

3. Реализация программы научных исследований на СИП.

Будут проведены научные исследования на СИП по следующим основным направлениям.

1. Радиобиологические исследования.
2. Изучение миграционных процессов в местах проведения ПЯВ.
3. Изучение поствзрывных процессов в местах проведения ПЯВ (подземная газификация горных пород, провальные явления).
4. Создание систем мониторинга природных сред (водная, воздушная).

Artmann G., Artmann A.T.

BIOMEDICAL ENGINEERING: EXPERIENCE OF BENEFICIAL COLLABORATION

Aachen University of Applied Sciences, Germany

The FH Aachen - University of Applied Sciences is one of the notable educational institutions in Germany where scientific researches in various directions of science are conducted. Among them the most important fields are medicine and biology. Studies and scientific researches in this sphere are held in campus laboratories in a small city Julich near Aachen. There are many student apartments in a close proximity to the campus where a lot of laboratories, libraries and sport facilities are located. Since 2005 Laboratories of Cellular Biophysics, Cell- and Microbiology and Medical & Molecular Biology started cooperation with the Al-Farabi Kazakh National University. The series of researches which are of interest for both sides was defined and since then young experts, students of Prof. Azhar Zhubanova, came to our University. Prof. A.Zhubanova have a training course at the University.

During these years, working with microbiology department, we had an opportunity to work also with an interesting person and scientist – Prof. Z.Mansurov. The results of joint researches will lead to a creation of the new technologies applicable both for biology and medicine, using new carbonized materials introduced by Prof. Z.Mansurov. So, efficiency of purification of blood was proved by use of columns filled with carbonized sorbent. Interesting experiments have been conducted with use of various cellular cultures, enzymatic and protein preparations etc.

In 2008 Mr Rustam Sadykov and in 2010 Ms Ajnash Kozhalakova has successfully got Ph.D degree, in June 2011 Mr Nuraly Akimbekov will do the same.

I'd like to underline that training candidates to Ph.D represents both scientific and public interest for both sides. On my behalf I can tell that your young scientists are skilful and wise people and thanks them we have learnt a lot about Republic of Kazakhstan and people who live there. It is need to say that such close connections with double responsibility for the future generation of scientists are of a great importance for the future of world science.

УДК 669.7122

Лось Д.А.

ДВУХКОМПОНЕНТНЫЕ СЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва, Россия

Считается, что именно цианобактерии, расцвет которых пришелся на период от 3,5 до 1,8 млрд. лет назад, обеспечили Землю кислородом и сделали возможным развитие многообразных форм аэробной жизни на планете [1]. В природе встречаются разные формы и виды этих бактерий: одноклеточные и нитчатые, морские и пресноводные, съедобные и ядовитые, свободноживущие и симбиотические. Считается, что именно цианобактерии вступили в симбиоз с клеткой, не способной к усвоению CO₂ и выделению кислорода, и в дальнейшем превратились в фотосинтезирующие органеллы растений [2]. В наши дни эти организмы составляют существенную часть океанического фитопланктона и продолжают участвовать в обогащении атмосферы кислородом, поставляя его количества, сравнимые с

теми, что выделяют все имеющиеся на Земле высшие растения. Одним из направлений исследований, где цианобактерии стали подходящим модельным объектом, является изучение стрессовых ответов фотосинтезирующих клеток. После того, как в 1996 году была определена полная нуклеотидная последовательность генома *Synechocystis sp.* PCC 6803 [3], начался новый этап в исследованиях этого организма и цианобактерий вообще. В 1999 году японская компания «Такага Био» приступила к выпуску ДНК-микрочипов, несущих 3079 (97%) индивидуальных генов из 3264, имеющихся в геноме *Synechocystis*. Появилась возможность одновременно наблюдать за изменением экспрессии каждого индивидуального гена и генома в целом при стрессовых воздействиях.

Двухкомпонентные системы регуляции

Эти системы состоят из сенсорной гистидинкиназы (Hik) и регулятора ответа (Rre) и формируют центральное ядро фосфатной сигнальной системы у цианобактерий [4]. 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 и регулировать транскрипцию.

