

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). *Algologia*. 2016, 26(1):3-17

<http://dx.doi.org/10.15407/alg26.01.003>

УДК 582.232:52.384:575.113:575.852

В.Я. ДВОРНИК

Колледж науки и общих исследований университета Аль-Файсал,
Аль Маатер, Эр-Рияд, Королевство Саудовская Аравия

ЭВОЛЮЦИЯ ЦИРКАДНОЙ СИСТЕМЫ ЦИАНОБАКТЕРИЙ: ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ НА УРОВНЕ ГЕНОМА

Цианобактерии стали первыми прокариотами, у которых было доказано наличие «внутренних часов» или циркадных ритмов, т.е. способности поддерживать жизненные процессы с приблизительно суточной периодичностью. В ходе долгой и сложной эволюционной истории циркадная система цианобактерий претерпела несколько серьезных изменений, приведших к ее структурной диверсификации. К настоящему времени выявлены три основных ее типа, обладающие различными наборами элементов. Существуют доказательства того, что эти различия могут быть связаны с определенными функциональными модификациями. Макроэволюция циркадной системы регулировалась многими факторами, включая многочисленные дубликации, изменения функции того или иного гена (*gene recruitment*) и возникновение гена *de novo*, аккрецию и слияние доменов, естественный отбор. Обсуждается концепция циркадной системы цианопрокариот в свете современных эволюционных воззрений. Рассматриваются структура циркадных генов и их распространение у цианобактерий и других прокариот, функционально-специфический полиморфизм и изменяющаяся скорость эволюции в циркадных генах цианобактерий, диверсификация циркадной системы цианобактерий, исследования ее эволюции. Быстрое накопление геномных данных открывает новые возможности для всестороннего сравнительного анализа и более точной реконструкции эволюционного сценария для этого тонко настроенного регуляторного механизма цианобактерий.

Ключевые слова: цианобактерии, циркадная система, эволюция, геномика.

Введение

Циркадные ритмы, или так называемые «внутренние часы», возникли в клетках живых организмов как основной инструмент адаптации к смене дня и ночи, вызванной вращением нашей планеты вокруг своей оси (Pittendrigh, 1993; Dunlap et al., 2004). Этот механизм контролирует своевременную экспрессию значительной части генов в геноме.

© В.Я. Дворник, 2016

Цианобактерии – универсальные прокариоты, обладающие высокоэффективными механизмами адаптации (Whitton, 1987). Именно в их клетках впервые для прокариот было установлено наличие механизма циркадных ритмов (Kondo et al., 1997). Циркадная система очень важна для обеспечения адаптационной и экологической пластичности цианобактерий, поскольку она контролирует основные физиологические процессы, такие как фотосинтез, фиксация азота и клеточное деление (Johnson, Golden, 1999). Молекулярный механизм циркадных ритмов цианобактерий был тщательно изучен в последние два десятилетия (Hosokawa et al., 2013; Espinosa et al., 2015), однако о том, как этот механизм развивался и превратился в высокоэффективную и надежную циркадную систему, известно пока сравнительно немного.

Циркадная система цианобактерий: обзор

Концепция циркадной системы, состоящей из трех основных элементов: вводного домена (input), центрального осциллятора (водителя ритма) и выводного домена (output), впервые была предложена Crosthwaite et al. (1995). Суть ее состоит в том, что на вход поступает сигнал из внешней среды (например, свет или температура), откуда он передается на центральный осциллятор. Последний является основным элементом системы: он поддерживает внутреннюю синхронизацию на протяжении отрезка времени, примерно равного 24 ч. Выводной домен передает информацию от центрального осциллятора нижестоящим генам, чтобы синхронизировать их экспрессию с этим периодом (Crosthwaite et al., 1995).

Циркадную систему цианобактерий подробно изучали на модельном штамме *Synechococcus elongatus* PCC7942. Было установлено, что ее ключевой структурно-функциональный элемент – **центральный осциллятор** – в большинстве случаев состоит из трех генов: *kaiA*, *kaiB* и *kaiC* (*kai* – «период» по-японски) (Ishiura et al., 1998). Гены *kaiB* и *kaiC* объединены в оперон, который контролируется одним промотером (Ishiura et al., 1998). Соответствующие белки взаимодействуют друг с другом: KaiB ослабляет фосфорилирование KaiC (Katayama et al., 2003), а KaiA регулирует экспрессию *kaiBC* путем связывания с соответствующими доменами KaiC (Taniguchi et al., 2001; Pattanayek et al., 2006). Среди белков Kai был идентифицирован белок KaiC как центральный компонент циркадной системы цианобактерий (Ditty et al., 2003). В дополнение к генам *kai*, объединенным в кластер, у некоторых цианобактерий встречаются гены *kaiB* и *kaiC*, рассеянные по геному. Будучи гомологичными своим «кластерным» аналогам, эти гены филогенетически и функционально дивергировали (Dvornyk, Knudsen, 2005) и, вероятно, более не связаны с циркадной системой (Wiegard et al., 2013).

Вводной домен циркадной системы цианобактерий образуют три гена. Ключевым элементом является ген киназы ввода циркадного

ритма (circadian input kinase) *cikA* (Schmitz et al., 2000). Ген светозависимого периода *ldpA* кодирует белок, который распознает изменение окислительно-восстановительного состояния клетки в результате колебаний интенсивности света и, соответственно, регулирует циркадные часы (Ivleva et al., 2005; Katayama et al., 2003). Продукт третьего известного элемента ввода – гена расширителя периода (period extender) *pex* (Kutsuna et al., 1998) – отрицательно контролирует экспрессию *kaiA* посредством связывания с отрезком длиной 5 п.н. в регионе, примыкающем к кодону инициации трансляции (Kutsuna et al., 2007).

