

На правах рукописи



Баик Алина Святославовна

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

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Лаборатории экспрессии генома растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник

Пожидаева Елена Станиславовна

Официальные оппоненты:

Нефёдова Лидия Николаевна,

доктор биологических наук,
доцент кафедры генетики биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Фесенко Игорь Александрович,

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник Лаборатории функциональной геномики и протеомики растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Защита состоится «19» марта 2019 г. в 11 часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук Д 002.210.01 по специальности 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений» (Биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: +7 (499) 678-54-20, e-mail: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, www.ippras.ru

Автореферат разослан «__» января 2019 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В клетках всех живых организмов протеолиз участвует в поддержании белкового гомеостаза за счёт активности особой группы ферментов, протеаз или пептидаз, которые катализируют расщепление пептидных связей в молекулах-мишенях. Необратимость протеолитической реакции позволяет клетке осуществлять однонаправленную координацию биологических процессов, которая необходима на различных этапах биогенеза белка: синтеза, его функционального созревания и завершающей деградации. Однако несмотря на кажущуюся простоту рассматриваемых реакций, протеолиз остаётся одним из наиболее сложных процессов, требующих определённых условий среды и активности ферментов.

Основная регуляторная роль принадлежит ограниченному протеолизу, катализируемому пептидазами различной субстратной специфичности. В частности, протеолитические ферменты, осуществляя селективное расщепление пептидной цепочки в целевых белках, участвуют в ряде посттрансляционных модификаций, что, к примеру, обеспечивает транспортировку белков к месту их функциональной активности (Albiniak *et al.*, 2012), созреванию белков в результате процессинга белков-предшественников (Teixeira, Glaser, 2013), а также регулирует скорость распада белков или коротких пептидов за счёт преобразования N-концевых аминокислотных остатков (а. о.) (Varshavsky, 2011). В зависимости от природы N-концевых а. о. время жизни новосинтезированного белка может составлять всего несколько минут, а по отношению к долгоживущим молекулам – до нескольких часов. В этом случае важная регуляторная роль отведена ферментам семейства аминопептидаз, которое включает особую группу белков – пролин-специфичных аминопептидаз. Они обладают строгой субстратной специфичностью в отношении пептидных связей, образованных пролином (Pro), что связано с конформационными свойствами самого а. о. Pro (Walter *et al.*, 1980; Cunningham, O'Connor, 1997). В их число также входит аминопептидаза P (APP), которая отщепляет любой первый а. о. в том случае, если после него находится Pro (Lin, Brandts, 1979). Ряд ранних работ (Tobias *et al.*, 1991; Ninnis *et al.*, 2009; Graciet *et al.*, 2006) позволил определить N-концевой остаток пролина как «стабилизирующий», то есть характерный для метаболически стабильных белков, в то время как «дестабилизирующие» а. о. являются сигналами для немедленной деградации несущих их белков. Поэтому наличие инициаторного Pro в молекуле белка способно стабилизировать его структуру и защитить от действия протеаз на длительное время.

В литературе подробно описаны каталитические свойства и субстратная специфичность фермента APP из гетеротрофной бактерии *Escherichia coli* (*E. coli*) (AMPP) (Wilce *et al.*, 1998). В то время как среди фотосинтезирующих организмов аминопептидаза P охарактеризована только у растений *Lycopersicon esculentum* (LeAPP2) (Hauser *et al.*, 2001) и *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) (ICP55, Intermediate Cleavage Peptidase 55), чья каталитическая активность, в отличие от LeAPP2, направлена на процессинг митохондриальных белков и осуществляется по эукариотическому типу (Huang *et al.*, 2015; Carrie *et al.*, 2015).

В соответствии с эндосимбиотической теорией происхождения эукариот, растительные клетки и их геномы (как и все эукариотические клетки) представляют собой результат эндоситобиоза между цианобактерией и гетеротрофным эукариотом. Принято считать, что именно цианобактерии являлись предшественниками

хлоропластов высших растений (Martin, Herrmann, 1998). Усложнение клеточной организации привело к увеличению числа APP белков, причём с различной функциональной направленностью и локализацией в клетке (<https://www.arabidopsis.org/>; Li *et al.*, 2008; Molinaro *et al.*, 2005; O'Toole *et al.*, 2010). Всё это затрудняет выяснение роли протеолитических белков в растениях, и в данном случае цианобактерии могут выступать в качестве модельного объекта для анализа их гомологов.

Действительно, если у *A. thaliana* идентифицированы три APP с различной клеточной локализацией, то в геноме одноклеточной цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803, содержащем 62 гена пептидаз различного типа, только один ген *sll0136* кодирует, предположительно, аминопептидазу P (Sokolenko *et al.*, 2002). Ранее в Лаборатории экспрессии генома растений были проведены исследования по выяснению путей действия аминопептидазы P (PepP) в клетках фотосинтезирующей бактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 штамм GS (Пожидаева *и др.*, 2013), но белок не был охарактеризован и его точная роль в клетках *Synechocystis* не установлена.

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

1. Получить рекомбинантный штамм *Escherichia coli*, являющийся продуцентом белка PepP *Synechocystis*.
2. Подобрать условия экспрессии белка PepP и оптимальный метод его очистки с учётом сохранения ферментативной активности препарата.
3. Изучить природу и оптимальные условия ферментативной активности, а также субстратную специфичность полученного препарата белка PepP *in vitro*.
4. Провести структурный анализ белка PepP с использованием биоинформационных ресурсов.
5. Сконструировать мутантный штамм *ΔpepP* *Synechocystis*, дефектный по гену *sll0136*, и оценить влияние инактивации гена на физиолого-биохимические характеристики мутанта.
6. Выявить и охарактеризовать предполагаемые субстраты белка PepP.

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

В ходе изучения протеолитической активности рекомбинантного белка PepP *in vitro*, экспрессированного в клетках *E. coli* и очищенного на глутатион-сефарозе, определена его субстратная специфичность в реакциях с флуоресцентным субстратом Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA. Установлено, что исследуемый белок является Mn²⁺-зависимой *Xaa-Pro*-аминопептидазой, оптимум активности которой находится в пределах 32°C и pH 7,6. С использованием биоинформационных ресурсов построена трёхмерная модель мономера/димера белка PepP в комплексе с лигандом.

Морфофизиологический анализ показал, что инактивация гена *sll0136* привела к формированию мутантным штаммом *ΔpepP* *Synechocystis* колоний меньшего размера, что является следствием уменьшения размеров клеток и пролонгированным

периодом деления цианобактерий. Потеря активности пептидазы PcpP нарушила организацию тилакоидных мембран в результате изменения содержания белков фотосинтетических комплексов и композиции светособирающего комплекса (ССК) цианобактерий.

