка *Synechocystis* был произведён поиск возможных гомологов среди идентифицированных белков пролин-специфичных аминопептидаз. Наиболее близкородственным оказался белок AMPPII *E. coli* (рис. 9), отнесённый к подсемейству металлопептидаз M24B (MEROPS). Характерной особенностью мозаичной структуры аминопептидазы P у *E. coli* является наличие каталитического домена с «pita-bread»-подобной структурной укладкой, высококонсервативный аминокислотный мотив (Asp260, Asp271, His354, Glu383, Glu406) которой участвует в связывании двухвалентных ионов марганца (Wilce *et al.*, 1998; Graham *et al.*, 2005). Основываясь на предсказанной оценке эволюционного родства PepP и AMPPII, мы предположили, что данные белки также будут иметь схожие структурные характеристики, механизм ферментативного катализа и субстратную специфичность.

Для изучения протеолитической активности препарата белка PepP *in vitro* был выбран субстрат Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA. Флуоресцентный трипептид подвергается гидролитическому расщеплению при наличии активности аминопептидазы P (металлопептидаза), дипептидил пептидазы II (аминопептидаза

серинового типа) или пролил-олигопептидазы (эндопептидаза серинового типа) (Stöckel-Maschek *et al.*, 2003). Протеолиз пептида Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA, как и ожидалось, наблюдался в опытах с PepP (Баик *и др.*, 2018). Отсутствие реакции гидролиза азоказеина (неспецифического субстрата для сериновых пептидаз) в присутствии белка PepP исключило его принадлежность к пептидазам серинового типа. Полученные результаты указывают на *Xaa-Pro* аминопептидазную активность фермента. Высокое сродство PepP в опытах *in vitro* к ионам Mn^{2+} и ингибирование фермента в присутствии металл-хелатирующих агентов также подтверждает металлозависимую природу белка (Баик *и др.*, 2018).

Результаты компьютерного моделирования белка PepP *in silico* по гомологии с шаблонными структурами PepP из *E. coli* и *Yersinia pestis* соответствуют данным биохимических экспериментов. Предложенная ранее гипотеза, согласно которой а. о. Asp260, Asp271, His354, Glu385, Glu415 в белке PepP соответствуют а. о. Asp260, Asp271, His354, Glu383, Glu406 в AMPPII *E. coli* и образуют активный сайт белка, участвуя в связывании ионов металлов, оказалась справедливой для цианобактериального фермента. Мономерный комплекс PepP связывает 2 иона марганца: первый из них удерживается за счёт а. о. Glu385, Glu415, Asp271, His354, второй взаимодействует с Glu415, Asp271, Asp260 (Баик *и др.*, 2018). Отметим, что сайт связывания со вторым атомом Mn^{2+} обладал меньшей расчётной аффинностью (меньшим сродством) к лиганду. Подобный эффект прослеживался также в структуре метиониновых аминопептидаз (Hu *et al.*, 2007), аминокислотные последовательности которых обладают высоким сходством с белком PepP, особенно в области каталитического домена (Пожидаева *и др.*, 2013). Интересно, что первоначально *in silico* белок PepP был идентифицирован как один из MAP белков у *Synechocystis* (Sokolenko *et al.*, 2002). В базе данных пептидаз MEROPS бактериальные APP и MAP отнесены к одному семейству M24 и имеют схожую пространственную укладку (Bazan *et al.*, 1994). Например, различия между метиониновой аминопептидазой (тип Ib) и AMPPII *E. coli* наблюдаются в N-концевой области белков, что впоследствии могло изменить функциональные

свойства и субстратную специфичность ферментов, но сохранить часть активности MAP в аминопептидазе P. Это позволяет предположить, что и пролин-специфичная аминопептидаза цианобактерий способна частично заменять функцию белков MAP, гидролизуя пептидные связи, образованные инициаторным а. о. Met и Pro в положении P2 (Пожидаева *и др.*, 2013).

Предсказанная *in silico* цитоплазматическая локализация фермента подтверждается анализом белка с использованием биоинформационных ресурсов и pH-оптимумом протеолитической активности в опытах *in vitro*, который близок к нейтральному (Баик *и др.*, 2018). Однако изучение эволюционных взаимоотношений выявило близкое родство цианобактериального белка с *Xaa-Pro* аминопептидазами не цитозольных, а митохондриальных белков эукариот (рис. 9), которые характеризуются более широкой субстратной специфичностью (Carrie *et al.*, 2015) и в отличие от AMPPII *E. coli* не требуют присутствия остатка пролина в строго определённом положении молекулы-субстрата (Wilce *et al.*, 1998). В ходе изучения влияния ингибиторов на активность препарата белка PepP мы обнаружили, что его субстратная специфичность помимо канонической *Xaa-Pro* активности, характерной для бактериальной AMPPII *E. coli*, демонстрировала дополнительную активность (Баик *и др.*, 2018), природа которой не была в этой работе выяснена.

Далее, с использованием классического генетического подхода были определены возможные субстраты аминопептидазы PepP у цианобактерии *Synechocystis*. Для этого с помощью сайт-направленого мутагенеза был сконструирован мутантный штамм *ΔpepP*, дефектный по аминопептидазе PepP. В ходе исследования было установлено, что инактивация гена *pepP* не повлияла на жизнеспособность цианобактериальной клетки, однако изменила скорость роста мутантных клеток и уменьшила их размер. Замедление роста *ΔpepP* по сравнению с ДТ через 20 ч культивирования могло быть обусловлено пролонгированным периодом клеточного деления. Однако видимых нарушений механизма цитокинеза в клетках мутантного штамма не наблюдалось, что подтверждается анализом

образцов, исследованных как световой, так и электронной микроскопией. В то же время в препаратах мутанта *ΔpepP* присутствовали клетки с повышенной активностью деградационных процессов, что приводило к разрушению внутриклеточных структур и, скорее всего, впоследствии, к гибели клеток. Это также повлияло на оценку времени дупликации клеток мутантного штамма. Одним из возможных объяснений наблюдаемого эффекта является наличие в клетке белков, которые в отсутствие белка PepP, стали функционально неактивны и подверглись протеолизу, согласно правилу N-конца. Суммируя наши результаты, а также литературные данные, мы выделили для аминопептидазы PepP белки-мишени из семейства белков теплового шока, Hsp40, DnaJ3 и DnaK1, которые могут опосредованно участвовать в клеточном делении, а также в сигнальных механизмах, обеспечивающих остановку деления клеток на логарифмической стадии роста. То, что указанный эффект не проявился во всех мутантных клетках, свидетельствует о существовании «запасного» пути, позволяющего заменять активность либо самой PepP, либо перечисленных регуляторных белков.

Нужно отметить, что замедленным ростом характеризовался и мутант *ΔpepP* штамма GS, у которого в дополнение к этому наблюдали изменённый синтез белков тилакоидных комплексов (Пожидаева *и др.*, 2013). Наши исследования также показали, что в клетках мутанта *ΔpepP* содержание основных белковых комплексов (ФСI и ФСII) фотосинтетических мембран между штаммами было изменено. У мутанта *ΔpepP* содержание ФСI было повышено, в то время как содержание комплекса ФСII было снижено относительно ДТ. Это, в свою очередь, отразилось на расположении в клетке тилакоидных мембран и, как следствие, размере мутантных клеток. Основываясь на фенотипе штамма *ΔpepP*, среди нескольких потенциальных кандидатов мы отобрали лишь белок YCF48, как возможный субстрат для аминопептидазы PepP. Белок YCF48 вовлечён в сборку ФСII на ранних этапах биогенеза и его инактивация может существенно повлиять на стабильность новосинтезированного белка pD1 (Komenda *et al.*, 2008).

Наблюдаемый в ходе роста фенотип (выцветание) клеток мутанта *ΔpepP* был обусловлен изменением в содержании пигментов. Количество фикобилипротеинов в образцах *ΔpepP* было снижено по сравнению с ДТ. Спектральный анализ позволил предположить, что у мутанта изменено количество фикобилисом в клетке, в первую очередь, в результате снижения синтеза фикобилипротеинов, как это было показано на мутанте *ΔpepP* штамма GS (Пожидаева *и др.*, 2013). Кроме того, полученные нами препараты электронной микроскопии *ΔpepP* демонстрировали увеличенный цитоплазматический интервал между слоями тилакоидов. Такая структурная организация схожа с расположением тилакоидов в клетках мутантного штамма *ΔCB,* у которого не хватает концевого блока ФЦ лучей ФКБ вследствие инактивации генов, кодирующих линкерные полипептиды L_R^{30} и L_R^{33} (Collins *et al.,* 2012). Пониженное содержание у мутанта *ΔpepP* линкерного полипептида с мол. массой 33 кД было подтверждено нами методом MALDI-TOF масс-спектрометрии после разделения фракции растворимых белков в IEF/2DE. Более того, выделение интактных фикобилисом из клеток *ΔpepP* и ДТ, и фракционирование их полипептидов в ДДС-ПААГ показало пониженное количество других линкерных белков (L_{CM}^{99}, L_R^{30}, L_R^{10} и L_{CR}^{27}) фикобилисом у мутанта *ΔpepP*, демонстрируя влияние аминопептидазы PepP не только на синтез белков АФЦ и ФЦ фикобилисом, но и на линкерные полипептиды. Нужно отметить, что мы не обнаружили в композиции N-концевой области белков фикобилисом а. о. пролина в позиции P2 и (или) P3. Вероятно, аминопептидаза PepP может регулировать уровень этих белков на уровне синтеза, например, через факторы трансляции. С помощью IEF/2DE и MALDI-TOF масс-спектрометрии нами было установлено, что у мутанта *ΔpepP* снижен уровень фактора элонгации EF-Tu. Этот белок играет центральную роль в фазе элонгации синтеза белка, как в бактериях, так и в органеллах эукариот, включая митохондрии и пластиды растений. Нужно также отметить важную роль фактора элонгации EF-Tu в восстановлении активности ФСII при окислительном стрессе.

Таким образом, в ходе данного исследования была охарактеризована аминопептидаза PepP и установлено её участие в биогенезе белков тилакоидных мембран у одноклеточной цианобактерии *Synechocystis*. В ходе исследования наблюдался многосторонний эффект влияния инактивации гена *pepP* на жизнедеятельность мутантного штамма *ΔpepP*, а также на белковый состав и количественный уровень основных фотосинтетических комплексов цианобактерий: фикобилисом, ФСI и ФСII. Описанные изменения морфофизиологических параметров у штамма *ΔpepP* позволили обнаружить белки, которые могут являться потенциальными субстратами для аминопептидазы PepP. В результате, были определены следующие возможные белки-мишени: мультифункциональные шаперонные белки DnaJ4, DnaJ3 и DnaK1, ClpB1 и ClpB2, а также фактор элонгации EF-Tu, выполняющий центральную роль в фазе элонгации синтеза белка и белок YCF48, участвующий в биогенезе белков комплекса ФСII.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что белок PepP *Synechocystis* sp. PCC 6803 обладает *Xaa-Pro* аминопептидазной активностью с оптимумом при 32°C и pH 7,6 и относится к Mn^{2+}-зависимым металлоферментам.
2. Выявлено, что белок PepP гомодимеризуется и в его взаимодействие с двумя ионами Mn^{2+} вовлечены высококонсервативные аминокислотные остатки активного сайта белка: Asp260, Asp271, His354, Glu385, Glu415, Thr273 и Thr383.
3. Показано, что инактивация гена *pepP* не повлияла на жизнеспособность цианобактерий, однако в отличие от дикого типа мутантный штамм *ΔpepP* формировал колонии меньшего размера, что является следствием уменьшения размеров клеток и пролонгированным периодом цитокинеза.
4. В клетках *ΔpepP* наблюдали нарушения в структуре и расположении тилакоидных мембран, свидетельствующие об участии белка PepP в биогенезе белков тилакоидных комплексов ФСI и ФСII.
5. Мутант *ΔpepP* характеризовался пониженным уровнем линкерных белков фикобилисом, демонстрируя влияние аминопептидазы PepP на композицию и содержание фикобилисом в клетках цианобактерий.
6. Выявлены возможные субстраты для белка PepP: мультифункциональные шаперонные белки DnaJ4, DnaJ3 и DnaK1, ClpB1 и ClpB2, фактор элонгации EF-Tu, выполняющий центральную роль в фазе элонгации синтеза белка, и белок YCF48, участвующий в биогенезе белков комплекса ФСII.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Баик А.С., Миронов К.С., Архипов Д.В., Пиотровский М.С., Пожидаева Е.С.** (2018) Характеристика аминопептидазы P одноклеточной цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Доклады Академии Наук*, **481**, 211-215.
2. **Баик А.С., Синетова М.А., Миронов К.С., Пожидаева Е.С.** (2014) Пролиновые аминопептидазы вовлечены в биогенез белков у фотосинтезирующих организмов. В сб.: *Материалы Международной научной конференции и школы молодых учёных «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий»*, под ред. Роньжиной Е.С. Калининград: Аксиос, с. 22-24.
3. **Беседин Д.В., Руденская Г.Н.** (2003) Пролинспецифичные эндопептидазы. *Биорганическая химия*, **29**, 3-20.
4. **Быховский В.Я., Зайцева Н.И.** (1989) Микробиологический синтез тетрапиррольных соединений. *Итоги науки и техники*, **32**, 175.
5. **Владимирова М.Г., Семененко В.Е.** (1962) Интенсивная культура одноклеточных водорослей. М.: АН СССР, 60 с.
6. **Миллер Д.** (1976) Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 436 с.
7. **Миронов К.С.** (2011) Влияние стресс-зависимых изменений текучести мембран на экспрессию генов у цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. Дисс. канд. биол. наук, Москва, 122 с.
8. **Пожидаева Е.С.** (2014) Комплексный подход при исследовании мультибелковых растворимых комплексов в клетках цианобактерий. *Физиология растений*, **61**, 283-290.
9. **Пожидаева Е.С., Мальтерер С., Баик А.С., Соколенко А.В.** (2013) Инактивация гена *sll0136* у *Synechocystis* sp. PCC 6803 приводит к нарушению биогенеза белков фотосинтетических комплексов. *Физиология растений*, **60**, 541-548.

10. **Пожидаева Е.С., Соколенко А.В.** (2017) У цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 светозависимое накопление белка SppA2 регулируется пептидазой SppA1. *Физиология растений*, **64**, 183-189.
11. **Проворов Н.А.** (2016) Мережковский и происхождение эукариотической клетки: 111 лет теории симбиогенеза. *Сельскохозяйственная биология*, **51**, 746-758.
12. **Стадничук И.Н., Красильников П.М., Зленко Д.В.** (2015) Фикобилисомы и фикобилипротеины цианобактерий. *Микробиология,* **84**, 131-143.
13. **Тарчевский И.А.** (1996) Процессы деградации у растений. *Биология*, **6**, 13-19.

14. **Adam Z., Frottin F., Espagne C., Meinnel T., Giglione C.** (2011) Interplay between N-terminal methionine excision and FtsH protease is essential for normal chloroplast development and function in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **23**, 3745-3760.
15. **Addlagatta A., Hu X., Liu J.O., Matthews B.W.** (2005) Structural basis for the functional differences between type I and type II human methionine aminopeptidases. *Biochemistry*, **44**, 14741-14749.
16. **Adir N.** (2005) Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: reconstructing a giant. *Photosynthesis Research*, **85**, 15-32.
17. **Adir N.** (2008) Structure of the phycobilisome antennae in cyanobacteria and red algae. In: *Photosynthetic Protein Complexes: A Structural Approach*, Fromme P. (ed.) Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 243-274.
18. **Albiniak A.M., Baglieri J., Robinson C.** (2012) Targeting of lumenal proteins across the thylakoid membrane. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 1689-1698.
19. **Anderson L.K., Toole C.M.** (1998) A model for early events in the assembly pathway of cyanobacterial phycobilisomes. *Molecular Microbiology*, **30**, 467-474.

