

На правах рукописи

ОБАНДО Сандовал Тобиас Амилкар

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ТРАНСПОРТА СИДЕРОФОРОВ
У ЦИАНОБАКТЕРИИ *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC 6803**

Специальность 03.02.07 – генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре генетики биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук, доцент,

БАБЫКИН Михаил Михайлович, доцент международного учебно-научного биотехнологического центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», г. Москва.

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор,

ЛОСЬ Дмитрий Анатольевич, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук», г. Москва.

Кандидат биологических наук,

ПОПОВА Александра Антоновна, старший научный сотрудник Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», г. Москва.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Москва.

Защита состоится «___» апреля 2019 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук» по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, д. 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, тел. +7 (499) 135-14-31.

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Горячева И.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Цианобактерии представляют собой морфологически разнообразную группу прокариот, которые встречаются почти во всех биотопах, включая ручьи, реки и озера, искусственные пруды и водоемы (Mur *et al.*, 1999), океаны (Hoffmann, 1999) и даже такие экстремальные места обитания, как термальные источники (Ward *et al.*, 1998; Weller *et al.*, 1991), гиперминерализованные микробные маты (Garcia-Pichel *et al.*, 1998; Nübel *et al.*, 2000), пустынные почвы (Garcia-Pichel *et al.*, 2001) и антарктические озера (Taton *et al.*, 2003, 2006). Отчасти это связано с их универсальным метаболизмом и способностью быстро переключаться с одного типа роста на другой, что позволяет им быть успешными в столь широком диапазоне условий окружающей среды (Stal, 1991). Таким образом, они вносят значительный вклад в первичную продуктивность большинства водных экосистем и биосферы в целом (Pace, 1997; Stockner and Antia, 1986).

Фундаментальное экологическое значение цианобактерий определяется также тем, что они являются признанными первичными колонизаторами засушливых земель и многие из них способны фиксировать атмосферный азот в биодоступные ионы аммония (см. обзор Fiore and Trevors, 1994). Согласно современным оценкам, вклад цианобактерий в первичную продуктивность биосферы составляет не менее 25% (Bullerjahn and Post, 2014; Flombaum *et al.*, 2013), а в биологическую фиксацию азота в мировом океане – до 50% (Karl *et al.*, 1997, 2002).

Абсолютно необходимым микроэлементом для подавляющего большинства бактерий является железо благодаря его каталитической роли во многих клеточных функциях (Andrews *et al.*, 2003). Цианобактерии, в сравнении с нефотосинтезирующими бактериями, имеют более значительную потребность в железе для поддержания богатых железом фотосистем. Например, у одноклеточной пресноводной цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 (далее *Synechocystis*) около четверти всего железа приходится на фотосистему I, и квота железа (число атомов на клетку) у этой цианобактерии на порядок выше, чем у сходной по размеру гетеротрофной бактерии *Escherichia coli* (Archibald, 1983; Keren *et al.*, 2004). В окисленных условиях в пресных и соленых водах железо существует преимущественно в окисленном состоянии, Fe(III) (Boyer *et al.*, 1987; Braun *et al.*, 1998; Byrne and Kester, 1976), и формирует труднорастворимые оксиды и оксигидроксиды Fe(III) (Cornell and Schwertmann, 2006; Frausto da Silva and Williams, 2001). Поэтому концентрация легкорастворимого закисного железа, Fe(II), крайне низка в экологических нишах цианобактерий, и, согласно многочисленным исследованиям, биодоступность железа представляет основной фактор, лимитирующий размножение и продуктивность цианобактерий (Boyd *et al.*, 2007; Imai *et al.*, 1999; Mann and Chisholm, 2000; Martin *et al.*, 1991; McKay *et al.*, 2004; Nagai *et al.*, 2004; Twiss *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2013). Таким образом, системы поглощения железа являются критическими для роста окисленных фотосинтезирующих микроорганизмов (Wandersman and Delepelaire, 2004).

Степень разработанности темы исследования

Бактерии выработали эффективные механизмы поглощения железа для преодоления его экстремально низкой биодоступности. Один из этих механизмов основан на синтезе и секреции низкомолекулярных соединений, сидерофоров, обладающих высокой специфичностью и аффинностью к труднорастворимому Fe(III) (Neilands, 1995; Vraspir and Butler, 2009). Вне клетки сидерофоры (в десферри-форме) растворяют и связывают железо, а затем в виде комплексов с Fe(III) (Fe-сидерофоры) транспортируются обратно в клетку.

Цианобактерии, как и другие бактерии, могут усваивать железо в различных формах: в виде ионов Fe(II) или Fe(III), либо в виде Fe-сидерофоров. Исследования последнего десятилетия были главным образом посвящены независимому от сидерофоров, восстановительному поглощению железа. Этот путь основан на восстановлении перед транспортом как свободного, так и органически связанного железа до легкорастворимого и более биодоступного Fe(II). Преимущество восстановительной стратегии заключается в ее способности оперировать с различными источниками железа, включая Fe-сидерофоры (Hopkinson and Morel, 2009; Kranzler *et al.*, 2011, 2014; Lis and Shaked, 2009; Lis *et al.*, 2015a, 2015b; Rose *et al.*, 2005). Однако, согласно многочисленным свидетельствам, свободное железо служит предпочтительным субстратом для цианобактерий, не являющихся продуцентами сидерофоров (Chen and Wang, 2008; Fujii *et al.*, 2011, 2015; Kranzler *et al.*, 2011, 2014; Lis *et al.*, 2015a; Rudolf *et al.*, 2015; Shaked and Lis, 2012). Таким образом, в случае чужеродных Fe-сидерофоров (ксеносидерофоров) одного потенциала восстановительного поглощения может быть недостаточно для удовлетворения потребностей цианобактерий в железе.

Способность цианобактерий продуцировать и утилизировать сидерофоры (даже множественные) (Wilhelm and Trick, 1994) давно известна и до сих пор является предметом активных исследований (Kranzler *et al.*, 2013; Zappa and Bauer, 2017). Значительный прогресс был достигнут в понимании молекулярных механизмов и генетического контроля поглощения железа у одноклеточной пресноводной цианобактерии *Synechocystis*. Эта цианобактерия, ставшая объектом настоящего исследования, служит классическим модельным организмом для молекулярно-генетического изучения оксигенного фотосинтеза. Геном *Synechocystis* не содержит генов, контролирующих биосинтез и секрецию сидерофоров (Ehrenreich *et al.*, 2005; Hopkinson and Morel, 2009), и ее неспособность продуцировать сидерофоры подтверждена экспериментально (Kranzler *et al.*, 2011). Считается, что восстановление Fe(III) играет центральную роль в поглощении как свободного, так и связанного с сидерофорами железа, и происходит до переноса железа через внутреннюю мембрану *Synechocystis*. С другой стороны, наряду с генами белкового комплекса TonB-ExbB-ExbD геном *Synechocystis* содержит гены TBDTs (TonB-зависимых транспортеров) и гены всех остальных предполагаемых компонентов систем транспорта Fe-сидерофоров (Kaneko *et al.*, 1996; Katoh *et al.*, 2001a; Mirus *et al.*, 2009; Stevanovic *et al.*, 2012). Это является весомым аргументом существования у *Synechocystis* классического сидерофор-

зависимого пути поглощения железа, функционирующего, однако, с участием ксеносидерофоров.

Цель работы заключалась в идентификации структурных и регуляторных генов транспортных систем, вовлеченных в утилизацию определенных ксеносидерофоров клетками не синтезирующей сидерофоры цианобактерии *Synechocystis*.

Задачи работы:

1. Исследовать способность цианобактерии *Synechocystis* использовать ксеносидерофоры в качестве единственных источников железа для роста.

2. Идентифицировать гены, существенные для утилизации специфических ксеносидерофоров.

3. Изучить экспрессию структурных генов систем транспорта Fe-сидерофоров в зависимости от наличия в среде утилизируемого ксеносидерофора.

4. Исследовать роль генов *pchR1*, *pchR2* и *pcrR*, кодирующих AgaC-подобные факторы транскрипции, в регуляции экспрессии структурных генов систем транспорта Fe-сидерофоров.

Научная новизна и практическая значимость

Представленные в настоящей работе результаты впервые свидетельствуют о способности цианобактерии *Synechocystis* использовать специфические ксеносидерофоры в качестве единственных источников железа через типичный для грамотрицательных бактерий TonB-зависимый путь транспорта, что расширяет представления об адаптивном потенциале цианобактерий, не способных синтезировать собственные сидерофоры. Идентифицированы гены, кодирующие все необходимые компоненты TonB-зависимой системы активного транспорта дигидроксаматных ксеносидерофоров у *Synechocystis*. Впервые исследована роль AgaC-подобных факторов транскрипции в регуляции экспрессии генов транспортеров сидерофоров у цианобактерий. Полученные экспериментальные данные и коллекция мутантов могут быть использованы для дальнейшего исследования молекулярных механизмов гомеостаза железа и TonB-зависимых систем транспорта органических соединений у цианобактерий, используемых в качестве модельных объектов для создания штаммов-продуцентов различных видов биотоплива.

Положения, выносимые на защиту

1. Цианобактерия *Synechocystis*, не являющаяся продуцентом сидерофоров, способна использовать специфические дигидроксаматные ксеносидерофоры в качестве единственных источников железа.

2. Утилизация этих ксеносидерофоров осуществляется посредством прямого TonB-зависимого транспорта в цитоплазму без участия основных транспортеров неорганического железа.

3. Выявлен кластер из пяти генов, *fecCDEB1-schT*, контролирующей транспорт дигидроксаматных ксеносидерофоров. Гены кластера кодируют TonB-зависимый транспортер SchT наружной мембраны и все необходимые компоненты ABC-транспортера: периплазматический связывающий белок FecB1, трансмембранную пермеазу FecC/FecD и мембранную АТФазу FecE.

4. Экспрессия генов *schT* и *fecB1* стимулируется утилизируемым ксеносидерофором и регулируется AraC-подобными факторами транскрипции PchR1, PchR2 и PcrR.

