

СЕРИН-ТРЕОНИНОВЫЕ ПРОТЕИНКИНАЗЫ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

© 2025 г. А. А. ЗОРИНА^{1*}, Д. А. ЛОСЬ¹, О. И. КЛЫЧНИКОВ^{1,2}

¹ Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН,

² Кафедра биохимии, Биологический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

I. Введение. II. Стратегии изучения серин-треониновых протеинкиназ цианобактерий. III. Исследования СТПК цианобактерий на примерах отдельных белков. IV. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Фосфорилирование у бактерий – важный регуляторный механизм адаптации к изменяющимся условиям: участвует в восприятии сигналов, его усилении и клеточном ответе на разные виды стресса, регулирует репликацию ДНК, формирование биопленок, включая адгезию к субстрату, выключение механизмов защиты хозяина и многое другое. В клетках цианобактерий фосфорилирование задействовано в регуляции таких жизненно важных биохимических процессов, как фотосинтез [1], фиксация CO₂ и усвоение азота [2–4], регуляция биосинтеза липидов [5], подвижность клеток [6] и адаптация к холодному стрессу [7].

Фосфорилирование у бактерий гораздо более разнообразно, чем у эукариот. Модификации могут подвергаться следующие аминокислотные остатки: серин (Ser), треонин (Thr), тирозин (Tyr), гистидин (His), аргинин (Arg), лизин (Lys), аспартат (Asp) и цистеин (Cys) [8–10]. У бактерий выделяют несколько типов протеинкиназ – это гистидинкиназы в составе двухкомпонентных систем, бактериальные тирозин киназы

Список сокращений: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; СТПК – серин-треониновые протеинкиназы; ЦТК – цикл трикарбоновых кислот; 2DE – two dimensional gel electrophoresis, двумерный гель-электрофорез; DML – DiMethyl Labeling, диметильное мечение; FASP – Filter-Aided Sample Preparation, расщепление белков на поверхности фильтра; IMAC – Immobilized Metal Affinity Chromatography, металл-аффинная хроматография; iTRAQ – isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation, изобарический тэг (метка) для относительной и абсолютной количественной оценки; LFQ – Label Free Quantification, безметочный количественный анализ; MALDI – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация; МОАС – Metal Oxide Affinity Chromatography, металл-оксидная аффинная хроматография; MS¹ или MS – сканирующий MS; MS² или MS/MS – тандемный MS, фрагментация изолированных пиков; PMF – Peptide Mass Fingerprinting, метод пептидных карт; S/MRM – Single/Multiple Reaction Monitoring, мониторинг заданных реакций; TMT – Tandem Mass Tag, метка тандемной массы.

*Адрес для корреспонденции: tarlonc@yandex.ru

(Bacterial Y-kinase, BY), атипичные сериновые киназы, аргининовые киназы, серин-треониновые протеинкиназы эукариотического типа (СТПК) [9]. У модельных организмов *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* было обнаружено более 2400 и 4400 сайтов фосфорилирования, что соответственно, говорит о сложной и разветвленной сети передачи сигналов [11, 12].

Фосфорилирование разных аминокислот имеет свои особенности: остатки Ser/Thr/Tyr образуют стабильные фосфоэфирные связи, которые позволяют применять стандартные протеомные методы. В противоположность этому, фосфорилирование His/Lys/Arg приводит к образованию термодинамически нестабильных амидофосфатов, которые гидролизуются в процессе пробоподготовки [10]. Этот факт приводит к недооценке фосфорилирования данных аминокислот и требует дальнейшей оптимизации и разработки новых протоколов пробоподготовки и детектирования.

Соотношение фосфорилирования различных аминокислот Ser/Thr/Tyr у разных бактерий примерно следующее: 70–80/10–15/5–10 у *Clostridioides difficile*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, и 40–50/35–40/5–10 у *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes* [13]. В клетках цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803 фосфорилирования Ser/Thr/Tyr имеет соотношение 42/52/6, при этом моно-, ди- и трифосфорилированные пептиды имеют соотношение 90/8/2 [14]. Для *Nostoc flagelliforme* показано примерно такое же соотношение Ser/Thr/Tyr – 56/38/6 и моно-, ди- и трифосфорилированных пептидов – 96/3/1 [15].

II. ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ СЕРИН-ТРЕОНИНОВЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

На сегодняшний день реализовано несколько стратегий изучения протеинкиназ: биоинформатическая, биохимическая, молекулярно-генетическая, физиологическая и протеомная [8].

Первая стратегия – использование биоинформатических методов для классификации и предсказания функций белка и его доменов. Биохимическая стратегия заключается в выделении гомогенного препарата белка с последующим исследованием параметров его активности с использованием «стандартных» (основной белок миеллина, МВР, гистон H1, H1 и казеин, Cas) и потенциальных эндогенных субстратов *in vitro*. Следующие стратегии основаны на получении организмов с измененным уровнем экспрессии гена киназы (сверхэкспрессия или нокаут) или удаления потенциально значимого(ых) домена(ов) в белке с последующим изучением изменений в транскриптоме и физиологии клетки. Последняя, наиболее молодая, протеомная стратегия заключается в установлении взаимосвязи между количеством/активностью киназы и количественными изменениями в протеоме, включая паттерны фосфорилирования. Применение именно этой стратегии позволяет изучать сигнальную сеть киназ (кинома) на уровне всей клетки.

Все перечисленные подходы либо по отдельности, либо в комбинации успешно использовались для исследования СТПК цианобактерий.

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ДОМЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПРОТЕИНКИНАЗ

Стоит отметить, что термин эукариотические или протеинкиназы эукариотического типа в большей степени является отражением исторического процесса обнаружения и исследований описываемых ферментов [16, 17].

На данный момент показано общее эволюционное происхождение СТПК эукариот, бактерий и архей, восходящее к последнему универсальному общему предку (Last Universal Common Ancestor, LUCA) [18–20]. Тирозинкиназы представляют собой более позднюю эволюционную ветвь, образовавшуюся после разделения про- и эукариотических организмов, причем их возникновение и эволюция в этих двух «доменах жизни» шла независимо [21, 22].

Идентификация потенциальных СТПК в разных царствах стала возможной благодаря консервативности каталитического домена [23, 24]. В его составе выделяют три структурные части, выполняющие различные функции: N-концевая доля (lobe) (в основном β -складчатая), большая по размеру C-концевая доля (в основном альфа-спиральная) и промежуточный линкер. Непосредственно каталитический активный центр расположен в глубокой бороздке, образованной двумя долями [25]. Меньшая N-концевая доля участвует в связывании и ориентации молекулы нуклеозидтрифосфата, тогда как C-концевая связывает белковый субстрат и инициирует перенос фосфатной группы [19, 26].

Киназный домен обычно организован в 12 субдоменов, и в его составе выделяют несколько консенсусных мотивов, необходимых для выполнения катализа. Катализ становится возможным после того, как участки связывания нуклеотида, участки связывания магния, участки связывания белка-субстрата и каталитический центр окажутся в «правильной» ориентации. [27]. Кроме того, СТПК обладают дополнительными субдоменами, которые отвечают за регулирование активности или изменение субклеточной локализации фермента [28].

На основании гомологии в геноме цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 аннотированы двенадцать генов потенциальных СТПК, которые подразделяются на две группы (Рис. 1). Первая – это серин-треониновые протеинкиназы N2-подобного типа (PKN2): SpkA, SpkB, SpkC, SpkD, SpkE, SpkF, SpkG [29, 30]. Вторая группа: SpkH, SpkI, SpkJ, SpkK, SpkL [30] имеет несколько названий: ABC1K (киназы, контролирующие активность BC1 комплекса), ADCK (киназы, содержащие домен ABC1) или UbiB-киназы (белок B биосинтеза убихинона) [18]. Наиболее часто употребляемым является ABC1K.

Выравнивание последовательностей протеинкиназ человека и *Synechocystis* sp. показало, что SpkG, SpkH, SpkI, SpkJ, SpkK и SpkL группируются вместе и близки тирозин-подобным протеинкиназам и серин-треониновым протеинкиназам. SpkB, SpkC, SpkD и SpkF образуют одну группу близкую к САМК семейству. SpkA и SpkE стоят особняком от остальных цианобактериальных протеинкиназ и могут быть отнесены к тирозин-подобным и серин-треониновым протеинкиназам соответственно [31].

Стоит отметить, что протеинкиназы PKN2- и ABC1K-типов значительно различаются как по размеру, так и по доменной организации [31, 32]. Белки SpkA-G группы (PKN2) более консервативны в N-, нежели в C-концевой доле, тогда как у представителей группы SpkH-L (ABC1K) центральный регион более консервативен. Такие различия связаны с расположением киназного домена [31, 32].

Независимо от размеров каталитического домена в его составе выделяют несколько консенсусных мотивов, характерных для всех протеинкиназ и необходимых для связывания АТФ и белкового субстрата, а также для выполнения катализа. Наиболее значимыми являются GxGxFGxV, VAVK, HRDx3N, DFG, W/YxAPE и DxWSxС последовательности [28, 33]. В дополнение к этим, основным, у белков ABC1K семейства присутствуют еще семь мотивов (I, II, V, VI, VIIa, IX, X), которые не имеют гомологичных последовательностей в протеинкиназах PKN2 группы. Значение этих мотивов в составе

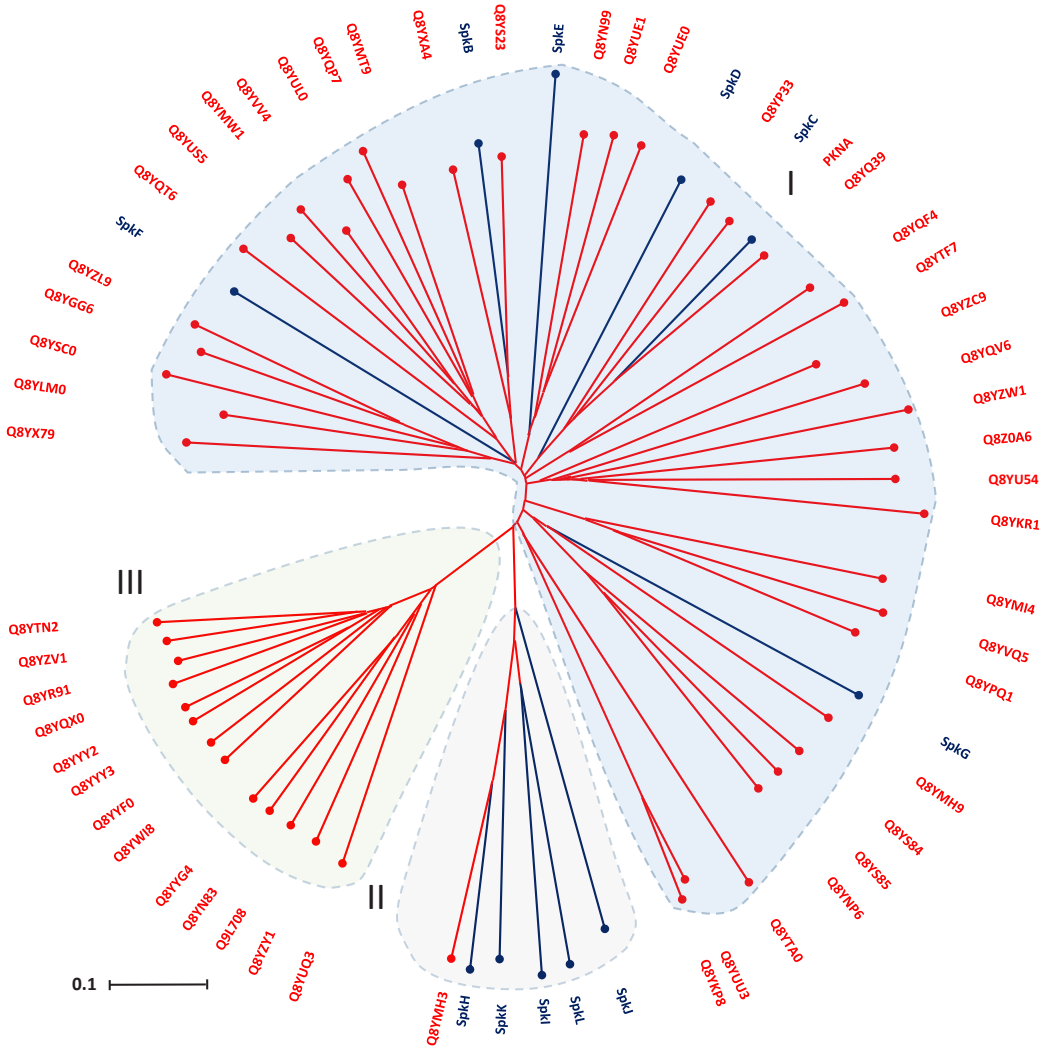


Рис. 1. Филогенетическое дерево серин-треониновых протеинкиназ *Synechocystis* sp. PCC 6803 (выделено синим) и *Nostoc (Anabaena)* sp. PCC 7120 (выделено красным).

I и II – PKN2- и ABC1K-подобные киназы, III – двух-доменные протеинкиназы, несущие серин-треониновый и гистидинкиназный домены.

белков неизвестно и, вероятно, потребует исследований структуры, а также анализа функций с использованием точечных мутаций [18].

К важным структурным параметрам протеинкиназ можно отнести наличие возможных трансмембранных доменов. Их присутствие в последовательности белка может дать информацию о локализации в клетке, а также о потенциальных функциях [34]. Большая часть сведений основана на данных предсказания структур. В одной из первых работ по протеинкиназам цианобактерий [32] среди СТПК PKN2 группы у *Synechocystis* к трансмембранным была отнесена только SpkF. В работе Зориной с соавт. [35] на

основании моделирования в SMART [36] была предсказана доменная организация трех протеинкиназ: SpkF (четыре трансмембранных домена на С-конце), SpkC (один трансмембранный домен) и SpkK (без трансмембранных доменов). На основании этого был предложен каскадный механизм фосфорилирования GroES (SpkF → SpkC → SpkK). В настоящее время на основе моделирования к мембранным СТПК у *Synechocystis* можно отнести SpkA-D, SpkF-I, SpkL [7, 31, 37].

В статье Жанг с соавт. [32] приведена одна из первых классификаций СТПК цианобактерий в зависимости от наличия и количества трансмембранных доменов, положения киназного, а также дополнительных структурно-функциональных доменов. Так, из семи описанных на тот момент протеинкиназ *Synechocystis* пять отнесены к группе ферментов цбСТПК I-другие (cbSTK I-other), характеризующихся размером более 400 аминокислотных остатков с протяженными неидентифицируемыми С- концевыми участками и не содержащими доменов, кроме протеинкиназного.

Присутствие дополнительных доменов характерно для белков группы цбСТПК II (cbSTK II). SpkB имеет два пентапептидных повтора (Pentapeptide Repeat Protein, PRP) [38], SpkD – SH3-подобный домен бактериального типа (src Homology-3) [32], а SpkG – последовательности с повторами WD40/YVTN [31]. Белки, содержащие PRP, очень широко представлены среди цианобактерий [39]. Однако, их потенциальная роль в клетке остается малоизученной, поэтому сложно предположить, какое значение имеет PRP в структуре SpkB. Известно, SH3-подобный домен способен связываться с лигандами, богатыми пролином [40], поэтому можно предположить, что SpkD способна принимать участие в белок–белковых взаимодействиях [41]. Повторяющиеся мотивы WD40 действуют как адаптеры при формировании белковых комплексов или комплексов белок–ДНК, принимая таким образом участие в самых разных клеточных процессах [42].

В ряду всех протеинкиназ *Synechocystis* выделяется SpkE. Вначале SpkE считалась неактивной из-за отсутствия или замены важных для киназной активности аминокислотных остатков в консервативной последовательности DFG, принимающей участие в катализе [43]. Однако позднее, в экспериментах *in vitro* SpkE обнаруживала ферментативную активность по отношению к гистону H1 [7]. При более детальном рассмотрении аминокислотной последовательности SpkE, отличия обнаруживаются не только в DFG сайте, но и в некоторых других: глицин богатый повтор GxGxFG имеет вид GxNxLG, мотив HRDx₃N изменён на HGQx₃N. Такие киназы, имеющие изменения в последовательностях ключевых аминокислот, называются псевдокиназами – белками, которые утратили каноническую фосфотрансферазную функцию. Они, тем не менее, могут играть иные важные роли в клеточной регуляции [44], например, посредством аллостерической регуляции других активных киназ или же выполняя функции скаффолд-белка [45]. Важно отметить, что потеря канонических остатков не всегда делает невозможным связывание нуклеотидов или перенос остатка фосфорной кислоты [46, 47]. Поскольку терминология до сих пор строго не установлена, SpkE может быть отнесена как к атипичным протеинкиназам [19], так и псевдокиназам [45].

