
The experimental data combined cultivation of are mixed cultures of microalgae on the modified environments. Presented the results of experiment show that during the cultivation of the mixed cultures of microalgae on the modified environments were observed speed enhancing of cell growth and accordingly with the increase of bioactive substances as compared with control.

А.А. Зорина, Н.С. Степанченко, Г.В. Новикова, Д.А. Лось

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕНОМИКА И ФОСФОПРОТЕОМИКА СТРЕССОВЫХ ОТВЕТОВ У ЦИАНОБАКТЕРИЙ

(Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, e-mail: losda@ippras.ru)

В работе рассматриваются проблемы идентификации систем восприятия и передачи сигналов стрессовых ответов у цианобактерий с применением методов ДНК-микрочипов и фосфопротеомики.

Современные методы исследования экспрессии генов, помимо традиционных РНК-ДНК гибридизации, обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией и др., предполагают использование ДНК-микрочипов для изучения транскрипции генов и масс-спектрометрический анализ белков для изучения и идентификации продуктов трансляции соответствующих генов. Применение ДНК-микрочипов и масс-спектрометрии в сочетании с методами направленного мутагенеза позволяют с высочайшей точностью определять влияние той или иной мутации на транскрипцию генов или на посттрансляционные модификации белков. Это особенно важно при изучении систем восприятия и передачи стрессовых сигналов или сигналов об изменении параметров окружающей среды, которые состоят, как правило, из протеинкиназ и протеинфосфатаз, осуществляющих фосфорилирование и дефосфорилирование белков, и таким образом регулирующих их активность.

Двухкомпонентные системы регуляции состоят из сенсорной гистидинкиназы (Hik) и регулятора ответа (Rre) и формируют центральное ядро фосфатной сигнальной системы у цианобактерий [1]. Сенсорная гистидинкиназа воспринимает изменения в окружающей среде через сенсорный домен. Изменения его конформации приводят к автофосфорилированию Hik по консервативному остатку гистидина с использованием донорной АТФ. Фосфат затем переносится на консервативный аспартат получающего домена белка – регулятора ответа Rre. После фосфорилирования, Rre также меняет свою конформацию, в результате чего приобретает способность связываться с ДНК. Связывается он обычно с промоторами генов, локализованных далее по курсу всей цепочки пути адаптации, связанного с генной экспрессией.

У цианобактерии *Synechocystis* имеется 47 генов, кодирующих гистидинкиназы, и 45 генов регуляторов ответа. Соответствующие этим генам белки являются кандидатами на роль сенсоров и передатчиков сигналов об изменении окружающей среды [2]. Как правило, инактивация генов, кодирующих белки-сенсоры и/или передатчики, приводит к невозможности запуска ряда генов стрессовых ответов, поэтому применение ДНК-микрочипов в данном случае способно дать однозначный ответ на вопрос о том, какие гены контролируются той или иной сенсорной гистидинкиназой. С использованием ДНК-микрочипов были идентифицированы сенсоры низкой (Hik33) и высокой (Hik34) температуры, солевого и гиперосмотического стресса (Hik2, Hik10, Hik16, Hik41), двухкомпонентная система, регулирующая транспорт ионов марганца при их недостатке (Hik27-Rre16) и некоторые другие [3-6].

В отличие от сенсорных гистидинкиназ, серин-треониновые протеинкиназы эукариотического типа у прокариот участвуют в регуляции основных физиологических процессов (подвижность клеток, метаболизм при повышенных температурах и т.п. [2, 7]). Мутации по генам серин-треониновых протеинкиназ редко приводят к видимым нарушениям в транскрипции генов и чаще выражаются в неспособности фосфорилирования отдельных белков. Такие изменения невозможно определить на уровне транскрипции даже с помощью микрочипов, и для их определения более подходят методы фосфопротеомики – определение профилей фосфорилирования по серину и треонину с помощью двумерного электрофореза с последующей идентификацией белков методами масс-спектрометрии.

