

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М. В. ЛОМОНОСОВА»

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

На правах рукописи

ОБАНДО Сандро Тобиас Амилкар

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

Специальность 03.02.07 – генетика

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:
Кандидат биологических наук, доцент
Бабыкин Михаил Михайлович**

Москва – 2019

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
1. ВВЕДЕНИЕ	5
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
Генетический контроль поглощения железа у цианобактерий	
2.1. Биологическое значение и доступность железа в природе.....	12
2.2. Транспорт железа в клетки грамотрицательных бактерий.....	14
2.2.1. Транспорт железа в комплексе с сидерофорами.....	14
2.2.1.1. Синтез сидерофоров.....	17
2.2.1.2. Транспорт Fe-сидерофоров через наружную мембрану клетки.....	19
2.2.1.3. Транспорт Fe-сидерофоров через внутреннюю мембрану клетки.....	21
2.2.1.4. Диссоциация Fe-сидерофоров в цитоплазме.....	22
2.2.2. Сидерофор-независимое поглощение железа у цианобактерий.....	23
2.2.2.1. <i>FutABC</i> – основная система поглощения свободного Fe(III).....	23
2.2.2.2. Дополнительные транспортеры Fe(III).....	24
2.2.2.3. Поглощение свободного Fe(II).....	25
2.2.2.4. Восстановительное поглощение железа.....	26
2.3. Регуляторные системы гомеостаза железа у цианобактерий.....	28
2.3.1. Глобальный регулятор гомеостаза железа <i>Fur</i>	28
2.3.2. <i>AraC</i> -подобные регуляторы транскрипции <i>PchR</i>	31
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	33
3.1. Бактериальные штаммы и плазмиды.....	33
3.2. Среды и условия культивирования бактерий.....	35
3.3. Получение и использование голодающих по железу культур <i>Synechocystis</i>	36
3.4. Сидерофоры в качестве источников железа.....	37
3.5. Определение концентрации сидерофора (CAS-анализ).....	38
3.6. Спектральный анализ клеток <i>Synechocystis</i>	39
3.7. Определение концентрации и чистоты нуклеиновых кислот.....	40
3.8. Манипуляции с ДНК и молекулярное клонирование.....	40
3.8.1. Выделение ДНК.....	40
3.8.2. Полимеразная цепная реакция.....	41
3.8.3. Гель-электрофорез ДНК и элюция ДНК из геля.....	42
3.8.4. Модифицирующие ДНК ферменты.....	42
3.8.5. Векторы для молекулярного клонирования.....	42
3.8.6. Трансформация <i>E. coli</i>	44
3.9. Конструирование мутантов <i>Synechocystis</i>	45
3.9.1. Инактивация гена с использованием ПЦР в комбинации с лигированием и расширением перекрывания фрагментов ДНК.....	45
3.9.2. Инактивация клонированного гена с использованием инверсной ПЦР и/или эндонуклеаз рестрикций.....	47
3.9.3. Трансформация <i>Synechocystis</i> с последующим отбором мутантов.....	48
3.10. Клонирование гена цианобактерии в векторе экспрессии.....	50
3.11. Конъюгационный перенос плазмид в клетки мутантов <i>Synechocystis</i>	51

3.12. Анализ экспрессии генов на уровне транскрипции.....	52
3.12.1. Выделение тотальной РНК из клеток <i>Synechocystis</i>	52
3.12.2. Реакция обратной транскрипции (синтез первой цепи кДНК).....	52
3.12.3. ПЦР в реальном времени.....	53
4. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	58
4.1. TonB-зависимая утилизация дигидроксаматных ксеносидерофоров у цианобактерии <i>Synechocystis</i>	58
4.1.1. Конструирование мутантов Δ tonB и Δ exbBD1 <i>Synechocystis</i>	58
4.1.2. Инактивация генов кластера <i>tonB-exbB1D1</i> не влияет на рост <i>Synechocystis</i> в обедненной железом среде.....	61
4.1.3. Тригидроксаматные ксеносидерофоры FCH и FOB не служат источниками железа для <i>Synechocystis</i>	63
4.1.4. Дигидроксаматные ксеносидерофоры FeSK и SAV стимулируют рост <i>Synechocystis</i> в обедненной железом среде, и их утилизация зависит от генов <i>tonB-exbB1D1</i>	64
4.1.5. Инактивация генов <i>feoB</i> , <i>futB</i> или <i>futC</i> не нарушает способность <i>Synechocystis</i> utiлизировать ксеносидерофоры FeSK и SAV.....	67
4.1.6. Раздельные пути утилизации свободного и связанного с сидерофорами железа с участием транспортных систем <i>FutABC</i> и <i>TonB-ExbB1-ExbD1</i> у <i>Synechocystis</i>	68
4.2. Генный кластер <i>fecCDEB1-schT</i> является существенным для утилизации дигидроксаматных ксеносидерофоров клетками <i>Synechocystis</i>	73
4.2.1. Геномная организация генов, предположительно вовлеченных в контроль транспорта ксеносидерофоров у <i>Synechocystis</i>	73
4.2.2. Инактивация любого из генов <i>fecB1</i> , <i>fecC</i> , <i>fecD</i> , <i>fecE</i> или <i>schT</i> нарушает способность <i>Synechocystis</i> утилизировать ксеносидерофоры FeSK и SAV.....	75
4.2.2.1. Комплémentационный анализ мутантов Δ fecB1 и Δ fecE.....	78
4.2.3. Инактивация любого из генов <i>fecB2</i> , <i>fecB3</i> , <i>fecB4</i> , <i>fhuA1</i> или <i>fhuA3</i> не нарушает способность <i>Synechocystis</i> утилизировать ксеносидерофоры FeSK и SAV.....	79
4.3. Участие ксеносидерофора SAV и факторов транскрипции семейства AraC/XylS в регуляции экспрессии генов <i>schT</i> и <i>fecB1</i> <i>Synechocystis</i>	80
4.3.1. Геномная организация и биоинформационический анализ генов <i>pchR1</i> , <i>pchR2</i> и <i>pcrR</i> AraC-подобных регуляторов транскрипции у <i>Synechocystis</i>	80
4.3.2. Зависимая от гена <i>pchR1</i> и модулируемая генами <i>pchR2</i> и <i>pcrR</i> стимуляция транскрипции генов <i>schT</i> и <i>fecB1</i> ксеносидерофором SAV.....	82
5. ОБСУЖДЕНИЕ.....	86
6. ВЫВОДЫ.....	92
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	93
ПРИЛОЖЕНИЕ А (справочное).....	115
Таблица А.1. Гомологи гена <i>all2580</i> AraC-подобного фактора транскрипции и кластеризованные с ними гены TBDTs в геноме цианобактерии <i>Anabaena</i> 7120.....	115
БЛАГОДАРНОСТИ.....	116

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ао – аминокислотный остаток
 АТФ – аденоzin трифосфат
 кДНК – комплементарная ДНК
 ОТ-ПЦР РВ – обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени
 пн – пара нуклеотидов
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 тпн – тысяча пар нуклеотидов
 АВ – аэробактин
 Ар – ампициллин
 CAS – хромазурол S
 См – хлорамфеникол
 DFCH – десферрихром
 DFOB – десферриоксамин B
 dNTPs – дезоксинуклеозидтрифосфаты
 EDTA – этилендиаминетрауксусная кислота
 FCH – феррихром
 Fe(II) – двухвалентное, закисное, железо
 Fe(III) – трехвалентное, окисное, железо
 Fe-сидерофор – ферри-сидерофор, или сидерофор в комплексе с Fe(III)
 FeAB – Fe-аэробактин
 FeSK – Fe-шизокинин
 FOB – ферриоксамин B
 Gm – гентамицин
 HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пiperазинэтансульфоновая кислота
 IPTG – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
 Km – канамицин
 MES – 2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота
 NIS – NRPS-независимый синтез сидерофора
 NRPS – нерибосомная пептид-синтетаза
 OD – оптическая плотность
 PBP(s) – периплазматический(е) (субстрат-) связывающий(е) белок(ки)
 PKS – поликетид-синтаза
 SAV – сидерофор *A. variabilis*
 SDS – натрия додецилсульфат
 SK – шизокинин
 Sp – спектиномицин
 TBDT(s) – TonB-зависимый(е) транспортер(ы)
 Тр – триметоприм
 Tris – трис(гидроксиметил)аминометан
 Triton X-100 – полиэтиленгликоль ρ -(1,1,3,3-тетраметилбутил)-фениловый эфир
 WT – дикий тип
 X-gal – 5-бromo-4-хлоро-3-индолил- β -D-галактопиранозид

1. ВВЕДЕНИЕ

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 биосфера 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 биосфера 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 оксигенных фотосинтезирующих микроорганизмов (Wandersman and Deleplaire, 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. Этот путь поглощения железа, который обычно обеспечивает прямой перенос Fe-сидерофоров в цитоплазму, хорошо изучен у гетеротрофных бактерий (Chu *et al.*, 2010; Raines *et al.*, 2015; Wandersman and Deleplaire, 2004). У грамотрицательных бактерий перенос Fe-сидерофоров через две мембранные состоит из двух этапов, каждый из которых является энергозависимым. Специфические рецепторы наружной мембранны, или TonB-зависимые транспортеры (TBDTs), связывают Fe-сидерофоры и транспортируют их в периплазму. Транспорт сопряжен с протон-движущей силой, энергия которой передается на TBDTs белковым комплексом TonB-ExbB-ExbD, встроенным во внутреннюю мембрану (Fischer *et al.*, 1989; Postle and Larsen, 2007). Транспорт Fe-сидерофоров через внутреннюю мембрану катализируют ABC-транспортеры с использованием энергии гидролиза АТФ. Обычно ABC-транспортер (импортер) грамотрицательных бактерий включает в себя один или несколько периплазматических субстрат-связывающих белков, PBPs, и коровий ABC-транспортер. Коровий ABC-транспортер состоит из двух одинаковых или разных трансмембранных пермеазных белков, а также из двух одинаковых или разных АТФазных белков, ассоциированных с внутренней мембраной (Beis, 2015; Davidson *et al.*, 2008; Köster, 2001). Кроме того, трансмембранные и АТФазные субъединицы могут быть представлены слитыми гомодимерными либо гетеродимерными белками. После переноса через наружную мембрану Fe-сидерофоры доставляются к внутренней мембране специфическими PBPs и транслоцируются в цитоплазму через коровьи ABC-транспортеры (Braun and Hantke, 2011; Köster, 2001).

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, 2015б; Rose *et al.*, 2005). Восстановительный путь считается общим для цианобактерий и может быть либо единственным, либо дополняющим сидерофор-зависимое поглощение железа (Lis *et al.*, 2015a). Субстратная неразборчивость восстановительного пути поглощения позволяет клеткам обходиться без специфических транспортеров Fe-сидерофоров и экстрагировать железо даже из сильных органических комплексов. Не случайно особое внимание к этому пути было обусловлено тем, что многие цианобактерии не имеют генов, контролирующих биосинтез и/или транспорт сидерофоров (Ehrenreich *et al.*, 2005; Hopkinson and Morel, 2009). 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 клеток 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 (рассмотрено в обзорах Kranzler *et al.*, 2013 и Zappa and Bauer, 2017). Сидерофоры, продуцируемые цианобактериями, относятся к двум классам: гидроксаматным и катехолатным. Химические структуры определены только для дигидроксаматных сидерофоров, шизокинина (SK) из *Anabaena* sp. PCC 6411 (Simpson and Neilands, 1976) и синехобактинов (структурно родственных SK) из *Synechococcus* 7002 (Armstrong and van Baalen, 1979; Boiteau and Repeta, 2015; Ito and Butler, 2005), а также для катехолатных сидерофоров анахелинов из *Anabaena cylindrica* (Beiderbeck *et al.*, 2000; Itou *et al.*, 2001). Оба представителя рода *Anabaena* – пресноводные виды, а *Synechococcus* 7002 – морской вид. На наличие у цианобактерий высоко аффинных систем поглощения Fe-сидерофоров указывает биоинформационный анализ, выявляющий у ряда их представителей, как продуцирующих, так и непродуцирующих сидерофоры, гены TonB-подобных белков и предполагаемых TBDTs (Hopkinson and Morel, 2009; Mirus *et al.*, 2009).

Известным продуцентом SK является модельная нитчатая диазотрофная цианобактерия *Anabaena* (*Nostoc*) sp. PCC 7120 (далее *Anabaena* 7120) (Goldman *et al.*, 1983). На сегодняшний день это единственная цианобактерия, у которой экспериментально установлены основные компоненты синтеза и экспорта сидерофора (эндогенного SK) и

TonB-зависимого поглощения Fe-сидерофора, FeSK (Nicolaisen *et al.*, 2008; Stevanovic *et al.*, 2012). Поглощение FeSK у этой цианобактерии осуществляется с помощью TBDTs, SchT и IutA2, а также ABC-транспортера FhuDBC. Примечательно, что в переносе FeSK через наружную мембрану участвуют два TBDTs; один из них особенно необходим в экстремальных условиях голодания по железу, а другой – в умеренных. Кроме того, те же компоненты системы транспорта через наружную и внутреннюю мембранны участвуют в поглощении ксеносидерфора Fe-аэробактина (FeAB), хотя и с гораздо более низкой эффективностью (Rudolf *et al.*, 2015, 2016; Stevanovic *et al.*, 2012). Однако молекулярные механизмы и пути TonB-зависимого транспорта сидерофоров у других цианобактерий остаются неизвестными.

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. Она является первым фотоавтотрофным организмом с полностью секвенированным геномом, который состоит из около 3,6 миллионов пн и кодирует 3172 белка (Kaneko *et al.*, 1996). 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*. Однако в этих экспериментах в качестве модельных использовали тригидроксаматный и дигидроксаматный Fe-сидерофоры, ферриоксамин B (FOB) и FeAB. Хотя *Synechocystis* была способна транспортировать железо из комплексов FOB и FeAB, эти ксеносидерофоры оказались недостаточными для удовлетворения ее потребностей в железе (Kranzler *et al.*, 2011; Lis *et al.*, 2015a). С другой стороны, наряду с генами белкового комплекса TonB-ExbB-ExbD геном *Synechocystis* содержит гены TBDTs 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.

Цели и задачи

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 AraC-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 AraC-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*, контролирующий транспорт дигидроксаматных ксеносидерофоров. Гены кластера кодируют TonB-зависимый транспортер SchT наружной мембранны и все необходимые компоненты ABC-транспортера: периплазматический связывающий белок FecB1, трансмембранный пермеза FecC/FecD и мембранный 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.

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. РСС 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. РСС 6803. Тезисы Всероссийской конференции с международным участием «50 лет ВОГиС: успехи и перспективы». Москва, 8-10 ноября 2016 г. С. 76.

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.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Генетический контроль поглощения железа у цианобактерий

2.1. Биологическое значение и доступность железа в природе

Железо является необходимым микроэлементом практически для всех организмов за исключением некоторых лактобактерий и спирохет рода *Borrelia* (Posey and Gherardini, 2000). В основном оно присутствует в геме и железосерных кластерах белков, играющих роль переносчиков электронов и катализаторов биохимических реакций в важнейших биологических процессах, таких как синтез ДНК, дыхание, цикл Кребса, фотосинтез и азотфиксация. Кроме того, железосодержащие белки могут выполнять функцию сенсоров внешних и внутренних условий клетки (Hantke, 2001; Klausner *et al.*, 1993; Lill, 2009; Walker and Connolly, 2008). Например, транскрипционные факторы бактерий, такие как Fur и PerR, или пост-транскрипционные регуляторы млекопитающих, такие как IRPs, взаимодействуют с железом и в зависимости от его внутриклеточного содержания эффективно контролируют экспрессию генов, вовлеченных в утилизацию железа или защиту клеток от активных форм кислорода.

