

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Биологический факультет

Кафедра микробиологии

Власова Виталина Анатольевна

**Регуляции биосинтеза аргинина у одноклеточных зеленых водорослей**

Выпускная квалификационная работа магистра

по направлению подготовки «Биология»

основная образовательная программа магистратуры «Биология»

Работа выполнена в лаборатории

Адаптации микроорганизмов

Кафедры микробиологии

(зав. лаб. – д.б.н., профессор Ермилова Е.В.)

(зав. кафедрой – д.б.н., профессор Пиневич А.В.)

Научный руководитель:

д.б.н., профессор Ермилова Елена Викторовна

Санкт-Петербург

2022

## Оглавление

Список сокращений .....	4
Введение .....	5
<b>Глава 1. Обзор литературы .....</b>	<b>7</b>
1.1. Сигнальные белки семейства РП фотосинтезирующих организмов .....	7
1.2. Структура и функции РП-белков у цианобактерий.....	8
1.2.1. Структура РП-белков у цианобактерий .....	8
1.2.2. Контроль белков-транспортеров .....	10
1.2.3. Контроль биосинтеза аргинина и цианофидина .....	11
1.2.4. Контроль глобального регулятора транскрипции NtcA через взаимодействие с белком-адаптером PpX .....	14
1.2.5. Регуляция фосфоенолпируваткарбоксилазы .....	15
1.2.6. Контроль биосинтеза жирных кислот .....	16
1.3. Структура и функции РП-белков у растений .....	17
1.3.1. Структура РП-белков у растений .....	17
1.3.2. Взаимодействие с NAGK .....	18
1.3.3. Контроль биосинтеза жирных кислот .....	19
1.3.4. Участие в поддержании симбиотических систем .....	19
<b>Глава 2. Материалы и методы .....</b>	<b>21</b>
2.1. Объект исследования.....	21
2.2. Условия культивирования .....	21
2.3. Количественный анализ экспрессии генов .....	22
2.3.1. Выделение тотальной РНК .....	22
2.3.2. Синтез комплементарной ДНК .....	23
2.3.3. Количественная ПЦР в режиме реального времени .....	23
2.4. Измерение концентрации хлорофилла .....	25
2.5. Выделение белков и определение их концентрации .....	25
2.6. Определение внутриклеточного содержания свободного аргинина .....	26
2.7. Клонирование, экспрессия и очистка рекомбинантных белков .....	26
2.8. Оценка активности фермента NAGK <i>in vitro</i> .....	28
2.9. Оценка активности фермента NAGK <i>in vivo</i> .....	29
2.10. Статистическая обработка данных .....	29
<b>Глава 3. Результаты .....</b>	<b>31</b>

3.1. Биоинформационный анализ первичных последовательностей <i>DsaNAGK</i> и <i>DsaPII</i> .....	31
3.2. Характеристика активности <i>DsaNAGK in vitro</i> .....	36
3.3. Характеристика активности <i>DsaNAGK in vivo</i> .....	41
3.3.1. Рост <i>D. salina</i> при разных концентрациях NaCl в среде .....	41
3.3.2. Зависимость активности и синтеза <i>DsaNAGK</i> в клетках, выращенных при разных концентрациях NaCl .....	42
3.3.3. Активность и экспрессия <i>DsaNAGK</i> в условиях голодания по азоту .....	44
3.3.4. Активность и экспрессия <i>CrNAGK</i> в условиях голодания по азоту .....	47
<b>Глава 4. Обсуждение результатов .....</b>	<b>49</b>
<b>Заключение .....</b>	<b>53</b>
<b>Выводы .....</b>	<b>54</b>
<b>Благодарности .....</b>	<b>55</b>
<b>Список литературы.....</b>	<b>56</b>

## Список сокращений

- ACCCase – ацетил-КоА-карбоксилаза  
Arg – аргинин  
BCCP – белок-носитель карбоксила биотина  
BC – биотинкарбоксилаза  
DTT – дитиотреитол  
Gln – глутамин  
GOGAT – глутамин-оксоглутаратаминотрансфераза  
CO<sub>2</sub> – углекислый газ  
GS – глутаминсинтетаза  
CT – карбокситрансфераза  
C/N – соотношение углерода к азоту  
HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> – гидрокарбонат-ион  
LDH – лактатдегидрогеназа  
MDH – малатдегидрогеназа  
ME – малик-энзим  
NAGK – N-ацетил-L-глутаматкиназа  
N –азот  
PEPC – фосфоенолпируваткарбоксилаза  
PEP – фосфоенолпируват  
PK – пируваткиназа  
PMSF – фенилметилсульфонил фторид  
P<sub>i</sub> – фосфат-анион, неорганический фосфор  
АДФ – аденозиндифосфат (аденозиндифосфорная кислота)  
АТФ – аденозинтрифосфорная кислота  
кДа – килодальтон  
КоА – кофермент А  
ЦТК – цикл трикарбоновых кислот  
ФСII – вторая фотосистема  
2-OG – 2-оксоглутарат

## ВВЕДЕНИЕ

В процессах метаболизма азота синтез аргинина играет важную роль, так как аргинин представляет собой не только незаменимую аминокислоту для биосинтеза белков, но также выступает предшественником в образовании полиаминов и окиси азота, которые, в свою очередь, участвуют в развитии микроорганизмов и их адаптации к стрессовым условиям. Ключевым ферментом биосинтеза аргинина у представителей Chlorophyta является N-ацетил-L-глутаматкиназа (NAGK). При этом среди Cyanobacteria и Archaeplastida ее активность контролируется сигнальным белком из семейства РII. Следует отметить, что первоначально ген, кодирующий РII-белок, не был выявлен у галофильной водоросли *Dunaliella salina*. Однако проведенное в 2020 году повторное секвенирование генома с использованием усовершенствованных технологий позволило показать наличие указанного гена у этой одноклеточной зеленой водоросли (Polle et al., 2020).

Суперсемейство белков РII включает сигнальные белки, которые обнаружены во всех трех доменах жизни. Канонические РII-белки воспринимают энергетический статус клетки посредством конкурентного связывания АТФ и АДФ, а также баланс углерода/азота посредством связывания 2-оксоглутарата (2-OG). Представители Archaeplastida унаследовали сигнальные РII-белки от предкового цианобактериального эндосимбионта. В ходе эволюции РII-белки растений приобрели чувствительность к глутамину, которая связана с появлением С-концевого расширения, называемого Q-петлей (Chellamuthu et al., 2014). Эта структура присутствует во всех РII-белках Chloroplastida. Сенсорные и регуляторные свойства РII-белков систематически исследовались у различных штаммов водорослей (красных, зеленых и др.). Так, сравнение этих белков у организмов с окисленным фотосинтезом – цианобактерий, красных водорослей, Chlorophyta и высших растений – позволило понять, что они сочетают в себе высокую консервативность наравне с адаптивностью к особенностям метаболизма. Например, для представителей как Cyanobacteria, так и Archaeplastida показана высокая консервативность строения и функций фермента N-ацетил-L-глутаматкиназы (NAGK), которая контролирует биосинтез аргинина и выступает одной из основных мишеней РII-белка. Однако вопрос о вовлечении РII-белка в контроль биосинтеза аргинина у *D. salina* оставался открытым.

**Цель работы** – охарактеризовать свойства и механизмы регуляции ключевого фермента биосинтеза аргинина N-ацетил-L-глутаматкиназы у галофильной одноклеточной зеленой водоросли *D. salina*.

### Задачи работы:

1. Используя методы клонирования и аффинной хроматографии, получить рекомбинантную N-ацетил-L-глутаматкиназу (*DsaNAGK*) *D. salina*.
2. Охарактеризовать кинетические параметры *DsaNAGK* и сравнить их со свойствами изученных ранее N-ацетил-L-глутаматкиназ.
3. Оценить роль РII-белка в контроле активности *DsaNAGK*.
4. Проанализировать изменение уровней экспрессии и активности N-ацетил-L-глутаматкиназы *in vivo* в клетках *D. salina* при росте в средах с разными концентрациями хлорида натрия и в условиях голодания по источнику азота.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Сигнальные белки семейства PII фотосинтезирующих организмов

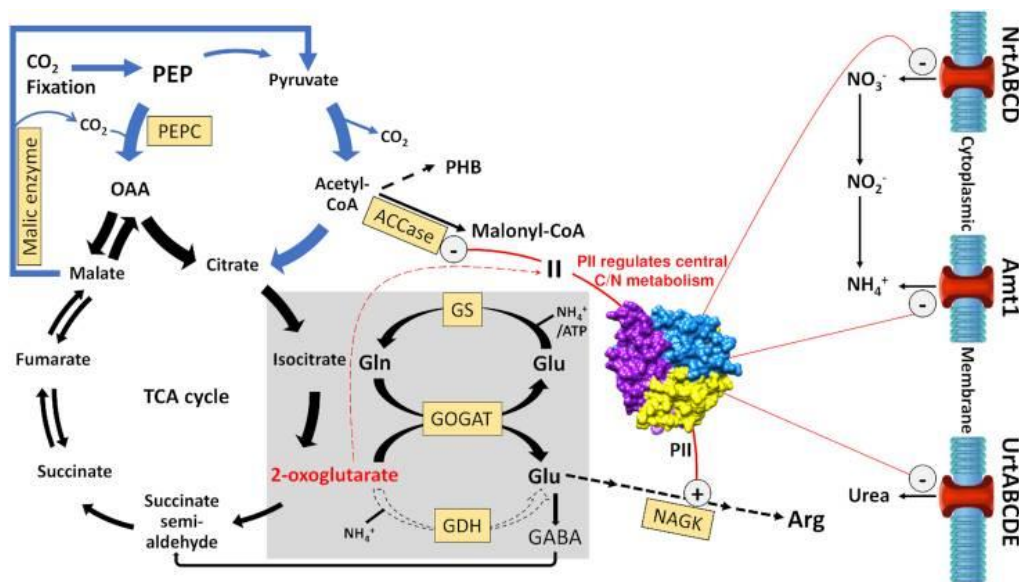
Для фотосинтезирующих организмов, которые образуют органические молекулы, ассимилируя неорганические соединения за счет световой энергии, крайне важно контролировать азотно-углеродный баланс (соотношение C/N). Это означает, что поступление азота в клетки должно быть скоординировано с интенсивностью фиксации CO<sub>2</sub>. Так, снижение поступления CO<sub>2</sub> в клетку приводит к снижению интенсивности ассимиляции азота. И наоборот, если клетка испытывает голодание по азоту, наблюдается индукция генов, отвечающих за использование альтернативных источников азота, что, например, в случае diaзотрофных цианобактерий приводит к активации азотфиксации (Herrero, 2001).

Реакции ассимиляции азота через цикл GS/GOGAT (глутаминсинтетаза/глутамин-2-оксоглутаратаминотрансфераза) играют ключевую роль в процессах роста и развития растений. Этот цикл в высшей степени консервативен у фотосинтезирующих организмов от цианобактерий до высших растений и строго регулируется в зависимости от доступности для организма азота и углерода.

Ионы аммония – наиболее предпочтительный источник азота – поступив в клетку, далее с помощью фермента глутаминсинтетазы (GS) соединяются с молекулами глутамата, образуя глутамин. В последующей реакции глутамин-оксоглутаратаминотрансфераза (GOGAT) переносит амидогруппу глутамина на  $\alpha$ -C атом 2-оксоглутарата (2-OG), в результате чего образуются две молекулы глутамата (Herrero et al., 2001). Из глутамата и глутамина органический азот распределяется в другие азотсодержащие соединения, необходимые для нормальной жизнедеятельности клетки. При этом 2-оксоглутарат, который служит в цикле GS/GOGAT предшественником глутамина, оказывается на пересечении химических реакций ассимиляции углерода и азота, поскольку он синтезируется в цикле трикарбоновых кислот из продуктов фиксации CO<sub>2</sub>. Такая тесная связь 2-OG с метаболизмом углерода и азота делает эту молекулу удобным индикатором метаболического статуса C/N (Flores et al., 2005). Оказалось, что у многих фотосинтезирующих организмов уровни 2-OG воспринимаются высоко консервативными сигнальными белками из семейства PII (Ninfa and Jiang, 2005).

Впервые белки семейства PII открыли в 60-е годы XX века у *Escherichia coli*, в клетке которой обнаружили два паралога – GlnB и GlnK (Shapiro, 1969; Arcondéguy et al., 2001). Первый из них экспрессируется конститутивно и регулирует активность

глутаминсинтетазы (GS). Второй специфически контролирует аммонийный канал AmtB. Дальнейшие исследования показали, что белки PII участвуют в регуляции азотного и углеродного метаболизма у бактерий, некоторых архей, а также у представителей кланды Archaeplastida (Arcondéguy et al., 2001; Forchhammer, 2004; Uhrig et al., 2009). Основные роли PII в регуляции углерод-азотного метаболизма (рис. 1) будут рассмотрены в последующих разделах.



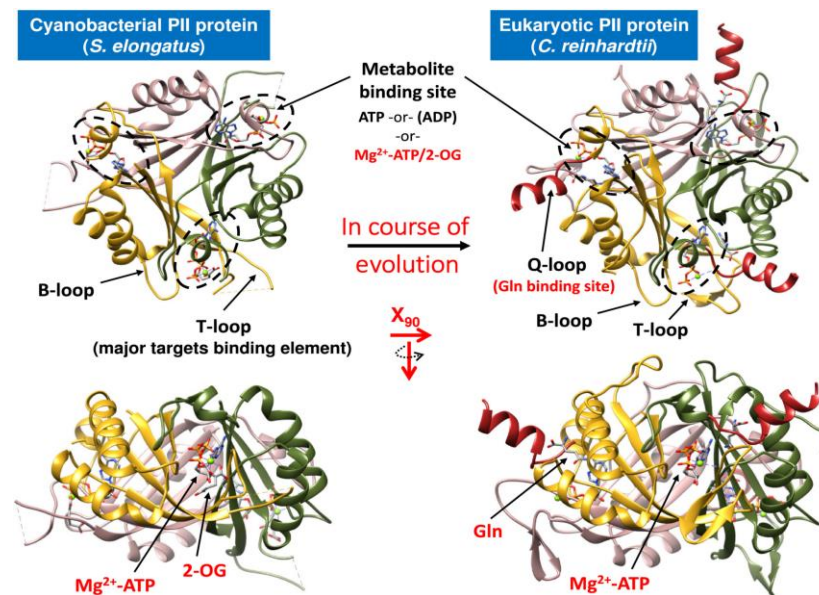
**Рис. 1.** Участие PII белка в регуляции C/N метаболизма у одноклеточных цианобактерий (по: Forchhammer and Selim, 2020)

## 1.2. Структура и функции PII-белков у цианобактерий

### 1.2.1. Структура PII-белков у цианобактерий

Строение PII белков высоко консервативно во всех доменах живого. Они формируют гомотримеры, состоящие из субъединиц с молекулярной массой 12-13 кДа и способные связывать АТФ и АДФ, 2-OG, а также у большинства Chlorophyta L-глутамин (Forcada-Nadal et al., 2018). Основу тримера составляют антипараллельные  $\beta$ -слои, собранные в компактную цилиндрическую структуру, окруженную  $\alpha$ -спиралями (рис. 2).





**Рис. 2.** Структура белков PII цианобактерии *Synechococcus elongatus* и эукариотической зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* (по Selim et al., 2020)

Важными функциональными элементами белков PII являются три петлевых участка (Т-, В- и С-петли), расположенные относительно других элементов белка в следующем порядке:  $\beta 1-\alpha 1-\beta 2$ -(Т-петля)- $\beta 3-\alpha 2$ -(В-петля)- $\beta 4$ -(С-петля). Наружу из коровой части белка выступают три длинные Т-петли, которые способны приобретать различные конформации благодаря гибкости их структуры, что делает их важными элементами для взаимодействия PII с его мишенями. Изменение конформации Т-петель осуществляется в ответ на связывание АТФ, АДФ,  $Mg^{2+}$ -АТФ и 2-ОГ на границе Т-петли и основной части PII-белка (Zeth et al., 2014). Так, АТФ и АДФ конкурируют за одни и те же сайты. В большинстве случаев при связывании с PII-белком комплекса  $Mg^{2+}$ -АТФ происходит присоединение еще одной эффекторной молекулы – 2-ОГ. Именно благодаря возможности конкурентно связывать АТФ и АДФ, а также  $Mg^{2+}$ -АТФ-зависимо связывать 2-ОГ белки PII способны определять энергетическое состояние клетки и внутриклеточный баланс С/Н (Fokina et al., 2010).

Кроме того, Т-петли являются мишенью регуляторных посттрансляционных модификаций. Так, у цианобактерии *Synechococcus elongatus* возможно фосфорилирование аминокислотного остатка Ser49 Т-петли. При этом тример PII может быть фосфорилирован по одной, двум или трем субъединицам, что приводит к четырем различным модификационным состояниям белка. Наличие и степень фосфорилирования PII зависит от условий роста: в присутствии в среде ионов аммония в качестве источника азота белок находится в нефосфорилированном состоянии. В клетках *S. elongatus*, выращенных на среде

с нитратом, наблюдаются промежуточные уровни фосфорилирования РII, а наибольшая степень фосфорилирования характерна для условий азотного голодания или при ингибировании усвоения азота путем добавления ингибиторов цикла GS/GOGAT (Forchhammer and Tandeau de Marsac, 1995). Фосфорилирование Т-петли РII по Ser49 влияет на способность белка связываться со своими мишенями, как правило, препятствуя таким взаимодействиям. Однако важно отметить, что фосфорилирование РII по Ser49, по-видимому, не является общим свойством всех цианобактерий. У морских пикоцианобактерий *Prochlorococcus marinus* PCC 9511, а также у некоторых Nostocales эту посттрансляционную модификацию обнаружить не удалось. Следовательно, несмотря на то, что ген РII консервативен у цианобактерий, фосфорилирование РII не является универсальным. Другая посттрансляционная модификация, а именно нитрование по Tyr51, была описана у нитчатой цианобактерии *Anabaena* PCC 7120 (Zhang et al., 2007), однако ее физиологическое значение до сих пор остается неясным.

### **1.2.2. Контроль белков-транспортеров**

Цианобактерии используют различные источники азота с разной степенью предпочтения. Если в среде присутствуют ионы аммония, они ингибируют поглощение других источников азота, подавляя соответствующие метаболические гены (Forchhammer, 2004). Недавние исследования (Watzer et al., 2019) показали, что РII-белки контролируют транспорт азота в клетки цианобактерий, напрямую взаимодействуя с пермеазой аммония Amt1 и тем самым регулируя ее активность. РII связывается с Amt1 в условиях избытка азота, подавляя ее активность, что позволяет предотвратить избыточное накопление внутриклеточного аммония и поддержать равновесие цикла GS/GOGAT. Кроме того, для цианобактерий контроль поглощения аммония важен и для поддержания фотосинтеза, поскольку высокие внутриклеточные концентрации аммония токсичны из-за фотосенсибилизирующего действия на фотосистему II (ФСII). В сочетании со световым стрессом аммоний приводит к фотодеструкции ФСII (Drath et al., 2008).

