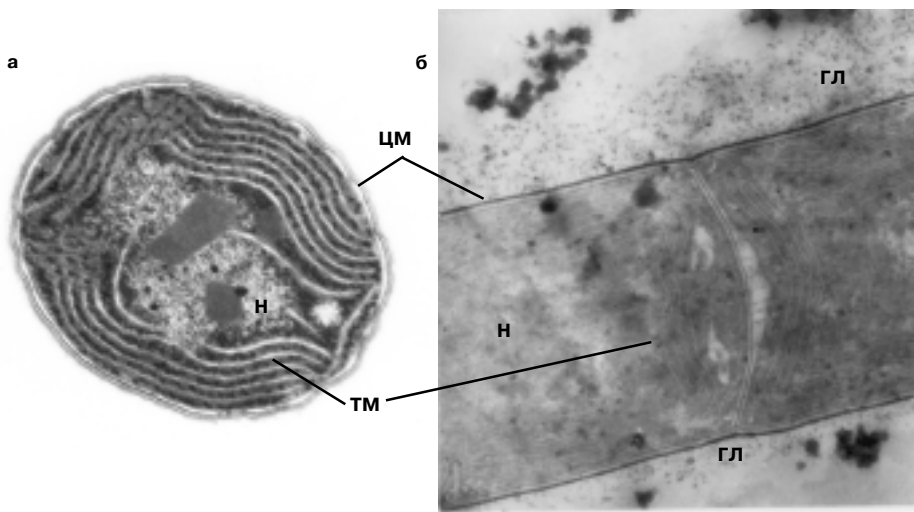


Доктор биологических наук
Д.А. Лось,
Институт физиологии растений
им. К.А.Тимирязева РАН

Как чувствуют стресс цианобактерии

По современным представлениям, планета Земля образовалась примерно 4,5 миллиарда лет назад. Спустя еще 500 миллионов лет на ней появилась вода и сформировались первичные океаны, а 3,8–3,6 миллиарда лет назад в них возникли первые примитивные бактерии. Прошло еще совсем немного времени, и около 3,5 миллиарда лет назад на сцену вышли цианобактерии – организмы, способные, подобно растениям, поглощать углекислый газ и выделять кислород.

Считается, что именно цианобактерии, расцвет которых пришелся на период от 3,5 до 1,8 миллиарда лет назад, обеспечили Землю кислородом и сделали возможным развитие многообразных форм аэробной жизни на планете. В наши дни в природе встречаются разные формы и виды этих бактерий: одноклеточные и нитчатые, морские и пресноводные, съедобные (спирулина) и ядовитые (микроцистис),



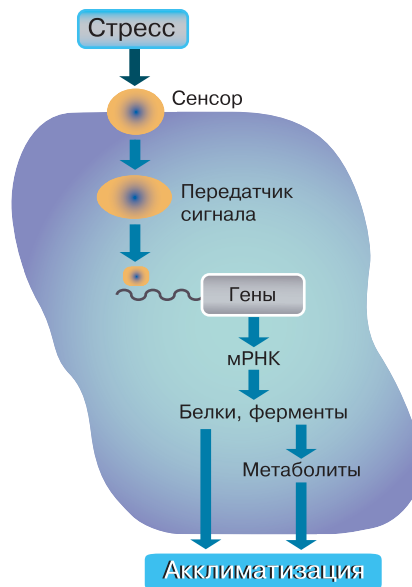
1
Электронные микрофотографии цианобактерий: а – *Synechocystis* – одноклеточная пресноводная цианобактерия; б – *Microcoleus* – нитчатая цианобактерия, предпочитающая щелочные воды; ЦМ – цитоплазматическая мембрана; ТМ – тилакоидные фотосинтезирующие мембраны, Н – нуклеоид (упакованная хромосомная ДНК); ГЛ – гликокаликс (внеклеточный полисахаридный слой).

