

На правах рукописи



**Зорина
Анна Алексеевна**

**Роль серин-треониновых протеинкиназ
в регуляции ответа на тепловой стресс
цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803**

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, г. Москва

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Лось Дмитрий Анатольевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Кокшарова Ольга Алексеевна

доктор биологических наук

Трофимова Марина Сергеевна

Ведущая организация: Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Защита состоится «21» декабря 2010 г. в 13 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: (499) 977-80-18, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института 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. Основными компонентами систем передачи сигналов в клетках эукариот являются серин-треониновые протеинкиназы (СТПК) (Hunter, 1995), тогда как для прокариот долгое время характерными считались исключительно двухкомпонентные системы. Благодаря проектам по определению нуклеотидных последовательностей целых геномов, гомологи СТПК эукариотического типа были обнаружены у множества бактерий (Kennelly, 2002; 2003). Так, в геноме *Bacillus subtilis* обнаружено 4 гена (Kunst *et al.*, 1997), у *Mycobacterium tuberculosis* - 11 генов (Wehenkel *et al.*, 2008; Molle and Kremer, 2010), а в геноме *Mycococcus xanthus* закодировано почти 100 генов протеинкиназ эукариотического типа (Nariya and Inoue, 2005). Изученные СТПК бактерий вовлечены в регуляцию работы ферментов первичного метаболизма, а также контролируют экспрессию некоторых генов.

Среди цианобактерий распространение данного типа ферментов неоднородно. Например, в геноме наиболее изучаемых цианобактерий *Anabaena* sp. PCC 7120 (Kaneko *et al.*, 2001; Ohmori *et al.*, 2001) и *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1996; 2003) обнаружено 52 и 12 генов СТПК соответственно (Leonard *et al.*, 1998).

К настоящему времени функционально охарактеризованы лишь немногие СТПК. Показано, что гены *spkA* (Kamei *et al.*, 2001; Panichkin *et al.*, 2006) и *spkB* (Kamei *et al.*, 2003) кодируют белки, принимающие участие в формировании пилей и контролирующие подвижность клеток *Synechocystis*. Протеинкиназа SpkC может участвовать в регуляции азотного метаболизма (Galkin *et al.*, 2003), а SpkD по всей видимости вовлечена в регуляцию соотношения метаболитов цикла трикарбоновых кислот в зависимости от количества неорганического углерода в питательной среде (Laurent *et al.*, 2008). Тем не менее, функции большинства СТПК цианобактерий остаются неизученными. Кроме того, сведения о потенциальных субстратах протеинкиназ в клетках этих организмов скудны и разрозненны.

Цели и задачи работы. Целью настоящей работы было изучение роли серин-треониновых протеинкиназ в регуляции ответа на тепловой стресс цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

1. Получить мутантные штаммы *Synechocystis* дефектные по генам серин-треониновых протеинкиназ и изучить фенотипические проявления мутаций в нормальных условиях и при высокотемпературном стрессе.
2. Изучить динамику транскрипции генов, индуцируемых высокими температурами, в клетках дикого типа и в полученных мутантных штаммах.
3. Изучить влияние высокотемпературного стресса на фосфорилирование *in vitro* белков, выделенных из клеток *Synechocystis*.
4. Провести поиск предполагаемого клеточного субстрата серин-треониновых протеинкиназ.

Научная новизна. Впервые исследовано участие СТПК цианобактерии *Synechocystis* в ответе организма на тепловой стресс. Показано изменение экспрессии группы индуцируемых тепловым шоком генов у мутантов по СТПК. Идентифицировано 7 белков – потенциальных субстратов СТПК в клетках *Synechocystis*. Определены протеинкиназы, отвечающие за фосфорилирование низкомолекулярного белка теплового шока GroES, а также предложена схема взаимодействия исследованных ферментов с уже известными белками, принимающими участие в восприятии и передаче сигналов теплового стресса.

Научно-практическое значение. Полученные результаты позволяют глубже понять молекулярные механизмы, лежащие в основе стрессовых ответов фотосинтезирующих клеток, и могут быть использованы как для дальнейшего изучения роли СТПК в клетках прокариот, так и уточнения их положения в сигнальных каскадах. Наши работы о роли СТПК в ответах клеток на тепловой стресс вошли в ряд обзорных статей и монографий (Allakhverdiev *et al.*, 2010; Los *et al.*, 2010; Лось, 2010). Они могут быть использованы при чтении курсов лекций по микробиологии, молекулярной биологии, физиологии и биохимии растений.

Апробация работы. Основные результаты научной работы были представлены на конференции молодых ученых ИФР РАН (Москва, 2009), на V молодежной школе-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2009), на Всероссийских научных конференциях «Физиология и генетика микроорганизмов в природных и экспериментальных системах» (Москва, 2009), «Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды» (Иркутск, 2009), «Физиология трансгенного растения и фундаментальные основы биобезопасности» (Москва, 2010) и «Растение и стресс» (Москва, 2010).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ.

Структура диссертации. Диссертация состоит из разделов: введение, обзор литературы, объекты и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы. Работа изложена на 115 страницах машинописного текста, включает 15 рисунков, 3 таблицы. Список литературы включает 160 наименований.

Объекты и методы исследования

Штаммы цианобактерий, использованные в работе. Штамм цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 дикого типа GS получен из коллекции культур кафедры генетики МГУ им. М.В. Ломоносова (Grigorieva and Shestakov, 1982). Штаммы дефектные по генам протеинкиназ *spkB-spkL* и транскрипционному фактору *hrcA* получены методом сайт-направленного мутагенеза с применением генов устойчивости к канамицину (Km), спектиномицину (Sp), хлорамфениколу (Cm) или грамицидину (Gm). Штамм мутантный по гистидинкиназе Hik34 (Suzuki *et al.*, 2005) получен из штамма GT (Williams, 1988).

Конструирование мутантных штаммов *Synechocystis* дефектных по генам СТПК и *hrcA*. Последовательности индивидуальных генов протеинкиназ амплифицировали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). Полученные фрагменты ДНК клонировали в вектор pGEM[®]-T, pGEM[®]-T Easy (Promega), pT7Blue-T (Novagen), или pUC18 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985). В клонированные последовательности вставляли кассеты устойчивости к антибиотикам, транспозон EZ::TN[™] <KAN-2> (Epicentre) или pGPS2.1 (NEB). Отбор трансформантов (Williams, 1988) производили на агаризованной среде BG11 с добавлением соответствующего антибиотика: $\Delta spkF$, $\Delta spkH$, $\Delta spkK$ – Sp (30 мкг/мл), $\Delta spkB$, $\Delta spkD$, $\Delta spkG$ - Km (25 мкг/мл), $\Delta spkA$, $\Delta spkC$, $\Delta spkI$, $\Delta spkJ$, $\Delta spkL$ - Cm (12,5 мкг/мл), $\Delta spkE$ - Gm (10 мкг/мл).

Для получения двойного мутанта по *spkH* и *spkK* использовали амплифицированный ген *spkK*, в который по сайту *Nco* I был вставлен картридж Km^r из плазмиды pUC4KIXX (Pharmacia). Готовой конструкцией трансформировали штамм *Synechocystis* дефектный по гену *spkH*.

Для получения мутанта по *hrcA* соответствующий ген (*sll1670*) амплифицировали с праймерами 5'-TTGGACTGGAATTCTAAGATG и 5'-ТТААТТТТТГСТСААТГСТТ ССГ, клонировали в pT7-Blue и замещали часть гена (по сайту *Eco*91I с затупленными концами) кассетой Km^r, полученной из pUC4K.

Молекулярное клонирование и рестрикционный анализ проводили, используя ферменты фирмы Fermentas (Литва). Выделение плазмид, трансформацию *E. coli* и лигирование фрагментов ДНК осуществляли по общепринятым методикам (Sambrook *et al.*, 1989).

Условия культивирования. Интенсивные культуры выращивали в жидкой среде BG11, забуференной 20 мМ HEPES-NaOH (pH 7,5), при 32°C (контрольные условия), постоянном освещении люминесцентными лампами интенсивностью 70 мкЕ/м²/с и аэрации стерильной газо-воздушной смесью, содержащей 1,5-2,0% CO₂. Клетки выращивали до ОП₇₅₀ = 0,8-1,0. Сосуды с клетками переносили в ванны с водой, нагретой до 44±1°C, на период от 30 мин до 4 сут. Интенсивность роста клеток определяли спектрофотометрически при 750 нм.