В геноме другой цианобактерии *Nostoc*, несущем около 6000 генов, обнаружено 52 гена, кодирующих СТПК [29]. Возможно, количество генов киназ коррелирует с размером генома цианобактерий, а также количеством элементов сигнальных систем. Структура протеинкиназ *Nostoc* отличается более сложным устройством: согласно классификации Жанг с соавт. [32] их можно встретить во всех трех группах. То есть, это и белки, имеющие в своем составе исключительно киназный домен (cbSTK I), белки с разно-

образными дополнительными доменами (PAS, PAC, GAF, ANF, WD40, FHA, GUN4, TPR, DUF323, P_hN1, CHASE2, PRP, RDD и SH3b) (cbSTK II) [48, 49], а также отсутствующая у *Synechocystis* группа cbSTK III [32, 50] (Рис. 1). В состав последней группы входят так называемые протеинкиназы «двойной» специфичности, т.к. они содержат N-концевой СТПК домен и C-концевой гистидинкиназный [32, 50, 51]. Участок, расположенный между этими доменами, также достаточно консервативен и часто содержит GAF- или PAS-мотив, соответствующий возможному воспринимающему домену двухкомпонентных систем. Вероятно, подобные белки обеспечивают взаимодействие двухкомпонентных систем и СТПК в передаче сигнала. Все эти белки большого размера – от 1777 (Alr2258) до 2021 (Alr3691) аминокислотных остатков [50] и встречаются не только у *Nostoc*, но и у большого числа филаментообразующих штаммов.

В цианобактериальной клетке, несмотря на ее достаточно простую организацию, белки можно разделить на несколько субпротеомов [52]: белки цитоплазмы, тилакоидных мембран (ТМ), плазматической (ПМ) и внешней мембран, периплазмы и пептидогликанового слоя [53]. В цитоплазме также выделяют несколько микрокомпарментов таких как карбоксисомы – структур белковой природы, в которых осуществляется фиксация углекислого газа [54], разнообразные тельца включения, содержащие гликоген, цианофицин, полигидроксibuтират, липиды и полифосфаты [55, 56]. Наличие такого количества компарментов предполагает сложную систему регуляции транспорта и сортировки белков.

Хотя современные биоинформатические методы позволяют довольно точно предсказывать структуру белка, его возможную локализацию и функцию, эти данные требуют экспериментального подтверждения.

ПРОТЕОМНЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ КИНОМА

Широкий спектр протеомных подходов, доступных на сегодняшний день исследователю, зачастую затрудняет выбор метода для решения конкретной задачи. В нашем обзоре мы решили осветить некоторые, наиболее часто применяемые подходы количественной (фосфо-)протеомики, их преимущества и ограничения.

С самого начала развития протеомных исследований с использованием масс-спектрометров в качестве детектора встали две основные задачи: идентификация белков и их (полу-)количественный анализ. Для их решения на сегодняшний день применяют либо сравнение количества на уровне белков с последующей их идентификацией, либо на уровне пептидов, полученных после расщепления протеома специфическими протеазами или химическими агентами. Для второй стратегии используются два основных методических подхода: безметочный количественный анализ (Label-Free Quantification, LFQ) и с использованием стабильных изотопов (Stable Isotope Labelling) [57–59]. Мечение стабильными изотопами, в свою очередь, может быть энзиматическим, химическим и метаболическим. Кроме того, все методы количественного анализа можно разделить на две большие группы. В одном случае, количество определяется по интенсивностям родительских ионов без фрагментации в MS¹, во втором – по интенсивностям фрагментов или репротерных ионов (тэгов) в MS² (Рис. 2).

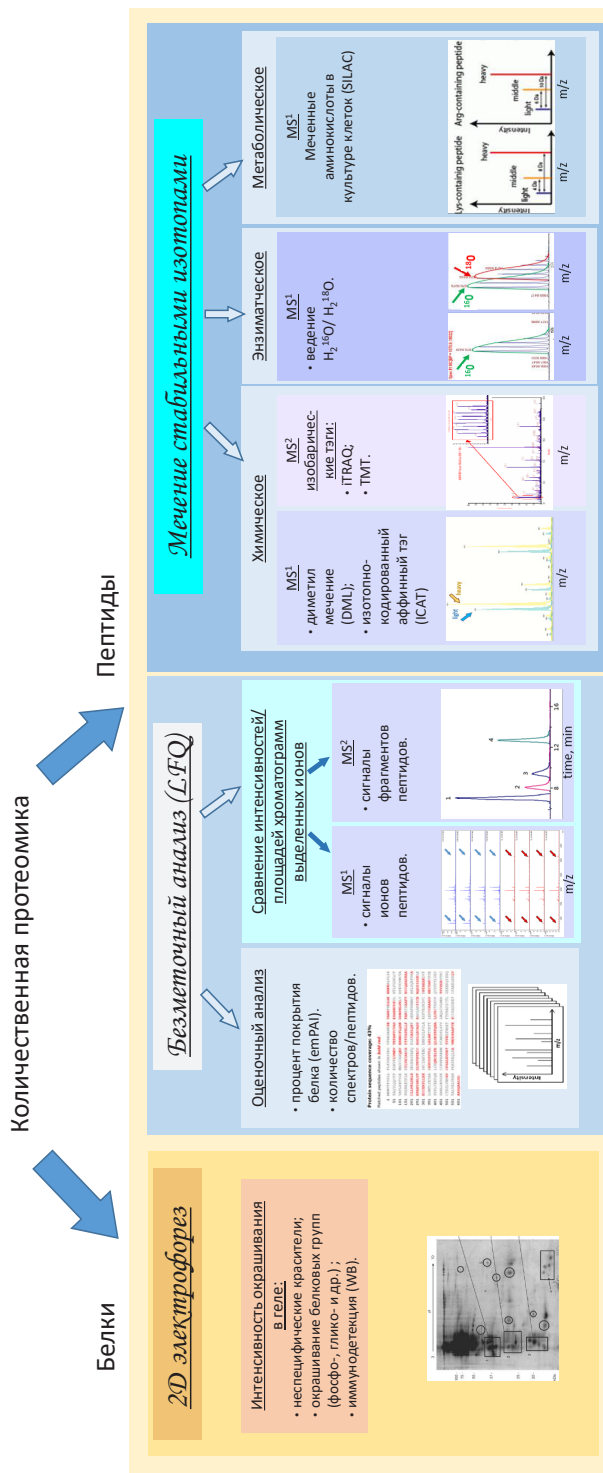


Рис. 2. Основные стратегии количественной протеомики (см. текст).

Данные стратегии применимы в протеомном подходе «снизу–вверх» (bottom–up), при котором идентификация белка строится на пептидах, полученных после расщепления белков (химического или энзиматического). Количественная информация может базироваться на интенсивностях пиков пептидов в MS1 (сканирующий MS) или по интенсивностям их фрагментов в MS2 (тандемный MS).

Количественная протеомика на уровне белков. Двумерный электрофорез.

Исторически первым революционным методом протеомного анализа стал двумерный электрофорез (2DE) с идентификацией белков методом секвенирования по Эдману [60]. В первом направлении экстракты белков разделялись по их изоэлектрическим точкам, а во втором – по их молекулярным массам [61]. Данный подход до сих пор особенно актуален для организмов, для которых отсутствуют данные полногеномного секвенирования, поскольку позволяет определять последовательности белков *de novo*.

Появление новых методов ионизации для ввода в масс-спектрометр образцов ионов с большой массой – ионизация электрораспылением (ElectroSpray Ionization, ESI) и матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI) – позволило использовать масс-спектрометры в качестве детекторов для рутинной идентификации белков [62].

Изначально стратегия идентификации строилась следующим образом: после 2DE и окрашивания белковые пятна вырезали из геля, подвергали специфическому расщеплению (например, с помощью трипсина) для получения набора пептидов. После проведения масс-спектрометрического сканирования (MS или MS¹), белки идентифицировали, сравнивая массы полученных пептидов с теоретическими [62]. Несмотря на более, чем 30 летнюю историю этого методического подхода, его основные этапы до сих пор остаются актуальными и являются основой для стратегии протеомного анализа «снизу–вверх» (bottom–up) и метода пептидных карт (Peptide Mass Fingerprinting, PMF) (Рис. 3).

Стратегия разделения белков в 2DE с MS-детекцией до сих пор широко используется, например, для исследования цитоплазматических белков, так как позволяет за один эксперимент идентифицировать порядка 1000–3000 белковых форм (протеоформ). При этом разделение проходит на уровне белков, поэтому данные о молекулярных массах и их изоэлектрических точках дают ценную дополнительную информацию о пост-трансляционных модификациях. Последнее особенно актуально при исследовании фосфорилирования белков. Данный метод позволяет относительно просто визуализировать фосфо-формы белков по изменению изоэлектрических точек (*pI* shift) и появлению серии характерных пятен («бус») одного молекулярного веса [63]. Изменение стехиометрии фосфорилирования приводит к пропорциональному увеличению числа этих пятен [64]. Окрашивание геля фосфоспецифичными красителями (например, Pro-Q Diamond) или иммунодетекция антителами специфичными к фосфорилированным аминокислотам в комбинации с энзиматической или химической обработкой образцов агентами, приводящими к дефосфорилированию, позволяют сделать однозначный вывод о наличии модификаций [65, 66].

Однако, данный метод имеет существенные ограничения. Растворение препарата в буфере, содержащем хаотропные агенты (мочевина и тиомочевина) и детергент (CHAPS) приводит к недооценке в исследуемом протеоме многих мембранных, мембран-ассоциированных белков, белков внеклеточного матрикса и клеточной стенки. Также, белки, имеющие экстремальные значения *pI*, могут теряться при изоэлектрическом фокусировании, выходя за границы диапазона pH амфолинов. Другими недостатками метода являются его относительная трудоемкость, что отражается в плохой масштабируемости для рутинного анализа десятков проб, а также посредственная воспроизводимость [67]. Для преодоления части ограничений был предложен метод дифференциального гель

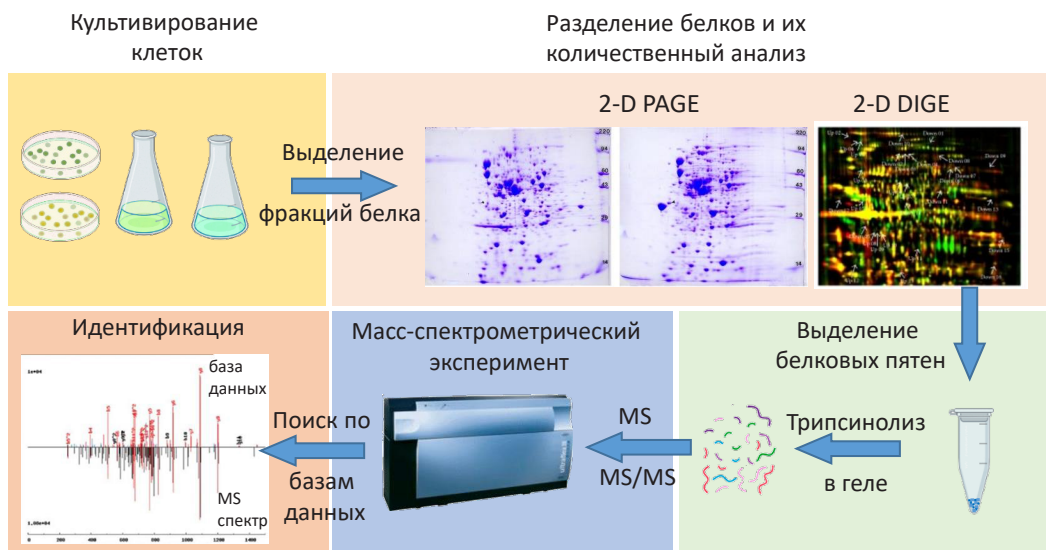


Рис. 3. Стратегия количественного анализа и идентификации протеомов на уровне белков при использовании 2D электрофореза в полиакриламидном геле (2D PAGE) или дифференциального геля электрофореза (2D DIGE).

MS – сканирование, MS/MS – фрагментация (тандемный MS) пептидов.

электрофореза (Difference Gel Electrophoresis, DIGE). Основная идея которого состоит в ковалентном мечении белков препаратов флуоресцентными красителями с разными спектральными характеристиками. Объединенные образцы подвергаются разделению по стандартной методике. Сканирование геля производится в отдельных каналах, соответствующих параметрам флуорофора [68].

Перечисленные подходы применялись при исследовании протеома *Synechocystis*. Так, двумерное разделение с последующей идентификацией позволило определить 55 дифференциально изменившихся белков плазматической мембраны в ответ на pH стресс [69]. Сравнение дикого типа и мутанта по гистидинкиназе Nik34 на уровне протеома подтвердило накопление белков, индуцируемых тепловым стрессом, в том числе ряда шаперонов [70]. Сравнительный анализ протеомов плазматических мембран из клеток дикого типа и мутанта Nik33, выращенных в нормальных условиях и при солевом стрессе, показал серьезные перестройки в составе мембран [71]. В частности у мутанта было снижено содержание некоторых белков-транспортёров, например, GgtB и FutA1, регуляторных белков таких как MorR и Rre13.

Анализ на основе 2DE образцов трех видов *Anabaena* (*Anabaena doliolum*, *Anabaena* sp. PCC 7120 и *Anabaena* L31) в контроле и через 1, 3, 5 и 7 дней солевого стресса выявил 256 существенно отличавшихся белковых пятен [22]. Около половины (134) из них соответствовало 29 белкам и было одинаковым у всех видов. В составе группы преимущественно обнаруживались белки базового метаболизма, стрессовые белки, факторы регуляции транскрипции. Были детектированы белки, характерные для конкретного генотипа. Эти различия исследователи связали с адаптационными процессами разных по устойчивости видов цианобактерий.

В работе [72], благодаря сочетанию 2DE с окрашиванием геля фосфоспецифичным красителем ProQ Diamond и последующим MS-анализом, представлен первый фосфопротеом *Synechocystis* и его изменения в ответ на солевой стресс. Были идентифицированы 32 белка, а для 8 из них установлены фосфосайты.

Количественная протеомика на уровне пептидов

Количественный анализ протеома на уровне белков имеет ряд существенных ограничений. Основной является сравнительно низкая разрешающая способность методов их разделения с последующей детекцией на масс-спектрометре. Предварительное специфическое расщепление протеома до пептидов устраняет эти ограничения.

Накопление данных MS-анализа и данных геномного секвенирования показало, что, основанный на MALDI-MS метод PMF, имеет свои ограничения – в сложных образцах пептиды с одинаковой измеренной массой могут иметь разную первичную структуру. Для решения этой проблемы был предложен метод «меток последовательностей» (sequence tags), стратегия которого заключалась в комбинировании информации измерения точной массы целого пептида в сканирующем MS (MS^1) с массами его фрагментов («тэгов») в тандемном MS (MS/MS или MS^2) [73]. В настоящее время данная стратегия идентификации известная как зависимое сканирование (Data Dependent Acquisition, DDA) широко используется в протеомных исследованиях.

Следует особенно подчеркнуть, что при количественном анализе на пептидом уровне требуется количественное расщепление всех белков до пептидов, что особенно актуально для нерастворимых белков, включая мембранные. Для увеличения эффективности энзиматического расщепления используется комбинации ферментов LysC/трипсин [74], расщепление в детергентах, совместимых с масс-спектрометрическими протоколами (PPS, ProteasMAX, RapiGest) [75] и расщепление на поверхности фильтров (Filter-Aided Sample Preparation, FASP) [76].

Разделение и обогащение фосфопептидов из смесей

Высокоэффективная жидкостная хроматография – ВЭЖХ (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) на обращённо-фазных колонках для разделения пептидов была применена в самых ранних протеомных работах [77, 78]. Это позволяет снижать аналитическую сложность образцов, уменьшать их динамический диапазон и концентрировать индивидуальные пептиды. Нанопотоковую ВЭЖХ (nano-LC) можно сопрягать с MS инструментом с помощью ESI интерфейса (ESI-MS) и проводить разделение и идентификацию пептидов в режиме реального времени. Для анализа протеомов прокариот метод позволяет в одном эксперименте рутинно идентифицировать порядка 10000 пептидов (1500 белков), что примерно составляет половину всего протеома [79].

Фосфорилирование – это динамический процесс, определяемый соотношением киназ и фосфатаз, причем представленность фосфорилированных белков в клетке обычно находится на низком уровне, что представляет особую трудность для его протеомного анализа. Для уверенной идентификации фосфопептидов на уровне протеома необходимо в 100–1000 раз большее количество белкового препарата (миллиграммы) по сравнению с обычным протеомным анализом (микрограммы). Также, такое низкое содержание фосфопептидов требует их обязательного предварительного обогащения и применение чувствительных методов детекции (Рис. 4).