В геноме *Synechocystis* имеются 44 гена, кодирующие потенциальные гистидинкиназы, и ещё 3 гена Hik локализованы в плаزمиде. Потенциальные регуляторы ответа представлены на хромосоме 42 генами, и ещё 3 гена находятся в плазмиде. Все эти 47 Hik и 45 Rre являются кандидатами на роль сенсоров и передатчиков сигналов об изменении окружающей среды [4].

Гистидинкиназы цианобактерий могут быть растворимыми и локализованными в мембранах. Размеры и оснащённость разного рода доменами также сильно различаются у разных гистидинкиназ. Тринадцать гистидинкиназ из 47 являются гибридными. Они, как и регуляторы ответа, несут один или несколько доменов восприятия сигнала и могут выполнять ещё и функцию передатчиков.

Сенсоры солёности и осмолярности

Сорбит (0,5М в течение 20 мин), использовавшийся для создания условий гиперосмотического стресса, индуцирует около 100 генов в три раза и выше [5-7]. Это, прежде всего, гены, кодирующие так называемые БТШ – белки теплового шока: *hspA*, кодирующий БТШ 17 кДа, *hspG* (HSP90), *dnaK2* (HSP70), *dnaJ* (HSP40), *groES*, *groEL1* и *groEL2*, *clpB1* (шапероны), ген протеазы *htrA*. Кроме этого, сильно индуцируются все три гена *hli*, которые активируются холодным стрессом и сильным светом; ген супероксиддисмутазы *sodB*; гены, кодирующие альтернативные сигма-субъединицы РНК-полимеразы - *sigB* и *sigD*; ген гистидин-киназы *hik34* (кодирует сенсорный белок, контролирующий экспрессию генов БТШ) [8]; и ген серин-треониновой протеинкиназы *spkH*.

Солевой стресс (0.5М NaCl в течение 20 мин) вызывает индукцию 360 генов и репрессию 200 генов в клетках *Synechocystis* в три раза или сильнее [5, 6]. Солевой стресс также вызывает быструю и сильную индукцию генов БТШ - *hspA*, *hspG*, *dnaK2*, *dnaJ*, *groEL2* и *clpB1*, протеазы *htrA*, а также уже упомянутых выше *hli*, *sodB*, *sigB* и *sigD*.

Оба стресса, солевой и гиперосмотический, усиливают экспрессию генов, вовлеченных в синтез осмопротектора глицерина (*glpD* и *ggsS*). Следует особо отметить ту немногочисленную группу генов, которая специфически индуцируется при гиперосмотическом стрессе. Это *fabG*, кодирующий 3-кетоацил-АПБ-редуктазу; *spkH*, кодирующий серин-треониновую протеинкиназу; и *gloA*, кодирующий лактоилглутатионлиазу.

Сенсоры и передатчики солевого и гиперосмотического стресса идентифицированы при скрининге библиотек мутантов *Synechocystis*, дефектных по генам гистидинкиназ *hik* и регуляторов ответа *rre*. Сочетая ДНК-РНК гибридизацию с техникой ДНК-микрочипов,

удалось определить несколько пар гистидинкиназ и соответствующих им регуляторов ответа, контролирующих индукцию генов в ответ на солевой [6] и гиперосмотический [5] стресс. Так были обнаружены пары Hik33-Rre31, Hik34-Rre1, Hik2-Rre1, Hik10-Rre3, а также трехкомпонентная система, состоящая из двух гистидинкиназ, Hik16 и Hik41, и регулятора ответа Rre17.

Пара Hik33-Rre31 отвечает за индукцию 7 генов при солевом и 11 генов при гиперосмотическом стрессе. Инактивация Hik33 и/или Rre31 приводит к тому, что эти гены перестают индуцироваться солью и сорбитом. Это свидетельствует о том, что данная двухкомпонентная система жестко контролирует транскрипцию указанных семи генов в ответ на солевой стресс.

Пара Hik10-Rre3 регулирует экспрессию лишь одного гена, *htrA*, кодирующего сериновую протеазу, при солевом и гиперосмотическом стрессе.

Система, состоящая из трех компонентов, два из которых, Hik16 и Hik41, видимо, являются последовательно мембранным сенсором и растворимым промежуточным передатчиком сигнала, представляют собой гистидин-киназы, а Rre17 – регулятор ответа, отвечающий за индукцию транскрипции трех генов неизвестной функции *sll0938*, *sll0939* и *slr0967*.