Для поглощения нитрата, одного из наиболее распространенных источников связанного азота, цианобактерии могут использовать два типа транспортных систем: многие пресноводные цианобактерии используют ABC-транспортер NrtABCD, тогда как морские и наземные штаммы – пермеазу нитратов/нитритов NrtP. Поступая в клетку, нитрат восстанавливается до нитрита с помощью нитратредуктазы NarB, а затем до аммиака с участием нитритредуктазы NirA (Flores et al., 2005). Поглощение нитратов ингибируется в присутствии ионов аммония, а также в случае нарушения фиксации CO<sub>2</sub>. Исследования Watzer et al. (2019) показали, что в этих условиях РII-белок *Synechocystis* PCC 6803,

находясь в нефосфорилированном состоянии, обладает высоким сродством к субъединицам NrtC и NrtD транспортера NrtABCD, что приводит к ингибированию транспорта нитратов. Кроме того, в качестве мишени РII-белка был выявлен переносчик мочевины ABC-типа UrtABCDE (Watzer et al., 2019). Эксперименты подтвердили, что РII-дефицитный мутант *Synechocystis* PCC 6803 утрачивает способность контролировать транспорт мочевины в клетку.

Еще одна малоизученная мишень РII – PamA – трансмембранный белок, принадлежащий к семейству механочувствительных каналов малой проводимости. Показано, что взаимодействие цитоплазматического домена PamA с РII отрицательно регулируется  $Mg^{2+}$ -АТФ-2-OG. Это указывает на то, что конформационные изменения Т-петли РII определяют возможность взаимодействия с PamA. При этом вовлечение в процесс регуляции 2-OG подразумевает, что связывание РII-PamA участвует в контроле баланса C/N и является физиологически значимым (Forchhammer and Selim, 2020).

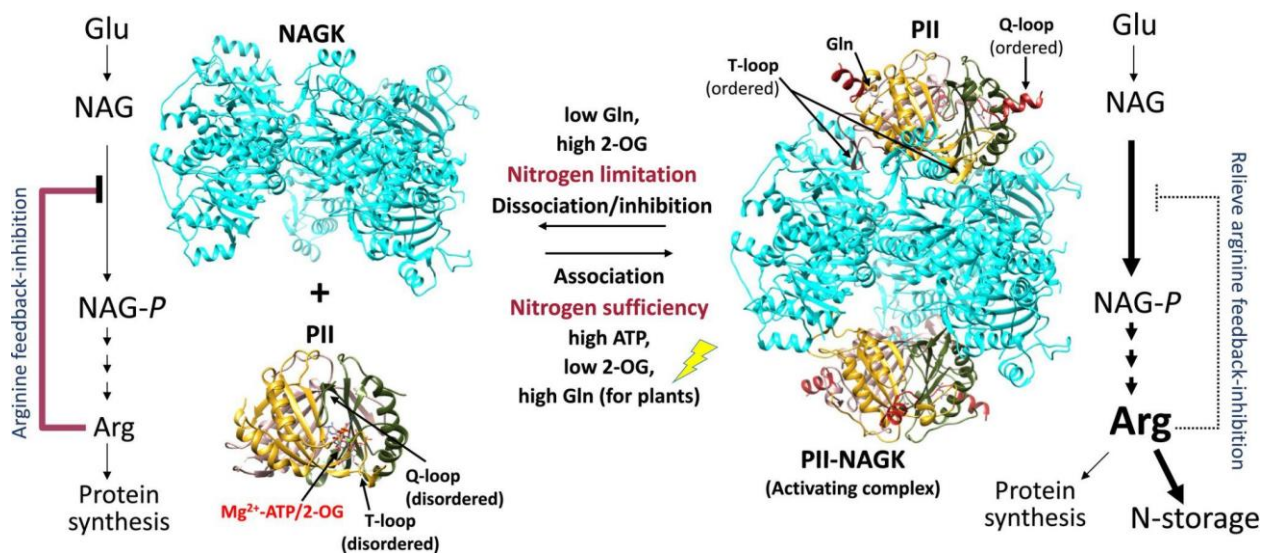
Поскольку белки-транспортеры локализованы на плазматической мембране, взаимодействие с ними принципиальным образом влияет на клеточную локализацию РII-белка. Так, с помощью флуоресцентно меченного РII *Synechocystis* было показано, что в клетках, выращенных на среде с избытком нитрата, этот белок преимущественно сосредоточен в центральной области и в районе клеточной мембраны. Центральная локализация белка соответствует цитоплазматическому пространству между тилакоидами. В этой области РII может взаимодействовать с различными растворимыми белками, такими как NAGK или PipX. Местонахождение в околосмембранной зоне объясняется взаимодействием с белками-транспортерами Amt1, NrtABCD и UrtABCDE. При помещении *Synechocystis* в среду без источника азота, РII равномерно распределяется по всему объему клетки, и его локализация на плазматической мембране становится не такой отчетливой, как в случае роста на нитрате. Это связано с тем, что в условиях голодания по азоту белки-транспортеры этого элемента в клетку не активны и, соответственно, их контроль с помощью РII не осуществляется. Повторный перенос клеток в среду, содержащую источник азота (нитрат, аммоний или мочевину), приводит к релокализации РII в сторону плазматической мембраны (Watzer et al., 2019).

### ***1.2.3. Контроль биосинтеза аргинина и цианофицина***

N-ацетил-L-глутаматкиназа (NAGK) – ключевой фермент в пути биосинтеза аргинина – стала первой идентифицированной мишенью взаимодействия сигнального белка РII у цианобактерий. NAGK катализирует превращение N-ацетил-L-глутамата в N-ацетил-L-глутамилфосфат, который далее превращается в орнитин, из которого образуются

аргинин и полиамины. Аргинин (Arg) представляет собой аминокислоту с наибольшим содержанием азота (четыре атома N на молекулу), поэтому является выгодным резервуаром этого элемента в клетке. Белки с большим количеством аргинина часто встречаются в семенах растений, а цианобактерии нерибосомно производят богатый аргинином полимер цианофицин. Накопление аргинина в виде богатых этой аминокислотой макромолекул позволяет снизить осмотический стресс, обеспечивая при этом возможность быстро мобилизовать азот для синтеза новых белков (Forchhammer and Selim, 2020).

Аргинин, как конечный продукт реакции, по отрицательной обратной связи ингибирует активность NAGK. Это ингибирование необходимо преодолеть, если клетка нуждается в дополнительном запасе азота в виде аргинина. PII-белок, взаимодействуя с NAGK, возвращает ее в активное состояние, тем самым создавая дополнительный механизм регуляции данного биосинтетического процесса (рис. 3).



**Рис. 3.** Участие PII-белка в процессе биосинтеза аргинина путем регуляции NAGK (по Selim et al., 2020)

В условиях избытка азота по отношению к углероду и низком уровне 2-OG в клетке нефосфорилированный PII активирует NAGK и освобождает ее от ингибирования аргинином. Это интенсифицирует поток метаболитов в пути синтеза аргинина, который затем может служить основой для биосинтеза белков, а также запасания избыточного азота в виде цианофицина. Многие цианобактерии способны синтезировать этот биополимер на основе L-аспартата и L-аргинина с помощью фермента цианофицинсинтетазы. Молекула цианофицина состоит из цепи поли-L-аспарагиновой кислоты, в которой каждая карбоксильная группа связана изопептидными связями с остатком аргинина (мульти-[L-

аргинил-поли-L-аспарагиновая кислота]) (Simon, 1971). В литературе описаны две основные функции цианофицина. У нитчатых цианобактерий крупные гранулы цианофицина образуются в области полярной шейки гетероцист. Этот гетероцистный полимер, по-видимому, тесно связан с переносом фиксированного азота от гетероцист к фотосинтетически активным вегетативным клеткам (Burnat et al., 2014). У цианобактерий, не образующих гетероцисты, цианофицин накапливается временно, в период несбалансированного роста. Так, например, у *Synechocystis* PCC 6803 в случаях, когда рост нарушается по разным причинам, но азот доступен, в клетке повышается уровень аргинина, что приводит к синтезу цианофицина. Таким образом, внутриклеточный уровень аргинина, по-видимому, выступает триггером для накопления цианофицина. Подобное явление наблюдается и при переносе клеток *Synechocystis*, испытывающих голодание по азоту и приостановивших рост, на среду с избытком аммония. Исследования показали, что синтез цианофицина, контролируемый PII белком, дает клеткам *Synechocystis* дикого типа преимущество, по сравнению с мутантами, имеющими дефицит цианофицина, при адаптации к средам с нестабильным содержанием азота (Watzel and Forchhammer, 2018).

Структура комплекса, формирующегося при взаимодействии PII и NAGK, подробно описана (Llácer et al., 2007). PII связывается с NAGK с высокой аффинностью в нефосфорилированном состоянии. Роль наличия или отсутствия этой посттрансляционной модификации заключается в том, что водородные связи, которые позволяют белку связаться с NAGK и которые поддерживают стабильность комплекса, образуются именно в сайте фосфорилирования Ser49 Т-петли. Следовательно, любые изменения в положении Ser49 путем фосфорилирования или мутации предотвращают эффективное взаимодействие NAGK-PII.

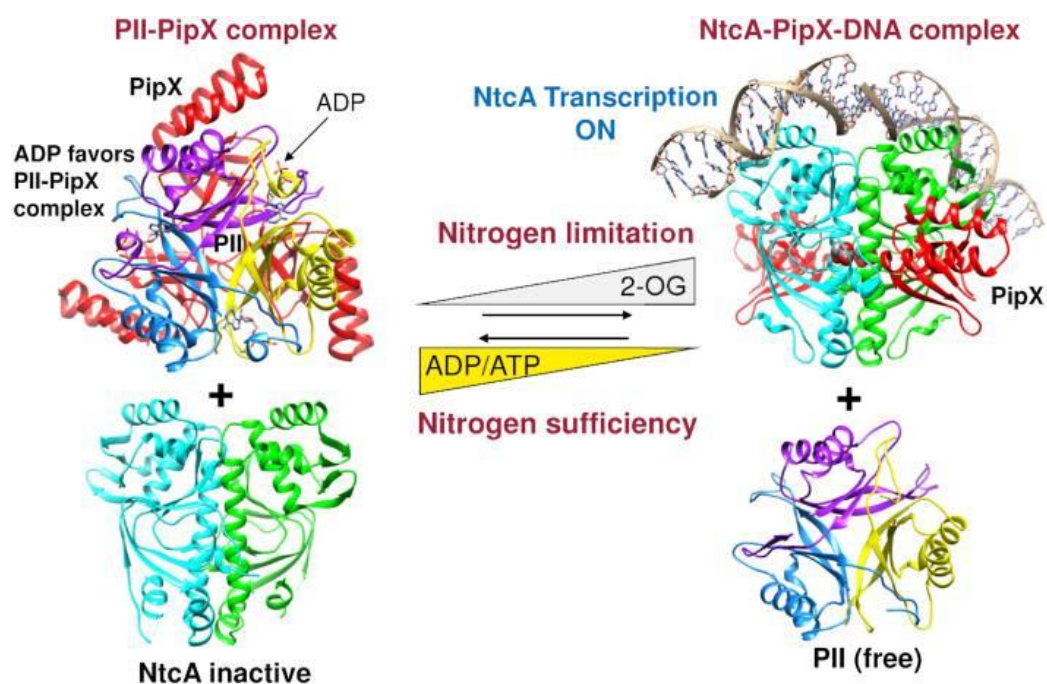
Комплекс PII-NAGK стабилен в присутствии АТФ, а также в отсутствие каких-либо низкомолекулярных эффекторов. Однако если PII находится в состоянии, связанном с АДФ или 2-OG-Mg<sup>2+</sup>-АТФ, белок не способен связывать NAGK. Так, повышенные уровни 2-OG в клетке (состояние высокого соотношения C/N) будут препятствовать взаимодействию PII-NAGK и тем самым предотвращать активацию NAGK. В этом случае комплекс PII-NAGK диссоциирует, и PII становится доступным для фосфорилирования киназой. Фосфорилирование приводит к ингибированию повторного образования комплекса, и это состояние сохраняется до тех пор, пока не произойдет дефосфорилирование PII. Следовательно, когда клетка выходит из периода азотного голодания, и соотношение C/N нормализуется, фосфорилированный PII должен быть сначала дефосфорилирован за счет активности фосфатазы, и только затем NAGK сможет активироваться. Это приводит к

задержке активации биосинтеза аргинина, гарантируя, что этот энергозатратный процесс возобновится только при наличии достаточного количества азота (Selim et al., 2020).

Ингибирование образования комплекса PII-NAGK при связывании PII с АДФ свидетельствует о том, что процесс активации NAGK с помощью PII может зависеть от энергетического статуса клетки. Однако анализ влияния АДФ показал, что при наличии АТФ необходим значительный переизбыток АДФ, чтобы каким-либо образом повлиять на каталитическую активность NAGK в присутствии PII и ингибирующих концентраций аргинина (Fokina et al., 2011). Такие результаты можно объяснить тем, что уровень АДФ физиологически менее значим для активации NAGK с помощью белка PII, чем клеточные уровни 2-OG и наличие фосфорилирования в Т-петле PII.

#### 1.2.4. Контроль глобального регулятора транскрипции *NtcA* через взаимодействие с белком-адаптером *PipX*

PipX (PII-interacting protein X) – небольшой белок, состоящий из 89 аминокислот, гомологи которого обнаружены во всех геномах цианобактерий. PipX взаимноисключаяще способен связывается либо с *NtcA*, либо с PII (рис. 4).



**Рис. 4.** Регуляция транскрипционного фактора *NtcA* белком PII, опосредованная взаимодействием PII-PipX (по: Forchhammer and Selim, 2020)

Связывание PipX с PII происходит в условиях избытка ионов аммония в среде, то есть при тех же условиях, которые необходимы для образования комплекса PII-NAGK. Это

приводит к тому, что между белками NAGK и PipX существует конкуренция за связывание с PII. Так, PipX снижает активацию PII и увеличивает ингибирование NAGK аргинином (Llácer et al., 2010).

В условиях недостатка азота и избытка 2-OG в клетке связывание 2-OG с PII приводит к диссоциации комплекса PII-PipX, в результате чего PipX может свободно взаимодействовать с регулятором транскрипции NtcA. Исследования показали, что PipX активирует транскрипцию NtcA-зависимых промоторов в условиях лимитирования по источникам азота, поскольку в комплексе с PipX NtcA находится в наиболее активном состоянии для связывания с ДНК (Espinosa et al., 2006). При этом связывание PipX с NtcA требует также 2-OG, внутриклеточный уровень которого увеличивается при повышении соотношения C/N. Однако оказалось, что PipX, в отличие от 2-OG, не всегда обязателен для транскрипции NtcA-зависимых промоторов. На основании этого был сделан вывод о том, что PipX является коактиватором 2-OG-активируемой NtcA-опосредованной транскрипции и что степень активации с помощью PipX зависит от специфического NtcA-зависимого промотора (Forcada-Nadal et al., 2018).

Известно, что у всех цианобактерий от активности NtcA зависит экспрессия генов, необходимых для усвоения таких источников азота, как нитраты и нитриты. Среди них – гены, кодирующие субъединицы GS и GOGAT, субъединицы нитритредуктазы, а также белки-транспортеры аммиака, нитратов и нитритов, аминокислот и мочевины. В дополнение к генам, непосредственно связанным с метаболизмом азота, несколько NtcA-зависимых генов участвуют в углеродном метаболизме (Forchhammer and Selim, 2020).

Роль PipX может быть более сложной, чем первоначально предполагалось, поскольку этот белок, вероятно, участвует в других регуляторных сетях помимо NtcA. Так, Labella et al. (2016) описали взаимодействие комплекса PII-PipX с регулятором PlmA. Более того, оказалось, что PlmA не способен взаимодействовать только с PII или PipX, что приводит к летальности мутантов по PII. Однако физиологическая значимость тройного комплекса PII-PipX-PlmA до сих пор остается неясной.

### ***1.2.5. Регуляция фосфоенолпируваткарбоксилазы***

Фосфоенолпируваткарбоксилаза (PEPC) у фотоавтотрофных организмов является одним из ключевых ферментов в процессе фиксации углерода. PEPC катализирует  $Mg^{2+}$ -зависимое необратимое карбоксилирование фосфоенолпирувата (PEP) с использованием  $HCO_3^-$ , в результате которого образуется оксалоацетат и неорганический фосфат ( $P_i$ ). Синтез оксалоацетата с участием PEPC необходим для восполнения этого важного

компонента ЦТК, поскольку он расходуется на синтез аминокислот семейства глутамата и аспартата. Кроме того, у цианобактерий PEPС вместе с малатдегидрогеназой (MDH) и малик-энзимом (ME) образуют основной метаболический путь синтеза пирувата из PEP. Таким образом PEPС представляет собой центральный фермент многих анаболических реакций в клетках цианобактерий. В связи с этим активность PEPС тонко регулируется различными эффекторными молекулами, например, для некоторых цианобактерий показано, что она снижается в присутствии малата и аспартата (Hauf, 2016).

Протеомный анализ РII белка из цианобактерии *Synechocystis* показал, что PEPС является потенциальным партнером взаимодействия РII (Hauf, 2016). Дальнейшие исследования подтвердили это предположение. Оказалось, что РII активирует и стабилизирует фермент за счет образования стабильного комплекса РII-PEPС, а также высвобождает PEPС от ингибирования АТФ.

#### **1.2.6. Контроль биосинтеза жирных кислот**

Еще одна мишень РII-белков, общая для цианобактерий и растений, – ацетил-КоА-карбоксилаза (ACCCase), которая катализирует ключевой этап биосинтеза жирных кислот – АТФ-зависимое карбоксилирование ацетил-КоА до малонил-КоА. ACCCase имеет три функциональные субъединицы: биотинкарбоксилазу (BC), белок-носитель карбоксила биотина (BCCP) и карбокситрансферазу (CT).

Цианобактериальный белок РII способен образовывать комплексы с BCCP-субъединицей ACCCase, сильно снижая активность фермента, что приводит к ингибированию биосинтеза жирных кислот, позволяя направлять ацетил-КоА в другие биосинтетические пути (Forcada-Nadal et al., 2018). Исследования взаимодействия РII-BCCP *in vitro* показали, что образование комплекса стимулируется в присутствии АТФ, тогда как 2-OG, как и в случае взаимодействия РII-NAGK, препятствует ему, тем самым предотвращая ингибирование активности ACCCase белком РII. Это приводит к тому, что в условиях избытка углерода (высокий уровень 2-OG) стимулируется запасание углерода в виде липидов, тогда как в условиях снижения уровня 2-OG и избытка азота биосинтез липидов приостанавливается.



### 1.3. Структура и функции РП-белков у растений

#### 1.3.1. Структура РП-белков у растений

Филогенетический анализ гомологов РП-белков у эукариотических организмов показал, что представители этого домена, по-видимому, унаследовали РП от цианобактериального эндосимбионта. Это позволяет предположить, что распространенность у эукариот РП-белков будет ограничиваться кладой Archaeplastida (Chellamuthu et al., 2013). При этом ген *GLB1*, кодирующий РП у Rhodophyta, в связи с эндосимбиотическим происхождением, сохранился в геноме пластид. У Chloroplastida, представленных зелеными водорослями и наземными растениями, напротив, в ходе эволюции ген *GLB1* переместился в ядро.

