

УДК 575.852

## РЕГУЛОНЫ NtcA И NtcB У ЦИАНОБАКТЕРИЙ И ХЛОРОПЛАСТОВ ВОДОРΟΣЛЕЙ ОТДЕЛА RHODOPHYTA

© 2011 г. К. В. Лопатовская\*, А. В. Селиверстов, В. А. Любецкий

Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук, Москва, 127994

Поступила в редакцию 24.06.2010 г.

Принята к печати 18.01.2011 г.

**Ключевые слова:** NtcA-фактор, NtcB-фактор, эволюция NtcA- и NtcB-регулонов, регуляция транскрипции, цианобактерии, красные водоросли.

**NtcA- AND NtcB-REGULONS IN CYANOBACTERIA AND RHODOPHYTA CHLOROPLASTS** by K. V. Lopatovskaya\*, A. V. Seliverstov, V. A. Lyubetsky (Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127994; \*e-mail: kristina@iitp.ru).

**Keywords:** NtcA-factor, NtcB-factor, evolution of NtcA- and NtcB-regulons, transcription regulation, Cyanobacteria, red algae.

Регуляция некоторых генов с участием транскрипционного фактора NtcA экспериментально показана при исследовании только четырех видов цианобактерий: *Anabaena* sp. PCC 7120 (*Nostoc* sp. PCC 7120), *Synechocystis* sp. PCC 6803, *S.* sp. WH 8102 и *S. elongatus* PCC 7942 [1–7]. Фактор NtcA у *Anabaena* sp. PCC 7120 представляет собой димер [1]; покрываемая им область на ДНК несколько асимметрична относительно центра палиндромной части сайта связывания [2]; эта область длиннее ранее описанного сайта связывания. Консенсус сайтов определен на основании выравнивания небольшого числа нуклеотидных последовательностей, входящих в регуляторные области генов, и имел длину 14 п.н. [3]. Регуляция двух генов с участием транскрипционного фактора NtcB экспериментально показана у тех же видов и у цианобактерии *Leptolyngbya boryana* [8–9]. Во всех исследованных случаях сайты связывания этих двух факторов расположены рядом, позиционно сцеплены. NtcA активирует гены ферментов метаболизма азота: глутаминсинтетазу I-го типа (GlnA), глутаминсинтетазу III-го типа (GlnN), изоцитратдегидрогеназу (Isd), ферредоксин-зависимую нитритредуктазу (NirA), нитратредуктазу (NarB), гены транспортеров аммония (AmtB), нитрата (NrtA), карбамида (UrtA) и специфичного для гетероцист ABC-транспортера (DevBCA), а также ген белка UreE, связанного с карбамид-амидогидролазой, гены самих транскрипционных факторов, факторов NtcA и NtcB и сигнального белка GlnB из семейства pII [10]. Активируются также гены нескольких ферментов, непо-

средственно не связанных с метаболизмом азота, а именно — рибулозо-5-фосфат-3-эпимеразы (Rpe), рибулозо-бисфосфаткарбоксилазы (РБФК, участвует в фиксации углерода и кодируется опероном *rbcSL*), а также гены системы транспорта бикарбоната (CmpABCD).

Известно только два NtcA-репресслируемых гена — *gifA* и *gifB*, которые кодируют факторы инактивации глутаминсинтетазы. Известно также только два NtcA-активируемых и, одновременно, NtcB-регулируемых гена — *nrtA* и *nirA* [1–9]. В пластомах трех видов Rhodophyta (*Cyanidium caldarium*, *Porphyra purpurea* и *P. yezoensis*) имеется ген *ucf28*, кодирующий NtcA, однако гена, кодирующего NtcB, не обнаружено ни в одном пластоме.

Мы предприняли систематические поиски сайтов связывания с ДНК транскрипционных факторов NtcA и NtcB в геномах цианобактерий и хлоропластов Rhodophyta. Последовательность шагов использованной методики выделена ниже курсивом. Методика не является алгоритмической и имеет интерактивный характер.