Личный вклад автора

Автор принимал участие во всех этапах выполнения работы, включая планирование и проведение экспериментов, обработку и интерпретацию результатов, а также написание тезисов докладов и статей. Все мутанты *Synechocystis*, использованные в настоящей работе, за исключением нескольких штаммов из коллекции кафедры, сконструированы непосредственно автором.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные результаты диссертации опубликованы в двух статьях рецензируемого научного журнала, отвечающего требованиям Высшей Аттестационной Комиссии Министерства образования и науки Российской Федерации. Результаты диссертации также были представлены на VI Съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Ростов-на-Дону, 2014), 5-ом Всероссийском симпозиуме с международным участием «Автотрофные микроорганизмы» (Москва, 2015) и Всероссийской конференции с международным участием «50 лет ВОГиС: успехи и перспективы» (Москва, 2016).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 13-04-01767.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из глав-разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы» и «Список литературы». Работа изложена на 116 страницах машинописного текста, включая 1 страницу Приложения, содержит 21 рисунок и 5 таблиц. Список цитируемой литературы включает 259 наименований, из которых 258 – на английском языке.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

Представляет вторую после Введения главу диссертации, обобщающую все имеющиеся в настоящее время сведения о генетическом контроле и молекулярных механизмах поглощения железа у цианобактерий. Основные подразделы этой главы посвящены биологическому значению и доступности железа в природе, зависимому и независимому от сидерофоров путям транспорта железа в клетки грамотрицательных бактерий, а также регуляторным системам гомеостаза железа у цианобактерий.

Материалы и методы

Объектами исследования служили штамм дикого типа (WT) цианобактерии *Synechocystis* и сконструированные на его основе мутанты (преимущественно в данной работе, кроме нескольких, взятых из коллекции кафедры). Нитчатую цианобактерию *Anabaena variabilis* ATCC 29413 использовали в качестве продуцента дигидроксаматного сидерофора SAV (штамм предоставлен к.б.н. Л.Е.Михеевой). Штамм *Escherichia coli* NM522 использовали для молекулярного клонирования и конструирования инактивированных генов *Synechocystis*. Штамм *E. coli* C600(R751) служил

донором плазмиды-помощника для конъюгационного переноса нативного гена *Synechocystis* в составе автономной рекомбинантной плазмиды в мутанты этой цианобактерии (комплементационный анализ).

Цианобактерии культивировали фотоавтотрофно при 30°C и постоянном освещении белым светом (40 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹). При этом использовали жидкие или плотные (0,9% агара), минеральные среды YBG11 (Shcolnick *et al.*, 2007) или BG11 (Rippka *et al.*, 1979 либо Stanier *et al.*, 1971). Влияние недостатка железа на рост клеток различных штаммов *Synechocystis* оценивали при их инкубации в обедненных железом средах YBG11-Fe или BG11-Fe, а эффект стимуляции роста ксеносидерофорами – в соответствующих производных жидкой среды YBG11-Fe. С целью истощения внутриклеточных запасов железа и получения голодающих по железу культур *Synechocystis* отмытые от стандартной среды клетки засеивали в обедненную железом среду до конечной оптической плотности ~ 0,05 при 750 нм (OD₇₅₀) и культивировали в течение 5 дней. Голодающие по железу клетки пересеивали до OD₇₅₀ ~ 0,05 в обедненную железом среду, и их рост в зависимости от наличия или отсутствия тестируемого ксеносидерофора регистрировали по изменению OD₇₅₀.

В работе использовали коммерчески доступные сидерофоры, приобретенные либо в десферри-форме – тригидроксаматные десферрихром, DFCH (Sigma), и десферриоксамин В, DFOB (дефероксаминмесилат; Sigma-Aldrich), либо в насыщенной железом форме – дигидроксаматные Fe-аэробактин (FeAB) и Fe-шизокинин (FeSK) (EMC microcollections GmbH). Сидерофоры в десферри-форме насыщали железом, смешивая их с FeCl₃ в молярном отношении 1,33/1, получая их соответствующие Fe-формы, феррихром (FCH) и ферриоксамин В (FOB). В качестве источника SAV использовали стерильный фильтрат выращенной в условиях недостатка железа культуры *A. variabilis*, который добавляли в среду роста *Synechocystis*.

Основные использованные методы и подходы изложены ниже в обобщенно сжатом виде.

Для выявления генов *Synechocystis*, наиболее вероятных кандидатов на участие в контроле транспорта ксеносидерофоров, использовали стандартные подходы биоинформатики и сравнительной геномики.

Исследуемые гены подвергали функциональному анализу, включающему их направленную инактивацию и фенотипическое изучение сконструированных мутантов (стратегия обратной генетики). Согласно очередности этапов анализа, использовали следующие методы и экспериментальные подходы:

- амплификация с помощью ПЦР специфического участка генома цианобактерии;
- молекулярное клонирование амплифицированного фрагмента ДНК в составе рекомбинантной плазмиды;
- инактивация клонированного гена делецией и замещением удаляемого участка кассетой устойчивости к антибиотику;
- конструирование мутанта с инактивированным целевым геном путем трансформации штамма WT *Synechocystis* рекомбинантной плазмидой (замещение интактного гена-мишени его мутантным аллелем в хромосоме штамма-реципиента);

- сегрегация мутанта на плотной селективной среде (с подходящим антибиотиком) с подтверждением его гомозиготности с помощью ПЦР-анализа;
- комплексный физиолого-биохимический анализ мутанта, включающий характеристику его роста и спектральный анализ изменений состояния его пигментов в зависимости от наличия/отсутствия в среде свободного или связанного с сидерофором железа.

Для подтверждения участия в утилизации ксеносидерофоров двух перекрывающихся генов *Synechocystis*, составляющих единый оперон, использовали комплементационный анализ двух соответствующих мутантов. Дистальный ген оперона клонировали в векторе экспрессии и с помощью конъюгационных скрещиваний переносили из клеток *E. coli* в клетки мутантов *Synechocystis* для последующего фенотипического сравнения трансконъюгантов с исходными мутантами и штаммом WT.

Анализ экспрессии генов, существенных для утилизации ксеносидерофоров, проводили с помощью метода обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР РВ).

РЕЗУЛЬТАТЫ

ТонВ-зависимая утилизация дигидроксаматных ксеносидерофоров у цианобактерии *Synechocystis*

С учетом имеющейся информации о потенциальной субстратной специфичности предполагаемых транспортеров железа у *Synechocystis* (Веб-сайт CyanoBase) в совокупности с литературными данными об известных бактериальных системах поглощения сидерофоров был проведен поиск ксеносидерофоров, способных служить единственными источниками железа для этой цианобактерии, а также генов, контролирующих их утилизацию. В предварительных экспериментах было обнаружено, что Fe-сидерофор FeSK восстанавливает рост штамма WT *Synechocystis* в обедненной железом среде. Это свидетельствовало о способности дигидроксаматного ксеносидерофора в качестве единственного источника железа поддерживать рост клеток и позволяло полагать, что его утилизация зависит от системы TonB-ExbB-ExbD, обеспечивающей транспорт соединений через наружную мембрану энергией внутренней мембраны у грамотрицательных бактерий.

Конструирование мутантов Δ tonB и Δ exbBD1 *Synechocystis*

В геноме *Synechocystis* идентифицированы три кластера генов *exbBD*: *exbB1D1* (*sll1404-sll1405*), *exbB2D2* (*slr0677-slr0678*) и *exbB3D3D4* (*sll0477-sll0478-sll0479*) (Huang *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2015; Stevanovic *et al.*, 2012). При этом единственный ген *tonB* (*slr1484*) *Synechocystis* тесно сцеплен с кластером *exbB1D1* (Рисунок 1.А). Данные биоинформатического анализа позволили полагать, что белковый комплекс TonB-ExbB1-ExbD1 может быть вовлечен в транспорт ксеносидерофоров у *Synechocystis*.

Для проверки предположения об участии системы TonB-ExbB1-ExbD1 в утилизации ксеносидерофоров клетками *Synechocystis* были сконструированы делеционно-инсерционные мутанты Δ tonB и Δ exbBD1, как описано в главе «Материалы и Методы». Ранее сообщалось, что инактивация этих генов приводит к пониженному росту клеток в условиях голодания по железу (Jiang *et*

al., 2012; 2015). В связи с этим в настоящей работе для сегрегации мутантов использовали две селективные среды, одна из которых основана на стандартной среде YBG11, а другая – на обогащенной железом среде YBG11(Fe600). Гомозиготные мутанты были успешно получены (Рисунок 1.Б) с использованием обеих селективных сред. Мы не наблюдали каких-либо фенотипических различий между клонами каждого мутанта, отобранными на разных средах; тем не менее, в последующих экспериментах использовали только мутанты $\Delta tonB$ и $\Delta exbBD1$, отобранные на плотной селективной среде YBG11(Fe600).