РП-белки растений являются типичными представителями семейства РП и соответствуют канонической структуре, описанной выше для цианобактерий. Однако доказательства существования ковалентных модификаций у растительных белков РП, в частности фосфорилирования, пока отсутствуют, хотя соответствующий сайт фосфорилирования Ser49 сохраняется (Ermilova et al., 2013). Следовательно, возможно, регуляция в РП-зависимой системе передачи сигнала у Chloroplastida может осуществляться за счет контроля концентрации белка РП и использования различных комбинаций эффекторных молекул.

Еще одна отличительная особенность растительных РП заключается в том, что их сенсорные свойства в отношении АТФ, АДФ и 2-OG сильно варьируют. Так, РП *Arabidopsis thaliana* способен связывать 2-OG в присутствии АДФ, тогда как цианобактериальные РП способны к такому связыванию исключительно в присутствии  $Mg^{2+}$ -АТФ. Кроме того, структурные исследования показали, что у РП *A. thaliana* рядом с сайтом связывания АТФ находятся сайты связывания цитрата и малоната. Впоследствии было выявлено, что они идентичны сайту связывания 2-OG (Fokina et al., 2010). Другая ситуация наблюдается у РП *Chlamydomonas reinhardtii*: он синергически связывает АТФ (в присутствии 2-OG) и 2-OG, но не связывает АДФ.

Сравнение аминокислотных последовательностей РП белков у Chloroplastida показало, что у многих представителей, в том числе у одноклеточной водоросли *C. reinhardtii* присутствует С-концевое расширение, названное Q-петлей, которое служит сайтом связывания аминокислоты глутамина (Gln). Для определения значения этого сегмента Chellamuthu et al. (2014) дополнительно проанализировали РП мха *Phycosmitrella patens* и однодольного растения *Oryza sativa*. Оба белка показали Gln-зависимую активацию

NAGK. Так, связывание Gln растительными белками PII обеспечивает дополнительный сенсорный ввод для восприятия внутриклеточного статуса C/N. Примечательно, что отсутствие подобного явления у *A. thaliana* и целого ряда представителей семейства *Brassicaceae* связано с небольшой делецией в сегменте Q-петли, что приводит к стабилизации комплекса с NAGK без связывания Gln. Возможно, эта особенность появилась с целью разграничения биосинтеза Arg и восприятия Gln, что позволяет накапливать более высокие концентрации Arg независимо от клеточных концентраций Gln.

### **1.3.2. Взаимодействие с NAGK**

У Archaeplastida образование комплекса между PII и NAGK может происходить по-разному. Так, у красных водорослей (Rhodophyta) этот процесс сходен с цианобактериями, когда связывание PII с NAGK, в основном, регулируется соотношением АТФ/АДФ и заполненностью соответствующего сайта комплексами  $Mg^{2+}$ -АТФ-2-OG. В этом случае насыщение связывающих карманов эффекторами 2-OG или АДФ предотвращает взаимодействие PII с NAGK (Fokina et al., 2011).

Как обсуждалось выше, белок PII *A. thaliana* взаимодействует с NAGK Gln-независимым образом из-за небольшой делеции в Q-петле, поэтому образование комплекса в этом случае также очень похоже на таковое у цианобактерий. Однако отличительная особенность *A. thaliana* состоит в том, что такие метаболиты как цитрат, глутамат и оксалоацетат ингибируют образование комплекса PII-NAGK, чего не наблюдается у цианобактерий (Feria-Bourrellier et al., 2009).

У большинства других изученных представителей Chlorophyta взаимодействие PII-NAGK требует присутствия Gln, связывание которого опосредовано наличием специфичной для растений Q-петли (Beez et al. 2009).

Особого внимания заслуживает комплекс PII-NAGK бесцветной гетеротрофной водоросли *Polytomella parva*. У *P. parva* PII образует очень стабильный, практически не диссоциирующий комплекс с NAGK, выступая при этом в качестве постоянной субъединицы фермента (Selim et al., 2020). Интересно, что образование комплекса PII-NAGK в этом случае оказывается независимым от АДФ, АТФ и 2-OG. Так, эффекторные молекулы АДФ или  $Mg^{2+}$ -АТФ/2-OG, которые у всех ранее описанных представителей вызывают диссоциацию комплекса, неэффективны в случае белков *P. parva*. Еще более удивительно то, что комплекс формируется полностью независимым от глутамина образом, хотя чувствительное к глутамину С-концевое расширение – Q-петля – в PII *P. parva* полностью сохраняется. Вероятно, нескольких аминокислотных замен в PII может быть

достаточно, чтобы превратить временный комплекс РII-NAGK в стабильный комплекс гетероолигомерных ферментов. Рассматривая этот пример, можно заключить, что в ходе эволюции Chlorophyta белки РII разошлись по своим свойствам, став очень гетерогенными в отношении связывания 2-OG и АДФ, а также в отношении образования комплексов с NAGK. *P. parva* представляет собой крайний случай, когда белок РII приобрел исключительную специализацию в отношении NAGK. Поэтому, возможно, что другие мишени регуляции РII у *P. parva* могли быть утрачены (Selim et al., 2020).

### **1.3.3. Контроль биосинтеза жирных кислот**

У растений, как и у цианобактерий, мишенью РII белка служит ацетил-КоА-карбоксилаза. В эукариотической растительной клетке этот фермент локализуется в хлоропластах и имеет структуру, идентичную ACCase у Cyanobacteria. На сегодняшний день взаимодействие РII с ВССР-субъединицей ACCase среди представителей Chloroplastida было убедительно продемонстрировано только для *A. thaliana* (Feria-Bourrellier et al., 2010). Однако остается неясным, имеет ли оно место и у других фотосинтезирующих эукариотических организмов. Кроме того, необходимы дальнейшие исследования структурного механизма, обеспечивающего сборку комплекса РII-ACCase.

### **1.3.4. Участие в поддержании симбиотических систем**

Исследования экспрессии генов, кодирующих РII у высших растений, выявили целый ряд новых потенциальных функций, в регуляции которых может участвовать этот белок. Так, например, у *Lotus japonicus* ген, кодирующий РII (*LjGLB1*), транскрипционно регулируется условиями, которые обеспечивают образование клубеньков (D'Aruppo et al., 2015). Это позволяет предположить, что белки РII участвуют в N-опосредованной нодуляции.

Другим примером участия РII в поддержании симбиотических отношений является система *Paramecium bursaria* – *Chlorella variabilis* (Minaeva and Ermilova, 2017). Для поддержания сосуществования водорослей и инфузории необходим тонкий метаболический контроль: *P. bursaria* снабжает водоросль азотными компонентами и CO<sub>2</sub>, а водоросль поставляет хозяину продукты фотосинтеза, сахара и кислород. Исследования Kodama и Fujishima (2012; 2014) показали, что метаболический статус инфузории регулирует не только деление клеток *C. variabilis*, но и внутриклеточные уровни РII-белка у симбионтов (Minaeva and Ermilova, 2017). Это открытие указывает на то, что сигнальные молекулы и продукты метаболизма клетки-хозяина могут действовать как мессенджеры, опосредующие регуляцию ключевых процессов жизнедеятельности в клетках-симбионтах.

Таким образом, анализ литературных данных показывает, что у всех фотосинтезирующих организмов наиболее консервативной мишенью белков семейства РII является фермент NAGK. Недавно повторное секвенирование генома галофильной зеленой водоросли *Dunaliella salina* (Jürgen et al., 2020) позволило идентифицировать ген, кодирующий белок РII. Однако вопросы о биохимических свойствах этого белка и о возможных особенностях его функционирования в условиях галофилии остаются открытыми.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Объект исследования

При выполнении работы мы использовали штамм IBSS-2 *Dunaliella salina* Teodoresco из коллекции ЦКП «Коллекция гидробионтов Мирового океана» ФИЦ ИнБЮМ, любезно предоставленный в. н. с., к. б. н., руководителем отдела Биотехнологий и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ А. Б. Боровковым, а также два штамма *Chlamydomonas reinhardtii*: cw15-325, полученный от профессора М. Шроды (Технический университет Кайзерслаутерна, Германия), и CC4533, полученный из коллекции ресурсного центра *Chlamydomonas* (США).

### 2.2. Условия культивирования

Штамм *D. salina* культивировали в среде RAMARAJ Medium D (Ramaraj and Niran, 2013) при постоянном освещении интенсивностью  $45 \text{ мкМ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ , комнатной температуре ( $22^\circ\text{C}$ ) и непрерывном покачивании 110 об/мин. В эксперименты брали культуру, выращенную на полной среде в течении 4 суток.

В состав среды RAMARAJ Medium D с 1,5 М NaCl входили:

Микроэлементы:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (9,28 мг/л),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,05 мг/л),  $\text{ZnSO}_4$  (0,11 мг/л),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1,98 мг/л),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  (0,49 мг/л),  $\text{NaVO}_3$  (0,24 мг/л),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,05 мг/л);

Макроэлементы:  $\text{MgSO}_4$  (0,6 г/л), KCl (0,2 г/л),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,044 г/л),  $\text{KNO}_3$  (0,5 г/л),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,014 г/л),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,0005 г/л),  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (0,074 г/л), NaCl (87,75 г/л).

Все компоненты смешивали, pH среды подводили с помощью раствора NaOH до 7,5, затем автоклавировали. После автоклавирования и остывания в среду стерильно вносили отдельно проавтоклавированный раствор  $\text{NaHCO}_3$  в конечной концентрации 2,1 г/л.

В ходе экспериментов по культивированию клеток в среде, содержащей в качестве источника азота мочевины, в среду, не содержащую  $\text{KNO}_3$ , после автоклавирования вносили мочевины ( $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ ) в количестве 0,36 г/л. Для создания условий голодания по азоту использовалась среда без источника азота. При исследовании условий с различными концентрациями соли (0,1 М, 1,5 М, 2,5 М, 3 и 4 М NaCl) варьировали количество вносимого в среду NaCl: 5,85 г/л; 146,25 г/л; 175,5 г/л или 234 г/л соответственно.

Для культивирования штаммов *C. reinhardtii* использовали среду TAP (трис-ацетат-фосфат) (Sager & Granick, 1954). Культуры выращивали при освещении интенсивностью  $45 \text{ мкМ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ , температуре  $22^\circ\text{C}$  и непрерывном покачивании 110 об/мин. В экспериментах

использовали культуры, выращенные в течение 3 суток (72 ч), что соответствует середине логарифмической фазы роста и концентрации клеток  $\sim 2 \times 10^6$  кл/мл.

В состав среды TAP входили:

- Раствор Бейринка – 25 мл/л среды, содержащий следующие компоненты:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (15,0 г/л),  $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (4,0 г/л),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (2,0 г/л);
- Фосфатный буфер – 1 мл/л среды, содержащий следующие компоненты:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (93,5 г/л),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (63,0 г/л);
- Растворы микроэлементов, содержащие ЭДТА (50 г/л), – по 1 мл/л:  $\text{ZnSO}_4$  (22 г/л),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (11,4 г/л),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (5,06 г/л),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (4,99 г/л),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1,61 г/л),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1,57 г/л),  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1,1 г/л);
- 1М трис-НСl – 20 мл/л (трис – 157,64 г/л), pH раствора подводили с помощью КОН.

При культивировании штамма cw15-325 в среду дополнительно вносили аргинин (100 мг/л), поскольку данный штамм ауксотрофен по этой аминокислоте.

Для подсчета клеток при отборе проб использовали камеру Горяева и световой микроскоп. Жизнеспособность клеток определяли путем окрашивания 0,1% красителем EvansBlue (DIA-M, Russia): из общего количества клеток вычитали окрашенные, поскольку жизнеспособные клетки оставались неокрашенными.

## 2.3. Количественный анализ экспрессии генов

### 2.3.1. Выделение тотальной РНК

Для выделения тотальной РНК из клеток *D. salina* и *C. reinhardtii* культуры центрифугировали при 3600g в течение 3 мин, удаляли супернатант, после чего осадок клеток ресуспендировали в 400 мкл реагента для экстракции нуклеиновых кислот (TRIzol). Клетки замораживали при  $-70^\circ\text{C}$ . Для последующих этапов экстракции клетки размораживали в течение 10 мин, добавляли в каждую пробу по 80 мкл хлороформа и интенсивно встряхивали, не используя вортекс, в течение 2-3 минут. Затем пробы центрифугировали 15 мин при 12000 g и охлаждении до  $4^\circ\text{C}$ . В результате произошло разделение водной и фенольной фаз. Верхнюю – водную – фазу, содержащую РНК, аккуратно отбирали в чистые пробирки и добавляли к ней 200 мкл изопропанола. Смесь инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего центрифугировали для осаждения РНК в течение 10 мин при 12000 g и комнатной температуре. Супернатант убирали, а осадок промывали 800 мкл 75% этанола и центрифугировали при 12000 g и  $4^\circ\text{C}$

в течение 5 мин. Супернатант удаляли, полученный осадок в течение 2-5 минут подсушивали в ламинаре и растворяли в DEPC-воде.

Концентрацию выделенной тотальной РНК и качество проб оценивали на спектрофотометре BioRad SmartSpec Plus (США) в растворе ТЕ при длинах волн 260/280 и 320 нм.

### ***2.3.2. Синтез комплементарной ДНК***

Сначала для удаления из образцов, содержащих РНК, геномной ДНК, в пробы внесли свободный от РНКаз фермент DNase I с реакционным буфером, содержащим MgCl<sub>2</sub>. Пробирки инкубировали в течение 30 мин при температуре 37°C. Затем внесли 25 мМ ЭДТА и инкубировали 10 мин при 65°C.

Комплементарную одноцепочечную ДНК на матрице РНК синтезировали с использованием набора RevertAid HMinus First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, США). Согласно руководству, в пробирки вносили oligo(dT)-праймеры (1 мкл), после чего смесь инкубировали при 65°C в течение 5 мин. По завершении реакции отжига пробы охлаждали на льду, после чего в них добавляли 4,5 мкл реакционной смеси следующего состава: 2 мкл 5<sup>x</sup> RT Buffer, 0,5 мкл 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мкл 10 мМ dNTP, 0,5 мкл ингибитора РНКазы (RiboLock) и 0,5 мкл фермента обратной транскриптазы (RevertAid). Синтез длился в течение 1 ч при 42°C, после чего его останавливали, повышая температуру до 70°C на 10 мин.

Концентрацию кДНК определяли с помощью спектрофотометра BioRad SmartSpec Plus (США).

### ***2.3.3. Количественная ПЦР в режиме реального времени***

Для проведения ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) использовали амплификатор Light Cycler Instrument (CFX96 Real-Time PCR Detection System, Bio Rad, США). Для визуализации реакции синтеза использовали флуоресцентный интеркалирующий краситель SYBR Green I, растворенный в DMSO. Синтез проходил в стрипованных пробирках для ПЦР с прозрачными крышками, в объеме, равном 20 мкл.

В состав реакционной смеси входили: 2 мкл 10<sup>x</sup> Hot Start Taq Buffer, 1 мкл 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мкл флуоресцентного красителя SYBR Green I, 0,05 мкл 0,5 мМ dNTP, 0,08 мкл фермента HotStart Taq DNA Polymerase (5 е.а./мкл), 0,15 мкл кДНК, по 0,8 мкл прямого и обратного праймеров в концентрации 200 нМ и 14,95 мкл воды.

ПЦР проводили по следующей программе:

1. 95°C, 1 мин – денатурация ДНК;
2. Повтор в течение 40 циклов следующих этапов: денатурация – 95°C в течение 30 с, отжиг праймеров – 60°C в течение 30 с и элонгация – 72°C в течение 1 мин.
3. Охлаждение до температуры 4°C.

Реакцию проводили в трех биологических и трех технических повторах. Последовательности праймеров, которые использовали для проведения амплификации, приведены в таблице 1.

**Таблица 1.** Последовательности праймеров для амплификации

<i>RACK1</i> прямой	СТТСТCGCCCATGACCAC
<i>RACK1</i> обратный	CCCACCAGGTTGTTCTTCAG
<i>CrNAG</i> прямой	GCAGGCGCTCAACATCAACG
<i>CrNAG</i> обратный	CATGCCACCAGCAATGACGC
<i>DsaACT</i> прямой	ACCACACCTTCTTCAACGA
<i>DsaACT</i> обратный	GGATGGCTACATACATGGCA
<i>DsaNAG1</i> прямой	CCAGGGCGTCACACACAAC
<i>DsaNAG1</i> обратный	TCCATGAACGAGGACGCAGC

Генами-калибраторами при проведении ПЦР выступали *RACK1* (как референс для генов *C. reinhardtii*) и *DsaACT* (как референс для генов *D. salina*), поскольку их экспрессия конститутивна в исследуемых условиях.

Уровень относительной экспрессии генов определяли методами  $\Delta C_t$  и  $\Delta\Delta C_t$  Livak (Livak and Schmittgen, 2001). При этом в анализе использовались значения порогового цикла ( $C_t$ ), то есть того цикла ПЦР, при котором флуоресценция красителя SYBR Green I пересекает минимальное пороговое значение, которое может быть зарегистрировано прибором. Далее расчет осуществлялся следующим образом:

Согласно методу  $\Delta C_t$ , изменение уровня экспрессии гена интереса =  $2^{\Delta C_t}$ , где  $\Delta C_t = C_t$  референсного гена –  $C_t$  образца

Согласно методу  $\Delta\Delta C_t$ , изменение уровня экспрессии гена интереса =  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , где  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$  пробы –  $\Delta C_t$  калибратора.



При этом  $\Delta Ct_{\text{пробы}} = Ct_{\text{гена интереса пробы}} - Ct_{\text{нормализатора пробы}}$ ;

$\Delta Ct_{\text{калибратора}} = Ct_{\text{гена интереса калибратора}} - Ct_{\text{нормализатора калибратора}}$

## 2.4. Измерение концентрации хлорофилла

Для измерения концентрации хлорофилла в клетках 600 мкл культуры сначала центрифугировали (6000 g в течение 30 сек), затем удаляли супернатант, а полученный осадок клеток ресуспендировали в 100 мкл воды. После этого в пробирку вносили 500 мкл ацетона для осуществления экстракции. Пробы перемешивали, после чего центрифугировали в течение 5 мин при 12000 g. Полученный супернатант, содержащий экстрагированный хлорофилл а и b, использовали для определения оптической плотности с помощью спектрофотометра (SmartSpec Plus, BioRad). Измерение проводили при длине волны, равной 652 нм. Каждый вариант культуры брали в двух повторах, между которыми рассчитывали среднее значение.

Для расчета концентрации хлорофилла в образцах использовали формулу:

$$C (\text{хлорофилла } a + b) (\text{мг/мл}) = \frac{A_{652}}{34,5} \cdot 1000$$

## 2.5. Выделение белков и определение их концентрации

Суммарное выделение белка осуществляли из культуры клеток конечной концентрацией  $5 \times 10^6$  кл/мл. Для этого культуру центрифугировали при 3500 g и 4°C в течение 3 мин. Супернатант удаляли, к осадку клеток добавляли 300 мкл Probuffer А следующего состава: 0,1 М DTT и 0,1 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Пробы встряхивали, после чего к ним добавляли 200 мкл Probuffer В, включающий 30% раствор сахарозы и 5% раствор SDS. После перемешивания разрушали клетки путем помещения проб в термостат на 5 мин при температуре 95°C. Далее пробы центрифугировали 2 мин при 12000 g и охлаждении (4°C). В результате растворенные белки остались в супернатанте, который переносили в чистые пробирки.