Ключевой элемент **выводного** домена циркадной системы – ген адаптивного сенсора синехококкуса (*Synechococcus* adaptive sensor) *sasA* контролирует центральный осциллятор несколькими способами. Во-первых, белок *sasA* физически взаимодействует с белками Kai и таким образом контролирует экспрессию генов в последующих периодах циркадного ритма (Kageyama et al., 2003). Во-вторых, *sasA* образует двухкомпонентный комплекс с регулятором отклика RpaA (регулятор, ассоциированный с фикобилисомой), и этот комплекс передает сигнал от генератора к последующим генам (Takai et al., 2006).

Другой элемент циркадного вывода в *S. elongatus* – ген *cpmA* (модификатор циркадной фазы) контролирует экспрессию нескольких транскрипционных репортеров, в том числе *psbAI*, *psbAII* и *kaiA* (Katayama et al., 1999). В дополнение к *cpmA*, экспрессия ритма *psbAI* контролируется генами сигма факторов группы 2 (*rpoD2*, *rpoD3*, *rpoD4* и *sigC*). Инактивация либо избыточная экспрессия любого из этих генов резко влияет на ритмичность транскрипции *psbAI* (Tsinoremas et al., 1996; Nair et al., 2002).

Высокопродуктивный функциональный анализ генома штамма *S. elongatus* РСС 7942 выявил еще один предполагаемый локус – оперон *clpP1/clpX*, мутации в котором приводят к образованию различных циркадных фенотипов (Holtman et al., 2005). Однако его конкретная роль в циркадной системе пока еще не определена.

Структура циркадных генов и их встречаемость в цианобактериях и других прокариотах

Гены циркадного ввода. Исходя из архитектуры доменов, *cikA* классифицируется как двухкомпонентная гистидинкиназа. Она относится к очень большому надсемейству генов, представленному практически во всех прокариотах, однако гомология с другими членами этого надсемейства ограничивается лишь доменом НПК (гистидин-протеинкиназы) (Vasa et al., 2010). Кроме НПК, *cikA* содержит домен GAF и псевдоресивер (PsR) (Schmitz et al., 2000). Относительно небольшое количество гомологов *cikA* имеют домен GAF, необходимый для циркадной функции гена (Mutsuda et al., 2003). Кроме того, истинная *cikA*, состоящая, как показано выше, из трех доменов (GAF-

НРК-PsR), присутствует только в цианобактериях и в единственном экземпляре.

В гене было обнаружено несколько высококонсервативных мотивов вероятной функциональной значимости. Один из них расположен непосредственно перед доменом GAF и охватывает аминокислотные остатки 168-183 в N-концевом регионе истинной *cikA* штамма *S. elongatus* PCC 7942, предположительно, чтобы увеличить фосфорилирование НРК (Vasa et al., 2010). Выявленная в *cikA* архитектура GAF-НРК-PsR не является типичной для всех цианобактерий. В частности, домен PsR, который вовлечен в супрессию активности домена НРК (Mutsuda et al., 2003), отсутствует в *cikA*-подобных генах нитчатых *Nostoc* и *Anabaena*. Отсутствие домена PSR в продукте *cikA*-подобного гена может свидетельствовать о существовании механизма, контролирующего фосфорилирование CikA, который отличается от имеющегося у штамма *S. elongatus* PCC 7942. У некоторых одноклеточных цианобактерий (*Prochlorococcus* sp., *Synechococcus* sp. WH 8102), а также у других бактерий отсутствуют гены *cikA* или их гомологи, содержащие домен GAF (Vasa et al., 2010). Это ограничивает происхождение *cikA* цианобактериями.

Подобно *cikA*, истинные (*bona fide*) гены *ldpA* встречаются только у цианобактерий. Их гомологи в других бактериях демонстрируют слабое сходство, преимущественно в пределах домена НусВ. В дополнение к домену НусВ, гены *ldpA* в цианобактериях обладают в концевых N- и C-доменах несколькими уникальными высококонсервативными мотивами, которые также могут быть связаны с функционированием циркадной системы (Dvornyk, 2005).

Ген *rex* является членом семейства транскрипционных факторов PadR (Kutsuna et al., 1998), широко распространенного у бактерий. Интересно, что ген *rex* может отсутствовать не только у цианобактерий, не имеющих ген *kaiA* (*Prochlorococcus* sp.), но и у некоторых видов (e.g., *Synechocystis* PCC 6803, *Crocospaera watsonii*), им обладающих (Дворник, неопубл. данные).

Гены *kai*. Ген *kaiC* принадлежит к надсемейству рекомбиназ RecA (Leire et al., 2000), необходимых для репарации ДНК (Roca, Cox, 1990), которые, как считают, происходят от универсального общего предка (DiRuggiero др., 1999). Поэтому, вероятно, *kaiC* эволюционно является старейшим среди всех циркадных генов цианобактерий (Dvornyk et al., 2003). Его нынешняя двухдоменная архитектура (Ishiura et al., 1998), вероятно, образовалась в результате удвоения и последующего слияния анцестральной однодоменной *recA* (Dvornyk et al., 2003). Истинный двухдоменный *kaiC* встречается у цианобактерий, а также у некоторых *Proteobacteria* и *Euryarchaeota*. Гомологи однодоменных *kaiC* отсутствуют у цианобактерий, но часто встречаются в других прокариотах (Dvornyk et al., 2003). Интересно, что гомологи двухдоменного *kaiC* среди цианобактерий отсутствуют только у *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 (Nakamura et al., 2003).