Биологическая доступность и роль железа в морских и пресноводных экосистемах в настоящее время интенсивно исследуются (например, смотрите обзор Shaked and Lis, 2012). По содержанию в земной коре оно занимает четвертое место среди всех элементов; однако, вследствие определенных химических свойств его концентрация в растворенном виде крайне ограничена. В водных растворах этот металл имеет два экологически важных состояния: закисного, Fe(II), и окисного, Fe(III), железа (da Silva and Williams, 2001). В большинстве водных сред железо представлено гетерогенной смесью соединений, включающей нехелатированные неорганические и комплексные органические соединения, которые содержат коллоидные макрочастицы ($> 0,2$ мкм) и растворенные фракции ($< 0,2$ мкм). Поскольку период полужизни ионов Fe(II) в водной среде в аэробных условиях при $pH=8$ составляет несколько минут (Millero *et al.*, 1987), железо представлено в основном соединениями Fe(III): $Fe(OH)^{2+}$, $Fe(OH)_3$ и $Fe(OH)_4^-$, растворимость которых в присутствии кислорода чрезвычайно низка (Byrne and Kester, 1976). Поэтому, несмотря на то, что растворенное железо потенциально биодоступно, в относительно низкой концентрации оно может не поддерживать рост фитопланктона (Hudson and Morel, 1989; Morel *et al.*, 2008). Концентрации растворенного железа во многих водных средах находятся в нано- (10^{-9}) – пикомолярном (10^{-12}) диапазоне (Johnson *et al.*, 1997), а иногда снижаются до уровня 10^{-18} М

(Miethke and Marahiel, 2007; Palyada *et al.*, 2004). Запасы биодоступного железа могут пополняться за счет растворения коллоидов и других конгломератов, например, с помощью тепловых и фотохимических процессов (Rich and Morel, 1990), либо за счет образования комплексов с органическими лигандами (Kraemer, 2004). Показано, что более 99% растворенного Fe(III) в океане и пресных водоемах связано с различными органическими лигандами, поддерживающими пикомолярные (10^{-12}) равновесные концентрации свободной неорганической формы Fe(III) (Nagai *et al.*, 2004; Rue and Bruland, 1995; Wu and Luther, 1995). В соответствии с константой стабильности комплекса с Fe(III), лиганды относят к более сильному, L1, или более слабому классу, L2 (Gledhill and van den Berg, 1994). Считается, что класс L1 включает в себя сидерофор-подобные соединения (сильные железоспецифические хелаторы, продуцируемые и секретируемые микроорганизмами), тогда как класс L2 представлен продуктами деградации клеток. Вместе с тем существуют данные о том, что соединения класса L2 могут поступать в окружающую среду не только за счет лизиса клеток, но и путем активного выделения (Hunter and Boyd, 2007). Концентрация этих соединений часто значительно превосходит (в 10^3 - 10^5 раз) концентрацию железа; поэтому, несмотря на относительно невысокие константы связывания железа, они способны существенно повышать его содержание в растворимой органической форме (Kranzler *et al.*, 2011). Большие районы океана, отличающиеся высоким содержанием нитратов и макроэлементов с одновременно низким содержанием хлорофилла, характеризуются пикомолярными уровнями растворенного железа. Данное наблюдение привело к формированию «железной гипотезы» Джона Мартина, предполагающей, что рост фотоавтотрофных организмов в этих районах океана на самом деле ограничивается низкой доступностью железа (Martin *et al.*, 1994). Подтверждением гипотезы служат эксперименты, демонстрирующие усиление роста фитопланктона после добавления железа в места их обитания (Martin *et al.*, 1991; de Baar *et al.*, 2005). В связи с этим биологическая доступность железа признается одним из основных факторов, лимитирующих рост фитопланктона и первичную продуктивность едва ли не половины мирового океана (Boyd and Ellwood, 2010; Martin *et al.*, 1994), значительный вклад в которую вносят цианобактерии (Falkowski, 1997).

Проблема биодоступности железа не менее актуальна и в случае патогенных микроорганизмов, поскольку подавляющая часть железа в организме хозяина находится в комплексе с биологическими макромолекулами, такими как гем, металлоферменты и ферритины (железосодержащие белки) или такими как трансферрин и лактоферрин (белки, участвующие в транспорте железа). При этом концентрация свободного железа при нейтральном pH в жидкостях организма человека (и других млекопитающих) оценивается на уровне 10^{-18} М (Raymond *et al.*, 2003), явно недостаточном для поддержания роста бактерий.

2.2. Транспорт железа в клетки грамотрицательных бактерий

2.2.1. Транспорт железа в комплексе с сидерофорами

Развитие систем транспорта железа с участием сидерофоров – одно из наиболее эффективных приспособлений микроорганизмов к условиям низкой биодоступности железа. Сидерофоры являются сильнейшими хелаторами Fe(III) и представляют собой низкомолекулярные (< 2000 Дальтон) вторичные метаболиты бактерий, грибов и растений (Budzikiewicz, 2010).

В настоящее время идентифицировано более 500 сидерофоров с различными химическими структурами (Hider and Kong, 2011). В зависимости от природы консервативной группы, непосредственно связывающей железо (Рисунок 2.1), сидерофоры можно разделить на 3 основных класса: катехолаты, гидроксаматы и карбоксилаты, а также ряд смешанных типов, имеющих разнородные комплексообразующие группы, например, α -гидроксикарбоксилат наряду с двумя гидроксаматными или катехолатными группами (Miethke and Marahiel, 2007).

В основном сидерофоры содержат гидроксаматные и катехолатные группы, присоединенные к линейным или циклическим углеводородным каркасам с образованием гексадентатной структуры в комплексе с железом (Рисунок 2.1). Микроорганизмы синтезируют также сидерофоры, представляющие собой тетрадентаты, тридентаты и бидентаты, которые менее эффективно связывают ион Fe(III). В целом, гексадентатные сидерофоры имеют гораздо более высокое сродство к Fe(III), чем тетрадентатные, у которых, в свою очередь, сродство выше, чем у три- и бидентатных сидерофоров (Albrecht-Gary and Crumbliss, 1998). Также были описаны комплексы Fe-сидерофоров с более сложной конфигурацией (Spasojevic *et al.*, 2001). Двумя наиболее сильными хелаторами железа являются производные трискатехолат-трилактона – бациллабактин и энтеробактин, у которых константы образования комплексов с Fe(III) составляют 10^{48} и 10^{49} , соответственно (Dertz *et al.*, 2006; Loomis and Raymond, 1991).

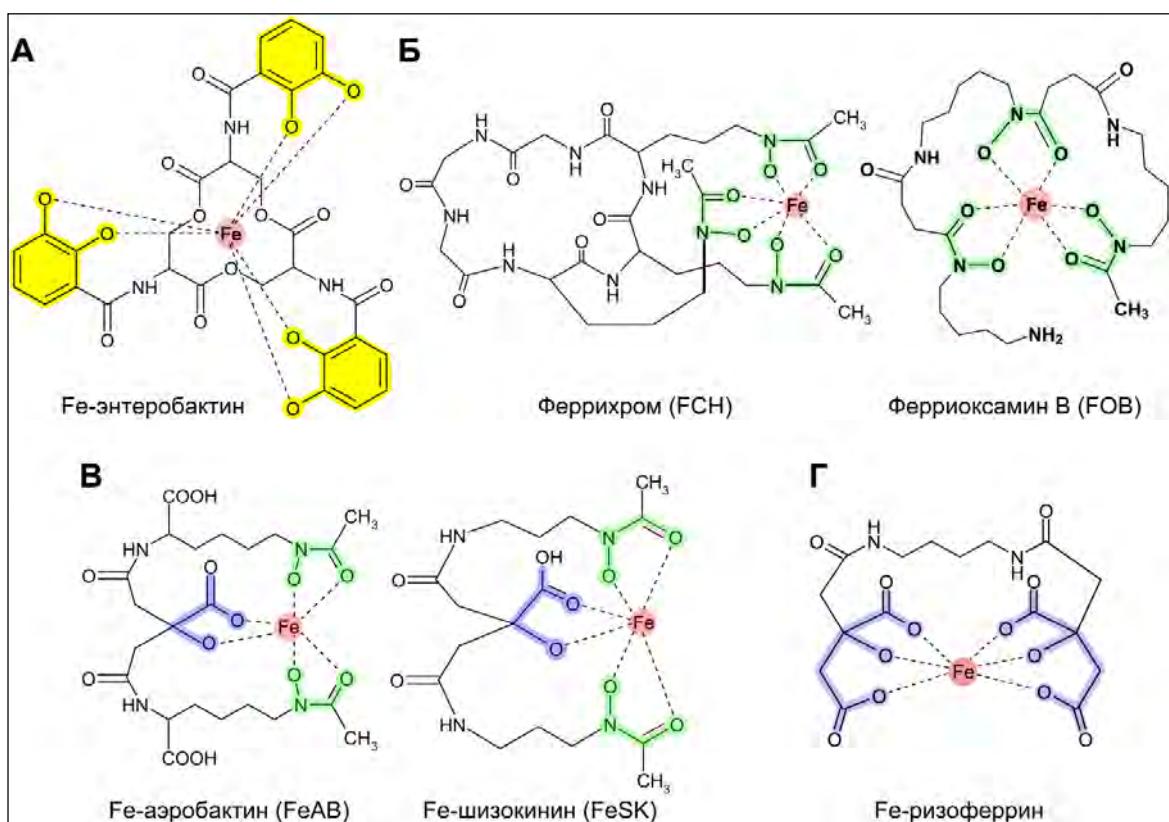


Рисунок 2.1. Структуры сидерофоров различной химической природы в комплексе с железом. Представлены сидерофоры наиболее распространенных типов: (А) катехолатного, (Б) тригидроксаматного, (В) дигидроксаматного (карбоксилат-гидроксаматного) и (Г) карбоксилатного. Различными цветами выделены специфические функциональные группы, формирующие гексадентатные комплексы с Fe(III). Приведены модифицированные иллюстрации из каталога EMC microcollections GmbH, за исключением изображения FOB, заимствованного из обзора Gledhill and Buck (2012).

Сидерофоры обладают более высоким сродством к Fe(III), чем к Fe(II), а также способны связывать другие металлы (Braud *et al.*, 2009a, 2009b; Hannauer *et al.*, 2012; Schalk *et al.*, 2011). Например, SK, помимо участия в поглощении железа, способен образовывать комплекс с медью (McKnight and Morel, 1979, 1980) и, таким образом, играет важную роль в снижении ее цитотоксичности (Clarke *et al.*, 1987). Постоянно обнаруживают новые сидерофоры, многие из которых являются структурными аналогами ранее изученных. Например, известно более 60 аналогов пиовердина (Fuchs *et al.*, 2001), 21 аналог десферрихрома, 21 аналог энтеробактина и 20 аналогов десферриоксамина (Hider and Kong, 2011).

Для повышения своей конкурентоспособности многие микроорганизмы производят несколько сидерофоров и/или могут использовать чужеродные сидерофоры (ксеносидерофоры), присутствующие в окружающей среде (в воде и почве) (Lee *et al.*, 2012). Например, условно патогенная для человека грамотрицательная бактерия *Pseudomonas*

aeruginosa продуцирует два основных сидерофора, пиовердин и пиохелин, и может еще использовать, по крайней мере, пять ксеносидерофоров: FOB, феррихром (FCH), цепабактин, энтеробактин и Fe-дицитрат (Hannauer *et al.*, 2010; Llamas *et al.*, 2006; Poole and McKay, 2003; Schalk, 2008).

Способность цианобактерий синтезировать сидерофоры в условиях недостатка железа известна с 70-х годов прошлого столетия (Estep *et al.*, 1975; McKnight and Morel, 1979; Murphy *et al.*, 1976). Цианобактериальные сидерофоры представлены соединениями гидроксаматного и катехолатного классов (Таблица 2.1). До настоящего времени установлены структуры только трех сидерофоров. Это гидроксаматные сидерофоры SK (Simpson and Neilands, 1976) и синехобактин (Armstrong and van Baalen, 1979), а также катехолатный сидерофор анахелин (Beiderbeck *et al.*, 2000).

Таблица 2.1. Сидерофоры, продуцируемые цианобактериями (Kranzler *et al.*, 2013)

Класс сидерофора	Вид цианобактерии	Структура сидерофора
Гидроксаматный	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	Синехобактин
	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6031	Неизвестна
	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6908	То же
	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	То же
	<i>Synechococcus</i> sp. WH 8101	То же
	<i>Anabaena catenula</i>	То же
	<i>Oscillatoria tenius</i>	То же
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	То же
	<i>Anacystis nidulans</i>	То же
	<i>Gloeocapsa alpicola</i>	То же
	<i>Anabaena flos-aquae</i>	То же
	<i>Anabaena variabilis</i>	То же
	<i>Anabaena</i> sp. PCC6411	SK
	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	SK
	<i>Anabaena cylindrica</i> Lemm 7122	Неизвестна
	<i>Anabaena cylindrica</i> Lemm 1611	То же
Катехолатный	<i>Oscillatoria tenius</i>	То же
	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6031	То же
	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6908	То же
	<i>Synechococcus</i> sp. WH8101	То же
	<i>Anabaena catenula</i>	То же
	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	То же
	<i>Anabaena cylindrica</i>	Анахелин

2.2.1.1. Синтез сидерофоров

Синтез и секреция сидерофоров бактериями происходит в основном при недостатке железа в среде, когда его внутриклеточная концентрация падает ниже уровня, необходимого для функционирования клетки. За синтез сидерофоров у бактерий, включая и цианобактерии, отвечают, по меньшей мере, три различные системы. Одну из них представляют нерибосомные пептидные синтетазы (NRPS).

NRPS – это сложные мультидоменные комплексы, содержащие функциональные модули. Основу модуля, обеспечивающего включение одной аминокислоты в синтезируемый сидерофор, составляют три домена (Du and Shen, 2001; Marahiel *et al.*, 1997). Типичным примером может служить NRPS Fer3, с помощью которой у гриба *Ustilago maydis* в результате соединения в циклическую структуру трех молекул метилглютаконил-гидроксиорнитина и двух аминокислотных остатков, серинового и глицинового, образуется сидерофор FCH (Mei *et al.*, 1993; Winterberg *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2001). Fer3 представляет собой белок из 4830 аминокислотных остатков, который содержит три модуля из трех доменов A, T и C, а также два концевых повтора доменов T и C – (A-T-C)-(A-T-C)-(A-T-C)-(T-C)-(T-C). Аминокислота (указанное выше производное гидроксиорнитина), вовлекаемая в процесс биосинтеза FCH, сначала аденилируется доменом A; затем активированная аминокислота переносится на домен T с образованием реакционноспособного тиоэфира. Домены конденсации C трех последовательных модулей A-T-C катализируют образование пептидных связей между тремя молекулами метилглютаконил-гидроксиорнитина, а повторы доменов T-C обеспечивают включение в структуру сидерофора остатков серина и глицина (Winterberg *et al.*, 2010).

Некоторые сидерофоры синтезируются белками NRPS в комплексе с поликетид-синтазами (PKS). Гены (от одиночных до нескольких десятков), кодирующие белки NRPS и PKS, идентифицированы с помощью биоинформационного анализа в геномах многих цианобактерий (Hopkinson and Barbeau, 2012; Hopkinson and Morel, 2009; Silva-Stenico *et al.*, 2011), однако, продуцируемые ими сидерофоры в подавляющем числе случаев не идентифицированы. Гены таких синтаз обычно присутствуют у нитчатых цианобактерий и практически отсутствуют у пресноводных одноклеточных цианобактерий родов *Synechocystis* и *Synechococcus*, а также у морских пикоцианобактерий родов *Prochlorococcus* и *Synechococcus* (Ehrenreich *et al.*, 2005; Hopkinson and Morel, 2009).

Описанные выше NRPS-зависимые системы синтеза характерны для сидерофоров гидроксаматной и катехолатной групп, а третий путь синтеза сидерофоров – NRPS-независимый (NIS) – продемонстрирован только для представителей гидроксаматного типа.

Такой способ описан для синтеза аэробактина (AB) у *E. coli* и ризобактина 1021 у *Sinorhizobium meliloti* (Challis, 2005). Синтез AB происходит с помощью четырех белков путем последовательного образования молекул-предшественников, которые затем собираются в конечный продукт. Первым шагом в образовании AB является модификация L-лизина ферментом IucD. Затем эту структуру ацетилирует ацетилтрансфераза IucB с образованием N₆-ацетил-N₆-гидроксилизина. Далее к нему при помощи белка IucA присоединяется цитрат и образуется промежуточное соединение цитрат-гидроксамат, к которому белок IucC добавляет второй N₆-ацетил-N₆-гидроксилизин, в результате образуя цитрат-дигидроксаматный сидерофор AB. Синтетазы RhbC, RhbD, RhbE и RhbF, участвующие в синтезе ризобактина, обнаруживают сходство с синтетазами IucA/B/C/D.

Таким образом, на начальных этапах сборки сидерофоров при помощи ацетилтрансфераз-подобных и оксигеназ-подобных ферментов получаются молекулы-предшественники, от сложности которых зависит количество этапов биосинтеза. Основные различия между путями биосинтеза сосредоточены на конечном этапе сборки. Сборка сидерофора в случае NRPS-зависимого пути происходит при помощи большого многофункционального белка (~ 4500 аминокислот), тогда как сборка сидерофора по NIS-пути – ферментами-синтетазами, относительно небольшого размера (~600 аминокислот) (Challis, 2005; Winterberg *et al.* 2010). Неизвестно, действуют ли синтетазы последовательно или в составе единого комплекса.