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

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

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

Апробация работы. Результаты диссертационной работы представлены на: V Съезде физиологов СНГ, V Съезде биохимиков России и международной конференции ADFLIM «Современные методы флуоресцентного молекулярного имиджинга» (Сочи-Дагомыс, 2016); Межинститутском научном молодёжном семинаре «Актуальные проблемы физиологии, молекулярной биологии и биотехнологии растений» (Москва, 2016); VIII Съезде Общества физиологов растений России, Всероссийской научной конференции с международным участием и школе для молодых учёных «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015); 9-м Европейском семинаре по молекулярной биологии цианобактерий (Тексель, Нидерланды, 2014); VII Всероссийской конференции «Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция» (Петрозаводск, 2014); Международной научной конференции и школе молодых учёных «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» в рамках годового собрания Общества физиологов растений России (Калининград, 2014); 67-й Международной студенческой научной конференции, посвящённой 120-летию со дня рождения академика В.С. Немчинова (Москва, 2014); XXI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2014» (Москва, 2014); Межинститутском научном молодёжном семинаре «Актуальные проблемы физиологии, молекулярной биологии и биотехнологии растений» (Москва, 2014); XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2013» (Москва, 2013); Международной конференции «Физиология и биотехнология микроводорослей», посвящённой 80-летию В.Е. Семененко (Москва, 2012); Международном Конгрессе по биологии растений, совместно организованном

FESPB и EPSO (Фрайбург, Германия, 2012); 65-й Международной студенческой научно-практической конференции, посвящённой 125-летию со дня рождения академика Н.И. Вавилова (Москва, 2012).

Положения, выносимые на защиту.

1. Полученный очищенный препарат белка PcpP *Synechocystis* обладает Xaa-Pro-аминопептидазной активностью, кинетические параметры которого в реакции с флуоресцентным пептидом Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA составляют $K_M = 8,83 \pm 0,94$ мкМ и $V_{max} = 19,46 \pm 0,67$ мкМ/сек, соответственно. Белок PcpP относится к Mn^{2+} -зависимым металлоферментам с оптимумом действия в пределах 32°C и pH 7,6.
2. Построение трёхмерной модели белка PcpP в комплексе с лигандом показывает, что в связывании двух ионов Mn^{2+} участвуют высококонсервативные аминокислотные остатки активного сайта белка Glu385, Glu415, Asp271, His354, Asp260, а также функционально значимые Thr273 и Thr383. Анализ олигомеризации белка демонстрирует образование гомодимера.
3. Получен гомозиготный мутантный штамм *ΔpcpP*, несущий инсерцию в гене *slh0136*, кодирующем аминопептидазу PcpP. Мутант *ΔpcpP* характеризуется пониженной скоростью роста уже в стандартных условиях (32°C, 70 мкЕ/м²·сек), а также изменёнными размерами и ультраструктурой клеток по сравнению с ДТ. Обнаруженные у мутанта *ΔpcpP* нарушения в структуре и расположении тилакоидов являются следствием изменений в композиции и содержании белков светособирающего комплекса, а также в соотношении ФСІ/ФСІІ. Предполагается участие PcpP в биогенезе белков тилакоидных комплексов.

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

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 12 печатных работ в научных журналах и материалах конференций, 4 из которых являются статьями в рецензируемых журналах, в том числе 3 – в изданиях, рекомендуемых ВАК.

Структура и объём работы. Диссертационная работа состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Объекты и методы исследования», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы», «Приложение». Работа изложена на 221 страницах машинописного текста, содержит 53 рисунка и 17 таблиц. Список цитируемой литературы включает 342 наименования, из которых 329 – на иностранных языках.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Культуру клеток *Synechocystis* sp. PCC 6803 штамм GT-L (коллекция IPPAS B-1400, ИФР РАН) выращивали фотоавтотрофно на агаризованной (1,2% агара) или в жидкой среде BG-11 (Rippka *et al.*, 1979) с добавлением 20 мМ Нерес-NaOH (рН 7,5) при температуре 32°C и при постоянном освещении люминесцентными лампами интенсивностью 70 мкЕ/м²·сек. Для поддержания мутантного штамма *ΔperP* в среду дополнительно вносили Км в концентрации 5-50 мкг/мл. Интенсивные культуры клеток *Synechocystis* выращивали в культуральных сосудах в жидкой среде (32°C, 70 мкЕ/м²·сек) с постоянным барботированием стерильной газовой смеси, обогащённой CO₂ (1,6%). Анализ роста и размера колоний проводили на агаризованной среде (1,5% агара) согласно методике, описанной у Dörrich (Dörrich, Wilde, 2015). Скорость роста цианобактерий оценивали по оптической плотности (ОП) в 1 мл суспензии клеток при длине волны 750 нм в зависимости от времени (в сутках культивирования).

Определение содержания пигментов в экстрактах цианобактерий проводили в соответствии с методикой (Lichtenthaler, 1987; Collier, Grossman, 1992). Спектры поглощения целых клеток *Synechocystis* в диапазоне длин волн от 350 до 800 нм измеряли на спектрофотометре UV2401 UV/VISIBLE (Shimadzu Biotech, Япония), спектры флуоресценции фикобилисом – при комнатной температуре на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301PC при длинах волн: $\lambda_{ex} = 658$ нм и $\lambda_{em} = 590-780$ нм.

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с использованием баз данных: CyanoBase (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/Synechocystis>), MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>), UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Выравнивание и сравнение аминокислотных последовательностей белков, построение эволюционных деревьев проводили в Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>); анализ ко-транскрипции нуклеотидных последовательностей в геноме *Synechocystis* sp. PCC 6803 – в DOOR² (<http://csbl.bmb.uga.edu/DOOR/>). Гидрофобность белка PerP *Synechocystis* оценивали согласно алгоритму Kyte и Doolittle (1982). Предполагаемую клеточную локализацию белка определяли с помощью Gneg-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Gneg-multi/>), PSLpred (<http://www.imtech.res.in/raghava/pslpred/>) и PSORTb (<http://www.psорт.org/psортb/>).

Построение пространственных структур белка PerP методом моделирования по гомологии осуществляли с помощью Modeller 9.15 (Sali, Blundell, 1993). Шаблонные структуры белков получали из PDB (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

Конструирование плазмид, необходимых для получения мутантного штамма цианобактерий или индуцированной экспрессии рекомбинантного белка PerP, проводили на основе векторов pAL-TA (Евроген, Россия) и pET-41a(+) (Novagen, США). В работе использовали клетки *E. coli* штаммы DH5 α (Life Technologies, США), XL1-Blue (Stratagene, США), BL21 (DE3)pLysS (Novagen, США). Для анализа полученных конструкций применяли ПЦР или ОТ-ПЦР, для доказательства отсутствия нуклеотидных замен образцы ДНК секвенировали в биотехнологической компании «Евроген».

Трансформацию клеток *Synechocystis* sp. PCC 6803 штамм GT-L проводили по методике, основанной на естественной двойной гомологичной рекомбинации между хромосомной и экзогенной ДНК (Grigorieva, Shestakov, 1982). Для получения мутантного штамма $\Delta pepP$ использовали генетическую конструкцию $pAL-TA-sll0136/Km^R$. Целевой ген инактивировали путём встраивания канамициновой кассеты (Km^R) по схеме, представленной на рис. 1.

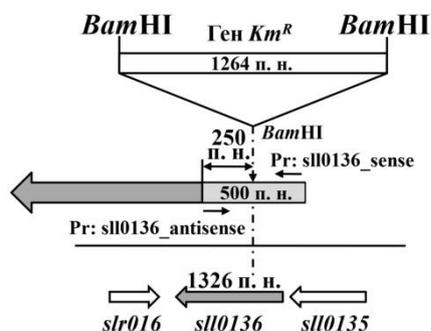


Рис. 1. Схематическое изображение инсерционной вставки Km^R -кассеты в гене *sll0136*.