20. **Archibald J.M.** (2015) Endosymbiosis and eukaryotic cell evolution. *Current Biology*, **25**, R911-R921.
21. **Ashkenazy H., Abadi S., Martz E., Chay O., Mayrose I., Pupko T., Ben-Tal N.** (2016) ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Research*, **44**, 344-350.
22. **Atanassova A., Sugita M., Sugiura M., Pajpanova T., Ivanov I.** (2003) Molecular cloning, expression and characterization of three distinctive genes encoding methionine aminopeptidases in cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Archives of Microbiology*, **180**, 185-193.
23. **Bachmair A., Becker F., Schell J.** (1993) Use of a reporter transgene to generate arabidopsis mutants in ubiquitin-dependent protein degradation. *PNAS*, **90**, 418-421.
24. **Bachmair A., Finley D., Varshavsky A.** (1986) *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*, **234**, 179-86.
25. **Baebprasert W., Jantaro S., Khetkorn W., Lindblad P., Incharoensakdi A.** (2011) Increased H2 production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by redirecting the electron supply via genetic engineering of the nitrate assimilation pathway. *Metabolic Engineering*, 13, 610-616.
26. **Baier A., Winkler W., Korte T., Lockau W., Karradt A.** (2014) Degradation of phycobilisomes in *Synechocystis* sp. PCC 6803: evidence for essential formation of an NblA1/NblA2 heterodimer and its codegradation by a Clp protease complex. *The Journal of Biological Chemist*, **289**, 11755-11766.
27. **Baier K., Lehmann H., Stephan D.P., Lockau W.** (2004) NblA is essential for phycobilisome degradation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 but not for development of functional heterocysts. *Microbiology*, **150**, 2739-2749.
28. **Baier K., Nicklisch S., Grundner C., Reinecke J., Lockau W.** (2001) Expression of two *nblA*-homologous genes is required for phycobilisome

degradation in nitrogen-starved *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiology Letters*, **195**, 35-39.

29. **Barker M., de Vries R., Nield J., Komenda J., Nixon P.J.** (2006) The Deg proteases protect *Synechocystis* sp. PCC 6803 during heat and light stresses but are not essential for removal of damaged D1 protein during the photosystem two repair cycle. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 30347-30355.
30. **Barrett A.J.** (1999) Peptidases: a view of classification and nomenclature. In: *Proteases New Perspectives*, Turk V. (ed.) Berlin: Birkhäuser, pp. 1-12.
31. **Barthel S., Bernát G., Seidel T., Rupprecht E., Kahmann U., Schneider D.** (2013) Thylakoid membrane maturation and PSII activation are linked in greening *Synechocystis* sp. PCC 6803 cells. *Plant Physiology*, **163**, 1037-1046.
32. **Baulina O.I.** (2012) Ultrastructural plasticity of cyanobacteria under dark and high light intensity conditions. In: *Ultrastructural plasticity of cyanobacteria*, Baulina O.I. (ed.) Berlin: Heidelberg, pp. 11-63.
33. **Bazan J.F., Weaver L.H., Roderick S.L., Huber R., Matthews B.W.** (1994) Sequence and structure comparison suggest that methionine aminopeptidase, prolidase, aminopeptidase P, and creatinase share a common fold. *PNAS*, **91**, 2473-2477.
34. **Bhasin M., Garg A., Raghava G.P.** (2005) PSLpred: prediction of subcellular localization of bacterial proteins. *Bioinformatics*, **21**, 2522-2524.
35. **Bhaya D., Bianco N.R., Bryant D., Grossman A.** (2000) Type IV pilus biogenesis and motility in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Molecular Microbiology*, **37**, 941-951.
36. **Bienert R., Baier K., Volkmer R., Lockau W., Heinemann U.** (2006) Crystal structure of NblA from *Anabaena* sp. PCC 7120, a small protein playing a key role in phycobilisome degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 5216-5223.
37. **Birnboim H.C., Doly J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, **7**, 1513-1523.

38. **Bittner L.M., Westphal K., Narberhaus F.** (2015) Conditional proteolysis of the membrane protein YfgM by the FtsH protease depends on a novel N-terminal degron. *The Journal of Biological Chemistry*, **290**, 19367-19378.

39. **Boehm M., Yu J., Krynicka V., Barker M., Tichy M., Komenda J., Nixon P.J., Nield J.** (2012) Subunit organization of a *Synechocystis* hetero-oligomeric thylakoid FtsH complex involved in Photosystem II repair. *The Plant Cell*, **24**, 3669-3683.

40. **Bond C.S.** (2003) TopDraw: a sketchpad for protein structure topology cartoons. *Bioinformatics*, **19**, 311-312.

41. **Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.

42. **Bradshaw R.A., Brickey W.W., Walker K.W.** (1998) N-terminal processing: the methionine aminopeptidase and N alpha-acetyl transferase families. *Trends in Biochemical Sciences*, **23**, 263-267.

43. **Brown M.S., Ye J., Rawson R.B., Goldstein J.L.** (2000) Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*, **100**, 391-398.

44. **Carrie C., Venne A.S., Zahedi R.P., Soll J.** (2015) Identification of cleavage sites and substrate proteins for two mitochondrial intermediate peptidases in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Bota*, **66**, 2691-2708.

45. **Caruso G.** (2010) Leucine aminopeptidase, beta-glucosidase and alkaline phosphatase activity rates and their significance in nutrient cycles in some coastal Mediterranean sites. *Marine Drugs*, **8**, 916-940.

46. **Chang S.Y., McGary E. C., Chang S.** (1989). Methionine aminopeptidase gene of *Escherichia coli* is essential for cell growth. *Journal of Bacteriology*, **171**, 4071-4072.

47. **Chen G., Zhang X.** (2010) New insights into S2P signaling cascades: Regulation, variation, and conservation. *Protein Science*, **19**, 2015-2030.

48. **Chen S., Vetro J.A., Chang Y.H.** (2002) The specificity in vivo of two distinct methionine aminopeptidases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **398**, 87-93.

49. **Cheregi O., Miranda H., Gröbner G., Funk C.** (2015) Inactivation of the Deg protease family in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 has impact on the outer cell layers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **152**, 383-394.

50. **Cheregi O., Sicora C., Kós P.B., Barker M., Nixon P.J. Vass I.** (2007) The role of FtsH and Deg proteases in the repair of UV-B radiation-damaged Photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1767**, 820-828.

51. **Clarke A.K., Eriksson M.J.** (2000). The truncated form of the bacterial heat shock protein ClpB/HSP100 contributes to development of thermotolerance in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Journal of Bacteriology*, **182**, 709-7096.

52. **Clarke A.K., Schelin J., Porankiewicz J.** (1998) Inactivation of the *clpP1* gene for the proteolytic subunit of the ATP-dependent Clp protease in the cyanobacterium *Synechococcus* limits growth and light acclimation. *Plant Molecular Biology*, **37**, 791-801.

53. **Collier J.L., Grossman A.R.** (1992) Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *Journal of Bacteriology*, **174**, 4718-4726.

54. **Collins A.M., Liberton M., Jones H.D., Garcia O.F., Pakrasi H.B., Timlin J.A.** (2012) Photosynthetic pigment localization and thylakoid membrane morphology are altered in *Synechocystis* 6803 phycobilisome mutants. *Plant Physiology*, **158**, 1600-1609.

55. **Colloms S.D.** (2004) Leucyl aminopeptidase PepA. In: *Proteolytic Enzymes, 2nd Edition*, Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F. (eds.) The San Diego: Elsevier/Academic Press., pp. 905-908.

56. **Cottrell G.S., Hooper N.M., Turner A.J.** (2000a) Cloning, expression, and characterization of human cytosolic aminopeptidase P: a single manganese(II)-dependent enzyme. *Biochemistry*, **39**, 15121-15128.

57. **Cottrell G.S., Hyde R.J., Lim J., Parsons M.R., Hooper N.M., Turner A.J.** (2000) Identification of critical residues inthe active site of porcine membrane-bound aminopeptidase P. *Biochemistry*, **39**, 15129-15135.

58. **Cunninghm D.F., O'Connor B.** (1997) Proline specific peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1343**, 160-186.

59. **Dagan T., Roettger M., Stucken K., Landan G., Koch R., Major P., Gould S.B., Goremykin V.V., Rippka R., de Marsac N.T., Gugger M., Lockhart P.J., Allen J.F., Brune I., Maus I., Pühler A., Martin W.F.** (2013) Genomes of Stigonematalean cyanobacteria (subsection V) and the evolution of oxygenic photosynthesis from prokaryotes to plastids. *Genome Biology and Evolution*, **5**, 31-44.

60. **Das A.K., Cohen P.W., Barford D.** (1988) The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *The EMBO Journal*, **17**, 1192-1199.

61. **Davy A., Thomsen K.K., Juliano M.A., Alves L.C., Svendsen I., Simpson D.** (2000) Purification and characterization of barely dipeptidyl peptidase IV. *Plant Physiology*, **122**, 425-431.

62. **den Blaauwen T., de Pedro M.A., Nguyen-Distèche M., Ayala J.A.** (2008) Morphogenesis of rod-shaped sacculi. *FEMS Microbiology Reviews*, **32**, 321-344.

63. **Dines M., Sendersky E., David L., Schwarz R., Adir N.** (2008) Structural, functional, and mutational analysis of the NblA protein provides insight into possible modes of interaction with the phycobilisome. *The Journal of Biological Chemist*, **283**, 30330-30340.

64. **Ding Q., Chen G., Wang Y., Wei D.** (2015) Identification of specific variations in a non-motile strain of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 originated

from ATCC 27184 by whole genome resequencing. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**, 24081-24093.

65. **Dinh T.V., Bienvenut W.V., Linster E., Feldman-Salit A., Jung V.A., Meinnel T., Hell R., Giglione C., Wirtz M.** (2015) Molecular identification and functional characterization of the first Nα-acetyltransferase in plastids by global acetylome profiling. *Proteomics*, **15**, 2426-2435.
66. **Ditzel M., Wilson R., Tenev T., Zachariou A., Paul A., Deas E., Meier P.** (2003) Degradation of DIAP1 by the N-end rule pathway is essential for regulating apoptosis. *Nature Cell Biology*, **5**, 467-473.
67. **Domitrovic T., Fausto A.K., Silva T.F., Romanel E., Vaslin M.F.S.** (2017) Plant arginyltransferases (ATEs). *Genetics and Molecular Biology*, **40**, 253-260.
68. **Dörrich A.K., Wilde A.** (2015) Spot assays for viability analysis of *Cyanobacteria*. *Bio-protocol*, **5**, e1574.
69. **Dougan D.A., Micevski D., Truscott K.N.** (2012) The N-end rule pathway: from recognition by N-recognins, to destruction by AAA + proteases. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1823**, 83-91.
70. **Dougan D.A., Truscott K.N., Zeth K.** (2010) The bacterial N-end rule pathway: expect the unexpected. *Molecular Microbiology*, **76**, 545-558.
71. **Drath M., Baier K., Forchhammer K.** (2009) An alternative methionine aminopeptidase, MAP-A, is required for nitrogen starvation and high-light acclimation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology*, **155**, 1427-1439.
72. **Drinkwater N., Sivaraman K.K., Bamert R.S., Rut W., Mohamed K., Vinh N.B., Scammells P.J., Drag M., McGowan S.** (2016) Structure and substrate fingerprint of aminopeptidase P from *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Journal*, **473**, 3189-3204.
73. **Dühring U., Irrgang K.D., Lünser K., Kehr J., Wilde A.** (2006) Analysis of photosynthetic complexes from a cyanobacterial *ycf37* mutant. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1757**, 3-11.

74. **Düppre E., Rupprecht E., Schneider D.** (2011) Specific and promiscuous functions of multiple DnaJ proteins in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology*, **157**, 1269-1278.

75. **Elmorjani K., Thomas J.-C., Sebban P.** (1986) Phycobilisomes of wild type and pigment mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Archives of Microbiology*, **146**, 186-191.

76. **Eriksson M., Clarke A.** (1996) The heat shock protein ClpB mediates the development of thermotolerance in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Journal of Bacteriology*, **178**, 4839-4846.

77. **Eriksson M.J., Schelin J., Miskiewicz E., Clarke A.K.** (2001). Novel form of ClpB/HSP100 protein in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Journal of Bacteriology*, **183**, 7392-7396.

78. **Erzberger J.P., Berger J.M.** (2006) Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **35**, 93-114.

79. **Esteves-Ferreira A.A.2, Inaba M., Obata T., Fort A., Fleming G.T.A., Araújo W.L., Fernie A.R., Sulpice R.** (2017) A novel mechanism, linked to cell density, largely controls cell division in *Synechocystis*. *Plant Physiology*, **174**, 2166-2182.

80. **Fisher M.L., Allen R., Luo Y., Curtiss R. 3rd.** (2013) Export of extracellular polysaccharides modulates adherence of the Cyanobacterium *Synechocystis*. *PLOS ONE*, **8**, e74514.

81. **Flick K., Kaiser P.** (2012) Protein degradation and the stress response. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **23**, 515-522.

82. **Foster J.S., Havemann S.A., Singh A.K., Sherman L.A.** (2009) Role of *mrgA* in peroxide and light stress in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiology Letters*, **293**, 298-304.

83. **Frommeyer M., Wiefel L., Steinbüchel A.** (2016) Features of the biotechnologically relevant polyamide family «cyanophycins» and their

biosynthesis in prokaryotes and eukaryotes. *Critical Reviews in Biotechnology*, **36**, 153-164.

84. **Frottin F., Martinez A., Peynot P., Mitra S., Holz R.C., Giglione C., Meinnel T.** (2006) The proteomics of N-terminal methionine cleavage. *Molecular & Cellular Proteomics*, **5**, 2336-2349.
85. **Fuhrmann E., Gathmann S., Rupprecht E., Golecki J., Schneider D.** (2009) Thylakoid membrane reduction affects the photosystem stoichiometry in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiology*, **149**, 735-744.
86. **Fujinaga M., Cherney M.M., Oyama H., Oda K., Jame N.G.M.** (2004) The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. *PNAS*, **101**, 3364-3369.
87. **Fulda S., Huang F., Nilsson F., Hagemann M., Norling B.** (2000) Proteomics of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. Identification of periplasmic proteins in cells grown at low and high salt concentrations. *European Journal of Biochemistry*, **267**, 5900-5907.
88. **Gannt E., Conti S.F.** (1996) Phycobiliprotein localization in algae. *Brookhaven Symposium in Biology*, **19**, 393-405.
89. **Gantt E.** (1994) Supramolecular membrane organization. In: *The molecular biology of cyanobacteria*, Bryant D.A. (ed.) Dordrecht: Kluwer, pp. 119-138.
90. **Gantt E., Lipschultz C.A., Zilinskas B.** (1976) Further evidence for a phycobilisome model from selective dissociation, fluorescence emission, immunoprecipitation, and electron microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, **430**, 375-388.
91. **Gao K., Ai H.** (2004) Relatioship of growth and photosynthesis with colony size in an edible cyanobacterium. *Plant Physiology*, **40**, 523-526.
92. **Garcia-Carreno F.L., Navarrete del Toro M.A.** (1997) Classification of proteases without tears. *Biochemical Education*, **25**, 161-167.
93. **Garzon M., Eifler K., Faust A., Scheel H., Hofmann K., Koncz C., Yephremov A., Bachmair A.** (2007) *PRT6/At5g02310* encodes an *Arabidopsis*

ubiquitin ligase of the N-end rule pathway with arginine specificity and is not the *CER3* locus. *FEBS Letters*, **581**, 3189-3196.

