

На правах рукописи



СИНЕТОВА Мария Андреевна

**РОЛЬ СВЕРХСПИРАЛИЗАЦИИ ДНК В ЭКСПРЕССИИ
СТРЕСС-ИНДУЦИРУЕМЫХ ГЕНОВ У
ЦИАНОБАКТЕРИИ *Synechocystis* sp. PCC 6803**

Специальность 03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2010

Работа выполнена в лаборатории молекулярных основ внутриклеточной регуляции
Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений
им. К.А. Тимирязева РАН

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Лось Дмитрий Анатольевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

доктор биологических наук

Еланская Ирина Владимировна

Носов Александр Владимирович

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Институт общей
генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Защита состоится «21» декабря 2010 г. в 11 часов на заседании совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской
академии наук Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу:
127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: (499) 977 8018, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке при Учреждении Российской
академии наук Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан «19» ноября 2010 г.

Ученый секретарь

совета по защите докторских
и кандидатских диссертаций,
кандидат биологических наук

М.И. Азаркович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Сигналы об изменении параметров окружающей среды воспринимаются различными сенсорами клетки и передаются по системам передачи на ДНК, вызывая изменения экспрессии генов, необходимых для адаптации к новым условиям. Однако сама молекула ДНК не является пассивным звеном в этой цепи. Изменения параметров окружающей среды прямо или косвенно влияют на уровень сверхспирализации ДНК, от которого зависят процессы репликации и транскрипции, а также взаимодействие ДНК с регуляторными элементами (Dogman, 2008). У всех мезофильных бактерий ДНК находится в состоянии отрицательной сверхспирализации, которое контролируется двумя топоизомеразами: ДНК-гираза вносит отрицательные сверхвитки, а топоизомераза I препятствует их избыточному накоплению (Tse-Dinh, 1998; Zechiedrlich, 2000). Добавление ингибитора ДНК-гиразы новобиоцина (Maxwell, 1997) приводит к снижению уровня отрицательной сверхспирализации ДНК и, таким образом, позволяет исследовать роль сверхспирализации ДНК в регуляции экспрессии генов.

Ряд исследований подтвердил, что изменение сверхспирализации ДНК играет важную роль в регуляции экспрессии генов бактерий при адаптации к стрессовым условиям. Однако имеющиеся данные получены в основном на отдельных генах репортерных плазмид гетеротрофных бактерий *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, и *Salmonella typhimurium* (Aoyama and Takanami, 1988; Franco and Drlica, 1989; Adamčik *et al.*, 2002). Развитие технологии ДНК-микрочипов, которая позволяет изучать изменения в экспрессии практически всех генов организма, расширяет возможности исследований в данном направлении. Использование этого метода уже показало важную роль сверхспирализации ДНК в регуляции экспрессии генов в условиях солевого стресса у *E. coli* (Cheung *et al.*, 2003). У этого же организма изучен общий транскрипционный ответ на добавление ингибитора ДНК-гиразы новобиоцина (Peter *et al.*, 2004). Но влияние сверхспирализации ДНК на глобальную экспрессию генов у других организмов и при воздействии других абиотических стрессов до сих пор остается неизученным. Это и определяет актуальность исследования и сравнения роли сверхспирализации ДНК в регуляции стресс-индуцируемых генов у организмов с иным типом метаболизма, например автотрофных, при воздействии различных стрессовых факторов.

Одноклеточная цианобактерия *Synechocystis* sp. PCC 6803 представляет собой особенно удобный и интересный объект для исследования данной проблемы. *Synechocystis* широко используется как модель для изучения фотосинтеза, текучести мембран, а также стрессовых ответов, их восприятия и регуляции. Для нашего исследования мы выбрали солевой, холодовой и тепловой стрессы, ответы на которые у *Synechocystis* достаточно хорошо изучены на уровне транскрипции, определены функции многих генов, необходимых для адаптации, и известны некоторые пути восприятия и регуляции этих стрессовых ответов (Los *et al.*, 2008). Топологическое

состояние ДНК чувствительно к этим воздействиям, и поэтому можно предположить, что сверхспирализация ДНК принимает важное участие в регуляции ответов на эти стрессы. Использование ДНК-микрочипов с почти полным набором генов *Synechocystis* (94 %) позволяет исследовать роль сверхспирализации ДНК в глобальной экспрессии генов стрессового ответа. Уже имеющиеся данные по регуляции ответа на эти воздействия дают возможность обсуждать взаимодействие сверхспирализации ДНК с другими системами регуляции.

Цели и задачи работы. Целью работы являлось изучение роли сверхспирализации ДНК в регуляции экспрессии стресс-индуцируемых генов у цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 в условиях солевого, холодого и теплового стрессов. В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать влияние ингибитора ДНК-гиразы новобиоцина на экспрессию генов при солевом, холодом и тепловом стрессах.
2. Провести кластерный анализ экспрессии генов стрессового ответа в присутствии и отсутствии новобиоцина.
3. Выяснить влияние изменений степени сверхспирализации ДНК на функционирование систем восприятия и передачи стрессовых сигналов.

Научная новизна. Впервые изучено влияние ингибитора ДНК-гиразы новобиоцина на экспрессию целого генома *Synechocystis* при солевом, холодом и тепловом стрессах и показана необходимость высокого уровня отрицательной сверхспирализации для индукции большинства генов холодого и солевого стрессов у *Synechocystis*. Впервые показано, что часть генов ответа на холодогой и солевой стрессы, которые не контролируются известными двухкомпонентными системами, регулируются изменением степени сверхспирализации ДНК.

Научно-практическое значение. Полученные результаты позволяют глубже понять молекулярные механизмы, лежащие в основе стрессовых ответов фотосинтезирующих клеток, и могут быть использованы для дальнейшего изучения регуляции ответа на абиотические стрессы у бактерий. Наша концепция о роли изменений сверхспирализации геномной ДНК в регуляции транскрипции генов стрессового ответа представлена в ряде обзорных работ (Los and Zinchenko, 2009; Los *et al.*, 2010) и может быть использована при чтении курсов лекций по микробиологии и физиологии растений.

Апробация работы. Материалы, вошедшие в диссертационную работу, были представлены на Всероссийской научной конференции с международным участием «Физиология и генетика микроорганизмов в природных и экспериментальных системах» и V молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2009); Всероссийской научной конференции «Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам окружающей среды» (Иркутск, 2009); III Всероссийском симпозиуме «Физиология

трансгенного растения и фундаментальные основы биобезопасности» и на Всероссийском симпозиуме «Растение и стресс» (Москва, 2010).

Публикации. Имеется 19 печатных работ, из них 8 - в отечественных и зарубежных рецензируемых изданиях. По теме диссертации опубликовано 8 работ, из которых 3 – в рецензируемых журналах.