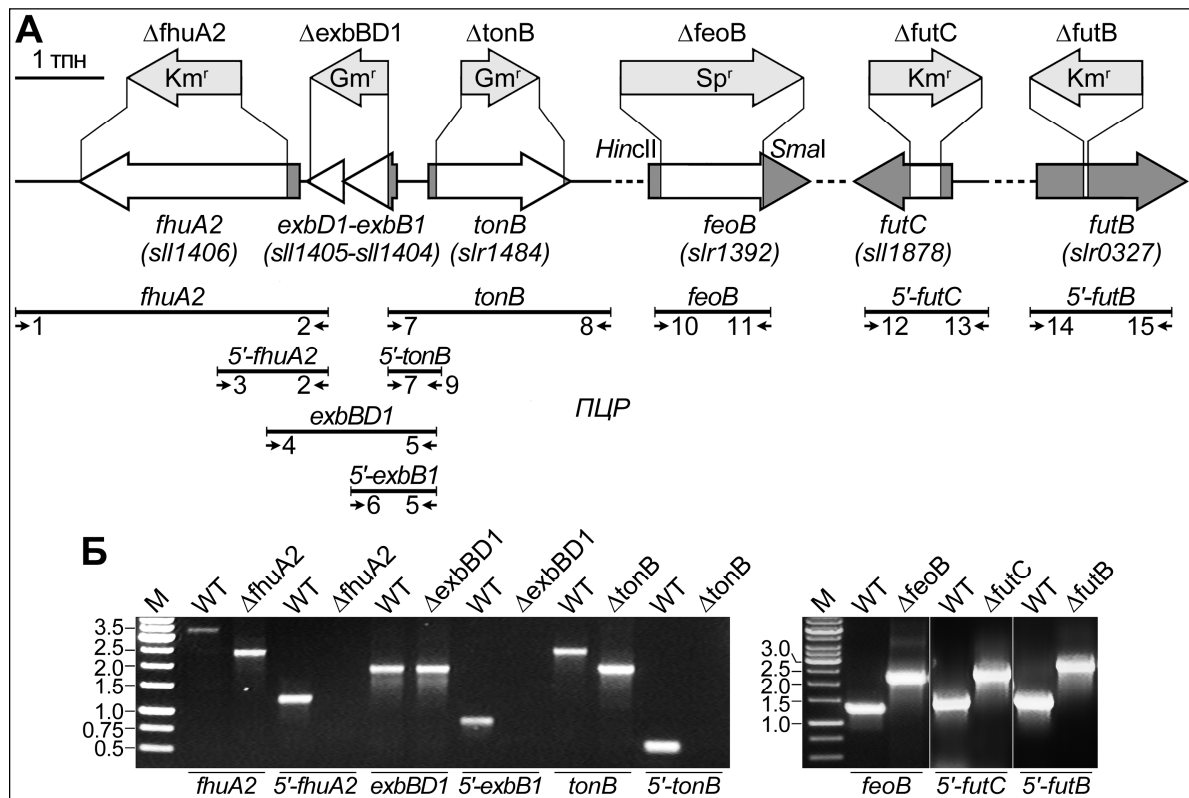


Рисунок 1. Конструирование и сегрегация мутантов $\Delta fhuA2$, $\Delta exbBD1$, $\Delta tonB$, $\Delta feoB$, $\Delta futC$ и $\Delta futB$ *Synechocystis*. (А) Схема делеционно-инсерционной инактивации генов *fhuA2*, *exbB1-exbD1*, *tonB*, *feoB*, *futC* и *futB*. Введенные делеции выделены белым цветом, а инсерции кассет устойчивости к антибиотикам, Km^r, Gm^r или Sp^r, изображены над генами. Отрезки под генами соответствуют участкам, подвергнутым ПЦР-анализу с использованием праймеров, обозначенных нумерованными стрелками. (Б) Результаты ПЦР-анализа, доказывающие гомозиготность мутантов $\Delta fhuA2$, $\Delta exbBD1$, $\Delta tonB$, $\Delta feoB$, $\Delta futC$ и $\Delta futB$. М – ДНК-маркеры (тпн).

Инактивация генов кластера *tonB-exbBD1* не влияет на рост *Synechocystis* в обедненной железом среде

Рост штамма WT и сконструированных нами мутантов $\Delta tonB$ и $\Delta exbBD1$ исследовали как в средах BG11 и BG11-Fe, так и в средах YBG11 и YBG11-Fe. Среда YBG11 содержит Fe(III) в прекомплексе с EDTA (Shcolnick *et al.*, 2007). В ее производной YBG11-Fe, содержащей 16 мкМ Na₂EDTA без добавления FeCl₃, пригодными для поглощения остаются только следовые количества Fe(III), которые высвобождаются из комплексов Fe-EDTA, не утилизируемых

клетками *Synechocystis* (Kranzler *et al.*, 2011). Нами не выявлено каких-либо фенотипических различий между штаммом WT и мутантами ΔtonB и ΔexbBD1 как при достатке, так и при недостатке железа, независимо от типа используемой среды. Клетки штамма WT и обоих мутантов нормально росли в средах BG11 и YBG11, и их рост в одинаково значительной степени был понижен в соответствующих обедненных железом средах (Рисунок 2.А и Б). Идентичный фенотип голодания по железу у всех сравниваемых штаммов был подтвержден спектральным анализом (Рисунок 2.В). Спектры абсорбции клеток обоих мутантов не отличались от таковых штамма WT ни в условиях достатка (в среде BG11), ни в условиях недостатка железа (в среде BG11-Fe).

Таким образом, согласно нашим данным, система TonB-ExbB1-ExbD1 *Synechocystis* не является существенной для транспорта как свободного, так и связанного с цитратом аммония железа (среда BG11).

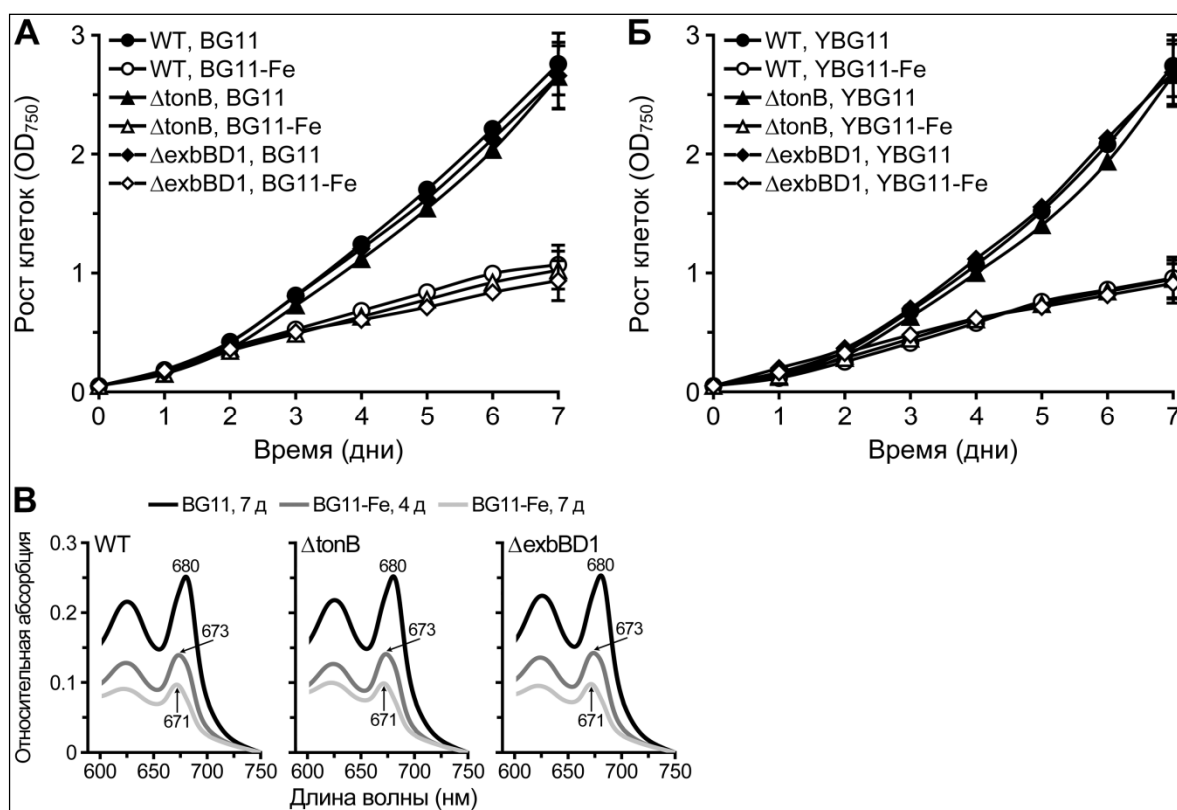


Рисунок 2. Кинетика роста и спектральные характеристики клеток штамма WT и мутантов ΔtonB и ΔexbBD1 *Synechocystis* в зависимости от наличия или отсутствия железа в среде. Отмытые от железа клетки засеивали до $\text{OD}_{750} \sim 0,05$ в среды указанного состава и выращивали в стандартных фотоавтотрофных условиях с активной аэрацией в течение семи дней. (А, Б) Кривые роста культур в присутствии или отсутствии источника Fe(III) в средах BG11/BG11-Fe или YBG11/YBG11-Fe, соответственно. (В) Длинноволновые (600-750 нм) участки спектров клеток культур штамма WT и мутантов ΔtonB и ΔexbBD1 в богатой (BG11, 7 дней роста) и обедненной железом среде (BG11-Fe, 4 и 7 дней роста). Стрелками отмечен сдвиг красного пика хлорофилла *a* с 680 нм в сторону коротких волн света у голодающих по железу клеток (в BG11-Fe) – до 673 нм на 4 день и до 671 нм на 7 день роста (слева – пик фикоцианина).

Тригидроксаматные ксеносидерофоры FCH и FOB не служат источниками железа для *Synechocystis*

Геном *Synechocystis* содержит гены *fhuA1*, *fhuA2* и *fhuA3*, кодирующие предполагаемые рецепторы (TBDTs) тригидроксаматных сидерофоров, таких как FCH и FOB, в наружной мембране (Kaneko *et al.*, 1996; Katoh *et al.*, 2001a). Штамм WT и мутанты ΔtonB и ΔexbBD1 росли очень медленно в обедненной железом среде YBG11-Fe, и добавление FCH или FOB не приводило к восстановлению их роста (Рисунок 3.А и Б). Более того, в присутствии каждого из этих Fe-сидерофоров наблюдали незначительное, но воспроизводимое, понижение роста культур всех трех штаммов относительно уровней их роста в обедненной железом среде.

Таким образом, тригидроксаматные ксеносидерофоры FCH и FOB не удовлетворяют потребность клеток *Synechocystis* в железе.