94. **Gibbs D.J.** (2015) Emerging functions for N-terminal protein acetylation in plants. *Trends in Plant Science*, **20**, 599-601.
95. **Gibbs D.J., Bacardit J., Bachmair A., Holdsworth M.J.** (2014) The eukaryotic N-end rule pathway: conserved mechanisms and diverse functions. *Trends in Cell Biology*, **24**, 603-611.
96. **Gibbs D.J., Conde J.V., Berckhan S., Prasad G., Mendiondo G.M., Holdsworth M.J.** (2015) Group VII Ethylene Response Factors coordinate oxygen and nitric oxide signal transduction and stress responses in plants. *Plant Physiology*, **169**, 23-31.
97. **Gibbs D.J., Lee S.C., Isa N.M., Gramuglia S., Fukao T., Bassel G.W., Correia C.S., Corbineau F., Theodoulou F.L., Bailey-Serres J., Holdsworth M.J.** (2011) Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. *Nature*, **479**, 415-418.
98. **Giglione C., Boularot A., Meinnel T.** (2004) Protein N-terminal methionine excision. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **61**,1455-1474.
99. **Giglione C., Meinnel T.** (2001) Organellar peptide deformylases: universality of the N-terminal methionine cleavage mechanism. *Trends in Plant Science*, **6**, 566-572.
100. **Giglione C., Serero A., Pierre M., Boisson B., Meinnel T.** (2000) Identification of eukaryotic peptide deformylases reveals universality of N-terminal protein processing mechanisms. *The EMBO Journal*, **19**, 5916-5929.
101. **Giglione C., Vallon O., Meinnel T.** (2003) Control of protein lifespan by N-terminal methionine excision. *The EMBO Journal*, **22**, 13-23.
102. **Gill S. C., von Hippel P.H.** (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*, **182**, 319-326.
103. **Glauser M., Bryant D.A., Frank G., Wehrli E., Rusconi S.S., Sidler W., Zuber H.** (1992) Phycobilisome structure in the cyanobacteria *Mastigocladus*

laminosus and *Anabaena* sp. PCC 7120. *European Journal of Biochemistry*, **205**, 907-915.

104. **Glazer A.N.** (1989) Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *The Journal of Biological Chemistry*, **264**, 1-4.
105. **Gombos Z., Wada H., Murata N.** (1994) The recovery of photosynthesis from low-temperature photoinhibition is accelerated by the unsaturation of membrane lipids: a mechanism of chilling tolerance. *PNAS*, **91**, 8787-8791.
106. **Gonda D.K., Bachmair A., Wunning I., Tobias J.W., Lane W.S., Varshavsky A.** (1989) Universality and structure of the N-end rule. *The Journal of Biological Chemistry*, **264**, 16700-16712.
107. **Gonzalez-Esquer C.R., Vermaas W.F.** (2013) ClpB1 overproduction in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 increases tolerance to rapid heat shock. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**, 6220-6227.
108. **Gorelova O.A., Baulina O.I., Rasmussen U., Koksharova O.A.** (2013) The pleiotropic effects of *ftn2* and *ftn6* mutations in cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942: an ultrastructural study. *Protoplasma*, **250**, 931-942.
109. **Graciet E., Francesca M., Wellmer F.** (2010) Structure and evolutionary conservation of the plant N-end rule pathway. *The Plant Journal*, **61**, 741-751.
110. **Graciet E., Hu R.G., Piatkov K., Rhee J.H., Schwarz E.M., Varshavsky A.** (2006) Aminoacyl-transferases and the N-end rule pathway of prokaryotic/eukaryotic specificity in a human pathogen. *PNAS*, **103**, 3078-83.
111. **Graciet E., Mesiti F., Wellmer F.** (2009a) Structure and evolutionary conservation of the plant N-end rule pathway. *The Plant Journal*, **61**, 741-751.
112. **Graciet E., Walter F., Maoileidigh D.O., Pollmann S., Meyerowitz E.M., Varshavsky A., Wellmer F.** (2009b) The N-end rule pathway controls multiple functions during *Arabidopsis* shoot and leaf development. *PNAS*, **106**, 13618-13623.
113. **Graciet E., Wellmer F.** (2010) The plant N-end rule pathway: structure and functions. *Trends in Plant Science*, **15**, 447-453.

114. **Graham S.C., Bond C.S., Freeman H.C., Guss J.M.** (2005) Structural and functional implications of metal ion selection in aminopeptidase P, a metalloprotease with a dinuclear metal center. *Biochemistry*, **44**, 13820-13836.

115. **Graham S.C., Guss J.M.** (2008) Complexes of mutants of *Escherichia coli* aminopeptidase P and the tripeptide substrate ValProLeu. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **469**, 200-208.

116. **Graham S.C., Lee M., Freeman H.C., Guss J.M.** (2003) An orthorhombic form of *Escherichia coli* aminopeptidase P at 2.4 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D*, **59**, 897-902.

117. **Graham S.C., Lilley P.E., Lee M., Schaeffer P.M., Kralicek A.V., Dixon N.E., Guss J.M.** (2006) Kinetic and crystallographic analysis of mutant *Escherichia coli* aminopeptidase P: insights into substrate recognition and the mechanism of catalysis. *Biochemistry*, **45**, 964-975.

118. **Graham S.C., Maher M.J., Simmons W.H., Freeman H.C., Guss J.M.** (2004) Structure of *Escherichia coli* aminopeptidase P in complex with the inhibitor apstatin. *Acta Crystallographica Section D*, **60**, 1770-1779.

119. **Gregersen N., Bross P., Vang S., Christensen J.H.** (2006) Protein misfolding and human disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, **7**, 103-124.

120. **Grigorieva G., Shestakov S.** (1982) Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiology Letters*, **13**, 367-370.

121. **Grossman A.R., Schaefer M.R., Chiang G.G., Collier J.L.** (1993) The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiological Reviews*, **57**, 725-749.

122. **Hartley B.S.** (1960) Proteolytic enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, **29**, 45-72.

123. **Haslberger T., Weibezahn J., Zahn R., Lee S., Tsai F.T., Bukau B., Mogk A.** (2007) M domains couple the ClpB threading motor with the DnaK chaperone activity. *Molecular Cell*, **25**, 247-260.

124. **Hauser F., Strassner J., Schaller A.** (2001) Cloning, expression, and characterization of tomato (*Lycopersicon esculentum*) aminopeptidase P. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 31732-31737.
125. **Heinz S., Rast A., Shao L., Gutu A., Gügel I.L., Heyno E., Labs M., Rengstl B., Viola S., Nowaczyk M.M., Leister D., Nickelsen J.** (2016) Thylakoid membrane architecture in *Synechocystis* depends on CurT, a homolog of the granal CURVATURE THYLAKOID1 proteins. *Plant Cell*, **28**, 2238-2260.
126. **Herdman M., Castenholz R.W., Iteman I., Rippka R.** (2013) Form – *Synechocystis*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00423
127. **Hoiczyk E., Hansel A.** (2000) Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *Journal of Bacteriology*, **182**, 1191-1199.
128. **Holman T.J., Jones P.D., Russell L., Medhurst A., Tomas S., Talloji P., Marquez J., Schmuths H., Tung S.A., Taylor I., Footitt S., Bachmair A., Theodoulou F.L., Holdsworth M.J.** (2009) The N-end rule pathway promotes seed germination and establishment through removal of ABA sensitivity in *Arabidopsis*. *PNAS*, **106**, 4549-4554.
129. **Hooper N.M., Hryszko J., Turner A.J.** (1990) Purification and characterization of pig kidney aminopeptidase P. A glycosyl-phosphatidylinositol-anchored ectoenzyme. *Biochemical Journal*, **267**, 509-515.
130. **Horwich A.L., Weber-Ban E.U., Finley D.** (1999) Chaperone rings in protein folding and degradation. *PNAS*, **96**, 11033-11040.
131. **Hu R.G., Sheng J., Qi X., Xu Z., Takahashi T.T., Varshavsky A.** (2005) The N-end rule pathway as a nitric oxide sensor controlling the levels of multiple regulators. *Nature*, **437**, 981-986.
132. **Huang F., Hedman E., Funk C., Kieselbach T., Schroder W.P., Norling B.** (2004) Isolation of outer membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its proteomic characterization. *Molecular & Cellular Proteomics*, **3**, 586-595.

133. **Huang F., Parmrydd I., Nilsson F., Persson A.L., Pakrasi H.B., Andersson B., Norling B.** (2003) Proteomics of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 identification of plasma membrane proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*, **1**, 956-966.

134. **Huang S., Nelson C.J., Li L., Taylor N.L., Ströher E., Peteriet J., Millar A.H.** (2015) Intermediate cleavage peptidase55 modifies enzyme amino termini and alters protein stability in arabidopsis mitochondria. *Plant Physiology*, **168**, 415-427.

135. **Huang S., Taylor N.L., Whelan J., Millar A.H.** (2009) Refining the definition of plant mitochondrial presequences through analysis of sorting signals, N-terminal modifications, and cleavage motifs. *Plant Physiology*, **150**, 1272-1285.

136. **Huesgen P.F., Miranda H., Lam X.T., Perthold M., Schuhmann H., Adamska I., Funk C.** (2011) Recombinant Deg/HtrA proteases from *Synechocystis* sp. PCC 6803 differ in substrate specificity, biochemical characteristics and mechanism. *Biochemical Journal*, **435**, 733-742.

137. **Hwang C.S., Shemorry A., Varshavsky A.** (2009) Two proteolytic pathways regulate DNA repair by cotargeting the Mgt1 alkylguanine transferase. *PNAS*, **106**, 2142-2147.

138. **Ichetovkin E.I., Abramochkin G., Shrader T.E.** (1997) Substrate recognition by the leucyl/phenylalanyl-tRNAa-protein transferase. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 33009-33014.

139. **Imai K., Kitayama Y., Kondo T.** (2013) Elucidation of the role of Clp protease components in circadian rhythm by genetic deletion and overexpression in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, **195**, 4517-4526.

140. **Ivleva N.B., Sidoruk K.V., Pakrasi H.B., Shestakov S.V.** (2002) Investigation of the functional role of Ctp proteins in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology*, **71**, 509-513.

141. **Iyer S., La-Borde P.J., Payne K.A., Parsons M.R., Turner A.J., Isaac R.E., Acharya K.R.** (2015) Crystal structure of X-prolyl aminopeptidase from

Caenorhabditis elegans: a cytosolic enzyme with a di-nuclear active site. *FEBS Open Bio*, **2**, 292-302.

142. **Jaba I.M., Zhuang Z.W., Li N., Jiang Y., Martin K.A., Sinusas A.J., Papademetris X., Simons M., Sessa W.C., Young L.H., Tirziu D.** (2013) NO triggers RGS4 degradation to coordinate angiogenesis and cardiomyocyte growth. *Journal of Clinical Investigation*, **123**, 1718-1731.
143. **Jankiewicz U., Bielawski W.** (2003) The properties and functions of bacterial aminopeptidases. *Acta microbiologica Polonica*, **52**, 217-231.
144. **Jansén T., Kanervo E., Aro E.-M., Mäenpää P.** (2002) Localisation and processing of the precursor form of photosystem II protein D1 in *Synechocystis* 6803. *Journal of Plant Physiology*, **159**, 1205-1211.
145. **Jansén T., Kidron H., Soitamo A., Salminen T., Mäenpää P.** (2003) Transcriptional regulation and structural modelling of the *Synechocystis* sp. PCC 6803 carboxyl-terminal endoprotease family. *FEMS Microbiology Letters*, **228**, 121-128.
146. **Järvi S., Suorsa M., Paakkarinen V., Aro E.M.** (2011) Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: novel super- and mega-complexes. *Biochemical Journal*, **439**, 207-214.
147. **Johnson E.S., Bartel B., Seufert W., Varshavsky A.** (1992) Ubiquitin as a degradation signal. *The EMBO Journal*, **11**, 497-505.
148. **Johnson E.S., Ma P.C., Ota I.M., Varshavsky A.** (1995) A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 17442-17456.
149. **Jordan A., Chandler J., MacCready J.S., Huang J., Osteryoung K.W., Ducat D.C.** (2017) Engineering cyanobacterial cell morphology for enhanced recovery and processing of biomass. *Applied and Environmental Microbiology*, **83**, e00053-17.
150. **Kamata T., Hiramoto H., Morita N., Shen J.R., Mann N.H., Yamamoto Y.** (2005) Quality control of Photosystem II: An FtsH protease plays an essential

role in the turnover of the reaction center D1 protein in *Synechocystis* PCC 6803 under heat stress as well as light stress conditions. *Photochemical & Photobiological Sciences*, **4**, 983-990.

151. **Kaneko T., Nakamura Y., Sasamoto S., Watanabe A., Kohara M., Matsumoto M., Shimpo S., Yamada M., Tabata S.** (2003) Structural analysis of four large plasmids harboring in a unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Research*, **10**, 221-228.
152. **Kaneko T., Sato S., Kotani H., Tanaka A., Asamizu E., Nakamura Y., Miyajima N., Hirosawa M., Sugiura M., Sasamoto S., Kimura T., Hosouchi T., Matsuno A., Muraki A., Nakazaki N., Naruo K., Okumura S., Shimpo S., Takeuchi C., Wada T., Watanabe A., Yamada M., Yasuda M., Tabata S.** (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Research*, **3**, 109-136.
153. **Kaneko T., Tanaka A., Sato S., Kotani H., Sazuka T., Miyajima N., Sugiura M., Tabata S.** (1995) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. I. Sequence features in the 1 Mb region from map positions 64% to 92% of the genome. *DNA Research*, **2**, 153-166.
154. **Karradt A., Sobanski J., Mattow J., Lockau W., Baier K.** (2008) NblA, a key protein of phycobilisome degradation, interacts with ClpC, a Hsp100 chaperone partner of a cyanobacterial Clp protease. *The Journal of Biological Chemistry*, **283**, 32394-32403.
155. **Khaket T.P., Dhanda S., Jodha D., Singh J.** (2015) Purification and biochemical characterization of dipeptidyl peptidase-II (DPP7) homologue from germinated *Vigna radiata* seeds. *Bioorganic Chemistry*, **63**, 132-141.
156. **Kieselbach T., Funk C.** (2003) The family of Deg/HtrA proteases: from *Escherichia coli* to *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, **119**, 337-346.

157. **Kim H.W., Vannela R., Zhou C., Rittmann B.E.** (2011) Nutrient acquisition and limitation for the photoautotrophic growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a renewable biomass source. *Biotechnology and Bioengineering*, **108**, 277-285.

158. **Kirst H., Formighieri C., Melis A.** (2014) Maximizing photosynthetic efficiency and culture productivity in cyanobacteria upon minimizing the phycobilisome light-harvesting antenna size. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1837**,1653-1664.

159. **Kitazono A., Kitano A., Kabashima T., Ito K., Yoshimoto T.** (1996) Prolyl aminopeptidaseis also present in *Enterobacteriaceae*: cloning and sequencing of the *Hafnia alvei* enzyme-gene and characterization of the expressed enzyme. *The Journal of Biochemistry*, **119**, 468-474.

160. **Kitazono A., Kitano A., Tsuru D., Yoshimoto T.** (1994) Isolation and characterization of the prolyl aminopeptidase gene (pap) from *Aeromonas sobria*: comparison with the *Bacillus coagulans* enzyme. *The Journal of Biochemistry*, **116**, 818-825.

161. **Kiyota H., Hirai M.Y., Ikeuchi M.** (2014) NblA1/A2-dependent homeostasis of amino acid pools during nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Metabolites*, **4**, 517-531.

162. **Klinkert B., Ossenbühl F., Sikorski M., Berry S., Eichacker L., Nickelsen J.** (2004) PratA, a periplasmic tetratricopeptide repeat protein involved in biogenesis of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 44639-44644.

163. **Koksharova O.A., Wolk C.P.** (2002) A novel gene that bears a DNAJ motif influences cyanobacterial cell division. *Journal of Bacteriology*, **184**, 5524-5528.