Для определения концентрации выделенного белка в пробах использовали метод, описанный Porov et al. (1975). Так, к 10 мкл раствора белка добавляли 190 мкл воды, после чего пробы перемешивали на вортексе. После этого добавляли 800 мкл раствора, содержащего осаждающий реагент (90% метанол и 10% уксусная кислота) и 0,5% краситель амидочерный. Пробы перемешивали и центрифугировали при 12000 g и 10°C в течение 10 мин. Аккуратно удаляли супернатант пипеткой, не затрагивая осадок, содержащий

белки. Затем осадок трижды отмывали от красителя путем добавления 800 мкл раствора, содержащего 90% метанола и 10% уксусной кислоты.

После отмывки к осадку добавляли 800 мкл 0,2 Н NaOH и перемешивали на вортексе, что приводило к растворению осадка. Концентрацию белка измеряли на спектрофотометре (SmartSpec Plus, BioRad) при длине волны 615 нм.

Калибровочную кривую для последующего определения концентрации белка в опытных пробах строили, используя растворы БСА с известными концентрациями.

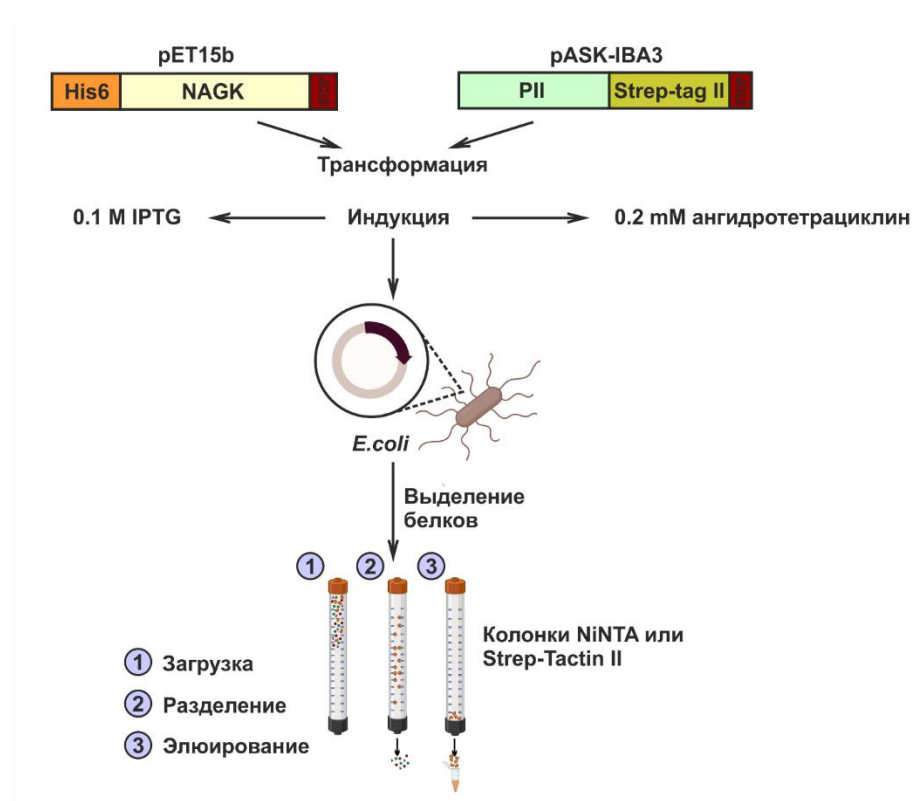
## **2.6. Определение внутриклеточного содержания свободного аргинина**

Внутриклеточный аргинин экстрагировали по методике Sakaguchi (1950). Для этого 4 мл культуры клеток центрифугировали, супернатант удаляли, а клетки ресуспендировали в 250 мкл воды. Пробы инкубировали 20 мин при 95°C, после чего охлаждали на льду и центрифугировали 10 мин при 12000 g и 4°C. 200 мкл супернатанта отбирали для последующей реакции. Для проведения реакции в пробу добавляли 40 мкл 0,2% 8-гидроксихинолина и 40 мкл 2 М NaOH. Смесь перемешивали и инкубировали на льду в течение 10 мин. Затем в пробирки быстро вносили 40 мкл холодного 19% NaClO и в течение 30 с перемешивали на вортексе. Реакцию останавливали добавлением 40 мкл 40% раствора мочевины. После 2 мин инкубирования на льду измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре (SmartSpec Plus, BioRad) при длине волны 500 нм. Концентрацию аргинина в опытных пробах определяли по калибровочной кривой, которую строили на основании оптической плотности водных растворов чистого аргинина разной концентрации (диапазон от 0 до 240 мкг/мл).

## **2.7. Клонирование, экспрессия и очистка рекомбинантных белков**

Рекомбинантный белок N-ацетил-L-глутаматкиназы *D. salina* получили на основе синтетического гена, который экспрессировали в *E. coli*. Последовательность гена *DsaNAGK* определили по аминокислотной последовательности соответствующего зрелого белка, не несущего транзитного пептида. Синтетический ген *DsaNAGK*, содержащий на концах последовательности для вставки в плазмиду pET15b *E. coli*, клонировали по методу AQUA Cloning (Beyer et al., 2015) в вектор pET15b (Novagen-Merck, Bio-sciences, Дармштадт, Германия) по сайту рестрикции NdeI. Для этого в объеме 10 мкл смешивали вставку и вектор в молярном соотношении 3:1 из расчета, чтобы на каждую 1 kb линейаризованного вектора по массе его приходилось 12 нг. Смесь инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре (22°C).

Полученную конструкцию трансформировали в клетки *E. coli* штамма Rosetta (Novagen) (рис. 5). Экспрессию гена *DsaNAGK* индуцировали путем добавления 0,1 М индуктора IPTG к суспензии клеток (оптическая плотность которых равнялась 0,5 единиц при длине волны 600 нм). Культуры с индуктором оставляли на ночь при комнатной температуре и покачивании (200 об/мин). Очистку *DsaNAGK* осуществляли методом аффинной хроматографии на колонке с иммобилизованной Ni-NTA агарозой (IBA GmbH, Геттинген, Германия), как описано у Maheswaran et al. (2004) (рис. 5). Для этого культуру центрифугировали 10 мин при 6000 g и 6°C, супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 10 мл буфера для разрушения следующего состава: 20 mM Трис-Cl (pH 8,0), 0,5 M NaCl, 10 mM имидазол, 1 mM DTT, 1 mM бензамидин и 0,2 mM PMSF. Затем клетки разрушали ультразвуком, после чего лизат центрифугировали в течение 60 мин при 12000 g и 4°C. Супернатант наносили на колонку с Ni-NTA-агарозой объемом 5 мл. Колонку предварительно подготовили к хроматографии, промыв раствором, содержащим 20 mM Трис-Cl (pH 8,0), 0,5 M NaCl и 10 mM имидазол.



**Рис. 5.** Схема клонирования, экспрессии и очистки рекомбинантных белков NAGK и PII.

Белок элюировали буфером следующего состава: 20 mM Трис-Cl (pH 8,0), 0,5 M NaCl и 250 mM имидазол. Элюат собирали в пробирки фракциями по 1 мл, чистоту образцов проверяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле SDS-PAGE. Фракции,

содержащие чистый белок *DsaNAGK*, объединяли, и с ними проводили диализ в буфере (pH 7,9), включающем 50 mM Трис-Cl (pH 8,0), 100 mM KCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 M DTT и 50% (w/v) глицерин. Очищенный белок хранили в холодильнике при -20°C.

Клонирование, экспрессия и очистка рекомбинантного белка *CrPII* была проведена ранее сотрудниками нашей лаборатории (Chellamuthu et al., 2014). Так, синтетический ген *CrPII* с последовательностью Strep-tag II на С-конце был клонирован в плазмиду pASK-IBA3 *E. coli*, после чего трансформирован в компетентные клетки. Далее проводилась сверхэкспрессия и очистка белков с помощью аффинной хроматографии на колонках Strep-Tactin II.

## 2.8. Оценка активности фермента *NAGK in vitro*

Активность очищенного рекомбинантного белка *DsaNAGK in vitro*, полученного с помощью вышеописанных этапов, определяли по методике, описанной Beez et al. (2009), используя сопряженные ферментативные реакции: АТФ-зависимое фосфорилирование NAG с участием пируваткиназы (PK) и лактатдегидрогеназы (LDH), сопровождающееся окислением NADH до NAD<sup>+</sup>.

В состав реакционной смеси входили: 50 mM имидазол (pH 7,5), 50 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NAG, 0,4 mM NADH, 1 mM фосфоенолпируват (PEP), 11 U лактатдегидрогеназы (LDH) и 15 U пируваткиназы (PK), 5 mM АТФ и 0,5 mM DTT. Реакцию проводили в объеме 800 мкл, запуская процесс добавлением в реакционную смесь 1,65 мкг *DsaNAGK*. В контрольные варианты *DsaNAGK* не добавляли. В экспериментах, подразумевающих присутствие белка PII, в смесь также дополнительно вносили 0,8 мкг *CrPII*. Измерение оптической плотности проб проводили в течение 10 мин с помощью фотометра SPECORD 200 (Analytik Jena) при длине волны 340 нм. Метод детекции активности фермента основывается на том, что фосфорилирование одной молекулы NAG происходит пропорционально окислению одной молекулы NADH до NAD<sup>+</sup>, что отражается в уменьшении оптической плотности реакционной смеси при длине волны 340 нм. Каждый эксперимент был проведен в трех повторах, данные по которым были приведены к среднему значению.

Расчет активности осуществляли с учетом того, что одна единица N-ацетил-L-глутаматкиназы катализирует превращение 1 мкмоль NAG в минуту, а молярный коэффициент поглощения NADH при 340 нм составляет 6178 L моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>. Энзиматические параметры K<sub>m</sub>, V<sub>max</sub>, K<sub>cat</sub> и IC<sub>50</sub> рассчитывали на основании наклона кривой, отображающей скорость протекающей реакции, с помощью программного обеспечения

GraphPad Prism-9 (GraphPad Software, США). Значения  $K_{cat}$  определяли, исходя из полученных показателей  $V_{max}$  и учитывая при расчете молекулярную массу гексамеров *Dsa*NAGK с His6-тагом (197,64 кДа), а также количество взятого в реакцию белка.

## 2.9. Оценка активности фермента NAGK *in vivo*

Активность N-ацетил-L-глутаматкиназы *in vivo* определяли, опираясь на методику, предложенную Haas and Leisinger (1975). Для анализа использовали клеточные экстракты, полученные из 100 мл культуры клеток. Культуру центрифугировали при 3600 g в течение 3 мин, после чего супернатант удаляли, а клетки ресуспендировали в 250 мкл буфера для разрушения следующего состава: 50 mM Трис-Cl (pH 7,4), 4 mM ЭДТА, 1 mM DTT, 0,5 mM Benzamidine. В пробы вносили приблизительно 50 мкл стеклянных шариков диаметром 0,10-0,11 мм, после чего клетки механически разрушали с помощью гомогенизатора Minilys (Bertin Technologies) на скорости 5000 об/мин в течение 20 с. Процесс разрушения повторяли трижды для каждой пробы. Затем образцы центрифугировали при 12000 g и 4°C в течение 10 мин для осаждения стеклянных шариков и клеточного дебриса на дно пробирки. Супернатант после центрифугирования переносили в чистую пробирку и держали на льду. Для последующего определения активности NAGK на каждую пробу (объемом 400 мкл) брали 24 мкл супернатанта. К нему добавляли 296 мкл реакционного буфера, включающего 400 mM  $NH_2OH \cdot HCl$ , 400 mM Трис-Cl (pH 7,4), 20 mM  $MgCl_2$  и 10 mM АТФ (pH реакционного буфера доводили до 7,5 с помощью раствора NaOH). Реакцию запускали добавлением 40 mM NAG (80 мкл 200 mM раствора NAG), после чего пробы инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 400 мкл стоп-раствора следующего состава: 5% w/v  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 8% w/v трихлоруксусной кислоты ( $C_2HCl_3O_2$ ) и 0,3 M HCl. Пробы перемешивали и центрифугировали в течение 10 мин при 12000 g и 4°C, после чего измеряли поглощение раствора на спектрофотометре (SmartSpec Plus, BioRad) при длине волны 450 нм. Реакцию проводили в трех повторах. В качестве бланков использовали пробы, в которые вместо NAG вносили равный объем воды.

Активность фермента рассчитывали исходя из того, что одна единица NAGK катализирует превращение 1 мкмоль N-ацетилглутамата за 1 мин, а молярный коэффициент поглощения для комплекса N-ацетилглутамилгидроксамат- $Fe^{3+}$  при длине волны 450 нм составляет  $456 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

## 2.10. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета офисных программ Microsoft Excel. Эксперименты проводили в трех биологических и трех

технических повторах, на основании результатов которых рассчитывали среднее значение и среднеквадратическое отклонение. Чтобы оценить достоверность различий между контрольными и опытными значениями, использовали t-критерий (Стьюдента) для уровня значимости ( $p < 0,01$ ).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1. Биоинформационный анализ первичных последовательностей

#### *DsaNAGK* и *DsaPII*

У *D. salina* ген Dusal.0374s00005 кодирует полноразмерный полипептид NAGK (*DsaNAGK*) с молекулярной массой 38047,15 Да, состоящий из 359 аминокислот и несущий N-концевую сигнальную последовательность, определяющую хлоропластную локализацию белка. Расчетная молекулярная масса процессированного полипептида *DsaNAGK* без транзитного пептида составляет 30940,10 Да. Последовательность *DsaNAGK* на N-конце содержит участок, характерный для чувствительных к аргинину NAGK, кроме того, *DsaNAGK* имеет консервативные аминокислотные остатки, отвечающие за аллостерическое связывание аргинина (рис. 6). Также *DsaNAGK* содержит консервативные аминокислотные остатки для связывания PII.

PII белок *D. salina* представляет собой канонический белок семейства PII. Полноразмерный полипептид *DsaPII*, кодируемый геном *D. salina* (Dusal.0350s00002), состоит из 220 аминокислот с имеет молекулярную массу 23690,82 Да. С помощью программного обеспечения ChloPro 1.1 Server удалось определить наличие в последовательности *DsaPII* транзитного пептида (аминокислотные остатки 1-57). Процессированный *DsaPII*, как и предполагалось, демонстрирует наибольшую степень идентичности с PII белком *C. reinhardtii* (*CrPII*) (56,92%). Мы выполнили выравнивание первичной последовательности PII белка *D. salina* относительно PII-белков других представителей Archaeplastida и бактерий. Выравнивание *DsaPII* указало на наличие в полипептиде двух аминокислотных последовательностей (PS00496 и PS00638), которые, согласно базе данных белковых доменов PROSITE, имеют высокую степень идентичности среди всех канонических белков PII (рис. 7). Кроме того, подобно гомологам PII у представителей Chloroplastida, белок *DsaPII* содержит уникальный C-концевой участок, включающий Q-петлю, которая отвечает за восприятие глутамина. Выравнивание также показало высокую степень консервативности ряда функционально важных участков PII-белков, в том числе аминокислотных остатков T-петли, которые вовлечены во взаимодействие с NAGK.

I

```

Dunaliella      1 MLTQRQVASSSSGRPSSCKTASQASAPRPARQCRS SRFVARKNEANVLAQPTFLAPQSRFP
Chlamydomonas  1 -----MALLAAKTTSPSVTTRRSVTGLPVSVSGFRASRPTRKHGIYV
Chlorella      1 -----MAMVPCPSQRLSLSSSIKSAAPHQICVSRP SRAPRRPAHLA
Physcomitrium  1 -----MASWKS SVTVLAKEPIGIR SAPAELIKGTSSVKFSYPAKKARFQARVE
Arabidopsis    1 -----MATVTSNAPSKSFSFTVSNPFKTLIPNKSPSLCYPTRNKNHRLGFS
Porphyra       1 -----
Synechococcus  1 -----
Synechocystis  1 -----
Thermotoga     1 -----
Escherichia    1 -----

```

II

```

Dunaliella      61 SSQICASDAQGVTHNLSLDRVVTLLSEALPYLQVFRGKTI VVKYGGAA MKDPTLKAQVI
Chlamydomonas  42 RAMAAATAEEAELRKQLINLDRVVTLLSEALPYLQVFRGKTI VVKYGGAA MKDPTLKAQVI
Chlorella      42 VTAAAAAPQASKALDRFSAFDRVSVLLSEALPYLQVFRGKTI VVKYGGAA MKDPTLKAQVI
Physcomitrium  50 AVTDQATARQAARTSQTGKGRVDIILAEALPYLQVFRGKTI VVKYGGAA MKDPTLKAQVI
Arabidopsis    48 IKATVSTPPSIATGNAPSPDYRVEILSESLPELQVFRGKTI VVKYGGAA MTSPELKS SVV
Porphyra       1 -----MLNTERVKVLSLSDVT-ILQAFSSRITLVVKYGGAA MKNQKLVHVI
Synechococcus  1 -----MSSEFIEAGAADRVRI LSEALPYLQVFRGKTI VVKYGGAA MKDPEELKEAVM
Synechocystis  1 -----MSSTQDYIGEEAATRVKILSEALPYLQVFRGKTI VVKYGGAA MKDPSNLKIKVI
Thermotoga     1 -----MRIDTVNVLLEALPYLQVFRGKTI VVKYGGAA MKDPSNAKKEFI
Escherichia    1 -----MMNPLITIKLGGVLLDSEALQRLF

```

```

Dunaliella      121 TDLVLLSCVGIR-CVLVHGGGPEINFWLDKVGIEEFKNGLRVTDAGTMEIVEMVLGGRV
Chlamydomonas  102 SDLVLLSCVGIR-CVLVHGGGPEINFWLAKVGIEAVFKNGLRVTDAGTMEIVEMVLGGRV
Chlorella      102 SDLVLLSCVGIR-PVIVHGGGPEINFWLNKLGIEAQFKNGLRVTDAGTMEIVEMVLGGRV
Physcomitrium  110 KDLVLLSCVGMK-CVLVHGGGPEINQWLKLGIEEFKNGLRVTDAGTMEIVEMVLGGRV
Arabidopsis    108 SDLVLLSCVGLR-PILVHGGGPEINRWLKLQINIPAEFRDGLRVTDAGTMEIVEMVLGGRV
Porphyra       45 SDLVFLSEGLR-PILVHGGGPEINFWLDQKILKPKFENGVRVTDAGTMEIVEMVLGGRV
Synechococcus  52 RDLVFLSCVGMK-PVIVHGGGPEINAWLGRVGIKPKFENGVRVTDAGTMEIVEMVLGGRV
Synechocystis  54 RDLVFLSCVGLR-PVIVHGGGPEINFWLDKVGIEEPPKFDGLRVTDAGTMEIVEMVLGGRV
Thermotoga     44 QDLVLLKYTGIR-PILVHGGGPEINQWLDKVGIEEFKNGHRVTDAGTMEIVEMVLGGRV
Escherichia    25 SALVNYRESHQRPLVIVHGGGCVVDELKMGKINLPVKKKNGLRVTDAGTMEIVEMVLGGRV