Для исследования ультраструктуры клеток методом электронной микроскопии аликвоты суспензии интенсивной культуры клеток дикого типа GS и мутантных штаммов $\Delta spkH$ и $\Delta spkK$ *Synechocystis* подвергали тепловому стрессу в течение одних и трех сут. Подготовку препаратов проводили согласно Маркеловой с соавт. (1990) и анализировали при помощи трансмиссионного микроскопа JEM JEOL X-100 (Япония).

Выделение общей клеточной РНК и нозерн-блоттинг проводили по ранее описанной методике (Kiseleva *et al.*, 2000).

Выделение фракции растворимых белков проводили при 4°C. 100 мл интенсивных культур осаждали центрифугированием 10 мин при 5000 g, осадок промывали в 50 мМ Tris-Cl (pH 7,6) с 10 мМ MgCl₂, а затем ресуспендировали в

буфере для гомогенизации (50 мМ Tris-Cl pH 7,6, 10 мМ MgCl₂, 2 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 1 мМ фенилметилсульфонил фторид (ФМСФ), 2 мМ ЭГТА, 2 мМ Na₃VO₄, 10 мМ NaF, 1мМ бензамидин, 50 мМ β-глицерофосфат и 250 мМ сахароза) и разрушали прессом Френча (French Pressure Cell Press, SLM, American Instruments Co) при 2,8 мПа. Гомогенат центрифугировали 20 мин при 16000 g. Супернатант переводили в 20 мМ MES-КОН (pH 6,5) посредством гель-фильтрации на колонках NAP-5 (GE Healthcare). Содержание белка определяли с бидинхиновым реагентом (BCA Protein Assay, Pierce).

Фосфорилирование белков *in vitro* и разделение меченых белков двумерным электрофорезом (2DE). Фосфорилирование белков *in vitro* проводили в реакционной смеси, содержащей 20 мМ MES-КОН (pH 6,5), 10 мМ MgCl₂, 10 мкМ АТФ, 10 мкКи [γ-³²P]АТФ. Реакцию инициировали добавлением 20-50 мкг белка и проводили в течение 15 мин при 30°C. Фосфорилированные белки осаждали при -20°C 80%-ным ацетоном в присутствии 15% ТСА и 1% 2-меркаптоэтанола. Осадки, промытые 80%-ным ацетоном, растворяли в буфере, содержащем 7,5 М мочевины, 2М тиомочевины, 1% Тритон X-100, 4% CHAPS, 20 мМ ДТТ и 0,2% биолиты pH 3-10 (BioRad). В аналитических целях разделение белков при помощи 2DE осуществляли в цилиндрических гелях по O'Farrell (1975). Для идентификации фосфобелков MALDI-TOF MS продукты реакции фосфорилирования фракционировали в первом направлении на IPG Strips (длина 7 см, диапазон pH 4-7, Bio-Rad) согласно инструкции производителя. Во втором направлении проводили электрофорез по Laemmli (1970). Гели фиксировали в 50% метаноле с 3% фосфорной кислоты, окрашивали коллоидным Кумасси G-250, высушивали и экспонировали с пленкой Biomax MR (Kodak). Вырезанные из 2DE-гелей пятна, соответствующие фосфобелкам, идентифицировали MALDI-TOF MS в центре Постгеномных технологий Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН.

Вестерн блоттинг. После 2DE разделения фосфопротеины переносили на нитроцеллюлозную мембрану (45 мкм, Hybond-C Extra) в Trans-Blot SD Electrophoretic Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad). После автордиографии мембраны обрабатывали кроличьими антителами против смеси белков GroEL и Cpn60 *Synechococcus vulcanus* (Tanaka *et al.*, 1997). Для визуализации использовали антикроличьи антитела, меченые пероксидазой хрена.

Получение рекомбинантного белка GroES. Фрагмент, несущий ген *groES*, амплифицировали из геномной ДНК при помощи ПЦР с праймерами F: 5'-CATATGGCCGCTATTTCC и R: 5'-CTCGAGGGCAACGGAGGC и клонировали в векторе экспрессии pET22b(+) (Novagen) по сайтам *Nde* I и *Xho* I. Рекомбинантный белок GroES, слитый с шестью остатками гистидина на С-конце, экспрессировали в штамме BL21(DE3 pLysS) *E. coli* и очищали при помощи набора Ni²⁺-Sephарозе Protino[®] Ni-IDA Kit (Macherey-Nagel) или методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (FPLC) на Mono Q (GE Healthcare).

Фосфорилирование GroES *in vitro*. 5-10 мкг белка, выделенного из клеток дикого типа GS и 11 мутантов ($\Delta spkB-L$), инкубировали с очищенным GroES (0.04 мг/мл) в течение 15 мин при 30°C в конечном объеме 25 мкл буфера, содержавшего 20 мМ MES-КОН (рН 6,5), 10 мМ MgCl₂, 10 нМ АТФ и 74 КБк [γ -³²P]АТФ. Продукты реакции разделяли в 18% денатурирующем ПААГ. Окрашенные Кумасси R-250 гели, высушивали и экспонировали с пленкой Biomax MR.

Результаты и их обсуждение

Создание коллекции мутантов по генам СТПК. Для исследования функциональной роли СТПК в условиях теплового стресса на основе неподвижного глюкозо-чувствительного штамма (GS) *Synechocystis* мы создали библиотеку мутантов дефектных по генам *spkB* – *spkL*. Ген *spkA* в использованном штамме изначально инактивирован вследствие сдвига рамки считывания, поэтому предварительно была нарушена последовательность этого гена в Пастеровском штамме, для которого характерно наличие неповрежденного гена *spkA*, и показана активность соответствующей протеинкиназы (Panichkin *et al.*, 2006).

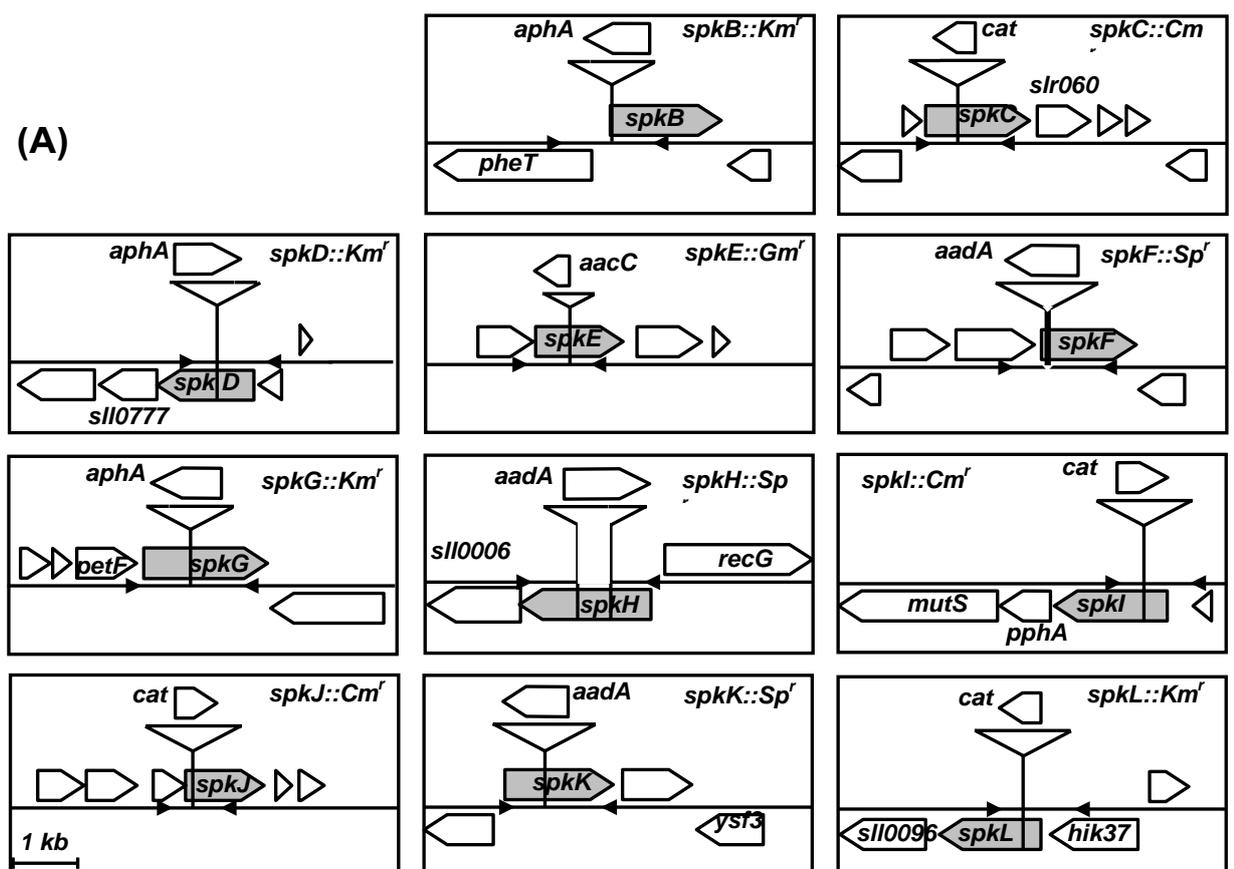
Инсерция кассеты устойчивости осуществлялась так, чтобы нарушить последовательность каталитического домена в СТПК и получить функционально неактивный фермент (Рис. 1А). Во всех мутантных штаммах была достигнута полная сегрегация хромосом (Рис. 1Б).