Пара Hik34-Rre1 регулирует 25 генов, среди которых множество уже известных нам «генов теплового шока». Индукция генов *sigB* для альтернативной сигма-субъединицы РНК-полимеразы, шаперона *dnaJ*, *rimI* рибосомной аланилацетилтрансферазы, и ещё пяти других генов непонятной функции также находятся под контролем Rre1. Однако, Hik34 не принимает участия в регуляции их экспрессии. В данном случае Rre1 взаимодействует с киназой Hik2.

Эксперименты с использованием дрожжевой двухгибридной системы показали прямое и тесное взаимодействие Hik2 и Rre1 [6]. При солевом стрессе пара Hik2-Rre1 контролирует экспрессию 8, а при гиперосмотическом - 5 генов (*sigB* и 4 гена неизвестной функции).

Таким образом, в описанных условиях эксперимента клетки *Synechocystis* задействуют одни и те же системы восприятия и передачи сигналов в условиях солевого и гиперосмотического стресса. Соль и сорбит вызывают быстрое сжатие клеток с первых секунд своего воздействия на них [5-7]. Соответственно, и сигнальные системы, воспринимающие такое сжатие при солевом и гиперосмотическом стрессе, могут быть одними и теми же.

Сенсор низкой температуры

Геномика низкотемпературного ответа цианобактерий впервые появилась в самом начале XXI века [9]. Холодовой стресс для клеток *Synechocystis* означает 20-22°C, поскольку в оптимальные температуры роста для этого штамма лежат в пределах 30-34°C. Ответам цианобактерий на низкотемпературный стресс посвящен ряд подробных обзоров [10-12]. Гены, отвечающие на снижение температуры окружающей среды, можно разделить на шесть категорий: 1) гены десатураз жирных кислот, отвечающие за регуляцию текучести мембран; 2) гены РНК-связывающих белков (Rbp), которые являются шаперонами РНК, подобно белкам холодового шока (Csp) *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*; 3) гены РНК-хеликаз, участвующих в дестабилизации вторичных структур мРНК, и таким образом, облегчающих инициацию трансляции при низких температурах; 4) гены рибосомных белков, избыток которых необходим для акклиматизации трансляционного аппарата к холоду; 5) гены протеаз, участвующих в восстановлении фотосистемы II после повреждения; 6) другие гены различных функций, не попадающие ни в одну из вышеперечисленных категорий.

Низкотемпературный сенсор идентифицирован с использованием рекомбинантного штамма *Synechocystis*, в котором под контролем промотора гена *desB*, индуцируемого низкими температурами, была встроена кассета, кодирующая люциферазу из *Vibrio harveii*. В мутантных штаммах с нарушенной системой передачи холодового сигнала снижение температуры не воспринималось клетками. В результате промотор *desB* не активировался и увеличения люминесценции не наблюдалось. Определение сайта мутации выявило

поврежденный ген, кодирующий гистидинкиназу мембранной локализации Hik33 (Sll0698) [13]. Исследования мутанта по Hik33 показали, что эта гистидинкиназа контролирует не все гены, индуцируемые холодом. Оказалось, что из 38 генов, транскрипция которых увеличивается на холоде более чем в 3 раза, только 23 гена находятся под контролем сигнального пути гистидинкиназы Hik33: *ndhD2*, *hliA*, *hliB*, *hliC*, *fus*, *feoB*, *crtP*, *desB* и несколько генов с неизвестной функцией. Остальные 15 генов не контролируются этим сенсором. Среди этих генов - *crhR*, кодирующий РНК-хеликазу, и *rbpA*, кодирующий РНК-связывающий белок шаперонного типа.