```

```

Dunaliella      180 NKSLVSLIQAGGKAVGLTGKDGQLLRAR-QMVEKDIGFVGEVSKVDPSILKIAAENNYT
Chlamydomonas  161 NKSLVSLIQAGGKAVGLTGKDGQLLRAR-QMVELDIGFVGEVSKVDPSILNVLVEDEYI
Chlorella      161 NKSLVSLIQAGGKAVGLTGKDGQLLRAR-QMVEKDIGFVGEVSVNPSLLQTLVADGYI
Physcomitrium  169 NKSLVSLINKAGGCAVGLCGDKGLKARPLS--DDLGFVGETIADVTSVVKGILNSGHL
Arabidopsis    167 NKSLVSLINAAGCATAVGLSGHPGRLITARPVPNSAQLGFVGEVARVDPVLRPLVYGYI
Porphyra       104 NKDLVASINKQGGKSVGLSGDKGLLTSR-PSDKPNLGFVGEVQNVDRNLETLNINNYI
Synechococcus  111 NKDLVSRINTTGGRAVGLCGDKGLLRAR-PHDQEGIGFVGEVSNVSEVIEPLERGYI
Synechocystis  113 NKELVNLINQAGGKAVGLCGDKGQLLRAR-TMTNKDVG FVGEVSVVDARVETLVKSGYI
Thermotoga     103 NKEIVMNLNLHGGRAVGLCGDKSKLVAEKETKHCIDIGVGVKVKVNEPETHALLENDYI
Escherichia    85 NKLLAWAKKHQIAAVGLFLGDGDSVKVT--QLDEELGHVGLAQFGSPKILNSLLENGYL

```

```

Dunaliella      239 PVVATIAIDDKGOALNINADTAAGEIAAALQAEKLLMTDVPGLRDPKDVSTKFOELNI
Chlamydomonas  220 PVVATIAIDYSGOALNINADTAAGEIAAALQAEKLLMTDVPGLRDRNDIGTKIQALDI
Chlorella      220 PVVASVADGKGOALNINADTAAGEIAASLRAEKLLMTDVPGLRDRDPSTKFAALTI
Physcomitrium  227 PVVATIAADNDGOALNINADTAAGEIAASLQAEKLLMTDVPGLRDRKDSSTLVPEVNI
Arabidopsis    227 PVVASVAADDSGOALNINADTVAGEIAAALQAEKLLMTDVPGLRDRDPSTKFAALTI
Porphyra       163 PVIASVAADKQGOALNINADTVAGEIAARLNAEKLLMTDTPGILRNASDATTLSHHSI
Synechococcus  170 PVISVAADENGQSENINADTVAGEIAAALNAEKLLMTDTRGILEDPKRPESLIPRNI
Synechocystis  172 PVISVAADDFGOALNINADTVAGEIAAALQAEKLLMTDTRGILRDRYKDPSTLIHKLDI
Thermotoga     163 PVVATVIGEDCHSYNINADTAAGEIAKSLMAEKLLMTDVPGLRDRKLI SLTTPDE--
Escherichia    143 PVVSSIGVTDGQLMNINADTAATAAATLGAAD-LI LLDVSVGILDGR---GQRIAEMTA

```

```

Dunaliella      299 RQCFRTLIQEGVIGGMI PKIECCVRC LAQGLCAAHIIDGRARHSILMEILTNBEGVTMI
Chlamydomonas  280 RSCRELIQEGVIGGMI PKIECCIRCLS QGVKAAHIIDGRASHSILMEILTDEGVGTMIT
Chlorella      280 RECFELEDDGIIAGGMIPKVCCIRSLSQVSAATHIIDGRQPHSLLMEILTDEGIGMIC
Physcomitrium  287 KGVKRVLEEGKIVAGGMIPKVCCIRSLAQGVKTA SLIDGRRQHSLLHETVSDPAGTMIT
Arabidopsis    287 KGVKRVLEEGKIVAGGMIPKVCCIRSLAQGVKTA SLIDGRRQHSLLHETVSDPAGTMIT
Porphyra       223 QEARDLTKTAVISGGMIPKVNCCIRSLAQGVASAHIIDGRIDHALLLEILTDOGIGSMIV
Synechococcus  230 PQSRELIQAGVIGGMI PKVCCIRSLAQGVRAAHIIDGRIPHALLLEIFTDAGIGTMIV
Synechocystis  232 QQARELIQSGVIGGMI PKVCCIRSLAQGVRAAHIIDGRILPHALLLEIFTDAGIGTMIV
Thermotoga     221 --AEELIRDGTVTGGMIPKVCASAVRGCVGVAVHIINGLEHALLLEIFSRKIGTMIK
Escherichia    199 AKAEQLIEQGITDGMIVKVNAA LDAARTLGRPVDIASWR-HAEQLPAIFNGMPMGTRIL

```

```

Dunaliella      359 G-----
Chlamydomonas  340 G-----
Chlorella      340 ERPL-----
Physcomitrium  347 G-----
Arabidopsis    347 G-----
Porphyra       283 V-----
Synechococcus  290 GSGYHEAHQPWQ
Synechocystis  292 ASGYDL-----
Thermotoga     279 ELEG-----
Escherichia    258 A-----

```



**Рис. 6.** Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей NAGK-белков *Dunaliella salina*, растений и бактерий. Выделенные черным остатки идентичны или консервативны, по крайней мере, для 60% анализируемых NAGK-белков. Серым цветом выделены сходные аминокислотные остатки. I – обозначает последовательность сигнального пептида, II – консервативную последовательность, характерную для чувствительных к аргинину белков NAGK, в пределах которой консервативные аминокислотные остатки для связывания аргинина обозначены желтым цветом. Аминокислотные остатки, непосредственно вовлеченные в аллостерическое связывание аргинина, выделены красным цветом. Выравнивание последовательностей проводилось с помощью программного обеспечения ClustalW.

Dsa	1	-----MQRLSQPSRTSSLSSNRPQQAQPTVAHYPSVPRSAPKTNKR
Cr	1	-----MALASRTSSAAVVGRSTRSAAVVPVRSIASRCQAARPAR
Physco	1	MALQPRLSLSCLRGRSVDACAFVAPASASISSADACVRIPCWNGASSSSKRLPFFGARV
At	1	-----MAASMTKPI SITSLGFYSDRKNIAFSDCISICSGFRHSR
Os	1	-----MSSPATAAAAAASCGVLRHHHPASPRPPPTTTTTTTRLLLLA
Sl	1	-----MASPSSLKSNFSLHSFSSSPSLSQFPHFTSITVQPKFF
Pp	1	-----
Pu	1	-----
Py	1	-----
Sy	1	-----
Sc	1	-----
Ec	1	-----

Dsa	43	TPSGAPACHRHLTACASLK RAS YAELESITCDLSAFPQCHFFRIEATIRPWRLPFVVEQL
Cr	40	RASVAVRAS-DENGSVSVRRAPYAELESIQCDLSAFPQGVKFFRIEATIRPWRLPFVIDTL
Physco	61	ASADPKSPNWRKRVSGVVQVHLEEDDQSKDYQPSVDFYKVEAIVRPWRISPVSSAL
At	40	PSCLDLVTKSPSNNSR-----VLPVVSQAISSDYIPDSKFYKVEAIVRPWRIQQVSSAL
Os	43	SRSRGLQRPLRVNHAPRRLPPTAARQAQSAAGYQPESEFYKVEAIVRPWRVPYVSSGL
Sl	40	PSQLTFKR---CQNAP-----SFPIIRAQNSPDFVPAKFKVEAIVRPWRIQQVSSAL
Pp	1	-----MKKIEAIVRPFKLNEVKLAL
Pu	1	-----MKKIEAIVRPFKLNEVKLAL
Py	1	-----MKKIEAIVRPFKLNEVKLAL
Sy	1	-----MKKIEAIVRPFKLNEVKLAL
Sc	1	-----MKKIEAIVRPFKLNEVKLAL
Ec	1	-----MKKIEAIVRPFKLNEVKLAL

Dsa	103	SAQGVVIRGMTAMVKGVMQGGNRERYAGTEFAITDLVDKATVEVVTAREQVDQVVRLLIST
Cr	99	SKYGIRGLTNPVKGVGVOGGSRRERYAGTEFGPSNLVDKEKLDIVVSRQVDVAVVRLVAA
Physco	121	LKMGIRGVTVDVIRGFGAQQGSRERQAGTEYAGDSYIKKKVLEIVVSKDQVEAVIDTITD
At	94	LKMGIRGVTVDVIRGFGAQQGSTERHGGSEFSEDKFKVAKVMEIVVKKDQVESVINTIE
Os	103	LKMGIRGVTVDVIRGFGAQQGSTERHGGSEFAEDTFIDKVKMEIVVSKDQVEAVVDKIE
Sl	91	LKMGIRGVTVDVIRGFGAQQGLTERQAGSEFSEDTFVAKVMEIVVSKDQVEGVIAKIE
Pp	21	VKGGIGGMTVVKVSGFGRQKQOTERYKGEYSID-IIDKIKLEIIVSDDKVNSTIEIIK
Pu	21	VKEGIGGMTVVKVSGFGRQKQOTERYKGEYSID-IIDKIKLEIIVSDDKVNKITETIIK
Py	21	VKEGIGGMTVVKVSGFGRQKQOTERYKGEYSID-IIDKIKLEIIVSDDKVEKIVETIIK
Sy	21	VNAGIVGMTVSEVRGFGRQKQOTERYKGEYSID-IIDKIKLEIIVVEDAQVDTVIDKIVA
Sc	21	VNAGIVGMTVSEVRGFGRQKQOTERYKGEYSID-IIDKIKLEIIVDEGQVDMVVDKLV
Ec	21	AEVGITGMTVTEVRGFGRQKQHTELYRGAEYMD-FLPKVKLEIIVVPDDIVDTTCVDTIIR

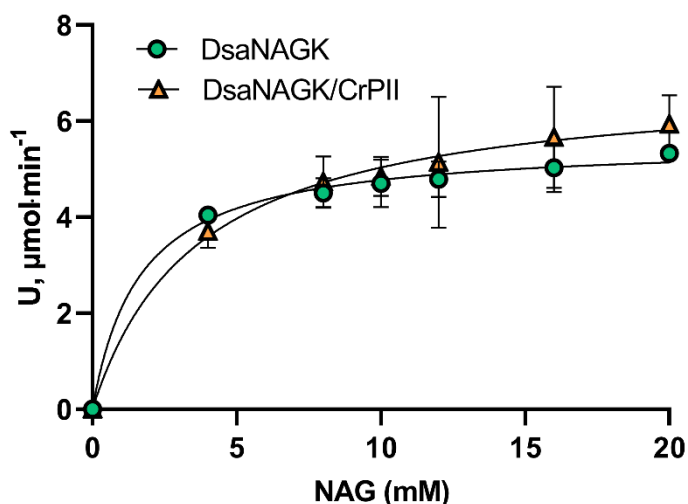
Dsa	163	ACYTGEIGDGKIFVHPVADVVRVIRTAETGAGAEKMEGGMFDQAASSSWIPANPANES
Cr	159	SAYTGEIGDGKIFVHPVAEVVIRRTAETGLEAEKMEGGMEDMMKKK-----
Physco	181	QARTGEIGDGKIFVSPVSDIIRIRTGERGLKAERMAGGRAAMQTSAGSDGN-----
At	154	GARTGEIGDGKIFVLPVSDVIRVIRRTGERGEKAEMTGDMLSPS-----
Os	163	KARTGEIGDGKIFVLPVSDVIRVIRRTGERGERAERMAGGLADKLSSAMPIS-----
Sl	151	EARTGEIGDGKIFLTPISDVIRVIRRTGERGEKAERMGGHADMSALSTS-----
Pp	80	TAKTGEIGDGKIFVSDVEQVIRIRTNLNSAAL-----
Pu	80	TAKTGEIGDGKIFVSDVEQVIRIRTNLNSAAL-----
Py	80	ASKTGEIGDGKIFVSTSERVIRIRTNLNFAL-----
Sy	80	AARTGEIGDGKIFVSPVDQITIRIRTGERKNADAI-----
Sc	80	AARTGEIGDGKIFVSPVDSVIRIRTGERKDTBAI-----
Ec	80	TAQTGKIGDGKIFVFDVARVIRIRTGEEDDAI-----

**Рис. 7.** Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей РII-белков *Dunaliella salina*, растений и бактерий. Выделенные черным остатками идентичны или консервативны, по крайней мере, для 60% анализируемых РII-белков. Серым цветом

выделены сходные аминокислотные остатки. Блоки I и II соответствуют характерным для РII паттернам с высоким сходством последовательностей (I и II). Белыми и черными стрелками обозначены позиции тирозиновых оснований, подвергающихся уридилированию в белке РII *E. coli*, и сериновых оснований, фосфорилируемых у *Synechococcus* PCC 7942, соответственно. АТФ-, NAGK- и 2-OG-связывающие основания отмечены (●), (■) и (▲) соответственно. Выравнивание последовательностей проводилось с помощью программного обеспечения ClustalW.

### 3.2. Характеристика активности DsaNAGK *in vitro*

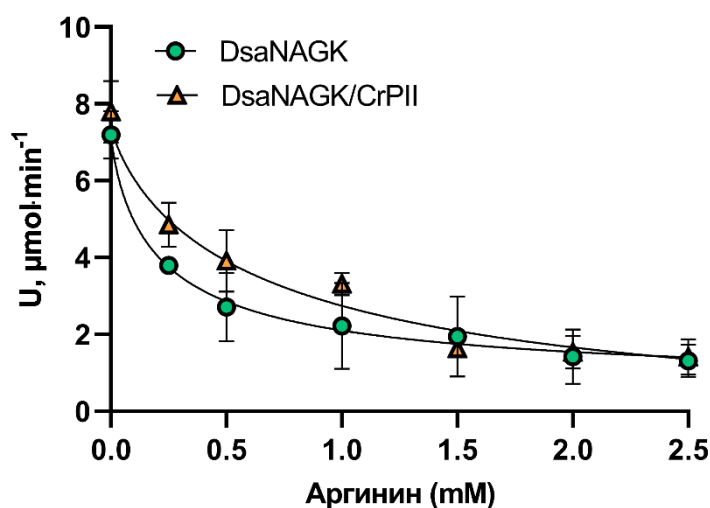
Чтобы исследовать биохимические свойства белка *DsaNAGK* и особенности его взаимодействия с регуляторным белком PII, а также с эффекторными молекулами, мы использовали рекомбинантный белок с His-6 меткой на N-конце, экспрессированный в клетках *E. coli* и очищенный методом аффинной хроматографии (рис. 5). Активность фермента оценивали по методике, предложенной Beez et al. (2009) и описанной ранее в материалах и методах (см 2.8.). В первую очередь мы определили кинетические константы *DsaNAGK*, а именно  $K_m$ ,  $V_{max}$  и  $K_{cat}$ . Для этого проводили измерение активности фермента при разных концентрациях субстрата NAG. Активность оценивали при концентрациях NAG в диапазоне 0-20 mM, поскольку к концентрации, равной 20 mM, скорость ферментативной реакции, катализируемой *DsaNAGK*, уже достигла максимального значения и перестала расти. Экспериментально удалось установить, что значение  $K_m$ , характеризующее концентрацию субстрата (NAG), при которой скорость ферментативной реакции достигает  $\frac{1}{2}$  от максимально возможной, составило  $1,65 \pm 0,27$  mM (рис. 8). При этом  $V_{max}$  и  $K_{cat}$  составили  $5,56 \pm 0,27$  мкмоль·мин<sup>-1</sup> и  $11,1 \pm 0,18$  с<sup>-1</sup> соответственно. Показатель, полученный для  $K_m$  *DsaNAGK*, сопоставим с  $K_m$ , характерной для NAGK зеленой водоросли *Chlorella variabilis* (*CvNAGK*) ( $K_m$  (NAG) 1,5 mM), при этом он в 1,4 раза меньше, чем  $K_m$  NAGK *Polytomella parva* (*PpaNAGK*) ( $K_m$  (NAG) 2,35 mM) и почти в пять раз ниже, чем  $K_m$  NAGK *Chlamydomonas reinhardtii* (*CrNAGK*) ( $K_m$  (NAG) 7,7 mM) (Selim et al., 2020; Chellamuthu et al., 2014). Кроме того, сравнение кинетических параметров *DsaNAGK* с NAGK других одноклеточных зеленых водорослей показало, что значение  $K_{cat}$  *DsaNAGK*, составляющее  $11,1 \pm 0,18$  с<sup>-1</sup>, оказывается гораздо ниже  $K_{cat}$ , характерных для других зеленых водорослей: *CvNAGK* ( $35,35$  с<sup>-1</sup>), *CrNAGK* ( $56,76$  с<sup>-1</sup>) и *PpaNAGK* ( $211,5 \pm 4,1$  с<sup>-1</sup>).



**Рис. 8.** Активность *DsaNAGK* в зависимости от концентрации субстрата NAG в присутствии и отсутствии *CrPII*.

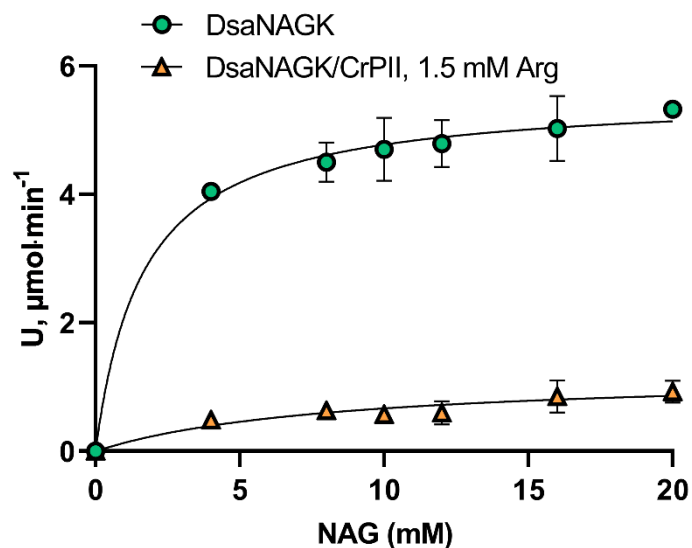
Чтобы проверить, влияет ли регуляторный белок PII на активность *DsaNAGK*, мы внесли в реакцию смесь PII *C. reinhardtii* (*CrPII*), который демонстрирует 56,9% идентичности аминокислотной последовательности *DsaPII*. Оказалось, что добавление *CrPII* лишь незначительно отразилось на кинетических параметрах *DsaNAGK* (рис. 8).

Далее, чтобы оценить изменение активности *DsaNAGK* при действии аргинина, который по отрицательной обратной связи выступает ингибитором этого фермента, мы определили кинетические параметры *DsaNAGK* в присутствии разных концентраций аргинина. Значение  $IC_{50}$  – половины максимальной ингибирующей концентрации – для аргинина составило  $0,22 \pm 0,06$  мМ (рис. 9), что приблизительно в пять раз меньше, чем  $IC_{50}$  для *CvNAGK* (1,2 мМ), но вдвое выше по сравнению с *CrNAGK* ( $IC_{50}$  0,11 мМ).