Структура диссертации. Диссертация состоит из разделов: Введение, Обзор литературы, Объекты и методы исследований, Результаты, Обсуждение результатов, Заключение, Выводы, Литература, Приложения. Работа изложена на 164 страницах машинописного текста, содержит 18 рисунков, 1 таблицу, 4 приложения. Список литературы включает 277 наименований.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Штаммы цианобактерий. Штамм цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 дикого типа GT был предоставлен Национальным Институтом Общей Биологии (NIBB, Оказaki, Япония). Штамм *Synechocystis* с плазмидой pVZ321, способной автономно реплицироваться в цианобактериях (GenBank №.AF100176, Зинченко и др., 1999), был получен методом трехродительского скрещивания. Для этого на среде LB выращивали ночные культуры двух штаммов *E. coli* C-600, один из которых был трансформирован плазмидой R751, содержащей кассету устойчивости к триметаприму, а второй - плазмидой pVZ321, содержащей кассеты устойчивости к канамицину и хлорамфениколу. Оба штамма были получены от проф. Зинченко В.В., каф. генетики Биологического факультета МГУ. Для трансформации *Synechocystis* выращивали в интенсивной культуре до $ОП_{750}=0,6-0,8$. После смешивания по 0,1 мл культуры каждого штамма *E. coli* и 0,5 мл культуры *Synechocystis* клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали осадок в 50 мкл среды BG11. Затем смесь наносили на мембранный фильтр, который помещали на ночь на чашки со средой, содержащей BG11 и LB в равной пропорции. Затем перемещали фильтр на чашки с BG11 с добавлением 10 мкг/мл канамицина. Первичные клоны последовательно пересекали с увеличением концентрации канамицина до 25 мкг/мл. Штамм *Synechocystis*, устойчивый к новобиоцину (NBres), был получен в результате спонтанной мутации в гене *gyrB* при выращивании клеток дикого типа на среде с добавлением 20 мкг/мл новобиоцина. Выросшие клоны затем последовательно пересекали на среды с увеличением концентрации новобиоцина до 200 мкг/мл. Наличие мутации в гене *gyrB* проверяли рестриктным анализом.

Условия культивирования. Культуры штаммов *Synechocystis* поддерживали на чашках Петри на агаризованной среде BG11 и в колбах на жидкой среде BG11, содержащей 20 mM HEPES-NaOH, pH 7.5 (Stanier *et al.*, 1971), при температуре 32 °C и постоянном освещении 10 мкмоль квантов света/м²/с. Штамм *Synechocystis*, содержащий плазмиду pVZ321, поддерживали на среде, содержащей 25 мкг/мл канамицина. Устойчивый к новобиоцину штамм *Synechocystis* поддерживали на

среде, содержащей 200 мкг/мл новобиоцина. Интенсивные культуры выращивали в сосудах с 200 мл среды BG11 при температуре 32 °С, постоянном освещении 70 мкмоль квантов света/м²/с и аэрации стерильной газовой смесью, содержащей 1,5-2 % CO₂.

Экспериментальные условия. В экспериментах использовали интенсивные культуры, выращенные до экспоненциальной фазы (4 сут, ОП₇₅₀=0,8-1). Для уменьшения уровня сверхспирализации добавляли новобиоцин до конечной концентрации 50 мкг/мл и инкубировали 30 минут в нормальных условиях роста. Затем клетки помещали в условия солевого, холодого или теплового стресса на 30 мин. Условия солевого стресса создавали добавлением в среду культивирования 5 М раствора NaCl до конечной концентрации 0,5 М. В контрольный вариант добавляли соответствующее количество среды BG-11, чтобы избежать эффекта разбавления. Условия холодого и теплового стрессов создавали помещением сосудов с культурой в водяную баню с температурой 22 °С и 44 °С соответственно. Штамм NBres выращивали для эксперимента в тех же условиях, что и дикий тип, но при постоянном присутствии новобиоцина в концентрации 50 мкг/мл.

Выделение плазмидной ДНК из клеток *Synechocystis*. Клетки из 100 мл культуры *Synechocystis* фиксировали с помощью равного объема охлажденного этанола, содержащего 0,2 % фенола, и осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 2200 g и 4 °С (центрифуга Eppendorf 5804R). Осадок ресуспендировали в 1 мл буфера TE 50/50 (50 мМ Трис-HCl, 50 мМ ЭДТА, pH 8,0), добавляли 0,2 мл хлороформа, и интенсивно встряхивали смесь в течение 5 мин, после чего осаждали и отбирали водную фракцию с клетками. Клетки осаждали центрифугированием 15 мин при 16000 g и 4 °С (центрифуга Eppendorf 5415R), осадок ресуспендировали в 280 мкл STET-буфера (8 % сахароза, 5 % тритон X-100, 50 мМ ЭДТА, 50 мМ Трис-HCl) (Holmes and Quigley, 1981). К суспензии добавляли 20 мкл лизоцима (20 мг/мл в STET-буфере) и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Клетки лизировали добавлением 600 мкл лизирующей смеси (0,2 М NaOH, 1 % SDS) и инкубировали 10 мин при 4 °С. Затем добавляли 600 мкл 2,55 М раствора ацетата калия (pH 4,8), инкубировали 10 мин при 4 °С. После этого осветляли лизат центрифугированием при 16000 g в течение 15 мин при 4 °С, к супернатанту добавляли 720 мкл изопропанола и выдерживали в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее осаждали 15 мин при 16000 g и дважды промывали осадок 70 % этанолом. Растворяли осадок в 200 мкл TE 50/100 и дважды обрабатывали равным объемом смеси фенола с хлороформом (1:1). Затем осаждали ДНК в течение ночи при -20 °С тройным объемом 96 % этанола, промывали 70 % этанолом и подсушивали под вакуумом в течение 4 мин. Осадок растворяли в 20-50 мкл TE.

Разделение форм плазмидной ДНК и саузерн-блот гибридизация. Для проведения гибридизации по методу саузерн-блот наносили по 5 мкг плазмидной ДНК на 1,5 % агарозный гель, содержащий 20 мкг/мл хлорохина для лучшего

разделения топоизомеров плазмидной ДНК, и электрофоретически разделяли 7 ч в буфере TBE при 35 В и комнатной температуре. В качестве зондов для гибридизации использовали кассету устойчивости к канамицину.

Выделение РНК. Выделение общей клеточной РНК проводили согласно общепринятой методике (Kiseleva *et al.*, 2000).

Анализ экспрессии генов с помощью ДНК-микрочипов проводили совместно с лабораторией клеточной регуляции Национального Института общей биологии Японии. ДНК-микрочипы *Synechocystis* (CyanoCHIP ver. 1.6) были получены от TaKaRaBio Co. Ltd. (Otsu, Japan). Микрочипы содержали 3079 из 3264 открытых рамок считывания *Synechocystis*. Меченную флуорофорами Cy3 и Cy5 кДНК синтезировали обратной транскрипцией 20 мкг общей клеточной РНК. Гибридизацию проводили при 65 °С 16 часов. Гибридизованные чипы отмывали 2xSSC (1xSSC: 150 mM NaCl, 15 mM цитрат натрия) при комнатной температуре, затем 2xSSC 10 мин при 60 °С, 0,2xSSC, 0,1 % SDS 10 мин при 60 °С и в конце 2 мин дистиллированной водой при комнатной температуре. Микрочипы сканировали на сканнере GMS418 (Affimetrix, Woburn, MA) с последующим анализом интенсивности сигнала каждого гена при помощи программы ImaGene ver. 5.5 (BioDiscovery, Los Angeles, CA). Для расчета уровня транскрипции каждого гена его сигнал в микрочипе нормализовали по сумме интенсивностей сигналов всех генов, за исключением генов рРНК. Затем рассчитывали фактор индукции (ФИ), показывающий изменения в количестве транскрипта каждого гена по отношению к общему уровню мРНК по сравнению с контролем (32 °С, без добавления новобиоцина). Все эксперименты проводили в двух или трех повторностях.