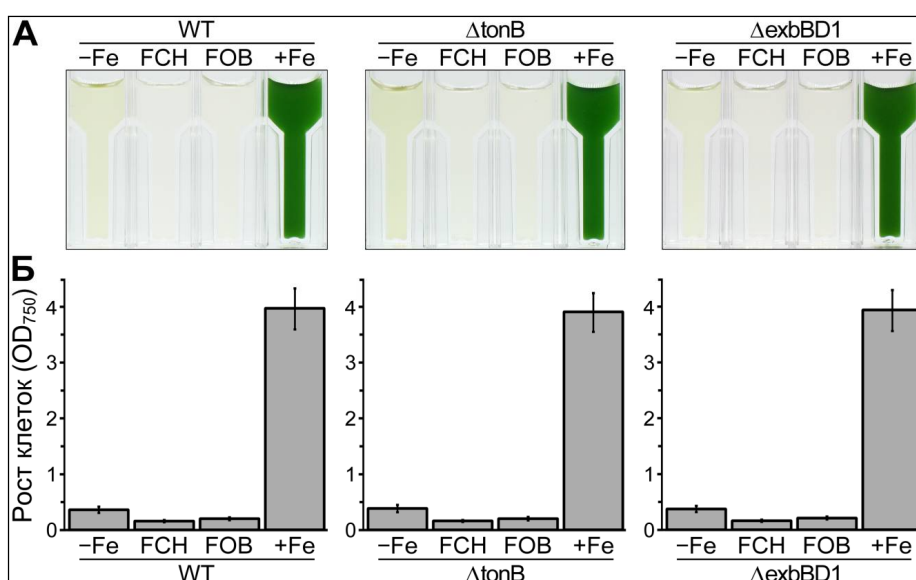


Рисунок 3. Рост штамма WT и мутантов ΔtonB и ΔexbBD1 *Synechocystis* в присутствии тригидроксаматных ксеносидерофоров, FCH или FOB, в качестве единственных источников железа. Голодающие по железу клетки разводили до $\text{OD}_{750} \sim 0,05$ в средах указанного состава и 4-мл культуры инкубировали в 20-мл пробирках в стандартных фотоавтотрофных условиях без активной аэрации в течение девяти дней. (А) Фотография и (Б) соответствующие конечные OD_{750} культур, выращенных в среде YBG11-Fe (-Fe) или в среде YBG11-Fe, содержащей 10 мкМ FCH либо 10 мкМ FOB. Положительный контроль – культуры в среде YBG11 (+Fe). Показаны средние значения и стандартные отклонения в трех независимых экспериментах.

Дигидроксаматные ксеносидерофоры FeSK и SAV стимулируют рост *Synechocystis* в обедненной железом среде, и их утилизация зависит от генов *tonB-exbB1D1*

Дигидроксаматные сидерофоры SK (шизокинин) и SAV могут синтезироваться и секретироваться в окружающую среду нитчатými диазотрофными цианобактериями рода *Anabaena*. Продуцентами SK являются *Anabaena* sp. PCC 6411 (Simpson and Neilands, 1976) и *Anabaena* sp. PCC 7120 (Goldman *et al.*, 1983), тогда как единственным известным продуцентом SAV – *A. variabilis* (Trick and Kerry, 1992).

Нами была исследована утилизация FeSK и структурно родственных сидерофоров SAV и FeAB клетками *Synechocystis*. Как уже было отмечено выше (см. Рисунок 3), штамм WT и мутанты Δ tonB и Δ exbBD1 росли очень медленно в обедненной железом среде YBG11-Fe. Добавление FeSK или SAV приводило к восстановлению роста штамма WT до того же уровня, что в стандартной среде YBG11. Однако ни один из этих ксеносидерофоров не восстанавливал рост мутантов Δ tonB и Δ exbBD1 (Рисунок 4.А и Б). Как и ожидалось, добавление FeAB, проявлявшего низкую биодоступность для клеток *Synechocystis* (Lis *et al.*, 2015a), не приводило к восстановлению роста ни штамма WT, ни обоих мутантов (Рисунок 4.А и Б). С одной стороны, эти результаты свидетельствовали о способности штамма WT *Synechocystis* утилизировать ксеносидерофоры FeSK и SAV в качестве единственных источников железа, а с другой стороны – об утрате такой способности мутантами Δ tonB и Δ exbBD1.

Гены *exbB1D1* входят в состав оперона *exbB1-exbD1-fhuA2* (Kopf *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2001), в котором ген *fhuA2* кодирует белок с предполагаемой функцией TBDT (Kaneko *et al.*, 1996; Katoh *et al.*, 2001a). Чтобы исключить возможность полярного эффекта инактивации генов *exbB1D1* на экспрессию нижерасположенного гена (*fhuA2*), нами был сконструирован мутант Δ fhuA2. Этот мутант, успешно сегрегированный в гомозиготном состоянии (Рисунок 1) как на стандартной, так и на обогащенной железом селективной среде, не отличался по своим ростовым характеристикам от штамма WT во всех использованных в работе условиях.

Следовательно, система TonB-ExbB1-ExbD1 является существенной для утилизации дигидроксаматных ксеносидерофоров FeSK и SAV клетками *Synechocystis*, тогда как предполагаемый TBDT FhuA2 таковым не является.

Инактивация генов *feoB*, *futB* или *futC* не нарушает способность *Synechocystis* утилизировать ксеносидерофоры FeSK и SAV

Поглощение ксеносидерофора FeAB нитчатой цианобактерией *Anabaena* 7120 происходит с участием TonB-зависимого транспортера FeSK, SchT, и не связано с восстановлением железа (Rudolf *et al.*, 2016). У *Synechocystis* железо восстанавливается и высвобождается из FeAB в периплазме (Kranzler *et al.*, 2011; Lis *et al.*, 2015a), но вместе с тем с высокой эффективностью происходит возвратное окисление Fe(II) в фотоавтотрофных условиях (Xu *et al.*, 2016). Поэтому нельзя было исключать, что FeSK и SAV тоже могут восстанавливаться в периплазматическом пространстве клеток *Synechocystis*, и свободное железо может транслоцироваться в цитоплазму трансмембранными транспортерами FeoB и FutABC, специфичными к ионам Fe(II) и Fe(III), соответственно (Katoh *et al.*, 2001a).

Для проверки этого предположения сконструировали мутант Δ feoB с нарушенным транспортером FeoB, а также мутанты Δ futB и Δ futC с инактивированными пермеазной и АТФазной субъединицами транспортера FutABC, соответственно (Рисунок 1). Мутант Δ feoB не отличался по росту от штамма WT и в обедненной железом, и в стандартной среде YBG11, тогда как мутанты Δ futB и Δ futC росли значительно медленнее штамма WT в обеих указанных средах (Рисунок 4.В). Однако все три мутанта демонстрировали

рост, идентичный росту штамма WT, в обедненной железом среде, содержащей FeSK или SAV в качестве единственного источника железа. На Рисунке 4.В показан рост клеток штамма WT и мутантов $\Delta feoB$, $\Delta futB$ и $\Delta futC$ в среде YBG11-Fe с добавлением FeSK. Таким образом, гены *feoB*, *futB* и $\Delta futC$ не являются необходимыми для утилизации дигидроксаматных ксеносидерофоров FeSK и SAV у *Synechocystis*.

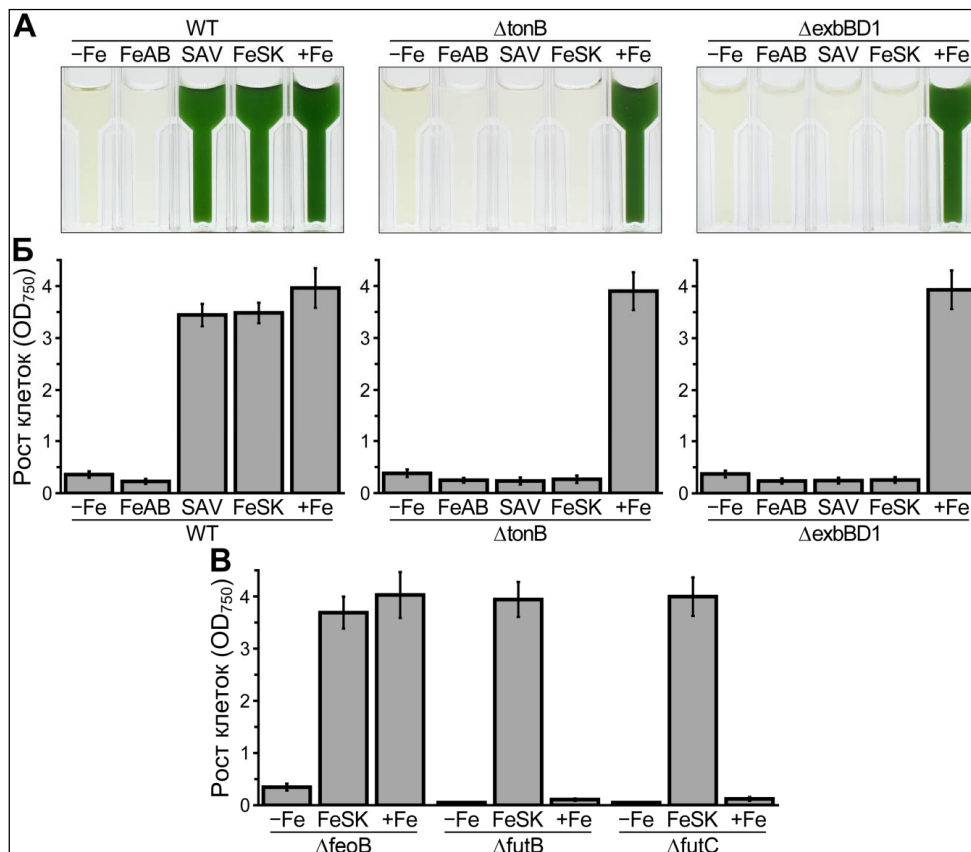


Рисунок 4. Рост штамма WT и мутантов $\Delta tonB$, $\Delta exbBD1$, $\Delta feoB$, $\Delta futB$ и $\Delta futC$ *Synechocystis* в присутствии дигидроксаматных ксеносидерофоров в качестве единственных источников железа. Голодающие по железу клетки разводили до OD₇₅₀ ~ 0,05 в средах указанного состава и 4-мл культуры инкубировали в 20-мл пробирках в стандартных фотоавтотрофных условиях без активной аэрации в течение девяти дней. (А) Фотография и (Б) соответствующие конечные OD₇₅₀ культур штамма WT и мутантов $\Delta tonB$ и $\Delta exbBD1$, выращенных в среде YBG11-Fe (-Fe), в среде YBG11-Fe, содержащей по 10 мкМ FeAB, SAV или FeSK, либо в среде YBG11 (+Fe). (В) Конечные OD₇₅₀ культур мутантов $\Delta feoB$, $\Delta futB$ и $\Delta futC$, выращенных в средах YBG11-Fe (-Fe), YBG11-Fe с 10 мкМ FeSK либо YBG11 (+Fe). Показаны средние значения и стандартные отклонения в трех независимых экспериментах.