Сенсор высокой температуры

Тепловой стресс индуцирует известные гены БТШ и шаперонов *hspA*, *groES*, *groEL1*, *groEL2*, *dnaJ*, *hspG*, *dnaK2*, *clpB1*, протеазы *htrA*, гены σ -фактора РНК-полимеразы *sigB*, сенсорной гистидинкиназы *hik34*, супероксиддисмутаза *sodB* и некоторые другие. Ни один из перечисленных генов не индуцируется тепловым шоком специфически. Экспрессия этих генов индуцируется также сорбитом [5], NaCl [6], а также окислительным стрессом (H₂O₂), сильным светом и ультрафиолетом (UV-B). Весь список генов истинных БТШ или HSP исчерпывается следующими названиями: *sll0441*, *sll0688*, *sll1106*, *sll1884*, *slr0852*, *slr0095*, *slr1597* [14].

Сенсор высокой был обнаружен при скрининге библиотеки мутантов по гистидинкиназам с помощью ДНК-микрочипов. Мутация в гене *hik34* приводила к индукции генов БТШ *hspG*, *groES* и оперона *groEL* при нормальной температуре роста [8]. Напротив, усиленная экспрессия *hik34* в рекомбинантном штамме *Synechocystis* подавляла экспрессию генов БТШ при тепловом стрессе. Гистидинкиназа Hik34 способна автофосфорилироваться при температурах 20-36°C и является репрессором транскрипции генов БТШ, сдерживающим их экспрессию при нормальной температуре роста. Тепловой стресс инактивирует Hik34 и запускает транскрипцию генов БТШ [4, 8].

Сенсоры света

Сенсорами света у *Synechocystis* являются гистидинкиназы со свойствами, напоминающими фитохромы растений [4, 15]. В геноме *Synechocystis* имеется 6 генов гистидинкиназ, в той или иной степени гомологичных генам, кодирующим фитохромные апопротеины: *hik35* (*slr0473*), *hik3* (*sll1124*), *hik32* (*sll1473/sll1475*), *hik1* (*slr1393*), *hik44* (*slr1212*) и *hik24* (*slr1969*). Помимо этого, имеются еще PilJ1 (Sll0041) и Cph2 (Sll0821), претендующие на роль цианохромов. Ген, кодирующий Hik32, прерван транспозоном и состоит из двух частей - *sll1473* и *sll1475* – в штамме *Synechocystis* sp. PCC 6803, геном которого использовался для определения нуклеотидной последовательности.

Гистидинкиназа Hik44 (Slr1212), кроме консервативных участков, характерных для фитохромов растений, оснащена ещё и всеми структурными элементами, делающими её похожей на рецептор этилена ETR1 растительного происхождения.

В геноме *Synechocystis* рядом с геном *hik35* находится ген *rre27* (*slr0474* или *rcp1*). Инактивация генов *hik35* и/или *rre27* приводит к нарушениям роста клеток на постоянном дальнем красном свете [16]. Инактивация Cph2 приводит к замедленному росту клеток на красном свете.

Использование ДНК микрочипов показало, что транскрипция примерно четверть генов *Synechocystis* регулируется светом [17]. 473 гена отвечают на красный свет, который преимущественно усиливает экспрессию генов, продукты которых участвуют в транскрипции, трансляции, фотосинтезе. 605 генов отвечают на дальний красный свет, который активирует разные стресс-зависимые гены.

Hik3 (Sll1124) по своим проявлениям ближе к криптохромам и, по-видимому, воспринимает синий свет. Hik44 (Etr1) может связывать этилен и также, как Hik32, принадлежит к новому классу светорецепторов – цианохромам, которые подобно фитохромам способны к фотопереходам, но делают это не под действием красного и дальнего красного, а под действием синего и зеленого света [18, 19]. Hik32 (CsaS) фосфорилирует Rre38 (CsaR) на зеленом свете ($\lambda_{\max} = 535$ nm), а регулятор ответа

индуцирует транскрипцию гена *srcG2*, кодирующего фикобилипротеин, необходимый для переноса энергии на ФСІ.

Заключение

Предполагается, что изменения текучести биологических мембран являются первичным сигналом при восприятии температурного и, возможно, осмотического стресса [4, 20]. Однако молекулярные механизмы, контролирующие восприятие и передачу этих сигналов, все еще до конца не понятны. В исследовании сенсорных систем цианобактерий остались самые интригующие загадки, разрешение которых будет возможно с помощью сочетания физиологических, биохимических и генетических подходов, подкрепленных современными возможностями развитых промышленных технологий.