Гены, кодирующие ферменты NIS-пути, редко встречаются у цианобактерий. С помощью биоинформационного анализа они были идентифицированы только у нескольких пресноводных (*Anabaena* 7120, *A. variabilis* ATC 29413) и морских представителей (*Synechococcus* 7002 и *Prochlorococcus* spp.), в то время как гены NRPS-пути выявлены у более 50% проанализированных видов (Hopkinson and Morel, 2009). Некоторые цианобактерии синтезируют более одного сидерофора. Например, *Anabaena* 7120 продуцирует, по крайней мере, 2 различных сидерофора. Ее геном содержит 2 кластера генов, один из которых содержит 7 генов NRPS- и 2 гена PKS-систем (Kaneko *et al.*, 2001), а второй – гомологи *rhb*-генов, кодирующих ферменты NIS-пути биосинтеза ризобактина у других бактерий (Nicolaisen *et al.*, 2008). Делеция первого кластера приводила к снижению, но не полному прекращению синтеза сидерофоров (Jeanjean *et al.*, 2008).

2.2.1.2. Транспорт Fe-сидерофоров через наружную мембрану клетки

У грамотрицательных бактерий Fe-сидерофоры распознаются на поверхности клеток и транслоцируются в периплазму специфическими транспортерами наружной мембраны, TBDTs (Fairman *et al.*, 2011; Krewulak and Vogel, 2008; Schalk *et al.*, 2012). Эти транспортеры имеют типичное строение β -цилиндрических поринов: 22 антипараллельных β -слоя образуют пору, полностью перекрытую глобулярным доменом, называемым «пробкой» (Schalk *et al.*, 2012). Сайт-рецептор связывания Fe-сидерофора находится вне клетки и состоит примерно из 10 аминокислотных остатков пробки и нескольких доменов β -цилиндра. Протон-движущая сила внутренней мембраны обеспечивает энергией транспорт Fe-сидерофорного комплекса через канал в наружной мембране, сформированный TBDT. Эта энергия передается транспортерам TBDTs через так называемую систему TonB, которая состоит из пронизывающих внутреннюю мембрану блока преобразования энергии, TonB (Wang and Newton, 1971), и двух стабилизирующих интегральных мембранных белков ExbB и ExbD. Транспорт сидерофора по каналу TBDT индуцируется в результате взаимодействия между TBDT-переносчиком и белком TonB через TonB-бокс, находящийся в N-концевом домене TBDT, что приводит к конформационным изменениям в пробке (Faraldo-Gómez and Sansom, 2003). Помимо сидерофоров с помощью TBDTs осуществляется транспорт гема, витамина B12 и ряда других органических и неорганических соединений (Noinaj *et al.*, 2010; Schauer *et al.*, 2008).

Каждый TBDT распознает и переносит специфический сидерофор или в некоторых случаях несколько похожих по структуре сидерофоров, но никогда не переносит сидерофоры с различной химической структурой (Ferguson *et al.*, 2000; Greenwald *et al.*, 2009; Hoegy *et al.*, 2009, 2010; Mislin *et al.*, 2006). Секвенирование геномов бактерий показало, что многие из них имеют множественные гены TBDTs (Blanvillain *et al.*, 2007; Schauer *et al.*, 2008). Так, в геноме *E. coli* K12 идентифицировано шесть генов, кодирующих TBDTs, вовлеченные в транспорт Fe-сидерофоров (Рисунок 2.2).

У некоторых видов цианобактерий также обнаружены гены (от 1 до 33), кодирующие предполагаемые TBDTs (Mirus *et al.*, 2009). Было высказано предположение, что количество TBDTs зависит от экологической ниши, которую занимает организм (Hopkinson and Morel, 2009; Mirus *et al.*, 2009; Stevanovic *et al.*, 2012). В геноме *Anabaena* 7120 идентифицировано 22 гена предполагаемых TBDTs. Два из них являются гомологами транспортера витамина B12 BtuB у *E. coli*, еще два – гомологами транспортера гема HutA у холерного вибриона *Vibrio cholera* (Mirus *et al.*, 2009). Гем и витамин B12 относятся к группе порфиринов, способных хелатировать железо или кобальт, соответственно. В настоящее время

идентифицировано только 2 цианобактериальных TBDTs, SchT и IutA2, которые вовлечены в транспорт FeSK у *Anabaena* 7120 (Рисунок 2.3) (Nicolaisen *et al.*, 2008; Rudolf *et al.*, 2016). Различия в экспрессии генов, кодирующих TBDTs у *Anabaena* 7120 в условиях дефицита железа, меди или азота, указывают на возможное участие TBDTs в транспорте не только железа, но и других соединений (Stevanovic *et al.*, 2012).

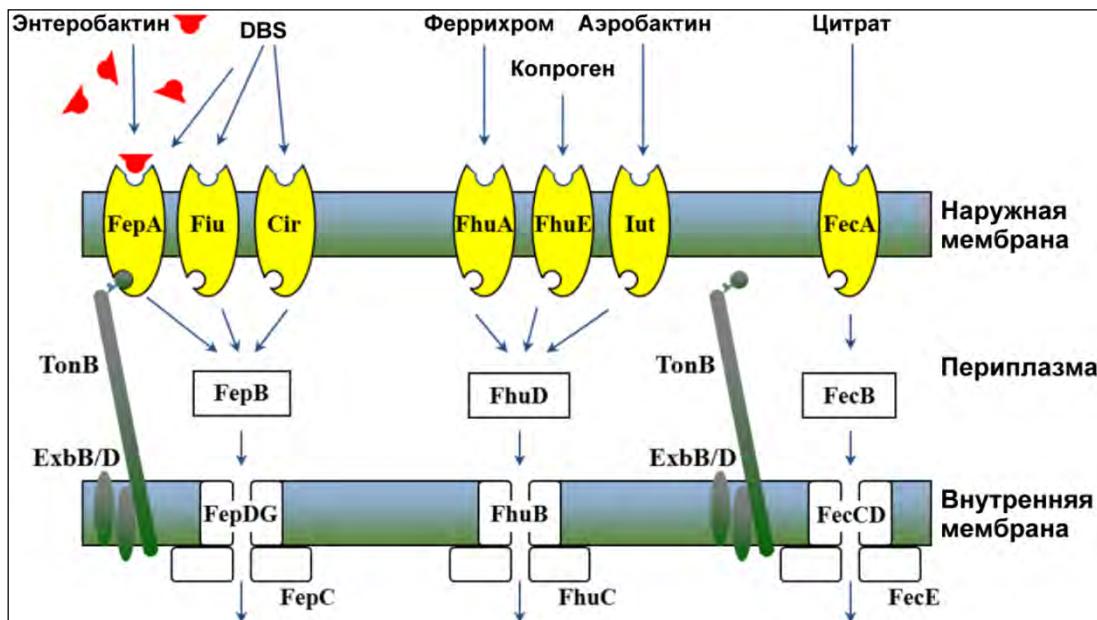


Рисунок 2.2. Системы поглощения Fe-сидерофоров у *E. coli*. Сидерофор-опосредуемое поглощение железа зависит от рецептора наружной мембраны (TBDT) и энергии внутренней мембранны, трансдуцируемой комплексом TonB-ExbB-ExbD. Белки TBDTs представляют наиболее селективные компоненты этих систем и обладают различной аффинностью к сидерофорам одного и того же класса. DBS – 2,3-дигидроксибензоилсерин, продукт гидролиза энтеробактина. Все сидерофоры (за исключением феррихрома), транспортируемые в Fe-форме, приведены в десферри-форме для упрощения схемы. Из работы Raymond *et al.* (2015).

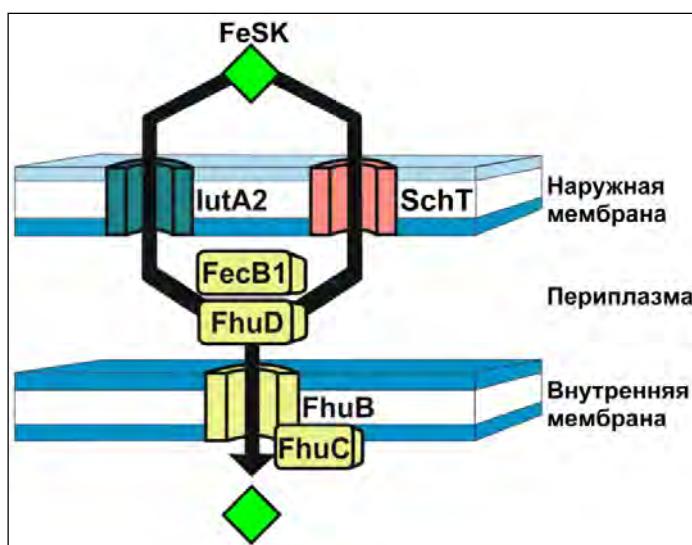


Рисунок 2.3. Система поглощения эндогенного сидерофора FeSK у цианобактерии *Anabaena* 7120. Из работы Rudolf *et al.* (2016). Пояснения в тексте.

2.2.1.3. Транспорт Fe-сидерофоров через внутреннюю мембрану клетки

В цитоплазму сидерофоры переносятся преимущественно посредством ABC-транспортеров (Hvorup *et al.*, 2007). Транспортер ABC обычно содержит пять функциональных субъединиц: периплазматический (субстрат-) связывающий белок (PBP), два трансмембранных белка-пермеазы, образующих канал, и два нуклеотид-связывающих белка, гидролизующих АТФ. Как правило, пермеаза и АТФаза представлены четырьмя отдельными полипептидами, образующими гомодимеры, но иногда они формируют общий гетеродимерный комплекс. Например, у *E. coli* ABC-транспортер Fe-энтеробактина, FepBC₂D₂, состоит из PBP FepB, димерной пермеазы FepC и димерной АТФазы FepD (Shea and McIntosh, 1991). Обычно пермеаза является димером двух идентичных белковых молекул, однако, у ABC-транспортера гидроксаматных сидерофоров FhuDBC *E. coli* пермеаза FhuB представляет собой слитый гомодимерный белок. В составе этого транспортера FhuD выполняет функцию PBP, а FhuC в виде димера – функцию АТФазы (Mademidis *et al.*, 1997; Mademidis and Köster, 1998). У *V. cholera* в ABC-транспортерах вибриобактина и энтеробактина, VctPDGC и ViuPDGC, АТФаза является гомодимером. Пермеаза в обеих этих системах состоит из белков-гетеродимеров VctDG и ViuDG (Wyckoff *et al.*, 2007; Wyckoff and Payne, 2011). Известны случаи использования общих АТФаз разными ABC-транспортерами. Например, у *Vibrio anguillarum* АТФазы FatE и FvtE являются взаимозаменяемыми в ABC-системах транспорта сидерофоров FatBCDE и FvtBCDE, соответственно (Naka *et al.*, 2013).

Транспорт сидерофоров через внутреннюю мембрану менее специфичен, чем через наружную. Низкая избирательность ABC-транспортеров хорошо демонстрируется на примере *E. coli*, у которой четыре TBDTs FhuA, FhuE, IutA и FoxA сопряжены с ABC-транспортером FhuDBC в поглощении Fe-сидерофоров FCH, копрогена, FeAB и FOB, соответственно (Braun *et al.*, 1998). Помимо ABC-транспортеров, известны однокомпонентные транспортеры сидерофоров, относящиеся к семейству MFS (Major Facilitator Superfamily); однако, механизм их действия малоизучен.

2.2.1.4. Диссоциация Fe-сидерофоров в цитоплазме

В известных сидерофор-зависимых путях поглощения железа высвобождение Fe(III) из комплекса с сидерофором чаще всего происходит в цитоплазме. В целом выделяют три возможных механизма высвобождения: гидролиз Fe-сидерофора, протон-опосредованная диссоциация комплекса или восстановление металлического центра (Albrecht-Gary and Crumbliss, 1998; Barchini and Cowart, 1996; Dhungana *et al.*, 2005). Механизм гидролиза имеет существенный недостаток, поскольку требует значительных метаболических затрат на постоянный синтез новых молекул сидерофоров. Механизм высвобождения железа с помощью протонирования возможен только при чрезвычайно низких значениях pH, которые не соответствуют физиологическому внутриклеточному pH бактерий.

Механизм восстановления металлического центра связан с проблемой, заключающейся в том, что окислительно-восстановительные потенциалы у многих сидерофоров имеют гораздо более высокие отрицательные значения, чем у большинства сильных биологических восстановителей, включая аскорбат, глутатион и кофермент NADH (Creutz, 1981; Millis *et al.*, 1993; Williams and Yandel, 1982). Поэтому восстановление железа из комплекса с сидерофором нуждается в специфических бактериальных редуктазах или сильных хелаторах Fe(II), которые могут сдвинуть окислительно-восстановительный потенциал Fe-сидерофора в положительную сторону или сформировать устойчивые комплексы с Fe(II) (Harrington and Crumbliss, 2009; Mies *et al.*, 2006). В частности, показано, что FOB диссоциирует при участии глутатиона или аскорбата в присутствии хелатора Fe(II) батоферандролинсульфоната (Mies *et al.*, 2006).

До сих пор механизмы диссоциации бактериальных Fe-сидерофоров остаются малоизученными; в этом отношении исследованы лишь такие сидерофоры, как энтеробактин, сальмохелин, FCH и их аналоги. У *E. coli* высвобождение железа из копрогена, FCH и FOB происходит в цитоплазме и включает восстановление металла ферментом FhuF (Matzanke *et al.*, 2004). Восстановление железа и диссоциация FCH сопрягаются с ацетилированием сидерофора для уменьшения его сродства к железу. Далее ацетилированный сидерофор выделяется в среду, но механизм этого процесса пока неизвестен (Hartman and Braun, 1980). Аминокислотная последовательность FhuF не обнаруживает значительного сходства с последовательностями любых других известных белков. Однако у бактерий *P. aeruginosa*, *Rhizobium leguminosarum* и *R. meliloti* обнаружены его гомологи (Capela *et al.*, 2001; Llamas *et al.*, 2006).

2.2.2. Сидерофор-независимое поглощение железа у цианобактерий

2.2.2.1. FutABC – основная система поглощения свободного Fe(III)

В качестве альтернативы сидерофор-зависимым системам поглощения трехвалентного железа, некоторые бактерии могут также обладать его специфическим ABC-транспортером. В этом случае Fe(III) должно сначала достичь периплазмы, например, путем пассивной диффузии через порин наружной мембраны. Затем в периплазме оно связывается и переносится периплазматическим белком к коровому ABC-транспортеру, состоящему из пермеазы внутренней мембраны и АТФазы. Хорошо изученными примерами таких транспортеров являются системы FbpABC (AfuABC), SfuABC и HitABC (Andrews *et al.*, 2003). В отличие от TonB-зависимых систем поглощения, эти транспортеры менее специфичны и способны также импортировать Fe(II) и/или Mn(II) в дополнение к Fe(III) или вместо него (Zappa and Bauer, 2013b).

ABC-транспортеры Fe(III) лучше изучены у цианобактерий, чем у аноксигенных бактерий. Гены, кодирующие ABC-транспортеры типа FutA/IdiA, идентифицированы в геномах 28 одноклеточных цианобактерий родов *Prochlorococcus*, *Synechococcus* и *Synechocystis* (Morrissey and Bowler, 2012). С биохимической точки зрения наиболее полно охарактеризован транспортер FutA(A₁A₂)BC *Synechocystis*. Он состоит из двух Fe(III)-связывающих белков FutA1 и FutA2, пермеазы FutB и АТФазы FutC. Экспрессия кодирующих эти белки *fut*-генов индуцируется недостатком железа. Белок FutA2 чрезвычайно обильно представлен в периплазме и считается периплазматическим рецептором Fe(III) в ABC-системе транспорта, тогда как роль белка FutA1 остается неясной. В отличие от FutA2, FutA1 преимущественно локализуется в цитоплазме. Однако делеция гена *futA1* приводит к сильному снижению концентрации комплексов Fe(III)-FutA2 в периплазме, что указывает на непрямое участие белка FutA1 в импорте железа (Badarau *et al.*, 2008; Katoh *et al.*, 2000, 2001a, 2001b; Morrissey and Bowler, 2012; Shcolnick *et al.*, 2009). Установлено, что транспортер FutABC вносит основной вклад в поглощение неорганического Fe(III) клетками *Synechocystis* и в бедной и в богатой железом среде в стандартных фотоавтотрофных условиях. Так, клетки мутантов по генам *futB* или *futC*, а также двойного мутанта *futA1/futA2* характеризуются чрезвычайно низкой скоростью роста на бедной железом среде и более чем на порядок пониженным уровнем включения изотопа ⁵⁹Fe(III) (Katoh *et al.*, 2001a).

Системы FutABC идентифицированы у многих других цианобактерий, включая нитчатые (Tom-Yew *et al.*, 2005). В частности показано, что у *Anabaena* 7120 гены различных

компонентов ABC-транспортеров индуцируются избытком железа при низкой плотности клеток, либо недостатком железа при умеренной плотности клеток. Это указывает на участие систем FutABC в различных клеточных ответах (Stevanovic *et al.*, 2013).