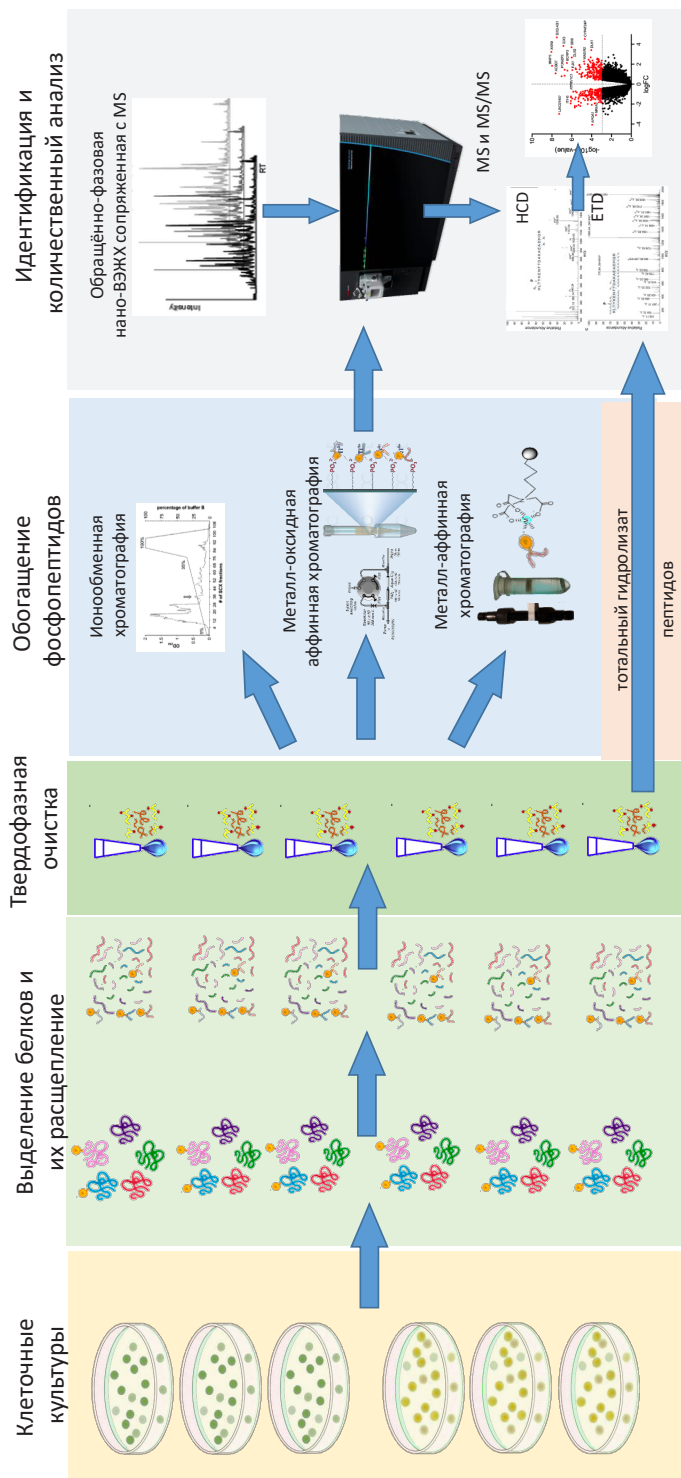


Рис. 4. Основные этапы протокола идентификации фосфопептидов с использованием стратегии безметочного количественного анализа. Для оценки степени фосфорилирования белка (осцирапу) проводят дополнительное количественное измерение исходного необогащенного фосфопептидами образца. Для локализации фосфорилированного остатка аминокислоты используются методы фрагментации: диссоциация соударением высоких энергий (Higher Energy Collisional Dissociation, HCD) или диссоциация с переносом электрона (Electron Transfer Dissociation, ETD).

Для фосфопротеомного анализа применяются две высокоспецифичные методики обогащения: металл-аффинная хроматография (Immobilized Metal Affinity Chromatography, ИМАС) на иммобилизованном Fe^{3+} и Ti^{4+} , а также металл-оксидная аффинная хроматография (Metal Oxide Affinity Chromatography, МОАС) на оксидах TiO_2 и ZrO_2 [3, 80–83]. Остальные методы применяются или для обогащения специфичных фосфо-сайтов (фосфотирозин и фосфо-сайтспецифичная иммунноаффинная хроматография), или как этап фракционирования пептидов перед ИМАС или МОАС (ионнообменная хроматография, хроматография гидрофильных взаимодействий). Следует иметь ввиду, что несмотря на широту использования методов ИМАС и МОАС для обогащения фосфо-пептидов, они являются комплементарными – часть фосфопептидов может быть обогащена только одним из методов [84–86].

Безметочный количественный анализ (LFQ)

Прежде всего, следует подчеркнуть, что масс-спектрометрический метод не является абсолютно количественным в том смысле, что интенсивность пика измеренного пептида нельзя напрямую конвертировать в его концентрацию (количество). Поэтому, для полуколичественного анализа белков из разных образцов корректным является сравнение одинаковых пептидов (с одинаковым соотношением массы к заряду и, в случае ВЭЖХ, временем элюции). При этом можно сравнивать или количество полученных спектров, или интенсивности/площади под пиками отдельных пептид-ионов в MS^1 . Такое сравнение интенсивностей является основой безметочного количественного анализа или LFQ [87]. На масс-спектрометрах высокого разрешения даже в режиме ультракороткого градиента метод позволяет проводить масштабирование полнопротеомного анализа до сотен образцов без применения дополнительных затрат времени и реактивов для пробоподготовки, а также инструментального времени для получения MS^2 спектров [88].

Одним из вариантов LFQ с тандемной фрагментацией пептидов является метод подсчета числа спектров (или числа идентифицированных пептидов) или процент покрытия белка идентифицированными пептидами на основе экспоненциально модифицированного индекса содержания белка (exponentially modified Protein Abundance Index, emPAI) [89, 90]. Однако, данные методы не являются точными и лишь дают приблизительную количественную оценку белков в образцах.

К отдельной группе относятся количественные методы, основанные на измерении интенсивности/площади фрагментов в MS^2 спектрах – методы информационно-независимого анализа (Data Independent Acquisition, DIA) и таргетные методы. Примером DIA является метод независимого сканирования – SWATH-MS (Sequential Windowed Acquisition of All Theoretical Fragment Ion Mass Spectra), таргетным – мониторинг заданных реакций (Single/Multiple Reaction Monitoring, S/MRM) [91–93]. Они характеризуются высокой воспроизводимостью, широким диапазоном концентраций для количественной оценки. В методе SWATH-MS проводится сканирование масс в MS^1 , но в отличие от зависимого сканирования, дальнейшая фрагментация пептидов проводится в широкополосных окнах масс, которые покрывают весь диапазон сканирования. При этом для количественного ретроспективного анализа может использоваться как данные об интенсивностях родительских ионов, так и интенсивности фрагментов. В методе MRM, который является масс-спектрометрическим аналогом вестерн-блоттинга, количественный анализ уникальных пептидов, однозначно характеризующих конкретный белок, проводят на основе оценок площадей хроматографических пиков ионов-фрагментов (MRM

transitions). Данный метод обладает одним из самых широких динамических диапазонов концентраций и может быть использован как комплементарный для подтверждения количеств отдельных белков широкомасштабного (shotgun) протеомного анализа [91].

Для создания протеомного атласа *Synechocystis* sp. PCC 6803 был применен метод LFQ в комбинации с методами многоэтапного фракционирования протеома [92]. Авторам удалось идентифицировать 2167 белков, что составило 71.3% всего протеома и оценить распределение 2027 белков в клетке цианобактерии. Благодаря использованию метода FASP для подготовки образцов, были идентифицированы 504 белка, которые по биоинформатическим данным имели трансмембранные домены. Согласно результатам этого исследования СТПК *Synechocystis* приурочены к разным мембранным фракциям, что может отражать возможные функции белка в клетке и быть основой для создания новых рабочих гипотез относительно их функций.

Комбинация комплементарных LFQ подходов (широкомасштабного протеомного исследования и целевого количественного анализа) была использована для исследования протеома *Anabaena* sp. PCC 7120 в условиях культивирования при недостатке азота [39]. Данный подход выявил количественные изменения в протеоме, затрагивающие метаболические пути ассимиляции азота и углерода при азотном голодании в течение 3, 12 и 24 часов, при этом дифференциально изменялись количества 363, 603 и 669 белков на каждом из этих этапов, соответственно.

Такой же комплементарный подход был применен для сравнения протеомов: пресноводного *Synechocystis* sp. PCC 6803 и морского *Synechocystis* sp. PCC 7338 [95]. На первом этапе, использование подхода DDA позволило идентифицировать белки двух штаммов и создать библиотеку спектров для количественного сравнения протеомов. На втором применяли метод информационно-независимого анализа (Data Independent Acquisition, DIA). Данный подход позволяет детектировать большее количество мало представленных белков в протеоме. Так, если в DDA режиме для фрагментации из всего спектра выбирались 10 родительских ионов с наибольшей интенсивностью, то в DIA – ионы, попадавшие в одно из 20 массовых окон в диапазоне между 500 и 900 m/z. В общей сложности для обоих штаммов было оценено количество 2049 белков, из них дифференциально отличались 396. Наиболее сильно отличалось содержание KdpV, белка АТФ-связывающей субъединицы калий-транспортирующей АТФазы. Предполагается, именно наличие высоко аффинных транспортеров ионов составляет основу адаптации клеток цианобактерии к жизни в морских условиях.

Следует подчеркнуть, что все методы LFQ можно сделать абсолютно количественными, используя как изотопно-меченные, так и немеченные пептиды с известной концентрацией как внутренний стандарт (spike) [96, 97].

Количественный анализ с использованием мечения стабильными изотопами

Мечение стабильными изотопами образцов позволяет проводить многоэтапное (многомерное) фракционирование без потери количественной информации. Также, данная стратегия повышает производительность анализа поскольку в одном эксперименте можно анализировать нескольких протеомов одновременно. Однако, данный метод требует дорогостоящих расходных материалов и дополнительных затрат времени на пробоподготовку, что ограничивает его применение.

На сегодняшний день в практике используется несколько протоколов (Рис. 5) мечения стабильными изотопами: энзиматический, химический и метаболический [57].

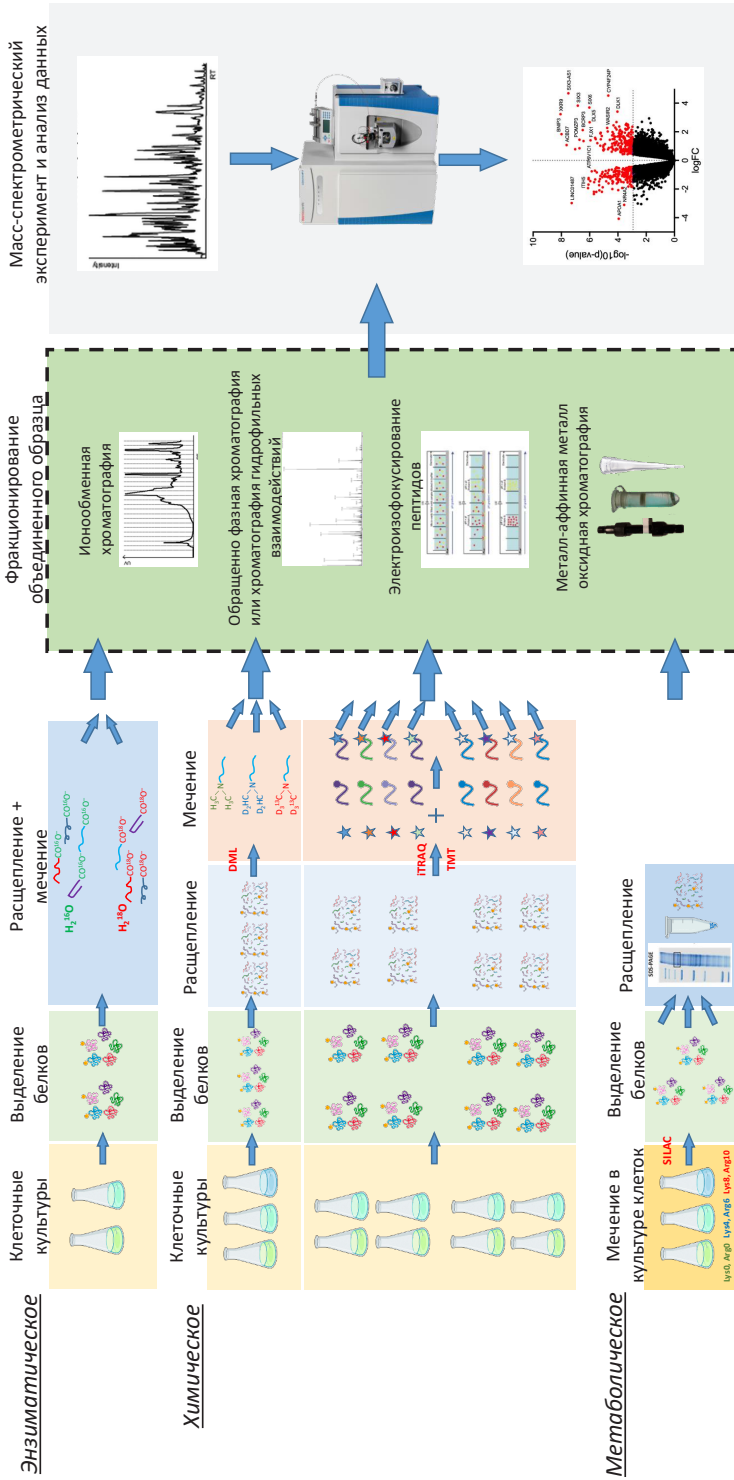


Рис. 5. Стратегия количественной протеомики с использованием меченых образцов стабильными изотопами.

Следует обратить внимание, что при использовании методов энзиматического и химического введения метки, стабильные изотопы вводятся на уровне пептидов: или на этапе энзиматического расщепления, или сразу после него. Метаболическое мечение отличается от остальных введением метки на уровне белков, что позволяет разделить объединенного образца на белковом уровне. Блок опционных этапов протокола выделен пунктирной линией.

Энзиматическое мечение

Основой энзиматического метода является специфическое расщепление образцов при помощи трипсина в H_2^{16}O и H_2^{18}O , при этом метка вводится в С-конец получающихся пептидов. Пептиды из разных образцов в MS^1 будут различаться между собой на 2 Да, и соотношение их интенсивностей будет отражать их количество в исходных образцах [98]. Данный метод имеет существенный недостаток – получаемая разница в массах пептидов с легкой и тяжелой метками недостаточна, чтобы разделить их изопопные кластеры. Начиная со второго изотопа легкого пептида, кластеры перекрываются, что может приводить к существенной ошибке количественного определения.

Химическое мечение с применением изобарических меток

Химическое введение стабильных изотопных меток возможно несколькими способами. Применяются так называемые изобарические метки, в которых масса репортерных групп (тэгов) сбалансирована массой линкера. Пептиды из разных образцов, меченные по $-\text{NH}_2$ группам метками с разными тэгами, обладают одинаковой массой (isobaric tags) и неразличимы как на уровне многомерного хроматографического разделения (LC/LC), так и в MS^1 . При фрагментации пептида в MS^2 репортерные метки с уникальной массой высвобождаются и по их интенсивностям определяется количество пептида в исходных образцах [99]. Изобарические метки на сегодняшний день представлены двумя наборами – это 8-плексная метка для относительной и абсолютной количественной оценки (isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation, iTRAQ) и 16-плексная метка тандемной массы (Tandem Mass Tag, TMT).

iTRAQ использовался для изучения ответа на длительное фосфорное голодание при разных концентрациях неорганического фосфора в среде у *Synechocystis*. Перестройка протеома в этих условиях была схожа с ответом на недостаток азота в питательной среде, однако эффект был менее выражен [100].

Анализ изменений протеома в ответ на азотное голодание у *Synechocystis* с использованием iTRAQ показал специфический ответ в зависимости от продолжительности стресса (24 и 48 ч) [101]. Только небольшое число белков было обнаружено на обеих стадиях без количественных изменений. На первые сутки снижался уровень белков биосинтеза аспарагиновой кислоты и гистидина, тогда как количество белков синтеза глутаминовой кислоты – только на вторые. Уменьшение количества ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) наблюдалось на обеих стадиях, гликолиза только на второй. Ответ клеток цианобактерии на непродолжительное азотное голодание выражался в значительной временной перестройке углеводного и азотного метаболизма.