Во-первых, из результатов опубликованных ранее работ [1–9] *отбирали* гены, регуляция экспрессии которых фактором NtcA или фактором NtcB показана хотя бы в одном из видов; рассматривались также случаи, когда фактор изменения концентрации какого-либо соединения азота был неизвестен. Эти сведения черпали из экспериментальных и, реже, биоинформатических данных. В последнем случае соответствующее предсказание было высоковероятным, если судить по результатам публикаций [1–9]. В этих работах сообщалось, является ли регуляция активацией или репрессией.

\* Эл. почта: kristina@iitp.ru

Во-вторых, с использованием программы BLASTp строили кластеры отобранных ортологичных генов цианобактерий (у 51 вида). В-третьих, *вырезали* для дальнейшего исследования 5'-лидерные области длиной 600 п.н., располагающиеся перед каждым из генов этих кластеров. Иногда эти области включали относительно короткие гены, например, *cse\_1215* перед геном *narB*. И, наконец, в каждой из этих лидерных областей *проводили* совместный поиск потенциальных сайтов связывания и боксов промотора. При поиске случаев активации определяли только -10 бокс с tg-расширением, при поиске случаев репрессии — оба бокса, -35 и -10 с tg-расширением. Поиск выполняли на нечетных итерациях — по образцу, который интерактивно уточнялся по мере расширения списка консервативных сайтов, а на четных итерациях — с использованием программы поиска мультибоксового регуляторного сигнала в наборе невыровненных последовательностей [11].

Вторая программа работает значительно дольше, но она точнее в определении промоторов [11]. В обеих программах нами используются экспериментальные данные о влиянии нуклеотидных замен в области промотора на его эффективность [12]. Нередко в одной лидерной области обнаруживается несколько последовательностей-кандидатов, состоящих из сайта и промотора. Тогда *отбирали* лучших кандидатов в одной лидерной области из некоторого вида, используя метод множественного выравнивания окрестностей кандидатов перед генами из одного кластера. Выравнивание выполнялось программой MEGA4 [13] при следующих параметрах: Gap Opening Penalty=15, Gap Extension Penalty=6.66, DNA Weight Matrix=IUB, Transition Weight=0.5, Use Negative Matrix=OFF, Delay Divergent Cutoff=30. Она применялась, чередуясь с программой множественного выравнивания последовательностей на основе данного филогенетического дерева [14]. Программы и соответствующие им методы [11, 14], в том числе, метод поиска промоторов, описаны также ранее [15].

Каждой строке выравнивания *приписывали* характеристику (“качество” сайта длиной 20 п.н.), вычисленную посредством алгоритма [16, 17]. Отметим, что характеристика сайта определяет тем лучшее его качество, чем эта характеристика меньше; характеристика определяет расстояние от очередного сайта до заранее выбранного набора экспериментально подтвержденных сайтов, служащих образцами. Строки с этой характеристикой выше 29.53 (для NtcA-активации) и 21.33 (для NtcA-репрессии) не показаны на рис. 1 (все таблицы и рисунки этой статьи размещены на веб-странице [http://www.molecbio.com/downloads/2011/3/supp\\_lopat\\_rus.pdf](http://www.molecbio.com/downloads/2011/3/supp_lopat_rus.pdf)). Строки с этой характеристикой выше 21 для NtcB-регуляции на рис. 2 не показаны.