164. **Komenda J., Barker M., Kuvikova S., de Vries R., Mullineaux C.W., Tichy M., Nixon P.J.** (2006) The FtsH protease *slr0228* is important for quality control of Photosystem II in the thylakoid membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 1145-1151.

165. **Komenda J., Knoppova J., Krynicka V., Nixon P.J., Tichy M.** (2010) Role of FtsH2 in the repair of Photosystem II in mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 with impaired assembly or stability of the $CaMn_4$ cluster. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1797**, 566-575.

166. **Komenda J., Nickelsen J., Tichý M., Prásil O., Eichacker L.A., Nixon P.J.** (2008) The cyanobacterial homologue of HCF136/YCF48 is a component of an early photosystem II assembly complex and is important for both the efficient assembly and repair of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *The Journal of Biological Chemistry*, **283**, 22390-22399.

167. **Kopf M., Klähn S., Scholz I., Matthiessen J.K., Hess W.R., Voß B.** (2014) Comparative analysis of the primary transcriptome of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Research*, **21**, 527-539.

168. **Kortemme T., Kim D.E., Baker D.** (2004) Computational alanine scanning of protein-protein interfaces. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, **219**, pl2.

169. **Krissinel E., Henrick K.** (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of Molecular Biology*, **372**, 774-797.

170. **Kroemer G., Mariño G., Levine B.** (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Molecular Cell*, **40**, 280-293.

171. **Krynická V., Tichy M., Krafl J., Yu J., Kaňa R., Boehm M., Nixon P.J., Komenda J.** (2014) Two essential FtsH proteases control the level of the Fur repressor during iron deficiency in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Molecular Microbiology*, **94**, 609-624.

172. **Kyte J., Doolittle R.F.** (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, **157**, 105-132.

173. **Lacey R.F., Binder B.M.** (2016) Ethylene regulates the physiology of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 via an ethylene receptor. *Plant Physiology*, **171**, 2798-2809.

174. **Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

175. **Lam X.T., Aigner H., Timmerman E., Gevaert K., Funk C.** (2015) Proteomic approaches to identify substrates of the three Deg/HtrA proteases of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemical Journal*, **468**, 373-384.

176. **Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M.** (1993) PROCHECK – a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, **26**, 283-291.

177. **Laurent V., Brooks D.R., Coates D., Isaac R.E.** (2001) Functional expression and characterization of the cytoplasmic aminopeptidase P of *Caenorhabditis elegans*. *European Journal of Biochemistry*, **268**, 5430-5438.

178. **Lea-Smith D.J., Bombelli P., Dennis J.S., Scott S.A., Smith A.G., Howe C.J.** (2014) Phycobilisome-deficient strains of *Synechocystis* sp. PCC 6803 have reduced size and require carbon-limiting conditions to exhibit enhanced productivity. *Plant Physiology*, **165**, 705-714.

179. **Lea-Smith D.J., Ortiz-Suarez M.L., Lenn T., Nürnberg D.J., Baers L.L., Davey M.P., Parolini L., Huber R.G., Cotton C.A., Mastroianni G., Bombelli P., Ungerer P., Stevens T.J., Smith A.G., Bond P.J., Mullineaux C.W., Howe C.J.** (2016) Hydrocarbons are essential for optimal cell size, division, and growth of cyanobacteria. *Plant Physiology*, **172**, 1928-1940.

180. **Lee H.S., Kim Y.J., Bae S.S., Jeon J.H., Lim J.K., Jeong B.C., Kang S.G., Lee J.H.** (2006) Cloning, expression, and characterization of aminopeptidase P from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. strain NA1. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 1886-1890.

181. **Lee M.J., Tasaki T., Moroi K., An J.Y., Kimura S., Davydov I.V., Kwon Y.T.** (2005) RGS4 and RGS5 are *in vivo* substrates of the N-end rule pathway. *PNAS*, **102**, 15030-15035.

182. **Lei H., Chen G., Wang Y., Ding Q., Wei D.** (2014) *Sll0528*, a site-2-protease, is critically involved in cold, salt and hyperosmotic stress acclimation of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *International Journal of Molecular Sciences*, **15**, 22678-22693.

183. **Leibowitz M.J., Soffer R.L.** (1971) Enzymatic modification of proteins. VII. Substrate specificity of leucyl, phenylalanyl-transfer ribonucleic acid-protein transferase. *The Journal of Biological Chemistry*, **246**, 4431-4438.

184. **Li H., Sherman L.A.** (2002) Characterization of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and deltanbl mutants under nitrogen-deficient conditions. *Archives of Microbiology*, **178**, 256-266.

185. **Li N., Wu J.M., Zhang L.F., Zhang Y.Z., Feng H.** (2010) Characterization of an unique proline iminopeptidase from white-rot basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochimie*, **92**, 779-788.

186. **Li X., Lou Z., Li X., Zhou W., Ma M., Cao Y., Geng Y., Bartlam M., Zhang X.C., Rao Z.** (2008) Structure of human cytosolic X-prolyl aminopeptidase: adouble Mn(II)-dependent dimeric enzyme with a novel three-domain subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, **283**, 22858-22866.

187. **Liberton M., Berg R.H., Heuser J., Roth R., PakrasiH.B.** (2006) Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Protoplasma*, **227**, 129-138.

188. **Liberton M., Saha R., Jacobs J.M., Nguyen A.Y., Gritsenko M.A., Smith R.D., Koppenaal D.W., Pakrasi H.B.** (2016) Global proteomic analysis reveals an exclusive role of thylakoid membranes in bioenergetics of a model cyanobacterium. *Molecular & Cellular Proteomics*, **15**, 2021-2032.

189. **Licausi F., Kosmacz M., Weits D.A., Giuntoli B., Giorgi F.M., Voesenek L.A., Perata P., van Dongen J.T.** (2011) Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature*, **479**, 419-422.

190. **Lichtenthaler H.K.** (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, **148**, 350-382.

191. **Lin L.-N., Brandts J.F.** (1979) Role of *cis-trans* isomerism of the peptide bond in protease specificity. Kinetic studies on small proline-containing peptides and on polyproline. *Biochemistry*, **18**, 5037-5042.

192. **Lipinska B., Sharma S., Georgopoulos C.** (1988) Sequence analysis and regulation of the htrA gene of *Escherichia coli*: a σ32-independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Research*, **16**, 10053-10067.

193. **Lloyd G.S., Hryszko J., Hooper N.M., Turner A.J.** (1996) Inhibition and metal ion activation of pig kidney aminopeptidase P. Dependence on nature of substrate. *Biochemical Pharmacology*, **52**, 229-236.

194. **Lowther W.T., Matthews B.W.** (2002) Metalloaminopeptidases: common functional themes in disparate structural surroundings. *Chemical Reviews*, **102**, 4581-4608.

195. **Luque I., Ochoa De Alda J.A., Richaud C., Zabulon G., Thomas J.C., Houmard J.** (2003) The NblAI protein from the filamentous cyanobacterium *Tolypothrix* PCC 7601: regulation of its expression and interactions with phycobilisome components. *Molecular Microbiology*, **50**, 1043-1054.

196. **Maes M.B., Scharpé S., De Meester I.** (2007) Dipeptidyl peptidase II (DPPII). *Clinica Chimica Acta*, 380, 31-49.

197. **Maier J.A., Martinez C., Kasavajhala K., Wickstrom L., Hauser K. E., Simmerling C.** (2015) ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *Journal of Chemical Theory and Computation*, **11**, 3696-3713.

198. **Mann N.H., Novac N., Mullineaux C.W., Newman J., Bailey S., Robinson C.** (2000) Involvement of an FtsH homologue in the assembly of functional photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Letters*, **479**, 72-77.

199. **Marbouty M., Mazouni K., Saguez C., Cassier-Chauvat C., Chauvat F.** (2009a) Characterization of the *Synechocystis* strain PCC 6803 penicillin-binding

proteins and cytokinetic proteins FtsQ and FtsW and their network of interactions with ZipN. *Journal of Bacteriology*, **191**, 5123-5133.

200. **Marbouty M., Saguez C., Cassier-Chauvat C., Chauvat F.** (2009b) ZipN, an FtsA-like orchestrator of divisome assembly in the model cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Molecular Microbiology*, **74**, 409-420.
201. **Marinova M., Dolashki A., Altenberend F., Stevanovic S., Voelter W., Tchorbanov B.** (2008) Characterization of an aminopeptidase and a proline iminopeptidase from cabbage leaves. *Zeitschrift fur Naturforschung C*, **63**, 105-112.
202. **Martin W., Herrmann R.G.** (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiology*, **118**, 9-17.
203. **Martin W., Rujan T., Richly E., Hansen A., Cornelsen S., Lins T., Leister D., Stoebe B., Hasegawa M., Penny D.** (2002) Evolutionary analysis of arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *PNAS*, **99**, 12246-12251.
204. **Martin W.F., Garg S., Zimorski V.** (2015) Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **370**, 20140330.
205. **Marx A., David L., Adir N.** (2014) Piecing Together the Phycobilisome. In: *The Structural Basis of Biological Energy Generation, Advances in Photosynthesis and Respiration 39*, Hohmann-Marriott M.F. (ed.), Dordrecht: Springer Netherlands, 59-76.
206. **Mary I., Tu C.J., Grossman A., Vaulot D.** (2004) Effects of high light on transcripts of stress-associated genes for the cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Prochlorococcus* MED4 and MIT9313. *Microbiology*, **150**, 1271-1281.
207. **Matsui M., Fowler J.H., Walling L.L.** (2006) Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *The Journal of Biological Chemistry*, **387**, 1535-1544.

208. **Maupin-Furlow J.A.** (2014) Prokaryotic ubiquitin-like protein modification. *Annual Review of Microbiology*, **68**, 155-175.

209. **Mayer M.P., Bukau B.** (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **62**, 670-684.

210. **Mazouni K., Domain F., Cassier-Chauvat C., Chauvat F.** (2004) Molecular analysis of the key cytokinetic components of cyanobacteria: FtsZ, ZipN and MinCDE. *Molecular Microbiology*, **52**, 1145-1158.

211. **McDonald A.G., Tipton K.F.** (2014) Fifty-five years of enzyme classification: advances and difficulties. *The FEBS Journal*, **281**, 583-592.

212. **Middepogu A., Murthy S.D.S, Prasanna R.B.** (2012) Structural organization and functions of phycobiliproteins in cyanobacteria. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, **2**, 9-17.

213. **Miranda H., Cheregi O., Netotea S., Hvidsten T.R., Moritz T., Funk C.** (2013) Coexpression analysis, proteomic and metabolomic study on the impact of a Deg/HtrA protease triple mutant in *Synechocystis* sp. PCC 6803 exposed to temperature and high light stress. *Journal of Proteomics*, **78**, 294-311.

214. **Mironov K.S., Los D.A.** (2015) RNA isolation from *Synechocystis*. *Bio-protocol*, **5**, e1428.

215. **Mogk A., Schmidt R., Bukau B. (2007)** The N-end rule pathway for regulated proteolysis: prokaryotic and eukaryotic strategies. *Trends in Cell Biology*, **17**, 165-172.

216. **Molinaro G., Carmona A.K., Juliano M.A., Juliano L., Malitskaya E., Yessine M.A., Chagnon M., Lepage Y., Simmons W.H., Boileau G., Adam A.** (2005) Human recombinant membrane-bound aminopeptidase P: production of a soluble form and characterization using novel, internally quenched fluorescent substrates. *Biochemical Journal*, **385**, 389-397.

217. **Montgomery B.L.** (2015) Light-dependent governance of cell shape dimensions in cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology*, **26**, 1-8.

218. **Morris J., Crawford T., Jeffs A., Stockwell P., Eaton-Rye J., Summerfield T.** (2014) Whole genome re-sequencing of two «wild-type» strains of the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *New Zealand Journal of Botany*, **52**, 36-47.

219. **Myouga F., Motohashi R., Kuromori T., Nagata N., Shinozaki K.** (2006) An *Arabidopsis* chloroplast-targeted Hsp101 homologue, APG6, has an essential role in chloroplast development as well as heat-stress response. *The Plant Journal*, **48**, 249-260.

220. **Naamati A., Regev-Rudzki N., Galperin S., Lill R., Pines O.** (2009) Dual targeting of Nfs1 and discovery of its novel processing enzyme, Icp55. *The Journal of Biological Chemistry*, **284**, 30200-30208.

221. **Nandan A.S., Nampoothiri K.M.** (2014) Unveiling aminopepidase P from Streptomyces lavendulae: Molecular cloning, expression and biochemical characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, **55**, 7-14.

222. **Naver H., Boudreau E., Rochaix J.D.** (2001) Functional studies of Ycf3: its role in assembly of photosystem I and interactions with some of its subunits. *Plant Cell*, **13**, 2731-2745.

223. **Nickelsen J., Rengstl B.** (2013) Photosystem II assembly: from cyanobacteria to plants. *Annual Review of Plant Biology*, **64**, 609-635.

224. **Nilsson F., Simpson D.J., Jansson C., Andersson B.** (1992) Ultrastructural and biochemical characterization of a *Synechocystis* 6803 mutant with inactivated *psbA* genes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **295**, 340-347.

225. **Ninnis R.L., Spall S.K., Talbo G.H., Truscott K.N., Dougan D.A.** (2009) Modification of PATase by L/F-transferase generates a ClpS-dependent N-end rule substrate in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, **28**, 1732-1744.

226. **Nishimura K., Kato Y., Sakamoto W.** (2016) Chloroplast proteases: updates on proteolysis within and across suborganellar compartments. *Plant Physiology*, **171**, 2280-2293.

227. **O'Farrell P.H.** (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, **250**, 4007-4021.

228. **Olive J., Ajlani G., Astier C., Recouvreur M., Vernotte C.** (1997) Ultrastructure and light adaptation of phycobilisome mutants of *Synechocystis* PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1319**, 275-282.

229. **Osipiuk J., Maltseva N., Shatsman S., Anderson W.F., Joachimiak A.** (2014) Proline aminopeptidase P II from *Yersinia pestis*. DOI: 10.2210/pdb4PV4/pdb

230. **O'Toole J.F., Liu Y., Davis E.E., Westlake C.J., Attanasio M., Otto E.A., Seelow D., Nurnberg G., Becker C., Nuutinen M., Kärppä M., Ignatius J., Uusimaa J., Pakanen S., Jaakkola E., van den Heuvel L.P., Fehrenbach H., Wiggins R., Goyal M., Zhou W., Wolf M.T., Wise E., Helou J., Allen S.J., Murga-Zamalloa C.A., Ashraf S., Chaki M., Heeringa S., Chernin G., Hoskins B.E., Chaib H., Gleeson J., Kusakabe T., Suzuki T., Isaac R.E., Quarmby L.M., Tennant B., Fujioka H., Tuominen H., Hassinen I., Lohi H., van Houten J.L., Rotig A., Sayer J.A., Rolinski B., Freisinger P., Madhavan S.M., Herzer M., Madignier F., Prokisch H., Nurnberg P., Jackson P.K., Khanna H., Katsanis N., Hildebrandt F.** (2010) Individuals with mutations in XPNPEP3, which encodes a mitochondrial protein, develop a nephronophthisis-like nephropathy. *Journal of Clinical Investigation*, **20**, 791-802.

231. **Ovando M.E.O., Isola M.C., Maldonado A.M., Franzoni L.** (2004) Purification and properties of iminopeptidase from peanut seeds. *Plant Science*, **166**,1143-1148.

232. **Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E.** (2004) UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, **25**, 1605-1612.

233. **Piatkov K.V., Vu T.T.M., Hwang C.-S., Varshavsky A.** (2015) Formyl-methionine as a degradation signal at the N-termini of bacterial proteins. *Microbial Cell*, **2**, 376-393.