В работе по изучению ответа *Spirulina platensis* на холодостресс [102] было идентифицировано 3786 белков, из которых количественно изменялись 1062 белка. Для большинства из них (749) было показано уменьшение количества при стрессе, тогда как увеличивалось вдвое меньшее число белков. Эти данные хорошо согласуются с уже имеющимися данными по изменению транскриптома. Наиболее значительным изменением подвергались белки, относящиеся к углеводному метаболизму, трансляции белка, синтезу аминокислот.

В работе Флорес с соавт. [103] iTRAQ мечение применялось для исследования вклада альтернативного сигма-фактора SigF в синтез внеклеточных полисахаридов, процессов секреции белка и формирования клеточной стенки у *Synechocystis*. По сравнению с диким типом у мутанта ΔSigF дифференциально изменялось 313 белков (из

1654 детектированных). Сравнение результатов поиска в геноме последовательностей потенциальных сайтов связывания SigF и идентифицированных белков выявило 12 потенциальных белков-мишеней этого σ -фактора, преимущественно принимающих участие в фотосинтезе и углеводном метаболизме.

В одной из работ по протеомному картированию *Synechocystis* sp. PCC 6803 [52] был использован подход локализации белков органелл с применением изотопного мечення (Localization of Organelle Proteins by Isotope Tagging, LOPIT). Он совмещал многостадийное фракционирование белков образца в градиенте плотности сахарозы с последующим мечением 10-плексным TMT и двумерной (LC/LC) обращенно-фазной ВЭЖХ в щелочных и кислых условиях. Авторам удалось идентифицировать 2445 белков (67% протеома). Использование количественных данных и белков-маркеров клеточных фракций позволило соотнести 1712 белков с конкретными компартментами клетки.

Использование 6-плексной изобарной метки TMT помогло выявить регуляторную роль гистидинкиназы Hik8 в регуляции фосфорилирования белка РII [69]. В эксперименте авторы количественно сравнивали протеомы *Synechocystis* дикого типа с пятью мутантами по белкам, участвующим в регуляции метаболизма углерода (гистидинкиназам Hik8, Hik31 их паралогу Slr6041, регулятору ответа Rre37, а также сигма-фактору РНК полимеразы SigE) с целью установления специфичности и взаимовлияния путей регуляции. В серии масс-спектрометрических экспериментов авторами было идентифицировано более 2500 белков, из которых 2189 были использованы для последующего количественного анализа. В результате сравнения протеомов было обнаружено, что только 4 белка количественно изменяются у всех 5 мутантов – было снижено количество Slr7085, Slr6074 и Slr1161, и повышено глюкозилглицеролфосфатсинтазы (GgpS). Также, благодаря использованию TMT метки, авторам удалось количественно измерить изменение уровня фосфорилирования S49 белка РII у мутантного штамма Hik8, который увеличивался в ауксотрофных и уменьшался в миксотрофных условиях культивирования.

При всей привлекательности метода изобарических меток следует отметить его недостатки – это высокая стоимость коммерческих наборов и снижение уровня динамического диапазона измеренных интенсивностей. На современных приборах высокого разрешения и применение разделения пептидов в газовой фазе данная проблема в большей части решена [99, 104].

Химическое мечение с применением «анизобарических» меток

Еще одним подходом количественного анализа является введение «анизобарических» меток в пептиды, что дает различие в массе на одинаковое значение. В MS¹ пептиды объединенного образца образуют дублеты или триплеты пиков с разными интенсивностями, на основании которых проводится количественный анализ. Для мечения используют химические агенты, модифицирующие –SH или –NH₂ группы.

Метки по –SH группам представлены только одним 2-плексным коммерческим набором – изотопно-кодированной аффинной меткой ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag). Несмотря на возможность обогащения меченных пептидов на этапе аффинной хроматографии и применимости в полнопротеомном анализе [105], ICAT имеет только одно преимущество – высокая селективность к тиольным группам, что особенно актуально для получения количественных данных относительно редокс статуса белков в клетке [106, 107].

Для $-\text{NH}_2$ мечения разработан 3-плексный протокол диметильного мечения (DiMethyl Labeling, DML) [108]. Данный метод позволяет проводить мечение пептидов как в растворе, так и на обращенно-фазной колонке в процессе пробоподготовки. Дейтерированный цианоборгидрид и ^{13}C -формальдегид являются самыми дешевыми из всех вышеперечисленных реактивов, поэтому метод завоевывает все большее число поклонников. Следует отметить, что все изотопные методы, количественный анализ которых основан на MS^1 , имеют эффект увеличения аналитической сложности объединенного образца, что приводит к меньшей глубине покрытия протеома. Недостаток компенсируется возможностью применения сложных схем разделения и обогащения, например, фосфопептидами, без потери количественной информации.

В исследовании ответа на абиотический стресс коллекции мутантов СТПК *Synechocystis* был проведен протеомный и фосфопротеомный анализ с использованием DML. Глубина покрытия протеома составила около 2500 белков (67%), и 2200 белков было выбрано для количественного анализа [82]. Для анализа фосфопротеома было использовано многостадийное фракционирование (обращенно-фазная ВЭЖХ в щелочных условиях, хроматография на TiO_2 , обращенно-фазная ВЭЖХ в кислых условиях). В результате было идентифицировано 115 фосфорилированных белков. Также авторами обнаружено, что некоторые пептиды встречаются только как дважды фосфорилированные (например, у RpoD сайты pT148 и pS155), в то время как у других преобладало фосфорилирование одного из остатков (например, у SlI0103 сайты pT380 или pT384, или pT387).

Метаболическое мечение

Метаболическое введение метки (metabolic stable isotope labeling) в настоящее время нашло свою реализацию в методе мечения стабильными изотопами в клеточной культуре (Stable Isotope Labelling by/with Amino acids in Cell culture, SILAC) [109]. В данном методе в культуральную среду добавляются изотопно меченные легкие, средние и тяжелые варианты аминокислот Lys и Arg, которые включатся в синтезируемые белки. На этапе энзиматического расщепления белков с использованием трипсина (или LysC/трипсина) получаемые пептиды содержат одну терминальную аминокислоту Lys или Arg, интенсивности которых детектируются в масс-спектрометре в MS^1 в виде дуплетов или триплетов (2- и 3-плексный SILAC). Основное преимущество данного метода состоит в том, что изотопное мечение происходит на уровне белков, которые затем можно разделять (например, одномерным SDS электрофорезом) без потери количественной информации даже с применением протокола расщепления белков в геле.

Существенными недостатками этого метода являются высокая стоимость, увеличение аналитической сложности объединенного образца, а также невозможность его применения для автотрофных организмов, синтезирующих Lys и Arg [110]. Альтернативой аминокислотам для метаболического мечения может быть введение изотопа азота ^{15}N , часто в форме $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$ или K^{15}NO_3 . Такой подход использовали для изучения метаболизма токсинов *Microcystis aeruginosa* при восстановлении после длительного азотного голодания [111]. В качестве источника азота использовались ^{15}N -аммоний, ^{15}N -мочевина, ^{15}N -нитрат и ^{15}N -аланин. Анализ проводили по включению ^{15}N в производимые цианобактерией микроцистины. В ходе работы было показано, что микроцистин-LY накапливался только в стрессовых условиях, на стадии восстановления в присутствии разных источников азота – преимущественно на среде с ^{15}N -аланином. Наиболее представленный микроцистин-LR синтезировался в присутствии всех источников азота.

III. ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИЙ СТПК ЦИАНОБАКТЕРИЙ НА ПРИМЕРАХ ОТДЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ

Несмотря на то, что в последнее время активно изучаются протеомы и разные виды пост-трансляционных модификаций, в частности фосфорилирование, у разных видов цианобактерий, *Synechocystis* и *Nostoc* по-прежнему являются наиболее изученными из всех.

ГРУППА PKN2 *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC 6803

SpkA (Slr1574–Slr1575)

SpkA – первая протеинкиназа *Synechocystis*, для которой была показана киназная активность *in vitro* по отношению ко всем «стандартным» экзогенным субстратам: МВР, Н1 и Cas [6]. Также SpkA проявляла способность к автофосфорилированию. Делеция *spkA* проявлялась в утрате клетками подвижности, а также в увеличении экспрессии оперонов *pilA1–pilA2* и *pilA5–pilA6*, кодирующих белки пилинового аппарата, и снижение экспрессии оперона *pilA9–pilA10–pilA11–slr2016* [6, 112]. Именно эти изменения исследователи связали с нарушением толстых пилей – структур, принимающих участие в передвижении клеток. Поиск внутриклеточных субстратов этой протеинкиназы показал SpkA-зависимое фосфорилирование белков мембранной фракции с молекулярным весом 30 и 90 кДа. Присутствие интенсивного сигнала фосфорилирования в низкомолекулярной области в районе 17 кДа в клетках мутанта без добавления экзогенного белка дало исследователям основание предположить, что активность других СТПК зависит от присутствия SpkA [6]. До настоящего времени непосредственные субстраты этой протеинкиназы не установлены.

SpkB (Slr1697)

Первые данные для SpkB получены на рекомбинантном белке [113]. В исследованиях *in vitro* была показана киназная активность SpkB по отношению к «стандартным» субстратам без проявления субстратной специфичности. Также, как и SpkA, SpkB способна к автофосфорилированию, интенсивность которого зависела от присутствия в реакционной смеси ионов двухвалентных металлов. К усилению автофосфорилирования приводило присутствие марганца, но не магния, при добавлении же кальция сигнала фосфорилирования не наблюдался вовсе [113]. Исследование на инсерционном мутанте по гену *slr1697* показало отсутствие подвижности при культивировании клеток на твердом субстрате. Однако, по данным трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) изменений в строении пилей обнаружено не было. На основании этого был сделан вывод, что SpkB является важным звеном регуляции подвижности клеток, но детали его функционирования не определены до сих пор.

Наличие четырех консервативных остатков Cys в N-концевом домене молекулы SpkB позволило выдвинуть гипотезу о возможности редокс-регуляции его активности. Добавление восстановителя *in vitro* не влияло на способность протеинкиназы к автофосфорилированию [113]. При этом, способность к субстратному фосфорилированию по отношению к Cas подавлялась после обработки окислителем (CuCl₂) и восстанавливалась в присутствии дитиотреитола [114]. Транкированная форма белка, не содержащая остатков Cys в N-конце, была неактивна, что косвенно подтвердило зависимость активности SpkB от изменений редокс-статуса.

Сравнение профилей фосфорилирования лизатов клеток дикого типа и мутанта по протеинкиназе SpkB показало исчезновение сигнала в области соответствующей молекулярной массе 90 кДа, а также ослабление интенсивности полос в районе 70 и 150 кДа. Сочетание методов 2DE, радиоавтографии и идентификации методом PMF позволило установить субстрат протеинкиназы в клетке – субъединица глицил-тРНК-синтетазы (GlyS). Физиологическое значение данной модификации пока не определено [114].

Полнопротеомный анализ мутанта по протеинкиназе SpkB при культивировании в условиях разной обеспеченности углеродом [82] позволил косвенно подтвердить связь SpkB с подвижностью клеток. Из 50 дифференциально отличавшихся белков в условиях высокой концентрации CO₂ (5%) в газо-воздушной смеси, 4 белка относились к группе пилин-подобных (Slr2016, Slr1928, Slr1929, Slr2015), и один белок клеточной поверхности – белок S-слоя Sll1951. Содержание пилиновых белков в клетках мутанта было изменено разнонаправленно: Slr2015, Slr2016 присутствуют у мутанта в большем количестве, а два других в меньшем. При этом, определение функций большей части количественно различавшихся белков все еще ждет своих исследователей. Отсутствие функциональной протеинкиназы SpkB оказывало слабое влияние на состав клеточных белков, и не объясняло причин менее интенсивного роста культуры мутанта при низких (0,04%) концентрациях CO₂. Применение методов фосфопротеомного анализа позволило обнаружить отсутствие или значительное снижение уровня фосфорилирования белков у мутанта SpkB. Фосфорилирование отсутствовало у глутатион S-трансферазы (Sll1545, Gst1) и Slr0483 (белок с неизвестной функцией), а также было значительно снижено у карбоксисомального белка ScmM (Sll1031) и важного регуляторного белка ПII (Ssl0707, GlnB). Фосфосайты глутатион S-трансферазы (T266) и Slr0483 (T34 или T35) детектировались при разных режимах культивирования исключительно в клетках дикого типа. Это позволило авторам предположить, что они являются субстратами SpkB. Белок ПII (GlnB) является мастер-регулятором многих аспектов азотного и углеродного метаболизма (например, C/N баланса). При этом, какая из киназ его фосфорилирует долгое время являлось загадкой [115]. Поэтому участие SpkB в фосфорилировании остатка S49 белка ПII при изменении концентрации CO₂ является особенно важным. Следует, однако, отметить, что авторами обнаружено остаточное фосфорилирование S49 даже в мутантных клетках, что говорит о существовании другой(гих) киназ, использующих его в качестве субстрата.

SpkC (Slr0599)

Первоначально белок SpkC был экспрессирован и охарактеризован в экспериментах *in vitro* [43]. Как и SpkB, SpkC был способен к автофосфорилированию, также отсутствовала специфичность фосфорилирования «стандартных» субстратов. Первая работа по установлению роли данного белка в клетке, который назван в работе как PknE, была проведена на мутантом штамме [116]. Он характеризовался устойчивостью к метиламину в концентрации примерно на порядок выше, чем дикий тип, особенно в условиях низкой освещенности. Протонированный метиламин проникает в клетки через те же транспортные системы, что и ионы аммония [117]. В клетках метиламин превращается в γ -глутамилметиламид в реакции, катализируемой глутаминсинтетазой. Далее он не метаболизируется и накапливается в клетках до токсичных концентраций. При этом у мутантного штамма не было обнаружено изменений в транспорте аммония и соответственно метиламина, а также в активности глутаминсинтетазы. В связи с этим,

было предположено, что наблюдаемая устойчивость вероятнее всего связана с функционированием системы трансформации метиламина в нетоксичный продукт. Также на мутантном штамме была показана устойчивость к другому токсичному агенту – L-метионин-D,L-сульфоксимины. Он является аналогом глутамина и необратимо ингибирует глутаминсинтетазу. Так же, как и в первом случае, система транспорта глутамина нарушена не была. Конкретная роль SpkC в механизме устойчивости клеток *Synechocystis* установлена не была, но на основании экспериментальных данных было сделано предположение о её участии в регуляции азотного метаболизма [116].

Это предположение было подтверждено в работах Шпэт с соавт. на клетках дикого типа [3, 83]. В частности, было показано, что фосфорилирование самой протеинкиназы SpkC зависит от изменения C/N баланса. Так, в условиях азотного голодания уровень фосфорилирования снижался. Благодаря методам фосфопротеомики, были установлены четыре сайта фосфорилирования SpkC по остаткам треонина (T291, T297, T312 и T319) [3].

В другой работе, в которой исследовалась роль уровня CO₂ при культивировании клеток, было обнаружено значительное увеличение фосфорилирование SpkC по остаткам T304 и T312, что подтверждает вовлеченность SpkC в адаптацию к изменению уровня углерода, а также, возможную регуляцию активности SpkC путем фосфорилирования [83]. Также были установлены белки, фосфорилирование которых частично или полностью зависит от присутствия SpkC в клетках. У мутанта не детектировались фосфопептиды белка-регулятора ответа в составе двухкомпонентной системы (CspR, Slr6040), DnaJ-подобного белка (Slr1384), белка Slr1619, а также белка CmpB (Slr0041), входящего в состав транспортера бикарбоната BCT1. Именно изменением фосфорилирования CmpB исследователи объяснили замедление роста мутанта при низкой концентрации CO₂ [83].

Важный регулятор C/N баланса – белок PII (GlnB), также фосфорилируется SpkC [83]. Таким образом, он является мишенью по крайней мере двух протеинкиназ *Synechocystis* – SpkB и SpkC, что говорит о непосредственном участии киназ PKN2-типа в регуляции ответа на изменение C/N баланса.

Протеинкиназа SpkC также участвует в фосфорилировании ко-шаперонина GroES [35]. На основании протеомных исследований был локализован участок его фосфорилирования по остатку T29 [82].

SpkD (Slr0776)

Биохимическая характеристика рекомбинантного белка SpkD [43] в условиях *in vitro* позволила установить его автокаталитическую киназную активность. Также было обнаружено предпочтение фосфорилирования в ряду «стандартных» субстратов: H1 ≥ MBP > Cas.

Функциональная роль белка SpkD в клетке была исследована на мутантном штамме. Для него были показаны отличия скорости роста при низком содержании неорганического углерода в среде, хотя активности высокоаффинных систем транспорта бикарбоната у обоих штаммов схожи. Добавление органических источников углерода таких как глюкоза, фосфоглицеральдегид и пируват не стимулировало рост мутанта, тогда как добавление в среду культивирования метаболитов ЦТК приводило к восстановлению роста [118]. Предположение об участии SpkD в координации работы ферментов ЦТК было подтверждено снижением на 20% содержания 2-оксоглутарата (2ОГ) у мутанта. 2ОГ является ключевым метаболитом, принимающим участие в координации C/N баланса.