Остальные строки выравнивания на этих рисунках сохранены с указанием их характеристики. Ха-

рактеристика для случая NtcA-активации меняется от 15.76 до 29.53 и для случая NtcA-репрессии — от 6 до 21.33; для случая NtcB-регуляции — от 8 до 21. Крайние значения характеристики возникают редко (рис. 1, 2). Качества (“достоверность”) предсказанных сайтов описываются характеристикой грубо: например, изменение сайта по сравнению с консенсусом по одной позиции иногда приводит даже к небольшому улучшению характеристики, однако, это не существенно для выделения строк таблицы, которые содержат потенциальный сайт связывания. В каждом сайте указаны позиции, в которых он отличается от наиболее консервативных позиций консенсуса (таких позиций шесть), и, тем самым, выявляется число переменных позиций по сравнению с наиболее консервативной частью консенсуса. Это число также может служить некоторой другой характеристикой качества сайта. Ее значения обычно равны 1 и редко 2.

По выравниванию программой WebLogo [18] строилось частотное распределение нуклеотидов. Филогенетические деревья строили при помощи метода ближайших соседей программой MEGA 4 [13]. Геномы получены из базы данных GenBank.

Используя описанную методику при изучении цианобактерий, мы предсказали 477 потенциальных сайтов связывания транскрипционного фактора NtcA, из них 441 сайт — у видов, экспериментальных данных по которым нет. Предсказано также 44 сайта связывания транскрипционного фактора NtcB, из них 40 — у видов, экспериментальных данных по которым нет. Сайты располагаются перед генами из 24 кластеров ортологичных генов у пятидесяти одного вида. Построены частотные распределения нуклеотидов в каждом порядке цианобактерий и, отдельно, в родах, представленных в базе данных большим числом видов или штаммов (*Prochlorococcus*, *Synechococcus*, *Cyanothece*, а также для родов *Nostoc* и *Anabaena*, взятых вместе) (рис. 3).

Существенно расширено число последовательностей для построения консенсуса сайта связывания с ДНК транскрипционного фактора NtcA. Теперь консенсус представляет собой вырожденный палиндром с длиной 20 п.н., наиболее консервативная часть которого имеет вид GTA-8N-TAC (рис. 4a). Соответствующее множественное выравнивание показано на рис. 1. Определен консенсус сайтов связывания фактора NtcB, имеющий вид TGCA-5N-TGCA (рис. 4b), по множественному выравниванию, представленному на рис. 2. Наша методика была применена к следующим 84 кластерам ортологичных генов: *aarF*, *amtB* (*amt1*), *apcF*, *apcE*, *apcA*, *ccmK*, *cmpA*, *cobA*, *cobB*, *cpcB*, *cynA*, *cynB*, *cynD*, *cynS*, *devB*, *icd*, *isiB*, *isiA*, *futC*, *gifA*, *gifB*, *glnA*, *glnB* (*glnK*), *glnN*, *gltS*, *gor*, *hetC*, *hetR*, *hisH*, *hupS*, *hypA2*, *hypB*, *metG*, *moaA*, *moaC*, *moeA*, *mutS*, *narB*, *narK* (*nrtP*), *ndhB*, *nblA*, *nifH*, *nirA*, *nirB*, *nrtA*, *nrtC*, *ntcA*, *ntcB*, *pcbD*, *pcbA*, *petH*, *petF* (*fdx*), *psaI*, *psaB*, *psaL*, *psaF*, *psbA3*,

*psbZ, psbB, psbO, psbW, psbE, psb27, rbcL, rnc, rnpB, rpe, rpoD (sigE, sigB), som, speB, tauA, tauB, tauC, thrC, trxA, trxM, ureE, ureG, urtA, urtB, urtC, urtD, urtE, xisA* и трем неаннотированным кластерам генов с неизвестными функциями (у *Synechococcus* sp. WH 8102 это гены SYNW0153, SYNW2097, SYNW2456 [19]).

