УДК581.1

**ПРОЛИНОВЫЕ АМИНОПЕПТИДАЗЫ ВОВЛЕЧЕНЫ В БИОГЕНЕЗ БЕЛКОВ У ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ОРГАНИЗМОВ**

А.С. Баик, М.А. Синетова, К.С. Миронов, Е.С. Пожидаева.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт Физиологии Растений им. К. А.Тимирязева Российской Академии Наук, 127276, Россия, Москва, ул. Ботаническая 35, э-почта: alenapoj@hotmail.com;

*Ключевые слова*: Synechocystis - аминопептидаза – фикобилисомы

**ВВЕДЕНИЕ**

Протеазы играют ключевую роль в регуляции структурных и физиологических изменений, которые обеспечивают быстрое и оптимальное приспособление клетки к различным стрессам [1]. Однако механизмы и биологическая роль протеаз у большинства фотосинтезирующих организмов остается до конца не изученной. В N-концевой протеолиз белков вовлечены пептидазы, различающиеся по своим функциональным свойствам, в том числе белки семейства пролин-специфичных аминопептидаз [2]. Эта группа ферментов является важной составляющей избирательного протеолиза белков, поскольку гидролиз пептидной связи, образованной пролином, может осуществляться лишь небольшим числом ферментов. На сегодняшний день эти белки хорошо охарактеризованы в клетках животных и бактерий [3]. Однако у растений аминопептидаза Р экспериментально идентифицирована только в томатах *Lycopersicon esculentum* [1].

Вклад протеаз в молекулярные процессы можно оценить с использованием мутантных организмов с дефектными целевыми белками. Для изучения функции пролин-специфичных пептидаз в клетках цианобактерий нами был получен гомозиготный мутантный штамм Δ*рерР* *Synechocystis* sp. PCC6803 (штамм GT), у которого инактивирован ген *sll0136*, кодирующий аминопептидазу Р. Мутант склонен к агрегации клеток, что, вероятно, обуславливает его более медленный рост, по сравнению со штаммом дикого типа (ДТ). После оптимизации условий экстракции растворимых белков для последующего анализа методом изофокусирования на амфолитах (2D/IEF) в сочетании с MALD-Tof анализом у мутанта показано сниженное количество линкерного полипептида мол. м. 32 кД, обеспечивающего связывание белков фикоцианина в лучах фикобилисом, а также фактора элонгации Tu, участвующего в синтезе белков.

**МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

*Штаммы и условия культивирования*. В работе использовали глюкозоустойчивый (GT) штамм дикого типа *Synechocystis* sp. PCC6803 из коллекции одноклеточных водорослей ИФР РАН. Инсерционный мутант ∆*pepP* был получен в данной работе путем трансформации клеток ДТ рекомбинантной плазмидой pAL-TA, несущей фрагмент гена *sll0136* с встроенным в него геном устойчивости к канамицину. Штаммы выращивали в климатической камере фотоавтотрофно, как описано [4].

*Приготовление образца для 2D/IEF электрофореза*. Выделение белков *Synechocystis* проводили с использованием пресса French [5]. Для идентификации белков MALDI-TOF MS растворимые белки фракционировали в первом направлении на IPG Strips (длина 11 см, диапазон рН 4-7, Bio-Rad) согласно инструкции производителя. Во втором направлении проводили электрофорез в денатурирующих условиях в 12,5% ПААГ. Гели окрашивали Кумасси G-250 (Bio-Rad). Вырезанные из 2D/SDS-гелей полипептиды идентифицировали методом MALDI-TOF в центре “Постгеномные и нанотехнологические инновации (ПИННИ)”, Москва, Россия.

*Электронная микроскопия.* Приготовление образцов для электронной микроскопии проводили по известному методу [6]. Изображения получали на электронном микроскопе Libra 200 (Carl Zeiss, Germany).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

В процессе роста мутант Δ*pepP* характеризовался замедленным ростом и адсорбированием клеток на стенках барбатера. Анализируя препараты клеток мутанта Δ*pepP* с помощью электронной микроскопии, мы наблюдали наличие скоплений клеточных агрегатов в сравнении с преобладанием одиночных клеток у образцов ДТ. Подобное поведение, вероятно, обусловлено нарушением у мутанта заключительного этапа образования клеточной стенки (Рис. 1). Одним из предположений является то, что у мутанта происходит отставание или дефект в созревании Z-кольца, которое стимулирует синтез пептидогликана в центре клетки, необходимого для образования перетяжки и разделения двух новых клеток. Также мы наблюдали в препаратах мутанта деструктивное расположение тилакоидов, в то время как у ДТ мембраны тилакоидов имели нормальную, упорядоченную периферийную локализацию (Рис. 1).