Скрининг коллекции мутантов по генам СТПК методом нозерн-блот гибридизации. Для идентификации СТПК – возможных компонентов пути передачи сигнала о тепловом стрессе провели скрининг всей коллекции мутантов (*spkB-L*) методом нозерн-блот гибридизации (Рис. 2). При гибридизации образцов РНК с зондами, представляющими собой последовательности генов *hspA*, *slr0967*, *slr0528*, индуцируемых тепловым стрессом, мы обнаружили, что при тепловом шоке только у мутантов $\Delta spkH$ и $\Delta spkK$ наблюдалось ослабление экспрессии по сравнению с диким типом GS.

Эти данные свидетельствуют о влиянии СТПК на экспрессию этой группы генов теплового шока. Более того, при использовании в качестве зонда фрагмента гена *sodB* отличия в степени экспрессии по сравнению с GS наблюдались только у мутанта по протеинкиназе SpkK. В связи с этим в дальнейшем мы сосредоточились на изучении физиологических характеристик именно этих двух мутантных штаммов.

Изучение физиологических и морфологических характеристик. Для оценки влияния повышенных температур на скорости роста культур дикого типа GS и двух мутантных штаммов $\Delta spkH$ и $\Delta spkK$ *Synechocystis* измеряли оптическую плотность образцов, находившихся в контрольных и стрессовых условиях в течение 4 сут. Сравнение ростовых кривых, построенных по результатам серии экспериментов, показало, что при 32°C скорости роста мутантов не отличались, тогда как в условиях теплового шока скорость роста и жизнеспособность мутанта $\Delta spkK$ была выше, чем у

дикого типа и у $\Delta spkH$. Мутант $\Delta spkK$ выжил во всех экспериментах, снижение его скорости роста было менее быстрым.



(Б) *spkA spkB spkC spkD spkE spkF spkG spkH spkI spkJ spkK spkL*
 WT A⁻ WT B⁻ WT C⁻ WT D⁻ WT E⁻ WT F⁻ WT G⁻ WT H⁻ WT I⁻ WT J⁻ WT K⁻ WT L⁻ λ HindIII

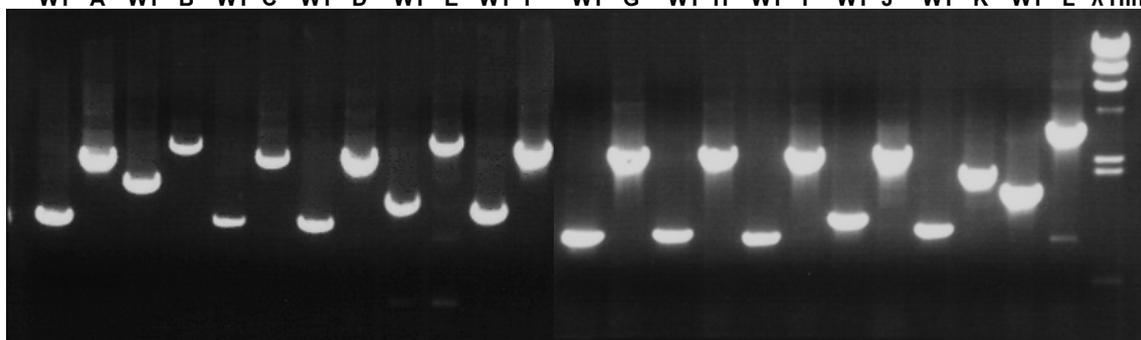


Рис. 1. Конструирование библиотеки мутантов по генам СПК. (А) Схема получения индивидуальных мутантов. (Б) Проверка степени сегрегации мутантных хромосом с помощью ПЦР. WT – клетки дикого типа; *spkB-spkL* (от B⁻ до L⁻) – мутанты по генам протеинкиназ. ДНК бактериофага λ , обработанная *Hind* III, служила в качестве маркера размера фрагментов ДНК.

Для объяснения различий в выживаемости мутантов $\Delta spkH$ и $\Delta spkK$ и дикого типа в условиях теплового шока изучали ультраструктуру клеток цианобактерий. На основании электронно-микроскопического исследования можно заключить, что в нормальных условиях клетки обоих мутантных штаммов не отличаются по ультраструктуре от клеток дикого типа. На снимках видны многочисленные тилакоиды, карбоксисомы, область ДНК, многослойная клеточная стенка.

Единственным отличием являлось наличие у мутанта $\Delta spkH$ включений с низкой электронной плотностью.

Через сутки теплового шока клетки дикого типа и $\Delta spkK$ накапливали значительные количества различных веществ низкой и высокой электронной плотности. У мутанта по гену $spkH$ запасных веществ меньше, клеточное содержимое начало отходить от оболочки, также нарушалось расположение тилакоидов. На третьи сутки стресса количество тилакоидов сократилось у всех исследованных образцов, но у дикого типа и $\Delta spkK$ они сохранили более упорядоченное расположение. Кроме этого, исчезли электронноплотные включения липидной природы и появились многочисленные гранулы гликогена. Фотосинтетический аппарат у мутанта $\Delta spkK$ выглядел менее поврежденным. В клетках же $\Delta spkH$, наоборот, процессы деградации усилились.

Проведенное изучение ультраструктуры клеток дикого типа *Synechocystis* и двух мутантных штаммов дает возможность предположить, что повышенная жизнеспособность мутанта $\Delta spkK$ в условиях стресса связана с наблюдаемыми различиями в накоплении включений на начальных стадиях теплового шока.

Анализ динамики экспрессии генов, индуцируемых тепловым стрессом, у мутантов по генам СТПК методом нозерн-блот гибридизации. Для изучения