Из них потенциальными NtcA-регулируемыми генами являются, в частности, гены *glnA, glnN, glnB, icd, amtB (amt1), gifA, gifB, ntcA, nirA, nirB, narB, narK (nrtP), ntcB, nrtA, urtA, cynA, speB, mutS, rnc, apcF, som, psaI, petF (fdx), hupS*. Подробнее эти данные приведены на рис. 1 и в табл. 1. На рис. 1 приведены координаты этих генов. Среди секвенированных пластомов Rhodophyta только ген *glnB*, как можно предположить, регулируется фактором NtcA (см. ниже). Ген *ycf28* ортологичен гену бактериального транскрипционного фактора NtcA из семейства Ctrp, которое характеризуется присутствием консервативного домена PF00325 (табл. 2, составленная по базе Pfam). Хотя гомологичные *ycf28* гены имеются в пластомах всех Rhodophyta (по состоянию на 2010 г.), домен PF00325 сохранился у тех и только тех видов, чьи пластомы содержат ген *glnB*, причем последний позиционно связан с геном *rps20*. Это виды *Cyanidium caldarium* (с псевдогеном *rps20*), *Porphyra purpurea* и *P. yezoensis*.

Состав NtcA-регулона полностью не определялся, так как не всегда очевиден полный состав оперонов, в которые входят найденные NtcA-регулируемые гены; некоторые гены таких оперонов, возможно, даже не секвенированы. Все найденные нами NtcA-регулируемые гены имеют сайт связывания непосредственно в 5'-лидерной области длиной 600 п.н.; другие гены того же оперона, следующие за этим сайтом, конечно, также регулируются фактором.

Тем не менее, можно сделать некоторые заключения об эволюции NtcA-регулона. В разных порядках цианобактерий она идет по-разному. Наиболее часто наблюдается регуляция генов *glnA, nirA, glnB, ntcA, amtB* у представителей Chroococcales, Gloeobacterales, Nostocales, Oscillatoriales, Prochlorales; гена *ntcB* — у Chroococcales, Gloeobacterales, Nostocales, Oscillatoriales; генов *gifA, gifB* — у Chroococcales, Nostocales, Oscillatoriales; *glnN* — у Chroococcales, Gloeobacterales; *nrtA, icd* — у Chroococcales, Oscillatoriales; *narB* — только у Chroococcales. Слабо консервативный сайт связывания NtcA предсказан у нескольких видов из разных таксономических групп перед генами *gor, petH, rpe, cmpABCD, ureEFG, urtA*. Состав регулона иногда значительно отличается даже у близких видов. Исчезновение регуляции гена *narB* у некоторых Chroococcales связано с включением его в длинный оперон. Гены транспорта мочевины также часто входят в состав длинного оперона. Вероятно, перед этими генами сайты возникли эволюционно недавно, после перестройки хромосом, изменившей состав оперонов. У видов

рода *Synechococcus* ген *icd* никогда не входит в NtcA-регулон, а ген *amtB* входит в его состав у небольшого числа видов.

Перед генами *cynA, devBCA, rbcL, xisA, sigE, nblA, nrtC, rnpB* изредка встречаются сайты у единичных видов цианобактерий. Они не консервативны даже у близких видов. Таким образом, хотя имеются экспериментальные указания [1–7] на NtcA-регуляцию генов *cynA* и *rbcL*, сайты перед ними возникли, по-видимому, относительно недавно; последнее оказалось возможным благодаря небольшой длине консервативной части сайта. Сайты перед опероном *devBCA*, предсказанные у *Acaryochloris marina* и *Cylindrospermopsis raciborskii*, определяют, по-видимому, регуляцию гетероцист, т.е. клеток трихома, связывающих атмосферный азот. Вероятно, они возникли эволюционно недавно.

Нами существенно расширено прежнее биоинформатическое описание состава NtcA-регулона, который включил гены *apcF, som, psaI, petF (fdx)* [8] у многих видов. Этот регулон включает ген *apcF* (субъединицы фикобилисомы) в порядках Chroococcales, Nostocales и Oscillatoriales, ген *som* (порин) — в порядках Chroococcales, Nostocales и Prochlorales; ген *psaI* (реакционного центра фотосистемы I) — в порядке Prochlorales; ген *petF* (ферредоксина) — в порядках Chroococcales, Prochlorales, Oscillatoriales и Nostocales. Напротив, вопреки гипотезе, высказанной ранее [8], перед генами *psaI* и *petF* регуляторные сайты встречаются редко и очень разнообразны даже у близких видов (рис. 1).