Он взаимодействует с белком PII, который после этого подвергается фосфорилированию [115]. При этом, снижение уровня 2ОГ у мутанта не приводило к изменению фосфорилирования PII что, возможно, говорит об альтернативных путях регуляции [118].

SpkE (Slr1443)

Как упоминалось ранее, изначально протеинкиназа SpkE, экспрессированная в гетерологической системе, считалась функциональной неактивной из-за замены аминокислотных остатков в активном центре [43]. Однако, смена системы экспрессии позволила получить активный фермент в условиях *in vitro* [7]. При этом SpkE не была способна к автофосфорилированию, но обладала субстратной специфичностью, фосфорилируя H1. Эксперименты по изучению активности протеинкиназы на уровне клеток показали отличия профилей фосфорилирования между образцами дикого типа и мутанта по SpkE.

Несмотря на то, что белки, подвергающиеся модификации, не были идентифицированы, данный факт косвенно подтверждает активность фермента в клетках *Synechocystis*. В частности, регуляторная роль SpkE может быть связана с ответом клеток на холододовый стресс. Схожесть профилей транскрипции генов у мутантов по SpkE и гистидинкиназе Hik33, известного сенсора холододового стресса [5], позволяет предположить участие SpkE в регуляторном пути ответа клеток *Synechocystis* на холододовый стресс в качестве дополнительного звена [7].

Также было показано участие протеинкиназы SpkE в регуляции подвижности клеток цианобактерии [119]. Делеция гена *spkE* приводила к утрате толстых пилей, задействованных в передвижении клетки, однако не изменяла ни уровень экспрессии гена *pilA1* (основного структурного белка толстых пилей), ни его количество в клетке. При этом наблюдаемое изменение массы PilA1 исследователи связывали с возможностью посттрансляционной модификации белка. Последнее не было продемонстрировано экспериментально. Тем не менее, было установлено, что в отсутствие SpkE нарушается сборка толстых пилей, и белок PilA1 накапливается во внеклеточном пространстве [119].

SpkF (Slr1225)

Впервые SpkF была получена в гетерологической системе как белок мембранной фракции [43]. Исследователи не проводили очистку белка, а проводили реакцию фосфорилирования в лизате клеток *E. coli* после индукции. Было показано, что в присутствии Mg-АТФ фермент проявлял киназную активность – автофосфорилировался и модифицировал «стандартные» субстраты, явно предпочитая MBP и H1 по сравнению с Cas.

Скрининговые исследования коллекции мутантов *Synechocystis* по СТПК с использованием ко-шаперонина GroES в качестве потенциального белка-мишени, показали способность SpkF фосфорилировать GroES. Было предложена схема каскада в пути передачи сигнала фосфорилирования с участием SpkF и двух других протеинкиназ – SpkC и SpkK [35].

В работах, посвящённых изучению адаптации клеток *Synechocystis* к флуктуациям уровней и соотношения C/N в среде культивирования, приводятся данные об изменении уровня (авто)фосфорилирования SpkF в ответ на эти изменения [3, 82].

SpkG (Slr0152)

Следует отметить, что на сегодняшний день киназу SpkG не удалось экспрессировать в *E. coli*, поэтому его активность на уровне белка в системе *in vitro* до сих пор не подтверждена. Основные данные для нее были получены на уровне целого организма.

Исследование функций SpkG и ее потенциальной роли в передаче сигналов на уровне клетки впервые проведено с использованием транскриптомного подхода [120]. Первоначально оценивался уровень экспрессии четырех генов протеинкиназ (*spkC*, *spkD*, *spkF*, *spkG*) при воздействии ряда стрессовых условий. В условиях солевого стресса (0.68 М NaCl) значительно увеличивался уровень экспрессии гена *spkG*. В этих условиях мутант характеризовался более медленным ростом по сравнению с диким типом. Анализ транскриптома показал дифференциальную экспрессию шестидесяти генов у мутанта SpkG. Причем, среди потенциально регулируемых генов были как те, экспрессия которых полностью зависела от наличия SpkG, так и изменялась только частично. На этом основании был сделан вывод, что протеинкиназа является дополнительным регуляторным элементом при ответе на солевой стресс в клетках цианобактерии [120].

Применение методов таргетной протеомики (SRM) позволило установить количественную взаимосвязь между SpkG и белком ферредоксином 5 (Fd5). Интересно, что ген белка Fd5 (*slr0148*) расположен в том же опероне *slr0144–0152*, что и *spkG* (*slr0152*) [121]. Для Fd5 было показано фосфорилирование по остаткам треонина T18 и T72, однако киназа не была установлена [3, 14]. По данным масс-спектрометрического анализа у мутанта SpkG по сравнению с диким типом значительно снижался уровень фосфорилирования T18, а фосфорилирование T72 отсутствовало вовсе [121]. Эти данные подтверждают, что Fd5 является одним из белков-мишеней для SpkG, но также предполагают наличие других протеинкиназ, также модифицирующих остаток T18.

ГРУППА ABC1K *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC 6803

Несмотря на длительное время, прошедшее от выделения генов цианобактерий в группу потенциальных СТПК, а также публикации многочисленных работ по киназам PKN2-типа, группа ABC1K по большей части все еще остается *terra incognita*. Им посвящено незначительное количество исследований, и в базе данных Uniprot они чаще всего отнесены к белкам с неизвестной функцией, а то и вовсе к предполагаемым.

SpkK (*Slr1919*)

Из группы ABC1K протеинкиназ *Synechocystis* первой попавшей в поле зрения исследователей стала SpkK. В 2011 г. было установлено, что она совместно с двумя белками группы PKN2 (SpkC и SpkF) вовлечена в ответ на тепловой стресс [35]. При помощи разделения белков на 2DE с последующим масс-спектрометрическим измерением на MALDI-TOF были идентифицированы несколько белков, фосфорилирование которых изменялось в клетках дикого типа в ответ на повышение температуры. В их числе был ко-шаперонин GroES. Поэтому этот белок был использован в качестве экзогенного субстрата в реакции *in vitro* с белками из клеток мутантов по генам СТПК (SpkB-SpKL). Сравнение профилей фосфорилирования и данные комплементационного анализа позволили установить, что протеинкиназы ABC1K-типа (SpkK) и PKN2-типа (SpkC и SpkF) вовлечены в модификацию GroES в клетках цианобактерии. Это впервые позволило предположить взаимодействие СТПК разных типов и каскадный принцип их работы [35].

К настоящему времени в целой серии работ факт фосфорилирования ко-шаперонина GroES подтвержден, а также установлен сайт модификации – T29 [3, 82, 83].

SpkI (Sll1770)

Протеинкиназа SpkI была охарактеризована на уровне организма в экспериментах, проведенных на нокаутированном инсерционном мутанте и на штамме-комплементанте [1]. Основные физиологические изменения наблюдались в параметрах роста и эффективности фотосинтеза в условиях высоких концентраций хлорида натрия. В нормальных условиях мутант имел схожую скорость роста с диким типом и комплементированным штаммом. Однако, при высоких концентрациях соли (0.6 М на твердом субстрате и 0.9 М в жидкой культуре) скорость его роста была ниже. Так же в условиях стресса у мутанта по сравнению с диким типом и комплементированным штаммом наблюдалось значительное уменьшение максимального квантового выхода фотосистемы II (ФСII), снижение нетто-фотосинтеза, активности ФСII, усиление дыхания. Мутация по гену *sll1770* привела также к изменению содержания основных белков фотосистем I и II в условиях стресса [1].

Полученные данные позволили сделать вывод, что SpkI необходима для координации работы обеих фотосистем и высокой эффективности фотосинтеза, что особенно важно при адаптации в условиях солевого стресса.

SpkH (Sll0005)

Последней охарактеризованной протеинкиназой ABC1K-группы является протеинкиназа SpkH. Ее активность была установлена в условиях *in vitro* [37]. Единственным из «стандартных» субстратов, который фосфорилировался SpkH, был Cas. Интенсивность сигнала на радиоавтографе была тем выше, чем больше было содержание ионов марганца в реакции. Для рекомбинантного белка было показано существование в форме тетрамера в растворе.

На данный момент протеинкиназа SpkH является единственной СТПК *Synechocystis*, для которой определен сайт фосфорилирования – XXpSXЕ. На основании биохимических свойств SpkH: аминокислотной последовательности мотива фосфорилирования (pSXЕ), олигомеризации белка в растворе (тетрамер) авторы отнесли SpkH к представителям группы казеиновых киназ (КК). Были проверены основные эффекторы, способные влиять на активность КК разных семейств: гепарин, спермин, стауроспорин, ДНК и РНК. Протеинкиназная активность SpkH ингибировалась спермином и гепарином, но не изменялась в присутствии ингибитора большинства протеинкиназ – стауроспорина. Эти данные свидетельствуют о том, что протеинкиназа SpkH *Synechocystis* функционально близка одной из КК, а именно, к «истинной» КК Fam20С.

ПРОТЕИНКИНАЗЫ NOSTOC (ANABAENA) SP. PCC 7120

Одноклеточная цианобактерия *Synechocystis* – весьма удобный объект для широкого спектра исследований. Более сложную систему представляет собой филаментообразующая, азотфиксирующая цианобактерия *Nostoc*. По видимому, механизмы адаптации к изменениям среды коррелируют с размером геномов цианобактерий и количеством генов кодирующих элементов сигнальных систем. Так, у в геноме *Synechocystis* было аннотировано 12 генов СТПК, тогда как у *Nostoc* обнаружено 52 гена [29].

Nostoc особенно интересен с точки зрения особенностей передачи сигналов как на уровне единичной клетки, так и межклеточной коммуникации, включающей регуляцию формирования гетероцист для фиксации атмосферного азота. Для этого процесса необходимы анаэробные условия, требующие глубокой морфологической, физиологической и биохимической перестройки клеток [122].

После удаления из среды неорганических форм азота в течение 24 ч наблюдается формирование гетероцист, которые распределяются по филаменту на расстоянии 10–20 вегетативных клеток. Такой характер организации при атмосферном источнике азота сохраняется во время последующего роста клеток делением. На поздних стадиях формирования гетероцист начинает синтезироваться нитрогеназа, ответственная за азотфиксацию. Специфическая структура оболочек гетероцист, включающая специфические гликолипиды и полисахаридный слой, создает анаэробные условия для функционирования нитрогеназы [123].

Необходимо отметить, что работы по исследованию протеинкиназ *Nostoc* были начаты еще в «догеномную» эпоху. Поиск и выбор объекта для исследования осуществлялся исключительно на основании поиска гомологов протеинкиназ в том числе неродственных организмов. [4, 124, 125].

PknA (Alr4366)

Первые СТПК у цианобактерий были обнаружены именно у *Nostoc* в 1993 г. [126]. При помощи метода Саузерн-блот гибридизации было установлено присутствие в геноме цианобактерии целой группы генов, сходных по нуклеотидной последовательности с эукариотическими протеинкиназами.

PknA (Alr4366) стала первой описанной из них. Было показано, что *pknA* экспрессируется при культивировании в нормальных условиях. При переводе в условия азотного голодания *pknA* интенсивнее экспрессируется на начальных (2.5–5 ч) этапах голодания, а затем его экспрессия постепенно снижается. Мутация гена протеинкиназы не была летальной при культивировании как на обычной среде, так и на среде без азота. Однако, по фенотипу клетки значительно отличались от дикого типа. В стандартных условиях они были мельче, филаменты образовывали агрегаты и оседали на дно даже при умеренном перемешивании. При переносе на среду без азота гетероцисты формировались, но это происходило с задержкой по времени и с меньшей частотой на протяжении всей нити [126].

Таким образом, было показано, что PknA (Alr4366) участвует в регуляции ростовых процессов и необходима при формировании гетероцист. Однако, до сегодняшнего дня, данные, подтверждающие её киназную активность и предполагаемые внутриклеточные субстраты отсутствуют.

PknC (All4813)

PknC – первая экспрессированная, очищенная и исследованная *in vitro* СТПК *Nostoc* [127]. Все прежде описанные ферменты PknA, PknD, PknE были изучены на уровне организмов с использованием мутантных штаммов. Протеинкиназа проявляла способность к автофосфорилированию по остатку треонина, которое зависело от наличия в субдомене II аминокислотных остатков Lys41 и Lys44. Транкированные формы белка, содержавшие в частности только киназный домен, не обладали ферментативной активностью. Учитывая, что PknC имеет протяженный неструктурированный С-конец, и именно эта часть молекулы подвергается автофосфорилированию и регулирует её активность.

В реакции *in vitro* были проверены несколько субстратов. Утверждается, что из «стандартных» экзогенных субстратов PknC способна фосфорилировать Cas. Также, в качестве субстрата был протестирован рекомбинантный белок PII, однако наличие гис-

тидинового тага привело к получению ложноположительного сигнала – PknC фосфорилировала серин, входящий в состав линкера [127].

Других данных для этого белка пока получено не было. Исследований его функций в клетке не проводилось.

PknD (Alr4368)

Протеинкиназа PknD была обнаружена благодаря тому же подходу, что и в случае PknA [4]. Ген *pknD* характеризовался стабильным уровнем экспрессии вне зависимости от присутствия азота в питательной среде или же формы неорганического азота (аммонийной или нитратной). Полученный инсерционный мутант фенотипически не отличался от дикого типа, формировал нормальные гетероцисты с одинаковым распределением по длине филаментов. При культивировании в присутствии неорганического азота в среде мутантные клетки имели сходную с диким типом скорость роста, но при дефиците азота он замедлялся в 5 раз. При этом, инактивация *pknD* не приводила к изменению в активности нитрогеназы в диазотрофных условиях, то есть клетки не утратили способность к фиксации атмосферного азота. Оценка уровня фосфорилирования регуляторного белка PII показала накопление сильно модифицированных форм белка. Таким образом, даже при сохранении способности к формированию гетероцист и активности нитрогеназы, клетки испытывали нехватку азота. Вероятно, что протеинкиназа PknD необходимая для нормального роста цианобактерии в условиях азотфиксации, участвует в транспорте продуктов азотного обмена между гетероцистами и вегетативными клетками [4]. Однако, эта гипотеза требует дальнейшего подтверждения.

PknE (Alr3732)

Согласно транскриптомным данным экспрессия гена *pknE (alr3732)* индуцируется через 8 ч в ответ на недостаток минерального азота [128]. Количество белка в этих условиях, напротив, незначительно снижается через 3 ч и затем снова восстанавливается до исходного уровня [124].

Инсерционный мутант по протеинкиназе PknE был жизнеспособен в нормальных условиях и его ростовые параметры не отличались от дикого типа. В условиях азотного голодания рост тормозился через 4 дня. У мутантного штамма наблюдался нормальный паттерн распределения гетероцист, но их структура была изменена [124]. При длительном культивировании филаменты дефрагментировались и позднее погибали. В работе другой группы были получены иные результаты: полученный мутант имел слегка увеличенную частоту формирования гетероцист с нормальной структурой [129]. При этом сверхэкспрессия протеинкиназы PknE приводила к исчезновению гетероцист даже в условиях азотного голодания.

Помимо изменений в структуре филамента, в клетках мутанта наблюдалось снижение активности нитрогеназы [124]. Этот эффект сохранялся независимо от условий культивирования, но в анаэробных условиях был выражен сильнее. Подобное явление могло бы быть следствием изменения оболочек гетероцист, однако состав структурных гликолипидов у мутанта не отличался от дикого штамма.

Для экспрессии *pknE* необходим цис-регуляторный элемент длиной 118 н.п., который расположен в промоторной области и содержит потенциальный сайт связывания с продуктом гена *hetR* (одного из основных транскрипционных регуляторов в клетках цианобактерий, необходимых для перехода клетки к образованию гетероцист) [129]. На

ранних этапах формирования гетероцист связывание HetR индуцирует экспрессию гена *pknE* (*alr3732*), а на поздних стадиях дифференцировки возросшее количество продукта гена и/или его активность приводит к ингибированию регулятора транскрипции [129]. Киназная активность PknE, потенциальные мишени и её роль в процессе формирования гетероцист на данный момент не исследованы.

PknH (*Alr1336*)

Азотное голодание в течение 8 ч приводило к индукции гена *alr1336* (*pknH*), экспрессия которого достигала своего максимума через 24 ч [130]. Белок PknH детектировался уже через 3 ч после начала стресса, а через 24 ч его содержание было максимально. Причем, его накопление происходило не во всех клетках, а только в гетероцистах. Само название, присвоенное предполагаемому на тот момент ферменту, было дано на основании этого факта – протеинкиназа, экспрессирующаяся в гетероцистах (Protein Kinase expressed in Heterocysts, PknH).