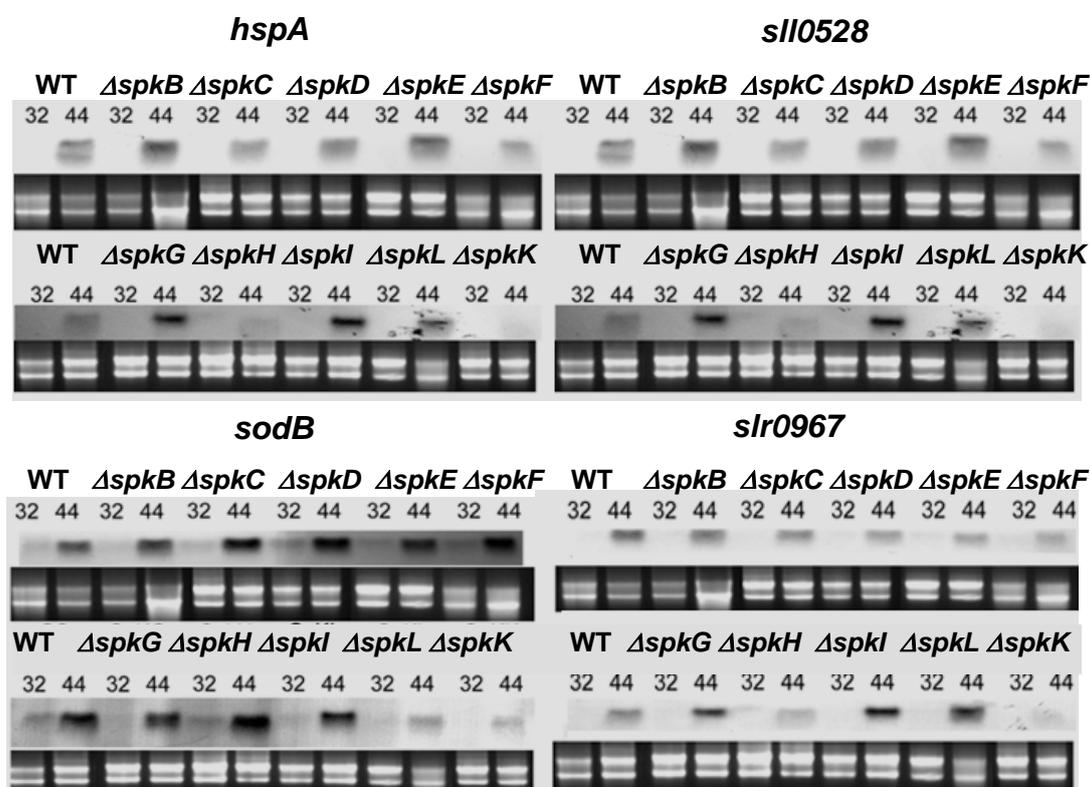


Рис. 2. Результаты скрининга коллекции мутантов по генам СТПК методом нозерн-блот гибридизации. В качестве зондов использованы ПЦР-продукты генов, индуцируемых тепловым стрессом (*hspA*, *sodB*, *slr0967*, *sll0528*). Электрофореграмма рРНК (окраска бромистым этидием) приведена для подтверждения равномерности нанесения образцов общей клеточной РНК. WT – дикий тип, $\Delta spkB$ - $\Delta spkL$ – мутанты по генам СТПК.

участия протеинкиназ SpkH и SpkK в регуляции ответа на тепловой стресс исследовали динамику экспрессии группы стресс-активируемых генов у дикого типа GS и у двух мутантов $\Delta spkH$ и $\Delta spkK$, отобранных по результатам первичного скрининга. В качестве зондов для гибридизации использовали фрагменты генов теплового шока *hspA*, *htpG*, *sigB*, *clpB1*, *sodB*, *groEL2*, *groES*. Исследование выявило отличие кинетики экспрессии у $\Delta spkK$ по сравнению с диким типом и $\Delta spkH$, а именно: наблюдалось запаздывание во времени максимума экспрессии активируемых повышенной температурой генов (Рис. 3).

Так как у мутанта по гену *spkK* удлиняется время экспрессии генов, индуцируемых тепловым шоком, следовательно, можно предположить, что протеинкиназа SpkK регулирует продолжительность транскрипции стрессовых генов и, вероятно, в этом выражается ее участие в ответе цианобактерии *Synechocystis* на тепловой шок.

Исследование динамики экспрессии стресс-индуцируемых генов у двойного мутанта $\Delta spkH/\Delta spkK$. Показанное ранее ослабление индукции экспрессии ряда генов теплового шока у обоих мутантов по СТПК SpkK и SpkH может свидетельствовать о непосредственном взаимодействии этих протеинкиназ в процессе передачи стрессового сигнала. Для проверки этого предположения мы сконструировали рекомбинантный штамм *Synechocystis* дефектный по генам *spkK* (*slr1919*) и *spkH* (*sll0005*). Исследование транскрипции индуцируемых тепловым стрессом генов у мутанта $\Delta spkH/\Delta spkK$ показало сходство динамики накопления транскриптов *clpB* и *sigB* у двойного мутанта и дикого типа (Рис. 3). Однако при этом у двойного мутанта наблюдалась пониженная интенсивность сигнала. Профиль

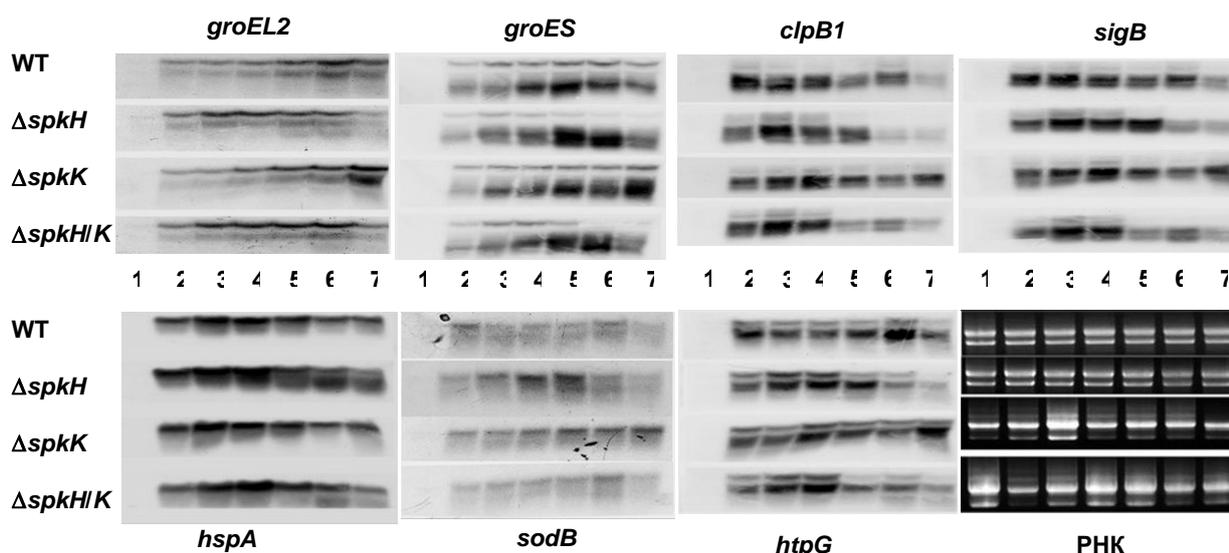


Рис. 3. Нозерн-блот анализ динамики экспрессии генов, индуцируемых тепловым стрессом, у мутантов по генам $\Delta spkH$, $\Delta spkK$ и двойного мутанта $\Delta spkH/\Delta spkK$. Продолжительность теплового стресса: 1 – 0; 2 – 15; 3 – 30; 4 – 60; 5 – 90; 6 – 120; 7 – 180 мин. Электрофореграмма РНК приведена для подтверждения равномерности нанесения образцов.

экспрессии генов *groEL2*, *groES* у двойного мутанта по динамике схож с профилем у мутанта $\Delta spkH$. Динамика экспрессии генов *hspA* и *hspG* сходна: индукция наблюдалась через 15 мин, максимум - через 1 ч после начала температурного воздействия, затем сигнал ослаблялся.

Возможным объяснением наличия сигнала у двойного мутанта в профилях всех исследованных генов и во всех временных точках может быть то, что исследуемые протеинкиназы находятся не в начале сигнального пути.

Фосфорилирование фракции растворимых белков *Synechocystis* по серину и треонину в ответ на высокотемпературное воздействие. Для определения функциональной активности СТПК, мы изучили влияние тепловой обработки на фосфорилирование *in vitro* растворимых белков, выделенных из контрольных и подвергнутых 30-мин тепловому стрессу клеток. Кратковременная обработка клеток не влияла на состав растворимых белков (Рис. 4 А, Б). Тем не менее, очевидно изменение степени фосфорилирования индивидуальных полипептидов (Рис. 4 В, Г).