Кластерный анализ экспрессии генов. Метод агломеративной иерархической кластеризации позволяет расположить исследуемые гены в древовидную структуру, где эти гены объединяются по уровню сходства их экспрессии в разных условиях. Причиной сходства экспрессии группы генов в различных условиях может быть какой-то общий регулятор транскрипции или расположение этих генов в одном опероне. На первом этапе кластерного анализа считается матрица расстояний между всеми генами. Дальше начинается процесс кластеризации. Агломеративная иерархическая обработка данных состоит из повторных циклов, в каждом из которых два самых сходных объекта, между которыми наименьшее расстояние, объединяются в одну ветвь дерева, причем длина этой ветви соответствует уровню сходства между объединенными элементами. Два объединенных объекта удаляются из списка и заменяются элементом, представляющим полученную новую ветвь. Считается расстояние между новым элементом и оставшимися элементами, и процесс повторяется до тех пор, пока не останется только один элемент (Eisen and de Hoop 2002). Мы проводили иерархический кластерный анализ с использованием программы Cluster 3.0 (Eisen *et al.*, 1998; <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>). Средние арифметические значения ФИ всех 3079 генов из семи экспериментов, а

именно: нормальные условия роста с добавлением новобиоцина, солевой, холодной и тепловой стрессы в присутствии и отсутствии новобиоцина, были логарифмированы, так как ФИ являются относительной величиной. В результате логарифмирования значений ФИ увеличению и уменьшению экспрессии в одинаковое количество раз соответствуют равные числа с противоположным знаком. Так как значимым изменением экспрессии считалось изменение не менее чем в два раза, было выбрано логарифмирование по основанию 2. Для кластерного анализа были выбраны гены с $|\log_2(\text{ФИ})| \geq 1$ хотя бы в двух случаях. Данным условиям соответствовало 1160 генов. Для расчета уровня сходства между генами использовали Евклидово расстояние. Евклидово расстояние учитывает разницу между уровнями экспрессии двух генов. Кластеры объединяли по методу полной связи. При кластеризации по этому методу за расстояние между двумя элементами x и y выбирается максимальное из всех попарных расстояний элементов, входящих в состав x и y . Полученные кластеры были визуализированы при помощи программы TreeView 1.60 (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>).

Нозерн-блот гибридизация. Для проведения гибридизации по методу нозерн-блот 10 мкг общей клеточной РНК денатурировали, а затем разделяли методом электрофореза в денатурирующем 1,2 %-агарозном формальдегидном геле 1,5 часа при 50 В и комнатной температуре. После этого РНК переносили на нейлоновую мембрану Hybond N (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция) полусухим переносом. Мембрану с нанесенной РНК гибридизовали с несколькими зондами. В качестве зондов использовались ПЦР-продукты генов, индуцируемых соответствующим стрессом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение сверхспирализации плазмидной ДНК в клетках *Synechocystis* под воздействием стрессовых условий в присутствии и отсутствии новобиоцина. Для исследования изменений сверхспирализации плазмидной ДНК в клетках *Synechocystis* под воздействием разных абиотических стрессов был использован трансформант, содержащий кроме своих семи плазмид (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/Synechocystis>) сконструированную ранее плазмиду pVZ321 (GenBank №.AF100176, Зинченко и др., 1999).

Все плазмиды *Synechocystis* реплицируются по механизму «катящегося колеса» (Xu and McFadden 1997; Yang and McFadden, 1994; 2000). Рекомбинантная плаزمида pVZ321 реплицируется с использованием тех же ферментов (Зинченко и др., 1999), а значит и тем же способом. Следовательно, в культуре часть плазмид всегда находится в одноцепочечной, часть - в релаксированной, а часть - в сверхспирализованной форме. Поэтому наблюдать классическое распределение топоизомеров, как у плазмид, реплицирующихся по тета-механизму (например, плазмиды *E. coli* или *B. subtilis*), на плаزمиде *Synechocystis* невозможно. Поскольку скорость прохождения плазмиды через агарозный гель зависит от ее формы, то релаксированная ДНК имеет

минимальную скорость, одноцепочечная ДНК двигается быстрее релаксированной ДНК. Сверхспирализованные двухцепочечные формы имеют промежуточные скорости.

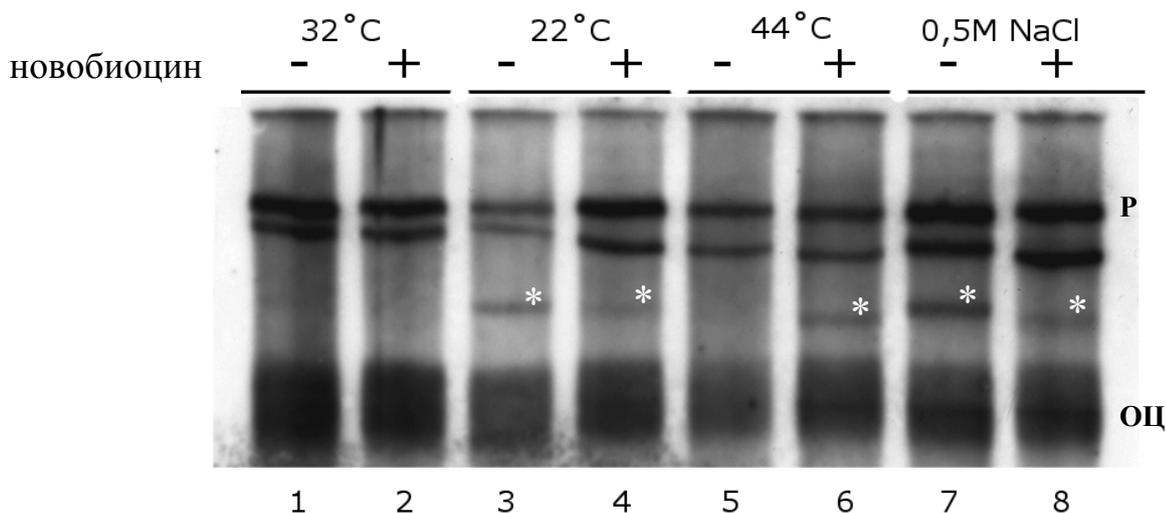


Рис. 1. Изменение степени сверхспирализации плазмиды pVZ321 в клетках *Synechocystis* при холодном, тепловом и солевом стрессах в отсутствии и присутствии новобиоцина. Визуализацию топоизомеров ДНК плазмиды pVZ321, разделенных в агарозном геле с 20 мкг/мл хлорохина, проводили с помощью Саузерн-блот гибридизации. На дорожки загружали по 5 мкг плазмидной ДНК; в качестве зонда использовали ДНК кассеты устойчивости к канамицину. Дорожки 1, 2 – контроль (32 °C); 3, 4 – холодовой стресс (22 °C, 30 мин); 5, 6 – тепловой стресс (44 °C, 30 мин); 7, 8 – солевой стресс (0,5 М NaCl, 30 мин); 1,3,5,7 – без новобиоцина; 2,4,6,8 – с добавлением новобиоцина. Р – релаксированная форма плазмидной ДНК; ОЦ – одноцепочечная форма плазмидной ДНК. Белой звездочкой (*) отмечен топоизомер плазмидной ДНК, которого не было в контроле. На рисунке представлены результаты одного из трех опытов.

В контрольных условиях (32 °C) какого-то значительного действия новобиоцина на топоизомерные формы плазмиды не наблюдалось (дорожки 1 и 2 на Рис. 1). При холодном стрессе появлялась дополнительная полоса, соответствующая новому по сравнению с контролем сверхспирализованному топоизомеру (дорожка 3 на Рис. 1). Добавление новобиоцина приводило к почти полному исчезновению этой полосы (дорожка 4 на Рис. 1), следовательно, эта форма плазмидной ДНК появилась при участии ДНК-гиразы. Солевой стресс вызывал появление похожей по подвижности полосы, и добавление новобиоцина также приводило к уменьшению количества этого топоизомера (дорожки 7 и 8 Рис. 1). Эти результаты согласуются с данными других исследователей: холодовой и солевой шок приводят к увеличению отрицательной сверхспирализации ДНК (Goldstein and Drlica, 1984; Hsieh *et al.*, 1991 б), а новобиоцин препятствует этому увеличению. При тепловом стрессе без новобиоцина состав топоизомеров не отличался от контрольного варианта (дорожка 5 на Рис. 1). Однако при добавлении новобиоцина появлялся новый топоизомер, близкий по

подвижности к топоизомерам, образовавшимся при солевом и холодном стрессах без новобиоцина (дорожка 6 на Рис. 1). Исходя из этого, можно предположить, что при тепловом стрессе ДНК-гираза принимает участие в регуляции сверхспирализации ДНК.