2.2.2.2. Дополнительные транспортеры Fe(III)

У *Synechocystis*, кроме 4 *fut*-генов, идентифицировано еще 13 генов, инактивация которых приводит к заметному снижению роста клеток в бедной железом среде и, в ряде случаев, к снижению уровня поглощения изотопа $^{55}\text{Fe(III)}$ (Jiang *et al.*, 2012, 2015; Xu *et al.*, 2016). Эти гены можно условно разделить на две категории. Первая включает 2 гена, не проявляющих прямого отношения к функциям транспорта: *sll1036* (кодирует предполагаемый белок, содержащий β -лактамазный домен) и *slr0376* (белок с неизвестной функцией DUF1257) (Jiang *et al.*, 2012). Вторая категория включает остальные 11 генов, которые имеют потенциальное отношение к функциям транспорта. Это гены *sll0772* (предполагаемый порин), *sll1263* (транспортер семейства CDF; Cation Diffusion Facilitator), *slr0964* (предполагаемая пермеаза Fe(II) FTR1), *tonB* (*slr1484*), *exbB1-exbD1* (*sll1404-sll1405*) (Jiang *et al.*, 2012), а также гомологи двух последних – *exbB2-exbD2* (*slr0677-slr0678*) и *exbB3-exbD3-exbD4* (*sll0477-sll0478-sll0479*) (Jiang *et al.*, 2015). Наиболее детально были изучены функции генов, кодирующих транспортеры двух типов, CDF (Jiang *et al.*, 2012) и FTR1 (Xu *et al.*, 2016), а также генов трех белковых комплексов ExbB-ExbD (Jiang *et al.*, 2015). Показано, что транспортеры CDF и FTR1 функционально дополняют основную систему поглощения неорганического Fe(III), FutABC. Их роль заключается в переносе в цитоплазму свободного Fe(III), частично высвобождающегося из комплексов Fe(III)-FutA2 в периплазме за счет восстановления и возвратного окисления (Xu *et al.*, 2016). Функциональный анализ трех генных кластеров *exbB-exbD* выявил необычную роль кодируемых ими белков в транспорте железа (Jiang *et al.*, 2015). По данным авторов, эти белки, которые у грамотрицательных бактерий традиционно участвуют в TonB-зависимом поглощении Fe-сiderофоров, у *Synechocystis* вовлечены в перенос через наружную мембрану свободного трехвалентного железа.

Предложенная авторами модель путей транспорта железа у *Synechocystis* (Xu *et al.*, 2016) представлена на Рисунке 2.4.

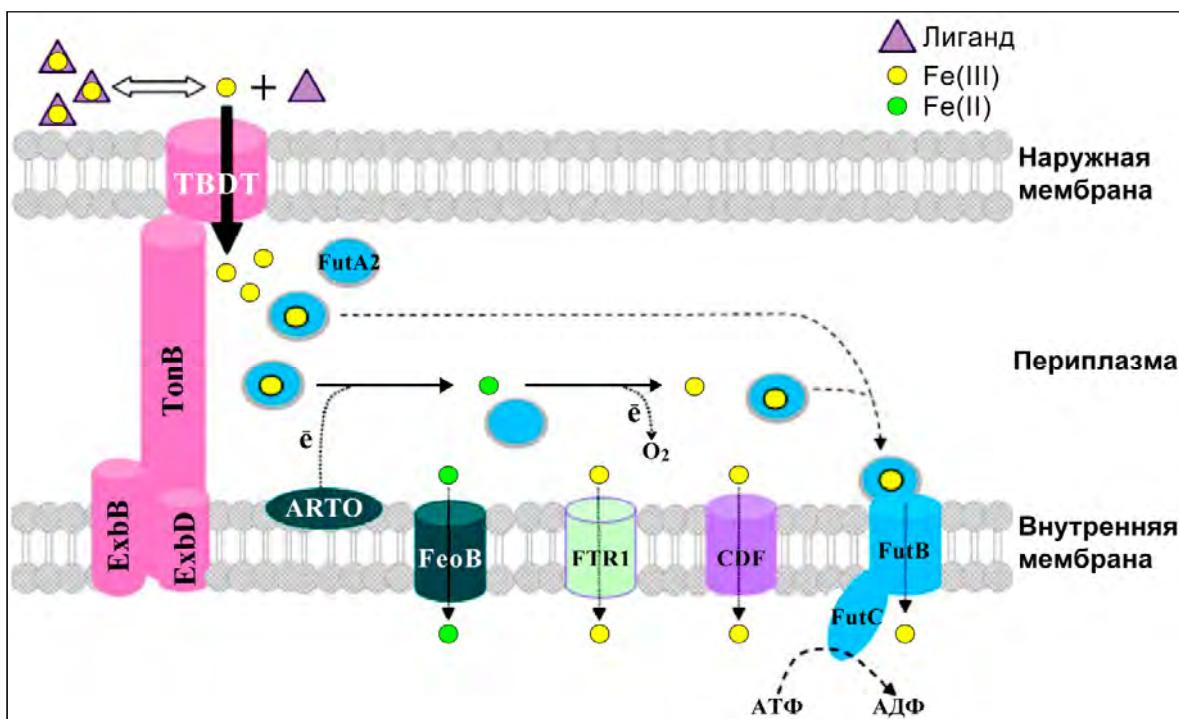


Рисунок 2.4. Модель путей поглощения железа у *Synechocystis* (Xu *et al.*, 2016).

В аэробных водных экосистемах Fe(III) преимущественно связано с органическими лигандами, такими как сидерофоры, а в искусственной среде YBG11 – с EDTA. Свободное Fe(III) и, возможно, Fe-сидерофоры переносятся через наружную мембрану посредством неизвестных TBDTs и системы TonB-ExbB-ExbD; причем транспорт свободного железа может быть в 800 раз более эффективным (Jiang *et al.*, 2015). Самый обильный белок периплазмы FutA2 связывает Fe(III), поддерживая его растворимость и облегчая транспорт. Белок FutA2 доставляет Fe(III) к коровому ABC-транспортеру FutBC, который переносит Fe(III) через внутреннюю мембрану. В фотоавтотрофных условиях ABC-транспортер FutABC является основным импортером свободного железа у *Synechocystis* (Katoh *et al.*, 2001a). В темноте до 90% железа, связанного с FutA2, может восстанавливаться альтернативной дыхательной терминальной оксидазой (ARTO), а затем переноситься в цитоплазму основным транспортером Fe(II) FeoB (Kranzler *et al.*, 2014). Однако на свету при фотосинтезе Fe(II) быстро окисляется кислородом до Fe(III), которое вновь в основном связывается с белком FutA2. Остатки Fe(III) переносятся через внутреннюю мембрану транспортерами CDF и FTR1 (Jiang *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2016).

2.2.2.3. Поглощение свободного Fe(II)

У бактерий (и ряда архей) транспорт Fe(II) из окружающей среды осуществляется в основном посредством системы Feo. Как отмечалось ранее, в оксигеновых условиях железо в форме Fe(II) практически отсутствует. Поэтому система FeoB функционирует у бактерий только в аноксигенных условиях и/или условиях внутриклеточного роста. Несмотря на важность этой системы и ее отличие от всех других бактериальных транспортеров, о ее функционировании известно удивительно мало (Cartron *et al.*, 2006). У энтеробактерий система Feo состоит из трех белков, FeoA, FeoB и FeoC, которые кодируются опероном

feoABC. Белок FeoB является Fe(II)-пермеазой, которая транспортирует Fe(II) из периплазмы в цитоплазму. С-конец этого большого белка интегрирован во внутреннюю мембрану, тогда как N-конец находится в цитоплазме. Небольшой белок FeoA является цитоплазматическим партнером белка FeoB. Функция этого белка остается неясной. Было высказано предположение, что FeoA взаимодействует с FeoB и стимулирует его активность. На основании биоинформационического анализа и косвенных экспериментальных данных было высказано предположение, что FeoC может быть транскрипционным репрессором *feo*-оперона (Cartron *et al.*, 2006; Hantke, 2003; Lau *et al.*, 2016).

У большинства бактерий, имеющих систему Feo, она, как и у энтеробактерий, является трехкомпонентной. Вместе с тем у других бактерий может отсутствовать компонент FeoC или два компонента – FeoC и FeoA (Cartron *et al.*, 2006). Кроме того известны бактерии, у которых система FeoB отсутствует. К таким бактериям относятся, например, морские пелагические цианобактерии родов *Prochlorococcus* и *Synechococcus*. Интересно, что у прибрежных видов *Synechococcus* присутствует ген *feoB* или гены *feoAB* (Morrissey and Bowler, 2012).

В геноме *Synechocystis* присутствует только ген *feoB*, но отсутствует ген *feoA*. Установлено, что его транскрипция индуцируется либо низкими концентрациями железа, либо активными формами кислорода (Katoh *et al.*, 2001a; Latifi *et al.*, 2005; Shcolnick *et al.*, 2009). В стандартных фотоавтотрофных условиях мутант с инактивированным геном *feoB* не отличался от штамма WT по скорости роста в обедненной железом среде, однако, *in vitro* демонстрировал значительно пониженный уровень поглощения изотопа ^{59}Fe (III), восстановленного аскорбатом до ^{59}Fe (II). На этом основании был сделан вывод о том, что белок FeoB является основным транспортером Fe(II) у *Synechocystis* (Katoh *et al.*, 2001a; Рисунок 2.4.). Вместе с тем, как показали эксперименты *in vitro* в темноте, FeoB может играть роль основного транспортера в восстановительном пути поглощения железа в аноксигенных условиях (Kranzler *et al.*, 2014; Рисунок 2.4.).

2.2.2.4. Восстановительное поглощение железа

Далеко не все бактерии способны поглощать железо с помощью прямой интернализации Fe-сидерофоров. Альтернативный путь заключается в том, что перед транспортом Fe(III) в неорганической и органической форме (в том числе в комплексе с сидерофорами) предварительно восстанавливается до Fe(II) (восстановительное поглощение железа). Восстановление может происходить на поверхности наружной мембраны либо в

периплазме. С помощью этого механизма осуществляется поглощение железа у растений, дрожжей и эукариотических водорослей (Kranzler *et al.*, 2013).

Показано, что восстановительный путь широко распространен у цианобактерий (Kranzler *et al.*, 2011; Lis and Shaked, 2009; Rose *et al.*, 2005). Например, у морской цианобактерии *Lyngbya majuscula* внеклеточное восстановление Fe(III) может осуществляться анионами супероксида (Rose *et al.*, 2005). В восстановлении нерастворимых оксидов железа на поверхности клеток *Synechocystis* могут участвовать пили типа IV, главным компонентом которых является пилин PilA1 (Lamb *et al.*, 2014).

Существенный вклад восстановления в периплазме в транспорт железа выявлен у цианобактерий в экспериментах *in vitro* по кратковременному поглощению радиоактивно меченого железа. Важный методический аспект этих экспериментов заключался в параллельной количественной оценке уровня восстановления железа и уровня подавления его транспорта феррозином, который специфически связывает Fe(II) и не проникает в цитоплазму. При этом количество образующегося комплекса Fe(II)-феррозин указывало, насколько транспорт железа сопряжен с его восстановлением (Kranzler *et al.*, 2011, 2014). Оказалось, что железо в неорганической форме (FeCl₃) биологически значительно более доступно для *Synechocystis*, чем в комплексе с сидерофорами AB и DFOB (Kranzler *et al.*, 2011). При этом константа скорости поглощения на единицу клеточной поверхности была на 4-5 порядков выше для свободного железа, чем для FeAB или FOB, соответственно (Lis *et al.*, 2015a).

Авторы провели сравнительный анализ восстановительного поглощения железа у 8 различных видов цианобактерий: 5 океанических (в том числе 1 нитчатой), 1 прибрежной и 2 пресноводных (*Synechocystis* и нитчатой *Anabaena* UTEX2576). Все виды, в том числе продуценты сидерофоров, *Synechococcus* 7002 и *Anabaena* UTEX2576, поглощали свободное железо в 10000 и более раз эффективно, чем в комплексе с ксеносидерофорами AB или DFOB. Кроме того, у *Anabaena* UTEX2576 восстановительное поглощение железа в свободной форме было в 1000 раз более эффективным, чем из комплекса с эндогенным SK. Однако отсутствие ингибирующего эффекта феррозина на поглощение железа у *Synechococcus* 7002 и *Anabaena* UTEX2576 указывало на специфический, не сопряженный с восстановлением, транспорт трехвалентного железа в комплексах с эндогенными сидерофорами (Lis *et al.*, 2015a).

Генетический контроль и молекулярные механизмы поглощения железа, включая восстановительное поглощение, наиболее хорошо изучены у модельной цианобактерии *Synechocystis*. Согласно современным представлениям, максимально биодоступным для ее клеток является растворенное неорганическое железо, и его поглощение осуществляется

двумя основными сидерофор-независимыми путями, показанными на Рисунке 2.4. Один из них обеспечивает прямой, не связанный с восстановлением, перенос трехвалентного железа в цитоплазму посредством ABC-транспортера FutABC. Данный путь облигатно функционирует в оксигенных условиях (на свету при фотосинтезе). Другой путь, восстановительный, предполагает предварительное восстановление Fe(III) до Fe(II) в периплазме с последующим разветвлением транспорта в зависимости от условий. В аноксигенных условиях (в темноте) подавляющая часть (до 90%) железа восстанавливается и поглощается в форме Fe(II) с помощью специфического транспортера FeoB во внутренней мембране. В оксигенных условиях, напротив, практически все образующееся Fe(II) быстро возвратно окисляется до Fe(III), которое в основном поглощается через систему FutABC и в меньшей мере, сугубо в свободном состоянии – через транспортеры CDF и FTR1 (Рисунок 2.4).

2.3. Регуляторные системы гомеостаза железа у цианобактерий

2.3.1. Глобальный регулятор гомеостаза железа Fur

Хотя железо играет ключевую роль в жизнедеятельности цианобактерий, избыток свободного внутриклеточного железа чрезвычайно вреден, поскольку оно катализирует в процессе фотосинтеза образование реакционно-способных форм кислорода (синглетного кислорода, аниона супероксида, перекиси водорода и гидроксильного радикала), что приводит к окислительному стрессу (Kirilovsky and Kerfeld, 2013; Latifi *et al.*, 2009). С другой стороны, голодание по железу также приводит к заметному повышению концентрации активных форм кислорода и вызывает окислительный стресс у цианобактерий (Latifi *et al.*, 2005). Следовательно, поглощение железа и его метаболизм должны строго регулироваться. Гомеостаз железа заключается в поддержании такого баланса концентрации свободного железа в цитоплазме, который позволяет избежать токсичного эффекта, обеспечивая при этом достаточный уровень этого металла для метаболических процессов (Andrews, 1998; Shcolnick and Keren, 2006).

У бактерий гомеостаз железа поддерживается посредством (1) синтеза, экспорта и реимпорта мощных хелаторов железа, сидерофоров; (2) сложных систем его поглощения; (3) депонирования его во внутриклеточных хранилищах (ферритинах); и (4) деградации железосодержащих белков в ответ на голодание по железу с последующим включением высвобожденных атомов Fe в особо в них нуждающиеся ферменты (Kranzler *et al.*, 2013). Регуляция генов, контролирующих эти процессы, является сложной и включает сеть

регуляторных белков. Некоторые из этих белков участвуют в регуляции конкретного кластера генов гомеостаза железа и, поэтому, являются «локальными регуляторами». Другие, «глобальные регуляторы», контролируют широкий спектр генов гомеостаза железа. К локальным регуляторам относятся AraC-подобные факторы транскрипции, двухкомпонентные системы, сигма-факторы и небольшие РНК (Kranzler *et al.*, 2013; Zappa and Bauer, 2017). У цианобактерий глобальным регулятором гомеостаза железа является транскрипционный фактор Fur – Ferric uptake regulator (Gonzalez *et al.*, 2016). Белок Fur обычно действует как транскрипционный репрессор, который отслеживает внутриклеточную концентрацию свободного железа и модулирует транскрипцию в ответ на его доступность (Andrews *et al.*, 2003). Он контролирует не только экспрессию систем поглощения и хранения железа, но также широкий набор генов и оперонов различных функциональных категорий, способствуя доступности железа для основных физиологических процессов (Gonzalez *et al.*, 2016).

Роль белка Fur в гомеостазе железа наиболее детально исследована у *E. coli*. Установлено, что он осуществляет контроль над широким спектром генов, многие из которых участвуют в поглощении железа, синтезе сидерофоров и хранении железа, но при этом он также влияет на гены, связанные с энергетическим метаболизмом, патогенностью и ответом на окислительный стресс. Белок Fur действует как зависимый от железа регулятор транскрипции, вызывая репрессию гена в присутствии высоких концентраций железа и его дерепрессию, когда железа в клетке недостаточно (McHugh *et al.*, 2003). Белок Fur существует в свободной форме и в комплексе с железом. Равновесие между ними сдвигается ионами Fe(II) в сторону комплекса Fur-Fe(II), который связывается с ДНК и репрессирует транскрипцию. Недостаток железа приводит к дерепрессии большой группы генов, контролирующих синтез и поглощение сидерофоров и, как следствие, стимулирует высокоаффинные системы поглощения железа из окружающей среды, в состав которых входят специфические рецепторы сидерофоров наружной мембранны (TBDTs), периплазматические белки и белки-транспортеры внутренней мембранны (Escolar *et al.*, 1999).