Серым цветом обозначен полноразмерный ген *sll0136*; светло-серым цветом выделен фрагмент гена *sll0136*. Указаны позиции праймеров для амплификации фрагмента гена и сайты рестрикции для получения векторной конструкции.

Световая и электронная микроскопия. Препараты клеточных культур *Synechocystis* анализировали в белом проходящем свете при $100\times$ увеличении на микроскопе Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия). Изучение ультраструктурных особенностей клеток цианобактерий проводили при помощи трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) как описано в работе Sarsekeyeva (Sarsekeyeva *et al.*, 2014).

Выделение белков клеточных экстрактов из *Synechocystis* проводили согласно Пожидаевой (Пожидаева, 2014) с изменениями, мембранных фракций – по стандартной методике (Gombos *et al.*, 1994). Интактные фикобилисомы изолировали из клеток цианобактерий по описанной методике (Gantt *et al.*, 1976) с использованием 12-30% градиента плотности йодиксанола – OptiPrep (Sigma, США). Содержание белка в пробах определяли при помощи бицинхонинового реагента (Sigma) или при помощи реагента Bradford (Sigma) согласно протоколу производителя.

Разделение белков клеточных экстрактов *Synechocystis* проводили в нативных условиях с помощью трис-боратной системы (Пожидаева, 2014) в градиентном ПААГ или при помощи двумерного (2DE) электрофореза по O'Farrell (1975). Для фракционирования нативных комплексов мембранных белков использовали голубой нативный ПААГ электрофорез, описанный в работе (Schagger, von Jagow, 1991) с некоторыми модификациями. Для разделения белковых проб в денатурирующих условиях применяли ДДС-ПААГ согласно Laemmli (1970).

Индукцию экспрессию полноразмерного рекомбинантного белка PepP в составе вектора pET-41a(+) проводили в клетках BL21 (DE3)pLysS *E. coli* внесением ИПТГ до конечной концентрации 0,1 mM при 25°C в течение 16-18 ч. Белок очищали методом аффинной хроматографии на колонке с глутатион-сефарозой согласно рекомендациям фирмы-производителя (Bio-Rad, США). Для получения чистого препарата белка PepP, лишённого аффинных меток, первично очищенный гибридный белок (GST-PepP) подвергали протеолитическому расщеплению в присутствии энтерокиназы (Sigma) и повторной очистке для отделения GST. Концентрацию препарата белка PepP определяли спектрофотометрически по

поглощению при 280 нм на Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Life Technologies). Расчёт коэффициента экстинкции производили по формуле (Gill, von Hippel, 1989).

MALDI-TOF анализ белковых проб после их фракционирования в ДДС-ПААГ осуществляли в центре «Постгеномные и нанотехнологические инновации» (Россия).

Иммунохимический анализ первично очищенного белка (GST-PepP) проводили с использованием первичных поликлональных антител кролика против человеческой X-пролил аминопептидазы 3 (Anti-XPNPEP3 antibody, Sigma) и вторичных флуоресцентных кроличьих IgG-антител, конъюгированных с ФИТЦ (Медгамал, Россия). Сигнал регистрировали на приборе Phosphoimager Typhoon Trio+ с использованием фильтра 525SP, опции Fluorescein, Cy2, AlexFluor488.

Для анализа протеолитической активности и субстратной специфичности белка PepP *in vitro* использовали специфичный для пролиновых аминопептидаз синтетический трипептид Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA (Bachem, Швейцария). Ферментативную реакцию проводили в присутствии 13,7 нМ очищенного препарата белка PepP и 10 мкМ субстрата в 40 мМ Трис-НСl (рН 7,5). Белок предварительно инкубировали при 30°C в течение 15 мин. Флуоресценцию высвобождаемого продукта реакции гидролиза детектировали при $\lambda_{ex} = 310$ нм и $\lambda_{em} = 410$ нм на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301PC. Для нахождения температурного оптимума активности белка PepP реакцию проводили в 40 мМ Трис-НСl (рН 7,5) при температуре от 10 до 60°C; для определения рН оптимума – в 40 мМ Трис-НСl в диапазоне рН от 5,5 до 8,5 при 30°C. Для анализа влияния ионов двухвалентных металлов использовали водные растворы ZnCl₂, MgCl₂, MnCl₂, CdCl₂, CaCl₂ в концентрациях 0,01-5 мМ. Ингибиторный анализ проводили в присутствии 1,10-фенантролина, ЭДТА, PMSF, пепстатина А и бестатина в концентрациях 0,1 мМ и 5 мМ. Белок предварительно инкубировали в течение 15 мин при 30°C, затем ещё 5 мин после внесения соответствующего оценочного компонента. Гидролиз неспецифического субстрата для сериновых протеаз азоказеина (Sigma) проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ протеолитических свойств и субстратной специфичности белка PepP

Согласно базе данных CyanoBase ген *sll0136* размером 1326 п. н. цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 кодирует, предположительно, белок пролин-специфичной аминопептидазы (PepP; WP_010873192.1). Белок состоит из 441 а. о. с ожидаемой мол. массой 48,5 кД и по данным биоинформационного анализа локализован в цитоплазме клетки, что также было отмечено в работе Sokolenko (Sokolenko *et al.*, 2002). Поиск гомологичных белков показал сходство аминокислотной последовательности белка PepP с белками семейства M24: пролиновыми аминопептидазами, пролидазами и метиониновыми аминопептидазами (MAP) (Пожидаева *и др.*, 2013). Согласно филогенетическому анализу наиболее близкородственными оказались белки цитозольной АМРРП *E. coli* (Wilce *et al.*, 1998), а также митохондриальных X-пролил-аминопептидаз эукариот: XPNPEP3 человека, ICP55 дрожжей и её гомолога в *A. thaliana*. Наряду с бактериальной аминопептидазой P II (44%), они показали высокую степень гомологии к белку PepP: аминопептидаза P3 *H. sapiens* (35%), ICP55 *A. thaliana* (33%) и ICP55 *S. cerevisiae* (32%). Основываясь

на предсказанной оценке эволюционного родства РерР и АМРРІІ, мы предположили, что данные белки также будут иметь схожую структурную укладку, механизм ферментативного катализа и субстратную специфичность.

Для биохимической характеристики очищенного препарата белка РерР был использован специфичный для пролиновых аминопептидаз флуоресцентный субстрат Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA и неспецифичный для сериновых протеаз белок азоказеин. Гидролиз трипептида Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA белком РерР указывает на то, что данный белок относится к группе *Xaa-Pro-* пептидаз. Изучение рН- и температурной зависимости РерР *Synechocystis* установило (Баик и др., 2018), что оптимум активности белка находится в пределах рН 7,6 и 32°C (рис. 2, А и Б). Литературные данные подтверждают, что большинство аминопептидаз Р в отношении флуоресцентного субстрата активны при рН, близкой к нейтральной, в то время как температурные оптимумы АРР белков зависят от организма.