Microcoleus – реликтовый организм. Останки сходных по строению клеток обнаружены в строматолитах – древних слоистых кальциевых отложениях, возраст которых, как и возраст цианобактерий, оценивается в 3,5–1,8 млрд. лет

свободноживущие и симбиотические. Большинство из них живет в воде, и многие специалисты до сих пор по привычке называют их синезелеными водорослями, хотя от водорослей эти организмы отличаются тем, что это прокариоты и у них нет ядра. Кроме того, цианобактерии в симбиозе с грибами образуют одну из самых удивительных и неприхотливых форм жизни – лишайники. Где бы ни обитали цианобактерии, у них в клетках находится множество плотно упакованных фотосинтетических, или тилакоидных мембран, сходных по строению и функциям с мембранами хлоропластов высших растений (рис. 1). Есть, правда, и тут исключение: клетки цианобактерии *Gloeobacter violaceus* (по-латински *violaceus* – «нарушает») имеют лишь клеточную мембрану и фотосинтетические комплексы располагаются прямо в ней. Считается, что именно цианобактерии в свое время вступили в симбиоз с клеткой, не способной к усвоению CO₂ и выделению кислорода, и позже превратились в фотосинтезирующие органеллы растений. В наши дни эти организмы составляют существенную часть океанического фитопланктона и продолжают участвовать в обогащении атмосферы кислородом, выделяя его, почти столько же, сколько все имеющиеся на Земле высшие растения.

Цианобактерии удобно использовать для изучения фотосинтеза у клеток растительного типа, поскольку строение мембран и устройство аппарата выделения кислорода у них в какой-то степени сходны, но в отличие от клеток растений они быстро растут, и с ними относительно легко проводить генетические манипуляции.

Еще одно направление исследований, где цианобактерии стали подходящим модельным объектом, – это изучение стресса. Поскольку растения обычно прикреплены и не могут выбрать себе самое благоприятное место, их жизнь сильно зависит от условий окружающей среды и они наиболее подвержены стрессовым факторам. Однако их организация очень сложна, а изменять их геном труднее, чем у бактерий, поэтому на них трудно изучать молекулярные механизмы ответов на ухудшение условий. Намного проще проводить такие исследования на цианобактериях.



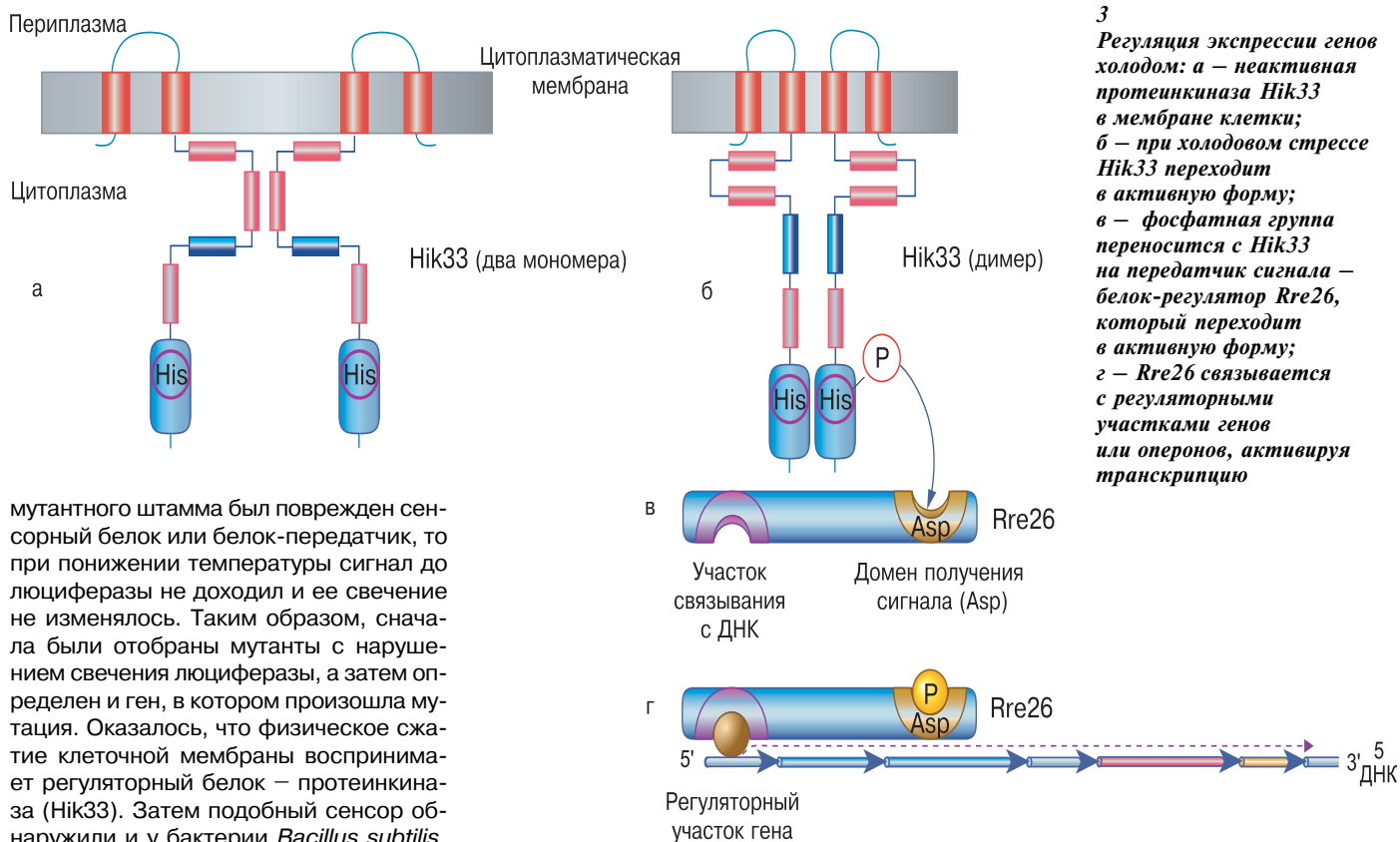
2
Схема восприятия и передачи сигналов при акклиматизации клеток к стрессовым условиям