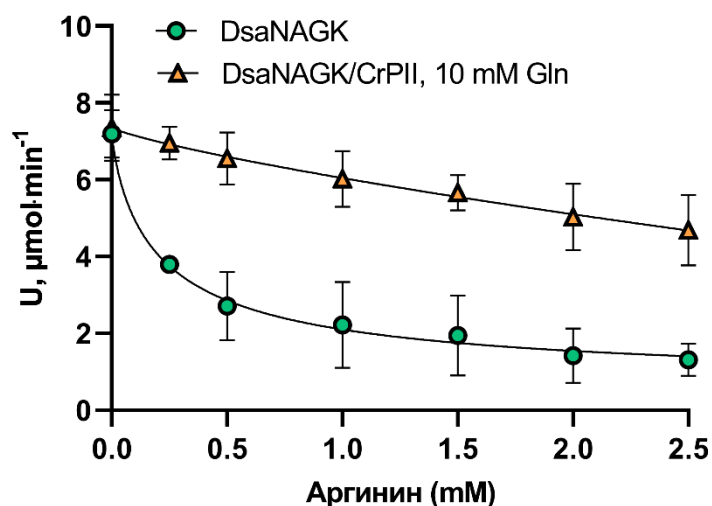
**Рис. 9.** Ингибирующее действие аргинина на активность *DsaNAGK* в присутствии или в отсутствии *CrPII*.

Добавление *CrPII* в реакцию не изменило активности *DsaNAGK* в присутствии аргинина (рис. 9). Кроме того, определение активности *DsaNAGK* в зависимости от концентрации субстрата NAG в присутствии ингибитора – аргинина – и *CrPII* подтвердило, что *CrPII* не активирует *DsaNAGK* (рис. 10). Так, в присутствии 1,5 мМ аргинина значение  $K_m$  (NAG) увеличилось с  $1,65 \pm 0,27$  мМ до  $8,33 \pm 0,13$  мМ, что говорит о значительном снижении чувствительности фермента по отношению к субстрату. Кроме того,  $V_{\text{max}}$  снизилась с  $5,56 \pm 0,27$  мкмоль·мин<sup>-1</sup> до  $1,22 \pm 0,14$  мкмоль·мин<sup>-1</sup>.



**Рис. 10.** Зависимость активности *DsaNAGK* от концентрации субстрата NAG в присутствии или отсутствии аргинина и *CrPII*.

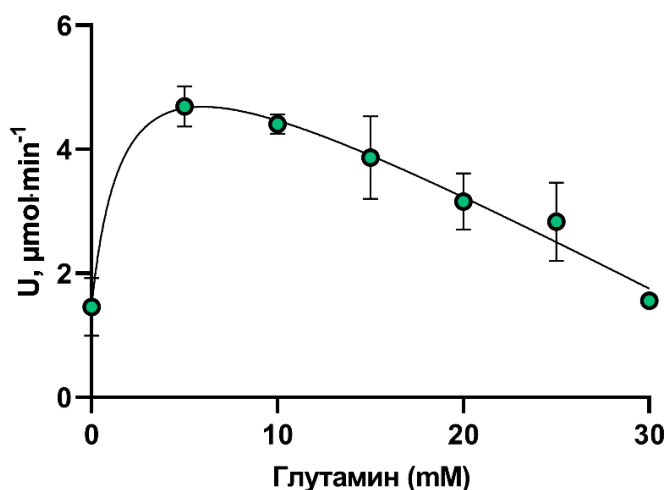
Эти наблюдения, казалось бы, противоречат известному факту о том, что регуляторные белки РII способны ослаблять ингибирование NAGK аргинином (Beez et al. 2009). Однако для всех представителей археопластид, имеющих РII белки, показано, что они способны выполнять такую функцию только в присутствии аминокислоты глутамина. Чтобы проверить, ослабляет ли *CrPII* ингибирование *DsaNAGK* аргинином в присутствии глутамина, мы внесли в реакционную смесь 10 mM глутамин. Экспериментально мы подтвердили предположение о том, что в случае взаимодействия *DsaNAGK* с *CrPII* глутамин действительно необходим, и в его присутствии *CrPII* значительно ослабляет ингибирование аргинином (рис. 11). Так, если  $IC_{50}$  (Arg) для *DsaNAGK* в отсутствие *CrPII* и глутамина составляло  $0,22 \pm 0,06$  mM, то при их добавлении концентрация ингибитора, равная даже 2,5 mM, не позволила достичь 50% снижения активности фермента.



**Рис. 11.** Ингибирование *DsaNAGK* аргинином в присутствии и в отсутствии *CrPII* с 10 mM глутамином.

Далее мы исследовали влияние концентрации глутамина на способность *CrPII* снимать ингибирование *DsaNAGK* аргинином (рис. 12). В качестве ингибирующей концентрации аргинина для эксперимента мы выбрали 1,5 mM, поскольку в этом случае наблюдалась наибольшая разница в активности *DsaNAGK* в отсутствие и в присутствии *CrPII* с глутамином (рис. 11).

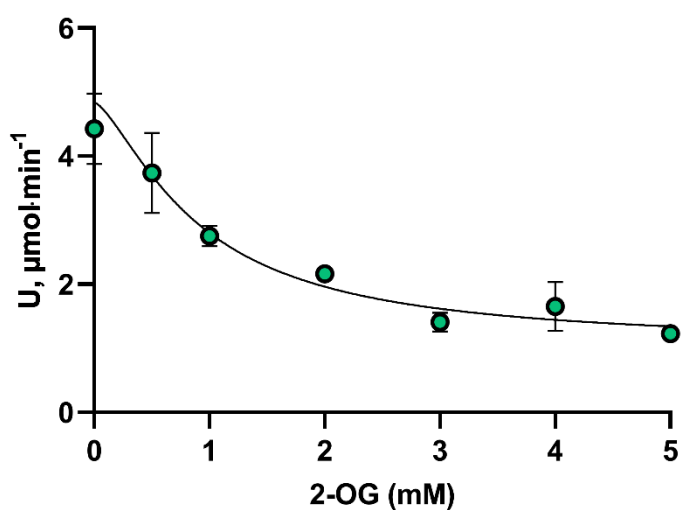
Из данных, представленных на рисунке 12, видно, что в присутствии невысоких концентраций глутамина (5 mM, 10 mM) активность *DsaNAGK* увеличивается в три раза по сравнению с ингибированным ферментом. Однако дальнейшее увеличение концентрации глутамина приводит к снижению активности *DsaNAGK*, а значит, в таких условиях *CrPII* менее эффективно связывается с NAGK и снимает ингибирование аргинином.



**Рис. 12.** Влияние глутамина на активность *DsaNAGK* в присутствии *CrPII* и 1,5 мМ аргинина.

Согласно многочисленным исследованиям РII белков у цианобактерий и растений, одной из важных молекул-эффекторов, которая часто оказывает влияние на взаимодействие этих регуляторных белков с мишенями, является 2-OG (Zeth et al., 2014; Fokina et al., 2010). Известно, что связывание 2-OG с РII белком у цианобактерий приводит к тому, что РII теряет способность взаимодействовать со своими мишенями. В случае *A. thaliana* присутствие 2-OG делает РII-белок неспособным облегчать ингибирование NAGK аргинином. В связи с этим мы исследовали влияние 2-OG на способность *CrPII* взаимодействовать с *DsaNAGK* и снимать ингибирование аргинином. Для этого была проведена реакция фосфорилирования NAG, катализируемая *DsaNAGK*, в присутствии *CrPII*, 10 мМ глутамина и 1,5 мМ аргинина при различных концентрациях 2-OG.

Согласно полученным данным, 2-OG снижает активность *DsaNAGK* по зависимому от концентрации механизму. При этом для 2-OG значение  $IC_{50}$  составило  $0,9 \pm 0,039$  мМ (рис. 13).



**Рис. 13.** Влияние 2-OG на активность *DsaNAGK* в присутствии *CrPII*, 10 мМ глутамина и 1,5 мМ аргинина.

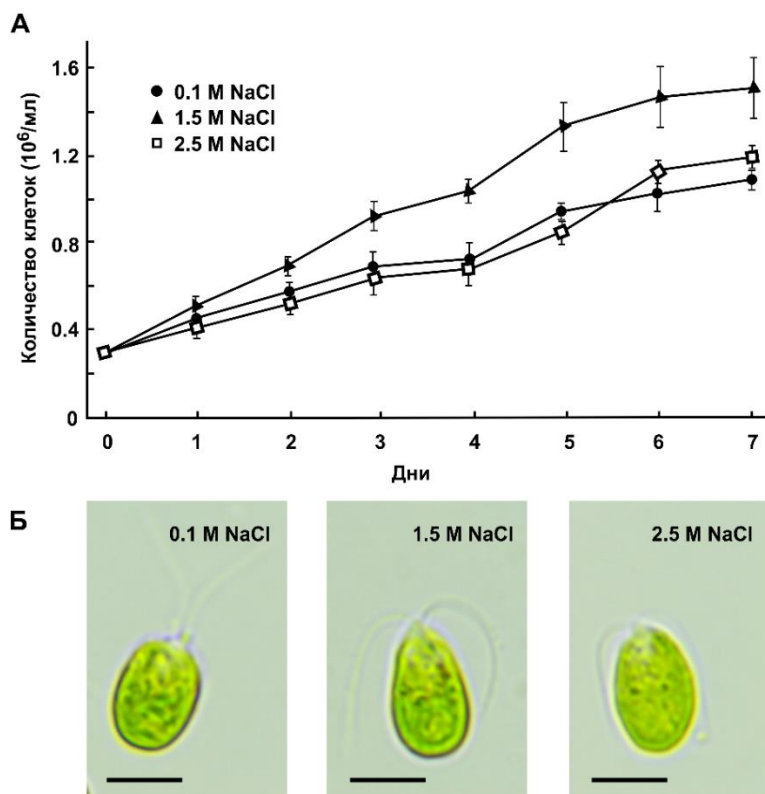


### 3.3. Характеристика активности *DsaNAGK in vivo*

Нас интересовало, как будет изменяться активность фермента в клетках в разных условиях, и, прежде всего, при различном содержании NaCl в среде.

#### 3.3.1. Рост *D. salina* при разных концентрациях NaCl в среде

В качестве питательной среды для культивирования *D. salina* была выбрана среда RAMARAJ Medium D (Ramaraj and Niran, 2013) с мочевиной в качестве источника азота и различными концентрациями соли: 0,1 М; 1,5 М; 2,5 М; 3 и 4 М NaCl. Из всех рассмотренных вариантов для роста культуры самой оптимальной оказалась среда с 1,5 М NaCl, поскольку при этой концентрации клетки наиболее быстро преодолели период задержки роста (лаг-фазу) и перешли в фазу активного деления (рис. 14 А). Максимальная скорость роста при этом наблюдалась на 4-5 сутки культивирования. При 0,1 М и 2,5 М NaCl скорость роста была снижена, причем оба варианта показали схожую динамику и близкую плотность культур через 7 суток выращивания ( $1,0-1,1 \times 10^6$  клеток/мл в сравнении с  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл при 1,5 М NaCl). При этом замедление скорости роста для всех выше указанных вариантов наблюдалось на 6-7 сутки. Концентрации соли, равные 3 М и 4 М, значительно подавляли рост культуры, в связи с чем кривые для этих вариантов не отображены на графике.



**Рис. 14.** Зависимость роста *D. salina* от концентрации NaCl в среде (А). На панели (Б) приведены фотографии клеток через 4 суток выращивания в средах с указанными концентрациями NaCl. Масштабная линейка: 10 мкм.

Микроскопические наблюдения показали, что клетки *D. salina* на средах с 0,1 М, 1,5 М и 2,5 М NaCl имели приблизительно одинаковый размер (рис. 14 Б). Однако заметно, что на среде с 1,5 М NaCl форма клеток более вытянутая, конец, на котором расположены жгутики, сильно сужен, тогда как при двух других вариантах концентрации соли клетки приобрели форму, более близкую к овалу с одинаково скругленными концами. Окраска клеток во всех трех вариантах одинакова, т.е. в анализируемых условиях не наблюдалось увеличение синтеза защитных пигментов каротиноидов.

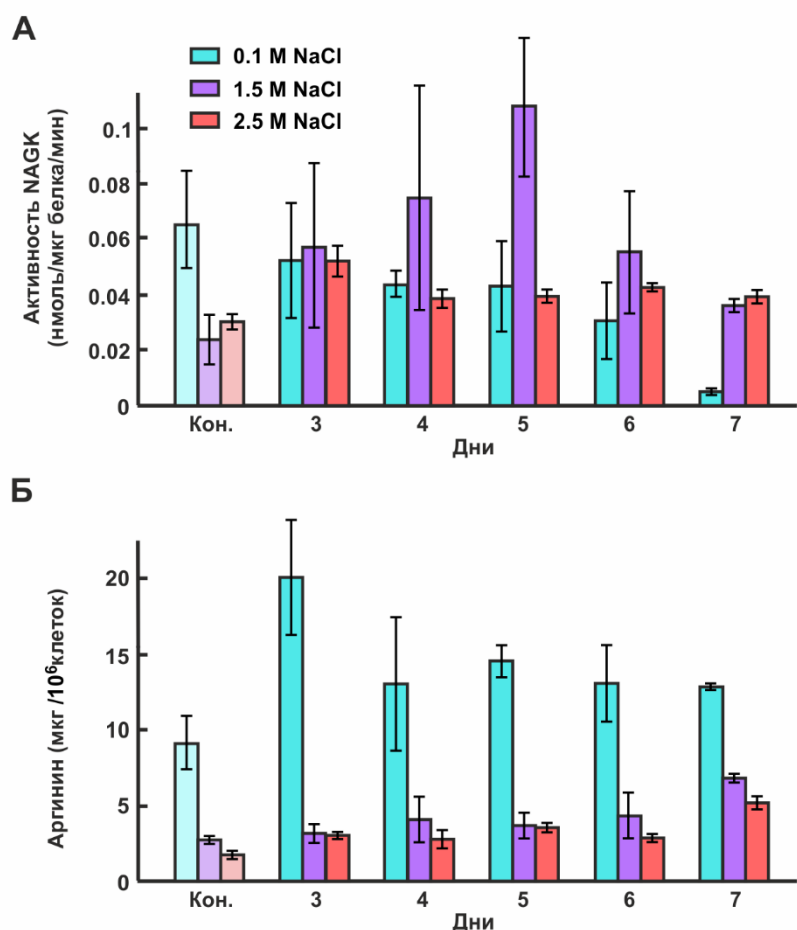
### **3.3.2. Зависимость активности и синтеза *DsaNAGK* в клетках, выращенных при разных концентрациях NaCl**

Активность фермента была проанализирована в клетках *D. salina*, выращенных на среде RAMARAJ Medium D и перенесенных в среду, источник азота в которой был изменен с нитрата на мочевины. Мы исследовали три варианта среды, различающиеся концентрацией NaCl: были использованы концентрации 0,1 М, 1,5 М и 2,5 М NaCl (рис. 14 А). При концентрациях соли, равных 3 М и 4 М, наблюдалось не только значительное снижение роста культуры, как указано выше, но и крайне низкие уровни активности *DsaNAGK*, поэтому данные концентрации не были взяты в дальнейший анализ.

Следует отметить, что через 4-5 суток роста, соответствующих логарифмической фазе, наиболее высокая активность *DsaNAGK* наблюдалась в культуре, выращенной при концентрации соли 1,5 М, что согласуется с характером роста культуры (рис. 14 А) и необходимостью синтезировать большие количества белка. Так, на 5 сутки роста активность *DsaNAGK* в клетках, выращенных на среде с мочевиной при концентрации соли 1,5 М, в 4,6 раза превышала контрольное значение (культура, выращенная на нитрате), и приблизительно в 2,5 раза была выше, чем в вариантах с 0,1 М и 2,5 М NaCl на 5 сутки (рис. 15 А). При этом в случаях с добавлением 0,1 М и 2,5 М NaCl активность фермента достоверно не различалась. Единственное достоверное отличие между этими вариантами наблюдалось на 7 сутки выращивания: на среде с 0,1 М NaCl была зафиксирована наименьшая активность *DsaNAGK*, значение которой оказалось приблизительно в семь раз ниже, чем на среде с 1,5 М и 2,5 М NaCl. Следует отметить, что именно в этих условиях наблюдался менее эффективный рост клеток (рис. 14 А), который согласуется с более

высокими уровнями внутриклеточного свободного аргинина (рис. 15 Б). Можно предположить, что накопление внутриклеточного аргинина из-за снижения синтеза белков блокировало активность фермента, как было установлено в экспериментах *in vitro* (рис. 9).

Однако при 2,5 М NaCl уровни свободного аргинина достоверно не отличались от роста при 1,5 М NaCl. Возможно, что это связано с использованием аминокислоты для синтеза белков, вовлеченных в процессы адаптации, а не роста/деления в этих условиях.

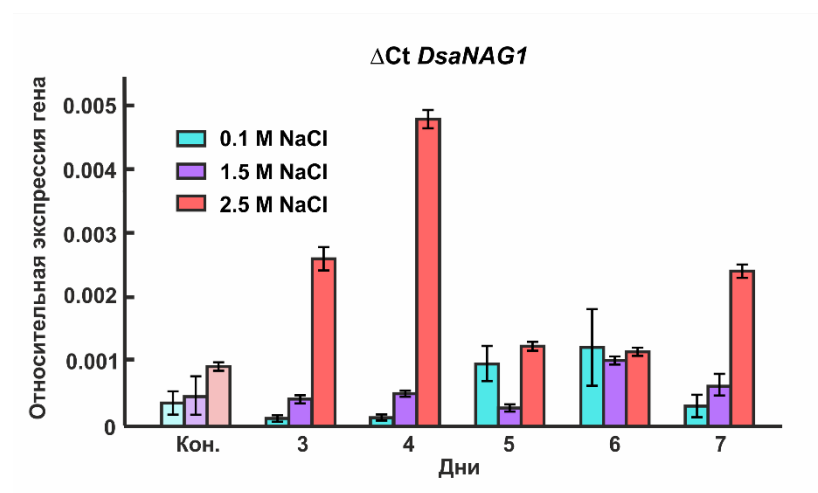


**Рис. 15.** Активность NAGK (А) и концентрация аргинина (Б) у *D. salina* на среде с мочевиной при разных концентрациях соли.

Чтобы дополнительно определить механизмы, контролирующие NAGK, нами был проведен сравнительный анализ уровней экспрессии гена *NAG1*, кодирующего этот фермент, методом ПЦР в режиме реального времени в клетках, находящихся в средах с разными концентрациями соли (рис. 16). Уровень экспрессии гена *NAG1* в условиях среды с 1,5 М NaCl демонстрировал незначительную индукцию, достигая максимума, в 2 раза превышающего контроль, на 6 сутки наблюдения. Подобная динамика наблюдалась и для клеток, выращенных при 0,1 М NaCl. В случае 2,5 М NaCl были зафиксированы более

значимые изменения уровня экспрессии *NAG1*. Так, уже на 3 сутки культивирования количество транскриптов почти в 3 раза превысило исходное, а через 4 суток достигло своего максимума, превосходя контроль в 5 раз. При этом нам не удалось зафиксировать четкой зависимости между изменением транскрипции гена *NAG1* и активностью кодируемой им NAGK.