Цианобактерии, у которых нет *kaiA*, демонстрируют более сильную изменчивость С-терминального региона (СП) гена *kaiC* по сравнению с видами, обладающими *kaiA* (Dvornyk, Knudsen, 2005). Это еще раз подтверждает участие данного региона в функционировании циркадной системы, так как KaiA связывается исключительно с ним (Pattanaeyek et al., 2006). Кроме того, недавнее исследование выявило, что СП также способен связываться с другим белком – KaiB (Pattanaeyek et al., 2013).

Гомологи гена *kaiB* также встречаются у других прокариот помимо цианобактерий. По длине их можно разделить на две группы. Более короткие гены (~300–400 п.н.) встречаются у всех цианобактерий (кроме *G. violaceus* PCC 7421) и у некоторых других прокариот; более длинные (до ~900 п.н.) найдены только у некоторых цианобактерий. Гомологи гена *kaiA* наиболее полиморфны из всех *kai*-генов и могут варьировать от 300 до 900 п.н. Гены *kaiB* и двухдоменный *kaiC*, как правило, объединены в оперон, который широко распространен у *Cyanobacteria* и встречается у некоторых других прокариот. Кроме того, у некоторых представителей протеобактерий и цианобактерий есть дополнительные копии *kaiB* и *kaiC*, рассеянные в их геномах. В отличие от *kaiB* и *kaiC*, ген *kaiA* встречается только у цианобактерий всегда в единственном экземпляре. Однако у некоторых из них (например, у *Prochlorococcus* sp.) ген *kaiA* отсутствует. Если в геноме присутствуют все три *kai*-гена, они всегда объединены в один кластер (Dvornyk et al., 2003).

Гены циркадного вывода. Ген *sasA* принадлежит к тому же надсемейству двухкомпонентных гистидинкиназ, что и *cikA*, поэтому его гомологи достаточно распространены у прокариот (Dvornyk et al., 2003). Вместе с тем, гомологи за пределами *Cyanobacteria* лишены *kaiB*-подобного домена даже у тех видов, которые в результате латерального переноса от цианобактерий имеют оперон *kaiBC* (Dvornyk et al., 2003). Это лишний раз свидетельствует о том, что ген *kaiB* возник у цианобактерий, а затем уже попал в другие бактерии путем латерального переноса.

Еще один ген циркадного вывода, *cpmA*, и его гомологи широко распространены у цианобактерий и других прокариот. Гены *cpmA* у цианобактерий более консервативны, особенно в их С-концевом домене (Dvornyk, 2006). Этот домен в соответствующем белке имеет два гидрофобных мотива (Katayama et al., 1999) и проявляет слабую гомологию с AIR-карбоксилазой и NCAIR-мутазой – белках PurE, участвующих в метаболизме пуринов (Watanabe et al., 1989; Meyer et al., 1992). Интересно, что фотосинтезирующие альфа-протеобактерии и *Chloroflexus*, хотя и содержат гомологи *kai* (Dvornyk et al., 2003), но не имеют гомологов *sasA* либо *cpmA*.

Ген *rpaA* был найден у представителей всех групп *Cyanobacteria*; его гомологи часто встречаются у *Firmicutes*, но редки у *Chloroflexi*, *Proteobacteria* и *Actinobacteria*. Отмечена различная встречаемость *labA* и его гомологов у прокариот. Так, *labA* найден только у цианобактерий,

имеющих *kaiA*, а его гомологи выявлены у альфа- и гамма-протеобактерий, у некоторых архей, изредка встречаются у представителей филы *Firmicutes* и отсутствуют у *Chloroflexi* (Дворник, неопубл. данные). Таким образом, встречаемость истинных *rpaA* и *labA* у цианобактерий довольно предсказуема и может служить свидетельством их циркадных функций. Недавно паралог *rpaA*, *rpaB* был определен как репрессор транскрипции *kaiBC* в течение субъективной ночи посредством связывания соответствующего белка с промотером *kaiBC* (Hanoaka et al., 2012). Эти результаты позволяют предположить наличие еще одного выходного контролирующего механизма циркадных ритмов.

Кроме упомянутых выше генов, к числу возможных элементов выводного домена циркадной системы могут относиться и сигма-факторы (Naig et al., 2002). Сигма-факторы группы 2 широко распространены в цианобактериях и имеют одинаковую структуру из четырех сигма-70 регионов (Дворник, неопубл. данные). Роль этих регионов в функционировании циркадной системы пока не выяснена.

Функционально-специфический полиморфизм и изменяющаяся скорость эволюции в циркадных генах цианобактерий

Циркадная система контролирует экспрессию значительной части генома цианобактерий (Kuccho et al., 2005) и, следовательно, лежит в основе адаптивного ответа этих организмов на смену дня и ночи (Woelfle et al., 2004). Согласно основным принципам эволюционной теории, гены фундаментальной функциональной значимости имеют более строгие селективные ограничения и, соответственно, низкий уровень полиморфизма (Kimura, 1983). Циркадные гены цианобактерий отвечают этому требованию: они гораздо более консервативны по сравнению с их нециркадными гомологами. Например, подсемейство истинных *rpmA* генов наиболее консервативно среди всех подсемейств гена *rpmA* и его гомологов (Dvornyk, 2006). Те же закономерности наблюдаются среди гомологов гена *sikA* (Vasa et al., 2010). Важно отметить, что низкий полиморфизм является следствием очень малой скорости мутационного процесса в циркадных генах (например, *rpmA*), а не их относительно молодого эволюционного возраста (Dvornyk, 2006).