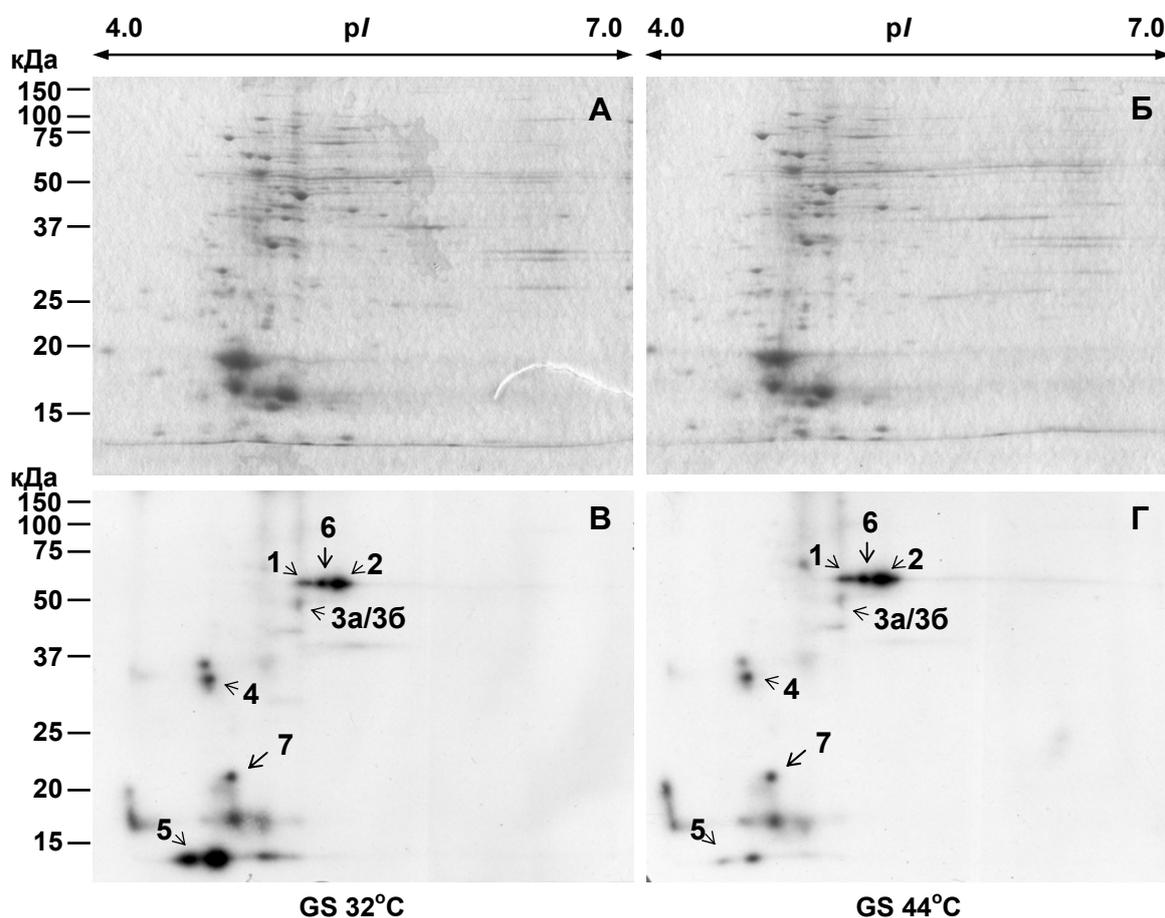


Рис. 4. Результаты 2DE разделения фракции растворимых белков *Synechocystis* из клеток дикого типа GS, выращенных при 32°C (А) и после теплового стресса при 44°C в течение 30 мин (Б). А, Б – гели, окрашенные Кумасси G-250; В, Г – соответствующие радиоавтографы.

Так, уровень фосфорилирования белков # 1 и # 2 более чем в два раза возростал после тепловой обработки. Сигнал фосфорилирования белков # 3а/3б снижался в 1,5

раза, а для белка # 4 существенного изменения не обнаружено. Самый высокий уровень конститутивного фосфорилирования проявлял полипептид # 5. В этом случае интенсивность сигнала снижалась в результате обработки. Таким образом, при повышении температуры существенно изменялась интенсивность серин-треонинового фосфорилирования белков. Особенно важно, что обнаруженное изменение степени фосфорилирования индивидуальных полипептидов является результатом функционирования исключительно серин-треониновых, а не гистидиновых протеинкиназ, поскольку гистидиновый тип фосфорилирования невозможно увидеть при использованных нами условиях обработки ПАА-гелей, осаждении продуктов реакции фосфорилирования *in vitro* в кислой среде, фиксация 2DE-гелей после разделения белков во втором направлении при рН 1.

Наблюдаемые изменения могли быть результатом автофосфорилирования протеинкиназ или свидетельствовать о температурозависимом изменении активности этих ферментов по отношению к субстратам. Для выявления потенциальных субстратов СТПК мы попытались идентифицировать фосфорилированные белки.

Идентификация фосфорилированных белков с помощью MALDI-TOF MS.

Для проведения MALDI-TOF MS анализа мы отобрали по 7 белков, которые обнаруживались как в контрольных, так и в подвергнутых стрессу образцах. Эти белки хорошо и с высокой воспроизводимостью разделялись при 2DE, а их количество было достаточно для идентификации. Фосфопротеины, наблюдаемые при 32°C (Рис. 4 В), были идентичны тем, что наблюдались при 44°C (Рис. 4 Г). Это свидетельствует о непосредственном влиянии повышенной температуры на изменения серин-треонинового фосфорилирования.

Идентифицированные фосфопротеины относятся к нескольким функциональным группам: (1) ферменты основного метаболизма (# 1 - метионил-тРНК-синтетаза, # 2 - большая субъединица RuBisCo, # 3а - 6-фосфоглюконат дегидрогеназа, # 3б - фактор элонгации Tu (TufA) и # 6 – тРНК δ 2-изопентенил пирофосфат трансфераза); (2) белки общего ответа на стресс (# 4 – белок теплового шока GrpE, # 5 – ко-шаперонин GroES), а также (3) белки с неизвестной функцией (# 7).

О фосфорилировании некоторых белков по серину и треонину, попавших в первую группу, сообщалось ранее (Eumann *et al.*, 2007; Masek *et al.*, 2008). Вполне закономерным является обнаружение среди фосфопротеинов второй группы двух белков теплового шока (# 4 и # 5), которые в контрольных образцах *Synechocystis* метились *in vitro* едва ли не наиболее сильно (Рис. 4). Однако после тепловой обработки степень фосфорилирования GrpE (# 4) практически не изменилась, тогда как GroES (# 5) - снизилась. Обнаруженные изменения можно объяснить активацией при стрессе, протеинфосфатаз, различной скоростью синтеза этих белков после действия стресса, либо изменением при тепловой обработке конститутивной активности протеинкиназ.

В качестве предполагаемого субстрата СТПК для дальнейших исследований был выбран 10-кДа шаперонин GroES. Идентификация этого белка удовлетворяла самым жестким критериям: по величине молекулярной массы, значению *pI*, также во всех MS-анализах белок с # 5 расщеплялся на восемь пептидов, которые покрывали 83% аминокислотной последовательности GroES *Synechocystis*.

GroES является субстратом фосфорилирования *in vitro* для протеинкиназ SpkC/F/K. Для того чтобы проверить, может ли GroES быть потенциальным субстратом СТПК, а также установить, какая именно протеинкиназа модифицирует этот белок, при проведении реакции *in vitro* использовали очищенный до электрофоретической гомогенности рекомбинантный GroES. По характеру фосфорилирования рекомбинантного белка все мутанты можно объединить следующим образом.

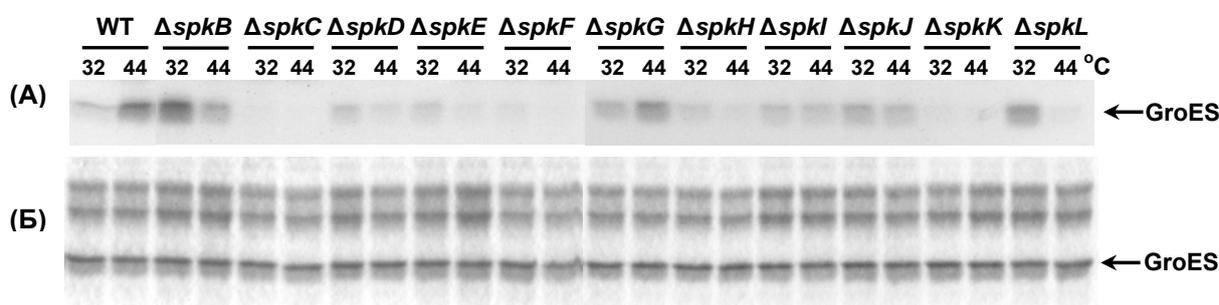


Рис. 5. Фосфорилирование *in vitro* рекомбинантного GroES протеинкиназами из фракции растворимых белков *Synechocystis* sp. PCC 6803 из клеток дикого типа GS и мутантов по генам СТПК (*spkB* - *spkL*), выращенных в нормальных условиях и подвергнутых обработке при 44°C. (A) – автордиограммы, (B) – гели, окрашенные Кумасси R-250.