234. **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. *Journal of Bacteriology*, **186**, 3991-3999.

235. **Porankiewicz J., Schelin J., Clarke A.K.** (1998) The ATP-dependent Clp protease is essential for acclimation to UV-B and low temperature in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Molecular Microbiology*, **29**, 275-283.

236. **Potuschak T., Stary S., Schlögelhofer P., Becker F., Nejinskaia V., Bachmair A.** (1998) PRT1 of *Arabidopsis thaliana* encodes a component of the plant N-end rule pathway. *PNAS*, **95**, 7904-7908.

237. **Qiao J., Wang J., Chen L., Tian X., Huang S., Ren X., Zhang W.** (2012) Quantitative iTRAQ LC-MS/MS proteomics reveals metabolic responses to biofuel ethanol in cyanobacterial *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Proteome Research*, **11**, 5286-5300.

238. **Rajaram H., Chaurasia A.K., Apte S.K.** (2014) Cyanobacterial heat-shock response: role and regulation of molecular chaperones. *Microbiology*, **160**, 647-658.

239. **Rast A., Rengstl B., Heinz S., Klingl A., Nickelsen J.** (2016) The role of Slr0151, a tetratricopeptide repeat protein from *Synechocystis* sp. PCC 6803, during Photosystem II assembly and repair. *Frontiers in Plant Science*, **7**, 1-12.

240. **Rawlings N.D., Barrett A.J.** (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*, **290**, 205-218.

241. **Rawlings N.D., Barrett A.J., Bateman A.** (2011) Asparagine peptide lyases a seventh catalytic type of proteolytic enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, **286**, 38321-38328.

242. **Reed S.I.** (2003) Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **4**, 855-864.

243. **Reynolds E.S.** (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, **17**, 208-212.

244. **Rial D.V., Ceccarelli E.A.** (2002) Removal of DnaK contamination during fusion protein purifications. *Protein Expression and Purification*, **25**, 503-507.

245. **Richaud C., Zabulon G., Joder A., Thomas J.C.** (2001) Nitrogen or sulfur starvation differentially affects phycobilisome degradation and expression of the nblA gene in Synechocystis strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, **183**, 2989-2994.

246. **Rippka R., Deruelles J., Waterbury J., Herdman M., Stanier R.** (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, **111**, 1-61.

247. **Roberts I.N., Lam X.T., Miranda H., Kieselbach T., Funk C.** (2012) Degradation of PsbO by the Deg protease HhoA is thioredoxin dependent. *PLOS ONE*, **7**, e45713.

248. **Roy A.S., Pal R.** (2015) Planktonic Cyanoprokaryota and Bacillariophyta of East Kolkata Wetlands ecosystem, a Ramsar Site of India with reference to diversity and taxonomic study. *Journal of Algal Biomass Utilization*, **6**, 47-59.

249. **Sacharz J., Bryan S.J., Yu J., Burroughs N.J., Spence E.M., Nixon P.J., Mullineaux C.W.** (2015) Sub-cellular location of FtsH proteases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 suggests localised PS II repair zones in the thylakoid membranes. *Molecular Microbiology*, **96**, 448-462.

250. **Sali A., Blundell T.L.** (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, 234, 779-815.

251. **Sandikci A., Gloge F., Martinez M., Mayer M.P., Wade R., Bukau B., Kramer G.** (2013) Dynamic enzyme docking to the ribosome coordinates N-terminal processing with polypeptide folding. *Nature Structural & Molecular Biology*, **20**, 843-850.

252. **Sandström S., Ivanov A.G., Park Y.I., Oquist G., Gustafsson P.** (2002) Iron stress responses in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Physiologia Plantarum*, **116**, 255-263.

253. **Sanz Y.** (2007) Aminopeptidase. In: *Industrial Enzymes*, Polaina J., MacCabe A.P. (eds.) Dordrecht: Springer, pp. 243-260.

254. **Sarsekeyeva F., Zayadan B.K., Usserbaeva A., Bedbenov V.S., Sinetova M.A., Los D.A.** (2015) Cyanofuels: Biofuels from cyanobacteria. Reality and perspectives. *Photosynthesis Research*, **125**, 329-340.

255. **Sarsekeyeva F.K., Usserbaeva A.A., Zayadan B.K., Mironov K.S., Sidorov R.A., Kozlova A. Yu., Kupriyanova E.V., Sinetova M.A., Los D.A.** (2014) Isolation and characterization of a new cyanobacterial strain with a unique fatty acid composition. *Advances in Microbiology*, **4**, 1033-1043.

256. **Satoh K., Yamamoto Y.** (2007) The carboxyl-terminal processing of precursor D1 protein of the photosystem II reaction center. *Photosynthesis Research*, **94**, 203-215.

257. **Schagger H., von Jagow G.** (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.*, **199**, 223-231.

258. **Schelin J., Lindmark F., Clarke A.K.** (2002) The *clpP* multigene family for the ATP-dependent Clp protease in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Microbiology*, **148**, 2255-2265.

259. **Schrader E.K., Harstad K.G., Matouschek A.** (2009) Targeting proteins for degradation. *Nature Chemical Biology*, **5**, 815-822.

260. **Seemüller E., Lupas A., Stock D., Lowe J., Huber R., Baumeister W.** (1995) Proteasome from thermoplasma acidophilum: a threonine protease. *Science*, **268**, 579-582.

261. **Sendersky E., Kozer N., Levi M., Moizik M., Garini Y., Shav-Tal Y., Schwarz R.** (2015) The proteolysis adaptor, NblA, is essential for degradation of the core pigment of the cyanobacterial light-harvesting complex. *The Plant Journal*, **83**, 845-852.

262. **Shen M.-Y., Sali A.** (2006) Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Science*, **15**, 2507-2524.

263. **Sheng M., Sala C.** (2001) PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annual Review of Neuroscience*, **24**, 1-29.

264. **Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.** (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, **68**, 850-858.

265. **Silva P., Thompson E., Bailey S., Kruse O., Mullineaux C.W., Robinson C., Mann N.H., Nixon P.J.** (2003) FtsH is involved in the early stages of repair of Photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell*, **15**, 2152-2164.

266. **Simpson D.J.** (2001) Proteolytic degradation of cereal prolamins – the problem with proline. *Plant Science*, **161**, 825-838.

267. **Singh R., Jamdar S.N., Goyal V.D., Kumar A., Ghosh B., Makde R.D.** (2017) Structure of the human aminopeptidase XPNPEP3 and comparison of its *in vitro* activity with Icp55 orthologs: insights into diverse cellular processes. *The Journal of Biological Chemistry*, **292**, 10035-10047.

268. **Singh S.P., Montgomery B.L.** (2011) Determining cell shape: adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and morphology. *Trends in Microbiology*, **19**, 278-285.

269. **Sokolenko A., Pojidaeva E., Zinchenko V., Panichkin V., Glaser V.M., Herrmann R.G., Shestakov S.V.** (2002) The gene complement for proteolysis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Current Genomics*, **41**, 291-310.

270. **Spector S., Flynn J.M., Tidor B., Baker T.A., Sauer R.T.** (2003) Expression of N-formylated proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, **3**, 317-322.

271. **Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G.** (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, **35**, 171-205.

272. **Stanne T.M., Pojidaeva E., Andersson F.I., Clarke A.K.** (2007) Distinctive types of ATP-dependent Clp proteases in cyanobacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, **282**, 14394-14402.

273. **Starheim K.K., Gevaert K., Arnesen T.** (2012) Protein N-terminal acetyltransferases: when the start matters. *Trends in Biochemical Sciences*, **37**, 152-161.

274. **Stary S., Yin X.J., Potuschak T., Schlögelhofer P., Nizhynska V., Bachmair A.** (2003) PRT1 of *Arabidopsis* is a ubiquitin protein ligase of the plant N-end rule pathway with specificity for aromatic amino-terminal residues. *Plant Physiology*, **133**, 1360-1366.

275. **Stein J.B., Grant A.R., Sauer T.R., Baker A.T.** (2016) Structural basis of an N-degron adaptor with more stringent specificity. *Structure*, **24**, 232-242.

276. **Stengel A., Gügel I.L., Hilger D, Rengstl B, Jung H, Nickelsen J.** (2012) Initial steps of photosystem II de novo assembly and preloading with manganese take place in biogenesis centers in *Synechocystis*. *Plant Cell*, **24**, 660-675.

277. **Stirnberg M., Fulda S., Huckauf J., Hagemann M., Krämer R., Marin K.** (2007) A membrane-bound FtsH protease is involved in osmoregulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803: The compatible solute synthesizing enzyme GgpS is one of the targets for proteolysis. *Molecular Microbiology*, **63**, 86-102.

278. **Stöckel-Maschek A., Stiebitz B., Koelsch R., Neubert K.** (2003) A continuous fluorimetric assay for aminopeptidase P detailed analysis of product inhibition. *Analytical Biochemistry*, **322**, 60-67.

279. **Stoitchkova K., Zsiros O., Javorfi T., Pali T., Andreeva A., Gombos Z., Garab G.** (2007) Heat- and light-induced reorganizations in the phycobilisome antenna of *Synechocystis* sp. PCC 6803. Thermo-optic effect. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1767**, 750-756.

280. **Sträter N., Lipscomb W.N.** (2004) Leucyl aminopeptidase (animal). In: *Proteolytic Enzymes, 2nd Edition*, Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F. (eds.) The San Diego: Elsevier/Academic Press., pp. 896-899.

281. **Strauch K.L., Beckwith J.** (1988) An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *PNAS*, **85**, 1576-1580.

282. **Sun X., Wang F., Cai H., Zhao C., Ji W., Zhu Y.** (2013) Functional characterization of an *Arabidopsis* prolyl aminopeptidase *AtPAP1* in response to salt and drought stresses. *Plant Cell*, **114**, 325-338.

283. **Suzuki I., Simon W.J., Slabas A.R.** (2006). The heat shock response of *Synechocystis* sp. PCC 6803 analysed by transcriptomics and proteomics. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 1573-1578.

284. **Szawłowska U., Grabowska A., Zdunek-Zastocka E., Bielawski W.** (2012) *TsPAP1* encodes a novel plant prolyl aminopeptidase whose expression is induced in response to suboptimal growth conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **419**, 104-109.

285. **Szawłowska U., Prus W., Bielawski W.** (2006) The molecular and biochemical characteristics of proline iminopeptidase from rye seedling (*Secale cereale* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, **28**, 517-524.

286. **Szawłowska U., Zdunek-Zastocka E., Bielawski W.** (2011) Biochemical characterisation of prolyl aminopeptidase from shoots of triticale seedlings and its activity changes in response to suboptimal growth conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, **49**, 1342-1349.

287. **Tasaki T., Sriram S.M., Park K.S., Kwon Y.T.** (2012) The N-end rule pathway. *Biochemical Journal*, **81**, 261-289.

288. **Teixeira P.F., Glaser E.** (2013) Processing peptidases in mitochondria and chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1833**, 360-370.

289. **Thiel T., Bramble J., Rogers S.** (1989) Optimum conditions for growth of cyanobacteria on solid media. *FEMS Microbiology Letters*, **52**, 27-31.

290. **Tian X., Chen L., Wang J., Qiao J., Zhang W.** (2013) Quantitative proteomics reveals dynamic responses of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to next-generation biofuel butanol. *Journal of Proteomics*, **78**, 326-345.

291. **Tippmann H.F.** (2004) Analysis for free: comparing programs for sequence

analysis. *Briefings in Bioinformatics*, **5**, 82-87.

292. **Tipton K., Boyce S.** (2000) History of the enzyme nomenclature system. *Bioinformatics*, **16**, 34-40.
293. **Tishinov K., Petrova S., Nedkov P.** (2010) Prolyl iminopeptidase from seeds of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, **32**, 211-213.
294. **Tishinov K., Stambolieva N., Petrova S., Galunsky B., Nedkov P.** (2009) Purification and characterization of the sunflower seed (*Helianthus annuus* L.) major aminopeptidase. *Acta Physiologiae Plantarum*, **31**, 199-205.
295. **Tobias J.W., Shrader T.E., Rocap G., Varshavsky A.** (1991) The N-end rule in bacteria. *Science*, **254**, 1374-1377.
296. **Trautmann D., Beyer P., Al-Babili S.** (2013) The ORF *slr0091* of *Synechocystis* sp. PCC 6803 encodes a high-light induced aldehyde dehydrogenase converting apocarotenals and alkanals. *The FEBS Journal*, **280**, 3685-3696.
297. **Trautmann D., Voss B., Wilde A., Al-Babili S., Hess W.R**. (2012) Microevolution in cyanobacteria: re-sequencing a motile substrain of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Research*, **19**, 435-448.
298. **Trautner C., Vermaas W.F.J.** (2013) The *sll1951* gene encodes the surface layer protein of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, **195**, 5370-5380.
299. **Tryggvesson A., Stahlberg F.M., Mogk A., Zeth K., Clarke A.K.** (2012) Interaction specificity between the chaperone and proteolytic components of the cyanobacterial Clp protease. *Biochemical Journal*, **446**, 311-320.
300. **Tsuboi S., Yamamura S., Imai A., Iwasaki K.** (2016) Unexpected diversity of *pepA* genes encoding leucine aminopeptidases in sediments from a freshwater lake. *Microbes and Environments*, **31**, 49-55.
301. **Turner G.C., Varshavsky A.** (2000) Detecting and measuring cotranslational protein degradation *in vivo*. *Science*, **289**, 2117-2120.

302. **Ughy B., Ajlani G.** (2004) Phycobilisome rod mutants in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Microbiology*, **150**, 4147-4156.

303. **van de Meene A.M., Hohmann-Marriott M.F., Vermaas W.F., Roberson R.W.** (2006) The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Archives of Microbiology*, **184**, 259-270.

304. **van de Meene A.M., Sharp W.P., McDaniel J.H., Friedrich H., Vermaas W.F., Roberson R.W.** (2012) Gross morphological changes in thylakoid membrane structure are associated with photosystem I deletion in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1818**, 1427-1434.

305. **van Wijk K.J.** (2015) Protein maturation and proteolysis in plant plastids, mitochondria, and peroxisomes. *Annual Review of Plant Biology*, **66**, 75-111.

306. **Vanhoof G., Goossens F., De Meester I., Hendriks D., Scharpe S.** (1995) Proline motifs in peptides and their biological processing. *The FASEB Journal*, **9**, 736-744.

307. **Varshavsky A.** (1997) The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes to Cells*, **2**, 13-28.

308. **Varshavsky A.** (2011) The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Science*, **20**, 1298-1345.

309. **Varshavsky A.** (2012) The ubiquitin system, an immense realm. *Annual Review of Biochemistry*, **81**, 167-176.

310. **Vermaas W.** (1996) Molecular genetics of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Principles and possible biotechnology applications. *Journal of Applied Phycology*, **8**, 263-273.

311. **Vermaas W.** (1996) Molecular genetics of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: principles and possible biotechnology applications. *Journal of Applied Phycology*, **8**, 263-273.

312. **Vetro J.A., Dummitt B., Chang Y.-H.** (2004) Methionine aminopeptidase. Emerging role in angiogenesis. In: *Aminopeptidases in Biology and Disease*, Hooper N.M., Lendeckel U. (eds.) Dordrecht: Springer, pp. 17-44.

313. **Vogtle F.N., Wortelkamp S., Zahedi R.P., Becker D., Leidhold C., Gevaert K., Kellermann J., Voos W., Sickmann A., Pfanner N., Meisinger C.** (2009) Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell*, **139**, 428-439.

314. **Volker C., Lupas A.N.** (2002) Molecular evolution of proteasomes. In: *The proteasome – Ubiquitin Protein Degradation Pathway*, Zwickl P., Baumeister W. (eds.) Berlin: Heidelberg, pp. 1-22.

315. **Wallace A.C., Laskowski R.A., Thornton J.M.** (1996) LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Engineering*, **8**, 127-134.