В процессе эволюции циркадные гены цианобактерий испытали многочисленные дубликации: как паралогические, так и ортологические (Dvornyk et al., 2003; Dvornyk, 2006). Приобретение новой функции одним из дубликатов, как правило, связано с изменением темпа эволюции, известным как функциональная дивергенция. Если дублицированные гены имеют разную скорость эволюции, это называется дивергенция I типа (Gu, 1999). Дивергенция II типа происходит, если дубликация гена не налагает никаких функциональных ограничений, а вместо этого приводит к радикальному

изменению свойств аминокислот (например, гидрофобности, смене заряда и т.д.) у дубликатов (Gu, 2001). Оба типа дивергенции, как предполагается, происходят в тех аминокислотных позициях, которые важны для новой функции гена.

В циркадных генах присутствуют оба вида функциональной дивергенции. Например, приблизительно из 600 остатков аминокислот, проанализированных в KaiB- и KaiC-белках цианобактерий, в 92 проявлялся какой-либо тип дивергенции (Dvornyk, Knudsen, 2005). Белки KaiB и KaiC из цианобактерий, которые содержат или не содержат KaiA, также показали значительное функциональное расхождение: около 5 % их участков имели различные функциональные ограничения. Предположительно, эти участки могут быть вовлечены во взаимодействие с KaiA (Dvornyk, Knudsen, 2005). Дивергенция II типа, вероятно, более существенно влияет на структуру и свойства белка, так как приводит к радикальным аминокислотным заменам (Gu, 2001). Например, полярный и незаряженный остаток T572 в KaiC штамма *S. elongatus* PCC 7942 играет важную роль в его взаимодействии с C-концевым доменом KaiA (Vakonakis, LiWang, 2004); если треонин заменяется неполярным аланином, взаимодействие ослабляется, что отрицательно влияет на циркадную ритмичность (Ishiura et al., 1998). Нециркадные гомологи KaiC у других прокариот, как правило, имеют совершенно разные аминокислотные остатки в этом положении (Dvornyk, Knudsen, 2005). Аналогичным образом, в других циркадных белках участки для дивергенции обоих типов, как правило, расположены внутри или в непосредственной близости от консервативных мотивов с известной или предполагаемой функциональной значимостью (Dvornyk et al., 2004; Dvornyk, 2005; Dvornyk, Knudsen, 2005).

Диверсификация циркадной системы цианобактерий

В начале эволюционных исследований циркадных систем цианобактерий, когда геномные данные были ограничены, некоторые факты уже тогда позволяли предположить, что цианобактерии могут обладать более чем одним типом циркадной системы. В пользу этого свидетельствовало отсутствие гена *kaiA* у некоторых их штаммов (Dvornyk et al., 2003). Этот ген относится к трем ключевым генам циркадной функции в оригинально описанной системе штамма *S. elongatus* PCC 7942 (Ishiura et al., 1998). Соответственно, было отмечено существование двух типов циркадных систем. Один ее тип в качестве центрального осциллятора имеет кластер из всех трех *kai*-генов (система *kaiABC*), тогда как система другого типа (*kaiBC*) не имеет гена *kaiA* и содержит лишь оперон *kaiBC* (Dvornyk et al., 2003). После открытия генов *kai* у штамма *S. elongatus* PCC 7942 систему *kaiABC* изучали наиболее тщательно и, видимо, в цианобактериях она преобладает. Система *kaiBC*

до сих пор была найдена только в одноклеточном *Prochlorococcus* и может представлять собой более простой циркадный механизм (Axmann et al., 2014). Еще одна потенциальная циркадная система, имеющая черты обоих описанных выше типов, может существовать у *Synechococcus* sp. WH 8102. С одной стороны, эта система имеет ген *kaiA*; с другой – филогенетически она расположена ближе к системе *kaiBC* (Dvornyk et al., 2004; Dvornyk, 2005; Dvornyk, Knudsen, 2005). Эта система штамма *Synechococcus* sp. WH 8102 обозначена как *kaiABC^d* (см. таблицу) и характерна для некоторых одноклеточных цианобактерий, которые филогенетически близки к *Prochlorococcus* (Vasa et al., 2010).

Существует доказательство еще большей эволюционной диверсификации циркадных систем у цианобактерий. Например, ген *rex* не был найден как у видов с системой *kaiBC*, так и у некоторых, имеющих систему *kaiABC* (см. таблицу). Кроме того *cikA*, присутствуя у видов, обладающих системой *kaiABC*, может иметь различную доменную архитектуру: либо не хватает домена PsR, как у гетероцитных *Nostocaceae*, либо есть дополнительные домены, как у термофильного *Synechococcus* sp. из Йеллоустоунских горячих источников (Vasa et al., 2010).

Современные эволюционные данные свидетельствуют о том, что цианобактерии имеют много типов циркадных систем, которые отличаются набором элементов (см. таблицу). У некоторых генов в каждом из типов могут проявляться изменения в доменной архитектуре. Все вышеуказанные варианты могут привести к модификации механизма «внутренних часов», но, скорее всего, не к полной потере циркадной ритмичности. Имеется достаточно доказательств тому, что инактивация некоторых циркадных генов за пределами центрального осциллятора «истинной» (*bona fide*) системы *kaiABC* может в определенной мере ухудшить работу механизма, но полностью его не разрушает (Katayama et al., 1999, 2003; Schmitz et al., 2000). Показано (Tomita et al., 2005), что для моделирования циркадной осцилляции фосфорилирования KaiC *in vitro* достаточно присутствия лишь трех Kai-белков и АТФ. Этот факт подтверждает вывод о том, что отсутствие некоторых второстепенных элементов, таких как *cikA*, *rex* или *rpmA*, не приводит к полной инактивации циркадной ритмичности.