В диком типе GS и у мутанта *ΔspkG* уровень фосфорилирования GroES был низким при 32°C, а при 44°C-обработке наблюдалось существенное усиление сигнала (Рис. 5 А).

У мутантов по протеинкиназам SpkB и SpkL при 32°C наблюдалось высокое конститутивное фосфорилирование GroES, тепловой стресс вызывал значительное снижение уровня фосфорилирования.

Мутанты *ΔspkD*, *ΔspkE*, *ΔspkH*, *ΔspkI* и *ΔspkJ* при 32°C фосфорилировали субстрат менее интенсивно, чем дикий тип GS и *ΔspkG*, а обработка повышенной температурой приводила к еще более сильному снижению фосфорилирования субстрата.

Наиболее интересными из всех оказались мутанты по генам *spkC*, *spkF* и *spkK*, так как в их белковых препаратах уровень фосфорилирования GroES оказался крайне низким при 32°C, а после 30-мин экспозиции при 44°C фосфорилирование GroES *in vitro* обнаружено не было (Рис.5 А).

Эти факты позволяют заключить, что, во-первых, у *Synechocystis* sp. PCC 6803 GroES может быть мишенью СТПК. Во-вторых, за фосфорилирование этого субстрата могут отвечать протеинкиназы SpkC, SpkF и/или SpkK.

Серин-треониновое фосфорилирование растворимых белков в клетках мутантов $\Delta hrcA$ и $\Delta hik34$: возможное взаимодействие СТПК с гистидинкиназой Hik34 и/или транскрипционным фактором HrcA. Кроме идентификации протеинкиназ, отвечающих за фосфорилирование GroES, весьма интересной задачей представлялось установление характера взаимодействия этих ферментов с уже известными сигнальными системами в клетках *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Показано, что экспрессия ряда генов, кодирующих белки теплового шока, находится под негативным контролем гистидинкиназы Hik34 (Suzuki *et al.*, 2005), а некоторые гены из этой группы (GroESL оперон) также под негативным контролем фактора транскрипции HrcA (Sll1670) (Nakamoto *et al.*, 2003). Можно предположить, что в клетках *Synechocystis* sp. PCC 6803 СТПК могут вовлекаться в пути передачи высокотемпературного сигнала. В таком случае по сравнению с диким типом у обоих мутантов в белковых препаратах, полученных из контрольных образцов, серин-треониновое фосфорилирование должно достигать максимального уровня, что согласовывалось бы с представлениями о HrcA и Hik34 как о негативных регуляторах пути передачи высокотемпературного сигнала.

Действительно, при нормальных условиях выращивания общее серин-треониновое фосфорилирование у мутанта $\Delta HrcA$ было выше, чем в клетках дикого типа GS (Рис. 4 и 6). Наиболее высоко фосфорилированными оказались фосфопептиды с # 1, 2, 4, 6 и 7, а уровень фосфорилирования пептидов # 1, 2 и 6 был даже выше, чем в диком типе GS после тепловой обработки. Если же клетки мутанта подвергались стрессу, то фосфорилирование этих полипептидов усиливалось еще, по крайней мере, в два раза по сравнению с собственным необработанным контролем. Тогда как после обработки степень фосфорилирования полипептида # 4 снижалась, а для фосфопептида # 7 значимых изменений уровня фосфорилирования не обнаружено, то есть его реакция на повышение температуры оказалась сходной с GS.

Все это подтверждает, что HrcA является негативным регулятором, и позволяет предположить, что большинство генов, кодирующих белки, фосфорилируемые по серину и/или треонину, вероятно, находятся под контролем транскрипционного фактора HrcA.

Наиболее существенное отличие мутанта дефектного по HrcA от дикого типа GS заключалось в том, что у мутанта фосфорилированным оказался полипептид, который по молекулярной массе, значению *pI*, а также по реакции с антителами (Рис. 6 В, Г) был определен как 60-кДа шаперонин GroEL. Важно, что этот полипептид обнаруживался только на авторадиограммах белков, выделенных из контрольных образцов $\Delta HrcA$, но не из подвергнутых стрессу. Вместе с тем, этот белок присутствовал во фракциях, полученных как из контрольных, так и из обработанных клеток, что видно по их реакции с антителами против GroEL. Фосфорилирование в условиях *in vitro* позволяет обнаруживать только *de novo* включение радиоактивной метки в полипептид, но не дает представление об уже существующем статусе

фосфорилирования белков в момент проведения реакции. В клетках мутанта $\Delta hrcA$ должна наблюдаться конститутивная экспрессия GroEL и при 32°C, и при 44°C. Вероятно, этот белок активно фосфорилируется уже при 32°C, поэтому экспозиция клеток при 44°C в течение 30 мин не приводит к увеличению включения метки.

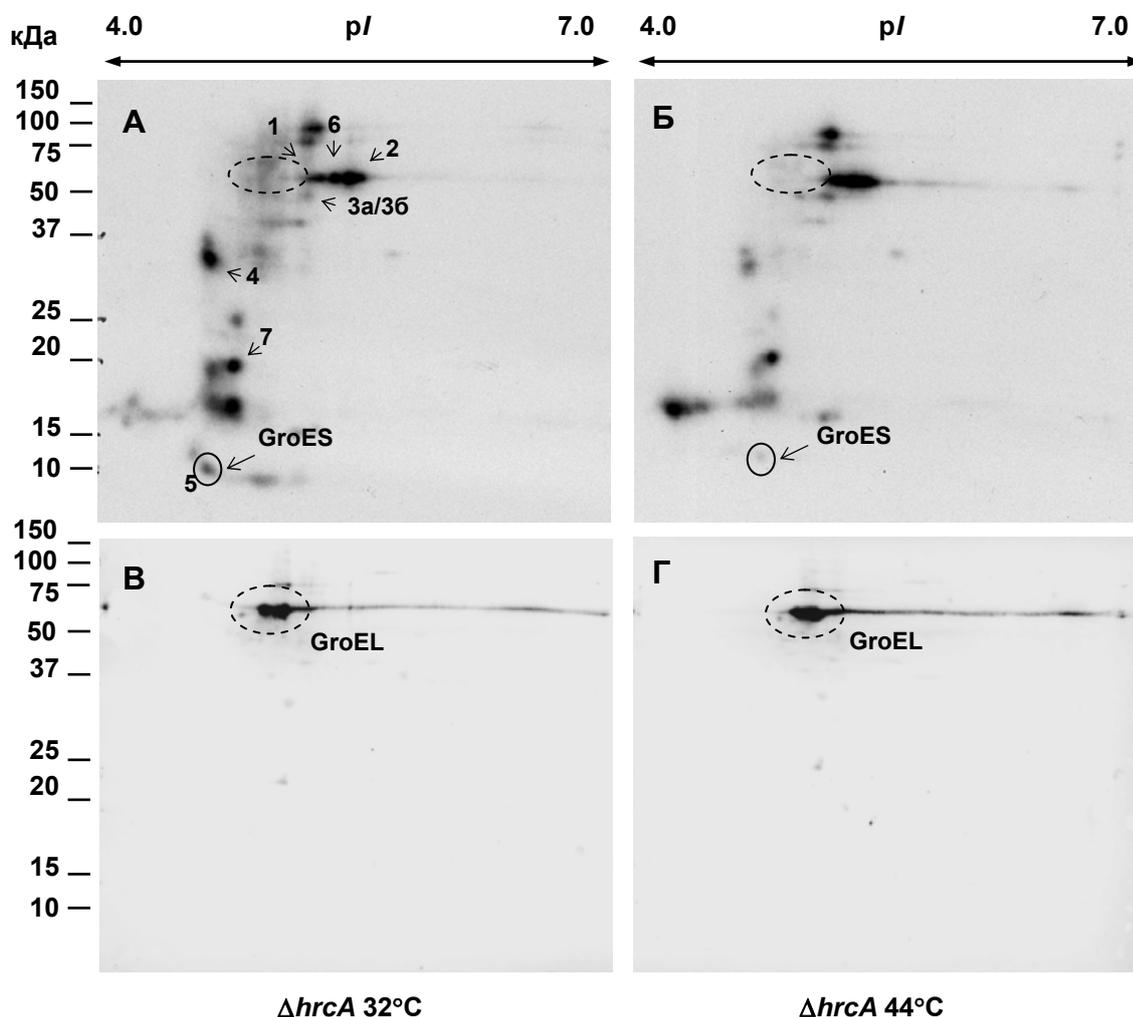


Рис. 6. Фосфорилирование *in vitro* фракции растворимых белков *Synechocystis* sp. PCC 6803 из клеток мутанта *HrcA*, выращенных при 32°C (А) и подвергнутых тепловому стрессу при температуре 44°C в течение 30 мин (Б), (В) и (Г) – соответствующие мембраны, обработанные антителами против Hsp60 (GroEL). Позиции, обозначенные пунктирной линией, указывают на местоположение GroEL.