316. **Walling L.L.** (2004) Leucyl aminopeptidase (plant). In: *Proteolytic Enzymes, 2nd Edition*, Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F. (eds.) The San Diego: Elsevier/Academic Press., pp. 901-904.

317. **Walsh N.P., Alba B.M., Bose B., Gross C.A., Sauer R.T.** (2003) OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell*, **11**3, 61-71.

318. **Walter R., Simmons W.H., Yoshimoto T.** (1980) Proline specific endo- and exopeptidases. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **30**, 111-127.

319. **Watanabe K., Toh Y., Suto K., Shimizu Y., Oka N., Wada T., Tomita K.** (2007a) Protein-based peptide-bond formation by aminoacyl-tRNA protein transferase. *Nature*, **449**, 867-871.

320. **Watanabe S., Sato M., Nimura-Matsune K., Chibazakura T., Yoshikawa H.** (2007b) Protection of psbAII transcript from ribonuclease degradation *in vitro* by DnaK2 and DnaJ2 chaperones of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **71**, 279-282.

321. **Weits D.A., Giuntoli B., Kosmacz M., Parlanti S., Hubberten H.-M., Riegler H., Hoefgen R., Perata P., van Dongen J.T., Licausi F.** (2014) Plant cysteine oxidases control the oxygen dependent branch of the N-end-rule pathway. *Nature Communications*, **5**, 3425.

322. **Westphal S., Heins L., Soll J., Vothknecht U.C.** (2001) Vipp1 deletion mutant of *Synechocystis*: a connection between bacterial phage shock and thylakoid biogenesis? *PNAS*, **98**, 4243-4248.

323. **Widdel F.** (2010) Theory and Measurement of Bacterial Growth. *Grundpraktikum Mikrobiologie*, **4**, 1-11.

324. **Wiederstein M., Sippl M.J.** (2007) ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, **35**, 407-410.

325. **Wijffels R.H., Kruse O., Hellingwerf K.J.** (2013) Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Current Opinion in Biotechnology*, **24**, 405-413.

326. **Wilce M.C., Bond C.S., Dixon N.E., Freeman H.C., Guss J.M., Lilley P.E., Wilce J.A.** (1998) Structure and mechanism of a proline-specific aminopeptidase from *Escherichia coli*. *PNAS*, **95**, 3472-3477.

327. **Wilken C., Kitzing K., Kurzbauer R., Ehrmann M., Clausen T.** (2004) Crystal structure of the DegS stress sensor: how a PDZ domain recognizes misfolded protein and activates a protease. *Cell*, **117**, 483-494.

328. **Wilmotte A., Herdman M.** (2001) Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16s rRNA sequences. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Boone D.R., Castenholzr W. (eds.) New York: Springer, pp. 582-585.

329. **Worley C.K., Ling R., Callis J.** (1998) Engineering *in vivo* instability of firefly luciferase and *Escherichia coli* beta-glucuronidase in higher plants using recognition elements from the ubiquitin pathway. *Plant Molecular Biology*, **37**, 337-347.

330. **Xian-Zhong H., Ling-Zhu W., Zheng-Qiang M.** (2004) Cloning and characterization of a ubiquitin fusion degradation protein gene in wheat. *Acta Botanica Sinica*, **46**, 1366-1372.

331. **Xiao Q., Zhang F., Nacev B.A., Liu J.O., Pei D.** (2010) Protein N-terminal processing: substrate specificity of *Escherichia coli* and human methionine aminopeptidases. *Biochemistry*, **49**, 5588-5599.

332. **Xu F., Huang Y., Li L., Gannon P., Linster E., Huber M., Kapos P., Bienvenut W., Polevoda B., Meinnel T., Hell R., Giglione C., Zhang Y., Wirtz M., Chen S., Li X.** (2015) Two N-terminal acetyltransferases antagonistically regulate the stability of a nod-like receptor in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **27**, 1547-1562.

333. **Yamanaka G., Glazer A.N., Williams R.C.** (1980) Molecular architecture of a light-harvesting antenna. Comparison of wild type and mutant *Synechococcus* 6301 phycobilisomes. *The Journal of Biological Chemistry*, **255**, 11104-11110.

334. **Yoshida S., Ito M., Callis J., Nishida I. Watanabe A.** (2002) A delayed leaf senescence mutant is defective in arginyl–tRNA: protein arginyltransferase, a component of the N-end rule pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **32**, 129-137.

335. **Yoshihara S., Geng X., Okamoto S., Yura K., Murata T., Go M., Ohmori M., Ikeuchi M.** (2001) Mutational analysis of genes involved in pilus structure, motility and transformation competency in the unicellular motile cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant and Cell Physiology*, **42**, 63-73.

336. **Yoshihara S., Ikeuchi M.** (2004) Phototactic motility in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochemical & Photobiological Sciences*, **3**, 512-518.

337. **Yoshimoto T., Murayama N., Tsuru D.** (1988) A novel assay method for aminopeptidase P and partial purification of two types of the enzyme in *Escherichia coli*. *Agricultural and Biological Chemistry*, **52**, 1957-1963.

338. **Zang X., Liu B., Liu S., Arunakumara K.K., Zhang X.** (2007) Optimum conditions for transformation of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology*, **45**, 241-245.

339. **Zavřel T., Očenášová P., Červený J.** (2017) Phenotypic characterization of *Synechocystis* sp. PCC 6803 substrains reveals differences in sensitivity to abiotic stress. *PLOS ONE*, **12**, e0189130.

340. **Zavřel T., Sinetova M.A., Búzová D., Literáková P., Červený J.** (2015) Characterization of a model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 autotrophic growth in a flat-panel photobioreactor. *Engineering in Life Sciences*, **15**, 122-132.

341. **Zhang X., Chen G., Qin C., Wang Y., Wei D.** (2012) *Slr0643*, an S2P homologue, is essential for acid acclimation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology*, **158**, 2765-2780.

342. **Zimorski V., Ku C., Martin W.F., Gould S.B.** (2014) Endosymbiotic theory for organelle origins. *Current Opinion in Microbiology*, **22**, 38-48.

ПРИЛОЖЕНИЕ

П. 1. Доказательство отсутствия нуклеотидных замен в последовательности гена *sll036* в составе рекомбинантной плазмиды pET-41a(+)-*sll0136*

```
sll0136           ------------------------------------------------------------
DNA1_S-tag        TAACTGGGCCGGGGGGGTGGCTCCGGTGATGACGACGACAAGAGTCCCATGGGATATCGG
DNA2_T7           ------------------------------------------------------------

sll0136         1 ------------------------------------------ATGCATCCGGTTGTT
DNA1_S-tag      1 GGATCCGAATTCTGTACAGGCCTTGGCGCGCCTGCAGGCGAGCTCATGCATCCGGTTGTT
DNA2_T7           ------------------------------------------------------------

sll0136        16 AGTTCCGCTGAATATCGTCAACGTCGCGATCGCCTAATGGCCAAGCTAGGCCAGGGGACG
DNA1_S-tag     61 AGTTCCGCTGAATATCGTCAACGTCGCGATCGCCTAATGGCCAAGCTAGGCCAGGGGACG
DNA2_T7           ------------------------------------------------------------

sll0136        76 GCCATTTTTGCCAGTGCGCCCCAGGCGGTGATGCACAACGATGTGGAATACGTATTTCGT
DNA1_S-tag    121 GCCATTTTTGCCAGTGCGCCCCAGGCGGTGATGCACAACGATGTGGAATACGTATTTCGT
DNA2_T7           ------------------------------------------------------------

sll0136       136 CAAGATAGTGATTTTTATTACCTGACGGGCTTCAATGAACCGGAGGCGATCGCCGTTTTT
DNA1_S-tag    181 CAAGATAGTGATTTTTATTACCTGACGGGCTTCAATGAACCGGAGGCGATCGCCGTTTTT
DNA2_T7           ------------------------------------------------------------

sll0136       196 GCGCCCCACCACGAAGAACATCAATTTATTCTATTTGTGCAACCCAAGGATCCAGCCAAG
DNA1_S-tag    241 GCGCCCCACCACGAAGAACATCAATTTATTCTATTTGTGCAACCCAAGGATCCAGCCAAG
DNA2_T7           ------------------------------------------------------------

sll0136       256 GAAACCTGGACGGGCATTCGCTACGGTGTGGAGGGGGTTCAATCCAGCTTTGGGTCGGAC
DNA1_S-tag    301 GAAACCTGGACGGGCATTCGCTACGGTGTGGAGGGGGTTCAATCCAGCTTTGGGTCGGAC
DNA2_T7           ------------------------------------------------------------

sll0136       316 ATTGCCTATCCCATTGGGGAATTGGATGAGCATTTACCGAAATATCTGGAAAAGGCAGAT
DNA1_S-tag    361 ATTGCCTATCCCATTGGGGAATTGGATGAGCATTTACCGAAATATCTGGAAAAGGCAGAT
DNA2_T7           ------------------------------------------------------------

sll0136       376 AAAATCCATTACCACCTCGGTCGAGATGAAGCGTTAAATCAAACCATCCTCAAGCACTGG
DNA1_S-tag    421 AAAATCCATTACCACCTCGGTCGAGATGAAGCGTTAAATCAAACCATCCTCAAGCACTGG
DNA2_T7           ------------------------------------------------------------

sll0136       436 CAAAAACAATTGGCCGCCTATCCCCGCCAAGGCTATGGTCCCCAAGCTTTAGTGAATTCC
DNA1_S-tag    481 CAAAAACAATTGGCCGCCTATCCCCGCCAAGGCTATGGTCCCCAAGCTTTAGTGAATTCC
DNA2_T7           ------------------------------------------------------------

sll0136       496 CATCCCTTGGTGCATCCCCTCCGGCAAGTTAAAAGTGAAACTGAATTAGCCTTGTTGCGG
DNA1_S-tag    541 CATCCCTTGGTGCATCCCCTCCGGCAAGTTAAAAGTGAAACTGAATTAGCCTTGTTGCGG
DNA2_T7           ------------------------------------------------------------

sll0136       556 CGGGCCTGTGACCTGTCGGCGATCGCCCATCAACGGGCCATGGAATTTGCTCGACCGGGA
DNA1_S-tag    601 CGGGCCTGTGACCTGTCGGCGATCGCCCATCAACGGGCCATGGAATTTGCTCGACCGGGA
DNA2_T7         1 ------TGTGACCTGTCGGCGATCGCCCATCAACGGGCCATGGAATTTGCTCGACCGGGA

sll0136       616 CATTACGAATATCAAGTGCAGGCGGAATTGGAAATTATTTTTCGGCGGGAAGGGGGCCTG
DNA1_S-tag    661 CATTACGAATATCAAGTGCAGGCGGAATTGGAAATTATTTTTCGGCGGGAAGGGGGCCTG
DNA2_T7        55 CATTACGAATATCAAGTGCAGGCGGAATTGGAAATTATTTTTCGGCGGGAAGGGGGCCTG

sll0136       676 GGGCCGGCTTATCCTTCCATTGTGGCGGCAGGAAAAAATGCCTGTATTTTGCACTACATC
DNA1_S-tag    721 GGGCCGGCTTATCCTTCCATTGTGGCGGCAGGAAAAAATGCCTGTATTTTGCACTACATC
DNA2_T7       115 GGGCCGGCTTATCCTTCCATTGTGGCGGCAGGAAAAAATGCCTGTATTTTGCACTACATC

sll0136       736 AACAATGACTGCCCTTTGCAAGATGGGGATTTACTACTCATCGATGCAGGTTGTGCCTAC
DNA1_S-tag    781 AACAATGACT----------------------------------------------------
DNA2_T7       175 AACAATGACTGCCCTTTGCAAGATGGGGATTTACTACTCATCGATGCAGGTTGTGCCTAC

sll0136       796 GGTTACTATAACGGTGACATCACCCGTACCTTTCCCATCAACGGTAAATTTAGTCCCGAA
DNA1_S-tag        ------------------------------------------------------------
DNA2_T7       235 GGTTACTATAACGGTGACATCACCCGTACCTTTCCCATCAACGGTAAATTTAGTCCCGAA
```

```
sll0136      856  CAACGCACCCTCTACGAAATTGTTCTAACTGCCCAGGAAGCGGCGATCGCCAAGGTACAG
DNA1_S-tag        ------------------------------------------------------------
DNA2_T7      295  CAACGCACCCTCTACGAAATTGTTCTAACTGCCCAGGAAGCGGCGATCGCCAAGGTACAG

sll0136      916  GCGGGCAATCCCTACCACGAATACCATGATGCGGCAGTGTCCGTGATTGTGGATGGTCTG
DNA1_S-tag        ------------------------------------------------------------
DNA2_T7      355  GCGGGCAATCCCTACCACGAATACCATGATGCGGCAGTGTCCGTGATTGTGGATGGTCTG

sll0136      976  ATGGATTTGGGTCTACTGGTGGGAAATAAGGAGGAAATTATCAAAGAAGAAAAATATAAG
DNA1_S-tag        ------------------------------------------------------------
DNA2_T7      415  ATGGATTTGGGTCTACTGGTGGGAAATAAGGAGGAAATTATCAAAGAAGAAAAATATAAG

sll0136     1036  CCCTTCTATATGCATCGCACCGGCCATTGGCTGGGGCTAGATGTCCACGATGCCGGCAAT
DNA1_S-tag        ------------------------------------------------------------
DNA2_T7      475  CCCTTCTATATGCATCGCACCGGCCATTGGCTGGGGCTAGATGTCCACGATGCCGGCAAT

sll0136     1096  TACAAACAGGATAAGGAAACCTGGACGGTGTTGGAGCCAGGGCAAGTGCTCACCGTAGAA
DNA1_S-tag        ------------------------------------------------------------
DNA2_T7      535  TACAAACAGGATAAGGAAACCTGGACGGTGTTGGAGCCAGGGCAAGTGCTCACCGTAGAA

sll0136     1156  CCGGGTATTTACATCGCCCCCGATATTAAACCCGCCGAAGGACAGCCGGAAGTGCCGGAA
DNA1_S-tag        ------------------------------------------------------------
DNA2_T7      595  CCGGGTATTTACATCGCCCCCGATATTAAACCCGCCGAAGGACAGCCGGAAGTGCCGGAA

sll0136     1216  CAATGGCGAGGTATTGGCATTCGCATTGAGGATGACGTATTGGTCACTGCCCAAGGCCCC
DNA1_S-tag        ------------------------------------------------------------
DNA2_T7      655  CAATGGCGAGGTATTGGCATTCGCATTGAGGATGACGTATTGGTCACTGCCCAAGGCCCC

sll0136     1276  GATGTGTTAACCAGTGCCGTGCCCAAGGCGATCGCCGATTTAGAACATTGA---------
DNA1_S-tag        ------------------------------------------------------------
DNA2_T7      715  GATGTGTTAACCAGTGCCGTGCCCAAGGCGATCGCCGATTTAGAACATTGACTCGAGCAC

sll0136           ------------------------------------------------------------
DNA1_S-tag        ------------------------------------------------------------
DNA2_T7      775  CACCACCACCACCACCACTAATTGATTAATACCTAGGCTGCTAAACAAAGCCCGAAA

sll0136           ----------------
DNA1_S-tag        ----------------
DNA2_T7      835  GGAAGCGATGGCCTAT
```

Секвенирование плазмидной ДНК pET-41a(+)-*sll0136* проводили с использованием праймеров S-tag (последовательность DNA1_S-tag) и T7 (последовательность DNA2_T7). Для выравнивания и сравнения полученных нуклеотидных последовательностей использовали программу ClustalW. Жирным шрифтом выделены идентичные а. о.