Примером такого определения может служить фосфопротеомный анализ субстратов серин-треониновых протеинкиназ у *Synechocystis* при тепловом стрессе. В геноме *Synechocystis* имеется 12 генов, кодирующих серин-треониновые протеинкиназы. Мутантные штаммы, полученные по каждому из этих генов, исследовались на предмет их способности фосфорилировать белки по остаткам серина и треонина в нормальных условиях роста и при тепловом стрессе. Методом MALDI-TOF были

идентифицированы метионил-тРНК-синтетаза, большая субъединица RuBisCo, 6-фосфоглюконат дегидрогеназа, фактор элонгации трансляции Tu (TufA), тРНК δ 2-изопентенил-пирофосфат-трансфераза, белок теплового шока GrpE и малый ко-шаперонин GroES, являющийся компонентом системы, участвующей в рефолдинге белков после их денатурации в условиях теплового или солевого стресса. Все перечисленные белки являются субстратами для серин-треониновых протеинкиназ. Белок GroES был экспрессирован в клетках *Escherichia coli*, очищен и использовался в экспериментах по фосфорилированию *in vitro* с использованием белковых экстрактов, полученных из клеток *Synechocystis* дикого типа и 12 мутантов, дефектных по генам серин-треониновых протеинкиназ. Эти эксперименты показали, что белковые экстракты, в которых отсутствует одна из трех протеинкиназ – SpkC, SpkF или SpkK, не способны фосфорилировать GroES. В то же время, реверсии соответствующих мутаций приводили к восстановлению фосфорилирования этого белка. Таким образом, было показано, что три протеинкиназы, SpkC/F/K, участвуют в фосфорилировании малого шаперонина GroES. При этом работают они, видимо, последовательно друг за другом, формируя каскад из трех этапов фосфорилирования, последним из которых является фосфорилирование GroES [8].

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 нормальной температуре. 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 серин-треониновых протеинкиназ, 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 серин-треониновыми протеинкиназами. 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.

Таким образом, систематический анализ библиотек мутантов цианобактерий с помощью ДНК-микрочипов и с помощью методов фосфопротеомики позволяет идентифицировать гены, кодирующие различные сенсорные системы клеток [9], а также другие системы фосфорилирования, участвующие в регуляции клеточных процессов.

1. Зорина А.А., Миронов К.С., Степанченко Н.С., Синетова М.А., Коробан Н.В., Зинченко В.В., Куприянова Е.В., Аллавердиев С.И., Лось Д.А. Системы регуляции стрессовых ответов у цианобактерий // *Физиология растений*. – 2011. Т. 58. № 5. С. 643-663.

2. Лось Д.А. Сенсорные системы цианобактерий. – Москва: Научный Мир. – 2010. 219 с.

3. Suzuki I., Los D.A., Kanesaki Y., Mikami K., Murata N. The pathway of perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis* // *EMBO J.* – 2000. V. 19. P. 1327-1334.

4. Yamaguchi K., Suzuki I., Yamamoto H., Lyukevich A., Bodrova I., Los D.A., Piven I., Zinchenko V., Kanehisa M., Murata N. A two-component Mn²⁺-sensing system negatively regulates expression of the *mntCAB* operon in *Synechocystis* // *Plant Cell* – 2002. V.14. P. 2901-2913.

5. Suzuki I., Kanesaki Y., Hayashi H., Hall J.J., Simon W.J., Slabas A.R., Murata N. The histidine kinase Hik34 is involved in thermotolerance by regulating the expression of heat shock genes in *Synechocystis* // *Plant Physiol.* – 2005. V. 138. P. 1409-1421.

6. Shumskaya M.A., Paithoonrangsarid K., Kanesaki Y., Los D.A., Zinchenko V.V., Tanticharoen M., Suzuki I., Murata N. Identical Hik-Rre systems are involved in perception and transduction of salt signals and hyperosmotic signals but regulate the expression of individual genes to different extents in *Synechocystis* // *J. Biol. Chem.* – 2005. V. 280. P. 21531-21538.

7. Panichkin V.B., Arakawa-Kobayashi S., Kanaseki T., Suzuki I., Los D.A., Shestakov S.V., Murata N. Serine/threonine protein kinase SpkA in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is a regulator of expression of three putative *pilA* operons, formation of thick pili, and cell motility // *J. Bacteriol.* – 2006. V. 188. P. 7696-7699.