Сценарий для циркадной системы *kaiBC*, по-видимому, другой. Инактивация *kaiA* полностью разрушает функцию системы *kaiABC* в *S. elongatus* PCC 7942 (Ishiura et al., 1998). Тем не менее, в некоторых исследованиях описаны суточные закономерности клеточного цикла и экспрессии генов у *Prochlorococcus* и высказывается предположение о существовании «внутренних часов», контролирующих эти процессы (Shalapyonok et al., 1998; Axmann et al., 2009).

Состав основных типов циркадных систем цианобактерий

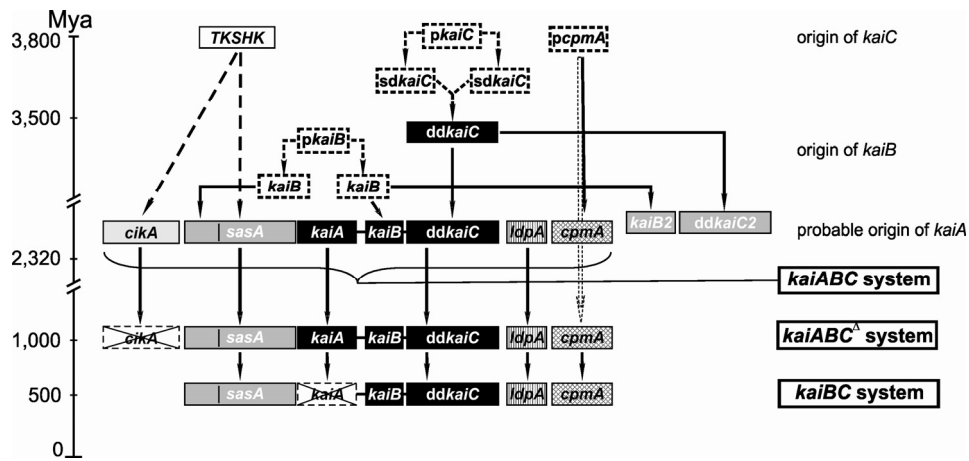
Функциональное подразделение и ген	Система и модельный штамм			Источник
	<i>kaiABC</i> (<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942)	<i>kaiABC^Δ</i> (<i>Synechococcus</i> sp. WH 8102)	<i>kaiBC</i> (<i>Prochlorococcus</i>)	
Ввод				
<i>cikA</i>	+	–	–	(Baca et al., 2010)
<i>ldpA</i>	+	+	+	(Dvornyk, 2005)
<i>rex</i>	+/-	+	–	(Дворник, неопубл.)
Центральный осциллятор				
<i>kaiA</i>	+	+	–	(Dvornyk et al., 2003)
<i>kaiB</i>	+	+	+	(Dvornyk et al., 2003)
<i>kaiC</i>	+	+	+	(Dvornyk et al., 2003)
Вывод				
<i>sasA</i>	+	+	+	(Dvornyk et al., 2004)
<i>labA</i>	+	–	–	(Дворник, неопубл.)
<i>rpaA</i>	+	+	+	(Дворник, неопубл.)
<i>rpaB</i>	+	+	+	(Дворник, неопубл.)
<i>spmA</i>	+	-/?	-/?	(Dvornyk, 2006)

«+» – Присутствует; «–» – отсутствует; «+/-» – может присутствовать или отсутствовать; «?» – отдаленно родственные гомологи присутствуют, но их циркадные функции должны быть подтверждены.

Эволюционная история циркадной системы цианобактерий

Эволюционные исследования циркадной системы цианобактерий и других прокариот были начаты менее двух десятилетий назад. Несмотря на столь короткий срок, они дали результаты, которые позволили в основных чертах обозначить ход эволюции циркадной системы (см. рисунок). Предшественники некоторых циркадных генов, вероятно, существовали еще 3,5 млрд лет назад, практически с самого начала

жизни на Земле и, очевидно, до того, как произошло разделение между археями и бактериями. К этим анцестральным генам относятся *kaiC* (Dvornyk et al., 2003) *sasA*, *cikA*, и *cpmA* (Dvornyk et al., 2004; Dvornyk, 2006; Vasa et al., 2010). Другие гены *kai*, по-видимому, моложе: происхождение *kaiB* датируется между 3500 и 2320 млн лет назад (Dvornyk et al., 2003). Возникновение гена *kaiA* первоначально предполагалось около 1 млрд лет назад (Dvornyk et al., 2003). Однако, филогенетический анализ более полных геномных данных показал, что термофильные штаммы одноклеточных *Synechococcus* sp. из Йеллоустоунских горячих источников и *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, которые филогенетически позиционированы между *G. violaceus* PCC 7421 (не имеющем гены *kai*) и *S. elongatus* PCC 7942 (имеющем истинную систему *kaiABC*), обладают геном *kaiA*, таким образом, сдвигая время происхождения этого гена к отметке 2,600–2,900 млрд лет (Vasa et al., 2010).



Нынешний эволюционный сценарий для циркадной системы цианобактерий. Шкала времени не пропорциональна. Исчезнувшие гены показаны пунктирными скобками. Потерянные гены вычеркнуты. *kaiB2* и *kaiC2* являются генами, которые не объединены в оперон. *pkaiC* – предшественник гена *kaiC*; *sdkaiC* – однодоменный *kaiC*; *ddkaiC* – двухдоменный *kaiC*; *pkaiB* – предшественник гена *kaiB*; *pcpmA* – предшественник гена *cpmA*; TCSHK – двухкомпонентная сенсорной трансдукции гистидинкиназа (воспроизводится с разрешения Dvornyk, 2009)