Действие новобиоцина на экспрессию генов в нормальных условиях роста. В нормальных условиях инкубация клеток *Synechocystis* с новобиоцином в концентрации 50 мкг/мл в течение 60 мин влияла на экспрессию всего лишь четырех генов. Добавление новобиоцина приводило к усилению экспрессии гена *gyrB*, кодирующего субъединицу GyrB ДНК-гиразы, и гена *lexA*, кодирующего репрессор генов SOS-ответа и к ингибированию экспрессии гена *nlpD*, кодирующего липопротеин, и гена *topA* топоизомеразы I.

Так как новобиоцин связывается именно с субъединицей GyrB ДНК-гиразы (Maxwell, 1997), увеличение количества транскриптов *gyrB* может быть ответом на снижение уровня активной ДНК-гиразы в клетке. Аналогично, ингибирование экспрессии гена *topA* топоизомеразы I, имеющей обратное действие на уровень сверхспирализации ДНК по сравнению с ДНК-гиразой, может отражать действие гомеостатического механизма, поддерживающего сверхспирализацию ДНК на определенном уровне. Причины увеличения экспрессии гена *lexA* неизвестны, но ранее было показано, что новобиоцин у *B. subtilis* может влиять на транскрипцию генов SOS-ответа (Osburne *et al.*, 1988), к которым принадлежит и *lexA*. Причины изменения экспрессии гена *nlpD* также неизвестны.

Основная роль ДНК-гиразы – образование отрицательных сверхвитков для поддержания постоянного уровня сверхспирализации (Reese and Maxwell, 1991) и удаление избыточных положительных сверхвитков после транскрипции и репликации (Liu and Wang 1987; Levine *et al.*, 1998). Так как ингибирование ДНК-гиразы в течение часа не приводило к значительным изменениям в экспрессии генов у *Synechocystis*, то можно предположить, что для поддержания нормальной экспрессии генов в отсутствие стрессовых воздействий нет необходимости в ДНК-гиразе (по крайней мере в такой промежуток времени). Этим *Synechocystis* принципиально отличается от *E. coli*. У этой бактерии после релаксации ДНК при нормальных условиях роста (в том числе и с помощью добавления новобиоцина в концентрации 50 мкг/мл, 5 мин) изменялась транскрипция 306 генов (Peter *et al.*, 2004). Возможно, это отличие связано с более интенсивным метаболизмом у *E. coli* (для сравнения, время удвоения интенсивной культуры *E. coli* порядка 20 мин, время удвоения интенсивной культуры *Synechocystis* порядка 25 часов). Таким образом, у *Synechocystis* в нормальных условиях ингибирование ДНК-гиразы в течение часа не успевает привести к глобальным нарушениям сверхспирализации или, возможно, у этого организма срабатывают гомеостатические механизмы, такие как снижение активности топоизомеразы I (мы показали, что экспрессия гена *topA* действительно снижается при добавлении новобиоцина).

Действие новобиоцина на экспрессию генов, индуцируемых солевым стрессом. Увеличение концентрации NaCl в среде до 0,5 М индуцировало экспрессию 294 генов с ФИ ≥ 2 без новобиоцина и 286 генов в его присутствии. По типу изменения экспрессии в зависимости от присутствия новобиоцина эти гены можно разделить на три группы. В первую группу вошли гены, которые значительно индуцировались солевым стрессом, и их индукция снижалась в присутствии новобиоцина. Многие из этих генов кодируют белки, необходимые для адаптации к солевому стрессу: белки общего стрессового ответа, такие как шапероны HspA, DnaK2, GroEL2, ClpB1, супероксиддисмутаза SodB; ферменты GlpD, GgpS и StrA, отвечающие за синтез глюкозил-глицерина (ГГ) и его предшественников; субъединицы транспортера ГГ GgtABC; Na⁺/H⁺ антипортер NhaS6; две металлопротеазы FtsH; белки, необходимые для деградации фикобилисом NblA1, NblA2; РНК-хеликаза CrhR; белки HliABC, защищающие ФСП при воздействии различных стрессовых условий; регуляторные белки, такие как гистидин-киназа Hik34, альтернативные сигма-факторы РНК-полимеразы SigB и SigD, серин-треониновая протеинкиназа SpkH, фактор транскрипции NdhR. Вторая группа включает гены, слабо индуцируемые солевым стрессом, экспрессия которых усиливалась в присутствии новобиоцина. Это гены *ziaA*, *feoB*, *rre40*, *dapA* и некоторые гены с неизвестной функцией. В третью группу объединены гены, индукция которых не зависела от присутствия новобиоцина: *htrA*, *dnaJ*, *menG* и несколько генов с неизвестной функцией. Сюда также относится оперон *sll1862-sll1863*, транскрипция которого индуцируется сильнее других генов в условиях солевого стресса (Marin *et al.*, 2004).

Результаты, полученные с помощью ДНК-микрочипов, были проверены и подтверждены нозерн-блот гибридизацией с зондами для генов, экспрессия которых изменялась в условиях солевого стресса. Продукты большинства этих генов играют важную роль в ответе клеток на солевой стресс. Это гены *slr1544*, *clpB1*, *hliB*, *ggtB*, *ggpS*, *groEL2*, *crhR*, *spkH*, *sigD*, *hspA*, *hik34*, *sigB*, *sodB* из группы 1, ген *feoB* из группы 2 и ген *sll1863* из группы 3.

Солевой стресс, вызванный NaCl, приводит к увеличению сверхспирализации ДНК у бактерий (Krispin and Allmansberger, 1995). Мы показали, что у *Synechocystis* добавление новобиоцина уменьшает экспрессию многих генов, индуцируемых солевым стрессом. Это гены, кодирующие ключевые ферменты, необходимые для адаптации к стрессовым условиям, включая гены так называемых белков теплового шока и гены ферментов, необходимых для синтеза осмопротектора ГГ, а также гены транспортной системы ГГ. Следовательно, для экспрессии этих генов *Synechocystis*, индуцируемых солевым стрессом, необходим высокий уровень отрицательной сверхспирализации ДНК. Полученные нами результаты соответствует известным из литературы данным для других бактерий. Так, увеличение сверхспирализации бактериальной ДНК, вызванное солевым и осмотическим шоком, приводит к

активации промотора оперона *proU*, который кодирует белок транспортной системы осмолита глицин-бетаина у *E. coli* и *S. typhimurium* (Higgins *et al.*, 1988; Jordi *et al.*, 1995). Также увеличение отрицательной сверхспирализации необходимо для индукции функционально значимой группы генов, активируемых в ответ на добавление NaCl, в том числе генов биосинтеза осмопротекторов (Cheung *et al.*, 2003).

Действие новобиоцина на экспрессию генов, индуцируемых холодovým стрессом. Холодовой стресс индуцировал транскрипцию 202 генов с ФИ ≥ 2 без новобиоцина и 271 гена в его присутствии. По изменению экспрессии под действием новобиоцина индуцируемые холодovým стрессом гены можно разделить на две группы. В первую вошли гены, экспрессия которых при холодovém шоке уменьшалась под действием новобиоцина. Это хорошо известные индуцируемые холодом гены *ndhD2*, *crhR*, *hliB*, *hliC*, *fus*, *rbpA1*, *rlpA* и несколько генов, умеренно индуцируемые холодом, такие как гены десатураз *desA*, *desB*, *desD* (Los and Murata, 1999). Во вторую группу вошли гены, экспрессия которых при холодovém стрессе увеличивалась в присутствии новобиоцина, в то время как без добавления новобиоцина их индукция была незначительна или отсутствовала. Это такие гены, как *feoB*, *sigD*, *hik31*, *hik3*, *dapA*, *petC2*, *pilA1*, *tatD*, *ziaA* и гены с неизвестной функцией. Результаты, полученные с помощью ДНК-микрочипов, были проверены и подтверждены нозерн-блот гибридизацией с зондами для генов *ndhD2*, *crhR*, *hliB*, *slr1544*, *rbpA1* из группы 1 и с зондами для генов *sll1862* и *sigD* из группы 2.