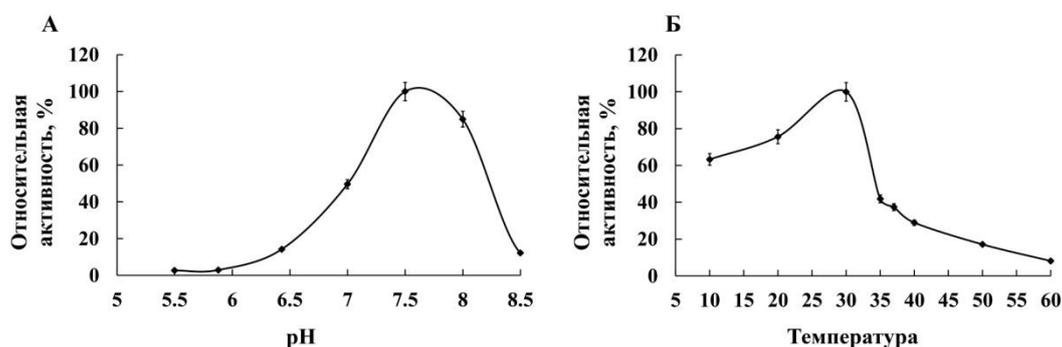


Рис. 2. Влияние рН (А) и температуры (Б) на протеолитическую активность белка РерР *Synechocystis*.

Реакцию гидролиза 10 мкМ Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA в присутствии 13,7 нМ РерР проводили (А) – в 40 мМ Трис-НСІ в диапазоне рН от 5,5 до 8,5 при 30°C, (Б) – в 40 мМ Трис-НСІ (рН 7,5) при температуре от 10 до 60°C; $M \pm m$, $n = 3$, $p < 0,05$.

Для определения кинетических параметров для Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA в присутствии белка РерР была изучена зависимость скорости реакции гидролиза аминопептидазы Р от концентрации субстрата (рис. 3, А) и построен график двойных обратных величин Лайнуивера-Берка (рис. 3, Б). Рассчитанные $K_M = 8,83 \pm 0,94$ мкМ

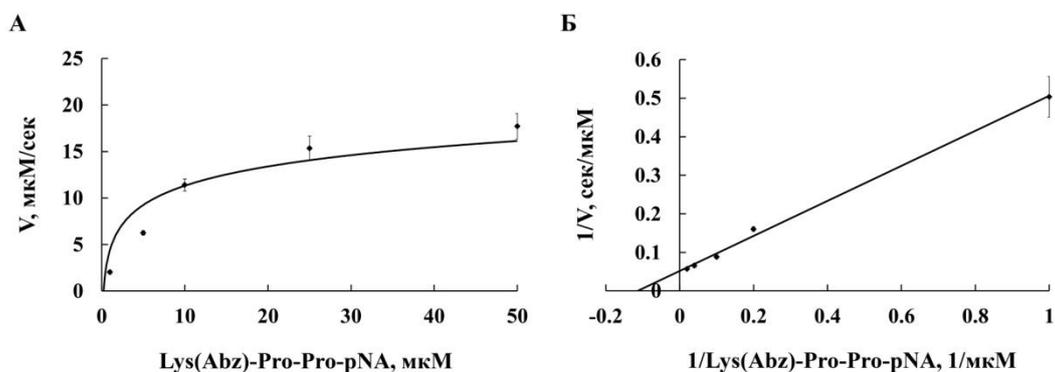


Рис. 3. (А) Зависимость скорости реакции гидролиза белком РерР (V) от концентрации субстрата Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA ($[S]$) и (Б) График Лайнуивера-Берка в двойных обратных координатах (зависимость $1/V$ от $1/[S]$).

Реакцию проводили в 40 мМ Трис-НСІ (рН 7,5) в присутствии 13,7 нМ РерР при 30°C; $M \pm m$, $n = 3$, $p < 0,05$.

и $V_{\max} = 19,46 \pm 0,67$ мкМ/сек свидетельствовали о высоком сродстве РерР к флуоресцентному пептиду (Баик и др., 2018).

При изучении влияния водных растворов хлоридов металлов (табл. 1) $ZnCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $CdCl_2$, $CaCl_2$ в концентрации от 0,01 до 5 мМ мы наблюдали резкое возрастание протеолитической активности исследуемого белка (более чем в 4 раза) в присутствии ионов Mn^{2+} , в то время как подавляющее большинство ионов оказывали ингибирующее действие. Данный результат свидетельствует о том, что белок РерР *Synechocystis* относится к Mn^{2+} -зависимым пептидазам (Баик и др., 2018).

Табл. 1. Влияние ионов двухвалентных металлов на протеолитическую активность белка РерР *Synechocystis*

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

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

В ходе ингибиторного анализа (табл. 2) (Баик и др., 2018), при добавлении в реакционную смесь металл-хелатирующих агентов (1,10-фенантролина или ЭДТА) наблюдалось значительное подавление ферментативной активности цианобактериального белка. Бестатин, ингибитор металлопротеаз, селективно действующий в отношении белков с аминопептидазной активностью, в концентрации 0,1 мМ в 2 раза подавлял каталитическую активность белка РерР. В то время как пепстатин А, ингибитор ферментативного катализа кислых протеаз (с кислой pI), строго не влияющий на нейтральные протеазы (с нейтральной pI), а также на ферменты серинового или цистеинового типа, полностью подавлял активность цианобактериального белка в отношении флуоресцентного субстрата. Падение ферментативной активности белка РерР также наблюдалось в присутствии ингибитора сериновых протеаз, PMSF. Однако отсутствие реакции гидролиза

неспецифического субстрата для сериновых протеаз, азоказеина, белком РерР *Synechocystis*, в отличие от реакции с контрольным трипсином (данные не представлены), исключает его принадлежность к аминопептидазам серинового типа. Данные результаты свидетельствуют о том, что специфичность цианобактериального фермента отличается от уже известных аминопептидаз Р, что может быть следствием предполагаемого автопротеолиза белка, наблюдаемого в процессе очистки.

Табл. 2. Влияние ингибиторов на протеолитическую активность белка РерР

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

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

Компьютерное моделирование трёхмерной структуры белка РерР

Компьютерное моделирование трёхмерной структуры мономера белка РерР (рис. 4) на основе шаблона АМРРП *E. coli* показало, что каталитический домен содержит ионы металла. Активный сайт аминопептидазы Р *Synechocystis* образует комплекс с двумя ионами Mn^{2+} . Один из них удерживается за счёт взаимодействия с четырьмя аминокислотами: Glu385, Glu415, Asp271 и His354; в связывании второго иона марганца участвуют: Glu415, Asp271 и Asp260. Отметим, что Thr273 и Thr383 также могут играть роль в удержании ионов марганца в активном сайте белка. С использованием модельной структуры аминопептидазы Р II *Yersinia pestis* установлено, что в процессе олигомеризации белок РерР образует гомодимер (рис. 5).