В общем виде стресс на молекулярном уровне можно описать следующим образом (рис. 2). Любое воздействие на клетку (изменение температуры, солености, кислотности среды и тому подобное) сначала воспринимают специализированные сенсорные молекулы, или сенсоры, расположенные в мембране или цитоплазме. Их свойства при этом изменяются. Они посылают сигнал об изменениях на молекулы – передатчики сигнала, которые, в свою очередь, регулируют экспрессию генов стрессового ответа, а именно: садятся на ДНК, где активируют или тормозят транскрипцию. В итоге синтезируются защитные белки или метаболиты, помогающие клеткам и всему организму приспособиться к новым условиям.

Ученые Национального института общей биологии из Японии (группа профессора Норико Мураты) и наша группа из Института физиологии растений РАН использовали клетки цианобактерии *Synechocystis* в качестве модельной системы, чтобы выявить молекулы, участвующие в ответе клеток на температурный, солевой, осмотический стрессы и на воздействие веществ, способных генерировать активные формы кислорода (АКФ). Последние чаще всего образуются в стрессовых реакциях и регулируют их или, если вырабатываются в чрезмерных количествах, разрушают структурные компоненты и могут даже вызвать гибель клеток.

Первый в истории науки сенсор, воспринимающий снижение температуры окружающей среды, был открыт именно у цианобактерий совместными усилиями японских и российских ученых. Считается, что температура – это так называемый диффузный физический фактор, то есть она действует практически одновременно на всю клетку. Тем не менее первой, по всей видимости, воспринимает низкие температуры клеточная мембрана. Она уплотняется, и находящийся в мембране сенсорный белок изменяет свою конформацию. Сответствующий ему ген удалось определить, используя библиотеку мутантов *Synechocystis*. Под контроль регуляторного элемента, активируемого при понижении температуры, поставили ген люциферазы. (Этот фермент у светлячков испускает свет.) Если у какого-то



3
Регуляция экспрессии генов холодом: а – неактивная протеинкиназа Hik33 в мембране клетки; б – при холодовом стрессе Hik33 переходит в активную форму; в – фосфатная группа переносится с Hik33 на передатчик сигнала – белок-регулятор Rre26, который переходит в активную форму; г – Rre26 связывается с регуляторными участками генов или оперонов, активируя транскрипцию

мутантного штамма был поврежден сенсорный белок или белок-передатчик, то при понижении температуры сигнал до люциферазы не доходил и ее свечение не изменялось. Таким образом, сначала были отобраны мутанты с нарушением свечения люциферазы, а затем определен и ген, в котором произошла мутация. Оказалось, что физическое сжатие клеточной мембраны воспринимает регуляторный белок – протеинкиназа (Hik33). Затем подобный сенсор обнаружили и у бактерии *Bacillus subtilis*.