Холодовой стресс вызывает увеличение кручения в замкнутых молекулах ДНК, что приводит к повышению активности ДНК-гиразы, которая вводит компенсаторные негативные сверхвитки (López-García and Forterre, 2000) и таким образом облегчает расхождение цепей ДНК во время транскрипции и репликации. Было показано, что холодовой стресс приводит к временному увеличению отрицательной сверхспирализации плазмидной ДНК эубактерий (Grau *et al.*, 1994; Krispin and Allmansberger, 1995) и специфичного участка ДНК *Synechocystis* (Los, 2004). Так как новобиоцин приводит к снижению уровня отрицательной сверхспирализации ДНК, а полученные нами результаты показывают, что его добавление снижает уровень экспрессии большинства индуцируемых холодovým стрессом генов, можно сделать вывод, что для индуцируемой холодovým стрессом экспрессии генов необходим высокий уровень отрицательной сверхспирализации ДНК. Такие предположения делались и раньше, исходя из влияния сверхспирализации ДНК на экспрессию отдельных генов холодového шока (Mizushima *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 2002; Los, 2004;) но нам впервые удалось убедительно это показать на примере глобальной экспрессии генов *Synechocystis*.

Так как солевой и холодовой стрессы вызывают увеличение отрицательной сверхспирализации ДНК, можно ожидать, что новобиоцин окажет сходное действие на экспрессию по крайней мере некоторых групп генов, индуцируемых солевым и холодovým стрессами. Действительно, при солевом и холодovém стрессе

увеличивалась экспрессия таких генов, как *crhR*, *hliB*, *hliC*, *slr1544*, *slr1483*, *ssr2016*, *slr0236*. Добавление новобиоцина предотвращало индукцию этих генов в условиях солевого и холодового стрессов. С другой стороны, новобиоцин в этих условиях усиливал экспрессию генов *ziaA*, *dapA*, *sll0462*, *slr1927*, *slr1851*. Полученные нами результаты показывают сходство в наборе генов, экспрессируемых в условиях холодового и солевого стрессов, и предполагают зависимость регуляции экспрессии генов от изменения общего уровня сверхспирализации, вызванного стрессовыми условиями и связанного с действием ДНК-гиразы.

Действие новобиоцина на экспрессию генов, индуцируемых тепловым стрессом. Тепловой стресс индуцировал транскрипцию 85 генов с $FI \geq 2$ без новобиоцина и 516 генов при его добавлении. По типу изменения экспрессии в зависимости от присутствия новобиоцина эти гены можно разделить на три группы. В первую группу генов, у которых индукция тепловым шоком уменьшалась в присутствии новобиоцина, вошли гены шаперонов *htpG*, *groESL*, *groEL2*, *dnaK2*, супероксиддисмутазы *sodB*, протеазы *clpB2* и некоторые другие гены с неизвестной функцией. Вторую, самую большую, группу составили гены, индукция которых тепловым стрессом увеличивалась в присутствии новобиоцина. Это как гены, индукция которых тепловым стрессом значительна и без добавления новобиоцина (*dnaJ*, *sigB*, *htrA*), так и множество других, которые не индуцируются тепловым стрессом без добавления новобиоцина. Третья группа представлена генами, на экспрессию которых новобиоцин не оказывал существенного влияния, она достаточно мала и состоит из *hspA*, *clpB1*, *ctpA* и одного гена с неизвестной функцией. Результаты, полученные с помощью ДНК-микрочипов, были проверены и подтверждены нозерн-блот гибридизацией с зондами для генов *groEL2*, *groES*, *sodB* из группы 1, с зондом для гена *sigB* группы 2 и с зондом для гена *hspA* группы 3. Таким образом, можно предположить, что индуцированная тепловым стрессом экспрессия генов коррелирует с изменениями сверхспирализации ДНК и действие ДНК-гиразы необходимо, скорее, для репрессии при тепловом стрессе генов группы 2.

Тепловой стресс уменьшает степень закручивания одной цепи вокруг другой, так как нагревание ведет к расхождению цепей ДНК. Уменьшение кручения может распределяться неравномерно, образуя денатурированные области, которые могут быть идеальным субстратом для топоизомеразы I, которая предпочитает связываться с одноцепочечными областями ДНК (Wang, 1996). Под действием топоизомеразы I уровень негативной сверхспирализации будет уменьшаться (Ueshima *et al.*, 1989; Tse-Dinh *et al.*, 1997; López-García and Forterre, 2000). Предполагается, что зависимость от температуры активности ДНК-гиразы и топоизомеразы I может быть ключевым фактором в контроле топологии ДНК в стрессовых условиях, и, таким образом, в регуляции экспрессии стресс-индуцируемых генов. Огромное количество генов второй группы, индуцируемых при добавлении новобиоцина в условиях

теплового стресса, может свидетельствовать об излишней релаксации ДНК: при тепловом стрессе повышается активность топоизомеразы I, релаксирующей ДНК (Ogata *et al.*, 1994), тогда как ДНК-гираза, отвечающая за снятие излишней релаксации ингибирована новобиоцином. При таком высоком уровне релаксации возможно нарушение регуляции экспрессии, например из-за того, что репрессоры перестают связываться с релаксированной ДНК.

У *Synechocystis* мы не наблюдали ни усиления экспрессии генов белков теплового шока (БТШ) при добавлении новобиоцина в нормальных условиях, ни увеличения времени экспрессии этих генов при добавлении новобиоцина в условиях теплового стресса. По всей видимости, у *Synechocystis*, в отличие от *E. coli* (Peter *et al.*, 2004), релаксация ДНК не является достаточным сигналом для синтеза генов БТШ.

Холодовой и тепловой стрессы оказывают противоположное действие на сверхспирализацию ДНК. У *Synechocystis* практически нет генов, которые бы значительно индуцировались обоими стрессами. Однако ингибирование ДНК-гиразы новобиоцином приводит к усилению индукции генов, которые обычно не реагируют на повышение температуры. Например, гены *ziaA*, *dapA*, *tatD*, *asd*, *sll1862-sll1863*, *sll0462*, *slr0550*, *slr1927* и *slr1851* индуцировались в присутствии новобиоцина и при холодном, и при тепловом стрессе. Важно отметить, что похожие закономерности наблюдались и при действии солевого стресса в присутствии новобиоцина. Таким образом, неспособность ингибированной ДНК-гиразы поддерживать достаточный уровень отрицательной сверхспирализации ДНК приводит к активации генов (в большинстве случаев с неизвестной функцией) стрессовыми условиями, независимо от природы стресса.

Действие новобиоцина на экспрессию стресс-индуцируемых генов у штамма NBres. Мы показали, что устойчивость к новобиоцину у штамма NBres обеспечивает спонтанная мутация в гене *gyrB*, описанная у *Synechocystis* ранее (Los, 2004). Исследование ростовых характеристик подтвердило устойчивость NBres к новобиоцину в опытных условиях при интенсивном культивировании. Мы проверили методом нозерн-блот гибридизации влияние новобиоцина на некоторые стресс-индуцируемые гены, экспрессия которых уменьшалась в присутствии новобиоцина в диком типе. У штамма NBres индукция этих генов стрессовыми условиями в присутствии новобиоцина сохранялась (Рис.2). Это подтверждает наше предположение, что снижение индукции этих генов обусловлено именно ингибированием ДНК-гиразы.