Генный кластер *fecCDEB1-schT* является существенным для утилизации дигидроксаматных ксеносидерофоров клетками *Synechocystis*

Геномная организация генов, предположительно вовлеченных в контроль транспорта ксеносидерофоров у *Synechocystis*

Участие белкового комплекса TonB-ExbB1-ExbD1 в утилизации дигидроксаматных ксеносидерофоров FeSK и SAV у цианобактерии

Synechocystis предполагает наличие у нее систем транспорта Fe-сидерофоров. Как минимум 16 генов, кодирующих белки, гомологичные компонентам известных транспортеров железа, идентифицировали в геноме *Synechocystis* (Kaneko *et al.*, 1996; Katoh *et al.*, 2001a). Было показано, что только 5 из них (*feoB*, *futA1*, *futA2*, *futB* и *futC*) являются существенными для транспорта неорганического железа. Согласно предсказываемым *in silico* функциям оставшихся 11 генов, было предположено, что они участвуют в транспорте Fe-сидерофоров (Katoh *et al.*, 2001a). Эти гены локализуются на участке генома размером 31 тпн (13498-44506 н), содержащем также гены *exbB1*, *exbD1* и *tonB*.

Вышеупомянутые 11 генов можно разделить на две функциональные группы. Первая группа включает 4 гена, *fhuA1* (*sll1409*), *fhuA2* (*sll1406*), *fhuA3* (*slr1490*) и *iutA* (*sll1206*), которые кодируют предполагаемые TBDTs. Как уже было отмечено выше, один из них, *fhuA2*, несуществен для утилизации ксеносидерофоров FeSK и SAV. Белок, кодируемый геном *iutA*, является ближайшим гомологом белков SchT и IutA2 нитчатой цианобактерии *Anabaena* 7120 (Mirus *et al.*, 2009), вовлеченных в поглощение сидерофора FeSK (Nicolaisen *et al.*, 2008; Rudolf *et al.*, 2016). Нами предложено новое название для гена *iutA* – *schT* (“schizokinen transporter”) – в соответствии с выявленной функцией этого гена (описанной ниже), а также гомологией его продукта белку SchT *Anabaena* 7120. Вторая группа включает 7 генов, *fecB1* (*slr1319*), *fecB2* (*sll1202*), *fecB3* (*slr1491*), *fecB4* (*slr1492*), *fecC* (*slr1316*), *fecD* (*slr1317*) и *fecE* (*slr1318*), предположительно кодирующих компоненты ABC-транспортеров Fec-типа. Белки FecB1, FecB2, FecB3 и FecB4 представляют предполагаемые периплазматические (субстрат-) связывающие белки, RBPs, тогда как FecC и FecD – трансмембранные пермеазные белки, а FecE – ассоциированную с внутренней мембраной АТФазу. Очевидно, только белки FecC, FecD и FecE подходят для сборки корового ABC-транспортера гипотетической системы импорта Fe-сидерофоров у *Synechocystis*.

Инактивация любого из генов *fecB1*, *fecC*, *fecD*, *fecE* или *schT* нарушает способность *Synechocystis* утилизировать ксеносидерофоры FeSK и SAV

Гены *fecC*, *fecD* и *fecE* *Synechocystis* входят в состав генного кластера *fecCDEB1-schT*, в котором гены *fecB1* и *schT* кодируют предполагаемые RBP и TBDT, соответственно. Все пять генов тесно сцеплены в хромосоме и, за исключением гена *schT*, транскрибируются в одном направлении. Поскольку эти физически кластеризованные гены кодируют все предполагаемые компоненты TonB-зависимой и опосредуемой сидерофорами системы поглощения железа, они оценивались нами как наиболее вероятные кандидаты на участие в контроле импорта FeSK и SAV. Для проверки данного предположения гены-кандидаты были инактивированы введением делеций с замещением удаленных участков кассетой устойчивости к канамицину, как описано в главе «Материалы и Методы». Гомозиготные мутанты $\Delta fecC$, $\Delta fecD$, $\Delta fecE$, $\Delta fecB1$ и $\Delta schT$ были успешно выделены на стандартной селективной среде, что было подтверждено результатами ПЦР-анализа (Рисунок 5.А и Б). Как и ожидалось, полученные мутанты не отличались от штамма WT по росту в стандартной среде и не демонстрировали более выраженного фенотипа

голодания клеток по железу в обедненной железом среде (не показано). Они были проверены на способность утилизировать FeSK и SAV в качестве единственных источников железа. Штамм WT и пять указанных мутантов росли очень медленно в обедненной железом среде YBG11-Fe (Рисунок 6). Добавление FeSK либо SAV приводило к восстановлению роста штамма WT. Напротив, ни один из двух ксеносидерофоров не восстанавливал рост мутантов $\Delta fecB1$, $\Delta fecC$, $\Delta fecD$, $\Delta fecE$ и $\Delta schT$ (Рисунок 6), что указывало на утрату этими мутантами способности утилизировать FeSK и SAV в качестве единственных источников железа.

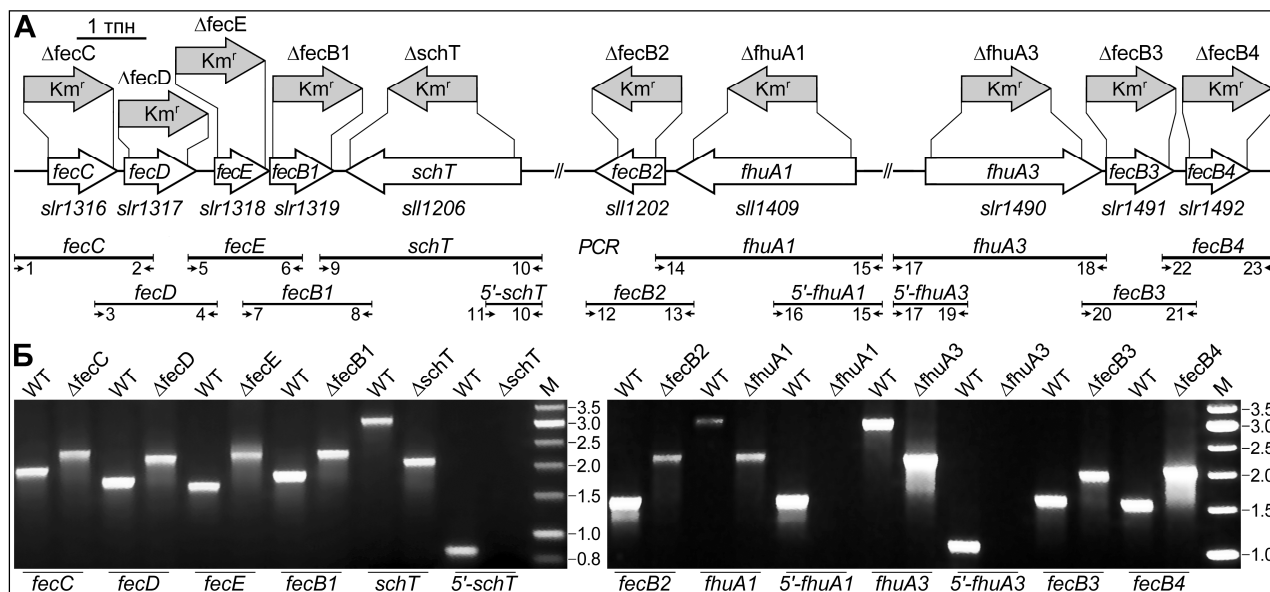


Рисунок 5. Конструирование и сегрегация мутантов $\Delta fecC$, $\Delta fecD$, $\Delta fecE$, $\Delta fecB1$, $\Delta schT$, $\Delta fecB2$, $\Delta fhuA1$, $\Delta fhuA3$, $\Delta fecB3$ и $\Delta fecB4$ *Synechocystis*. (А) Схема делеционно-инсерционной инактивации соответствующих генов. Локализация инсерций кассеты *Km^r* у мутантов показана над генами. Отрезки под генами соответствуют участкам, подвергнутым ПЦР-анализу с использованием праймеров, обозначенных нумерованными стрелками. (Б) Результаты ПЦР-анализа, доказывающие гомозиготность мутантов. М – ДНК-маркеры (тпн).

Комплементационный анализ мутантов $\Delta fecB1$ и $\Delta fecE$

Два гена *fecE* и *fecB1* кластера *fecCDEB1-schT* перекрываются и составляют единую транскрипционную единицу (Korf *et al.*, 2014). В связи с этим нельзя было исключать, что ген *fecE* не участвует в утилизации ксеносидерофоров, и фенотип мутанта $\Delta fecE$ обусловлен строгим полярным эффектом инактивации гена *fecE* на экспрессию перекрывающегося с ним гена *fecB1*. Для прояснения роли гена *fecE* в утилизации ксеносидерофоров был проведен комплементационный анализ мутантов $\Delta fecE$ и $\Delta fecB1$. С этой целью на основе вектора pVZ326, способного реплицироваться в широком круге бактерий (GenBank, MG356711), сконструировали рекомбинантную плазмиду pVZ-*fecB1*, содержащую ген *fecB1* под контролем конститутивного промотора.

С помощью конъюгационных скрещиваний плазмиду pVZ-*fecB1* ввели в клетки мутантов $\Delta fecB1$ и $\Delta fecE$. Как показано на Рисунке 6.А и Б, введение плазмиды pVZ-*fecB1* в мутант $\Delta fecB1$, но не $\Delta fecE$, приводило к

восстановлению фенотипа штамма WT, то есть, способности клеток использовать FeSK или SAV в качестве единственного источника железа.