После оптимизации и проведения 2D IEF электрофореза, где белки разделяются в зависимости от значения pI, были обнаружены различия в белковом профиле растворимой фракции мутанта от дикого типа (Рис. 2). Белки, отсутствующие у Δ*рерР*, были проанализированы в образцах дикого типа с помощью Maldi-tof анализа. Это позволило выявить отсутствие у мутанта линкерного белка мол. м. 32 кД, ассоциированного с фикобилисомами. Полученные результаты позволяют заключить, что у мутанта нарушена сборка лучевой области фикобилисом из-за отсутствия линкера 32 кД, который обеспечивает связывание дистальных блоков фикоцианина. Это согласуется с нашими предыдущими результатами, демонстрирующими у мутанта нарушения в сборке фикобилин-содержащих комплексов. В дальнейшем необходимо провести более детальный анализ структуры фикобилисом в клетках мутанта.

Также Maldi-tof анализ показал отсутствие у мутанта фактора элонгации Tu. Ранее, мы продемонстрировали, что в клетках, лишенных белка РерР, наблюдаются изменения в уровне трансляции белков основных фотосинтетических комплексов [5]. Вероятно, это связано с нарушениями в синтезе или стабильности фактора элонгации Tu. Однако эти данные требуют дальнейшего анализа.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №12-04-00049-а.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. *Sokolenko A., Pojidaeva E., Zinchenko V., Panichkin V., Glaser V.M., Herrmann R.G., Shestakov S.V.* The gene complement for proteolysis in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 and Arabidopsis thaliana chloroplasts// Curr. Genet. 2002. V. 41. P. 291-310.

2. *Yaron A., Nader F*. Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 1993. V. 28. P. 31-81.

3. *Wilce M.C., Bond C.S., Dixon N.E., Freeman H.C., Guss J.M., Lilley P.E., Wilce J.A.* Structure and mechanism of a proline-specific aminopeptidase from Escherichia coli // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 3472-3477.

4. *Пожидаева Е. С., Малтерер C., Баик А. С., Соколенко А. В.* // Инактивация гена *sll0136* у Synechocystis sp. PCC 6803 приводит к нарушению биогенеза белков фотосинтетических комплексов. Физиология растений, 2013, том 60, № 4, с. 541–548.

5. *Пожидаева Е.С*. Комплексный подход при исследовании мультибелковых растворимых комплексов в клетках цианобактерий // Физиология растений, 2014, том 61, № 2, с. 283–290.

6. ***Синетова М., Маркелова А.Г., Лось Д.А.*** Влияние азотного голодания на ультраструктуру и пигментный состав хлоропластов ацидотермофильной микроводоросли Galdieria sulphuraria. //Физиология растений*,* 2006,том53, №2, с. 172-181.



Рис. 1. Результаты электронной микроскопии клеток цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803 к 5-м суткам инкубации при 32° С, 70 мкмоль фотон/(м2 с), 1.6 % CO2 в контроле: а – штамм РСС6803; б – штамм Δ*pepP*; А – зона нуклеоида; Б – тилакоиды; С – зона образования перетяжки (клеточной стенки). Масштаб: а-б – 0,5 мкм.

Fig. 1. The electron micrographs of cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 after 5 days incubation at 32° С, 70 µmol photon/(m2 s), 1.6 % CO2 in control cells: a – the strain PCC6803; b - - mutant strain Δ*pepP*; A – nucleoid; B – thylakoids; C- zone of septa formation. Scale: a, b – 0,5 µm.



Рис. 2. Результаты двумерного (2D/IEF) электрофореза белков растворимой фракции, выделенной из клеток ДТ (а) и Δ*pepP* (б) *Synechocystis* sp. PCC6803. Позиции белков, идентифицированных с помощью Maldi-tof анализа указаны (1) – линкерный белок мол. м. 32 кД, (2) – фактор элонгации Tu.

Fig. 2. The results of 2D/IEF gel electrophoresis of soluble proteins extracted from the wild-type strain (a) and Δ*pepP* (b) *Synechocystis* sp. PCC6803. The position of proteins identified using Maldi-tof analysis is indicated as (1) – 32 kDa linker protein; (2) – Tu elongation factor.

**PROLIN-SPECIFIC AMINOPEPTIDASES INVOLVED IN BIOGENESIS OF PROTEINS IN PHOTOSYNTHETIC ORGANISMS**

A.S. Baik, M.A. Sinetova, K.S. Mironov, E.S. Pojidaeva

*Key words*: Synechocystis - aminopeptidase – phycobilisome

The N-terminal proteolysis of proteins involved peptidase differ in their functional properties, including the proline-specific aminopeptidases. Our results demonstrate an important role of the proline aminopeptidase PepP in the biogenesis of photosynthetic proteins in the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. PCC6803. We have shown that in the PepP-deficient cells dramatically reduced the amount of Tu elongation factor, involved in protein synthesis and 32 kDa phycocyanin associated linker protein of phycobolisome.