В начале своей эволюции циркадная протосистема, вероятно, имела меньший набор элементов, по сравнению с ее современной версией (см. рисунок). Оперон *kaiBC* на тот момент еще не возник и центральный осциллятор состоял из разделенных *kaiB* и *kaiC*. Такие копии этих генов по-прежнему присутствуют у некоторых цианобактерий (например, *Synechocystis* sp. PCC 6803), существенно отличаясь от своих истинных аналогов (Dvornyk et al., 2003; Dvornyk, Knudsen, 2005; Wiegard et al.,

2013). Оперон *kaiBC* возник у цианобактерий приблизительно около 2,300 млрд лет назад и затем горизонтально был перенесен в другие прокариоты (Dvornyk et al., 2003). Интересно, что ген *kaiA* присущ исключительно цианобактериям и не был найден у других прокариот. Этот факт свидетельствует о двух возможных сценариях: горизонтальный перенос оперона *kaiBC* произошел либо до появления *kaiA* в цианобактериях, либо до того, как три гена *kai* объединились в кластер.

Первоначально циркадная система цианобактерий эволюционировала в сторону большей сложности и эффективности. Этот процесс включал несколько механизмов. Первым было рекрутирование новых генов, которые приобрели циркадные функции путем эволюции от нециркадных предшественников. Число анцестральных генов, по-видимому, было меньшим, поэтому некоторые циркадные гены с разными функциями (например, *cikA* и *sasA*) могут иметь одних и тех же предшественников (Dvornyk et al., 2004; Vasa et al., 2010). Вторым механизмом было формирование специализированных функциональных подразделений в системе (т.е. ввод и вывод). В какой-то момент эволюции, по-видимому, в районе расхождения *S. elongatus* PCC 7942 и *Prochlorococcus* sp. (500 млн–1,000 млрд лет назад) циркадная система подверглась резкому упрощению из-за потери *cikA*, а затем *kaiA* (Vasa et al., 2010) и нескольких других элементов (см. рисунок, таблицу).

До сих пор неизвестно, когда система приобрела циркадную функцию. Гипотетически, это могло произойти с возникновением гена *kaiA*, когда стал доступным минимально необходимый набор циркадных элементов (Tomita et al., 2005). Правда, теоретически возможно, что циркадная протосистема смогла осциллировать даже в отсутствие *kaiA*, хотя и с меньшей эффективностью. Эта проблема требует дальнейшего исследования.

Макроэволюция циркадной системы цианобактерий – сложный процесс, в который были вовлечены многие факторы. Очевидно, горизонтальные переносы циркадных генов – распространенное явление, в частности для генов *kai* (*kaiB* и *kaiC*), оперона *kaiBC* (Dvornyk et al., 2003; Dvornyk, Nevo, 2004) и *cpmA* (Dvornyk, 2006). Две гистидинкиназы, *sasA* и *cikA*, по-видимому, произошли от общего предка через аккреции домена и слияния генов (Dvornyk et al., 2004; Vasa et al., 2010). Интересно, что *sasA* имеет также общего предшественника, *kaiB*-подобный ген, с другим циркадным геном, *kaiB* (Dvornyk et al., 2003). Все циркадные гены цианобактерий имели несколько дупликаций. Еще одним важным фактором их эволюции был отбор. Хотя в некоторые периоды эволюции циркадных генов происходил эпизодический положительный отбор, главную роль сыграл отрицательный отбор (Dvornyk et al., 2004; Dvornyk, 2005). Однако положительный отбор является более выраженным на уровне популяции (Dvornyk et al., 2003; Dvornyk, Jahan, 2012; Ng et al., 2013). На состав циркадной системы различных таксонов цианобактерий

влияло не только вовлечение новых генов, но и потеря некоторых из них (например, *kaiA* и *cikA*) (Vasa et al., 2010).

Еще одним интересным фактом эволюции циркадной системы цианобактерий является ее очевидная связь с геологической историей Земли, в частности с изменением продолжительности дня и глобального уровня ультрафиолетового облучения (Dvornyk, 2009; Vasa et al., 2010). Это один из самых важных адаптивных механизмов, которые внесли свой вклад в исключительную экологическую универсальность цианобактерий.

Исследования эволюции циркадной системы цианобактерий в эпоху геномики

Изобретение и широкое внедрение технологий секвенирования нового поколения открыли огромные возможности и новые направления в эволюционных исследованиях, а именно в сравнительном эволюционном анализе.

За последнее десятилетие был достигнут значительный прогресс в секвенировании всего генома различных цианобактерий. В настоящее время в GenBank и других открытых базах данных доступны сведения о 110 полностью или частично секвенированных геномах 74 родов цианобактерий. Это гораздо больше, чем было доступно в 2009 г. (22 рода), когда был опубликован последний подробный обзор по эволюции циркадной системы цианобактерий (Dvornyk, 2009), хотя по-прежнему значительно меньше, чем почти 300 родов, приведенных в недавнем таксономическом обзоре (Komárek et al., 2014). Тем не менее, имеющиеся в настоящее время геномные данные могут помочь решить ряд вопросов и значительно обновить существующие сценарии эволюции циркадной системы. На основе ограниченных геномных данных уже были предложены три типа циркадной системы, так что анализ большего объема данных поможет выявить и другие типы.

Проблемой являются и противоречия в датировании происхождения цианобактерий. Время их появления колеблется в пределах от 3,300–3,500 млрд лет (Schopf, Parker, 1987) до 2,100 млрд (Tomitani et al., 2006) в зависимости от типа данных и используемого подхода. Это может приводить к ошибкам как в полученных филогенетических деревьях, так и в предлагаемой временной шкале эволюции циркадной системы (см. рисунок). Поэтому предполагаемое датирование следует интерпретировать с осторожностью.