Если модификация GroEL при стрессе протекает в течение нескольких минут, то можно допустить, что дополнительная инкубация (30-60 мин) при 44°C не оказывает влияния на фосфорилирование белка.

Шаперонин GroEL предотвращает неправильное сворачивание белковых молекул и способствует надлежащей укладке полипептидов, образующихся в большом количестве, например, при тепловом стрессе. У *E. coli* температурный стресс приводит к обратимому фосфорилированию GroEL (Sherman and Goldberg, 1992; 1994), что является необходимым условием для формирования активной формы

GroESL комплекса. Однако у мутанта *Synechocystis* по HrcA шаперонин GroEL образуется и, по всей видимости, фосфорилируется конститутивно.

Фосфорилирование GroES (фосфопептид # 5) у $\Delta hrcA$ ниже, чем в диком типе при 32°C. После высокотемпературной обработки в течение 30 мин степень фосфорилирования указанного фосфопептида сравнима с таковой в клетках дикого типа GS после экспозиции при 44°C (Рис. 4 и 6). Таким образом, вполне вероятно, что фосфорилирование GroES также протекает конститутивно при нормальных условиях, а снижение степени фосфорилирования при 44°C отражает снижение активности соответствующих СТПК.

Гистидиновая протеинкиназа Hik34 (Slr1285), как и HrcA, является негативным регулятором экспрессии генов теплового шока. Нарушение последовательности гена *hik34* приводит к конститутивной экспрессии при нормальной температуре группы генов (*groESL*, *htpG*, *hspA*, *dnaK2* и *slr1634*), индуцируемых у дикого типа при стрессе, это позволяет мутантным клеткам выживать после экспозиции при 48°C в течение 3 ч (Suzuki *et al.*, 2005). Инактивация *hrcA* влияет на экспрессию только оперона *groESL* и гена *cpn60* (Singh *et al.*, 2006). Ранее высказывались предположения о существовании возможного взаимодействия между HrcA и Hik34 (Singh *et al.*, 2006), однако экспериментально это не подтверждено.

Мы исследовали профили фосфорилирования белков клеток дикого типа GT и мутанта по Hik34. Важно, что в отличие от всех других мутантов родительским штаммом $\Delta Hik34$ является глюкозо-толерантный штамм GT *Synechocystis* (Ikeuchi and Tabata, 2001). У GT и GS профили фосфорилирования сходны, хотя и отличаются по уровню фосфорилирования индивидуальных белков.

Тепловой стресс приводил к изменениям в профиле фосфорилирования в клетках $\Delta hik34$, которые отличались от изменений, наблюдаемых в клетках дикого типа GS (Рис. 7). Например, не наблюдалось влияния повышенной температуры на фосфорилирование фосфопептидов # 1 и # 3а/3б. Хотя фосфорилирование фосфопептидов # 2 и # 6 повышалось, но в меньшей степени, чем у дикого типа GS. У $\Delta Hik34$ конститутивное фосфорилирование полипептида # 7 оказалось ниже, чем в диком типе GS, однако после температурной обработки был обнаружен рост уровня его фосфорилирования.

В клетках $\Delta hik34$, выращенных нормальных условиях, фосфорилирование фосфопептида # 5 (GroES) было ниже, чем в диком типе GS, но выше, чем у $\Delta HrcA$. Тепловой стресс в течение 30 мин приводил к уменьшению степени фосфорилирования фосфопептида # 5, хотя и в меньшей степени, чем у обоих штаммов: дикого типа GS и $\Delta HrcA$.

Белок GroEL образуется в равных количествах в клетках $\Delta hik34$ и при 32°C, и при 44°C, что подтверждается результатами вестерн-блоттинга (Рис. 7 Д, Е). Однако его фосфорилирования *in vitro* мы не обнаружили. Возможно, GroEL может быстро и интенсивно фосфорилироваться уже при 32°C. При изучении протеома *Synechocystis* идентифицировали 5 пятен, соответствовавших GroEL1, и 3 пятна, соответствовавших GroEL2 (Срп60) (Slabas *et al.*, 2006). Антитела, использованные в нашей работе, получены против смеси белков GroEL1 и GroEL2, что, по всей видимости, привело к узнаванию обеих форм шаперонина. Неоспоримым является

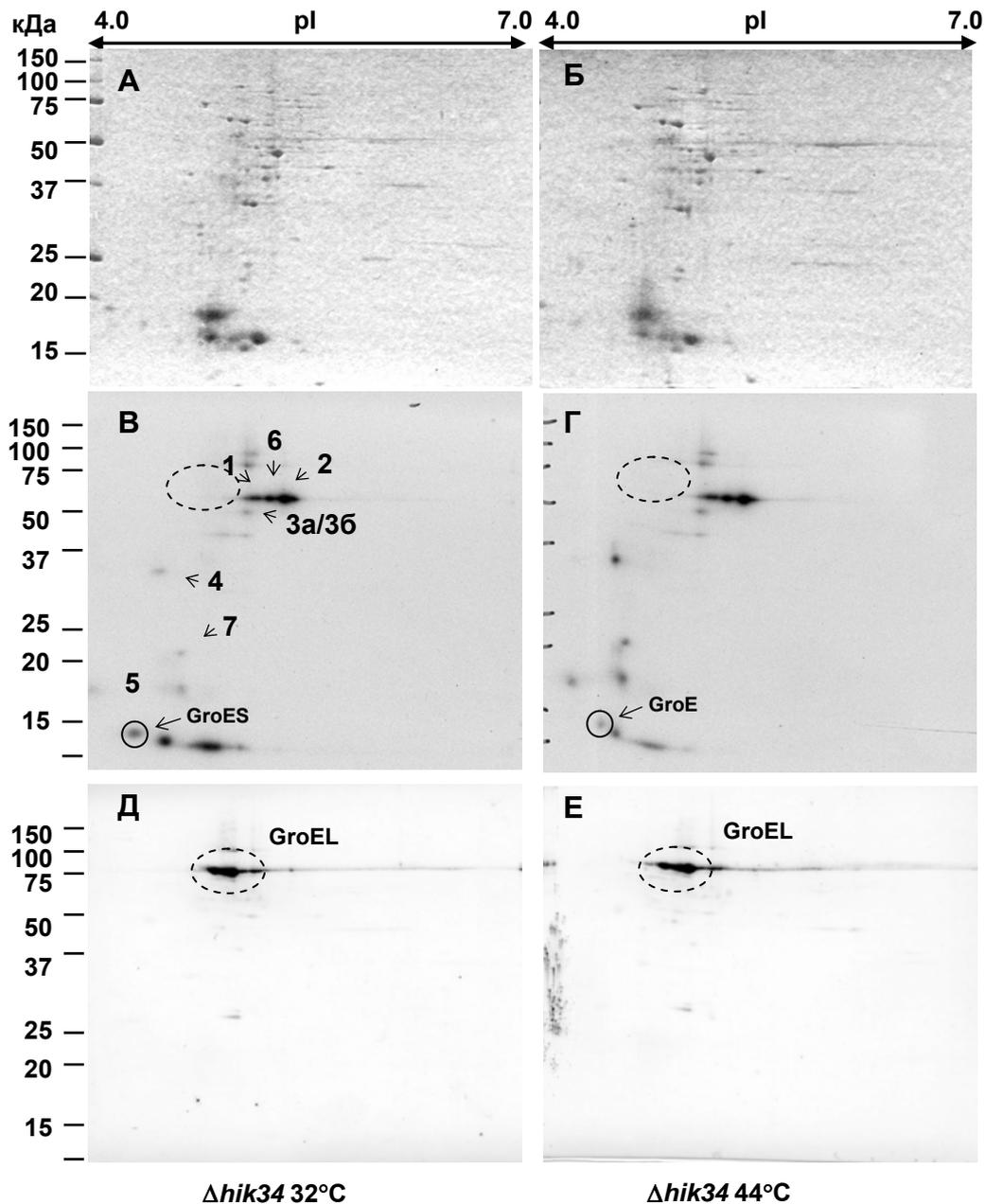


Рис. 7. Фосфорилирование *in vitro* фракции растворимых белков *Synechocystis* sp. PCC 6803 из клеток мутанта $\Delta Hik34$, выращенных при 32°C (А) и подвергнутых тепловому стрессу при 44°C в течение 30 мин (Б). В, Г – соответствующие радиоавтографы; Д, Е – соответствующие мембраны, обработанные антителами против Hsp60 (GroEL). Позиции, обозначенные пунктирной линией, указывают на местоположение GroEL.