Мы сопоставили опубликованное ранее дерево видов цианобактерий [20] с построенным нами деревом NtcA-фактора (рис. 5). Отсутствие сайта у некоторого вида, при том, что сайт имеется у других видов того же рода, хорошо согласуется с изменением фактора в этом виде. Виды *Cyanothece* sp. PCC 7425, *Nostoc azollae* (*A. azollae*), *Trichodesmium erythraeum* расположены на дереве NtcA-фактора далеко от своих филогенетических родственников, и их регуляторные сайты перед рядом генов заметно отличаются от консенсуса GTA-8N-TAC или вообще отсутствуют. Например, у *Cyanothece* sp. PCC 7425 сайт перед геном *narB* заметно отличается от консенсуса, а перед генами *glnB, icd, nrtA, petF, psaI* сайты отсутствуют. У *Nostoc azollae* перед генами *glnA, icd, ntcA, ntcB, apcF* сайты заметно отличаются от консенсуса, а перед генами *glnB, narB, nrtA, psaI, som* они отсутствуют; в то время как у других Nostocales сайты близки к консенсусу перед этими генами. У *Trichodesmium erythraeum* сайты перед генами *nirA, ntcB* значительно отличаются от консенсуса, а перед генами *narB, ntcA, nrtA, psaI, apcF* отсутствуют. Эти исключительные случаи, как и хорошая, в целом, согласованность дерева NtcA-фактора с данными о наличии сайта связывания, подтверждают наши предсказания о наличии регуляторных сайтов.

Из полученных данных выделены случаи, когда в некоторых видах ген имеется, а сайт не найден (например, перед генами *icd*, *glnB*, *amtB*, *nrtA*, *narB*, *narK*, *ntcA*, *ntcB*, *nirA*, *nirB*, *apcF*, *petF*, *som*, *psaI*), и случаи, когда перед геном во всех видах сайт присутствует (например, перед генами *glnN*, *glnA*, *gifA*, *gifB*). Мы выделили также гены, которые обычно имеются у вида, но не регулируются фактором NtcA (табл. 3). Такая ситуация наблюдается, например, в случае гена *rbcl*, который непосредственно не связан с метаболизмом азота, поэтому отсутствие сайта связывания перед ним не кажется неожиданным.

В хлоропластах Rhodophyta в 5'-лидерной области гена *glnB* нами найдены консервативные участки с консенсусами GTATyATA и TTAAnnAAAAAnAA, которые примыкают друг к другу или разделены тремя нуклеотидами (комплементарные им участки показаны на рис. 6). Здесь располагается тройка нуклеотидов GTA, являющаяся наиболее консервативной частью сайта связывания фактора NtcA у цианобактерий. Можно предположить, что эти участки служат сайтом связывания NtcA в хлоропластах. В отличие от бактериального консенсуса, эти участки не образуют палиндрома. Поэтому разница между хлоропластами и цианобактериями проявляется здесь в том, что у хлоропластов триплет GTA входит в состав сайта только один раз, а у цианобактерий — дважды: на прямой цепи ДНК (одно плечо палиндрома) и на инвертированной цепи ДНК (другое плечо палиндрома), и это позволяет прочно связать димер NtcA с ДНК. При этом бактериальный и хлоропластный консенсусы фактора NtcA значительно отличаются.