Еще одна проблема связана с результатами, которые были получены около 10 лет назад с использованием имеющихся на то время довольно ограниченных данных, и которые сегодня могут оказаться устаревшими. Например, как было показано выше, последующий анализ большего пула геномных данных позволил пересмотреть первоначальный вывод о времени происхождения *kaiA* и отодвинуть его примерно до 2,600–2,900 млрд лет назад (Vasa et al., 2010).

Несмотря на определенные ограничения, эволюционный анализ обладает огромным потенциалом в формировании проверяемых гипотез для последующей верификации методами молекулярной биологии (т.н. "мокрые" эксперименты). В одном из исследований сообщалось, что 5'-конец *kaiC* у *Prochlorococcus*, в отличие от такового у *S. elongatus* PCC7942, не является консервированным. Высказывалось предположение, что это может быть связано с функциональными различиями соответствующего белка, в частности его способностью связываться с KaiA (Dvornyk, Knudsen, 2005). Позже это подтвердили другие исследователи (Axmann et al., 2009). Точно так же, по результатам анализа сдвига скорости эволюции, было высказано предположение, что разъединенные гены *kaiB* и *kaiC*, встречающиеся в геномах некоторых цианобактерий, не имеют циркадной функции (Dvornyk, Knudsen, 2005). Это недавно было продемонстрировано *in vitro* в экспериментах по фосфорилированию KaiC (Wiegard et al., 2013).

Дальнейшие сравнительные эволюционные и функциональные исследования циркадной системы цианобактерий с использованием имеющихся геномных данных помогут раскрыть молекулярные механизмы и пути реализации «внутренних часов» цианобактерий и других прокариот.

REFERENCES

- Axmann I.M., Duhring U., Seeliger L., Arnold A., Vanselow J.T., Kramer A., and Wilde A., *J. Bacteriol.*, 2009, 191(17):5342-5347.
- Axmann I.M., Hertel S., Wiegard A., Dorrich A.K., and Wilde A., *Mar. Genom.*, 2014, 14:3-16.
- Baca I., Sprockett D., and Dvornyk V., *J. Mol. Evol.*, 2010, 70(5):453-465.
- Crosthwaite S.K., Loros J.J., and Dunlap J.C., *Cell.*, 1995, 81(7):1003-1012.
- DiRuggiero J., Brown J.R., Bogert A.P., and Robb F.T., *J. Mol. Evol.*, 1999, 49(4):474-484.
- Ditty J.L., Williams S.B., and Golden S.S., *Annu. Rev. Genet.*, 2003, 37:513-543.
- Dunlap J.C., Loros J.J., and DeCoursey P.J., *Chronobiology: Biological Timekeeping*, Sinauer Assoc. Inc., Sunderland, MA, 2004.
- Dvornyk V., *J. Mol. Evol.*, 2005, 60(1):105-112.
- Dvornyk V., *Microbiology*, 2006, 152(Pt 1):75-84.
- Dvornyk V., *The Circadian Clock Gear in Cyanobacteria: Assembled by Evolution in Bacterial Circadian Programs*, Springer-Verlag, Berlin; Heidelberg, 2009, pp. 241-258.
- Dvornyk V., Deng, H.W., and Nevo E., *Mol. Biol. Evol.*, 2004, 21(8):1468-1476.
- Dvornyk V. and Jahan A.S., *Mol. Biol. Evol.*, 2012, 29(12):3899-3907.
- Dvornyk V. and Knudsen B., *Genetica*, 2005, 124(2, 3):247-254.
- Dvornyk V. and Nevo E., *J. Mol. Evol.*, 2004, 58(3):341-347.
- Dvornyk V., Vinogradova O., and Nevo E., *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 2002, 99(4):2082-2087.
- Dvornyk V., Vinogradova O., and Nevo E., *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 2003, 100(5):2495-2500.
- Espinosa J., Boyd J.S., Cantos R., Salinas P., Golden S.S., and Contreras A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, 112(7):2198-2203.