Молекулярный механизм репрессии основан на том, что комплекс Fur-Fe(II) специфически связывается с консервативной нуклеотидной последовательностью, Fur-боксом, в промоторах репрессируемых генов, и образует димер. Fur-бокс присутствует у многих организмов, где Fur регулирует поглощение железа. Классический Fur-бокс *E. coli* является 19-нуклеотидным палиндромом GATAATGATAATCATTATC, который связывается с димером белка Fur (de Lorenzo *et al.*, 1988; Escolar *et al.*, 1998).

Регулятор Fur и Fur-подобные регуляторы составляют семейство белков-сенсоров металлов, которые контролируют транскрипцию генов, участвующих в гомеостазе металлов,

и связанную с этим защиту от окислительного стресса. В это семейство входят металлорегуляторы Zur (поглощение цинка), Mur (поглощение марганца), Nur (поглощение никеля), PerR (ответ на окислительный стресс) и гем-зависимый железо-чувствительный регулятор Irr (Fillat, 2014). Белки Fur-семейства высоко консервативны и широко представлены у цианобактерий. У исследованных к настоящему времени цианобактерий количество *fur*-генов варьирует от 2 до 5. Исключением являются *Acaryochloris marina* MBIC11017, имеющая 13 *fur*-генов, и *Cyanobacterium UCYN-A*, у которой эти гены отсутствуют (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2016). Подавляющее большинство видов, включая *Synechocystis* (Kaneko *et al.*, 1996) и *Anabaena* 7120 (Kaneko *et al.*, 2001), имеют по 3 гена, которые часто называют *furA*, *furB* и *furC* или *fur*, *zur* и *perR*.

Цианобактериальный ген *furA*, по-видимому, является жизненно важным, поскольку все попытки его инактивации оказались безуспешными у всех изученных видов: *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Synechococcus* 7002, *Synechocystis* и *Anabaena* 7120 (Ghassemian and Straus, 1996; Hernández *et al.*, 2006a, 2006b; Kunert *et al.*, 2003; López-Gomollón *et al.*, 2006; Ludwig *et al.*, 2015; Michel *et al.*, 2001). Установлено, что у *Synechococcus* 7002 и *Anabaena* 7120, имеющих по три *fur*-гена, именно гены *furA*, которые проявляют наибольшее сходство с геном *fur* гетеротрофных бактерий, непосредственно вовлечены в регуляцию генов метаболизма железа в зависимости от его содержания в среде (Gonzalez *et al.*, 2012; Hernandez *et al.*, 2004; Ludwig *et al.*, 2015). Высокая консервативность белка FurA дает основание полагать, что он является основным регулятором гомеостаза железа и у многих других видов цианобактерий (González *et al.*, 2016). Функциональная роль белка FurA наиболее хорошо изучена у *Anabaena* 7120. Показано, что FurA не только вовлечен в поддержание гомеостаза железа, но прямо или косвенно регулирует транскрипцию множества генов и оперонов, участвующих в различных физиологических процессах, включая фотосинтез, дыхание, реакцию на окислительный стресс, азотфиксацию, дифференциацию гетероцист, клеточную морфологию, биосинтез тетрапиррола, деградацию фикобилисом, катаболизм хлорофилла, запрограммированную гибель клеток, светочувствительность, сигнальную трансдукцию, биосинтез экзополисахаридов и продукцию цианотоксинов (Gonzalez *et al.*, 2010-2014).

2.3.2. AraC-подобные регуляторы транскрипции PchR

Белок AraC является регулятором транскрипции, который контролирует катаболизм арабинозы у *E. coli* путем селективного связывания с ДНК в непосредственной близости от промоторных участков его целевых генов. В отсутствие арабинозы димер AraC репрессирует экспрессию оперона катаболизма арабинозы *araBAD*, а при ее наличии связывает арабинозу своим N-концом, перемещается на другие сайты связывания и активирует экспрессию этого оперона (Gallegos *et al.*, 1997; Schleif, 2010).

AraC-подобные регуляторы транскрипции обнаружены у многих видов бактерий. Общей характеристикой белков AraC является наличие консервативной последовательности из 100 аминокислотных остатков в С-концевой области белка, которые образуют структуру «спираль-поворот-спираль», ответственную за связывание ДНК. Белки этого семейства (AraC/XylS) участвуют в различных клеточных процессах, от углеродного метаболизма до стрессовых ответов и регуляции вирулентности (Gallegos *et al.*, 1997).

Некоторые представители этого семейства участвуют и в гомеостазе железа. Например, у *P. aeruginosa* синтез сидерофора пиохелина регулируется белком Fur и AraC-подобным белком PchR. Гены биосинтеза пиохелина у этой бактерии организованы в два дивергентных оперона *pchDCBA* и *pchEFGHI*, которые сгруппированы в один кластер с опероном поглощения пиохелина, *fptABCX*, и регуляторным геном *pchR*. В свою очередь, ген *pchR* тесно сцеплен с опероном *pchDCBA* в отдельный подкластер *pchR-pchDCBA*, но транскрибируется дивергентно. В условиях достатка железа белок Fe-Fur репрессирует транскрипцию всех этих трех оперонов и гена *pchR*. В условиях недостатка железа белок Fur диссоциирует из Fur-боксов этих генов, что приводит к восстановлению экспрессии указанных генов на базальном уровне. Полная экспрессия оперона синтеза и оперона транспорта пиохелина нуждается в транскрипционном активаторе PchR. Пиохелин в Fe-форме служит эффекторной молекулой для белка PchR и позволяет этому регулятору связываться с PchR-боксами, расположенными в промоторных участках регулируемых генов. Следует отметить, что связывание комплекса Fe-пиохелин-PchR с PchR-боксом в межгенном участке *pchR-pchDCBA* наряду с индукцией оперона *pchDCBA* репрессирует транскрипцию самого гена *pchR* (Youard *et al.*, 2011).

В геноме *Synechocystis* идентифицировано три *pchR*-подобных гена, *sll1205* (*pchR*), *sll1408* (*pcrR*) и *slr1489* (*pchR*), кодирующих белки, гомологичные бактериальному регулятору гомеостаза железа PchR (Kaneko *et al.*, 1996; <http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>). В настоящей работе мы обозначали эти гены как *pchR1*, *pcrR* и *pchR2*, соответственно (глава 4 «Результаты»). Согласно литературным данным, они не являются существенными для

стандартного фотоавтотрофного роста, однако, вовлечены в адаптивный ответ на окислительный и металл-зависимый стресс (Houot *et al.*, 2007; Soni *et al.*, 2012). Все они индуцируются в условиях недостатка железа и репрессируются при его избытке (Houot *et al.*, 2007). Гены *pchR1* и *pchR2* индуцируются перекисью водорода и репрессируются кадмием. Гены *pcrR* и *pchR2* регулируются избытком цинка; первый – негативно, а второй – позитивно. Мутанты по любому из *pchR*-генов более устойчивы к избытку железа и несколько менее чувствительны к его недостатку, чем штамм WT. Мутанты $\Delta pchR1$ и $\Delta pchR2$ более устойчивы к перекиси водорода, чем штаммы WT и $\Delta pcrR$. Вместе с тем мутанты $\Delta pchR1$ и $\Delta pchR2$ более устойчивы к кадмию и кобальту, которые нарушают гомеостаз железа и вызывают окислительный стресс (Soni *et al.*, 2012).

Следует отметить, что у *Synechocystis* все три *pchR*-подобных гена локализованы в кластере генов, которые вовлечены или предположительно вовлечены в транспорт сидерофоров (отражено также на Рисунке 4.8 в главе 4 «Результаты»).

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Бактериальные штаммы и плазмиды

Характеристика использованных штаммов и плазмид приведена в Таблице 3.1.

Таблица 3.1. Штаммы и плазмиды, использованные в работе

Штамм и/или плазмида	Существенный генотип; фенотип (примечание)	Ссылка/источник
Штаммы		
<i>Escherichia coli</i>		
NM522 ^{a)}	<i>supE thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>hsd5 F'</i> [<i>proAB⁺ lac^q lacZΔM15</i>]	Коллекция кафедры
C600(R751) ^{b)}	<i>thr-1 thi-1 leuB6 lacY1 tonA21 supE44 R751; Tra⁺ Tp^R</i>	То же
<i>Anabaena variabilis</i>		
ATCC 29413	(Штамм дикого типа, продуцент сидерофора)	От Л.Е.Михеевой
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803		
WT	Дикий тип	Коллекция кафедры
Δ exbBD1	Δ exbB1- Δ exbD1::Gm ^r ; Gm ^R	Данная работа
Δ fecB1	Δ fecB1::Km ^r ; Km ^R	То же
Δ fecB1(pVZ326)	Δ fecB1::Km ^r pVZ326; Km ^R Cm ^R (трансконьюгант)	То же
Δ fecB1(pVZ-fecB1)	Δ fecB1::Km ^r pVZ-fecB1; Km ^R Cm ^R (трансконьюгант)	То же
Δ fecB2	Δ fecB2::Km ^r ; Km ^R	То же
Δ fecB3	Δ fecB3::Km ^r ; Km ^R	То же
Δ fecB4	Δ fecB4::Km ^r ; Km ^R	То же
Δ fecC	Δ fecC::Km ^r ; Km ^R	То же
Δ fecD	Δ fecD::Km ^r ; Km ^R	То же
Δ fecE	Δ fecE::Km ^r ; Km ^R	То же
Δ fecE(pVZ326)	Δ fecE::Km ^r pVZ326; Km ^R Cm ^R (трансконьюгант)	То же
Δ fecE(pVZ-fecB1)	Δ fecE::Km ^r pVZ-fecB1; Km ^R Cm ^R (трансконьюгант)	То же
Δ feoB	Δ feoB::Sp ^r ; Sp ^R	То же
Δ fhuA1	Δ fhuA1::Km ^r ; Km ^R	То же
Δ fhuA2	Δ fhuA2::Km ^r ; Km ^R	То же
Δ fhuA3	Δ fhuA3::Km ^r ; Km ^R	То же
Δ futB	Δ futB::Km ^r ; Km ^R	То же
Δ futC	Δ futC::Km ^r ; Km ^R	То же
Δ pchR1	Δ pchR1::Sp ^r ; Sp ^R (вставка кассеты Sp ^r в сайт <i>Ball</i>)	Коллекция кафедры
Δ pchR2	Δ pchR2::Gm ^r ; Gm ^R (вставка кассеты Gm ^r в сайт <i>Ball</i>)	То же
Δ pcrR	Δ pcrR::Km ^r ; Km ^R (вставка кассеты Km ^r в сайт <i>Ball</i>)	То же
Δ schT	Δ schT::Km ^r ; Km ^R	Данная работа
Δ tonB	Δ tonB::Gm ^r ; Gm ^R	То же
Δ tonB-exbB	Δ tonB-exbB1::Sp ^r ; Sp ^R	Коллекция кафедры
Δ tonB-exbB/ Δ futB	Δ tonB-exbB1::Sp ^r Δ futB::Km ^r ; Sp ^R Km ^R	Данная работа
Δ tonB-exbB/ Δ futC	Δ tonB-exbB1::Sp ^r Δ futC::Km ^r ; Sp ^R Km ^R	То же

Продолжение Таблицы 3.1.

Штамм и/или плазмида	Существенный генотип; фенотип (примечание)	Ссылка/источник
Плазмиды		
pUCGM	pUC-ori <i>bla</i> <i>mp1819::Gm^r</i> ; <i>Ap^R Gm^R</i> (донор кассеты <i>Gm^r</i>)	Schweizer, 1993
pUCKM ^{g)}	pUC-ori <i>bla</i> <i>mp1819::Km^r</i> ; <i>Ap^R Km^R</i> (донор кассеты <i>Km^r</i>)	Коллекция кафедры
pUCSP ^{g)}	pUC-ori <i>bla</i> <i>mp1819::Sp^r</i> ; <i>Ap^R Sp^R</i> (донор кассеты <i>Sp^r</i>)	То же
pGEM-T Easy	pUC-ori <i>bla</i> <i>lacZ::MCS</i> ; <i>Ap^R</i> (вектор)	Promega
pΔexbBD1	pGEM-T' <i>[ΔexbB1-exbD1::Gm^r]</i> ; <i>Ap^R Gm^R</i>	Данная работа
pΔfecB1	pGEM-T' <i>[ΔfecB1::Km^r]</i> ; <i>Ap^R Km^R</i>	То же
pΔfecB2	pGEM-T' <i>[ΔfecB2::Km^r]</i> ; <i>Ap^R Km^R</i>	То же
pΔfecB3	pGEM-T' <i>[ΔfecB3::Km^r]</i> ; <i>Ap^R Km^R</i>	То же
pΔfecB4	pGEM-T' <i>[ΔfecB4::Km^r]</i> ; <i>Ap^R Km^R</i>	То же
pΔfecC	pGEM-T' <i>[ΔfecC::Km^r]</i> ; <i>Ap^R Km^R</i>	То же
pΔfecD	pGEM-T' <i>[ΔfecD::Km^r]</i> ; <i>Ap^R Km^R</i>	То же
pΔfecE	pGEM-T' <i>[ΔfecE::Km^r]</i> ; <i>Ap^R Km^R</i>	То же
pΔfhuA1	pGEM-T' <i>[ΔfhuA1::Km^r]</i> ; <i>Ap^R Km^R</i>	То же
pΔfhuA2	pGEM-T' <i>[ΔfhuA2::Km^r]</i> ; <i>Ap^R Km^R</i>	То же
pΔfhuA3	pGEM-T' <i>[ΔfhuA3::Km^r]</i> ; <i>Ap^R Km^R</i>	То же
pΔfutB	pGEM-T' <i>[ΔfutB::Km^r]</i> ; <i>Ap^R Km^R</i>	То же
pΔfutC	pGEM-T' <i>[ΔfutC::Km^r]</i> ; <i>Ap^R Km^R</i>	То же
pΔschT	pGEM-T' <i>[ΔschT::Km^r]</i> ; <i>Ap^R Km^R</i>	То же
pΔtonB	pGEM-T' <i>[ΔtonB::Gm^r]</i> ; <i>Ap^R Gm^R</i>	То же
pJet1.2/blunt	pMB1-ori <i>bla</i> <i>eco47R::MCS</i> ; <i>Ap^R</i> (вектор)	Thermo Fisher Scientific
pΔfeoB	pJet1.2/blunt' <i>[ΔfeoB::Sp^r]</i> ; <i>Ap^R Sp^R</i>	Данная работа
pVZ326	RSF1010-ori <i>cat kan</i> ; <i>Mob⁺ Cm^R Km^R</i> (вектор)	GenBank, MG356711
pVZ-fecB1	pVZ326' <i>[Δkan::fecB1]</i> ; <i>Mob⁺ Cm^R</i>	Данная работа

^{a)}Штамм NM522 со специальной плазмидой-эпизомой F' (Gough and Murray, 1983), предназначенный для «сине-белой» селекции рекомбинантных плазмид на основе векторов типа pGEM-T Easy

^{g)}Штамм C600 (Sambrook *et al.*, 1989), содержащий плазмиду R751 (Meyer and Shapiro, 1980)

^{g)}Производная pUCGM с заменой кассеты *Gm^r* на *Km^r* из плазмиды pUC4K (Pharmacia; Швеция)

^{g)}Производная плазмиды pHP45Ω (Prentki and Krisch, 1984)

Обозначения:

Δ – делеция части гена, гена или генов, а также символ мутантного штамма;

:: – символ инсерции кассеты устойчивости к антибиотику/полилинкеру/гену;

Ap^R, *Cm^R*, *Gm^R*, *Km^R*, *Sp^R* или *Tr^R* – устойчивость к ампициллину (*Ap*; ген *bla*), хлорамфениколу (*Cm*; *cat*), гентамицину (*Gm*; *aacC1*), канамицину (*Km*; *kan*, или *aphII*), спектиномицину (*Sp*; *aadA*) или триметоприму (*Tr*; *dhfRIIC*);

Gm^r, *Km^r* или *Sp^r* – кассета (фрагмент ДНК с геном) устойчивости к *Gm*, *Km* или *Sp*;

MCS или *trp* – сайт множественного клонирования (полилинкер) плазмиды-вектора;

Tra⁺ или *Mob⁺* – конъюгативная или мобилизуемая (с помощью конъюгативной) плазмиды, способная к переносу из клетки-донора в клетку-реципиент в процессе конъюгации.