Исходя из полученных данных мы предполагаем, что действие солености среды на N-ацетил-L-глутаматкиназу галофильной водоросли *D. salina* происходит не только на транскрипционном, но также на посттранскрипционном уровне.

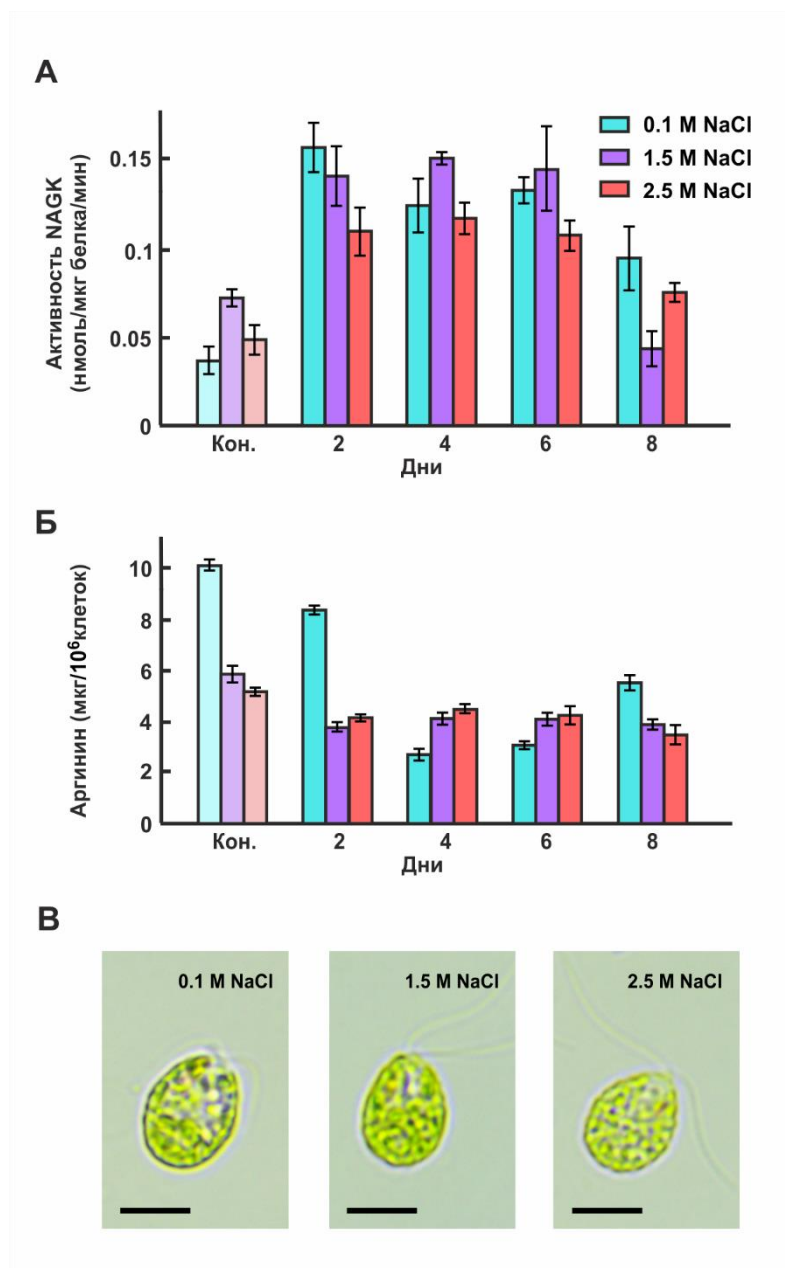


**Рис. 16.** Относительная экспрессия гена *NAG1* в клетках *D. salina* при разных концентрациях NaCl.

### 3.3.3. Активность и экспрессия *DsaNAGK* в условиях голодания по азоту

Поскольку удаление азота из среды является одним из факторов, стимулирующих синтез каротиноидов, нас интересовало, как в условиях голодания будет контролироваться синтез аргинина, аминокислоты, которая необходима для синтеза в стрессовых условиях дополнительно таких защитно-адаптивных молекул как пролин и путресцин. Неожиданным оказалось то, что в клетках, голодающих по азоту, происходило значительное увеличение активности фермента (рис. 17 Б). При этом наибольший эффект наблюдался в случае среды с 0,1 М NaCl: уже на 2 сутки после перевода клеток со среды, содержащей мочевины, на среду без источника азота активность *DsaNAGK* увеличилась в 4,3 раза, после чего стала постепенно снижаться до уровня, в 2,6 раза превышающего контроль (8 сутки эксперимента). При более высоких концентрациях соли – 1,5 М и 2,5 М NaCl – активность фермента возрастала в меньшей степени и достигала максимума на 4 сутки пребывания в

безазотной среде. При этом в обоих случаях активность *DsaNAGK* достигла уровня, в 2-2,3 раза превышающего контроль.



**Рис. 17.** Активность NAGK (А) и концентрация аргинина (Б) в условиях голодания по источнику азота. На панели (В) приведены фотографии клеток через 4 суток голодания в средах с указанными концентрациями NaCl. Масштабная линейка: 10 мкм.

Следует отметить, что исходные уровни активности фермента в клетках после 4 суток роста при разных концентрациях NaCl на среде с мочевиной несколько различались (рис. 15 А; рис. 17 А). Для клеток, выращенных в среде с 0,1 М и 2,5 М NaCl, значения

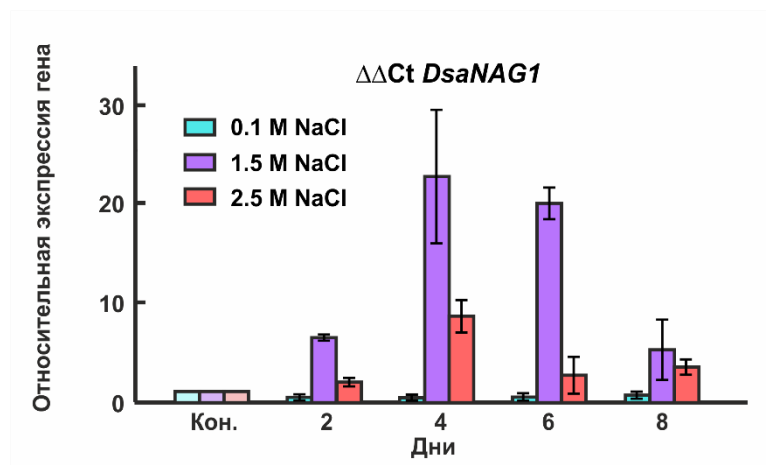
оказались довольно близкими, но при этом почти в 2 раза были ниже активности, установленной в контроле для 1,5 М NaCl.

Другая ситуация наблюдалась при сравнении уровней свободного аргинина: концентрация этой аминокислоты в контроле (до перевода на среду без источника азота) при 0,1 М NaCl была примерно в 1,8 раза выше, чем при 1,5 М и 2,5 М NaCl (рис. 17 Б). Однако динамика изменения уровня аргинина во всех случаях была сходной – количество свободной аминокислоты в клетках на протяжении всего эксперимента было несколько ниже контрольных значений, хотя изменения в случаях 1,5 М и 2,5 М NaCl были не очень значительными. Наиболее заметное падение уровня зафиксировано для клеток, находившихся в среде с 0,1 М NaCl. В этом случае минимальная концентрация аргинина наблюдалась на 4 сутки пребывания в среде без азота, при этом она была в 3,7 раза ниже контрольного значения.

То, что уровни свободного аргинина оставались низкими в клетках, инкубировавшихся при разном содержании соли в среде, по-видимому, указывает на вовлечение синтезированной аминокислоты в синтез белков, необходимых для адаптации к условиям голодания, и/или для синтеза защитных молекул (путресцина и/или пролина).

Заметно также, что при переносе клеток на среду без источника азота меняется их морфология. Так, хотя размер клеток во всех случаях остался неизменным, при концентрации соли 1,5 М клетки *D. salina* приобрели более округлую форму, близкую к вариантам 0,1 М и 2,5 М (рис. 17 В). При этом во всех случаях голодания по азоту наблюдалось изменение окраски клеток с ярко-зеленой на более желтоватую, при этом она была гораздо менее равномерной, чем при росте на полной среде (рис. 14 Б).

Анализ экспрессии гена *NAG1* в условиях голодания по азоту показал, что его индукция происходит только при концентрациях соли, равных 1,5 М и 2,5 М NaCl, достигая максимума в обоих случаях на 4 сутки (рис. 18). При этом количество транскриптов гена *NAG1* в клетках на среде с 1,5 М NaCl более чем в 20 раз превысило контроль, а в случае 2,5 М NaCl – в 8 раз.



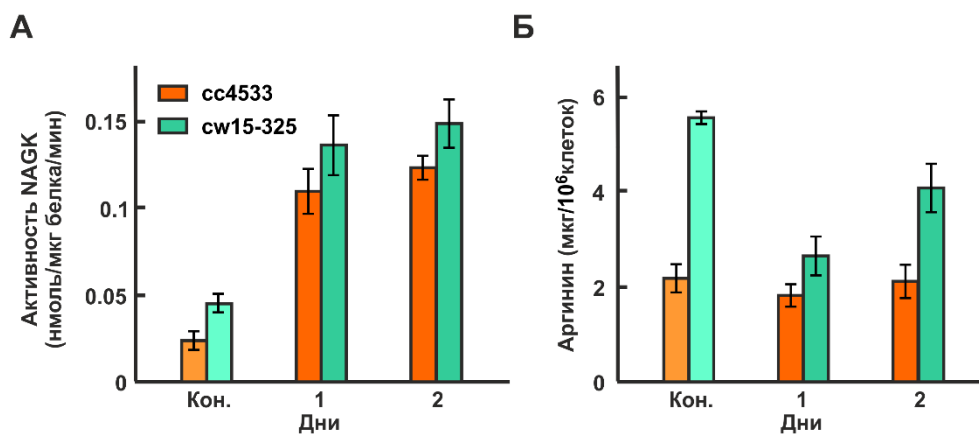
**Рис. 18.** Относительная экспрессия гена *NAG1* в клетках *D. salina* в условиях голодания по азоту при разных концентрациях NaCl.

Таким образом, при 0,1 М NaCl наблюдалось четырехкратное возрастание активности фермента, тогда как индукции кодирующего его гена не происходило. Количество транскриптов гена *NAG1* в условиях 1,5 М NaCl и 2,5 М NaCl возрастало несколько медленнее, чем происходило увеличение активности *DsaNAGK*, однако в обоих случаях максимум (превышение исходного уровня активности в 2 и 2,3 раза (рис. 17 А)) достигался на 4 сутки голодания по азоту. Это указывает на то, что синтез и/или активность фермента в значительной степени контролируется на посттранскрипционном уровне.

### 3.3.4. Активность и экспрессия *CrNAGK* в условиях голодания по азоту

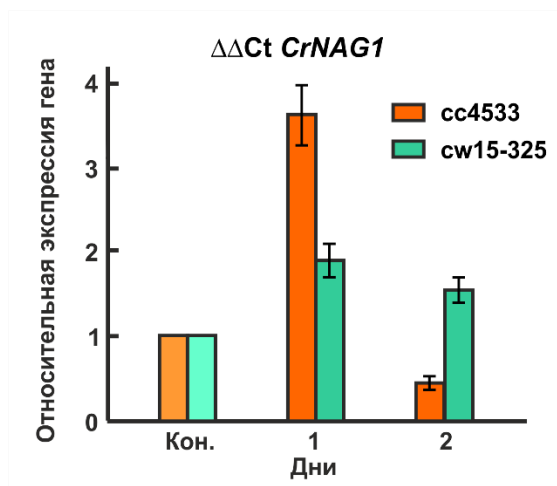
Возник вопрос, характерно ли выявленное нами увеличение активности *NAGK* в условиях голодания по азоту только для *D. salina* или также для других зеленых водорослей. Для выяснения этого вопроса мы проанализировали активность и экспрессию фермента у двух штаммов близкородственной одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* – СС4533 и cw15-325.

Как видно из представленных данных, активность *CrNAGK* возрастала в условиях голодания по азоту у обоих штаммов (рис. 19 А). Так, на 2 сутки активность фермента в 5,6 раз и 3,3 раза превысила контрольные значения для СС4533 и cw15-325 соответственно. Определение уровня свободного аргинина в клетках показало, что у штамма cw15-325 при переводе на среду без источника азота происходит снижение концентрации этой аминокислоты, тогда как у СС4533 она остается практически неизменной (рис. 19 Б). Последнее обстоятельство может быть связано с тем, что cw15-325 является ауксотрофом по аргинину, тогда как СС4533 – прототроф.



**Рис. 19.** Активность NAGK (А) и концентрация аргинина (Б) у штаммов *C. reinhardtii* CC4533 и cw15-325 в условиях голодания по азоту.

При этом экспрессия гена *NAG1* у обоих исследуемых штаммов *C. reinhardtii* при переносе клеток на среду без источника азота возрастала уже через сутки, после чего снижалась (рис. 7). Из рис. 20 также видно, что изменения количества транскриптов у штамма cw15-325 более значительны, при этом быстрая активация гена *NAG1* – через 1 сутки – соответствует значительному увеличению активности CrNAGK, зафиксированному в тот же период (рис. 19 А). Однако на 2 сутки голодания по азоту экспрессия *NAG1* резко снижается, при том, что активность фермента остается высокой.



**Рис. 20.** Относительная экспрессия гена *NAG1* у штаммов *C. reinhardtii* CC4533 и cw15-325 в условиях голодания по азоту.

Таким образом, выявленное увеличение активности фермента, по-видимому, является одним из механизмов адаптации к отсутствию азота.



## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

N-ацетил-L-глутаматкиназы (NAGK) представляют собой консервативные мишени РII-белков фотосинтезирующих эукариот и цианобактерий, что определяет сходство их структуры и кинетических параметров. Наше исследование *in vitro* показало, что биохимические свойства *DsaNAGK* во многом сходны с ранее исследованными NAGK других представителей Chloroplastida. Так, например, значение  $K_m$  (NAG) для *DsaNAGK*, равное  $1,65 \pm 0,27$  mM, оказалось сопоставимым с  $K_m$  *CvNAGK* (1,5 mM). При этом для некоторых других представителей зеленых водорослей, в частности *P. parva* и *C. reinhardtii*, характерны значения  $K_m$ , превышающие таковые для *DsaNAGK*, в частности  $K_m$  (NAG) *PpaNAGK* и  $K_m$  (NAG) *CrNAGK* в 1,4 и в 5 раз выше соответственно (Selim et al., 2020; Chellamuthu et al., 2014).

При этом следует отметить, что значение  $K_{cat}$  для *DsaNAGK* ( $11,1 \pm 0,18$  с<sup>-1</sup>) оказалось в разы ниже, чем для NAGK других зеленых водорослей. Так, эта кинетическая константа для *CvNAGK* превышает показатели *DsaNAGK* в 3 раза, для *CrNAGK* – в 5 раз, а для *PpaNAGK* – в 19 раз (Selim et al., 2020; Chellamuthu et al., 2014). Однако данная величина сопоставима с  $K_{cat}$ , определенной для NAGK цианобактерии *Synechococcus elongatus* (*SeNAGK*), которая составляет  $13$  с<sup>-1</sup> (Beez et al., 2009). Поскольку такой параметр, как  $K_{cat}$ , называемый также числом оборотов фермента, определяет, сколько молекул субстрата за единицу времени может вовлечь в превращение фермент, можно предположить, что *DsaNAGK* работает медленнее остальных принимаемых в рассмотрение N-ацетил-L-глутаматкиназ зеленых водорослей, но сопоставимо с бактериальным.

Сравнение вышеуказанных кинетических параметров у разных представителей зеленых водорослей позволяет предположить, что *CrNAGK*, обладающая наибольшим  $K_m$  среди всех рассматриваемых представителей, имеет наименьшую чувствительность к субстрату, а *PpaNAGK*, обладающая самым высоким значением  $K_{cat}$ , обеспечивает наиболее высокую скорость протекания реакции.

Данные, которые мы получили при изучении влияния аргинина на активность *DsaNAGK in vitro*, полностью согласуются с хорошо известным фактом о том, что этот конечный продукт реакции по отрицательной обратной связи ингибирует фермент (Beez et al. 2009). Как нами было установлено, для *DsaNAGK* половина максимальной ингибирующей концентрации аргинина равнялась  $0,22 \pm 0,06$  mM, что является промежуточным значением между *CrNAGK* и *CvNAGK*. Это позволяет *DsaNAGK* и

*Cv*NAGK быть менее чувствительными к увеличению уровня внутриклеточного аргинина, чем *Cr*NAGK.

При этом мы зафиксировали способность *Cr*PII взаимодействовать с *Dsa*NAGK и облегчать ингибирование аргинином в присутствии глутамина. Тот факт, что *Cr*PII снимал ингибирование *Dsa*NAGK аргинином только в присутствии глутамина, не оказался неожиданным в связи с тем, что связывание глутамина, характерное для большинства представителей *Chloroplastida*, определяется наличием в PII-белке консервативного C-концевого участка, включающего Q-петлю. Биоинформационный анализ аминокислотных последовательностей белков PII подтвердил, что эта структура характерна как для *Cr*PII, так и для *Dsa*PII, а это предполагает Gln-зависимое взаимодействие *Cr*PII с *Dsa*NAGK, которое мы и наблюдали.

Кинетика взаимодействия *Dsa*NAGK с *Cr*PII в присутствии 2-OG позволила заключить, что эта эффекторная молекула блокирует способность PII-белка снимать ингибирование аргинином. Эта особенность также, как и эффект глутамина, по-видимому, определяется тем, что во взаимодействие с *Dsa*NAGK мы брали PII *C. reinhardtii*, для которого она была показана в более ранних исследованиях (Chellamuthu et al., 2014). При сравнении влияния 2-OG на активность *Dsa*NAGK со значениями, определенными для NAGK других эукариотических организмов, можно заключить, что IC<sub>50</sub> для *Dsa*NAGK, равное  $0,9 \pm 0,039$  мМ, значительно превышает IC<sub>50</sub> для *At*NAGK и *Cv*NAGK (IC<sub>50</sub> 0,036 мМ и 0,23 мМ соответственно), но сопоставимо с показателем, характерным для *Cr*NAGK (IC<sub>50</sub> 1,2 мМ) (Beez et al., 2009; Chellamuthu et al., 2014). Эти наблюдения позволяют охарактеризовать индивидуальную способность PII-белков разных организмов формировать комплекс со своими мишенями – NAGK. Соответственно, близость значений IC<sub>50</sub>, полученных для *Dsa*NAGK и *Cr*NAGK, возможно связано с тем, что в нашем исследовании мы рассматривали действие *Cr*PII на активность *Dsa*NAGK. Примечательно, что взаимодействие PII-белков с NAGK не всегда зависит от наличия 2-OG. Так, в работе Selim et al. (2020) для одноклеточной зеленой водоросли *P. parva* было показано, что добавление 2-OG к реакционной смеси, содержащей комплекс *Ppa*PII-*Ppa*NAGK в присутствии 5 мМ глутамина и 0,5 мМ аргинина не приводило к снижению активности *Ppa*NAGK. Это является еще одним подтверждением того, что не все PII-белки теряют свою способность взаимодействовать с NAGK в присутствии 2-OG.