Инсерционный мутант сохранял нормальный рост на среде, содержащей азот, но в условиях голодания рос значительно хуже [130]. Микроскопическое исследование и специфическое окрашивание на полисахариды, проведенные через 24 ч голодания, показали нормальное формирование структур. Экспрессия основных генов, вовлеченных в формирование гетероцист, у мутанта не была изменена. Активность нитрогеназы в мутантном штамме также не изменялась. Однако визуально филаменты мутантов были короче, чем у дикого штамма, и гетероцисты отделялись от вегетативных клеток. Анализ фенотипа комплементанта подтвердил связь наблюдаемых изменений с присутствием этого белка. Исследователями на тот момент был сделан вывод, что протеинкиназа PknH вовлечена в обеспечение контактов гетероцист и вегетативных клеток, но не в их формирование [130].

Эта работа получила свое продолжение спустя несколько лет [131]. В ней было установлено, что формирование укороченных филаментов у мутанта PknH связано скорее с особенностями культивирования (интенсивным барботажем), а не специфическим воздействием мутации. Флуоресцентная микроскопия голодающих в течение продолжительного времени клеток показала, что мутация *pknH* приводит к нарушению паттерна возникновения гетероцист на протяжении нитей. Их формирование началось в соседних клетках и частота их возникновения существенно возрастала. Комплементация гена восстанавливала нормальное протекание этого процесса. Анализ фенотипов клеток с точечными мутациями аспарагиновой кислоты в DFG-мотиве показал его консервативность в составе активного центра PknH. Таким образом, была косвенно подтверждена протеинкиназная активность PknH [131].

Также как для *pknE* (см. выше), для *pknH* была показана зависимость индукции транскрипции от наличия белка-регулятора HetR [129]. Однако в структуре промоторной области гена *pknH* отсутствует последовательность связывания HetR. Поэтому было предположено, что экспрессия гена *pknH* контролируется каким-то дополнительным транскрипционным фактором, который, в свою очередь, регулируется HetR. Интересно, что PknH реципрокно регулирует *hetR*. Оба гена активно экспрессируются на ранних стадиях азотного голодания в дифференцирующихся клетках. Предполагается, что в гетероцисту в норме развиваются только те, в которых баланс PknH/HetR сдвинут в сторону накопления HetR, а в вегетативную клетку – в сторону PknH. Однако, эта гипотеза требует более детального изучения и экспериментального подтверждения.

Pkn22 (Alr2502, PbH1)

Роль Pkn22 (Alr2502, PbH1) *Nostoc* изучалась мутантном штамме в условиях дефицита железа в среде и окислительного стресса [132]. Экспрессия гена *alr2502* значительно увеличивалась при голодании по железу в течение 60 мин; в условиях окислительного стресса (при добавлении метилвиологена) через 15 мин. Это позволило предположить участие Pkn22 в восприятии и/или ответе на эти стрессорные факторы. Рост мутанта в нормальных условиях и его фенотип не отличались от дикого типа. Однако, он сильно отставал в скорости роста при недостатке железа в среде [132].

Анализ транскриптома в условиях недостатка железа показал, что у мутанта практически отсутствует индукция гена *isiA*. Этот ген кодирует хлорофилл-связывающий белок CP43, который может функционировать как дополнительный антенный комплекс для фотосистемы I (ФСІ), а также участвовать в защите фотосинтетического аппарата от фототингибирования [133]. У мутанта экспрессия *isiA* восстанавливалась только через 24 ч голодания. Что вероятно связано с запуском адаптационных процессов, регулируемых иными сигнальными системами. При этом, индукция еще одного гена, индуцируемого в норме при недостатке железа – *isiB* не зависела от наличия гена протеинкиназы.

Накопление белка IsiA – важный этап адаптации клеток к условиям недостатка железа. Сравнение спектров флуоресценции целых клеток при 77К показало отсутствие характеристического пика в клетках мутанта по Pkn22, что показывает её участие в ответе клетки на дефицит железа [132, 134].

Поскольку активные формы кислорода являются универсальным триггером стрессового ответа цианобактерий [135], то индукция Pkn22 в присутствии метилвиологена, индуцирующего окислительный стресс, позволила предположить её участие в ответе на несколько видов стресса. Наличие в промоторной области *alr2502* сайтов связывания таких транскрипционных регуляторов как FnrA и NtcA, которое было показано *in vitro*, подтвердило роль Pkn22 как точки пересечения ответа на разные стрессовые факторы [136].

Транскриптомный анализ мутанта по *alr2502* показал значимые изменения в экспрессии 26 генов при окислительном стрессе, вызванным воздействием перекиси водорода, и более 100 генов при азотном голодании. Интересно, что спектры индуцируемых генов практически не пересекались, указывая на независимый характер восприятия и/или передачи сигналов, осуществляемых посредством этой протеинкиназы [136].

Позднее роль Pkn22 в ответе на азотное голодание была исследована более детально [137]. Мутант был не способен к росту в условиях голодания, поскольку был нарушен процесс образования гетероцист: их формирование начиналось позже и их количество было существенно меньшим, чем у дикого типа. Также была показана важность функционирования Pkn22 непосредственно как протеинкиназы. Точечная мутация важного для катализа остатка K63 в белке привела к тому же эффекту, что и делеция всего гена.

В дрожжевой двугибридной системе было показано, что Pkn22 взаимодействует с транскрипционным фактором HetR. Методами фосфопротеомного анализа было установлено, что Pkn22 фосфорилирует HetR по остатку S130. Точечные замены этой аминокислоты на аланин привели к неспособности образовывать гетероцисты, а на аспарагиновую кислоту – к их удвоенному количеству. Таким образом, в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo* была показана роль Pkn22 как активной протеинкиназы [137].

Примечательным является тот факт, что мутация гена протеинкиназы приводит к задержке в переходе вегетативных клеток цианобактерии в гетероцисты, а увеличение количества транскрипционного фактора HetR способно восстанавливать нормальный процесс. Таким образом, можно предположить наличие других протеинкиназ, которые способны модифицировать этот белок.

HepS (AlI2760)

Скрининг библиотеки мутантов *Nostoc*, росших на среде с неорганическим азотом, но погибавших при культивировании на среде без азота, привел к обнаружению группы неизвестных ранее Fox генов (nitrogen Fixation in the presence of O₂Ygen), одним из которых оказался *hepS (all2760)* [138]. Их нежизнеспособность была связана с отсутствием полноценных функциональных гетероцист и невозможностью фиксировать атмосферный азот. Нарушение процесса формирования гетероцист было связано с отсутствием полисахаридного Hep слоя, при сохранении гликолипидного Hgl, что было подтверждено на уровне морфологии (ТЭМ), синтеза гликолипидов (ТСХ) и полисахаридов (окраска клеток альцианом) [138]. При этом дефицит минерального азота в течение 14 ч не приводил к индукции генов синтеза гликолипидного слоя у мутанта по *all2760*, что может объясняться регуляцией на уровне активности белков его биосинтеза [139].

Стоит отметить, что данные относительно влияния HepS на экспрессию генов демонстрируют ее возможную регуляторную функцию в клетке в процессе перехода к азотфиксации. Однако, они не подтверждают ее роль как протеинкиназы, а ее белки-мишени до сих пор не установлены.

HstK (Alr2258)

HstK – первая из исследованных протеинкиназ цианобактерий, относящихся к группе «гибридных» [50]. Об особенностях их организации упоминалось выше. Стоит отметить, что протеинкиназы подобной структуры также встречаются царстве грибов [140].

Протеинкиназа HstK была случайно обнаружена в ходе исследования другого белка этого же семейства (PknB), поскольку оба гена расположены в непосредственной близости на хромосоме [51]. HstK и PknB были экспрессированы в гетерологичной системе и была показана их способность к автофосфорилированию. В силу сложной организации HstK ее свойства как протеинкиназы изучали не на полноразмерном белке, а только на СТПК домене. В работе был использован метод комплементации: PknB и киназный домен HstK, экспрессированные в *Saccharomyces cerevisiae*, были способны восстанавливать работу Hog1p сигнального пути, активация которого необходима при ответе на осмотический стресс в дрожжах [141]. Таким образом, была показана их функциональность и возможность участвовать в передаче сигналов в эукариотической клетке. Функциональность второго киназного домена до сих пор не показана.

Pkn41 (Alr0709) и Pkn42 (Alr0710)

Два гена протеинкиназ *alr0709* и *alr0710*, также принадлежащих к семейству HstK, расположены последовательно на хромосоме и транскрибируются одновременно. Их экспрессия не зависит от формы азота, присутствующей в среде при культивировании. Однако сильная индукция обоих генов наблюдается в ответ на недостаток железа в питательной среде исключительно в присутствии аммония. Было показано, что их индук-

ция регулируется путем связывания транскрипционного фактора NtcA с промоторной областью *pkn41* [142].

Штаммы мутантов по каждому из этих генов фенотипически были схожи с диким типом во всех условиях выращивания. Исключение составили эксперименты с сочетанием двух факторов – недостаток железа и отсутствие минерального азота в среде, что приводило к замедлению роста. Также мутанты характеризовались сниженным уровнем накопления железа в нормальных условиях роста и индукцией генов, связанных с голоданием по железу (*nifJ1* и *nifJ2*) [142].

Разумеется, нужны более детальные исследования, чтобы подтвердить именно протеинкиназную активность Pkn41 и Pkn42, а также биохимический механизм их действия.

Pkn30 (All3691) и Pkn44 (All1625)

Еще одним примером HstK протеинкиназ у *Nostoc* являются белки Pkn30 и Pkn44 [32]. Делеция по гену каждой из этих киназ не приводила к видимым изменениям фенотипа. Двойной мутант характеризовался нарушением роста в diaзотрофных условиях. Детальное микроскопическое исследование показало, что мутант относится к Hgl⁻ Hcp⁺ типу, то есть у него отсутствует гликолипидный слой, но сохраняется полисахаридный. Тонкослойная хроматография подтвердила присутствие только одного из гликолипидов специфичных для гетероцист – минорного гликолипида HGL2. Такие глобальные морфологические изменения закономерно сказываются на проницаемости кислорода через оболочку гетероцист, что ингибирует активность нитрогеназы. При этом механизм взаимодействия этих протеинкиназ, объясняющий наблюдаемые эффекты, до сих пор не исследован.

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные работы по исследованию СТПК у цианобактерий *Synechocystis* и *Nostoc* демонстрируют многообразие подходов и методов, используемых для их изучения. Однако, следует отметить, что имеющиеся данные в целом фрагментарны и освещают лишь отдельные аспекты их структуры, физико-химических параметров, их роль в клетке и взаимодействие с другими регуляторными системами. Омиксные методы позволяют глубже понять взаимодействие путей передачи сигналов в живой клетки и получить новую информацию о механизмах регуляции.

Пока остаются малоизученными такие аспекты, как консервативные мотивы фосфорилирования для каждой из киназ, влияние фосфорилирования самих киназ на их активность, локализация киназ в клетке, наличие у них регуляторных белков, а также роль некаталитических доменов. Эти и целый ряд других вопросов ещё далек от решения и стоит перед исследователями

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант РНФ № 21-74-30003) и частичной поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042700043-9).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang, X., Ge, H., Zhang, Y., Wang, Y. & Zhang, P. (2022) Ser/Thr protein kinase spki affects photosynthetic efficiency in *Synechocystis* sp. PCC 6803 upon salt stress, *Life*. **12**. doi: 10.3390/life12050713.
2. Forchhammer, K. & Tandeau de Marsac, N. (1995) Phosphorylation of the PII protein (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: analysis of in vitro kinase activity, *Journal of bacteriology*. **177**, 5812–5817. doi: 10.1128/jb.177.20.5812-5817.1995.
3. Spat, P., Macek, B. & Forchhammer, K. (2015) Phosphoproteome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its dynamics during nitrogen starvation, *Frontiers in microbiology*. **6**, 248. doi: 10.3389/fmicb.2015.00248.
4. Zhang, C.C. & Libs, L. (1998) Cloning and characterisation of the *pknD* gene encoding an eukaryotic-type protein kinase in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120, *Molecular & general genetics : MGG*. **258**, 26–33. doi: 10.1007/s004380050703.
5. Murata, N. & Los, D.A. (2006) Histidine kinase Hik33 is an important participant in cold-signal transduction in cyanobacteria, *Physiologia Plantarum*. **126**, 17–27. doi: https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00608.x.
6. Kamei, A., Yuasa, T., Orikawa, K., Geng, X.X. & Ikeuchi, M. (2001) A eukaryotic-type protein kinase, SpkA, is required for normal motility of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, *Journal of bacteriology*. **183**, 1505–1510. doi: 10.1128/JB.183.5.1505-1510.2001.
7. Zorina, A.A., Bedbenov, V.S., Novikova, G.V., Panichkin, V.B. & Los, D.A. (2014) [Involvement of serine/threonine protein kinases in cold stress response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: functional characterization of a protein kinase Spke], *Molekuliarnaia biologiya*. **48**, 452–462. doi.
8. Lim, S. (2023) A review of the bacterial phosphoproteomes of beneficial microbes, *Microorganisms*. **11**. doi: 10.3390/microorganisms11040931.
9. Mijakovic, I., Grangeasse, C. & Turgay, K. (2016) Exploring the diversity of protein modifications: special bacterial phosphorylation systems, *FEMS microbiology reviews*. **40**, 398–417. doi: 10.1093/femsre/fuw003.
10. Macek, B., Forchhammer, K., Hardouin, J., Weber-Ban, E., Grangeasse, C. & Mijakovic, I. (2019) Protein post-translational modifications in bacteria, *Nature reviews Microbiology*. **17**, 651–664. doi: 10.1038/s41579-019-0243-0.
11. Potel, C.M., Lin, M.H., Heck, A.J.R. & Lemeer, S. (2018) Defeating major contaminants in Fe(3+)- Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) phosphopeptide enrichment, *Molecular & cellular proteomics : MCP*. **17**, 1028–1034. doi: 10.1074/mcp.TIR117.000518.
12. Prust, N., van Breugel, P.C. & Lemeer, S. (2022) Widespread arginine phosphorylation in *Staphylococcus aureus*, *Molecular & cellular proteomics : MCP*. **21**, 100232. doi: 10.1016/j.mcpro.2022.100232.
13. Garcia-Garcia, T., Douche, T., Giai Gianetto, Q., Poncet, S., El Omrani, N., Smits, W.K., Cuenot, E., Matondo, M. & Martin-Verstraete, I. (2022) In-depth characterization of the *Clostridioides difficile* phosphoproteome to identify Ser/Thr kinase substrates, *Molecular & cellular proteomics : MCP*. **21**, 100428. doi: 10.1016/j.mcpro.2022.100428.
14. Chen, Z., Zhan, J., Chen, Y., Yang, M., He, C., Ge, F. & Wang, Q. (2015) Effects of phosphorylation of beta subunits of phycocyanins on state transition in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Plant & cell physiology*. **56**, 1997–2013. doi: 10.1093/pcp/pcv118.
15. Liang, W., Yan, F., Wang, M., Li, X., Zhang, Z., Ma, X., Hu, J., Wang, J. & Wang, L. (2021) Comprehensive phosphoproteomic analysis of *Nostoc flagelliforme* in response to dehydration provides insights into plant ROS signaling transduction, *ACS omega*. **6**, 13554–13566. doi: 10.1021/acsomega.0c06111.