Выше мы отмечали корреляцию между наличием домена PF00325 в белке NtcA и наличием сайта связывания фактора NtcA, причем сайт расположен рядом с геном *rps20*. Можно высказать гипотезу, которая объяснит эту корреляцию. Предполагаемые сайты связывания фактора NtcA в 5'-лидерной области гена *glnB* перекрывают промотор перед дивергентно расположенным геном *rps20* (на рис. 6 эти участки показаны на цепи *rps20*). Несмотря на консервативность промотора, положение найденных участков не постоянно относительно его боксов, поэтому консервативность участков не может быть объяснена просто консервативностью самого промотора. Существенно то, что, начиная от этих участков и вплоть до начала гена *glnB*, не обнаруживается бактериального  $\sigma^{70}$ -промотора, и нет оснований предполагать, что там имеются промоторы других типов. Боксы промотора для *glnB* не обнаруживаются, но их отсутствие может компенсировать белок-активатор NtcA.

Одновременно с этим можно предположить, что в локусе имеет место белок-ДНКовая регуляция гена *rps20* в сочетании с конкуренцией РНК-полимераз, которые движутся навстречу друг другу по двум цепям ДНК с указанного промотора для гена *rps20* и

некоего промотора в 3'-области сайта для NtcA. Регуляция осуществляется в одной из двух ситуаций: фактор NtcA связан или не связан со своим сайтом. Наша модель конкуренции РНК-полимераз [21] основана на следующем правиле: обе движущиеся навстречу друг другу и столкнувшиеся РНК-полимеразы покидают ДНК и прекращают транскрипцию; при столкновении РНК-полимераза и фактора РНК-полимераза продолжает транскрипцию, а связь фактора с ДНК разрывается. Таким образом, фактор NtcA выступает здесь как потенциальный активатор транскрипции для гена *glnB* и одновременно как транскрипционный репрессор для гена *rps20* на комплементарной цепи ДНК, который ослабляет конкуренцию РНК-полимераз, транскрибирующих локус в противоположном направлении.

Оба типа регуляции согласованы: у *Synechococcus* sp. PCC 7002 фактор NtcA активирует транскрипцию гена *glnB*, от которого в этом виде ген *rps20* позиционно далек, так что здесь конкуренция не возникает. Напротив, у красных водорослей, возможно, NtcA репрессирует ген *rps20* и, в результате, активирует тот же самый ген *glnB*. Отметим, что оба эти гена отсутствуют у Streptophyta.

Сайты связывания фактора NtcB обнаружены нами у многих видов перед генами *nrtA* и *nirA* (рис. 2) (распределение нуклеотидов показано на рис. 4b). NtcB-регулон включает ген *nrtA* у Chroococcales и ген *nirA* у порядков Chroococcales, Nostocales, Oscillatoriales, Gloeobacterales (табл. 4). В пластах Rhodophyta сайты связывания NtcB не найдены.

Итак, изучено большое число видов в связи с регуляторной активностью перед многими генами транскрипционных факторов NtcA и NtcB. Для изученных генов предсказана эволюция NtcA- и NtcB-регулонов. Показано, что у многих цианобактерий фактор NtcA репрессирует транскрипцию генов *gifA*, *gifB* и активирует транскрипцию других генов, в частности, *apcF* и *som*. Кажется маловероятной гипотеза [8] о существенной роли NtcA-регуляции генов, вовлеченных в фиксацию углерода (*rbcl*, *rpe*, *cmpABCD*), или генов фотосистем у подавляющего большинства видов цианобактерий. Здесь примером может служить ген *petH*, кодирующий ферредоксин-NADP-редуктазу, во всех рассмотренных видах цианобактерий: по-видимому, перед ним NtcA-регуляторный участок отсутствует. Предложена гипотеза о механизме регуляции транскрипции гена *glnB* у Rhodophyta, согласно которой *glnB* всегда входит в NtcA-регулон.