3.2. Среды и условия культивирования бактерий

Культуры *E. coli* выращивали в жидкой богатой среде LB (Миллер, 1976) с активной аэрацией за счет постоянного перемешивания на орбитально-качающемся шейкере (220 об/мин) или магнитной мешалке (300 об/мин) при 37°C в течение 18 часов. В качестве селективных сред для клонирования и поддержания трансформантов, несущих рекомбинантные плазмиды, использовали плотные среды LB (содержащие 1,5% агара) с добавлением подходящего антибиотика (Ap, Cm, Gm, Km или Sp). Плотная индикаторная среда с Ap дополнительно содержала хромогенный субстрат β -галактозидазы, 5-бromo-4-хлоро-3-индолил- β -D-галактопиранозид, X-Gal, и индуктор промотора *lac*-оперона, изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид, IPTG (оба от компании Thermo Fisher Scientific; Уолтем, США).

Цианобактерии культивировали фотоавтотрофно при 30°C и постоянном освещении белым светом интенсивностью 40 мкмоль фотонов· $m^{-2} \cdot s^{-1}$ с помощью люминесцентных ламп ЛЛ 30Вт ЛБ 30 (бренд L30W/640 G13 OSRAM; Смоленск, РФ). При этом использовали жидкие или плотные, содержащие 0,9% Бакто-агара (Becton, Dickinson and Company; Франклин Лейкс, США), минеральные среды YBG11 (Shcolnick *et al.*, 2007) или BG11 (Rippka *et al.*, 1979 либо Stanier *et al.*, 1971). В жидкие среды дополнительно вносили 10 мМ буфера HEPES-NaOH (рН 7,8), а в плотные – 0,3% тиосульфата натрия. Жидкие культуры объемом 4 мл инкубировали в 20-мл пробирках на открытом штативе с небольшим уклоном (угол 10° от горизонтали; без активной аэрации), а культуры объемом 50 мл – в 150-мл колбах Эрленмейера с постоянным перемешиванием на магнитной мешалке (300 об/мин). Среды готовили в деионизированной воде с удельным сопротивлением 18,2 М $\Omega \cdot$ см (очистка с помощью комбинированной мембранный установки УВОИ-МФ-1812(18)-1, ЗАО НПК «МЕДИАНА-ФИЛЬТР»; Москва, РФ) с использованием высокоочищенных реактивов компаний Fluka, Sigma и Sigma-Aldrich (инкорпорированы в Merk KGaA; Дармштадт, Германия) со следовым содержанием железа и меди (кроме солей самих этих металлов). Наряду со стандартными средами YBG11 или BG11, которые содержат 6 мкМ FeCl₃ или 12 мкМ Fe(NH₄)₃(C₆H₅O₇)₂ (цитрат железа(III)-аммония), использовали их производные, обогдененные железом, YBG11-Fe или BG11-Fe. В эти среды вместо солей Fe(III) соответственно добавляли 16 мкМ Na₂EDTA (вносят в комплексе с FeCl₃ в YBG11; Shcolnick *et al.*, 2007) или 12 мкМ (NH₄)₂HC₆H₅O₇. В модифицированные среды YBG11+Fe600 с повышенным содержанием неорганического Fe(III) вносили 600 мкМ FeCl₃ (из 0,1 М раствора в 48% этаноле), но не добавляли Na₂EDTA (кроме 1,5 мкМ в комплексе со следовыми металлами), а также лимонную кислоту (стандартная концентрация – 30 мкМ). В

качестве селективных сред для трансформантов или трансконъюгантов *Synechocystis* использовали плотные среды YBG11 и YBG11+Fe600 с добавлением подходящего антибиотика (Cm, Gm, Km или Sp).

Для культивирования нитчатой диазотрофной цианобактерии *A. variabilis* использовали жидкие и плотные производные YBG11, дополненные 2 мкМ NiCl₂. Культуры *A. variabilis* с повышенной продукцией эндогенного сидерофора (Kerry *et al.*, 1988; Trick and Kerry, 1992) выращивали в жидкой среде YBG11₀-Fe-Cu (с 2 мкМ NiCl₂) без добавления NaNO₃ (условие фиксации молекулярного азота клетками), FeCl₃, CuSO₄, а также Na₂EDTA (кроме 1,5 мкМ в комплексе со следовыми металлами).

3.3. Получение и использование голодающих по железу культур *Synechocystis*

Влияние недостатка железа на рост клеток различных штаммов *Synechocystis* оценивали при их инкубации в средах YBG11-Fe или BG11-Fe, а эффект стимуляции роста Fe-сидерофорами – в соответствующих производных жидкой среды YBG11-Fe. В таких экспериментах использовали новые стерильные пластиковые центрифужные и мерные пробирки, а также мерные флаконы для культур клеток (Greiner Packaging International GmbH; Кремсмюнстер, Австрия). Для минимизации загрязнения железом все стеклянные пробирки и колбы (с помещенными в них магнитами в тефлоновой оболочке) обрабатывали в течение ночи 4 М HCl, промывали 15 раз деионизированной водой (18,2 МΩ·см), заполняли на треть объема 10 мкМ Na₂EDTA (pH 7,5) и автоклавировали (после стерилизации раствор Na₂EDTA удаляли).

С целью истощения внутриклеточных запасов железа и получения голодающих по железу культур *Synechocystis* клетки, выращенные в течение 5 дней в 50 мл стандартной жидкой среды, YBG11 или BG11, осаждали центрифугированием (12 мин при 3000г и 30°C). Клетки промывали (ресуспендировали и центрифугировали, как указано выше) дважды в 25 мл раствора 15 мМ цитрата Na и 10 мМ Na₂EDTA (pH 6,0) и дважды в 25 мл обедненной железом среды, YBG11-Fe или BG11-Fe. Промытые клетки засевали в соответствующую обедненную железом среду до конечной оптической плотности 0,05 при 750 нм (OD₇₅₀) и культивировали в течение 5 дней. Наконец, голодающие по железу клетки пересевали с разведением до OD₇₅₀ ~ 0,05 в обедненную железом среду, YBG11-Fe или BG11-Fe, и их рост в отсутствии либо в присутствии тестируемого Fe-сидерофора регистрировали по изменению OD₇₅₀ с помощью спектрофотометра Ultrospec II (LKB Biochrom Limited; Кэмбридж, Великобритания).

Рост клеток *Synechocystis* представляли графиками изменения OD₇₅₀ культур в зависимости от времени (дни) инкубации, либо диаграммами значений OD₇₅₀ и фотографиями культур в заключительный день инкубации. Каждый эксперимент проводили в трех независимых повторах и вычисляли средние значения и стандартные отклонения от средних значений. Для оценки статистической значимости различий использовали парный двухвыборочный t-тест Стьюдента для средних.

3.4. Сидерофоры в качестве источников железа

В работе использовали коммерчески доступные сидерофоры, приобретенные либо в десферри-форме – тригидроксаматные десферрихром, DFCH (Sigma), и десферриоксамин B, DFOB (дефероксаминмезилат; Sigma-Aldrich), либо в насыщенной железом форме – дигидроксаматные FeAB и FeSK (EMC microcollections GmbH; Тюбинген, Германия). Лиофилизированные сидерофоры растворяли до концентрации 1 мМ в стерильной деионизированной воде и хранили при -20°C. Непосредственно перед опытом сидерофоры в десферри-форме, DFCH и DFOB, насыщали железом, смешивая их с FeCl₃ в молярном отношении 1,33/1 (444 мкМ сидерофора/333 мкМ FeCl₃), с доведением pH до 6-7 с помощью 5 мМ NaOH. Эти смеси инкубировали 8 часов в темноте при комнатной температуре, фильтровали через стерильные нитроцеллюлозные фильтры (диаметр пор 0,45 мкм; компания Millipore, теперь инкорпорированная в Merk KGaA) и добавляли в среду YBG11-Fe до конечной концентрации 10 мкМ сидерофора/7,5 мкМ FeCl₃ (DFCH и DFOB в ферри-форме – FCH и FOB, соответственно). Сидерофоры FeAB и FeSK непосредственно разводили в среде YBG11-Fe до 10 мкМ. Готовые среды с Fe-сидерофорами выдерживали в темноте 12-18 часов перед посевом голодающих по железу клеток *Synechocystis*.

Источником безымянного дигидроксаматного сидерофора, обозначаемого нами SAV, служила нитчатая цианобактерия *A. variabilis* (любезно предоставлена к.б.н. Л.Е.Михеевой; кафедра генетики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова). Культуры *A. variabilis* выращивали в течение 10 дней в жидкой среде YBG11₀-Fe-Cu. После осаждения клеток центрифугированием (15 мин при 12000g и 2°C) среду фильтровали через стерильные нитроцеллюлозные фильтры (диаметр пор 0,45 мкм; Millipore). Фильтраты дополняли всеми отсутствующими компонентами среды YBG11, кроме FeCl₃, и определяли в них концентрацию SAV (ниже). Независимо полученные фильтраты культур *A. variabilis* содержали 35-40 мкМ SAV; их добавляли к голодающим по железу культурам *Synechocystis* до конечной концентрации сидерофора – 10 мкМ.

3.5. Определение концентрации сидерофора (CAS-анализ)

Концентрацию SAV в среде по мере роста культур *A. variabilis*, а также в конечных фильтратах этих культур (выше) определяли с помощью модифицированного метода с использованием красителя хромазурола S (CAS) (Alexander and Zuberer, 1991). Метод основан на обесцвечивании окрашенного комплекса Fe-CAS вследствие экстракции из него железа сидерофором. Из среды после удаления клеток центрифугированием (5 мин при 12000g) или из конечного фильтрата отбирали аликовты, из которых делали последовательные двукратные разведения средой YBG11-Fe. К 0,5-мл пробам этих разведений добавляли по 0,5 мл свежеприготовленного раствора: 15 мкМ FeCl₃, 150 мкМ CAS, 0,6 мМ гексадецилtrimетиламмониум бромида, 4 мМ 5-сульфосалициловой кислоты и 0,5 М буфера MES-KOH (рН 5,6). Смеси инкубировали в темноте, 1 час при 22°C, затем 0,5 часа при 65°C (для растворения возможного преципитата), и незамедлительно измеряли абсорбцию света (A) с длиной волны 630 нм (спектрофотометр Ultrospec II). Контрольной пробой служила среда YBG11-Fe (референс). Концентрацию сидерофора рассчитывали по уравнению линии тренда калибровочной кривой, полученной с использованием DFOB в качестве стандарта в диапазоне концентраций 1-7 мкМ и построенной с помощью Microsoft Excel 2010 (Рисунок 3.1):

$$C = [1 - (A_{\Pi}/A_P)]/0,124,$$

где C – концентрация сидерофора (мкМ), (A_П/A_P) – отношение значений абсорбции света с длиной волны 630 нм опытной пробой (A_П) и референсом (A_P), соответственно.

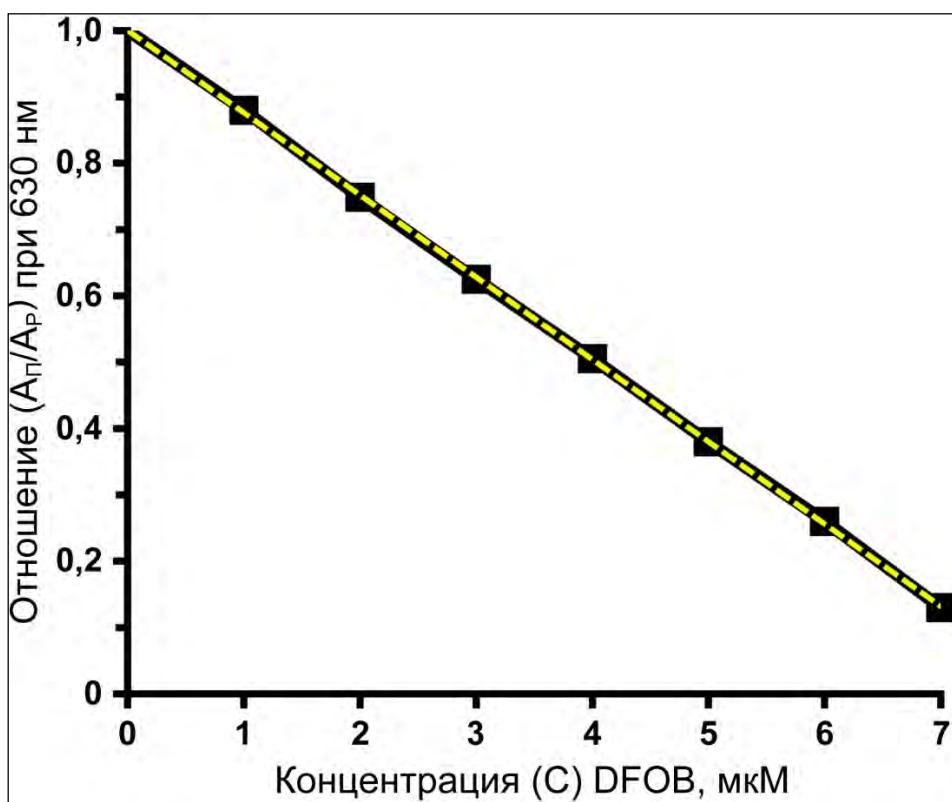


Рисунок 3.1. Калибровочная кривая для определения концентрации сидерофора в среде и фильтратах культур нитчатой цианобактерии *A. variabilis* с помощью CAS-анализа. По оси абсцисс – концентрация (C) сидерофора DFOB, мкМ, использованного в качестве стандарта. По оси ординат – отношение ($A_{\text{п}}/A_{\text{р}}$) значений абсорбции света с длиной волны 630 нм пробой, содержащей DFOB ($A_{\text{п}}$), и референсом (среда YBG11-Fe), не содержащим сидерофор ($A_{\text{р}}$). Желтым пунктиром показана линия тренда.

3.6. Спектральный анализ клеток *Synechocystis*

Спектральный анализ применяли с целью регистрации стрессового состояния и оценки внутриклеточного содержания пигментов у культур *Synechocystis* при голодании по железу. Спектры абсорбции клеток в видимом диапазоне света от 400 до 750 нм записывали с помощью спектрофотометра Specord 50 (Analytik Jena AG; Йена, Германия). Суспензии клеток доводили до равной оптической плотности ($OD_{750} = 0,3$) и спектры корректировали на светорассеяние при 750 нм. В условиях достатка железа в среде абсорбционный максимум (пик) фикоцианина приходился на длину волны 625 нм, а пик хлорофилла *a* в красной области спектра («красный пик» хлорофилла) – на 680 нм. В работе представлены типичные спектры клеток из трех независимых повторов эксперимента.

3.7. Определение концентрации и чистоты нуклеиновых кислот

Концентрацию нуклеиновых кислот в растворах измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH; Эрланген, Германия). При этом их чистоту оценивали по отношениям OD_{260/280} и OD_{260/230}, которые соответственно отражали уровни загрязнения белками и другими органическими соединениями (такими как феноляты и тиоцианаты). Значения OD_{260/280} и OD_{260/230} $\geq 1,8$ служили показателем чистоты образцов ДНК, а значения $\geq 2,0$ – образцов РНК (Sambrook *et al.*, 1989).

3.8. Манипуляции с ДНК и молекулярное клонирование

3.8.1. Выделение ДНК

*Выделение плазмид из клеток *E. coli** проводили с помощью набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit, согласно инструкции компании-производителя (Thermo Fisher Scientific). Для получения одного препарата использовали клетки из 3-5 мл культуры, выращенной в присутствии подходящего антибиотика (мкг/мл): Ap (50), Gm (10), Cm (10), Km (30) или Sp (30).

*Выделение суммарной ДНК или плазмид из клеток *Synechocystis** проводили с использованием 2-мл аликовот пятидневных культур. Осадки клеток, промытые 1 мл раствора 50 мМ Tris-HCl, 10 мМ Na₂EDTA (pH 8,0) (реконструировали и центрифугировали 5 мин при 12000g), реконструировали в 270 мкл буферного раствора: 8% сахарозы, 5% Triton X-100, 50 мМ Na₂EDTA, 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0). К суспензиям клеток добавляли по 20 мкл хлороформа и после 5 мин интенсивного смещивания по 30 мкл раствора лизоцима (Sigma; 20 мг/мл в стерильной дистиллированной воде). Смеси инкубировали 60 мин при 37°C.

Для выделения суммарной ДНК (хромосома и эндогенные плазмиды *Synechocystis*) клетки лизировали добавлением с мягким перемешиванием 100 мкл 10% раствора SDS и 100 мкл 5 М раствора NaCl. Лизат инкубировали 60 мин при 65°C и остужали на столе до комнатной температуры.

Для выделения плазмид клетки лизировали добавлением с мягким перемешиванием 600 мкл щелочного раствора: 0,2 М NaOH, 1% SDS. После 5 мин инкубации на столе смесь нейтрализовали добавлением 600 мкл 5 М ацетата калия (pH 4,8), центрифугировали 15 мин при 12000g и отбирали супернатант («осветленный» лизат).