Кластерный анализ экспрессии генов *Synechocystis* в нормальных условиях, в условиях солевого, холодного и теплового стрессов без новобиоцина и в его присутствии. Кластерный анализ позволяет расположить гены в группы в соответствии со сходными особенностями их экспрессии в различных условиях. Попадание генов в один кластер может свидетельствовать об их участии в каком-то одном процессе и/или о наличии общего регулятора транскрипции. Данные,

полученные в результате кластерного анализа, графически отображаются в виде цветной таблицы (Рис. 3), где каждая ячейка отображает уровень экспрессии каждого гена (ряды) при данном воздействии (столбцы) по сравнению с контролем. Желтое окрашивание соответствует увеличению экспрессии по сравнению с контролем, синее окрашивание – снижению экспрессии, черное окрашивание – отсутствию изменений экспрессии. Интенсивность окрашивания зависит от величины изменения экспрессии.

Кластерный анализ показал, что существует три большие группы генов, экспрессия которых менялась по-разному в ответ на стрессовые воздействия и добавление новобиоцина (Рис. 3). В первую группу (540 генов) входят гены, экспрессия которых уменьшается в стрессовых условиях при добавлении новобиоцина и которые практически не индуцируются в стрессовых условиях. В основном это гены, отвечающие за синтез пигментов, формирование и работу фотосинтетического аппарата, фиксацию CO₂, синтез ферментов пентозофосфатного цикла, синтез нуклеотидов, аминокислот, полисахаридов. Эта группа содержит также один нетипичный кластер генов (кластер 3 на Рис. 3), индуцируемых холодом и ингибируемых добавлением новобиоцина. Сюда входят хорошо изученные гены десатураз жирных кислот, а также гены, отвечающие за синтез соединений, входящих в состав клеточной стенки.

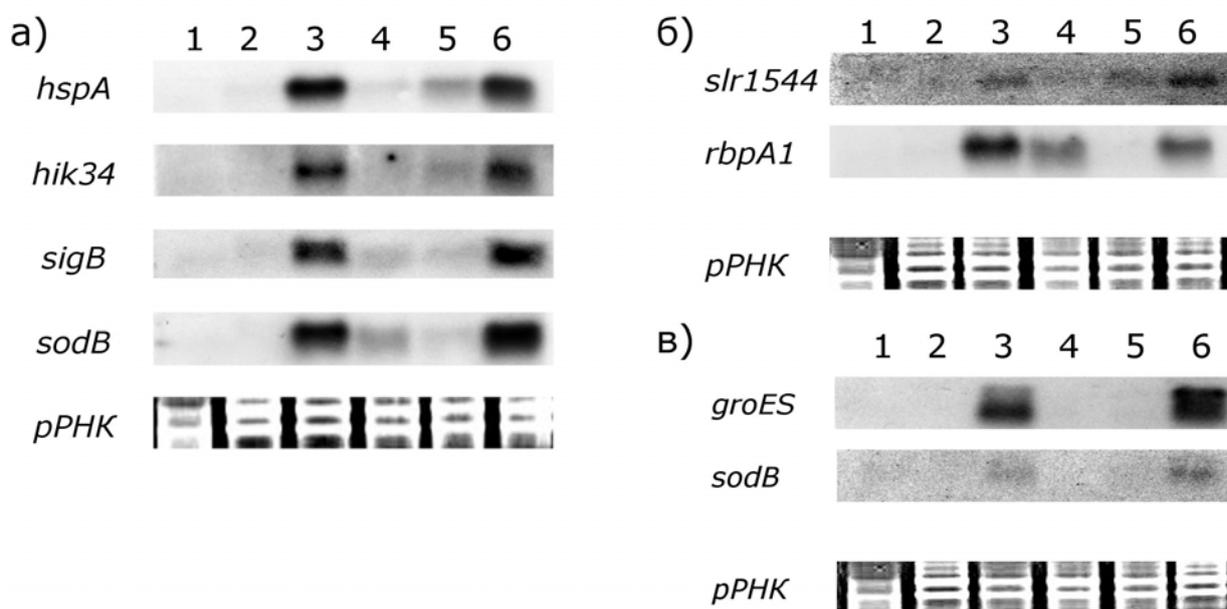


Рис. 2 Нозерн-блот анализ экспрессии генов у штамма, устойчивого к новобиоцину при солевом (а), холодовом (б) и тепловом (в) стрессах. РНК из клеток дикого типа (1-4): 1 - выращенных при 32°C без добавления новобиоцина; 2 – после инкубации в течение 60 мин с 50 мкг/мл новобиоцина; 3 - после инкубации в течение 30 мин в стрессовых условиях без новобиоцина; 4 - после инкубации в течение 30 мин в стрессовых условиях с 50 мкг/мл новобиоцина; РНК из клеток мутанта, устойчивого к новобиоцину (5,6): 5 - выращенных при 32°C с 50 мкг/мл новобиоцина; 6 – после инкубации в течение 30 мин в стрессовых условиях с 50 мкг/мл новобиоцина. В качестве контроля показана рРНК, окрашенная бромистым этидием (по 2 мкг общей клеточной РНК на дорожке).

Во вторую группу (361 ген) входят гены, индуцируемые одним или несколькими стрессами, их экспрессия регулируется новобиотином по-разному в зависимости от типа стрессовых условий. В эту группу входит кластер, состоящий в основном из генов рибосомных белков и тРНК, генов, отвечающих за синтез аминокислот и нуклеотидов, генов аминоацил-тРНК синтетаз и трансляционных факторов инициации (кластер 11 на Рис. 3). Экспрессия этих генов несколько увеличивается при солевом и холодном стрессах. При добавлении новобиотина в условиях солевого стресса экспрессия уменьшается, а в условиях холодного стресса меняется по-разному. Подобная индукция солевым и холодным стрессами генов, необходимых для процесса трансляции, наблюдалась также у дрожжей (Yale and Bohnert, 2001). Можно предположить, что индуцированная стрессом экспрессия генов, участвующих в поддержании трансляционного аппарата (Los and Murata, 1999), в условиях солевого и раннего холодного стрессов является общей особенностью прокариотических и эукариотических одноклеточных организмов. Так как добавление новобиотина снижает экспрессию многих генов этого кластера в условиях солевого стресса, можно говорить о важности достаточного уровня отрицательной сверхспирализации для экспрессии этих генов.

В третью группу (259 генов) входят гены, уровень экспрессии которых в основном выше в присутствии новобиотина при стрессовых условиях, чем в контрольных условиях. Эта группа состоит из трех подгрупп, различающихся по степени своей индуцибельности. В первую подгруппу объединяются гены, слабо индуцируемые солевым и/или холодным стрессами, но сильно индуцируемые при добавлении новобиотина. Это гены, кодирующие различные трансмембранные транспортеры, белки, участвующие в хемотаксисе, в репликации, транскрипции и в регуляции этих процессов. Во вторую подгруппу входят гены, экспрессия которых значительно увеличивается в условиях солевого и/или холодного стрессов, а в присутствии новобиотина их индуцибельность уменьшается. Типичный представитель этой подгруппы кластер 24 (Рис. 3). Сюда входят хорошо известные индуцируемые холодным и/или солевым стрессом гены *hliA*, *hliB*, *hliC*, *feoB*, *ndhD2*, *crhR*, *sigD* и др. В регуляции многих генов этого кластера при солевом и холодном стрессах участвует гистидин-киназа Hik33 (Shoumskaya *et al.*, 2005; Los *et al.*, 2008). Большинству генов кластера 24 для индукции необходим высокий уровень сверхспирализации, возникающий при холодном и солевом стрессах. Третья подгруппа состоит из одного кластера генов, экспрессия которых не меняется при холодном стрессе и увеличивается при солевом и тепловом стрессах (кластер 25 на Рис. 3). Добавление новобиотина снижает индуцибельность этих генов в условиях солевого стресса, но не оказывает большого влияния при тепловом стрессе. Это гены шаперонов, протеаз, супероксиддисмутазы, сигма-фактора В, РНК-полимеразы, гистидин-киназы Hik34 и другие. В кластере 25 находятся 16 генов из 25, контролируемых Hik34-Rre1 и все гены, контролируемые Hik16-Hik41-Rre17 и Hik10-

Rre3 при солевом стрессе (Paithoonrangsarid *et al.*, 2004; Shoumskaya *et al.*, 2005). Гистидин-киназа Hik34 участвует также в регуляции экспрессии многих из этих генов при тепловом стрессе (Suzuki *et al.*, 2005). Возможно, гены кластера 25 объединяет регуляция с помощью Hik34 и SigB.