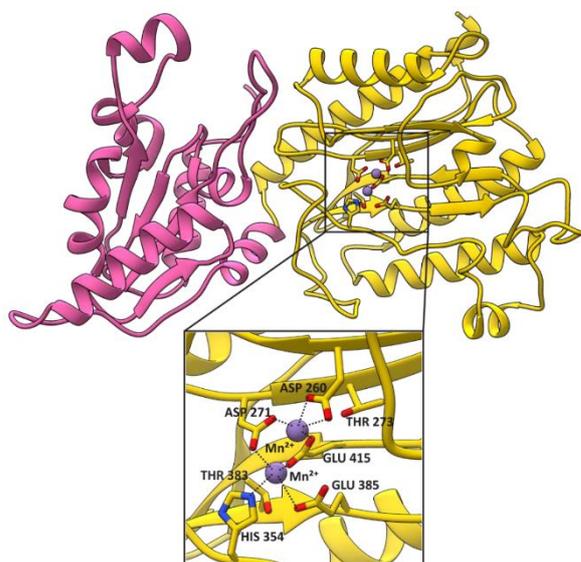
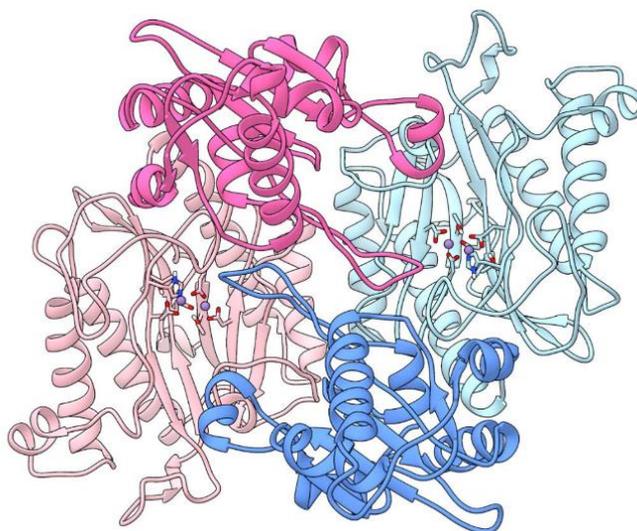


Рис. 4. Трёхмерная модель мономера белка РерР *Synechocystis* в комплексе с ионами марганца.

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

Рис. 5. Трёхмерная модель гомодимера белка PerP *Synechocystis*.

Яркими цветами обозначены N-концевые домены мономеров, светлыми цветами – С-концевые домены мономеров белка PerP.



Таким образом, в реакциях с Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA установлено, что белок PerP является *Xaa-Pro*-аминопептидазой, максимальная активность которой наблюдается в присутствии ионов Mn^{2+} при 32°C и pH 7,6. Субстратная специфичность белка PerP оказалась шире активности гомологов APP белков прокариот, на что указывает ингибиторный анализ. Белок PerP относится к металлопептидазам, требующим наличия двух ионов марганца в качестве кофактора, в удержании которых участвуют высококонсервативные а. о. протеолитического центра Asp260, Asp271, His354, Glu385, Glu415, а также Thr273 и Thr383.

Аминопептидаза PerP вовлечена в регуляцию скорости роста и размера клеток

Для выяснения путей действия пептидазы PerP и её возможных субстратов у *Synechocystis* sp. PCC 6803 был получен жизнеспособный гомозиготный мутант $\Delta perP$, дефектный по аминопептидазе P, на основе глюкозоустойчивого штамма GT-L. При выращивании в жидкой среде мутант был склонен к выраженному оседанию и адгезии клеток на поверхности культуральных сосудов по сравнению с ДТ (рис. 6), что отличалось от мутанта $\Delta perP$ в GS штамме (Пожидаева и др., 2013).

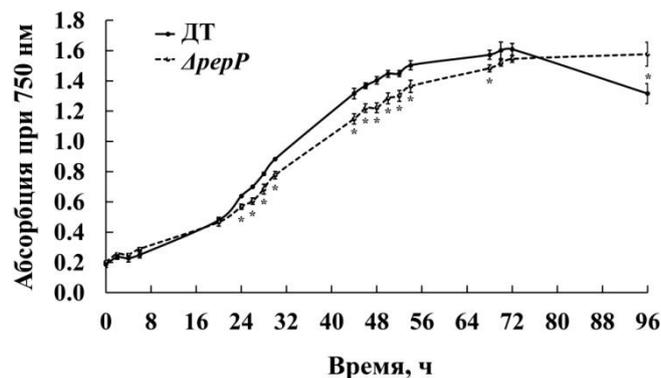


Рис. 6. Культура клеток штаммов дикого типа и мутанта $\Delta perP$ *Synechocystis*, выращенная в жидкой среде BG-11 при постоянной аэрации газовой смесью, содержащей 1,6% CO_2 .

Стрелки указывают на образование клеточных скоплений и адгезию на стенках вегетационных сосудов в образцах мутанта $\Delta perP$.

Мутантный штамм $\Delta perP$ характеризовался замедлением в росте после 20-и ч культивирования (рис. 7) в условиях интенсивной культуры. Время дупликации клеток мутанта также было увеличено в сравнении с ДТ. На 4 сутки выращивания цианобактерий в отличие от естественного старения культуры ДТ культура мутанта перешла в стационарную фазу роста. Это свидетельствует о том, что анализируемые штаммы находились на различных стадиях роста бактерий.

Рис. 7. Динамика роста клеточной культуры штаммов дикого типа и мутанта $\Delta pepP$ *Synechocystis*. $M \pm m$, $n = 3$, * обозначены достоверные различия между средними при $p < 0,05$.



Дальнейшее выращивание цианобактерий на агаризованной среде показало, что мутант $\Delta pepP$ формирует колонии меньшего размера (рис. 8, А). Средняя площадь колоний пятидневной культуры мутантного штамма была на 40,9% меньше соответствующего показателя у ДТ (рис. 8, Б).

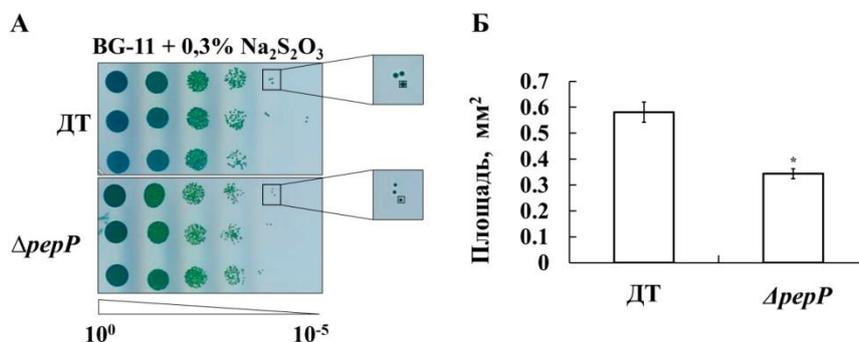


Рис. 8. Пятидневная культура клеток штаммов дикого типа и мутанта $\Delta pepP$ *Synechocystis*, выращенная на агаризованной среде BG-11 в присутствии 0,3% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ в стандартных условиях; (Б) диаграмма показателей площади колоний штаммов дикого типа (ДТ) и мутанта $\Delta pepP$ *Synechocystis*.

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

Анализ данных световой микроскопии не выявил каких-либо видимых нарушений в морфологии клеток цианобактерий, однако размер клеток мутанта $\Delta pepP$ оказался достоверно меньше клеток ДТ на 7,8% (рис. 9).