Лизаты депротеинизировали равной по объему смесью фенола, хлороформа и изоамилового спирта (25:24:1; Sigma), насыщенной раствором 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 1 мМ

Na_2EDTA – 5 мин мягко перемешивали до образования гомогенной эмульсии и центрифугировали 10 мин при 12000g. Водную фазу отбирали в стерильную пробирку и ДНК осаждали добавлением 0,6 объема изопропанола – смесь инкубировали 15 мин и центрифугировали 15 мин при 12000g. Осадки ДНК трижды промывали 0,5 мл 75% этанола (центрифугирование по 10 мин при 12000g), растворяли в 50 мкл буфера, 10 мМ Tris-HCl и 1 мМ Na_2EDTA (pH 7,5), и хранили при -20°C.

3.8.2. Полимеразная цепная реакция

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) применяли для амплификации фрагментов хромосомы *Synechocystis*, конструирования рекомбинантных молекул ДНК и проверки гомозиготности мутантов *Synechocystis*. Праймеры для ПЦР (Таблица 3.2 в конце главы 3) с заданной температурой их отжига на матричной ДНК (обычно в интервале 63-67°C) подбирали с помощью программы Clone Manager Professional (Version 9 for Windows). Для проведения ПЦР использовали *Taq*- (TrueStart™ Hot Start) или *Pfu*-ДНК-полимеразу, а также все необходимые реагенты от корпорации Thermo Fisher Scientific. Реакционные смеси объемом 25 или 50 мкл (включая ДНК-матрицу) содержали 200 мкМ дезоксинуклеозидтрифосфатов (из смеси 10 мМ dNTPs), 1,5 мМ MgCl_2 (в случае *Taq*-полимеразы) или 2 мМ MgSO_4 (в случае *Pfu*-полимеразы), по 5 пмоль специфических праймеров («прямого» и «обратного») и 0,5 единицы активности (е.а.) *Taq*-ДНК-полимеразы либо 1,25 е.а. *Pfu*-ДНК-полимеразы. В качестве матрицы использовали 100 нг суммарной ДНК *Synechocystis*, 50 пг индивидуальной плазмида, материал 1/20 объема реакции лигирования либо 20-30 нг смеси перекрывающихся фрагментов ДНК. ПЦР проводили в амплификаторе АМПЛИ-4 (ООО “КОМПАНИЯ БИОКОМ”; Москва, РФ). За исключением отдельно описанных случаев, программа ПЦР включала три стадии со следующими параметрами. Предварительная стадия – денатурация молекул ДНК при 95°C, 3 мин. Основная стадия – амплификация фрагмента ДНК – воспроизводимая в 30 циклах, включала три шага. Первый – денатурация ДНК при 95°C, 30 с; второй – отжиг праймеров при температуре от 63 до 67°C (в зависимости от длины и ГЦ-состава праймеров), 40 с; третий – полимеразная реакция при 72°C, время которой рассчитывали с учетом размера синтезируемого фрагмента ДНК и скорости синтеза *Taq*- или *Pfu*-ДНК-полимеразой (1000 пн/мин или 500 пн/мин, соответственно). Заключительная стадия ПЦР – достройка концов фрагментов ДНК в течение 8 мин при 72°C.

Амплифицированные фрагменты ДНК очищали от остальных компонентов реакции с использованием набора GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific). В некоторых

случаях специфические фрагменты ДНК выделяли с помощью элюции из агарозного геля после фракционирования продуктов ПЦР электрофорезом.

3.8.3. Гель-электрофорез ДНК и элюция ДНК из геля

Гель-электрофорез ДНК проводили в буфере, 40 мМ Tris-ацетата и 1 мМ Na₂EDTA (рН 8,4), при напряженности электрического поля 3-5 В/см в горизонтальных 0,8% или 1,2% агарозных гелях (агароза Type I Low EEO; Sigma), содержащих 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Для определения размеров линейных фрагментов ДНК в качестве стандартов использовали ДНК-маркеры GeneRuler DNA Ladder Mix или GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Гели фотографировали через оранжевый светофильтр при освещении ультрафиолетовым светом с длиной волны 254 нм.

Для выделения индивидуальных фрагментов ДНК с помощью элюции из агарозного геля использовали набор GeneJET Gel Extraction Kit, согласно инструкции компании-производителя (Thermo Fisher Scientific).

3.8.4. Модифицирующие ДНК ферменты

В экспериментах по молекулярному клонированию и конструированию рекомбинантных молекул ДНК использовали эндонуклеазы рестрикции бренда FastDigest, *Bam*HI, *Hinc*II, *Hind*III, *Nde*I, *Pae*I (изоизомер *Sph*I) и *Sma*I, а также термочувствительную щелочную фосфатазу Fast AP (Thermo Fisher Scientific). Лигирование молекул ДНК осуществляли с помощью набора Rapid DNA Ligation Kit, согласно прилагаемой инструкции (Thermo Fisher Scientific). Ферменты инактивировали прогреванием реакционных смесей в течение 10-20 мин при повышенной температуре, 65-80°C, согласно рекомендациям компании-производителя.

3.8.5. Векторы для молекулярного клонирования

Для клонирования ПЦР-фрагментов использовали коммерчески доступные плазмидные векторы pGEM-T Easy и pJet1.2/blunt (Таблица 3.1; Рисунок 3.2). Оба вектора линеаризованы по уникальному сайту *Eco*RV: pGEM-T Easy с разрывом гена *lacZ'* и модификацией 3'-концов (добавлено по одному выступающему тимидину), а pJet1.2/blunt – с разрывом гена *eco47IR*, летального для определенных штаммов *E. coli* (таких как NM522). Гены *lacZ'* и *eco47IR* экспрессируются с промотора P_{lacUV5}, индуцируемого IPTG. В первом

векторе клонировали ПЦР-фрагменты, синтезированные *Taq*-ДНК-полимеразой с выступающими 3'-концевыми дезоксиаденозинами; во втором – ПЦР-фрагменты с тупыми концами, синтезированные *Pfu*-ДНК-полимеразой. Селективным маркером обоих векторов служил ген *bla*, детерминирующий устойчивость к Ап. Рекомбинантные плазмида, производные pGEM-T Easy, отбирали в белых клонах-трансформантах *E. coli* NM522 (синие содержат вектор; «сине-белая» селекция). Такой отбор основан на нарушении явления α-комплементации дефектной β-галактозидазы, кодируемой мутантным геном *lacZΔM15* эндогенной плазмида F' [*proAB⁺* *lacI^q* *lacZΔM15*], коротким α-пептидом β-галактозидазы, кодируемым «индикаторным» геном *lacZ'* вектора. Молекулярное клонирование в векторе pJET1.2 заключалось в прямом отборе устойчивых к Ап трансформантов *E. coli* NM522, несущих рекомбинантные плазмида. Стандартная реакционная смесь для лигирования (20 мкл) содержала 50 нг вектора и фрагмент ДНК в трехкратном молярном избытке (в нг).

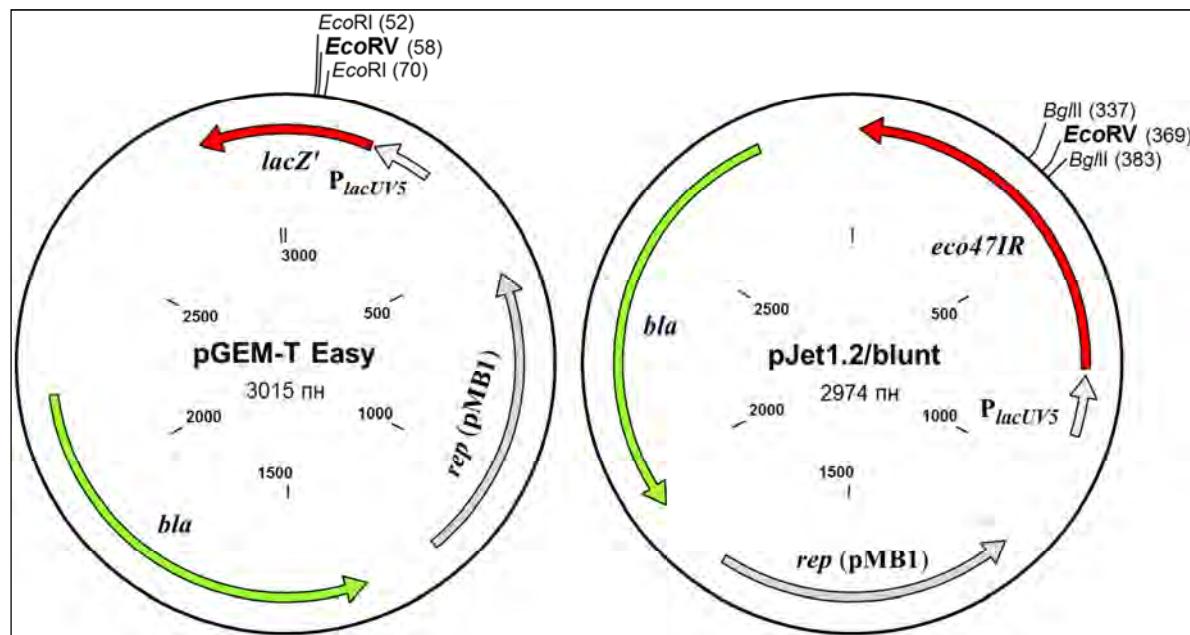


Рисунок 3.2. Физические карты векторов pGEM-T Easy (Promega; Фичберг, США) и pJet1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific). Производятся в готовой для использования линейной форме в результате разрезания по сайту *EcoRV* (выделен жирным). Показаны также сайты эндонуклеаз рестрикции, *EcoRI* в pGEM-T Easy и *BgIII* в pJet1.2/blunt, использующиеся для проверки рекомбинантных плазмид на наличие клонированного фрагмента ДНК. Пояснения в тексте.

3.8.6. Трансформация *E. coli*

Компетентные клетки *E. coli* NM522 получали с помощью модифицированного метода обработки хлоридом кальция (Sambrook *et al.*, 1989) с изменениями ряда временных и физических параметров. Аликовоту объемом 2,5 мл 18-часовойочной культуры, выращенной без активной аэрации, разводили в 50 мл среды LB и инкубировали при 37°C на магнитной мешалке (300 об/мин) в течение 90-100 мин (до OD₆₀₀ ~ 0,3-0,4 – первый из двух максимумов компетентности клеток; Tang *et al.*, 1994). Клетки осаждали центрифугированием (12 мин при 1500g и 4°C), ресуспенсировали встряхиванием (вручную, без пипетирования) в 25 мл 10 mM CaCl₂ при 4°C и осаждали, как выше указано. Клетки ресуспенсировали встряхиванием в 2,5 мл холодного (4°C) раствора 100 mM CaCl₂, инкубировали 2 часа в ледяной бане (4°C), добавляли 1,25 мл 45% глицерина (охлажденного до -20°C) и разделяли на аликовоты, которые хранили при -70°C. К 100-мкл аликовоте свежеполученной (или размороженной после хранения) суспензии компетентных клеток добавляли 10 мкл пробы лигирования ДНК (соответствует ~25 нг вектора) и смесь инкубировали 30 мин в ледяной бане. Клетки подвергали тепловому шоку при 42°C в течение 1,5 мин, охлаждали 3 мин в ледяной бане, смешивали с 0,7 мл среды LB и инкубировали 1-4 часа (в зависимости от селективного маркера; в случае размороженной суспензии – 2-6 ч) при 37°C на орбитально-качающемся шейкере (200 об/мин). Для отбора трансформантов аликовоту 100-200 мкл высевали на селективную среду.

Трансформанты, содержащие вектор pGEM-T Easy с клонированным ПЦР-фрагментом, отбирали на плотной индикаторной среде для «сине/белой» селекции колоний, в которую наряду с Ap (50 мкг/мл) вносили X-Gal (20 мкг/мл) и IPTG (0,5 mM). Белые колонии пересевали на плотную среду с Ap для последующей проверки наличия в них рекомбинантных плазмид.

Трансформанты, содержащие вектор pJet1.2/blunt со встроенным ПЦР-фрагментом, отбирали на плотной среде с Ap (50 мкг/мл) и IPTG (0,5 mM).

Для отбора трансформантов с рекомбинантными плазмидами, в которых клонированные гены инактивировали делецией и замещением удаленного участка кассетой устойчивости к антибиотику, использовали плотные селективные среды с Gm (15 мкг/мл), Km (50 мкг/мл) или Sp (50 мкг/мл).

3.9. Конструирование мутантов *Synechocystis*

Праймеры, использованные для конструирования и/или анализа сегрегации мутантов *Synechocystis*, приведены в Таблице 3.2. Все мутанты были сконструированы с помощью известных подходов направленной делеционно-инсерционной инактивации генов. Ген-мишень инактивировали удалением (делеция) определенного участка, вместо которого в роли генетического маркера встраивали (инсерция) кассету устойчивости к антибиотику (Gm^r , Km^r или Sp^r ; Таблица 3.1). Кассеты вырезали из соответствующих плазмид-доноров (Таблица 3.1) с помощью эндонуклеаз рестрикции *Hinc*II (кассеты с тупыми концами) или *Bam*HI и элюировали из гелей в виде линейных фрагментов ДНК.

3.9.1. Инактивация гена с использованием ПЦР в комбинации с лигированием и расширением перекрывания фрагментов ДНК

В данной работе подавляющая часть мутантов *Synechocystis* была сконструирована с помощью модифицированного подхода Nikawa, Kawabata (1998). Преимущество этого подхода заключается в том, что рекомбинантные молекулы ДНК для направленной инактивации генов синтезируют в серии ПЦР, комбинируемых с лигированием и расширением перекрывания фрагментов ДНК, избегая необходимости промежуточных этапов молекулярного клонирования. Суть предложенной нами модификации сводится к использованию в первых сериях ПЦР *Pfu*-ДНК-полимеразы, которая синтезирует ПЦР-фрагменты с тупыми концами. Это позволяет непосредственно лигировать ПЦР-фрагменты с тупоконечной кассетой устойчивости к антибиотику и служит условием эффективной инициации синтеза ДНК, обеспечивающего расширение перекрывания фрагментов. Принципиальная схема данного подхода представлена на Рисунке 3.3. Сначала (этап I), используя хромосому штамма WT *Synechocystis* в качестве матрицы, проводят две ПЦР с *Pfu*-ДНК-полимеразой и парами праймеров F1+R1 и F2+R2, специфичных к гену-мишени. В результате получают два фрагмента ДНК, фланкирующих будущую делецию выше и ниже нее относительно направления транскрипции гена («верхний» и «нижний» фланги делеции). Эти ПЦР-фрагменты лигируют (этап II) с *Hinc*II-кассетой устойчивости к антибиотику (Gm^r или Km^r), а затем (этап III) индивидуальные продукты лигирования амплифицируют в двух ПЦР с *Pfu*-ДНК-полимеразой и парами праймеров, F1+Rc и Fc+R2 (Rc и Fc – специфичны к кассете). Синтезированные гибридные фрагменты ДНК («верхний» и «нижний» фланги делеции, слитые с 5'-частью и 3'-частью кассеты, соответственно) перекрываются своими концами, имеющими общий для них участок кассеты между праймерами Rc и Fc.