- Gu X., *Mol. Biol. Evol.*, 1999, 16(12):1664-1674.
- Gu X., *Mol. Biol. Evol.*, 2001, 18(4):453-464.
- Hanaoka M., Takai N., Hosokawa N., Fujiwara M., Akimoto Y., Kobori N., Iwasaki H., Kondo T., and Tanaka K., *J. Biol. Chem.*, 2012, 287(31):26321-26327.
- Holtman C.K., Chen Y., Sandoval P., Gonzales A., Nalty M.S., Thomas T.L., Youderian P., and Golden S.S., *DNA Res.*, 2005, 12(2):103-115.
- Hosokawa N., Kushige H., and Iwasaki H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, 110(35):14486-14491.
- Ishiura M., Kutsuna S., Aoki S., Iwasaki H., Andersson C.R., Tanabe A., Golden S.S., Johnson C.H., and Kondo T., *Science*, 1998, 281(5382):1519-1523.
- Ivleva N.B., Bramlett M.R., Lindahl P.A., and Golden S.S., *EMBO J.*, 2005, 24(6):1202-1210.
- Iwasaki H., Williams S.B., Kitayama Y., Ishiura M., Golden S.S., and Kondo T., *Cell*, 2000, 101(2):223-233.
- Johnson C.H. and Golden S.S., *Annu. Rev. Microbiol.*, 1999, 53:389-409.
- Kageyama H., Kondo T., and Iwasaki H., *J. Biol. Chem.*, 2003, 278(4):2388-2395.
- Katayama M., Kondo T., Xiong J., and Golden S.S., *J. Bacteriol.*, 2003, 185(4):1415-1422.
- Katayama M., Tsinoremas N.F., Kondo T., and Golden S.S., *J. Bacteriol.*, 1999, 181(11):3516-3524.
- Kimura M., *The Neutral Theory of Molecular Evolution*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1983.
- Komárek J., Kaštovský J., Mareš J., and Johansen J.R., *Preslia*, 2014, 86(4):295-235.
- Kondo T., Mori T., Lebedeva N.V., Aoki S., Ishiura M., and Golden S.S., *Science*, 1997, 275(5297):224-227.
- Kucho K., Okamoto K., Tsuchiya Y., Nomura S., Nango M., Kanehisa M., and Ishiura M., *J. Bacteriol.*, 2005, 187(6):2190-2199.
- Kutsuna S., Kondo T., Aoki S., and Ishiura M., *J. Bacteriol.*, 1998, 180(8):2167-2174.
- Kutsuna S., Kondo T., Ikegami H., Uzumaki T., Katayama M., and Ishiura M., *J. Bacteriol.*, 2007, 189(21):7690-7696.
- Leipe D.D., Aravind L., Grishin N.V., and Koonin E.V., *Genome Res.*, 2000, 10(1):5-16.
- Meyer E., Leonard N.J., Bhat B., Stubbe J., and Smith J.M., *Biochemistry*, 1992, 31(21):5022-5032.
- Mutsuda M., Michel K.P., Zhang X., Montgomery B.L., and Golden S.S., *J. Biol. Chem.*, 2003, 278(21):19102-19110.
- Nair U., Ditty J.L., Min H., and Golden S.S., *J. Bacteriol.*, 2002, 184(13):3530-3538.
- Nakamura Y., Kaneko T., Sato S., Mimuro M., Miyashita H., Tsuchiya T., Sasamoto S., Watanabe A., Kawashima K., Kishida Y., Kiyokawa C., Kohara M., Matsumoto M., Matsuno A., Nakazaki N., Shimpo S., Takeuchi C., Yamada M., and Tabata S., *DNA Res.*, 2003, 10(4):137-145.
- Ng K.W., Pointing S.B., and Dvornyk V., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2013, 79(5):1516-1522.
- Pattanayek R., Williams D.R., Pattanayek S., Xu Y., Mori T., Johnson C.H., Stewart P.L., and Egli M., *EMBO J.*, 2006, 25(9):2017-2028.
- Pattanayek R., Yadagiri K.K., Ohi M.D., and Egli M., *Cell Cycle*, 2013, 12(5):810-817.
- Pittendrigh C.S., *Annu. Rev. Physiol.*, 1993, 55:16-54.
- Roca A.I. and Cox M.M., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 1990, 25(6):415-456.
- Schmitz O., Katayama M., Williams S.B., Kondo T., and Golden S.S., *Science*, 2000, 289(5480):765-768.

- Schopf J.W. and Packer B.M., *Science*, 1987, 237:70-73.
- Shalapyonok A., Olson R.J., and Shalapyonok L.S., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64(3):1066-1069.
- Takai N., Nakajima M., Oyama T., Kito R., Sugita C., Sugita M., Kondo T., and Iwasaki H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103(32):12109-12114.
- Taniguchi Y., Yamaguchi A., Hijikata A., Iwasaki H., Kamagata K., Ishiura M., Go M., and Kondo T., *FEBS Lett.*, 2001, 496(2, 3):86-90.
- Tomita J., Nakajima M., Kondo T., and Iwasaki H., *Science*, 2005, 307(5707):251-254.
- Tomitani A., Knoll A.H., Cavanaugh C.M., and Ohno T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103(14):5442-5447.
- Tsinoremas N.F., Ishiura M., Kondo T., Tanaka K., Takahashi H., and Johnson C.H., *EMBO J.*, 1996, 15:2488-2495.
- Vakonakis I. and LiWang A.C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101(30):10925-10930.
- Watanabe W., Sampei G., Aiba A., and Mizobuchi K., *J. Bacteriol.*, 1989, 171(1):198-204.
- Whitton B.A., *Survival and Dormancy of Algae in Survival and Dormancy of Microorganisms*, John Wiley, New York, 1987, pp. 109-167.
- Wiegand A., Dorrich A.K., Deinzer H.T., Beck C., Wilde A., Holtzendorff J., and Axmann I.M., *Microbiology*, 2013, 159(Pt 5):948-958.
- Woelfle M.A., Ouyang Y., Phanvijhitsiri K., and Johnson C.H., *Curr. Biol.*, 2004, 14(16): 1481-1486.

Поступила 12 ноября 2015 г.
Подписал в печать С.П. Вассер

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). *Algologia*. 2016, 26(1):3-17

<http://dx.doi.org/10.15407/alg26.01.003>

V.Ya. Dvornyk

College of Science and General Studies, Alfaisal University,
Al Maather, Riyadh, Kingdom of Saudi Arabia,
e-mail: vdvornyk@alfaisal.edu

EVOLUTION OF THE CIRCADIAN CLOCK SYSTEM IN CYANOBACTERIA:
A GENOMIC PERSPECTIVE

Cyanobacteria are the first prokaryotes shown to have an endogenous circadian clock, an ability to sustain life processes with an approximate daily periodicity. During its long and complex evolutionary history, the circadian system of cyanobacteria has underwent several major changes, which resulted in its structural diversification. Three main types of the system, which possess different sets of elements, have been identified so far. There is evidence that these differences may be associated with some functional modifications. Macroevolution of the circadian system has been governed by many factors, including multiple duplications, gene recruitment and *de novo* gene origin, domain accretion and fusion, and selection. Rapid accumulation of genomic data provides new possibilities for comprehensive comparative analyses and more accurate reconstruction of an evolutionary scenario for this finely tuned regulatory mechanism of cyanobacteria.

Key words: cyanobacteria, circadian system, evolution, genomics.