Влияние изменений сверхспирализации ДНК на функционирование систем восприятия и передачи стрессовых сигналов. Показано, что экспрессию многих генов солевого стресса регулируют пять двухкомпонентных систем (Paithoonrangsarid *et al.*, 2004; Shoumskaya *et al.*, 2005), также была выделена группа генов, которая не регулировалась ни одной из этих систем (в том числе и гены биосинтеза ГГ *ggpS* и *stpA*). В нашей работе мы обнаружили, что экспрессия некоторых из этих генов (*glpD*, *ggpS*, *stpA*, *ggtABC*, *ndhR*, *sll1862*, *sll1863* и других генов с неизвестной функцией) зависит от степени сверхспирализации ДНК (Рис. 4).

Релаксация ДНК, вызванная новобиоцином, влияет также на индукцию генов, находящихся под контролем Hik33-Rre31, Hik16-Hik41-Rre17 и Hik34-Rre1 (Рис. 4). Индукция самого гена *hik34* уменьшается в присутствии новобиоцина. Возможно, именно это является причиной снижения экспрессии генов *groELS*, *dnaK2*, *htpG*, *sodB*, *sigB*, *clpB1*, но, учитывая, что стрессовое воздействие длилось всего 30 мин, более вероятным представляется прямое участие сверхспирализации в регуляции экспрессии этих генов. Надо отметить, что повышение уровня сверхспирализации необходимо также для индукции генов, кодирующих другие регуляторы ответа на солевой стресс, такие как альтернативные сигма-факторы *sigD* и *sigB* и транскрипционный фактор *ndhR*.

Сигнал от двухкомпонентной системы Hik33-Rre26 абсолютно необходим для индукции холодным стрессом таких генов, как *ndhD2*, *hliA*, *hliB*, *hliC*, *sigD*, *fus*, *fole*, *feoB*, *crtP*, *slr1544* (Рис. 5). Наши результаты показывают, что действие двухкомпонентной системы Hik33-Rre26 – не единственное условие для индукции генов *ndhD2*, *hliA*, *hliB*, *hliC*, *fus*, *feoB*, *crtP*, *slr1544*. Добавление новобиоцина значительно снижает индуцируемую холодным стрессом экспрессию этих генов, а в случае *fus* и *crtP* индукция полностью отсутствует. Можно предположить, что для индукции этих генов, кроме сигнала от двухкомпонентной системы, нужен высокий уровень отрицательной сверхспирализации, возникающий при холодном стрессе, причем для генов *fus* и *crtP* это необходимое условие. В случае с *fole* уровень отрицательной сверхспирализации не важен, для экспрессии *sigD* более благоприятно снижение уровня сверхспирализации. Для индукции холодным стрессом этих генов, по всей видимости, достаточно сигнала от системы Hik33-Rre26. Двухкомпонентная система Hik33-Rre26 участвует также в регуляции экспрессии генов *crhR*, *desB*, *slr0082*, но для них показана необходимость дополнительных регуляторов, так как у мутанта по Hik33 индукция этих генов холодным стрессом сохраняется, хотя и значительно уменьшается.

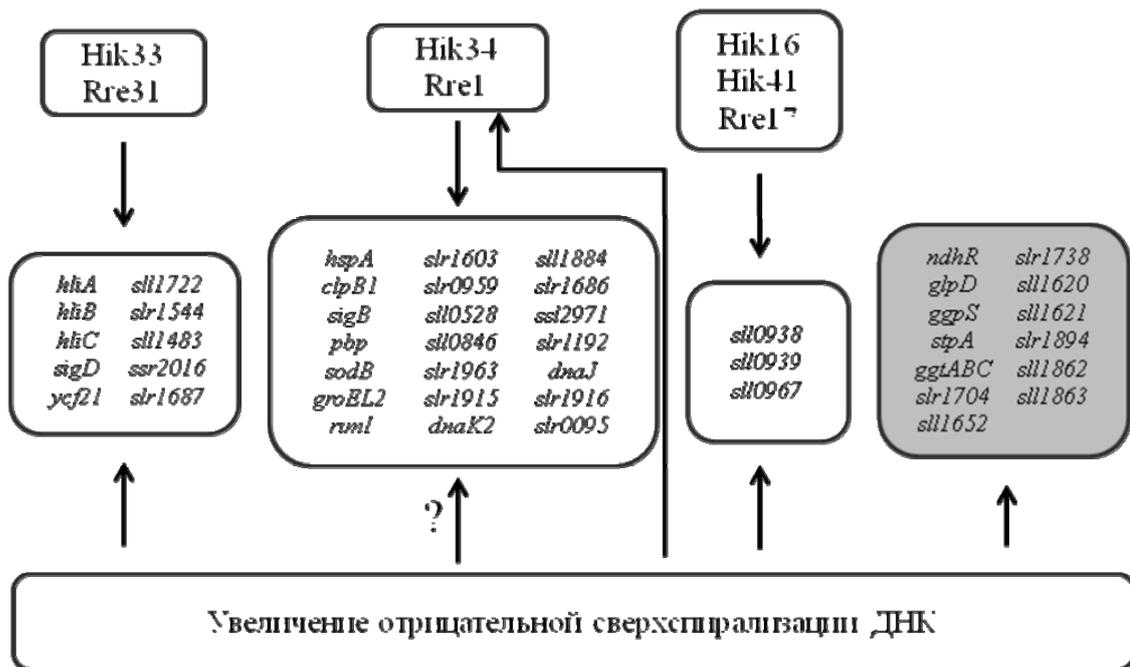


Рис. 4. Вызванное солевым стрессом увеличение отрицательной сверхспирализации ДНК принимает участие в регуляции генов, находящихся под контролем двухкомпонентных систем Hik33-Rre31, Hik34-Rrel1, Hik16-Hik41-Rrel17. В случае Hik34-Rrel1 участие сверхспирализации может быть прямым (стрелка с вопросительным знаком) или через регуляцию экспрессии *hik34* (изогнутая стрелка). Гены, изображенные в окрашенной области, не регулируются ни одной из двухкомпонентных систем, но регулируются сверхспирализацией ДНК



Рис. 5. Вызванное холодовым стрессом увеличение отрицательной сверхспирализации ДНК принимает участие в регуляции генов, находящихся под контролем двухкомпонентной системы Hik33-Rre26,. Возможно также наличие дополнительного регулятора (обозначен вопросительным знаком). Гены, изображенные в окрашенном прямоугольнике, не регулируются Hik33-Rre26, но регулируются сверхспирализацией ДНК.

Наши данные показывают, что увеличение отрицательной сверхспирализации ДНК при холодовом стрессе влияет на температурозависимую экспрессию генов *desB* и *crhR*. Уровень сверхспирализации ДНК может быть по крайней мере одним из дополнительных регуляторов экспрессии *crhR* и *desB*.