16. Bakal, C.J. & Davies, J.E. (2000) No longer an exclusive club: eukaryotic signalling domains in bacteria, *Trends in cell biology*. **10**, 32–38. doi: 10.1016/s0962-8924(99)01681-5.
17. Kennelly, P. J. (2002) Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective, *FEMS microbiology letters*. **206**, 1–8. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb10978.x.
18. Lundquist, P.K., Davis, J.I. & van Wijk, K.J. (2012) ABC1K atypical kinases in plants: filling the organellar kinase void, *Trends in plant science*. **17**, 546–555. doi: 10.1016/j.tplants.2012.05.010.
19. Pereira, S.F., Goss, L. & Dworkin, J. (2011) Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria, *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. **75**, 192–212. doi: 10.1128/MMBR.00042-10.
20. Stancik, I.A., Sestak, M.S., Ji, B., Axelson-Fisk, M., Franjevic, D., Jers, C., Domazet-Loso, T. & Mijakovic, I. (2018) Serine/Threonine protein kinases from bacteria, archaea and eukarya share a common evolutionary origin deeply rooted in the tree of life, *Journal of molecular biology*. **430**, 27–32. doi: 10.1016/j.jmb.2017.11.004.
21. Gizzio, J., Thakur, A., Haldane, A., Post, C.B. & Levy, R.M. (2024) Evolutionary sequence and structural basis for the distinct conformational landscapes of Tyr and Ser/Thr kinases, *Nature communications*. **15**, 6545. doi: 10.1038/s41467-024-50812-0.
22. Grangeasse, C., Nessler, S. & Mijakovic, I. (2012) Bacterial tyrosine kinases: evolution, biological function and structural insights, *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. **367**, 2640–2655. doi: 10.1098/rstb.2011.0424.
23. Hanks, S.K. & Quinn, A.M. (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members, *Methods in enzymology*. **200**, 38–62. doi: 10.1016/0076-6879(91)00126-h.
24. Pawson, T. (1994) Introduction: protein kinases, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. **8**, 1112–1113. doi: 10.1096/fasebj.8.14.7958615.
25. Hanks, S.K. & Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. **9**, 576–596. doi: 10.1096/fasebj.9.5.576.
26. Janczarek, M., Vinardell, J.M., Lipa, P. & Karas, M. (2018) Hanks-type serine/threonine protein kinases and phosphatases in bacteria: roles in signaling and adaptation to various environments, *International journal of molecular sciences*. **19**. doi: 10.3390/ijms19102872.
27. Scheeff, E.D. & Bourne, P.E. (2005) Structural evolution of the protein kinase-like superfamily, *PLoS computational biology*. **1**, e49. doi: 10.1371/journal.pcbi.0010049.
28. Reinhardt, R. & Leonard, T.A. (2023) A critical evaluation of protein kinase regulation by activation loop autophosphorylation, *eLife*. **12**. doi: 10.7554/eLife.88210.
29. Leonard, C.J., Aravind, L. & Koonin, E.V. (1998) Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the «eukaryotic» protein kinase superfamily, *Genome research*. **8**, 1038–1047. doi: 10.1101/gr.8.10.1038.
30. Shi, L., Potts, M. & Kennelly, P.J. (1998) The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait, *FEMS microbiology reviews*. **22**, 229–253. doi: 10.1111/j.1574-6976.1998.tb00369.x.
31. Xu, W. & Wang, Y. (2019) Sequences, domain architectures, and biological functions of the serine/threonine and histidine kinases in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Applied biochemistry and biotechnology*. **188**, 1022–1065. doi: 10.1007/s12010-019-02971-w.
32. Shi, L., Li, J. H., Cheng, Y., Wang, L., Chen, W. L. & Zhang, C.C. (2007) Two genes encoding protein kinases of the HstK family are involved in synthesis of the minor heterocyst-specific glycolipid in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *Journal of bacteriology*. **189**, 5075–5081. doi: 10.1128/JB.00323-07.

33. Oruganty, K. & Kannan, N. (2012) Design principles underpinning the regulatory diversity of protein kinases, *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. **367**, 2529–2539. doi: 10.1098/rstb.2012.0015.
34. Yin, Z., Shen, D., Zhao, Y., Peng, H., Liu, J. & Dou, D. (2023) Cross-kingdom analyses of transmembrane protein kinases show their functional diversity and distinct origins in prokaryotes, *Computational and structural biotechnology journal*. **21**, 4070–4078. doi: 10.1016/j.csbj.2023.08.007.
35. Zorina, A., Stepanchenko, N., Novikova, G.V., Sinetova, M., Panichkin, V.B., Moshkov, I.E., Zinchenko, V.V., Shestakov, S.V., Suzuki, I., Murata, N. & Los, D.A. (2011) Eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases SpkC/F/K are involved in phosphorylation of GroES in the cyanobacterium *Synechocystis*, *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*. **18**, 137–151. doi: 10.1093/dnares/dsr006.
36. Letunic, I., Khedkar, S. & Bork, P. (2021) SMART: recent updates, new developments and status in 2020, *Nucleic acids research*. **49**, D458–D460. doi: 10.1093/nar/gkaa937.
37. Zorina, A.A., Novikova, G.V., Gusev, N.B., Leusenkov, A.V., Los, D.A. & Klychnikov, O.I. (2023) SpkH (SI10005) from *Synechocystis* sp. PCC 6803 is an active Mn⁽²⁺⁾-dependent Ser kinase, *Biochimie*. **213**, 114–122. doi: 10.1016/j.biochi.2023.05.006.
38. Bateman, A., Murzin, A.G. & Teichmann, S.A. (1998) Structure and distribution of pentapeptide repeats in bacteria, *Protein science : a publication of the Protein Society*. **7**, 1477–1480. doi: 10.1002/pro.5560070625.
39. Zhang, R. & Kennedy, M.A. (2021) Current Understanding of the Structure and Function of Pentapeptide Repeat Proteins, *Biomolecules*. **11**. doi: 10.3390/biom11050638.
40. D’Aquino, J.A. & Ringe, D. (2003) Determinants of the SRC homology domain 3-like fold, *Journal of bacteriology*. **185**, 4081–4086. doi: 10.1128/jb.185.14.4081-4086.2003.
41. Kurochkina, N. & Guha, U. (2013) SH3 domains: modules of protein-protein interactions, *Biophysical reviews*. **5**, 29–39. doi: 10.1007/s12551-012-0081-z.
42. Jain, B.P. & Pandey, S. (2018) WD40 repeat proteins: signalling scaffold with diverse functions, *The protein journal*. **37**, 391–406. doi: 10.1007/s10930-018-9785-7.
43. Kamei, A., Yuasa, T., Geng, X. & Ikeuchi, M. (2002) Biochemical examination of the potential eukaryotic-type protein kinase genes in the complete genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*. **9**, 71–78. doi: 10.1093/dnares/9.3.71.
44. Kwon, A., Scott, S., Taujale, R., Yeung, W., Kochut, K.J., Evers, P.A. & Kannan, N. (2019) Tracing the origin and evolution of pseudokinases across the tree of life, *Science signaling*. **12**. doi: 10.1126/scisignal.aav3810.
45. Jeffery, C.J. (2023) Current successes and remaining challenges in protein function prediction, *Frontiers in bioinformatics*. **3**, 1222182. doi: 10.3389/fbinf.2023.1222182.
46. Brauer, E.K., Ahsan, N., Popescu, G.V., Thelen, J.J. & Popescu, S.C. (2022) Back from the dead: the atypical kinase activity of a pseudokinase regulator of cation fluxes during inducible immunity, *Frontiers in plant science*. **13**, 931324. doi: 10.3389/fpls.2022.931324.
47. Goldberg, T. & Sreelatha, A. (2023) Emerging functions of pseudoenzymes, *The Biochemical journal*. **480**, 715–728. doi: 10.1042/BCJ20220373.
48. Ohmori, M., Ikeuchi, M., Sato, N., Wolk, P., Kaneko, T., Ogawa, T., Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okamoto, S., Yoshimura, H., Katoh, H., Fujisawa, T., Ehira, S., Kamei, A., Yoshihara, S., Narikawa, R. & Tabat, S. (2001) Characterization of genes encoding multi-domain proteins in the genome of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*. **8**, 271–284. doi: 10.1093/dnares/8.6.271.
49. Krupa, A. & Srinivasan, N. (2005) Diversity in domain architectures of Ser/Thr kinases and their homologues in prokaryotes, *BMC genomics*. **6**, 129. doi: 10.1186/1471-2164-6-129.

50. Wang, L., Sun, Y.P., Chen, W. L., Li, J.H. & Zhang, C.C. (2002) Genomic analysis of protein kinases, protein phosphatases and two-component regulatory systems of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *FEMS microbiology letters*. **217**, 155–165. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11469.x.
51. Phalip, V., Li, J.H. & Zhang, C.C. (2001) HstK, a cyanobacterial protein with both a serine/threonine kinase domain and a histidine kinase domain: implication for the mechanism of signal transduction, *The Biochemical journal*. **360**, 639–644. doi: 10.1042/0264-6021:3600639.
52. Baers, L.L., Breckels, L.M., Mills, L.A., Gatto, L., Deery, M.J., Stevens, T.J., Howe, C.J., Lilley, K.S. & Lea-Smith, D.J. (2019) Proteome mapping of a cyanobacterium reveals distinct compartment organization and cell-dispersed metabolism, *Plant physiology*. **181**, 1721–1738. doi: 10.1104/pp.19.00897.
53. Liberton, M., Saha, R., Jacobs, J.M., Nguyen, A. Y., Gritsenko, M.A., Smith, R.D., Koppelaar, D.W. & Pakrasi, H.B. (2016) Global proteomic analysis reveals an exclusive role of thylakoid membranes in bioenergetics of a model cyanobacterium, *Molecular & cellular proteomics : MCP*. **15**, 2021–2032. doi: 10.1074/mcp.M115.057240.
54. Evans, S.L., Al-Hazeem, M.M.J., Mann, D., Smetacek, N., Beavil, A.J., Sun, Y., Chen, T., Dykes, G.F., Liu, L.N. & Bergeron, J.R.C. (2023) Single-particle cryo-EM analysis of the shell architecture and internal organization of an intact alpha-carboxysome, *Structure*. **31**, 677–688 e4. doi: 10.1016/j.str.2023.03.008.
55. Allen, M.M. (1984) Cyanobacterial cell inclusions, *Annual review of microbiology*. **38**, 1–25. doi: 10.1146/annurev.mi.38.100184.000245.
56. Shively, J.M., Cannon, G.C., Heinhorst, S., Bryant, D.A., DasSarma, S., Bazylinski, D., Preiss, J., Steinbüchel, A., Docampo, R. & Dahl, C. (2011) Bacterial and archaeal inclusions in *eLS*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000302.pub3>.
57. Aebersold, R. & Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics, *Nature*. **422**, 198–207. doi: 10.1038/nature01511.
58. Ong, S.E. & Mann, M. (2005) Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative, *Nature chemical biology*. **1**, 252–262. doi: 10.1038/nchembio736.
59. Bantscheff, M., Lemeer, S., Savitski, M.M. & Kuster, B. (2012) Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present, *Analytical and bioanalytical chemistry*. **404**, 939–965. doi: 10.1007/s00216-012-6203-4.
60. Bauw, G., Van Damme, J., Puype, M., Vandekerckhove, J., Gesser, B., Ratz, G.P., Lauridsen, J.B. & Celis, J.E. (1989) Protein-electroblotting and -microsequencing strategies in generating protein data bases from two-dimensional gels, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **86**, 7701–7705. doi: 10.1073/pnas.86.20.7701.
61. O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *The Journal of biological chemistry*. **250**, 4007–4021. doi.
62. Henzel, W.J., Billeci, T.M., Stults, J.T., Wong, S.C., Grimley, C. & Watanabe, C. (1993) Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **90**, 5011–5015. doi: 10.1073/pnas.90.11.5011.
63. Zhu, K., Zhao, J., Lubman, D.M., Miller, F.R. & Barder, T.J. (2005) Protein *pI* shifts due to posttranslational modifications in the separation and characterization of proteins, *Analytical chemistry*. **77**, 2745–2755. doi: 10.1021/ac048494w.
64. Rogowska-Wrzęsinska, A., Le Bihan, M.C., Thaysen-Andersen, M. & Roepstorff, P. (2013) 2D gels still have a niche in proteomics, *Journal of proteomics*. **88**, 4–13. doi: 10.1016/j.jprot.2013.01.010.
65. Kuyama, H., Toda, C., Watanabe, M., Tanaka, K. & Nishimura, O. (2003) An efficient chemical method for dephosphorylation of phosphopeptides, *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*. **17**, 1493–1496. doi: 10.1002/rcm.1078.

66. Lopez-Pedrouso, M., Alonso, J. & Zapata, C. (2014) Evidence for phosphorylation of the major seed storage protein of the common bean and its phosphorylation-dependent degradation during germination, *Plant molecular biology*. **84**, 415–428. doi: 10.1007/s11103-013-0141-1.
67. Magdeldin, S., Enany, S., Yoshida, Y., Xu, B., Zhang, Y., Zureena, Z., Lokamani, I., Yaoita, E. & Yamamoto, T. (2014) Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis, *Clinical proteomics*. **11**, 16. doi: 10.1186/1559-0275-11-16.
68. Unlu, M., Morgan, M.E. & Minden, J.S. (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts, *Electrophoresis*. **18**, 2071–2077. doi: 10.1002/elps.1150181133.
69. Huang, C., Duan, X., Ge, H., Xiao, Z., Zheng, L., Wang, G., Dong, J., Wang, Y., Zhang, Y., Huang, X., An, H., Xu, W. & Wang, Y. (2023) Parallel proteomic comparison of mutants with altered carbon metabolism reveals Hik8 regulation of P(II) phosphorylation and glycogen accumulation in a cyanobacterium, *Molecular & cellular proteomics : MCP*. **22**, 100582. doi: 10.1016/j.mcpro.2023.100582.
70. Slabas, A.R., Suzuki, I., Murata, N., Simon, W.J. & Hall, J.J. (2006) Proteomic analysis of the heat shock response in *Synechocystis* PCC6803 and a thermally tolerant knockout strain lacking the histidine kinase 34 gene, *Proteomics*. **6**, 845–864. doi: 10.1002/pmic.200500196.
71. Li, T., Yang, H.M., Cui, S.X., Suzuki, I., Zhang, L.F., Li, L., Bo, T.T., Wang, J., Murata, N. & Huang, F. (2012) Proteomic study of the impact of Hik33 mutation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 under normal and salt stress conditions, *Journal of proteome research*. **11**, 502–514. doi: 10.1021/pr200811s.
72. Mikkat, S., Fulda, S. & Hagemann, M. (2014) A 2D gel electrophoresis-based snapshot of the phosphoproteome in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, *Microbiology*. **160**, 296–306. doi: 10.1099/mic.0.074443-0.
73. Mann, M. & Wilm, M. (1994) Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags, *Analytical chemistry*. **66**, 4390–4399. doi: 10.1021/ac00096a002.
74. Saveliev, S., Bratz, M., Zubarev, R., Szapacs, M., Budamgunta, H. & Urh, M. (2013) Trypsin/Lys-C protease mix for enhanced protein mass spectrometry analysis, *Nature Methods*. **10**, i–ii. doi: 10.1038/nmeth.f.371.
75. Chen, E.I., Cociorva, D., Norris, J.L. & Yates, J.R., 3rd (2007) Optimization of mass spectrometry-compatible surfactants for shotgun proteomics, *Journal of proteome research*. **6**, 2529–2538. doi: 10.1021/pr060682a.
76. Wiśniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N. & Mann, M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis, *Nature Methods*. **6**, 359–362. doi: 10.1038/nmeth.1322.
77. James, P., Quadroni, M., Carafoli, E. & Gonnet, G. (1993) Protein identification by mass profile fingerprinting, *Biochemical and biophysical research communications*. **195**, 58–64. doi: 10.1006/bbrc.1993.2009.
78. Yates, J.R., 3rd, Speicher, S., Griffin, P.R. & Hunkapiller, T. (1993) Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification, *Analytical biochemistry*. **214**, 397–408. doi: 10.1006/abio.1993.1514.
79. Abele, M., Doll, E., Bayer, F.P., Meng, C., Lomp, N., Neuhaus, K., Scherer, S., Kuster, B. & Ludwig, C. (2023) Unified workflow for the rapid and in-depth characterization of bacterial proteomes, *Molecular & cellular proteomics: MCP*. **22**, 100612. doi: 10.1016/j.mcpro.2023.100612.
80. Thingholm, T.E. & Larsen, M.R. (2016) Phosphopeptide enrichment by immobilized metal affinity chromatography, *Methods in molecular biology*. **1355**, 123–133. doi: 10.1007/978-1-4939-3049-4_8.
81. Pinkse, M.W., Uitto, P.M., Hilhorst, M.J., Ooms, B. & Heck, A.J. (2004) Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns, *Analytical chemistry*. **76**, 3935–3943. doi: 10.1021/ac0498617.