П. 2. Аминокислотные последовательности белков, кодируемых генами, окружающими *pepP Synechocystis*

ClpP3, кодируемый геном *slr0165*

MPIGVPSVPFRLPGSQYERWIDIYTRLSQERIIFLGQEVNDSIANRIVAFLLYLDSDDPS
KPIYLYINSPGGSVTAGMAIYDTMQYIKAEVITICVGLAASMGAFLLASGAPGKRLALPH
ARIMIHQPMGGTGRRQATDIDIEAREILRIRQQLNEIMAQRTGQTVEKIAKDTDRDYFLS
AAEAKEYGLIDKVIENSTMGNN

PepP, кодируемый геном *sll0136*

MHPVVSSAEYRQRRDRLMAKLGQGTAIFASAPQAVMHNDVEYVFRQDSDFYYLTGFNEPE
AIAVFAPHHEEHQFILFVQPKDPAKETWTGIRYGVEGVQSSFGSDIAYPIGELDEHLPKY
LEKADKIHYHLGRDEALNQTILKHWQKQLAAYPRQGYGPQALVNSHPLVHPLRQVKSETE
LALLRRACDLSAIAHQRAMEFARPGHYEYQVQAELEIIFRREGGLGPAYPSIVAAGKNAC
ILHYINNDCPLQDGDLLLIDAGCAYGYYNGDITRTFPINGKFSPEQRTLYEIVLTAQEAA
IAKVQAGNPYHEYHDAAVSVIVDGLMDLGLLVGNKEEIIKEEKYKPFYMHRTGHWLGLDV
HDAGNYKQDKETWTVLEPGQVLTVEPGIYIAPDIKPAEGQPEVPEQWRGIGIRIEDDVLV
TAQGPDVLTSAVPKAIADLEH

MtnP, кодируемый геном *sll0135*

MTAVTIWTKTKPGRVSCFIRKNSTMVNAPIGIIGGSGLYQMEALKNVEEVTLDTPFGAPS
DSFIVGELAGVRVAFLARHGRGHHLLPSEIPFRANIHGMKQLGVKYLISASAVGSLQAEA
KPLDMVVPDQFIDRTRQRISTFFGEGIVAHIGFGNPICPQLAQCLSTAIAGLELEGVTLH
DRGTYVSMEGPAFSTIAESNLYRSWGGTVIGMTNLPEAKLAREAEIAYATLALVTDYDCW
HPDHDHVTVEMVIGNLQKNAVNAQQVILETVKQLAANPFESIAHRALQYAVLTPPDKFPA
ATYEKLSLLLGKYYPPAP

Гипотетический белок, кодируемый геном *sll0242*

MDFVEAEQMYYDWCQQLHERHISATEFTAWLDRLRVQDAQGNWWHIEHPGGMWLCWNGQA
WERKNPPKEATDSPPGTALTQQMKEPQNLGQLLGWLAGSVLKGIPKQIVLGIFLIVIVWL
LHLFLLVVVNDGFNLTGTNPWFDSVLVLGGEVIAGSLFWIFTGILLSQLIHGTLGQYLKA
ITSFPATVVSFCQQSSQFKAPILWLGFSGALVFALLFGNLLVSLQILLFTLVALQESTHF
LRLVLKLSWQDAQKLIRKGKSLHPLTSDQCQQLLSGMAVGFGLAALLLWLAPSLLRLFFI
AAIAVTLWQFFSGKRSTTSALSLFIIFTAGSLTLGQMEPVWADDGGWAECGQSLQTWIQC
GGTDQAILNSGLAGLAIWLGWILGGLQIPSASMASSGVISTTPGATTFPQDIEYTYPDGR
HTTLVYDPEKGGYINILTGGLIDPNEINAWHQNNLSTHQQTEDWRRRNEYLETTGQDAQS
QALQAIKADYEERQHLLNRISQMEKDIFEGKMGLGDLMNPGQPGDVMAQLSRLGEQIASG
DPIDRQKLQALGKLYSDKISGRILTANQIPQPDIWFDSTVDAAMETTKQLATVRGEDGQF
SWLRLAGRIGAAYLTGGASEAILIPTQAIISSKEYVAQGGDSIIEGSRRAMETAATSLYM
GEILNRTIRAIKPIISGKLAHPPQQAPTKPTITPQRTPAKSIITPKQTPTKTATTPQRTP
AKSTPPPQQTPTKTATTPQQTPAKSTPPPQQTPTKTATTPQQTNSTIPKYQIRQNVVNKI
LNETENLSPEQRLEIASNLKKANKITEAEYNAIKNKVKPQLEGRPVEGQGGHDDVAMTSM
EELSRKEQINVCKYRPNGNHAEINFNEAGAWDKIGKKETLFTYPKNKSPNDIVAQDIVIY
SAGDKILKPEQIAAMKNRILVDLQAGRLT

Гипотетический белок, кодируемый геном *sll0241*

MKMKPWRFLLLLGIFVILSVELLGLMRRNFQSKRRPGWQIIRPPHEVSALVLQNQILWSG
GKDGVVGIDIQKREIVKTITCDPPVNFVQALVLDRQNWLWIAHNKGLSYYDGQRCQAYQS
DDSRFREPINTLYLDRQGQLWIGTWQGAAVKEKAGWRWLGMADGLPDLMINLIAQDSQGG

MWFGSSVAPRGGLNYCLKKTCQKFSTSNGLPHNNITSLWIKDSNKVWVGTGFFDRGGAAQ
LEANNSGWVVRKTLTAANGLAGAKVRSIYQDRQGVLWLGSENDGLARLAGENWLTLTEAD
GLANQEVKVMLEDQAGNFWIGTKDGVNYIPAEQLLKLGDK

П. 3. Нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид GST-PepP

ATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGACTTCTT
TTGGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTTGTATGAGCGCGATGAAGGTGATAAA
TGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCCTTATTATATTGAT
GGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATACGTTATATAGCTGACAAGCACAAC
ATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTG
GATATTAGATACGGTGTTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCAAAGTT
GATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTCGAAGATCGTTTATGTCATAAA
ACATATTTAAATGGTGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGAT
GTTGTTTTATACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAAATTAGTTTGTTTTAAA
AAACGTATTGAAGCTATCCCACAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATAGCA
TGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAaaatcggat
ggttcaactagtggttctggtcatcaccatcaccatcactccgcgggtctggtgccacgc
ggtagtactgcaattggtatgaaagaaaccgctgctgctaaattcgaacgccagcacatg
gacagcccagatctgggtaccggtggtggctccggtgatgacgacgacaagagtcccatg
ggatatcggggatccgaattctgtacaggccttggcgcgcctgcaggcgagctc***ATGCAT***
CCGGTTGTTAGTTCCGCTGAATATCGTCAACGTCGCGATCGCCTAATGGCCAAGCTAGGC
CAGGGGACGGCCATTTTTGCCAGTGCGCCCCAGGCGGTGATGCACAACGATGTGGAATAC
GTATTTCGTCAAGATAGTGATTTTTATTACCTGACGGGCTTCAATGAACCGGAGGCGATC
GCCGTTTTTGCGCCCCACCACGAAGAACATCAATTTATTCTATTTGTGCAACCCAAGGAT
CCAGCCAAGGAAACCTGGACGGGCATTCGCTACGGTGTGGAGGGGGTTCAATCCAGCTTT
GGGTCGGACATTGCCTATCCCATTGGGGAATTGGATGAGCATTTACCGAAATATCTGGAA
AAGGCAGATAAAATCCATTACCACCTCGGTCGAGATGAAGCGTTAAATCAAACCATCCTC
AAGCACTGGCAAAAACAATTGGCCGCCTATCCCCGCCAAGGCTATGGTCCCCAAGCTTTA
GTGAATTCCCATCCCTTGGTGCATCCCCTCCGGCAAGTTAAAAGTGAAACTGAATTAGCC
TTGTTGCGGCGGGCCTGTGACCTGTCGGCGATCGCCCATCAACGGGCCATGGAATTTGCT
CGACCGGGACATTACGAATATCAAGTGCAGGCGGAATTGGAAATTATTTTTCGGCGGGAA
GGGGGCCTGGGGCCGGCTTATCCTTCCATTGTGGCGGCAGGAAAAAATGCCTGTATTTTG
CACTACATCAACAATGACTGCCCTTTGCAAGATGGGGATTTACTACTCATCGATGCAGGT
TGTGCCTACGGTTACTATAACGGTGACATCACCCGTACCTTTCCCATCAACGGTAAATTT
AGTCCCGAACAACGCACCCTCTACGAAATTGTTCTAACTGCCCAGGAAGCGGCGATCGCC
AAGGTACAGGCGGGCAATCCCTACCACGAATACCATGATGCGGCAGTGTCCGTGATTGTG
GATGGTCTGATGGATTTGGGTCTACTGGTGGGAAATAAGGAGGAAATTATCAAAGAAGAA
AAATATAAGCCCTTCTATATGCATCGCACCGGCCATTGGCTGGGGCTAGATGTCCACGAT
GCCGGCAATTACAAACAGGATAAGGAAACCTGGACGGTGTTGGAGCCAGGGCAAGTGCTC
ACCGTAGAACCGGGTATTTACATCGCCCCCGATATTAAACCCGCCGAAGGACAGCCGGAA
GTGCCGGAACAATGGCGAGGTATTGGCATTCGCATTGAGGATGACGTATTGGTCACTGCC
CAAGGCCCCGATGTGTTAACCAGTGCCGTGCCCAAGGCGATCGCCGATTTAGAACATTGA

Протяжённость последовательности, кодирующей рекомбинантный полипептид GST-PepP, составляет 2220 п. н. Серым цветом выделена нуклеотидная последовательность гена размером 651 п. н., кодирующего GST-tag. Жирным курсивом выделена нуклеотидная последовательность гена *sll0136* размером 1326 п. н., кодирующего белок PepP *Synechocystis*.

П. 4. Анализ результатов MALDI-TOF масс-спектрометрии

Образец	№ в NCBI	Название белка	Мол. масса, кД		Достоверность	Покрытие, %
			Экспериментальная	Теоретическая		
GST-PepP	gi|495705565	Глутатион-S-трансфераза *Pseudomonas* sp. Ag1	27,88	23,87	193	55,20
	gi|499175605	*Xaa-Pro* аминопептидаза *Synechocystis* sp. PCC 6803	49,47	48,50	160	39,20
PepP 1/2	gi|499175605	*Xaa-Pro* аминопептидаза *Synechocystis* sp. PCC 6803	49,47	48,50	100/187	24,3/32,70
1	gi|16322821	Фикоцианин-ассоциированный линкерный белок *Synechocystis* sp. PCC 6803	32,5	33,00	412	47,00
2	gi|16330913	Фактор элонгации EF-Tu *Synechocystis* sp. PCC 6803	43,71	43,89	334	42,00

П. 5. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) клеток штаммов дикого типа и мутанта *ΔpepP Synechocystis*

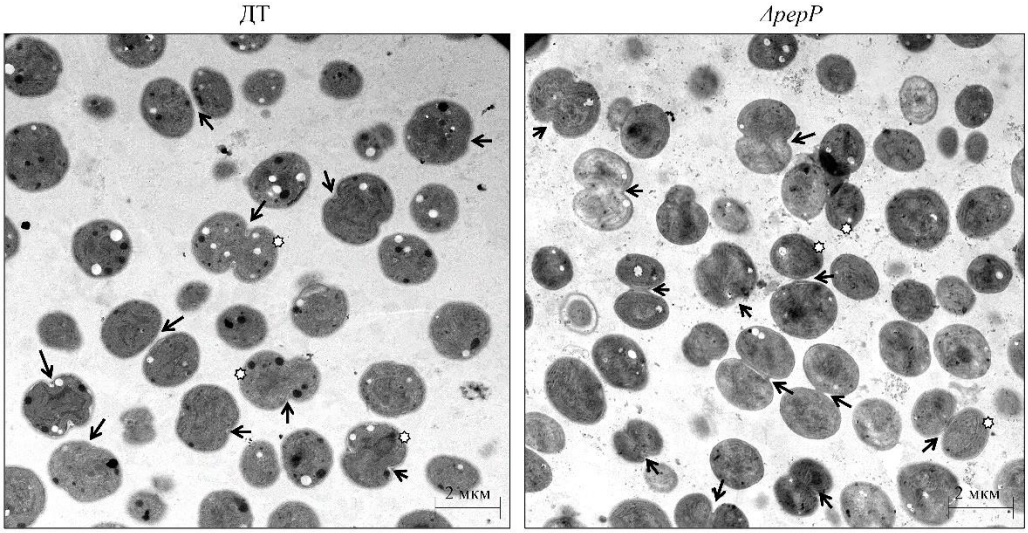

Рис. 50. ТЭМ клеток штаммов дикого типа и мутанта *ΔpepP Synechocystis*.

Обозначения: стрелками обозначены клетки *Synechocystis*, находящиеся на разных стадиях клеточного деления; звёздочкой указаны «ассиметричные» клетки, у которых клеточная перегородка расположена или формируется не в экваториальной зоне. Масштаб указан на изображениях.

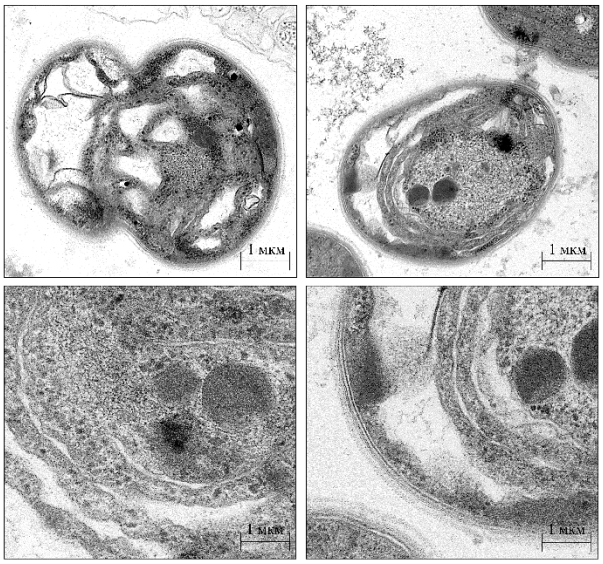

Рис. 51. ТЭМ клеток мутантного штамма *ΔpepP Synechocystis*.

Обозначения: представлена фракция клеток с разрушенной внутриклеточной структурой. Масштаб указан на изображениях.