Вот как работает цепочка передачи сигнала о холодовом стрессе у *Synechocystis* (рис. 3). В обычных условиях протеинкиназа Hik33 находится в клеточной мембране в неактивной форме, в виде отдельных белков-мономеров (а). При холодовом стрессе мембрана сжимается, конформация протеинкиназы изменяется и ее домены (показаны красными цилиндрами) сближаются. Белок превращается в димер и становится активным. А затем происходит автофосфорилирование: одна половинка Hik33 переносит на гистидиновый остаток (His) другой половинки молекулу фосфата – «эстафетную палочку» в каскаде передачи сигналов (б). Вслед за этим фосфат переносится на белок-регулятор Rre26 и прикрепляется к остатку аспарагиновой кислоты (Asp), находящемуся в домене получения сигнала (в). У этого белка есть еще участок узнавания регуляторных областей генов, но в нефосфорилированном виде он не связывается с ДНК. Приняв эстафету и изменив свою конформацию, Rre26 приобретает способность садиться на ДНК в регуляторных областях генов или их групп – оперонов. При этом ускоряется или, наоборот, тормозится экспрессия, то есть считывание мРНК с того или иного гена или группы генов.

В 1996 году была определена полная нуклеотидная последовательность генома *Synechocystis*, и в исследованиях стресса у этих организмов начался новый этап. К этому времени появились и

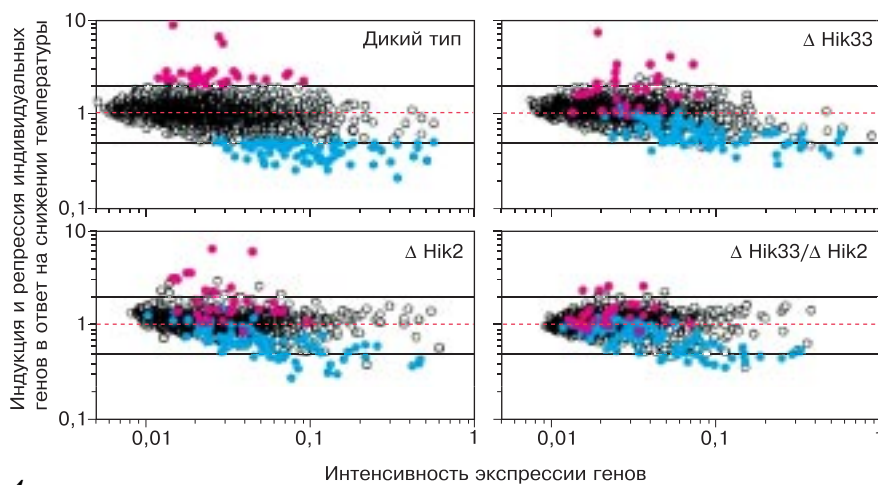
технологии, подходящие для одновременного изучения экспрессии большого количества генов. Японская компания «Такага» приступила к выпуску ДНК-микрочипов, несущих 3079 индивидуальных генов из 3264, имеющихся в геноме этой цианобактерии. Появилась возможность наблюдать за изменением экспрессии каждого из этих генов. Бактерии подвергали стрессу, выделяли РНК и с помощью чипа определяли, какие гены у нее активировались, какие репрессировались, а какие не изменяли экспрессию. Кроме того, все гены гистидинкиназ и регуляторов ответа подвергали направленному мутагенезу, так что у каждого мутантного штамма был нарушен один ген. Таким образом провели скрининг генов и соответствующих белков и определили потенциальные (соответствующие данным компьютерного анализа) сенсорные белки, отвечающие за восприятие изменений температуры, освещенности, солёности, недостатка или избытка разнообразных ионов и многого другого.

Стратегию поиска всех компонентов стрессового ответа определяли, исходя из того, что температурным сенсором оказался белок со свойствами гистидиновых протеинкиназ, которые обычно входят в состав так называемых двухкомпонентных систем регуляции. Такие системы состоят из киназ и принимающих от них «эстафетный» фосфат белков – регуляторов ответа. Мы проводили систематический на-

правленный мутагенез всех генов, кодирующих (по данным компьютерного анализа) гистидиновые киназы и регуляторы ответа. Затем анализировали экспрессию всех генов в мутантах на ДНК-микрочипах.