факт конститутивной экспрессии GroEL в $\Delta hik34$ и в $\Delta hrcA$, однако относительно его температурозависимого фосфорилирования остаются серьезные сомнения. Сравнение спектров фосфорилирования GroEL в мутантах $\Delta hik34$ и в $\Delta hrcA$ также приводит к предположению, что фосфорилирование GroEL каким-то образом зависит от активности HrcA, но не от активности Hik34. Результаты исследования фосфопротеома *E. coli* также не подтверждают наличие фосфорилированной формы GroEL при нормальной для роста температуре (Masek *et al.*, 2008), несмотря на то, что в данной работе проводилось обогащение фракции фосфорилированных белков. Однако присутствие модифицированной подобным образом формы GroES в клетках *E. coli* не вызывает сомнения. Поскольку GroES и GroEL кодируются одним опероном как у *E. coli*, так и у *Synechocystis*, то вполне можно ожидать их совместной транскрипции, трансляции и, в конечном итоге, соотношения в клетке 1:1. Различия, наблюдаемые в серин-треониновом фосфорилировании GroES и GroEL, наводят на мысль, что СТПК имеют различное сродство к GroES и GroEL, или эти белки фосфорилируются различными протеинкиназами. В любом случае очевидно, что экспрессия *groESL* оперона регулируется HrcA и Hik34, однако регуляция фосфорилирования GroEL и GroES осуществляется по-разному с возможным участием HrcA, но не Hik34.

Заключение

Скрининг библиотеки мутантов *Synechocystis* дефектных по генам СТПК показал, что транскрипция генов, кодирующих белки теплового шока, у штаммов $\Delta spkH$ и $\Delta spkK$ существенно отличается от дикого типа. Различия касаются, в основном, динамики накопления транскриптов, что свидетельствует об участии этих протеинкиназ в регуляции экспрессии генов белков теплового шока. Изучение влияния теплового стресса на транскрипцию генов у двойного мутанта $\Delta spkH/\Delta spkK$ свидетельствуют о наличии каких-то дополнительных участников в пути регуляции ответов клеток на тепловой стресс.

СТПК фосфорилируют несколько белков в оптимальных условиях роста. Тепловой стресс вызывает изменения в интенсивности фосфорилирования этих белков. Низкомолекулярный ко-шаперонин GroES подвергается модификации тремя серин-треониновыми протеинкиназами: SpkC, SpkF и SpkK. Фосфорилирование по остаткам серина и треонина в клетках *Synechocystis* протекает интенсивно и конститутивно при нормальной температуре роста, хотя эксперименты *in vitro* с рекомбинантным GroES свидетельствует о возможности активации СТПК при тепловом стрессе.

В клетках дикого типа гистидинкиназа Hik34 и фактор транскрипции HrcA репрессируют экспрессию оперона *groESL* при оптимальной температуре роста. Тем не менее, экспериментально подтверждено присутствие и GroES, и GroEL в

экстрактах белков из клеток, выращенных при 32°C. Это указывает на то, что Hik34 и/или HrcA репрессируют транскрипцию не полностью.

Мы предполагаем, что фосфорилирование по остаткам серина и треонина, по крайней мере, в случае GroES и GroEL, осуществляется конститутивно и зависит только от количества доступного субстрата. Тепловой стресс вызывает индукцию экспрессии оперона *groESL*, накопление в клетке GroEL и GroES и обеспечивает достаточные количества субстрата для СТПК, которые фосфорилируют эти шаперонины, что, согласно принятой в настоящее время схеме, облегчает их олигомеризацию.

Мутации в генах *hik34* и *hrcA* выражаются в конститутивной экспрессии *groESL* оперона. Указанные белки накапливаются в значительных количествах и подвергаются модификации СТПК. Полученные нами данные о существовании фосфорилированной формы GroES дают основания предполагать, что серин-треониновое фосфорилирование этого ко-шаперонина может быть чрезвычайно важным для формирования функционального олигомерного GroESL комплекса.

Выводы:

1. Мутант $\Delta spkK$ по сравнению с диким типом и $\Delta spkH$ характеризуется повышенной жизнеспособностью в условиях теплового шока.
2. Показаны различия в ультраструктуре клеток дикого типа и мутантных штаммов $\Delta spkH$ и $\Delta spkK$, свидетельствующие о связи повышенной жизнеспособности мутанта $\Delta spkK$ в условиях стресса с особенностями накопления включений на начальных стадиях теплового шока.
3. У мутантов по серин-треониновым протеинкиназам SpkK и SpkH экспрессия генов, индуцируемых тепловым стрессом, снижается.
4. Мутант $\Delta spkK$ отличается от дикого типа и $\Delta spkH$ по кинетике экспрессии генов, активируемых повышенной температурой, в то время как у двойного мутанта $\Delta spkH/\Delta spkK$ этих отличий не обнаружено.
5. Отличий в наборе фосфорилируемых белков у дикого типа и мутантов в оптимальных условиях роста не выявлено, тогда как уровни фосфорилирования индивидуальных полипептидов различались.
6. Идентифицированы белки, подвергающиеся модификации по остаткам серина и/или треонина в условиях теплового стресса.
7. Показано участие серин-треониновых протеинкиназ SpkC, SpkF и SpkK в фосфорилировании рекомбинантного белка ко-шаперонина GroES.
8. Предложена возможная схема участия серин-треониновых протеинкиназ в формировании функционального комплекса GroESL.

Список публикаций по теме диссертации:

1. **Зорина А.А.**, Синетова М.П., Лось Д.А. (2009) Участие серин-треониновой протеинкиназы SpkK в регуляции ответа на тепловой стресс цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Бюллетень МОИП. Отдел биологический*. 114: 129-130.
2. 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.
3. 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.
4. **Zorina A.**, Stepanchenko N., Sinetova M., Panichkin V.B., Novikova G.V., Moshkov I.E., Zinchenko V.V., Shestakov S.V., Suzuki I, Murata N., Los D.A. (2010) Eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases SpkC/F/K are involved in phosphorylation of GroES in the cyanobacterium *Synechocystis*. Submitted to *DNA Research*.
5. **Зорина А.А.**, Синетова М.П. (2008) Роль серин-треониновой протеинкиназы SpkK в регуляции ответа на тепловой стресс цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. Сборник материалов IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, 11-15 мая 2008 г., Новосибирск, с. 162.
6. **Зорина А.А.**, Синетова М.П., Лось Д.А. (2009) Роль серин-треониновых протеинкиназ SpkH и SpkK в регуляции ответа на тепловой стресс цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. Материалы Всероссийской научной конференции «Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды», 24-28 августа 2009 г. Иркутск: НЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН, с. 178-181.
7. **Зорина А.А.**, Синетова М.П., Лось Д.А. (2009) Роль серин-треониновых протеинкиназ в регуляции ответа на тепловой стресс у цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. Актуальные аспекты современной микробиологии: V молодежная школа-конференция. Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. Москва, 26-27 октября 2009 г.: Тезисы. М.: МАКС Пресс, с. 25-26.
8. Синетова М.П., 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.
9. **Зорина А.А.**, Степанченко Н.С., Синетова М.А., Паничкин В.В., Новикова Г.В., Мошков И.Е., Зинченко В.В., Шестаков С.В., Лось Д.А. (2010) Участие серин-треониновых протеинкиназ в фосфорилировании шаперонина GroES при тепловом стрессе у цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. Тезисы Всероссийского симпозиума «Растение и стресс», Москва 9-12 ноября 2010 г. с.160-161.
10. Лось Д.А., **Зорина А.А.**, Синетова М.П., Миронов К.С. (2010) Сенсорные системы цианобактерий. Тезисы Всероссийского симпозиума «Растение и стресс», Москва 9-12 ноября 2010 г. с. 221.