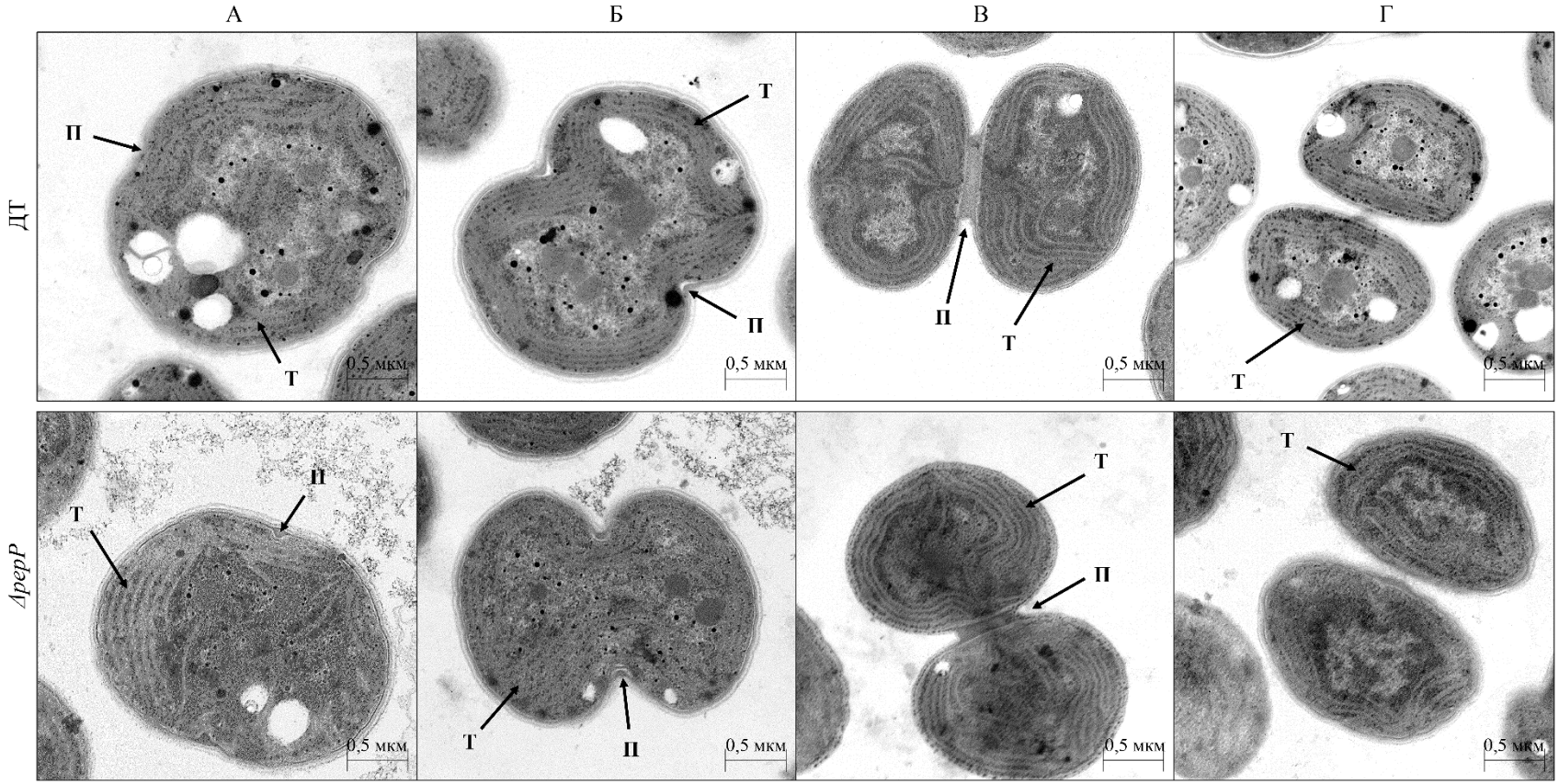

Рис. 52. ТЭМ клеток штаммов дикого типа и мутанта *ΔpepP Synechocystis*.

Обозначения: А – начальная стадия клеточного деления, инициация формирования клеточной перетяжки (септы); Б – инвагинация цитоплазматической мембраны и клеточной стенки в цитоплазму клетки; В – образование дочерних клеток за счёт сформировавшегося разделительного кольца; Г – завершающий этап цитокинеза, расхождение дочерних клеток; Т – тилакоидная мембрана, П – клеточная перетяжка. Масштаб указан на изображениях.

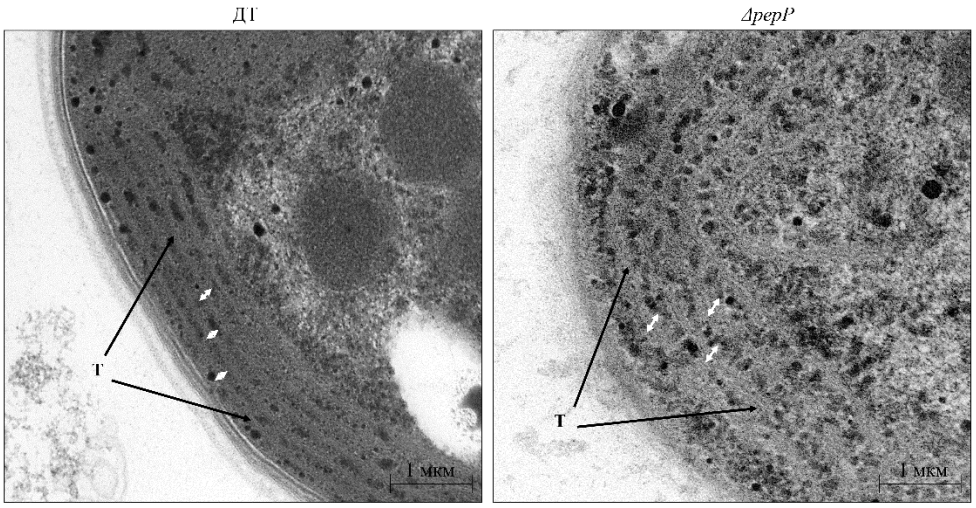

Рис. 53. ТЭМ клеток штаммов дикого типа и мутанта *ΔpepP Synechocystis*.

Обозначения: белыми стрелками обозначены слои цитоплазмы, расположенные между тилакоидными мембранами; Т – тилакоидная мембрана. Масштаб указан на изображениях.

П 6. Аминокислотные последовательности белков – возможных мишеней для пептидазы PepP

DnaJ4, кодируемый геном *sll0897*

M***P***GDYYQTLGVTRDADKDEIKRAYRRLARKYHPDVNKEPGAEEKFKEINRAYEVLSEPEI
RQRYDQFGEAGVSGGGAQGFDVGNMGDFADIFETIFGGFGGGMGGQQRGRRRANGPTRGD
DLRLDLQLTFQEAIFGGEKEIRIPHLESCQVCEGTGAKPGTGVKTCGTCNGAGQVRRATR
TPFGSFAQVSACPTCNGSGEVIEQKCEACNGVGRKQETKKLKITIPAGVDDGTRLRVGKE
GDAGLRGGPAGDLYVFLMVETDKHFVREGMNIRSNLEVSYLQAILGCRLEVDTVDGKAEL
TIPAGTQPNTVLTLENKGVPKLGNATIRGDHLITVKVQIPTRINSEERELLERLATIKGE
SHGKGGLEGFLGGLFHK

DnaJ3, кодируемый геном *sll1666*

MA***P***SPFADSYYGVLELHPAASPVAIRRAYRELSKRYHPDTTLLTPDIATVKFQRLNEAYA
VLSNPDRRSVYDLQIGYSRWNVIQVPPDPLQGQNSAASTSLGRNSAYLDASDRPLSAGEF
FALALLGLTLGGCLALALLIAWLRGDPLVIPSLLPWFIN

DnaK1, кодируемый геном *slr0086*

M***P***YAIDFGTTNTVIARWNEATRQGNLIDLPSLSHPLGDSGPLVPSLLYVENAALGQVAIA
REVLDRGRDISTDTRFFKNFKRGIGVAVQGFLPQLDGHTLSLETLGQWYLDKLIRILTEQ
EGQGPDCLALTVPVDSFESYRHWLSHTCRSWGVEEVRLVDEPTAAALGYGVGDASQILVL
DFGGGTVDFSWVQLGDRGQKGRSGFLLKWGGILGGSKAEEKSALAKVLAKAGANLGGSDI
DYWISEYFTEAQGLQVSPWIRRLAERLKIALGEAEEATEVYFDDQALESYEFQLRRSDLT
EILQQRQFFERLTALWEQVQQTAQRRGLTPANLDAVLVVGGTSQLPMVQDWINAQFPAGK
IRNQQPFGAIALGALQIYQGREVQDYLYHSYGVRYWNRRKNSHNWHPIIKNGQTYPMAEP
IELTLGASLDNQPSIELIVGELGSSIGATEVYFDGNQLITRVLENQAFTVQPLNDRNGAR
QIAQLSPPGVPGGDRIKVKFWVDDQRYLRLTVEDLLQQKLLLENQVVAQLR

YCF48, кодируемый геном *slr2034*

M***P***VKFPSLKFEQLKQLVLVAAIAVFCVSCSHVPDLAFNPWQEIALETDSTFADIAFTEDP
NHGWLVGTKETIFETTDGGDTWEQKLIDLGEEKASFSAVSFSGNEGWITGKPSILLHTTD
GGQTWARIPLSEKLPGAPYSIIALGPQTAEMITDLGAIYKTTNGGKNWKALVEGAVGVAR
TIQRSTDGRYVAVSARGNFYSTWAPGQTEWTPHNRNSSRRLQTMGYGKDGQLWLLARGGQ
LQFSTDPDAEEWSDVIAPQDKGSWGLLDLSFRTPEEVWVAGASGNLLMSQDGGQTWAKDT
GVEDIPANLYRVVFLSPEKGFVLGQDGILLKYNPSTEVAMVP

YCF3, кодируемый геном *slr0823*

M***P***RTQRNDNFIDKSFTVMADIILKILPTNQKAKEAFVYYRDGMSAQADGEYAEALDNYEE
ALRLEENPNDRSYILYNMALIHASNGDHEKALGLYQEAIELNPKMPSALNNIAVIYHFQG
EKAKEAGQEDDAENLFDKAAEYWKQAIRLAPNNYIEAQNWLKITGRSEMDVF

YCF36, кодируемый геном *sll0584*

MK***P***MRESSPQICPVPIDQQPVNEYEALKSAWLYSWGQVDLLSYGKNLTRLALLISFIVSP
IASASFSVEKQPVQCGFLIVLGICLLLSLFVLRLMLGWRYVGDRLGAETVTYEESGWYDG
QVWRKPLEVQTRDQLILRYQVNPVLQRWQNTLKLLGATMAIDILIWTIFRFLH

NblA1, кодируемый геном *ssl0452*

MK***P***ESFDLTIEQMFEFRRMQDATANISQEQALELLVQASRLLMIKSNVIRDLMRQAPLEP
LG

ClpP1, кодируемый геном *slr0542*

MI***P***TVIETSGRGDRAFDIYSRLLRERIVFLGQEVRDENANLVVAQLLFLEAEDPEKDIYL
YINSPGGSVSAGLGIFDTMNQIRPDVCTICIGLAASMGAFLLSAGAKGKRMSLPNSRIMI
HQPLGGAQGQATDIEIQAKEILYLKALLNQHLANHTGKSLEEITADTERDFFMSAEESKE
YGLIDQVINRRPSASDPI

ClpP3, кодируемый геном *slr0165*

M***P***IGVPSVPFRLPGSQYERWIDIYTRLSQERIIFLGQEVNDSIANRIVAFLLYLDSDDPS
KPIYLYINSPGGSVTAGMAIYDTMQYIKAEVITICVGLAASMGAFLLASGAPGKRLALPH
ARIMIHQPMGGTGRRQATDIDIEAREILRIRQQLNEIMAQRTGQTVEKIAKDTDRDYFLS
AAEAKEYGLIDKVIENSTMGNN

ClpX, кодируемый геном *sll0535*

M***P***KYDSHLKCSFCGKSQEQVRKLIAGPGVYICDECVELCNDILDEELLDVPPASTGERDG
TGQKQKKSGQPRRRLTLEELPKPTAIKQYLDEYVIGQDEAKKVLSVAVYNHYKRLNLLER
NQEIDPGDAVELQKSNILLVGPTGSGKTLLAQTLAKILEVPFAVADATTLTEAGYVGEDV
ENILLRLLQVADLDVEEAQRGIIYIDEIDKIARKSENPSITRDVSGEGVQQALLKMLEGT
VANVPPQGGRKHPYQDCIQIDTSNILFICGGAFVGLEKVIEQRFGKKSMGFVRPGEGPSK
EKRTADVLRQAEPDDLVKFGLIPEFIGRIPVMACLNPLDEDALIAILTQPRNAIVKQYQT
LLGMDHVELDFQPDAVRAIATEAHRRKTGARALRGIVEELMLDVMYELPSREDLTHCLIT
REMVEKRSTAELLLHPSSLPKPESA

ClpB1, кодируемый геном *slr0156*

MQ***P***TDPTKFTEQAWDAIVKSQEVARRYKNTNLEVEHILLALLEQDMGLAARIFQRAAVDG
EGLRQQLEIFTNRQPKQAYVEQLYLGRSLDVMLDRADAARSSWEDKFISVEHLLVGFAED
DRVGRKTLRAFNLDPQDLELAIKAIRGSQKVTEPNQEEKYEALDKYGRDLTEQARQGKLD
PVIGRDEEIRRVIQVLSRRSKNNPVLIGEPGVGKTAIAEGLAQRIINGDVPESLKNRQLI
SLDMGSLIAGAKYRGEFEERLRSVMKEVTNSDGQIILFIDEVHTVVGAGGREGSGSMDAG
NLLKPMLARGELRCIGATTLDEYRKNIEKDPALERRFQQVYVKQPSVDDTISILRGLKEK
YEVHHGVKITDSALVAAATLSHRYIQDRFLPDKAIDLVDEAAARLKMEITSKPVELEDID
RRLMQLQMEKLSLEGEEKRPGLGADKSSKERLEKIQQEITELEGQQQELSGQWLSEKQML
EEINTLKEKEQELRLQVEKAERATDWEKAAKIKYGELEVLQHDIEEKESKLLEIQGSGNT
LLREQVTESDIAEIVAGWTGIPMNRLMETERQKLLQLEGHLHQRVIGQKEAVAAVSAAIR
RARAGMKDPSRPIGSFLFMGPTGVGKTELARALAGFLFDSEEAMVRIDMSEYMEKHAVSR
LIGAPPGYVGYEEGGQLSEAVRRRPYSVVLLDEVEKAHLDVFNILLQVLDDGRITDSQGR
VVDFRNTIIVMTSNIGSDHILSLSADDADYDKMQKQVLQSLRKHFRPEFLNRIDDLIIFH
TLKRDELRRIVVLQIKRIEKLLDEQKITLSLSDAALDHIVSAGYDPTYGARPLKRAIQRQ
LENPIATKILENTFVAGDKILIDCVDGQLIFDKEIEPTTLPEEPEENITAVEVEVLSS

ClpB2, кодируемый геном *slr1641*

MQ***P***TDPNKFTEKAWEAIAKTPEIAKQHRQQQIETEHLLSALLEQNGLATSIFNKAGASIP
RVNDQVNSFIAQQPKLSNPSESIYLGRSLDKLLDNAEIAKSKYGDDYISIEHLMAAYGQD
DRLGKNLYREIGLTENKLAEIIKQIRGTQKVTDQNPEGKYESLEKYGRDLTELAREGKLD
PVIGRDEEVRRTIQILSRRTKNNPVLIGEPGVGKTAIAEGLAQRIINHDVPESLRDRKLI
SLDMGALIAGAKYRGEFEERLKAVLKEVTDSQGQIILFIDEIHTVVGAGATQGAMDAGNL
LKPMLARGALRCIGATTLDEYRKYIEKDAALERRFQEVLVDEPNVLDTISILRGLKERYE
VHHGVKIADSALVAAAMLSNRYISDRFLPDKAIDLVDEAAAKLKMEITSKPEELDEVDRK
ILQLEMERLSLQRENDSASKERLEKLEKELADFKEEQSKLNGQWQSEKTVIDQIRTVKET
IDQVNLEIQQAQRDYDYNKAAELQYGKLTDLQRQVEALETQLAEQQTSGKSLLREEVLES
DIAEIISKWTGIPISKLVESEKEKLLHLEDELHSRVIGQDEAVTAVAEAIQRSRAGLSDP
NRPTASFIFLGPTGVGKTELAKALAKNLFDTEEALVRIDMSEYMEKHAVSRLMGAPPGYV
GYEEGGQLTEAIRRRPYSVILFDEIEKAHGDVFNVMLQILDDGRLTDAQGHVVDFKNTII
IMTSNLGSQYILDVAGDDSRYEEMRSRVMDVMRENFRPEFLNRVDETIIFHGLQKSELRS
IVQIQIQSLATRLEEQKLTLKLTDKALDFLAAVGYDPVYGARPLKRAVQKYLETAIAKGI
LRGDYKPGETIVVDETDERLSFTSLRGDLVIV

Жирным курсивом выделены а. о. Pro в положении P2 и P3.