Литература

1. Заварзин Г.А. Становление биосферы // Вестник РАН 2001. 71: 988-1001.
2. Маргелис Л. Роль симбиоза в эволюции клетки. - М.: Мир, 1983. - 352 с.
3. Kaneko T., Sato S., Kotani H. et al. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (Supplement) // DNA Res. 1996. 3: 185-209.
4. Los D.A., Zorina A., Sinetova M., Kryazhov S., Mironov K., Zinchenko V.V. Stress sensors and signal transducers in cyanobacteria // Sensors 2010. 10: 2386-2415.
5. Paithoonrangsarid K., Shoumskaya M.A., Kanesaki Y., Satoh S., Tabata S., Los D.A., Zinchenko V.V., Hayashi H., Tanticharoen M., Suzuki I., Murata N. Five histidine kinases perceive osmotic stress and regulate distinct sets of genes in *Synechocystis* // J. Biol. Chem. 2004. 279: 53078-53086.
6. Shoumskaya 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. 280: 21531-21538.
7. Shapiguzov A., Lyukevich A.A., Allakhverdiev S.I., Sergeyenko T.V., Suzuki I., Murata N., Los D.A. Osmotic shrinkage of cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803 by water efflux via aquaporins regulates osmotic stress-inducible gene expression // Microbiology 2005. 151: 447-455.
8. 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. 138: 1409-1421.
9. Suzuki I., Kanesaki Y., Mikami K., Kanehisa M., Murata N. Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik33 in *Synechocystis* // Mol. Microbiol. 2001. 40: 235-244.
10. Los D.A., Murata N. Responses to cold shock in cyanobacteria // J. Mol. Microbiol. Biotech. 1999. 1: 221-230.
11. Los D.A., Murata N. Sensing and Response to Low Temperature in Cyanobacteria. // Cell and Molecular Responses to Stress, Sensing, Signaling and Cell Adaptation. Vol. 3 / eds. Storey K.B., Storey J.V. Amsterdam: Elsevier Press, 2002. - pp. 139-153.
12. Los D.A., Suzuki I., Zinchenko V.V., Murata N. Stress Responses in *Synechocystis*: Regulated Genes and Regulatory Systems // The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution / eds. Herrero A., Flores E. Norfolk: Caister Academic Press, 2008. - pp. 117-157.
13. Suzuki I., Los D.A., Kanesaki Y., Mikami K. and Murata N. The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis* // EMBO J. 2000. 19: 1327-1334.
14. Inaba M., Suzuki I., Szalontai B., Kanesaki Y., Los D.A., Hayashi H., Murata N. Gene-engineered rigidification of membrane lipids enhances the cold inducibility of gene expression in *Synechocystis* // J. Biol. Chem. 2003. 278: 12191-12198.
15. Kehoe D.M., Grossman A.R. Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors // Science 1996. 273: 1409-1412.
16. Hughes J., Lamparter T., Mittmann F., Hartmann E., Gartner W., Wilde A., Borner T. A Prokaryotic phytochrome // Nature 1997. 386: 663.
17. Hubschmann T., Yamamoto H., Gieler T., Murata N., Borner T. Red and far-red light alter the transcript profile in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: impact of cyanobacterial phytochromes // FEBS Lett. 2005. 579: 1613-1618.
18. Ulijasz A.T., Cornilescu G., von S.D., Cornilescu C., Velazquez E.F., Zhang J., Stankey R.J., Rivera M., Hildebrandt P., Vierstra R.D. Cyanochromes are blue/green light photoreversible photoreceptors defined by a stable double cysteine linkage to a phycoviolobin-type chromophore // J. Biol. Chem. 2009. 284: 29757-29772.
19. Ikeuchi M., Ishizuka T. Cyanobacteriochromes: a new superfamily of tetrapyrrole-binding photoreceptors in cyanobacteria // Photochem. Photobiol. Sci. 2008. 7: 1159-1167.
20. Los D.A., Zinchenko V.V. Regulatory Role of Membrane Fluidity in Gene Expression // Lipids in Photosynthesis. Essential and Regulatory Functions / eds. Wada H., Murata, N. Dordrecht: Springer Science + Business Media B.V., 2009. - pp. 329-348.