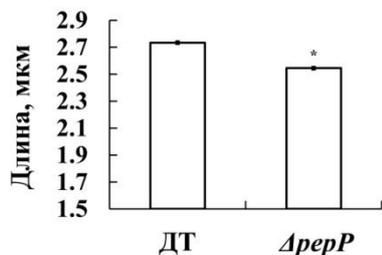


Рис. 9. Диаметр клеток штаммов дикого типа и мутанта $\Delta pepP$ *Synechocystis*.

$M \pm m$, $n = 246$, * обозначены достоверные различия между средними при $p < 0,05$.

Таким образом, в ходе исследования было установлено, что инактивация гена *sll0136* у *Synechocystis* GT-L привела к формированию колоний меньшего размера, что вызвано замедленным ростом мутантных клеток $\Delta pepP$, а также их меньшим размером по сравнению с ДТ. Наблюдаемая у $\Delta pepP$ агрегация клеток не является

следствием явных нарушений в клеточном делении, а обусловлена особенностями самого штамма. Мы также предполагаем, что инактивация гена *sll0136* привела к увеличению клеточного цикла у мутанта *ΔperP* штамма GT-L по сравнению с ДТ. Можно предположить, что среди белков, участвующих в клеточном делении и сигналинге, координирующем процесс цитокинеза, есть субстраты для пептидазы PerP.

В клетках, дефектных по аминокептидазе PerP, изменена структура и распределение тилакоидных мембран

Известно, что вариабельность размера клеток цианобактерий зависит от их структурных особенностей и напрямую связана с изменениями в составе, распределении и активности белковых комплексов, расположенных в тилакоидной мембране или ассоциированных с ней. Анализ штаммов *Synechocystis* с использованием ТЭМ показал, что, в отличие от ДТ, клеточная суспензия мутанта *ΔperP* представлена клетками трёх типов (рис. 10).

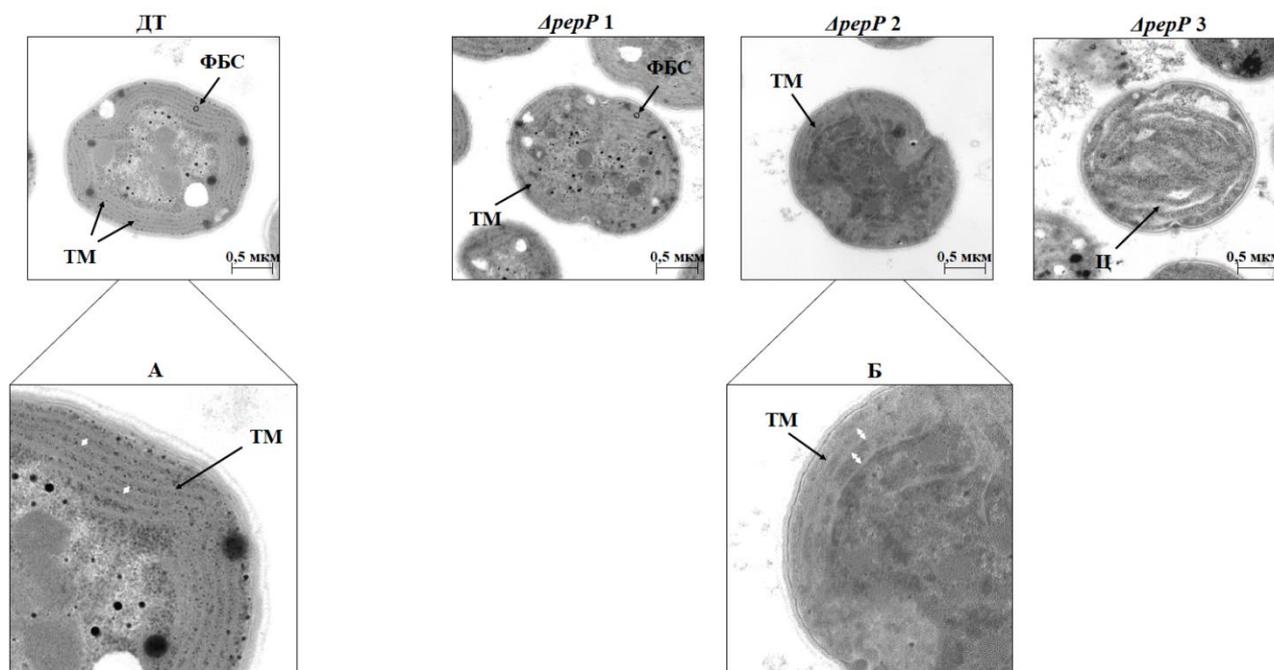


Рис. 10. Трансмиссионная электронная микроскопия клеток штаммов дикого типа и мутанта *ΔperP* *Synechocystis*.

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

Большая часть проанализированных препаратов состояла из клеток с изменённым расположением тилакоидов (рис. 10, *ΔperP 2*), а также увеличенным цитоплазматическим интервалом между слоями тилакоидов (рис. 10, А и Б). Последнее может быть объяснено как минимум двумя факторами: 1) нарушениями в структуре фикобилисом (Collins *et al.*, 2012; Olive *et al.*, 1997); 2) изменением в

распределении и соотношении комплексов ФСII и ФСI в тилакоидах (Fuhrmann *et al.*, 2009; Barthel *et al.*, 2013).

Действительно, результаты фракционирования нативных комплексов фотосистем цианобактерий показали различия в соотношении белков комплексов ФСII/ФСI у мутанта и ДТ. В образцах мутантного штамма *ΔperP* *Synechocystis* наблюдалось повышенное содержание белков комплекса ФСI на фоне пониженного содержания белков комплекса ФСII (рис. 11), что согласуется с результатами, ранее полученными на мутанте *ΔperP* GS штамма (Пожидаева *и др.*, 2013).

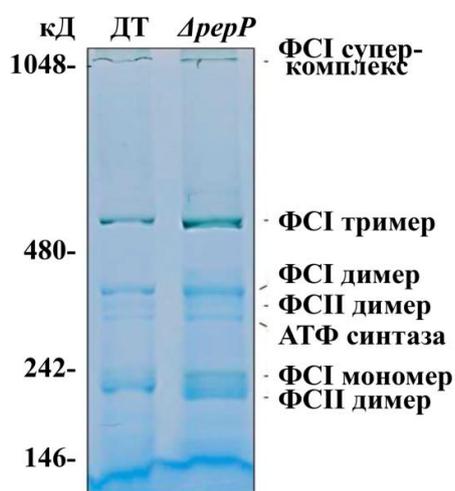


Рис. 11. Разделение тилакоидных комплексов в нативных условиях с помощью 4-13% градиентного ПААГ электрофореза.

Гель окрашен коллоидным Кумасси-Г. Для солубилизации белковых проб, содержащих хлорофилл в концентрации 1 мкг/мкл, использовали 1% n-додецил-β-D-мальтозид. На гель наносили 8 мкг хлорофилла образца. Справа обозначены позиции соответствующих комплексов белков фотосинтетических мембран; слева указаны мол. массы маркерных белков в кД. Локализацию белковых полос в геле проводили по данным, опубликованным в работе (Dühring *et al.*, 2006).