Пример такого анализа показан на рисунке 4. Исходный штамм цианобактерии охлаждали и с помощью ДНК-микрочипов смотрели, как изменяется активность генов, то есть количество считанной с них информационной РНК. Видно, что у мутантов по гистидинкиназам Hik33 и Hik2 становится меньше генов, регулируемых низкой температурой, чем у клеток исходного штамма. А у двойного мутанта, дефектного по Hik33 и Hik2 одновременно, сильной активации генов низкими температурами вообще не наблюдается. Таким образом, можно сделать вывод о том, что данные гистидинкиназы участвуют в восприятии клетками сигнала о снижении температуры окружающей среды. Таким же способом можно выявить и другие сенсоры и передатчики стрессовых сигналов.

С помощью описанной методологии найдены также пары белков, составляющие системы ответа клеток на солевой стресс. Пока обнаружено пять таких систем. Каждая из них состоит из одной или двух сенсорных гистидинкиназ и соответствующего белка-регулятора, воспринимающего сигнал от сенсора и передающего его к регуляторным областям генов ответа. Каждая



4
Изменения активности генов у *Synechocystis* при низкой температуре:
a – при снижении температуры у исходного штамма одни гены (красные точки) активируются, другие – (синие точки) репрессируются, экспрессия третьих (белые точки) не меняется; *б, в* – у мутантов по *Hik33* и *Hik2* не все гены отвечают на холодовой стресс; *г* – у двойного мутанта по *Hik33* и *Hik2* активация генов холодом почти не наблюдается

двухкомпонентная система регулирует свою группу генов. Вместе с тем есть группа стресс-зависимых генов, активность которых не контролируется известными двухкомпонентными системами регуляции. По-видимому, ответ клеток на солевой стресс регулируется еще какими-то компонентами, отличными от гистидинкиназы и регуляторов ответа на температуру. Среди таких контролируемых механизмов могут быть и глобаль-

ные регуляторы транскрипции, например сигма-факторы РНК-полимеразы – вспомогательные белки, которые присоединяются к этой полимеразе и изменяют ее активность. Для них в геноме известно 7 генов. Это могут быть другие протеинкиназы, подобные соответствующим белкам эукариот (для них в геноме известно 12 генов), а также транскрипционные факторы – специфические ДНК-связывающие белки, регу-

ЖИВЫЕ ЛАБОРАТОРИИ

лирующие активность индивидуальных генов или их групп (около 90 генов в геноме).

Как цианобактерии и другие прокариоты чувствуют разные виды стресса, еще не до конца понятно, однако в целом схема ясна. А главное, есть методология для систематического анализа экспрессии участвующих в этом генов. Она основана на знании полных нуклеотидных последовательностей геномов и использовании ДНК-микрочипов. Эта технология – мощный инструмент, помогающий относительно легко и весьма достоверно определять клеточные системы регуляции, отвечающие за восприятие и передачу стрессовых сигналов.



ИНФОРМАЦИЯ



ЗАО «КАТАКОН» предлагает
 совместную разработку ЗАО «КАТАКОН»,
 Института катализа им. Г.К.Борескова СО РАН,
 Института физики полупроводников СО РАН

АНАЛИЗАТОРЫ УДЕЛЬНОЙ ПОВЕРХНОСТИ



Измерение удельной поверхности приборами серии **СОРBTOMETP** базируется на тепловой десорбции аргона или азота методами БЭТ и STSA. Приборы эффективны для определения текстурных характеристик дисперсных и пористых веществ и материалов в научных исследованиях, в промышленности (контроль качества сырья и готовой продукции), а также в учебных целях. Измерения прибора **СОРBTOMETP** основаны на одноточечном методе БЭТ, **СОРBTOMETP-M** – на многоточечных методах БЭТ и STSA. Метод STSA позволяет определить объем микропор образца.

Технические характеристики приборов

Диапазон измеряемой удельной поверхности 0,1–2000 м²/г
 Диапазон относительных парциальных давлений газа-адсорбата 0,03–0,95
 Полная автоматизация цикла адсорбция-десорбция.
 Встроенная в прибор станция подготовки исследуемых образцов к измерениям.
 Управление процессом измерения и обработка результатов с использованием ЭВМ.

630090 Новосибирск,
 пр. Академика Лаврентьева, 5, ЗАО «КАТАКОН»
 телефон +7(383) 3397265, 3331084;
 факс (383) 3308766,
 e-mail: catacon@ngs.ru
 www.catacon.ru

Мы обучаем персонал потребителя работе на приборе, обеспечиваем техническое и методическое сопровождение прибора во время эксплуатации.