Таким образом, все гены кластера *fecCDEB1-schT* являются существенными для утилизации ксеносидерофоров FeSK и SAV у *Synechocystis*.

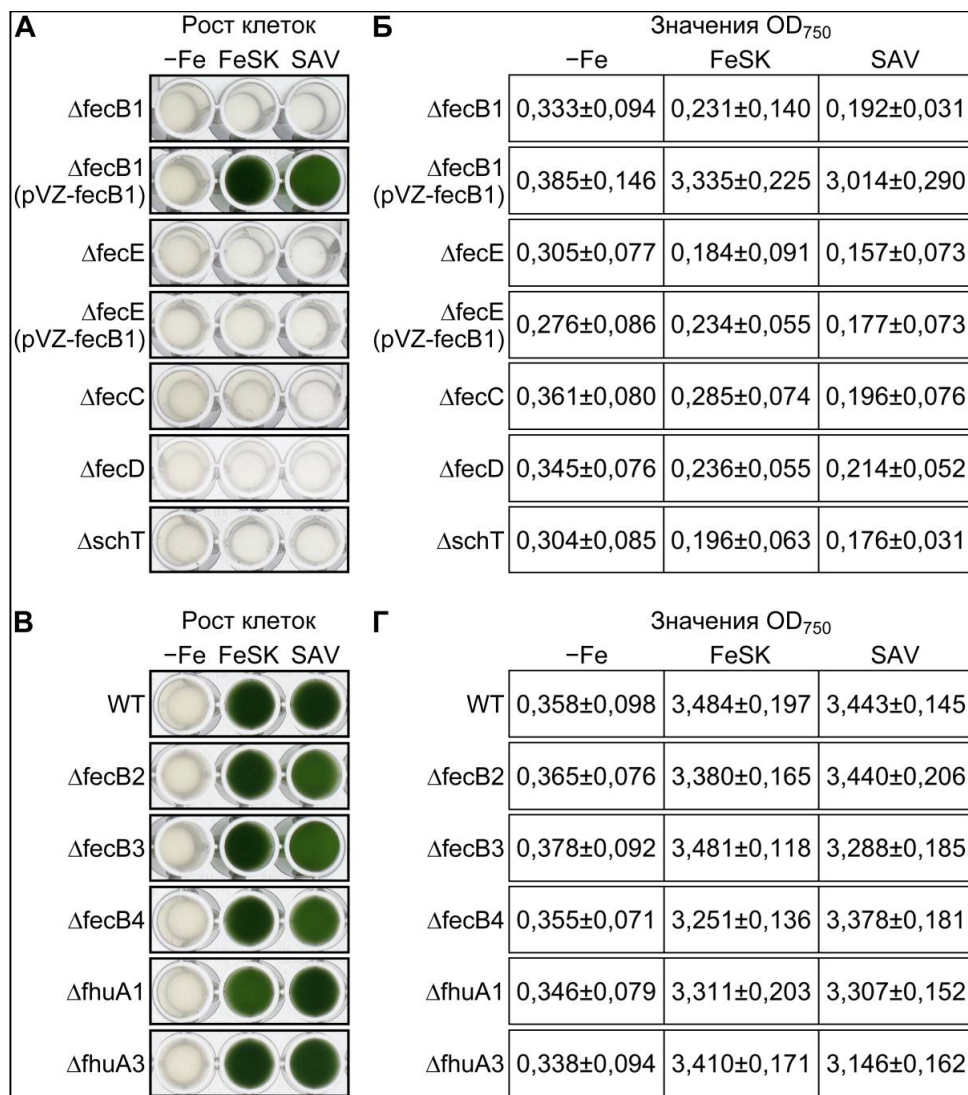


Рисунок 6. Рост штамма WT и мутантов $\Delta fecB1$, $\Delta fecB1$ (pVZ-fecB1), $\Delta fecB2$, $\Delta fecB3$, $\Delta fecB4$, $\Delta fecC$, $\Delta fecD$, $\Delta fecE$, $\Delta fecE$ (pVZ-fecB1), $\Delta fhuA1$, $\Delta fhuA3$ и $\Delta schT$ *Synechocystis* в присутствии дигидроксаматных ксеносидерофоров, FeSK или SAV, в качестве единственных источников железа. Голодающие по железу клетки развели до OD₇₅₀ ~ 0,05 в среде YBG11-Fe (-Fe) либо в среде YBG11-Fe с добавлением 10 мкМ FeSK или SAV и 4-мл культуры инкубировали в 20-мл пробирках в стандартных фотоавтотрофных условиях без активной аэрации в течение девяти дней. (А и В) Фотографии микролунок с культурами штаммов, неспособных, за исключением $\Delta fecB1$ (pVZ-fecB1) (А), либо способных (В) утилизировать FeSK и SAV. (Б и Г) Соответствующие конечные OD₇₅₀ культур в виде средних значений и стандартных отклонений, полученных в трех независимых экспериментах. Штаммы $\Delta fecB1$ (pVZ-fecB1) и $\Delta fecE$ (pVZ-fecB1) представляют собой трансконъюганты мутантов $\Delta fecB1$ и $\Delta fecE$, соответственно, которые содержат рекомбинантную плазмиду pVZ-fecB1 с конститутивно экспрессирующимся геном *fecB1*.

Инактивация любого из генов *fecB2*, *fecB3*, *fecB4*, *fhuA1* или *fhuA3* не нарушает способность *Synechocystis* утилизировать ксеносидерофоры FeSK и SAV

Для выяснения вклада в утилизацию FeSK и SAV «сиротских» PBPс и TBDTs *Synechocystis*, кодируемых генами вне кластера *fecCDEB1-schT*, были сконструированы гомозиготные мутанты $\Delta fecB2$, $\Delta fecB3$, $\Delta fecB4$, $\Delta fhuA1$ и $\Delta fhuA3$ (Рисунок 5). Все мутанты росли с такой же скоростью, как и штамм WT, в стандартной или обедненной железом среде. Более того, они не отличались от штамма WT по росту в присутствии FeSK или SAV в качестве единственных источников железа (Рисунок 6.В и Г).

Таким образом, гены *fecB2*, *fecB3*, *fecB4*, *fhuA1* и *fhuA3* не являются существенными для утилизации дигидроксаматных ксеносидерофоров FeSK и SAV клетками *Synechocystis*.

Участие ксеносидерофора SAV и факторов транскрипции семейства AraC/XylS в регуляции экспрессии генов *schT* и *fecB1* *Synechocystis*

Участок генома *Synechocystis*, в котором сосредоточены гены предполагаемых компонентов систем транспорта сидерофоров, содержит также три гомологичных гена, *pchR1* (*sll1205*), *pchR2* (*slr1489*) и *pcrR* (*sll1408*), AraC-подобных факторов транскрипции (Kaneko *et al.*, 1996). Каждый из этих трех генов сцеплен с одним из генов предполагаемых TBDTs, *schT*, *fhuA3* или *fhuA1*, соответственно, и, более того, ген *pchR1* дополняет генный кластер *fecCDEB1-schT*, вовлеченный в утилизацию ксеносидерофоров FeSK и SAV.

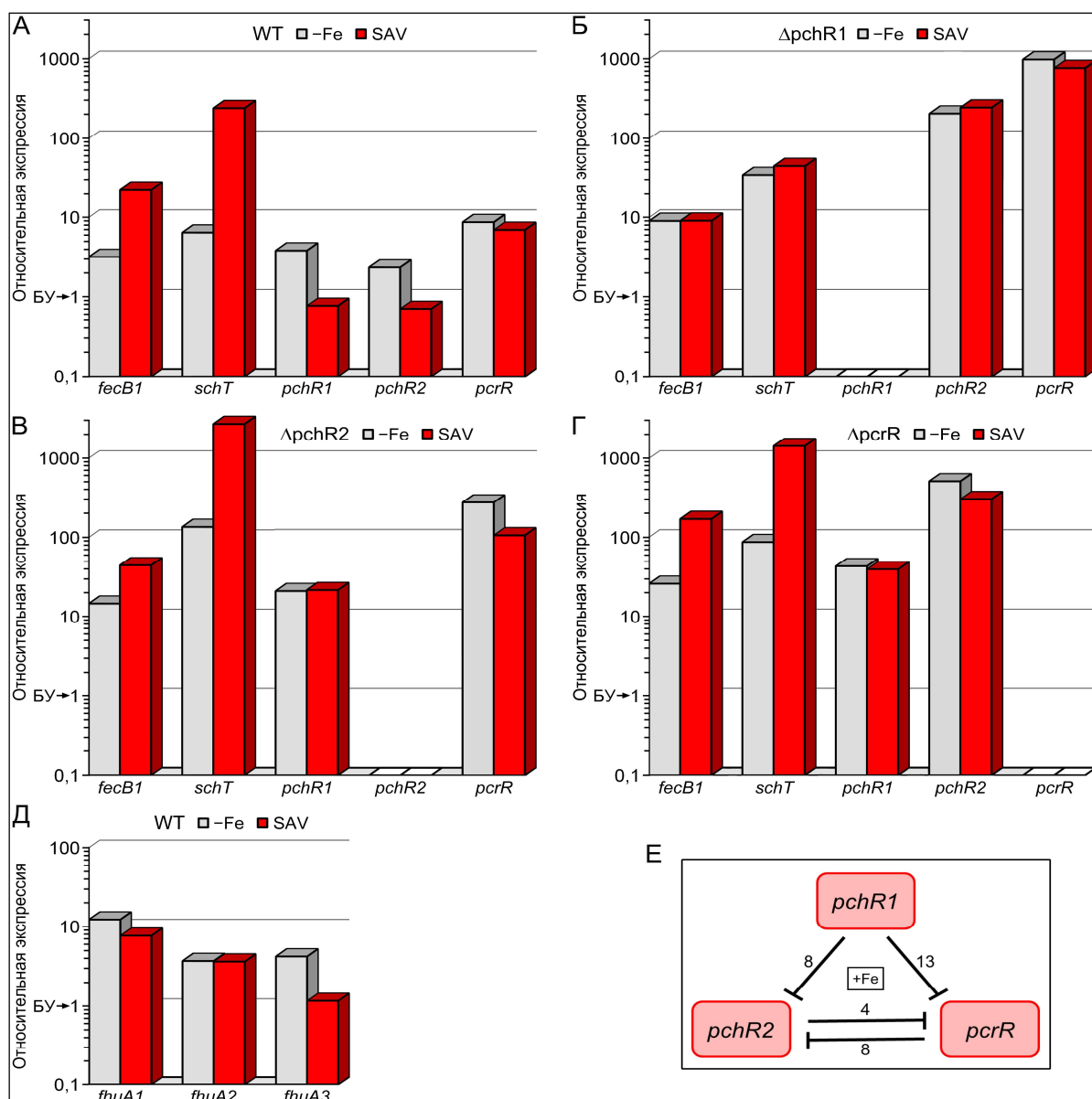
Зависимая от гена *pchR1* и модулируемая генами *pchR2* и *pcrR* стимуляция транскрипции генов *schT* и *fecB1* ксеносидерофором SAV

С помощью метода ОТ-ПЦР РВ нами показано, что у штамма WT при недостатке железа ксеносидерофор SAV стимулирует экспрессию генов *schT* и *fecB1*, кодирующих предполагаемые TBDT и PBP дигидроксаматных ксеносидерофоров FeSK и SAV (Рисунок 7.А). При этом SAV не стимулировал экспрессию генов предполагаемых TBDTs, *fhuA1*, *fhuA2* и *fhuA3*, которые не являются существенными для его утилизации (Рисунок 7.Д).