8. Zorina A., Stepanchenko N., Novikova G.V., Sinetova M., Panichkin V.B., Moshkov I.E., Zinchenko V.V., Shestakov S.V., Suzuki I., Murata N., Los D.A. Eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases SpkC/F/K are involved in phosphorylation of GroES in the cyanobacterium *Synechocystis* // *DNA Research* – 2011. V. 18. P. 137-151.

9. 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.

**Л.В. Игнатова, Е.В. Бражникова, Т.Д. Мукашева, В.Л. Цзю, Р.Ж. Бержанова,
Р.К. Сыдыкбекова, С.Е. Шукешева**

СКРИНИНГ АКТИВНЫХ НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ СРЕДИ ДРОЖЖЕПОДОБНЫХ ГРИБОВ РОДА *AUREOBASIDIUM*

(Казахский национальный университет имени аль-Фараби)

Одной из серьезных проблем восстановления природной среды при добыче, транспортировке и переработке нефти является ликвидация нефтяного загрязнения и утилизации отходов нефтяной промышленности. Наиболее перспективным направлением биоремедиации нефтезагрязненных объектов является применение биологического метода, основанного на использовании биохимического потенциала микроорганизмов, позволяющих ускорить разложение нефти и нефтепродуктов, не нанося дополнительного ущерба нарушенной экосистеме [1,2].

Микробиологическая активность является важным фактором при утилизации нефтяных загрязнений. Однако высокомолекулярные парафины, ароматические и полициклические соединения, содержащиеся в сырой нефти, прочно связываются с почвенными частицами, образуя гидрофобные пленки, и становятся практически недоступными для ферментных систем микроорганизмов. Одним из важнейших механизмов окисления гидрофобных углеводородов нефти является продуцирование микроорганизмами-нефтедеструкторами биосурфактантов, которые способствуют десорбции и солюбилизации нефтяных углеводородов, тем самым, облегчая их ассимиляцию микробными клетками [3].

Поскольку углеводородокисляющие микроорганизмы растут на границе раздела фаз «углеводород/вода», синтез эмульгаторов при высокой клеточной плотности увеличивает площадь поверхности углеводородных капель, создавая оптимальные условия питания для большего числа бактерий. В то же время, при использовании такого сложного субстрата, как нефть, по окончании процесса ферментативного окисления ее легкодеградируемых фракций наличие эмульгатора позволяет микроорганизмам, отсоединиться от «использованной» нефтяной капли и переходить к «свежему» субстрату [4].

Поверхностно-активные вещества, продуцируемые дрожжеподобными грибами *Aureobasidium pullulans*, могут являться мощным регулятором активности микробной популяции [5,6]. Одним из важных критериев оценки поверхностно-активных веществ при их практическом использовании является способность к эмульгированию углеводородов.

Цель исследований – оценка эмульгирующей и нефтедеструктирующей активности штаммов дрожжеподобных грибов *Aureobasidium pullulans*.

Материалы и методы

В качестве объектов были выбраны 30 штаммов *Aureobasidium pullulans*, способных к продукции различных биологически активных соединений: экзополисахаридов и меланинов. Эмульгирующую активность определяли спектрофотометрически при выращивании на минеральной среде Чапека-Докса в течение 7 суток. Динамику численности изучали при росте в полупогруженных условиях на минеральной среде 8E.

При изучении деструкции нефти оценивали суммарный показатель ее убыли как в жидкой среде, так и в стерильном песке, определяемый весовым методом (гравиметрия). Культуры выращивали на минеральной среде 8E, содержащей 1%, 2% и 3% сырой нефти от общего объема. Первоначальное содержание нефти в песке составило 12 500 мг/кг, что соответствует умеренно-сильному уровню загрязнения, поскольку превышает ориентировочно допустимое количество (ОДК) нефти в почве в 11 раз. Продолжительность опыта - 14 суток. Определение фитотоксичности проводили по стандартной методике с использованием семян редиса.

Результаты и обсуждение

Эмульгирование углеводородов с помощью поверхностно-активных веществ улучшает поступление гидрофобных органических загрязнителей из почвы и воды в микробные клетки и соответственно их деградацию.