Для генов *rpbA*, *rlpA*, *mutS*, *cbiO* способ передачи холодового сигнала до сих пор был не известен. Наши данные свидетельствуют, что таким сигналом может быть повышение отрицательной сверхспирализации, вызванное холодовым стрессом, так как добавление новобиоцина вызывает снижение экспрессии этих генов при холодовом стрессе. По всей видимости, есть и дополнительные регуляторы, так как добавление новобиоцина уменьшает экспрессию *rpbA*, но она остается выше, чем в контроле.

Возможно, что увеличение отрицательной сверхспирализации ДНК при снижении температуры приводит к изменению промоторного расстояния или к изменению доступности регуляторных последовательностей, которые узнаются РНК-полимеразой или индуцируемыми холодовым стрессом транскрипционными факторами. Важность степени сверхспирализации ДНК для такого узнавания была показана на плаزمиде с промоторами, имеющими спейсер разной длины и на плазмиде с энхансерными последовательностями (Aoyama and Takanami, 1988; Liu *et al.*, 2001). Для гена *rpbA* было показано, что в регуляции холодовым стрессом этого гена может участвовать 5'-нетранслируемая область (5'-НТО, Ehira *et al.*, 2003). Предполагается, что *rpbA* имеет конститутивно работающий промотор, но в нормальных условиях роста его работе препятствует один или несколько связанных с 5'-НТО белков. При снижении температуры этот ДНК-белковый комплекс диссоциирует, и экспрессия гена *rpbA* резко увеличивается (Sato and Nakamura, 1998). Возможно, изменение уровня сверхспирализации является причиной диссоциации этих белков при холодовом стрессе.

Hik34 – это единственная известная гистидин-киназа, которая участвует в регуляции ответа на тепловой стресс у *Synechocystis* (Suzuki *et al.*, 2005). Эта сенсорная гистидин-киназа также регулирует много генов, индуцируемых гиперосмотическим (Paithoonrangsarid *et al.*, 2004) и солевым стрессами (Shoumskaya *et al.*, 2005). Hik34 действует как репрессор индуцируемых тепловым шоком генов при нормальных физиологических температурах (Suzuki *et al.*, 2005). Таким образом, увеличение экспрессии *hik34* в условиях теплового стресса в присутствии новобиоцина может приводить к снижению экспрессии ряда генов.

ВЫВОДЫ

1. Для индукции генов солевого и холодового стресса необходим высокий уровень отрицательной сверхспирализации геномной ДНК, о чем свидетельствует снижение транскрипции большинства генов в присутствии ингибитора ДНК-гиразы – новобиоцина.
2. Активная ДНК-гираза создает условия, приводящие к подавлению транскрипции многих генов при высоких температурах, и ее ингибирование новобиоцином существенно увеличивает количество генов, индуцируемых тепловым стрессом.
3. Кластерный анализ выявил три основные группы генов в зависимости от их реакции на изменение сверхспирализации ДНК при стрессовых воздействиях: (1) гены, экспрессия которых в присутствии новобиоцина уменьшается при всех стрессовых воздействиях и которые практически не индуцируются в стрессовых условиях; (2) гены, индуцируемые одним или несколькими стрессами, их экспрессия регулируется новобиоцином по-разному в зависимости от типа стрессовых условий; (3) гены, которые в основном индуцируются в присутствии новобиоцина при всех видах стрессового воздействия.
4. Транскрипция большинства генов, контролируемых ранее изученными двухкомпонентными системами регуляции при солевом, холодовом и тепловом стрессах, зависит от степени сверхспирализации геномной ДНК.
5. Часть генов ответа на холодовой и солевой стрессы, которые не контролируются известными двухкомпонентными системами, регулируются изменением степени сверхспирализации ДНК.
6. Изменения степени сверхспирализации ДНК, вызываемые разными стрессовыми факторами, играют важную роль в регуляции экспрессии генов стрессового ответа, по-видимому, либо регулируя транскрипцию этих генов непосредственно за счет изменения структуры промоторной области, либо опосредованно – создавая условия для связывания регуляторных белков с регуляторными областями ДНК.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ:

1. **Синетова М.А.**, Маркелова А.Г., Лось Д.А. (2006) Влияние азотного голодания на ультраструктуру и пигментный состав хлоропластов кислотермофильной микроводоросли *Galdieria sulphuraria*. *Физиология растений* 53: 172-181.
2. Dudoladova, M.V., Kupriyanova E.V., Markelova A.G., **Sinetova M.**, Allakhverdiev S.I., Pronina N.A. (2007) The thylakoid carbonic anhydrase associated with photosystem II is the component of inorganic carbon accumulating system in cells of halo- and alkaliphilic cyanobacterium *Rhabdoderma lineare*. *Biochimica et Biophysica Acta (Bioenergetics)* 1767: 616-623.
3. Маркелова А.Г., **Синетова М.А.**, Куприянова Е.В., Пронина Н.А. (2009) Распределение и функциональная роль карбоангидразы Cah3 в тилакоидной мембране хлоропласта и пиреноида *Chlamydomonas reinhardtii*. *Физиология растений* 56: 844-853.

4. Пронина Н.А., Куприянова Е.В., Маркелова А.Г., **Синетова М.А.** (2009) Роль пиреноида как метаболического микрокомпартамента в увеличении эффективности фотосинтеза. *Бюллетень МОИП. Отдел биологический*. Т. 114: 183-185.
5. Зорина А.А., **Синетова М.А.**, Лось Д.А. (2009) Участие серин-треониновой протеинкиназы SpkK в регуляции ответа на тепловой стресс у цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Бюллетень МОИП. Отдел биологический*. 114: 129-130.
6. **Синетова М.А.**, Зорина А.А., Лось Д.А. (2009) Сверхспирализация ДНК влияет на экспрессию стресс-индуцируемых генов *Synechocystis* sp. PCC 6803 в условиях холодого и солевого стресса. *Бюллетень МОИП. Отдел биологический* 114: 142-144.
7. Prakash J.S.S., **Sinetova M.**, Kupriyanova E., Zorina A., Suzuki I., Murata N., Los D.A. (2009) DNA supercoiling regulates the stress-inducible expression of genes in the cyanobacterium *Synechocystis*. *Molecular BioSystems* 5: 1904-1912.
8. Los D.A., Zorina A., **Sinetova M.**, Kryazhov S., Mironov K., Zinchenko V.V. (2010) Stress sensors and signal transducers in cyanobacteria. *Sensors* 10: 2386-2415.
9. **Синетова М.А.**, Зорина А.А., Лось Д.А. (2009) Участие сверхспирализации ДНК в регуляции стресс-зависимой экспрессии генов у цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. Материалы Всероссийской научной конференции «Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды», 24-28 августа 2009 г. – Иркутск: НИЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН, с. 421-424.
10. **Синетова М.А.**, Зорина А.А., Лось Д.А. (2009) Участие сверхспирализации ДНК в регуляции экспрессии стресс-индуцируемых генов цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. Тезисы V молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии». Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, 26-27 октября 2009 г., с. 54-55.
11. **Синетова М.А.**, Миронов К.С., Зорина А.А., Зинченко В.В., Лось Д.А. (2010) Функциональная геномика цианобактерий: мутагенез регуляторных компонентов, вовлеченных в стрессовые ответы. Тезисы трудов III-го Всероссийского симпозиума «Физиология трансгенного растения и фундаментальные основы биобезопасности». Москва, 18-21 октября 2010 г., с.74.
12. Лось Д.А., Зорина А.А., **Синетова М.А.**, Миронов К.С. (2010) Сенсорные системы цианобактерий. Тезисы Всероссийского симпозиума «Растение и стресс», Москва, 9-12 ноября 2010 г., с. 221.
13. **Синетова М.А.**, Зорина А.А., Лось Д.А. (2010) Сверхспирализация ДНК участвует в регуляции экспрессии стресс-индуцируемых генов цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. Тезисы Всероссийского симпозиума «Растение и стресс», Москва, 9-12 ноября 2010 г. с. 321.