Для выяснения роли регуляторных генов *pchR1*, *pchR2* и *pcrR* *Synechocystis* в контроле утилизации дигидроксаматных ксеносидерофоров исследовали, как на экспрессию указанных генов влияет SAV, и как их инактивация влияет на стимулируемую SAV экспрессию генов *fecB1* и *schT*. С этой целью использовали мутанты из коллекции нашей лаборатории $\Delta pchR1$, $\Delta pchR2$ и $\Delta pcrR$. Было установлено, что в присутствии железа мутанты не отличаются от штамма WT по уровням транскрипции, как генов *fecB1* и *schT*, так и генов *fhuA1*, *fhuA2* и *fhuA3*. Вместе с тем каждый мутант демонстрировал повышение транскрипции (дерепрессию) двух либо одного из двух других регуляторных генов. У мутанта $\Delta pchR1$ были дерепрессированы гены *pchR2* и *pcrR*, у мутанта $\Delta pchR2$ – ген *pcrR*, а у мутанта $\Delta pcrR$ – ген *pchR2* (Рисунок 7.Е). При недостатке железа уровни транскрипции всех трех регуляторных генов заметно повышались у штамма WT (Рисунок 7.А). В этих же условиях у мутантов наблюдали существенную дерепрессию (повышение уровней транскрипции на 1-2 порядка в сравнении с WT) других регуляторных генов:

у $\Delta pchR1$ – генов *pchR2* и *pcrR*, а у $\Delta pchR2$ и $\Delta pcrR$ – гена *pchR1* и соответственно генов *pcrR* или *pchR2* (Рисунок 7.Б, В и Г). Таким образом, гомологичные гены *pchR1*, *pchR2* и *pcrR* *Synechocystis* являются компонентами единой регуляторной сети и способны к негативной взаиморегуляции, более ярко выраженной при голодании клеток по железу.

При недостатке железа мутанты $\Delta pchR1$, $\Delta pchR2$ и $\Delta pcrR$ достоверно отличались от штамма WT более высокими уровнями транскрипции генов *fecB1* и *schT* (Рисунок 7.Б, В и Г), что указывало на негативную регуляцию этих генов генами *pchR1*, *pchR2* и *pcrR*. У штамма WT ксеносидерофор SAV стимулировал транскрипцию генов *fecB1* и *schT*, но ингибировал транскрипцию генов *pchR1* и *pchR2* ниже базового уровня (Рисунок 7.А). Напротив, у мутанта $\Delta pchR1$ SAV не стимулировал транскрипцию генов *fecB1* и *schT* (Рисунок 7.Б); однако, стимулировал их транскрипцию до максимально высоких уровней у мутантов $\Delta pchR2$ и $\Delta pcrR$ (Рисунок 7.В и Г). Эти результаты позволяют полагать, что белок PchR1 с использованием SAV в роли потенциального эффектора способен репрессировать транскрипцию собственного гена (возможно, и гомологичного гена *pchR2*) и активировать транскрипцию генов *schT* и *fecB1*.



ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным в настоящей работе результатам, система TonB-ExbB1-ExbD1 не является существенной для поглощения свободных ионов железа цианобактерией *Synechocystis*, что противоречит сведениям об их переносе через наружную мембрану данной цианобактерии с помощью неидентифицированного ExbB-ExbD-зависимого транспортера (Jiang *et al.*, 2015). Это противоречие может объясняться генетическими различиями между штаммами WT *Synechocystis*, используемыми в разных лабораториях. Не исключено, что три комплекса ExbB-ExbD, которые разделяют частично избыточные функции поглощения неорганического железа у штамма WT, использованного в работе Jiang *et al.* (2015), являются полностью избыточными у штамма WT из нашей лаборатории. В будущем для выяснения этого вопроса необходимо исследовать зависимость роста клеток от железа у мутантов, сконструированных на основе нашего штамма WT с инактивированными кластерами *exbB2D2* и *exbB3D3D4*, как по-отдельности, так и в комбинациях друг с другом и с изученным в настоящей работе кластером *exbB1D1*.

Нами установлено, что дигидроксаматные ксеносидерофоры FeSK и SAV высоко биодоступны для не синтезирующей собственные сидерофоры цианобактерии *Synechocystis* и способны служить единственными источниками железа для ее роста. Кроме того, фенотипический анализ мутантов, дефектных по генам *tonB* (*slr1484*) и *exbB1-exbD1* (*sll1404-sll1405*), предоставил прямое свидетельство участия системы TonB-ExbB1-ExbD1 в утилизации этих ксеносидерофоров клетками *Synechocystis*. В отличие от FeSK и SAV, структурно сходный с ними сидерофор FeAB неспособен поддерживать рост клеток *Synechocystis*, голодающих по железу. Это указывает на высокую субстратную специфичность систем транспорта дигидроксаматных ксеносидерофоров у данной цианобактерии.

С помощью направленной инактивации генов нами идентифицирован генный кластер *fecCDEB1-schT*, вовлеченный в утилизацию дигидроксаматных ксеносидерофоров FeSK и SAV клетками *Synechocystis*. Белки, кодируемые пятью генами этого кластера, включают, согласно их предполагаемым

Рисунок 7. Изменения в экспрессии ряда генов *Synechocystis*, обусловленные ксеносидерофором SAV и инактивацией регуляторных генов *pchR1*, *pchR2* и *pcrR*. Типичные результаты двух-трех независимых опытов по оценке с помощью ОТ-ПЦР РВ относительных уровней транскрипции генов *fecB1*, *schT*, *pchR1*, *pchR2* и *pcrR* у штамма WT (А) и мутантов $\Delta pchR1$ (Б), $\Delta pchR2$ (В) и $\Delta pcrR$ (Г) в зависимости от наличия в среде железа или SAV. Для сравнения у штамма WT показан характер экспрессии генов *fhuA1*, *fhuA2* и *fhuA3*, кодирующих, как и *schT*, предполагаемые TBDTs (Д). Отмытые от железа клетки инкубировали 72 часа в средах YBG11 (контроль +Fe), YBG11-Fe (-Fe) или YBG11-Fe + 10 мкМ SAV. Уровни транскрипции генов выражали относительными значениями к принимаемым за 1 базовым уровням (БУ) их транскрипции у штамма WT в присутствии железа. (Е) Схема регуляторных отношений между генами *pchR1*, *pchR2* и *pcrR* в присутствии железа. Тупые стрелки указывают репрессию генов-мишеней у штамма WT; цифры – коэффициенты их дерепрессии (средние значения в трех независимых экспериментах) у мутантов $\Delta pchR1$, $\Delta pchR2$ и $\Delta pcrR$ по соответствующим генам-регуляторам.

функциям, TBDT (SchT), РВР (FecB1), два трансмембранных пермеазных белка (FecC и FecD) и АТФазу (FecE). Эти белки представляют собой компоненты типичной для грамотрицательных бактерий системы транспорта железа, которая обеспечивает прямой перенос Fe-сидерофоров в цитоплазму без восстановления железа снаружи клетки или в периплазме. В совокупности приведенные данные предполагают следующую модель пути транспорта дигидроксаматных ксеносидерофоров в цианобактерию *Synechocystis* при недостатке железа в природных местах ее обитания (Рисунок 8). Согласно этой модели, внеклеточный Fe-сидерофор, такой как FeSK или SAV, транспортируется через наружную мембрану специфическим TBDT SchT, который обеспечивается энергией протон-движущей силы через систему TonB-ExbB1-ExbD1. Поступив в периплазму, Fe-сидерофор связывается специфическим РВР FecB1 и доставляется к коровому ABC-транспортеру FecCDE, состоящему из мембранного пермеазного комплекса FecC/FecD и гомодимерной АТФазы FecE, ассоциированной с внутренней мембраной. Наконец, транспортер FecCDE опосредует зависимый от гидролиза АТФ перенос Fe-сидерофора через внутреннюю мембрану в цитоплазму. Принимая во внимание роль гена *iutA* в утилизации FeSK, мы предлагаем переименовать его в *schT* («schizokinen transporter»). Следует отметить, что Fec-подобный ABC-транспортер FecCDE является единственным предсказываемым коровым ABC-транспортером, который может участвовать в поглощении Fe-сидерофоров у *Synechocystis*.