Аминопептидаза PerP вовлечена в регуляцию уровня белков фикобилисом у *Synechocystis*

Как было отмечено выше, изменения в структуре и расположении тилакоидных мембран в клетке могут быть связаны с нарушениями в структуре и композиции светособирающего комплекса, что также отражается на количестве пигмент-содержащих белков фикобилисом (ФКБ): аллофикоцианина (АФЦ) и фикоцианина (ФЦ). Отличия в составе пигментов демонстрирует изменённый фенотип мутантного штамма цианобактерий, характеризующийся выцветанием (рис. 6). Сравнительный анализ пигментного состава трёхдневной культуры клеток *Synechocystis*, показал, что у мутанта *ΔperP* снижено содержание фикобилипротеинов по сравнению с клетками ДТ. Схожий эффект наблюдался и у мутанта *ΔperP* штамма GS (Пожидаева *и др.*, 2013), однако детального исследования взаимосвязи PerP и фикобилипротеинов в этой работе не проводилось. В процессе выделения белков ССК фракция интактных ФКБ мутанта находилась в менее плотной зоне градиента, что свидетельствует об усечённой структуре антенн цианобактерий. Последующее фракционирование интактных фикобилисом в ДДС-ПААГ показало, что в клетках мутанта понижено содержание белков ФЦ и АФЦ, а также пяти линкерных полипептидов (рис. 12): якорного белка фикобилисомы L_{CM}⁹⁹, связывающего ядро аллофикоцианина с тилакоидной мембраной; полипептидов боковых цилиндров L_R³³, L_R³⁰ и L_R¹⁰; линкерного белка L_{RC}²⁷, участвующего в прикреплении боковых цилиндров фикоцианина к аллофикоцианиновому ядру.

Разделение цитоплазматических белков с помощью IEF/2DE электрофореза с последующей MALDI-TOF масс-спектрометрией позволило идентифицировать два белка, содержание которых в образцах мутантного штамма *Synechocystis* было

значительно снижено в отличие от ДТ: линкерный белок с мол. массой 33 кД (L_R^{33}) и фактор элонгации Tu (EF-Tu) с мол. массой 43,7 кД.

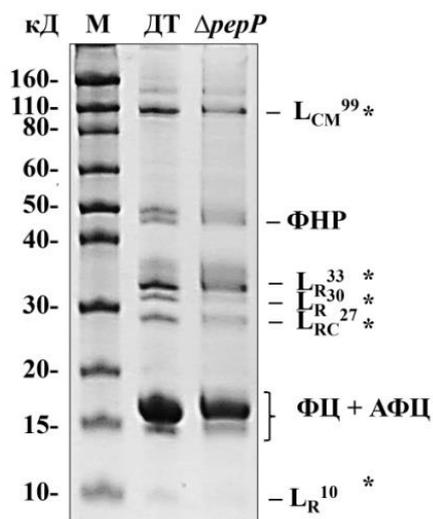


Рис. 12. Фракционирование интактных фикобилисом *Synechocystis* в 12,5% ДДС-ПААГ. L – линкерные полипептиды фикобилисом; ФЦ – фикоцианин; АФЦ – аллофикоцианин; ФНР – ферредоксин-НАДФ-редуктаза; М – маркерные белки (Thermo Scientific, Life Technologies); * обозначены линкерные белки фикобилисом, содержание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

Анализ аминокислотных последовательностей линкерных белков не выявил наличия а. о. Pro в позициях P2 или P3 молекул, что исключает их из потенциальных прямых субстратов для аминопептидазы PerP. Однако исследуемый белок может быть вовлечён в посттрансляционные модификации соответствующих мишеней, которые координируют биогенез фикобилисом.

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

Потенциальные прямые субстраты для аминопептидазы PerP

Установленная в данной работе субстратная специфичность белка PerP как *Xaa↓Pro*- аминопептидазы с предполагаемой цитоплазматической локализацией в клетке позволяет ожидать, что потенциальные прямые субстраты для анализируемого белка также находятся в цитоплазме и отвечают требованиям высокой избирательности действия APP белков. Основываясь на результатах биоинформационного анализа и экспериментальных данных, полученных в ходе выполнения данной диссертационной работы, потенциальными белками-мишенями для PerP могут выступать белки семейств DnaJ, DnaK, Ycf и Clp пептидаз. Мы выделили для аминопептидазы PerP белки-мишени из семейства белков теплового шока, DnaJ4 (или Hsp40), DnaJ3 и DnaK1, которые могут опосредованно участвовать в клеточном делении, а также в сигнальных механизмах, обеспечивающих остановку деления клеток на логарифмической стадии роста. Основываясь на фенотипе мутанта *ΔperP* был выделен другой белок, YCF48, как возможный субстрат для аминопептидазы PerP, который вовлечён в сборку ФСII на ранних этапах биогенеза у *Synechocystis* (Komenda et al., 2008). С помощью IEF/2DE и MALDI-TOF масс-спектрометрии нами был идентифицирован фактор элонгации EF-Tu. Этот белок

играет центральную роль в фазе элонгации синтеза белка, как в бактериях, так и органеллах эукариот, включая митохондрии и пластиды растений. Также возможными субстратами для аминопептидазы *PerP* являются белки *ClpB1* и *ClpB2*, выполняющие различные функции, в частности, участвующие в клеточном ответе на воздействие повышенных температур (Rajaram *et al.*, 2014). В работе Sokolenko показано, что белок *PerP* может быть вовлечён в адаптацию цианобактерий к действию теплового стресса (Sokolenko *et al.*, 2002).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данного исследования определена субстратная специфичность белка *PerP* *Synechocystis*, как *Xaa-Pro-Mn²⁺*-зависимой аминопептидазы, активность которой отличается от канонической активности прокариотических АРР белков (Баик *и др.*, 2018). Интересно, что более широкая субстратная специфичность также характерна для близкородственных белков митохондриальных пролин-специфичных аминопептидаз эукариот, не требующих наличия а. о. пролина в строго определённом положении молекулы-субстрата (Carrie *et al.*, 2015). В то же время, структура каталитического домена типична для металлопептидаз и содержит высококонсервативные а. о. активного сайта белка, соответствующие а. о. АМРРП *E. coli*.

Данная работа показала многосторонний эффект инактивации гена *perP* на жизнедеятельность мутантного штамма *ΔperP*, а также на белковый состав и количественный уровень основных фотосинтетических комплексов цианобактерий: фикобилисом, ФСІ и ФСІІ. Нами было установлено, что инактивация гена *perP* не повлияла на жизнеспособность цианобактериальной клетки, однако изменила скорость роста мутантных клеток и уменьшила их размер. Нужно отметить, что замедленным ростом характеризовался и мутант *ΔperP* штамма GS, у которого в дополнение к этому наблюдали изменённый синтез белков тилакоидных комплексов (Пожидаева *и др.*, 2013). Наши исследования также показали, что в клетках мутанта *ΔperP* содержание основных белковых комплексов (ФСІ и ФСІІ) фотосинтетических мембран между штаммами было изменено, что отразилось на расположении в клетке тилакоидных мембран и, как следствие, уменьшении размера мутантных клеток.