Кинетические параметры *Dsa*NAGK, установленные в рамках данной работы требуют дальнейшей проверки в условиях взаимодействия с собственным PII-белком (*Dsa*PII). Это позволит оценить, отличается ли и, если да, то насколько, эффект разных, хоть

и очень близких по структуре, РII-белков на активности *DsaNAGK*. Кроме того, продолжив исследование в этом направлении, мы сможем установить, зависит ли образование комплекса *DsaNAGK-DsaPII* от глутамина и 2-OG.

Выполненная нами оценка активности N-ацетил-L-глутаматкиназы *in vivo* у зеленых водорослей показала, что этот фермент оказывается задействован в клеточный ответ на голодание по азоту. К такому предположению приводят данные о кратном увеличении активности *DsaNAGK* и *CrNAGK*, а также индукция гена *NAG1* при переносе на среду без источника азота, что ранее никем не было показано. Важно отметить, что в случае культур *D. salina* активность в контрольных вариантах, а также уровни аргинина зависели от концентрации соли в питательной среде. Так, наиболее высокие уровни аргинина наблюдались на среде с 0,1 М NaCl, что сочеталось с менее высокими уровнями активности *DsaNAGK* в сравнении с другими концентрациями. Возможно, это объясняется менее интенсивными процессами синтеза белков в клетках в данных условиях.

Известно, что количество и активность белков в клетках могут регулироваться как на транскрипционном, так и посттранскрипционном уровнях. Мы проанализировали возможность регуляции активности *DsaNAGK* на уровне транскрипции кодирующего ее гена *NAG1*. Так, несмотря на увеличение активности фермента при переводе на среду без источника азота при всех исследованных нами концентрациях соли (0,1 М, 1,5 М, 2,5 М), индукцию гена *NAG1* удалось зафиксировать только в условиях 1,5 М и 2,5 М соли. При этом максимум индукции по времени соответствовал наибольшему уровню активности *DsaNAGK* и приходился на 4 сутки голодания по азоту. Тот факт, что увеличение уровня экспрессии гена не оказалось универсальным для всех трех вариантов, позволяет предположить наличие посттранскрипционного уровня регуляции *DsaNAGK*, который мы планируем изучить в дальнейшем.

Также мы показали, что установленный феномен активации *DsaNAGK* в условиях голодания по азоту не является специфичным только для *D. salina*. Данные, полученные на штаммах СС4533 и cw15-325 *C. reinhardtii*, первый из которых является прототрофным, а второй ауксотрофным по аргинину, подтверждают возрастание активности *CrNAGK* в аналогичных условиях. При этом при сходной динамике роста активности фермента наблюдаются различия в концентрации внутриклеточного аргинина, что может быть обусловлено имеющимися у штаммов различиями в потребности в этой аминокислоте.

Для *C. reinhardtii* также была выявлена индукция гена *CrNAG1* при переводе на среду без источника азота, при этом паттерны роста количества транскриптов у разных

штаммов различались, что также может свидетельствовать о наличии посттранскрипционной регуляции.

Поскольку аргинин, ключевым ферментом в биосинтезе которого являются N-ацетил-L-глутаматкиназы, в стрессовых условиях, к которым можно отнести и голодание по азоту, выступает предшественником для синтеза таких защитно-адаптивных молекул, как пролин и путресцин, возникает вопрос, изменяются ли уровни пролина и/или путресцина в клетках при помещении в среду без азота. В связи с этим еще одной задачей, которую нам предстоит решить в рамках углубления данной работы, будет анализ уровней пролина и путресцина в клетках *D. salina* и *C. reinhardtii*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ свойств и механизмов регуляции ключевого фермента биосинтеза аргинина N-ацетил-L-глутаматкиназы у галофильной одноклеточной зеленой водоросли *D. salina* позволил прийти к следующему заключению.

Впервые для представителей галофильных одноклеточных фотосинтезирующих эукариотических микроорганизмов охарактеризован белок из консервативного семейства ферментов, вовлеченных в синтез аргинина, и установлено, что *DsaNAGK* ингибируется аргинином по принципу обратной связи, а значит относится к аргинин-чувствительным N-ацетил-L-глутаматкиназам. Сравнение каталитической активности *DsaNAGK* с другими одноклеточными зелеными водорослями позволяет говорить о сходных ферментативных возможностях, а имеющиеся отличия, вероятнее всего, отражают особенности метаболизма разных представителей.

Полученные данные подтверждают высказанную ранее в нашей лаборатории идею о том, что на протяжении всей эволюции фототрофов с оксигенным типом фотосинтеза – от цианобактерий до Archaeplastida – N-ацетил-L-глутаматкиназа является наиболее консервативной клеточной мишенью РII-белков.

Кроме того, нами установлено, что *DsaNAGK* регулируется на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях, и голодание по источнику азота приводит к увеличению активности фермента. Последнее обстоятельство, по нашему мнению, может отражать общую стратегию в адаптации одноклеточных зеленых водорослей, поскольку данный феномен выявлен нами также для *Chlamydomonas reinhardtii*. Дальнейшие исследования с привлечением дополнительных объектов позволят подтвердить или опровергнуть наше предположение.

## ВЫВОДЫ

1. *DsaNAGK* относится к аргинин-чувствительным N-ацетил-L-глутаматкиназам и ингибируется аргинином по принципу обратной связи.
2. N-ацетил-L-глутаматкиназа *D. salina* является мишенью для РII-белка; CrPII регулируют активность *DsaNAGK* по глутамин-зависимому механизму.
3. *DsaNAGK* регулируется на транскрипционном и посттранскрипционном уровне; *D. salina* демонстрирует максимальную активность NAGK в среде с оптимальным для роста клеток содержанием соли – 1,5 М NaCl.
4. В условиях голодания по азоту происходит увеличение активности *DsaNAGK*, которое фиксируется в клетках, инкубированных в средах с различным содержанием соли (от 0,1 М до 2,5 М NaCl).
5. Активация N-ацетил-L-глутаматкиназы в условиях голодания по азоту характерна не только для *D. salina*, но и для пресноводной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую признательность своему научному руководителю, д.б.н., профессору Ермиловой Елене Викторовне за наставничество, помощь и неременную поддержку в процессе выполнения и написания выпускной квалификационной работы. Также выражаю благодарность старшим научным сотрудникам лаборатории Адаптации микроорганизмов: к.б.н., Лапиной Татьяне Викторовне и к.б.н., Залуцкой Жанне Михайловне за помощь и сопровождение в ходе экспериментальной части работы. Благодарю сотрудников кафедры микробиологии СПбГУ во главе с заведующим кафедры Александром Васильевичем Пиневичем. Выражаю большую благодарность в. н. с., к. б. н., руководителю отдела Биотехнологий и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ А. Б. Боровкову и профессору Михаэлю Шроде из Технического университета г. Кайзерслаутерна за предоставленные для работы штаммы микроорганизмов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arcondéguy T. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control / Arcondéguy T., Jack R., Merrick M. // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2001. – Vol. 65(1). – P. 80–105.
2. Beez S. N-Acetyl-L-glutamate kinase (NAGK) from oxygenic phototrophs: PII signal transduction across domains of life reveals novel insights in NAGK control / Fokina O., Herrmann C., Forchhammer K. // *J Mol Biol.* – 2009. – Vol. 389. – P. 748–758.
3. Beyer H. M. AQUA Cloning: A Versatile and Simple Enzyme-Free Cloning Approach / Beyer H. M., Gonschorek P., Samodelov S. L. [et al.] // *PLOS ONE.* – 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0137652.
4. Burnat M. Compartmentalized cyanophycin metabolism in the diazotrophic filaments of a heterocyst-forming cyanobacterium / Burnat M., Herrero A., Flores E. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2014. – Vol. 111(10). – P. 3823–3828.
5. Chellamuthu V. R. A widespread glutamine-sensing mechanism in the plant kingdom / Chellamuthu V. R., Ermilova E., Lapina T. // *Cell.* – 2014. – Vol. 159. – P. 1188–1199.
6. Chellamuthu V. R. From cyanobacteria to plants: conservation of PII functions during plastid evolution / Chellamuthu V. R., Alva V., Forchhammer K. // *Planta.* – 2013. – Vol. 237. – P. 451–462.
7. D'Apuzzo E. PII overexpression in *Lotus japonicus* affects nodule activity in permissive low-nitrogen conditions and increases nodule numbers in high nitrogen treated plants / D'Apuzzo E., Valkov V. T., Parlati A. [et al.] // *Molecular Plant–Microbe Interactions.* – 2015. – Vol. 28. – P. 432–442.
8. Drath M. Ammonia triggers photodamage of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC 6803 / Drath M., Kloft N., Batschauer A. [et al.] // *Plant Physiol.* – 2008. – Vol. 147(1). – P. 206–215.
9. Ermilova E. PII signal transduction protein in *Chlamydomonas reinhardtii*: localization and expression pattern / Ermilova E., Lapina T., Zalutskaya Z. // *Protist.* – 2013. – Vol. 164. – P. 49–59.
10. Espinosa J. Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PipX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarate dependent manner with PII and NtcA / Espinosa J., Forchhammer K., Burillo S., Contreras A. // *Mol. Microbiol.* – 2006. – Vol. 61 – P. 457–469. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05231.x.



11. Feria-Bourrellier A. B. Chloroplast acetyl-CoA carboxylase activity is 2-oxoglutarate-regulated by interaction of PII with the biotin carboxyl carrier subunit / Feria-Bourrellier A. B., Valot B., Guillot A. [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. – 2010. – Vol. 107. – P. 502–507.
12. Feria-Bourrellier A. B. Metabolite regulation of the interaction between *Arabidopsis thaliana* PII and N-acetyl-l-glutamate kinase / Feria-Bourrellier A. B., Ferrario-Méry S., Vidal J., Hodges M. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2009. – Vol.387. – P. 700–704.
13. Flores E. Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria / Flores E., Frías J. E., Rubio L. M., Herrero A. // *Photosynth Res*. – 2005. – Vol. 83(2). – P. 117–133.
14. Fokina O. Mechanism of 2-oxoglutarate signaling by the *Synechococcus elongatus* PII signal transduction protein / Fokina O., Chellamuthu V. R., Forchhammer K., Zeth K. // *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. – 2010. – Vol. 107. – P. 19760–19765.
15. Fokina O. Signal-transduction protein P(II) from *Synechococcus elongatus* PCC 7942 senses low adenylate energy charge in vitro / Fokina O., Herrmann C., Forchhammer K. // *Biochem J*. – 2011. – Vol. 440(1). – P. 147–156.
16. Forcada-Nadal A. The P(II)-NAGK-PipX-NtcA Regulatory Axis of Cyanobacteria: A Tale of Changing Partners, Allosteric Effectors and Non-covalent Interactions / Forcada-Nadal A., Llácer J. L., Contreras A. [et al.] // *Front Mol Biosci*. – 2018. – Vol. 5. – P. 91.
17. Forchhammer K. Carbon/nitrogen homeostasis control in cyanobacteria/ Forchhammer K., Selim K. A. // *FEMS Microbiol Rev*. – 2020. – Vol. 44(1). – P. 33–53.
18. Forchhammer K. Global carbon/nitrogen control by PII signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets // *FEMS Microbiol Rev*. – 2004. – Vol. 28(3). – P. 319–333.
19. Forchhammer K. Functional analysis of the phosphoprotein PII (glnB gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 / Forchhammer K., Tandeau de Marsac N. // *J Bacteriol*. – 1995. – Vol. 177(8). – P. 2033–2040.
20. Forchhammer K. Sensory properties of the PII signalling protein family / Forchhammer K., Lüddecke J. // *FEBS J*. – 2016. – Vol. 283. – P. 425–437. doi: 10.1111/febs.13584.
21. Haas D. N-Acetylglutamate 5-phosphotransferase of *Pseudomonas aeruginosa* / Haas D., Leisinger T. // *Eur J Biochem*. – 1975 – Vol. 52. – P. 365–375.

22. Hauf, W. Regulation of carbon polymer accumulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Dissertation of the University of Tübingen. – 2016. doi: 10.15496/publikation-14642.
23. Herrero A. Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria / Herrero A., Muro-Pastor A. M., Valladares A., Flores E. // *FEMS Microbiol Rev.* – 2004. – Vol. 28(4). – P. 469–487.
24. Herrero A. Nitrogen control in cyanobacteria / Herrero A., Muro-Pastor A. M., Flores E. // *J Bacteriol.* – 2001. – Vol. 183(2). – P. 411–425.
25. Polle J. E. W. Genomic adaptations of the green alga *Dunaliella salina* to life under high salinity / Polle J. E. W., Calhoun S., McKie-Krisberg Z. [et al.] // *Algal Research.* – 2020. – Vol. 50. – pp. 101990.
26. Kodama Y. Cell division and density of symbiotic *Chlorella variabilis* of the ciliate *Paramecium bursaria* is controlled by the host's nutritional conditions during early infection process / Kodama Y., Fujishima M. // *Environmental Microbiology.* – 2012. – Vol. 14. – P. 2800–2811.
27. Kodama Y. Symbiotic *Chlorella variabilis* incubated under constant dark conditions for 24 hours loses the ability to avoid digestion by host lysosomal enzymes in digestive vacuoles of host ciliate *Paramecium bursaria* / Kodama Y., Fujishima M. // *FEMS Microbiology Ecology.* – 2014. – Vol. 90. – P. 946–955.
28. Labella J. I. Expanding the Cyanobacterial Nitrogen Regulatory Network: The GntR-Like Regulator PlmA Interacts with the PII-PipX Complex / Labella J. I., Obrebska A., Espinosa J. [et al.] // *Front Microbiol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 1677.
29. Livak K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta$ CT method / Livak K. J., Schmittgen T. D. // *Methods.* – 2001. – Vol. 25. – P. 402–408.
30. Llácer J. L. Structural basis for the regulation of NtcA-dependent transcription by proteins PipX and PII / Llácer J. L., Espinosa J., Castells M. A. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – Vol. 107. – P. 15397–15402. doi: 10.1073/pnas.1007015107.
31. Llácer J.L. The crystal structure of the complex of PII and acetylglutamate kinase reveals how PII controls the storage of nitrogen as arginine / Llácer J. L., Contreras A., Forchhammer K. [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2007. – Vol. 104(45) – P. 17644–17649.

32. Maheswaran M. Complex Formation and Catalytic Activation by the PII Signaling Protein of N-Acetyl-l-glutamate Kinase from *Synechococcus elongatus* Strain PCC 7942 / Maheswaran M., Urbanke C., Forchhammer K. // *Enzyme Catalysis and Regulation*. – 2004. – Vol. 279(53). – P. 55202–55210.
33. Minaeva E. Responses triggered in chloroplast of *Chlorella variabilis* NC64A by long-term association with *Paramecium bursaria* / Minaeva E., Ermilova E. // *Protoplasma*. – 2017. – Vol. 254. – P. 1769–1776.
34. Ninfa A. J. PII signal transduction proteins: sensors of alpha-ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism / Ninfa A. J., Jiang P. // *Curr Opin Microbiol*. – 2005. – Vol. 8(2). – P. 168–173.
35. Polle J. E. W. Genomic adaptations of the green alga *Dunaliella salina* to life under high salinity / Polle J. E. W., Calhoun S., McKie-Krisberg Z. [et al.] // *Algal Research*. – 2020. – Vol. 50. – pp. 101990.
36. Popov N. Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates / Popov N., Schmitt M., Schulzeck S. [et al.] // *Acta Biol Med Ger*. – 1975. – Vol. 34. – P. 1441–1446.
37. Ramaraj S. Modified medium for enhanced growth of *Dunaliella* strains / Ramaraj S., Niran J. // *INT J CURR SCI*. – 2013. – Vol. 5. – P. 67–73.
38. Sager R. Nutritional control of sexuality in *Chlamydomonas reinhardtii* / Sager R., Granick S. // *J Gen Physiol*. – 1954. – Vol. 37(6). – P. 729–742.
39. Sakaguchi S. A new method for the colorimetric determination of arginine / Sakaguchi S. // *J Biochem*. – 1950. – Vol. 37. – P. 231–236.
40. Scholl J. Phosphoenolpyruvate carboxylase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is under global metabolic control by PII signaling / Scholl J., Dengler L., Bader L., Forchhammer K. // *Molecular Microbiology*. – 2020. – Vol. 114(2). – P. 292–307.
41. Selim K. A. From cyanobacteria to Archaeplastida: new evolutionary insights into PII signalling in the plant kingdom / Selim K. A., Ermilova E., Forchhammer K. // *New Phytologist*. – 2020. doi: 10.1111/nph.16492.
42. Selim K. A. Interaction of N-acetyl-l-glutamate kinase with the PII signal transducer in the non-photosynthetic alga *Polytomella parva*: Co-evolution towards a hetero-oligomeric

- enzyme / Selim K. A., Lapina T., Forchhammer K., Ermilova E. // FEBS Journal. – 2020. – Vol. 287. – P. 465–482.
43. Shapiro BM. The glutamine synthetase deadenylylating enzyme system from *Escherichia coli*. Resolution into two components, specific nucleotide stimulation, and cofactor requirements // *Biochemistry*. – 1969. – Vol. 8(2). – P. 659–70.
  44. Simon R. D. Structure and composition of cyanophycin granules in the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6308 // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1971. – Vol. 68(2). – P. 265–267.
  45. Tanigawa R. Transcriptional activation of NtcA-dependent promoters of *Synechococcus* sp. PCC 7942 by 2-oxoglutarate in vitro / Tanigawa R., Shirokane M., Maeda Si S. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. – Vol 99. – P. 4251–4255. doi: 10.1073/pnas.072587199.
  46. Uhrig R. G. PII in higher plants: a modern role for an ancient protein / Uhrig R. G., Ng K. K., Moorhead G. B. // *Trends Plant Sci*. – 2009. – Vol. 14(9). – P. 505–511.
  47. Watzer B. Cyanophycin Synthesis Optimizes Nitrogen Utilization in the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 / Watzer B., Forchhammer K. // *Appl Environ Microbiol*. – 2018. – Vol. 84(20).
  48. Watzer B. The Signal Transduction Protein P(II) Controls Ammonium, Nitrate and Urea Uptake in Cyanobacteria / Watzer B., Spät P., Neumann N. [et al.] // *Front Microbiol*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1428.
  49. Zeth K. Structural basis and target-specific modulation of ADP sensing by the *Synechococcus elongatus* PII signaling protein / Zeth K., Fokina O., Forchhammer K. // *J. Biol. Chem*. – 2014. – Vol. 289. – P. 8960–8972. doi: 10.1074/jbc.M113.536557.
  50. Zhang Y. PII is important in regulation of nitrogen metabolism but not required for heterocyst formation in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 / Zhang Y., Pu H., Wang Q. [et al.] // *J Biol Chem*. – 2007. – Vol. 282(46). – P. 33641–33648.