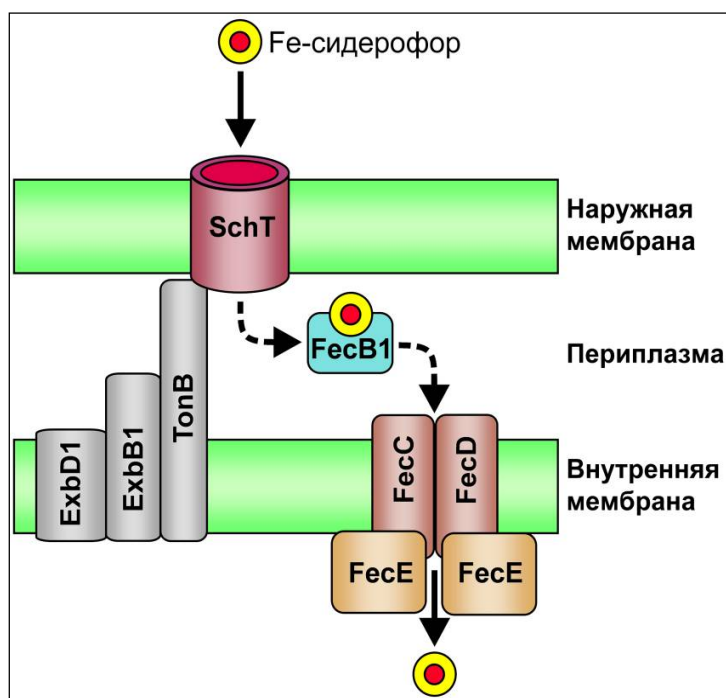


Рисунок 8. Модель пути транспорта дигидроксаматных ксеносидерофоров в клетку *Synechocystis*. Fe-сидерофор – ксеносидерофор FeSK либо SAV. Пояснения в тексте.

Наличие у *Synechocystis* четырех предполагаемых TBDTs может отражать ее способность утилизировать в качестве источников железа ксеносидерофоры различных типов. Установлено, что TBDTs FhuA1, FhuA2 и FhuA3 не являются

существенными для утилизации FeSK и SAV. Вместе с тем наши данные указывают на то, что только один из четырех PBPs, FecB1, является существенным для утилизации этих дигидроксаматных ксеносидерофоров. Нельзя исключать, что три сиротских TBDTs (FhuA1, FhuA2 и FhuA3) и три сиротских PBPs (FecB2, FecB3 и FecB4) способны формировать альтернативные системы поглощения специфических ксеносидерофоров совместно с единственным коровым ABC-транспортером FecCDE. Сиротские PBPs широко распространены у бактерий, и примеры их функциональной активности хорошо известны (Thomas, 2010).

Таким образом, цианобактерия *Synechocystis* способна утилизировать Fe-сидерофоры через традиционный для грамотрицательных бактерий путь поглощения железа. Система, состоящая из специфического TBDT SchT и ABC-транспортера FecB1CDE, позволяет цианобактерии расти с использованием ксеносидерофоров FeSK и SAV в качестве единственных источников железа. В связи с этим восстановительный путь, которому отводили центральную роль в поглощении цианобактериями органически связанного железа (Kranzler *et al.*, 2011; Lis *et al.*, 2015a), представляется переоцененным для *Synechocystis*.

Проведенный нами анализ экспрессии генов предполагаемых систем транспорта сидерофоров и генов AraC-подобных факторов транскрипции с использованием ОТ-ПЦР РВ положил начало изучению механизмов регуляции поглощения дигидроксаматных ксеносидерофоров у *Synechocystis*. Установлено, что в условиях недостатка железа ксеносидерофор SAV оказывает негативный эффект на транскрипцию регуляторного гена *pchR1* и позитивный – на транскрипцию генов *schT* и *fecB1*. При этом у мутанта с инактивированным геном *pchR1* не наблюдается повышения экспрессии генов *schT* и *fecB1* в присутствии SAV. Представленные данные хорошо согласуются с общей для грамотрицательных бактерий моделью регуляции систем транспорта Fe-сидерофоров, опосредуемой AraC-подобными факторами транскрипции. Сообразно с этой моделью белок PchR1 в комплексе с ксеносидерофором SAV в качестве эффектора может негативно регулировать экспрессию собственного гена и позитивно – экспрессию генов *schT* и *fecB1*. Однако взаимная репрессия трех регуляторных генов, *pchR1*, *pchR2* и *pcrR*, существенно осложняет интерпретацию полученных нами результатов и понимание вклада каждого гена в контроль утилизации ксеносидерофоров у *Synechocystis*. Для решения этого вопроса необходимы дальнейшие исследования, в частности, с использованием двойных и тройного мутантов по генам *pchR1*, *pchR2* и *pcrR*.

В заключение следует отметить, что способность *Synechocystis* утилизировать ксеносидерофоры имеет важный экологический аспект. Как известно, цианобактерии, синтезирующие и поглощающие собственные сидерофоры, успешно конкурируют с эукариотическими водорослями за ограниченные запасы железа в пресноводной среде обитания. Например, сидерофор гидроксаматного типа, продуцируемый нитчатой цианобактерией *Anabaena flos-aqua*, которая вносит существенный вклад в цветение водоемов, значительно ингибирует рост зеленой водоросли *Scenedesmus* (Murphy *et al.*, 1976), а дигидроксаматный SK – рост зеленой водоросли *Chlamydomonas*

reinhardtii (Bailey and Taub, 1980). Таким образом, без затрат энергии и ресурсов на синтез собственных сидерофоров *Synechocystis* может более успешно, чем продуценты сидерофоров, конкурировать с другими фитопланктонными организмами за усвоение железа в естественных местах обитания. Близкое по смыслу предположение было высказано еще в работе Katoh *et al.* (2001a): «Транспорт железа в комплексах с сидерофорами может не иметь существенного значения для поглощения железа в лабораторных условиях, но может давать огромное преимущество клеткам *Synechocystis* в естественной окружающей среде».

Наряду с цианобактериями рода *Anabaena* продуцентами СК являются широко распространенная в окружающей среде бактерия *Bacillus megaterium* (Byers *et al.*, 1967; Mullis *et al.*, 1971), бактерия-патоген растений *Ralstonia solanacearum* (Budzikiewicz *et al.*, 1997) и формирующая корневые клубеньки бактерия-симбионт растений *Rhizobium leguminosarum* IARI 917 (Storey *et al.*, 2006). Все вместе они могут вносить существенный вклад в обилие СК в пресноводных экосистемах. Более того, данный сидерофор проявляет высокую стабильность в окружающей среде и хорошо сохраняется в высохшей почве рисовых полей (Akers, 1983). Следовательно, в Fe-форме он может служить легко доступным природным источником железа для цианобактерий, таких как *Synechocystis*, которые не продуцируют СК, но обладают системами транспорта FeСК.

ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что цианобактерия *Synechocystis*, не синтезирующая собственные сидерофоры, способна утилизировать в качестве единственных источников железа дигидроксаматные ксеносидерофоры, FeСК, продуцируемый рядом бактерий, включая цианобактерию *Anabaena* 7120, и SAV, продуцируемый цианобактерией *A. variabilis*.

2. Утилизация указанных ксеносидерофоров клетками *Synechocystis* зависит от функций трех генов, кодирующих компоненты системы TonB-ExbB1-ExbD1, сопрягающей транспорт сидерофоров через наружную мембрану с протонным градиентом, и не зависит от функций генов основных транспортеров FutABC и FeoB неорганического железа.

3. Функциональный анализ 11 генов, кодирующих предполагаемые компоненты систем транспорта сидерофоров, показал, что утилизация дигидроксаматных ксеносидерофоров контролируется состоящим из 5 генов кластером *fecCDEB1-schT*, который кодирует TonB-зависимый транспортер SchT наружной мембраны, периплазматический сидерофор-связывающий белок FecB1 и компоненты корового ABC-транспортера внутренней мембраны, FecC, FecD и FecE.

4. На основании полученных данных предложена модель TonB-зависимого пути транспорта дигидроксаматных ксеносидерофоров у цианобактерии *Synechocystis*.

5. Показано, что AraC-подобные факторы транскрипции PchR1, PchR2 и PcrR, а также утилизируемый ксеносидерофор SAV в качестве потенциального эффектора белка PchR1 вовлечены в регуляцию экспрессии генов *schT* и *fecB1*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в научных журналах:

1. Babykin M.M., **Obando S.T.A.**, Zinchenko V.V. (2018) TonB-dependent utilization of dihydroxamate xenosiderophores in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Current Microbiology* 75(2):117–123. doi:10.1007/s00284-017-1355-2
2. **Obando S.T.A.**, Babykin M.M., Zinchenko V.V. (2018) A cluster of five genes essential for the utilization of dihydroxamate xenosiderophores in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Current Microbiology* 75(9):1165–1173. doi:10.1007/s00284-018-1505-1

Материалы конференций:

1. Бабыкин М.М., **Обандо Т.**, Зинченко В.В. Генетика гомеостаза железа у цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. Тезисы докладов VI съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированные генетические симпозиумы. Ростов н/Д, 15-20 июня 2014 г. С. 54. – ISBN 978-5-91291-018-0
2. **Обандо Т.**, Биканов Р.А., Зинченко В.В., Бабыкин М.М. Гены транспорта сидерофоров у *Synechocystis* sp. PCC 6803. Тезисы 5-го Всероссийского симпозиума с международным участием «Автотрофные микроорганизмы». Москва, МГУ имени М.В.Ломоносова. Биологический факультет. 21-24 декабря 2015 г. М.: МАКС Пресс, 2015. С. 62. – ISBN 978-5-317-05141-9
3. Бабыкин М.М., **Обандо Т.**, Зинченко В.В. Генетический контроль транспорта сидерофоров у *Synechocystis* sp. PCC 6803. Тезисы Всероссийской конференции с международным участием «50 лет ВОГиС: успехи и перспективы». Москва, 8-10 ноября 2016 г. С. 76.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю доценту М.М. Бабыкину и заведующему кафедрой генетики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова профессору В.В. Зинченко за бесценную помощь в организации и проведении моей диссертационной работы в стенах кафедры. Автор душевно благодарит всех сотрудников кафедры генетики за всестороннюю поддержку, внимание и творческую атмосферу. Автор также благодарит научного сотрудника кафедры Н.Е. Спиркину за большую техническую помощь в работе над оформлением диссертации. Отдельную благодарность автор выражает д.б.н. И.Б. Каплану за критическое прочтение и редактирование рукописей моих статей на английском языке.