Работа получила финансовую поддержку Международного научно-технического центра (3807) и Министерства образования и науки РФ (П2370 и 14.740.11.0624).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alfonso M., Perewoska I., Kirilovsky D. 2001. Redox control of *nrcA* gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Nitrogen availability and electron transport regulate the levels of the NtcA protein. *Plant Physiol.* **125**, 969–981.
2. Frias J.E., Flores E., Herrero A. 2000. Activation of the Anabaena nir operon promoter requires both NtcA (CAP family) and NtcB (LysR family) transcription factors. *Mol. Microbiol.* **38**, 613–625.
3. Muro-Pastor M.I., Florencio F.J. 2003. Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria. *Plant Physiol. Biochem.* **41**, 595–603.
4. Bird C., Wyman M. 2003. Nitrate/nitrite assimilation system of the marine picoplanktonic cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain WH 8103: effect of nitrogen source and availability on gene expression. *Appl. Env. Microbiol.* **69**, 7009–7018.
5. Aldehni M.F., Forchhammer K. 2006. Analysis of a non-canonical NtcA-dependent promoter in *Synechococcus elongatus* and its regulation by NtcA and PII. *Arch. Microbiol.* **184**, 378–386.
6. Garcia-Dominguez M., Reyes J.C., Florencio F.J. 2000. NtcA represses transcription of *gifA* and *gifB*, genes that encode inhibitors of glutamine synthetase type I from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Microbiol.* **35**, 1192–1201.
7. Su Z., Olman V., Mao F., Xu Y. 2005. Comparative genomics analysis of NtcA regulons in cyanobacteria: regulation of nitrogen assimilation and its coupling to photosynthesis. *Nucl. Acids Res.* **33**, 5156–5171.
8. Maeda S.-I., Kawaguchi Y., Ohe T.-A., Omata T. 1998. *cis*-Acting sequences required for NtcB-dependent, nitrite-responsive positive regulation of the nitrate assimilation operon in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* **180**, 4080–4088.
9. Aichi M., Takatani N., Omata T. 2001. Role of NtcB in Activation of Nitrate Assimilation Genes in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **183**, 5840–5847.
10. Forchhammer K. 2008. PII signal transducers: novel functional and structural insights. *Trends Microbiol.* **16**, 65–72.
11. <http://lab6.iitp.ru/en/twobox/>
12. Homann A., Link G. 2003. DNA-binding and transcription characteristics of three cloned sigma factors from mustard (*Sinapis alba* L.) suggest overlapping and distinct roles in plastid gene expression. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1288–300.
13. Kumar S., Dudley J., Nei M., Tamura K. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief. Bioinformatics.* **9**, 299–306.
14. <http://lab6.iitp.ru/en/treel/>
15. Lyubetsky V.A., Rubanov L.I., Seliverstov A.V. 2010. Lack of conservation of bacterial type promoters in plastids of Streptophyta. *Biol. Direct.* **5**, 1–32.
16. Лопатовская К.В., Зверков О.А., Селиверстов А.В., Любецкий В.А. 2009. Транскрипция генов синтеза пролина у бактерий родов *Marinobacter*, *Pseudomonas* и *Shewanella* регулируется белком семейства TetR. *Труды конференции Информационные технологии и системы*, 278–281.
17. Лопатовская К.В., Горбунов К.Ю., Русин Л.Ю., Селиверстов А.В., Любецкий В.А. 2010. Эволюция транскрипционной регуляции синтеза пролина у гамма-протеобактерий. *Вестник МГУ. Биология.* **4**, 92–94.
18. Crooks G.E., Hon G., Chandonia J.M., Brenner S.E. 2004. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Res.* **14**, 1188–1190.
19. Su Z., Mao F., Dam P., Wu H., Olman V., Paulsen I.T., Palenik B., Xu Y. 2006. Computational inference and experimental validation of the nitrogen assimilation regulatory network in cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH 8102. *Nucl. Acids Res.* **34**, 1050–1065.
20. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/microbial\\_taxtree.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/microbial_taxtree.html).
21. Lyubetsky V.A., Zverkov O.A., Rubanov L.I., Seliverstov A.V. Modeling RNA polymerase competition: the effect of  $\sigma$ -subunit knockout and temperature on gene transcription level. *Biol. Direct* – in press.