82. Barske, T., Spat, P., Schubert, H., Walke, P., Macek, B. & Hagemann, M. (2023) The role of serine/threonine-specific protein kinases in cyanobacteria - SpkB is involved in acclimation to fluctuating conditions in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Molecular & cellular proteomics : MCP*. **22**, 100656. doi: 10.1016/j.mcpro.2023.100656.
83. Spat, P., Barske, T., Macek, B. & Hagemann, M. (2021) Alterations in the CO₂ availability induce alterations in the phosphoproteome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *The New phytologist*. **231**, 1123–1137. doi: 10.1111/nph.17423.
84. Yue, X., Schunter, A. & Hummon, A.B. (2015) Comparing multistep immobilized metal affinity chromatography and multistep TiO₂ methods for phosphopeptide enrichment, *Analytical chemistry*. **87**, 8837–8844. doi: 10.1021/acs.analchem.5b01833.
85. Thingholm, T.E., Jensen, O.N., Robinson, P.J. & Larsen, M.R. (2008) SIMAC (sequential elution from IMAC), a phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides, *Molecular & cellular proteomics : MCP*. **7**, 661–671. doi: 10.1074/mcp.M700362-MCP200.
86. Matheron, L., van den Toorn, H., Heck, A.J. & Mohammed, S. (2014) Characterization of biases in phosphopeptide enrichment by Ti⁴⁺-immobilized metal affinity chromatography and TiO₂ using a massive synthetic library and human cell digests, *Analytical chemistry*. **86**, 8312–8320. doi: 10.1021/ac501803z.
87. Megger, D.A., Bracht, T., Meyer, H.E. & Sitek, B. (2013) Label-free quantification in clinical proteomics, *Biochimica et biophysica acta*. **1834**, 1581–1590. doi: 10.1016/j.bbapap.2013.04.001.
88. Fedorov, I.I., Protasov, S.A., Tarasova, I.A. & Gorshkov, M.V. (2024) Ultrafast Proteomics, *Biochemistry (Moscow)*. **89**, 1349–1361. doi: 10.1134/S0006297924080017.
89. Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J. & Mann, M. (2005) Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein, *Molecular & cellular proteomics : MCP*. **4**, 1265–1272. doi: 10.1074/mcp.M500061-MCP200.
90. Lundgren, D.H., Hwang, S.I., Wu, L. & Han, D.K. (2010) Role of spectral counting in quantitative proteomics, *Expert review of proteomics*. **7**, 39–53. doi: 10.1586/epr.09.69.
91. Ludwig, C., Gillet, L., Rosenberger, G., Amon, S., Collins, B. C. & Aebersold, R. (2018) Data-independent acquisition-based SWATH-MS for quantitative proteomics: a tutorial, *Molecular systems biology*. **14**, e8126. doi: 10.15252/msb.20178126.
92. Wang, J., Huang, X., Ge, H., Wang, Y., Chen, W., Zheng, L., Huang, C., Yang, H., Li, L., Sui, N., Wang, Y., Zhang, Y., Lu, D., Fang, L., Xu, W., Jiang, Y., Huang, F., and Wang, Y. (2022) The quantitative proteome atlas of a model cyanobacterium, *J. Genet. Genom.*, **49**, 96–108, doi: 10.1016/j.jgg.2021.09.007.
93. Gillet, L.C., Navarro, P., Tate, S., Rost, H., Selevsek, N., Reiter, L., Bonner, R. & Aebersold, R. (2012) Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis, *Molecular & cellular proteomics : MCP*. **11**, O111 016717. doi: 10.1074/mcp.O111.016717.
94. Lange, V., Picotti, P., Domon, B. & Aebersold, R. (2008) Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial, *Molecular systems biology*. **4**, 222. doi: 10.1038/msb.2008.61.
95. Kwon, D., Park, J.-M., Duong, V.-A., Hong, S.-J., Cho, B.-K., Lee, C.-G., Choi, H.-K., Kim, D.-M. & Lee, H. (2020) Comparative proteomic profiling of marine and freshwater *synechocystis* strains using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Marine Science and Engineering*. **8**, 790. doi.
96. Geiger, T., Wisniewski, J.R., Cox, J., Zanivan, S., Kruger, M., Ishihama, Y. & Mann, M. (2011) Use of stable isotope labeling by amino acids in cell culture as a spike-in standard in quantitative proteomics, *Nature protocols*. **6**, 147–157. doi: 10.1038/nprot.2010.192.
97. Клычников, О.И., Корчинская, В.Ю. & Карлов, В.Д. (2024) Method for quantitative detection of isoforms of translation initiation factors 4E in potato leaf tissues using multiple reaction monitoring, *Масс-спектрометрия*. **1**. doi: 10.25703/ms.2024.21.02.

98. Mirgorodskaya, O.A., Kozmin, Y.P., Titov, M.I., Korner, R., Sonksen, C.P. & Roepstorff, P. (2000) Quantitation of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using ^{18}O -labeled internal standards, *Rapid communications in mass spectrometry* : RCM. **14**, 1226–1232. doi: 10.1002/1097-0231(20000730)14:14<1226::AID-RCM14>3.0.CO;2-V.
99. Sivanich, M.K., Gu, T.J., Tabang, D.N. & Li, L. (2022) Recent advances in isobaric labeling and applications in quantitative proteomics, *Proteomics*. **22**, e2100256. doi: 10.1002/pmic.202100256.
100. Fuszard, M.A., Ow, S.Y., Gan, C.S., Noirel, J., Ternan, N.G., McMullan, G., Biggs, C.A., Reardon, K.F. & Wright, P.C. (2013) The quantitative proteomic response of *Synechocystis* sp. PCC6803 to phosphate acclimation, *Aquatic biosystems*. **9**, 5. doi: 10.1186/2046-9063-9-5.
101. Huang, S., Chen, L., Te, R., Qiao, J., Wang, J. & Zhang, W. (2013) Complementary iTRAQ proteomics and RNA-seq transcriptomics reveal multiple levels of regulation in response to nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Molecular bioSystems*. **9**, 2565–2574. doi: 10.1039/c3mb70188c.
102. Li, Q., Chang, R., Sun, Y. & Li, B. (2018) Correction: iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of *Spirulina platensis* in response to low temperature stress, *PloS one*. **13**, e0196442. doi: 10.1371/journal.pone.0196442.
103. Flores, C., Santos, M., Pereira, S.B., Mota, R., Rossi, F., De Philippis, R., Couto, N., Karunakaran, E., Wright, P.C., Oliveira, P. & Tamagnini, P. (2019) The alternative sigma factor SigF is a key player in the control of secretion mechanisms in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Environmental microbiology*. **21**, 343–359. doi: 10.1111/1462-2920.14465.
104. Shenoy, A. & Geiger, T. (2015) Super-SILAC: current trends and future perspectives, *Expert review of proteomics*. **12**, 13–19. doi: 10.1586/14789450.2015.982538.
105. Gygi, S.P., Rist, B., Griffin, T.J., Eng, J. & Aebersold, R. (2002) Proteome analysis of low-abundance proteins using multidimensional chromatography and isotope-coded affinity tags, *Journal of proteome research*. **1**, 47–54. doi: 10.1021/pr015509n.
106. Sethuraman, M., McComb, M.E., Huang, H., Huang, S., Heibeck, T., Costello, C.E. & Cohen, R.A. (2004) Isotope-coded affinity tag (ICAT) approach to redox proteomics: identification and quantitation of oxidant-sensitive cysteine thiols in complex protein mixtures, *Journal of proteome research*. **3**, 1228–1233. doi: 10.1021/pr049887e.
107. Kukulage, D.S.K., Yapa Abeywardana, M., Matarage Don, N.N.J., Hu, R.M., Shishikura, K., Matthews, M.L. & Ahn, Y.H. (2023) Chemoproteomic strategy identified p120-catenin glutathionylation regulates E-cadherin degradation and cell migration, *Cell chemical biology*. **30**, 1542–1556 e9. doi: 10.1016/j.chembiol.2023.08.004.
108. Boersema, P.J., Raijmakers, R., Lemeer, S., Mohammed, S. & Heck, A.J. (2009) Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics, *Nature protocols*. **4**, 484–494. doi: 10.1038/nprot.2009.21.
109. Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A. & Mann, M. (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics, *Molecular & cellular proteomics* : MCP. **1**, 376–386. doi: 10.1074/mcp.m200025-mcp200.
110. Xiong, Q., Chen, Z. & Ge, F. (2016) Proteomic analysis of post translational modifications in cyanobacteria, *Journal of proteomics*. **134**, 57–64. doi: 10.1016/j.jprot.2015.07.037.
111. Qian, Z.Y., Chen, X., Zhu, H. T., Shi, J.Z., Gong, T.T. & Xian, Q.M. (2019) Study on the cyanobacterial toxin metabolism of *Microcystis aeruginosa* in nitrogen-starved conditions by a stable isotope labelling method, *Journal of hazardous materials*. **373**, 558–564. doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.03.127.
112. Panichkin, V.B., Arakawa-Kobayashi, S., Kanaseki, T., Suzuki, I., Los, D.A., Shestakov, S.V. & Murata, N. (2006) Serine/threonine protein kinase SpkA in *Synechocystis* sp. strain PCC

- 6803 is a regulator of expression of three putative *pilA* operons, formation of thick pili, and cell motility, *Journal of bacteriology*. **188**, 7696–7699. doi: 10.1128/JB.00838-06.
113. Kamei, A., Yoshihara, S., Yuasa, T., Geng, X. & Ikeuchi, M. (2003) Biochemical and functional characterization of a eukaryotic-type protein kinase, SpkB, in the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Current microbiology*. **46**, 296–301. doi: 10.1007/s00284-002-3887-2.
114. Mata-Cabana, A., Garcia-Dominguez, M., Florencio, F.J. & Lindahl, M. (2012) Thiol-based redox modulation of a cyanobacterial eukaryotic-type serine/threonine kinase required for oxidative stress tolerance, *Antioxidants & redox signaling*. **17**, 521–533. doi: 10.1089/ars.2011.4483.
115. Forchhammer, K. (2004) Global carbon/nitrogen control by PII signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets, *FEMS microbiology reviews*. **28**, 319–333. doi: 10.1016/j.femsre.2003.11.001.
116. Galkin, A.N., Mikheeva, L.E. & Shestakov, S.V. (2003) Insertional inactivation of genes encoding eukaryotic type serine/threonine protein kinases in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Mikrobiologiya*. **72**, 64–69. PMID: 12698794.
117. Boussiba, S. & Gibson, J. (1991) Ammonia translocation in cyanobacteria, *FEMS Microbiology Letters*. **88**, 1–14. doi: [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(91\)90692-4](https://doi.org/10.1016/0378-1097(91)90692-4).
118. Laurent, S., Jang, J., Janicki, A., Zhang, C.C. & Bedu, S. (2008) Inactivation of *spkD*, encoding a Ser/Thr kinase, affects the pool of the TCA cycle metabolites in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, *Microbiology*. **154**, 2161–2167. doi: 10.1099/mic.0.2007/016196-0.
119. Kim, Y.H., Park, Y.M., Kim, S.J., Park, Y.I., Choi, J.S. & Chung, Y.H. (2004) The role of Slr1443 in pilus biogenesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803: involvement in post-translational modification of pilins, *Biochemical and biophysical research communications*. **315**, 179–186. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.01.036.
120. Liang, C., Zhang, X., Chi, X., Guan, X., Li, Y., Qin, S. & Shao, H. B. (2011) Serine/threonine protein kinase SpkG is a candidate for high salt resistance in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *PLoS one*. **6**, e18718. doi: 10.1371/journal.pone.0018718.
121. Angeleri, M., Zorina, A., Aro, E.M. & Battchikova, N. (2018) Interplay of SpkG kinase and the Slr0151 protein in the phosphorylation of ferredoxin 5 in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, *FEBS letters*. **592**, 411–421. doi: 10.1002/1873-3468.12970.
122. Ehira, S. (2013) Transcriptional regulation of heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *Russian Journal of Plant Physiology*. **60**, 443–452. doi: 10.1134/S1021443713040043.
123. Kumar, K., Mella-Herrera, R.A. & Golden, J.W. (2010) Cyanobacterial heterocysts, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. **2**, a000315. doi: 10.1101/cshperspect.a000315.
124. Zhang, C.C., Friry, A. & Peng, L. (1998) Molecular and genetic analysis of two closely linked genes that encode, respectively, a protein phosphatase 1/2A/2B homolog and a protein kinase homolog in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *Journal of bacteriology*. **180**, 2616–2622. doi: 10.1128/JB.180.10.2616-2622.1998.
125. Zhang, C.C., Gonzalez, L. & Phalip, V. (1998) Survey, analysis and genetic organization of genes encoding eukaryotic-like signaling proteins on a cyanobacterial genome, *Nucleic acids research*. **26**, 3619–3625. doi: 10.1093/nar/26.16.3619.
126. Zhang, C.C. (1993) A gene encoding a protein related to eukaryotic protein kinases from the filamentous heterocystous cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **90**, 11840–11844. doi: 10.1073/pnas.90.24.11840.
127. Gonzalez, L., Phalip, V. & Zhang, C.C. (2001) Characterization of PknC, a Ser/Thr kinase with broad substrate specificity from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *European journal of biochemistry*. **268**, 1869–1875. doi.
128. Ehira, S., Ohmori, M. & Sato, N. (2003) Genome-wide expression analysis of the responses to nitrogen deprivation in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC

- 7120, *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*. **10**, 97–113. doi: 10.1093/dnares/10.3.97.
129. Saha, S.K. & Golden, J.W. (2011) Overexpression of *pknE* blocks heterocyst development in *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *Journal of bacteriology*. **193**, 2619–2629. doi: 10.1128/JB.00120-11.
130. Ehira, S. & Ohmori, M. (2012) The *pknH* gene restrictively expressed in heterocysts is required for diazotrophic growth in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *Microbiology*. **158**, 1437–1443. doi: 10.1099/mic.0.057729-0.
131. Fukushima, S.I. & Ehira, S. (2018) The Ser/Thr kinase PknH is essential for maintaining heterocyst pattern in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *Life*. **8**. doi: 10.3390/life8030034.
132. Xu, W.L., Jeanjean, R., Liu, Y.D. & Zhang, C.C. (2003) *pkn22* (*alr2502*) encoding a putative Ser/Thr kinase in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 is induced by both iron starvation and oxidative stress and regulates the expression of *isiA*, *FEBS letters*. **553**, 179–182. doi: 10.1016/s0014-5793(03)01019-6.
133. Kouril, R., Arteni, A.A., Lax, J., Yeremenko, N., D’Haene, S., Rogner, M., Matthijs, H.C., Dekker, J.P. & Boekema, E.J. (2005) Structure and functional role of supercomplexes of IsiA and photosystem I in cyanobacterial photosynthesis, *FEBS letters*. **579**, 3253–3257. doi: 10.1016/j.febslet.2005.03.051.
134. Lamb, J.J., Røkke, G. & Hohmann-Marriott, M.F. (2018) Chlorophyll fluorescence emission spectroscopy of oxygenic organisms at 77 K, *Photosynthetica*. **56**, 105–124. doi: 10.1007/s11099-018-0791-y.
135. Mironov, K.S., Sinetova, M.A., Shumskaya, M. & Los, D.A. (2019) Universal molecular triggers of stress responses in cyanobacterium *Synechocystis*, *Life*. **9**. doi: 10.3390/life9030067.
136. Yingping, F., Lemeille, S., Gonzalez, A., Risoul, V., Denis, Y., Richaud, P., Lamrabet, O., Fillat, M.F., Zhang, C.C. & Latifi, A. (2015) The Pkn22 Ser/Thr kinase in *Nostoc* PCC 7120: role of FurA and NtcA regulators and transcript profiling under nitrogen starvation and oxidative stress, *BMC genomics*. **16**, 557. doi: 10.1186/s12864-015-1703-1.
137. Roumezi, B., Xu, X., Risoul, V., Fan, Y., Lebrun, R. & Latifi, A. (2019) The Pkn22 kinase of *Nostoc* PCC 7120 is required for cell differentiation via the phosphorylation of HetR on a residue highly conserved in genomes of heterocyst-forming cyanobacteria, *Frontiers in microbiology*. **10**, 3140. doi: 10.3389/fmicb.2019.03140.
138. Fan, Q., Lechno-Yossef, S., Ehira, S., Kaneko, T., Ohmori, M., Sato, N., Tabata, S. & Wolk, C. P. (2006) Signal transduction genes required for heterocyst maturation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *Journal of bacteriology*. **188**, 6688–6693. doi: 10.1128/JB.01669-05.
139. Lechno-Yossef, S., Fan, Q., Ehira, S., Sato, N. & Wolk, C.P. (2006) Mutations in four regulatory genes have interrelated effects on heterocyst maturation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *Journal of bacteriology*. **188**, 7387–7395. doi: 10.1128/JB.00974-06.
140. Herivaux, A., So, Y.S., Gastebois, A., Latge, J.P., Bouchara, J.P., Bahn, Y.S. & Papon, N. (2016) Major sensing proteins in pathogenic fungi: the hybrid histidine kinase family, *PLoS pathogens*. **12**, e1005683. doi: 10.1371/journal.ppat.1005683.
141. O’Rourke, S.M., Herskowitz, I. & O’Shea, E.K. (2002) Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response, *Trends in genetics : TIG*. **18**, 405–412. doi: 10.1016/s0168-9525(02)02723-3.
142. Cheng, Y., Li, J.H., Shi, L., Wang, L., Latifi, A. & Zhang, C. C. (2006) A pair of iron-responsive genes encoding protein kinases with a Ser/Thr kinase domain and a His kinase domain are regulated by NtcA in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *Journal of bacteriology*. **188**, 4822–4829. doi: 10.1128/JB.00258-06.