Наблюдаемый в ходе роста фенотип клеток мутанта *ΔperP* был связан с пониженным содержанием фикобилипротеинов, что согласуется с данными на мутанте *ΔperP* штамма GS (Пожидаева *и др.*, 2013). Кроме того, анализ препаратов электронной микроскопии *ΔperP* позволил выявить, что в клетках мутанта увеличен цитоплазматический интервал между слоями тилакоидов, что типично для клеток мутантного штамма *ΔCB* с усечённой структурой лучей ФКБ вследствие отсутствия линкерных полипептидов L_R^{30} и L_R^{33} (Collins *et al.*, 2012). Полученные нами совокупные результаты позволили установить, что инактивация гена *perP* привела к снижению содержания пяти линкерных белков (L_{CM}^{99} , L_R^{30} , L_R^{33} , L_R^{10} и L_{RC}^{27}) фикобилисом у мутанта *ΔperP*, демонстрируя влияние аминопептидазы *PerP* не только на синтез белков АФЦ и ФЦ фикобилисом, но и на линкерные полипептиды. Нужно отметить, что мы не обнаружили в композиции N-концевой области белков фикобилисом а. о. пролина в позиции P2 и (или) P3. Вероятно, аминопептидаза *PerP* может регулировать уровень этих белков на уровне синтеза, например, через факторы трансляции, что согласуется с данными MALDI-TOF анализа.

Описанные изменения морфофизиологических параметров у штамма *ΔperP* позволили обнаружить белки, которые могут являться потенциальными субстратами для аминопептидазы PerP - мультифункциональные шаперонные белки DnaJ4, DnaJ3 и DnaK1, ClpB1 и ClpB2, а также фактор элонгации EF-Tu, выполняющий центральную роль в фазе элонгации синтеза белка, и белок YCF48, участвующий в биогенезе белков комплекса ФСII.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что белок PerP *Synechocystis* sp. PCC 6803 обладает Xaa-Pro-аминопептидазной активностью с оптимумом при 32°C и pH 7,6 и относится к Mn²⁺-зависимым металлоферментам.
2. Выявлено, что белок PerP гомодимеризуется и в его взаимодействие с двумя ионами Mn²⁺ вовлечены высококонсервативные аминокислотные остатки активного сайта белка: Asp260, Asp271, His354, Glu385, Glu415, Thr273 и Thr383.
3. Показано, что инактивация гена *perP* не повлияла на жизнеспособность цианобактерий, однако в отличие от дикого типа мутантный штамм *ΔperP* формировал колонии меньшего размера, что является следствием уменьшения размеров клеток и пролонгированным периодом цитокинеза.
4. В клетках *ΔperP* наблюдали нарушения в структуре и расположении тилакоидных мембран, свидетельствующие об участии белка PerP в биогенезе белков тилакоидных комплексов ФСI и ФСII.
5. Мутант *ΔperP* характеризовался пониженным уровнем линкерных белков фикобилисом, демонстрируя влияние аминопептидазы PerP на композицию и содержание фикобилисом в клетках цианобактерий.
6. Выявлены возможные субстраты для белка PerP: мультифункциональные шаперонные белки DnaJ4, DnaJ3 и DnaK1, ClpB1 и ClpB2, фактор элонгации EF-Tu, выполняющий центральную роль в фазе элонгации синтеза белка, и белок YCF48, участвующий в биогенезе белков комплекса ФСII.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В журналах, рекомендованных ВАК

1. **Баик А.С.**, Миронов К.С., Архипов Д.В., Пиотровский М.С., Пожидаева Е.С. (2018) Характеристика аминопептидазы P из одноклеточной цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Доклады Академии Наук*, **481**, 211–215.
2. Пожидаева Е.С., Малтерер С., **Баик А.С.**, Соколенко А.В. (2013) Инактивация гена *sll0136* у *Synechocystis* sp. PCC 6803 приводит к нарушению биогенеза белков фотосинтетических комплексов. *Физиология растений*, **60**, 541–548.
3. Белозёрова Н.С., **Баик А.С.**, Буцанец П.А., Кузнецов В.В., Шугаев А.Г., Пожидаева Е.С. (2014) Влияние салициловой кислоты на альтернативный путь дыхания люпина жёлтого. *Физиология растений*, **61**, 43–52.

В прочих изданиях

1. **Баик А.С.**, Синетова М.А., Миронов К.С., Пожидаева Е.С. (2014) Пролиновые аминокептидазы вовлечены в биогенез белков у фотосинтезирующих организмов. Статья в сб.: *Материалы Международной научной конференции и школы молодых учёных «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий»*, под ред. Роньжиной Е.С. Калининград: Аксиос, с. 22–24.
2. **Баик А.С.**, Миронов К.С., Пожидаева Е.С. (2016) Молекулярное клонирование, экспрессия и биохимическая характеристика аминокептидазы Р из одноклеточной цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. В сб.: *Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, конференции Adflim, Спецвыпуск*, под ред. Григорьевой А.И. и др. Сочи-Дагомыс: ActaNaturae, с. 220.
3. **Баик А.С.**, Миронов К.С., Пожидаева Е.С. (2015) Очистка и характеристика пролин-специфичной аминокептидазы у цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. В сб.: *Тезисы докладов VIII Съезда Общества физиологов растений России, Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых учёных «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий»*, под ред. Титова А.Ф. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, с. 51.
4. **Baik A.**, Pozhidaeva E. (2014) Proteomic analysis of *Synechocystis* sp. PCC 6803 cells lacking in proline-specific aminopeptidase. In: *Abstracts book of 9th European Workshop on the Molecular Biology of Cyanobacteria*, Texel, The Netherlands, p. 60.
5. **Баик А.С.**, Пожидаева Е.С. (2014) Характеристика аминокептидазы Р в клетках фотосинтетических организмов. В сб.: *Тезисы докладов VII Всероссийской конференции «Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция»*, под ред. Немовой Н.Н. и др. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, с. 82.
6. **Баик А.С.**, Пожидаева Е.С. (2014) РерР влияет на биогенез белков у одноклеточной цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. В сб.: *Тезисы докладов XXI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2014»*, Секция «Биология», под ред. Брюханова А.Л. и др. Москва: МАКС Пресс, с. 333.
7. **Баик А.С.** (2013) Участие пролиновых аминокептидаз в регуляции биогенеза белков фотосинтетических комплексов. В сб.: *Тезисы докладов XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2013»*, Секция «Биология», под ред. Брюханова А.Л. и др. Москва: МАКС Пресс, с. 299.
8. **Баик А.С.**, Пожидаева Е.С. (2012) Роль пролиновой аминокептидазы в биогенезе белков фотоавтотрофных организмов. В сб.: *Тезисы международной конференции «Физиология и биотехнология микроводорослей», посвящённой 80-летию со дня рождения В.Е. Семененко*, Москва, с. 72.
9. **Baik A.**, Sokolenko A., Svetanovic S., Efremova L., Pojidaeva E. (2012) The role of proline-specific aminopeptidases in photosynthetic protein biogenesis. In: *Abstracts of Plant Biology Congress jointly organized by FESPB and EPSO*, Freiburg, Germany, p. 626.