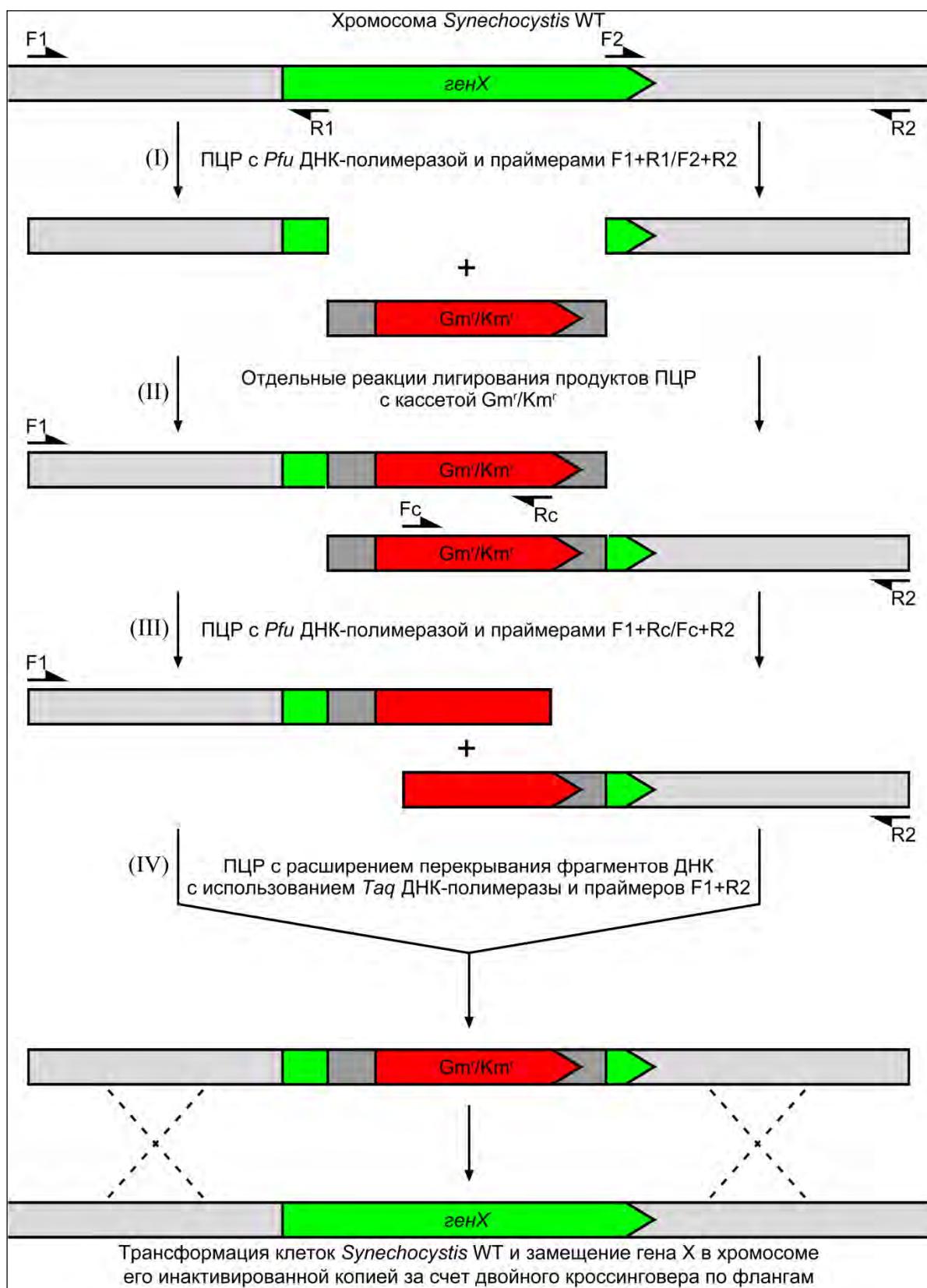


Рисунок 3.3. Схема модифицированного подхода Nikawa, Kawabata (1998) к синтезу рекомбинантных молекул ДНК для направленной инактивации генов *Synechocystis*, основанного на комбинации ПЦР с лигированием и расширением перекрывания фрагментов ДНК. Стрелки F1, R1, F2 и R2 – праймеры к гену-мишени (*генX*; зеленый); Fc и Rc – праймеры к *Hinc*II-кассете, Gm^r или Km^r (Gm^r/Km^r; красная с темно-серыми краями). Внизу – рекомбинационный механизм замещения гена мутантным аллелем в геноме. Подробности в тексте.

На заключительном этапе (IV) в ПЦР с расширением перекрывания фрагментов с использованием *Taq*-ДНК-полимеразы и наружных праймеров к гену-мишени, F1+R2, амплифицируют конечный рекомбинантный фрагмент ДНК, который содержит инактивированный ген с делецированным участком, замещенным кассетой устойчивости к антибиотику. Синтезированные таким способом рекомбинантные фрагменты ДНК клонируют в векторе pGEM-T Easy (Рисунок 3.2) с отбором трансформантов *E. coli*, устойчивых к Gm или Km, соответственно.

Ниже в качестве конкретного примера использования данного подхода описана процедура синтеза рекомбинантной молекулы ДНК для конструирования мутанта Δ exbBD1. Два ПЦР-фрагмента, представляющих «верхний» и «нижний» фланги делеции генов *exbB1-exbD1*, амплифицировали с помощью ПЦР с *Pfu*-ДНК-полимеразой и парами праймеров exbBD_F1+exbBD_R1 и exbBD_F2+exbBD_R2, соответственно. Каждый фрагмент лигировали с *HincII*-кассетой Gm^r, а затем индивидуальные продукты лигирования амплифицировали с помощью ПЦР с *Pfu*-ДНК-полимеразой и парами праймеров exbBD_F1+Gm_R и Gm_F+exbBD_R2, соответственно. Полученные гибридные ПЦР-фрагменты смешивали в эквимолярном отношении и использовали в ПЦР с расширением перекрывания фрагментов в присутствии *Taq*-ДНК-полимеразы и наружных праймеров exbBD_F1+exbBD_R2 к генам *exbB1-exbD1*. Синтезированный ПЦР-фрагмент клонировали в векторе pGEM-T Easy с получением рекомбинантной плазмида p Δ exbBD1. Аналогичным способом были сконструированы рекомбинантные плазмида p Δ fecB1, p Δ fecB2, p Δ fecB3, p Δ fecB4, p Δ fecC, p Δ fecD, p Δ fecE, p Δ fhuA1, p Δ fhuA2, p Δ fhuA3, p Δ schT и p Δ tonB, содержащие соответствующие инактивированные гены. За исключением генов *exbB1-exbD1* и *tonB*, инактивированных с использованием *HincII*-кассеты Gm^r, все остальные вышеозначенные гены были инактивированы с использованием *HincII*-кассеты Km^r.

3.9.2. Инактивация клонированного гена с использованием инверсной ПЦР и/или эндонуклеаз рестрикции

С целью инактивации генов *futB* и *futC* фрагменты генома (1567 и 1383 пн), содержащие большие участки этих генов, амплифицировали в ПЦР с использованием *Taq*-ДНК-полимеразы и соответствующих пар праймеров, futB_F+futB_R и futC_F+futC_R, а затем клонировали в векторе pGEM-T Easy. Полученные рекомбинантные плазмида использовали в качестве матриц в инверсных ПЦР с *Taq*-ДНК-полимеразой и дивергентными праймерами к инактивируемым генам, futB_Fd+futB_Rd или futC_Fd+futC_Rd, содержащими сайт узнавания *Bam*HI. При этом программа ПЦР включала вторую стадию из 5

предварительных циклов с пониженной температурой отжига праймеров (57°C) по причине их неполной комплементарности матрицам (выступающие 5'-концы с сайтом *Bam*HI). Отжиг праймеров и синтез ДНК в следующих 25 циклах основной третьей стадии проводили на одном шаге при одной температуре – 72°C. Синтезированные ПЦР-фрагменты (4,56 и 4,06 пн, соответственно), содержащие в себе вектор, обрабатывали рестриктазой *Bam*HI и фосфатазой Fast AP и лигировали с *Bam*HI-кассетой *Km*^r. Лигированной смесью трансформировали клетки *E. coli* NM522 с отбором трансформантов, устойчивых к *Km*. Из полученных рекомбинантных плазмид отобрали две, *pΔfutB* и *pΔfutC* (Таблица 3.1), в которых кассета *Km*^r была встроена в противоположном направлении инактивированным генам. Данную ориентацию кассеты определяли с помощью ПЦР-анализа рекомбинантных плазмид по амплификации специфических фрагментов только при следующих сочетаниях праймеров к гену и кассете: *futB_F+Km_F* или *Km_R+futB_R* (в случае *pΔfutB*), либо *futC_F+Km_F* или *Km_R+futC_R* (в случае *pΔfutC*). В итоге, в генах *futB* и *futC* были удалены участки 538-573 н и 134-479 н, соответственно. Следует отметить, что эти делеции идентичны описанным Katoh *et al.* (2001a).

Чтобы инактивировать ген *feoB*, содержащий его участок генома (2218 пн) амплифицировали с помощью ПЦР с использованием *Pfu*-ДНК-полимеразы и пары праймеров *feoB_F+feoB_R* и клонировали в векторе *pJet1.2/blunt*. Внутригенный участок (1145 пн) между сайтами эндонуклеаз рестрикции *Hinc*II и *Sma*I был замещен *Hinc*II-кассетой *Sp*^r с отбором рекомбинантной плазиды *pΔfeoB* (Таблица 3.1), отличающейся «прямой» ориентацией встроенной кассеты относительно инактивированного гена. Ориентацию кассеты в рекомбинантных плазмidaх устанавливали по результату их обработки смесью эндонуклеаз рестрикции *Hinc*II (пограничный сайт инсерции) и *Pae*I (сайт в «начале» кассеты, расположенный на 584 пн выше стартового кодона гена устойчивости к *Sp*, *aadA*). Образование фрагментов размером около 5800 и 300 пн указывало на «прямую» ориентацию кассеты (как в случае *pΔfeoB*), а фрагментов размером около 4300 и 1800 пн – на «обратную» (не отбирали).

3.9.3. Трансформация *Synechocystis* с последующим отбором мутантов

В экспоненциальной фазе роста цианобактерия *Synechocystis* обладает природной компетентностью в отношении гомологичной ДНК и трансформируется с высокой эффективностью (Grigorieva and Shestakov, 1982). Вкратце, процедура трансформации *Synechocystis*, использованная в настоящей работе, заключалась в следующем. Клетки из 1 мл трехдневной культуры осаждали центрифугированием (3 мин при 5000г и 30°C) и

ресуспенсировали в 50 мкл свежей среды. К суспензии клеток добавляли 100-300 нг (в 1-5 мкл) рекомбинантной плазмиды (каждая содержала два последовательных уникальных участка генома цианобактерии со встроенной между ними кассетой устойчивости к антибиотику). Клетки инкубировали 24 часа при 30°C и интенсивности света 20 мкмоль фотонов $m^{-2} s^{-1}$, а затем высевали на селективные среды YBG11 и YBG11(Fe600), которые содержали подходящий антибиотик в минимальной концентрации (в мкг/мл – Gm, 1; Km, 10; или Sp, 10), достаточной для подавления роста штамма-реципиента. Колонии устойчивых к антибиотику трансформантов, образующихся в результате двух актов гомологичной рекомбинации по флангам кассеты (продемонстрировано в нижней части Рисунка 3.3), отбирали через 7-10 суток инкубации в стандартных фотоавтотрофных условиях.

Поскольку каждая клетка *Synechocystis* содержит до 200 копий хромосомы (Griese *et al.*, 2012), проводили сегрегацию гомозиготных мутантных клонов с помощью последовательных пересевов отдельных колоний на селективных средах с повышающейся концентрацией соответствующего антибиотика (мкг/мл): Gm (1-5), Km (10-50) или Sp (10-50).

Для получения мутантов $\Delta exbBD1$, $\Delta fecB1$, $\Delta fecB2$, $\Delta fecB3$, $\Delta fecB4$, $\Delta fecC$, $\Delta fecD$, $\Delta fecE$, $\Delta feoB$, $\Delta fhuA1$, $\Delta fhuA2$, $\Delta fhuA3$, $\Delta futB$, $\Delta futC$, $\Delta schT$ и $\Delta tonB$ использовали штамм WT *Synechocystis*, который трансформировали соответствующими рекомбинантными плазмидами (вышеописанными p $\Delta exbBD1$, p $\Delta fecB1$, p $\Delta fecB2$ и т.д.). Комбинированные тройные мутанты $\Delta tonB-exbB/\Delta futB$ и $\Delta tonB-exbB/\Delta futC$ были сконструированы на основе ранее полученного в нашей лаборатории мутанта $\Delta tonB-exbB$ с использованием для его трансформации плазмид p $\Delta futB$ и p $\Delta futC$, соответственно. Все сконструированные в данной работе мутанты были успешно доведены до гомозиготного состояния, стабильно сохранявшегося в неселективных условиях (в отсутствие антибиотика). Сегрегацию мутантов проверяли с помощью ПЦР-анализа выделенной из них ДНК; в каждом случае критерием гомозиготности мутанта служило отсутствие ПЦР-фрагмента, специфичного для хромосомы штамма WT. Данные, свидетельствующие о гомозиготности мутантов, представлены в главе 4 «Результаты».

3.10. Клонирование гена цианобактерии в векторе экспрессии

На основе вектора pVZ326 (GenBank, MG356711) была сконструирована рекомбинантная плазмида pVZ-fecB1 с конститутивно экспрессирующимся геном *fecB1* (Таблица 3.1; Рисунок 3.4) для комплементационного анализа мутантов Δ fecB1 и Δ fecE *Synechocystis*. Вектор pVZ326 представляет собой мобилизующую (Mob^+) плазмиду с широким кругом хозяев, способную эффективно передаваться из *E. coli* в цианобактерии в процессе конъюгации с участием конъюгативной плазмиды-помощника. Вектор и рекомбинантные плазмиды на его основе автономно реплицируются в клетках *Synechocystis*. Клонируемый ген встраивают в вектор pVZ326 по сайтам эндонуклеаз рестрикции *NdeI* и *HindIII* под контроль регуляторных элементов гена устойчивости к Км (*kan*).

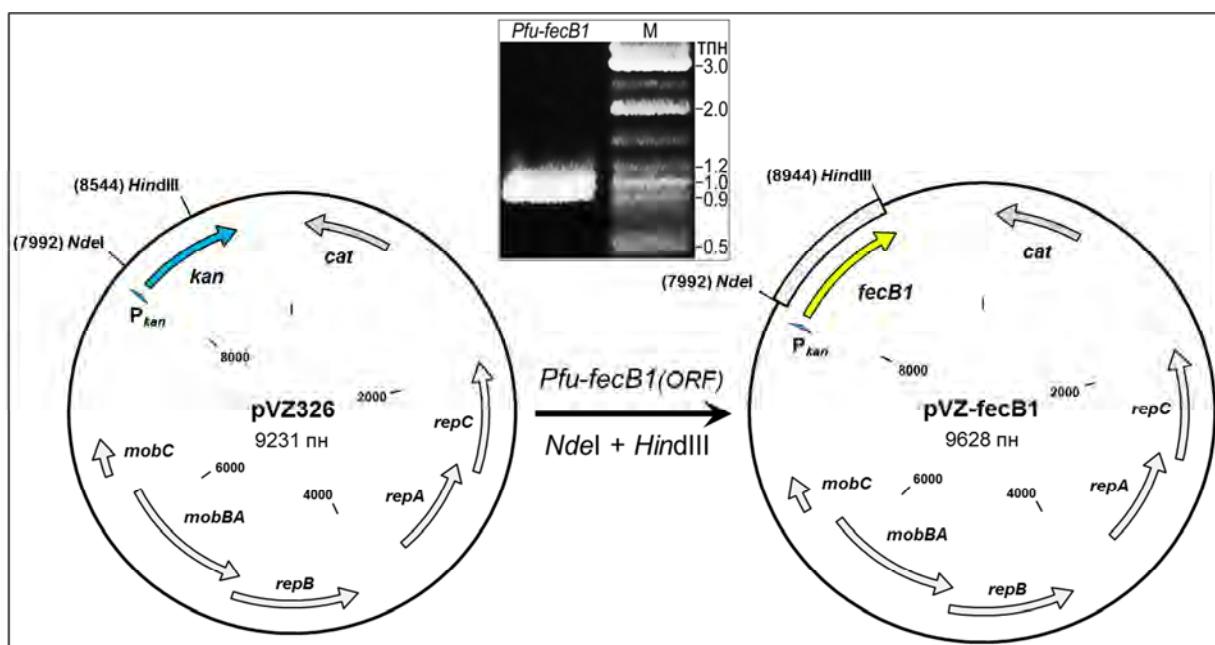


Рисунок 3.4. Схема клонирования гена *fecB1* в векторе экспрессии pVZ326. Представлены физические карты вектора и рекомбинантной плазмида pVZ-fecB1, которая содержит кодирующую последовательность гена *fecB1*, встроенную в вектор по сайтам эндонуклеаз рестрикции *NdeI* и *HindIII*. Клонированный ген экспрессируется с регуляторных элементов гена устойчивости к Км (*kan*) – промотора P_{kan} и сайта связывания рибосом (не указан). Показаны селективный маркер вектора (ген *cat*), определяющий устойчивость клеток к Ст, а также детерминанты его репликации (гены *repA* и *repC*) и конъюгационной мобилизации (гены *mobBA* и *mobC*). На фотографии-вставке представлен участок геля с фрагментом ДНК, амплифицированным с помощью *Pfu*-ДНК-полимеразы и содержащим кодирующую последовательность гена *fecB1*, *Pfu-fecB1(ORF)*. Подробности в тексте.

Представленная на Рисунке 3.4 схема клонирования гена *fecB1* в векторе экспрессии pVZ326 заключалась в следующем. Кодирующую последовательность гена *fecB1* амплифицировали в ПЦР с *Pfu*-ДНК-полимеразой и парой праймеров *fecB1_N*+*fecB1_H*

(Таблица 3.2 в конце главы 3) с использованием в качестве матрицы суммарной ДНК штамма WT *Synechocystis*. При этом программа ПЦР включала вторую стадию из 5 предварительных циклов с пониженной температурой отжига праймеров (56°C) по причине их неполной комплементарности матрице (выступающие 5'-концы с сайтом *Nde*I на одном праймере и сайтом *Hind*III на другом праймере). Температура отжига праймеров в следующих 25 циклах основной третьей стадии ПЦР была поднята до 61°C. Амплифицированный фрагмент ДНК размером 963 пн обрабатывали смесью эндонуклеаз рестрикции *Nde*I и *Hind*III и встраивали с помощью лигирования в вектор pVZ326 с заменой участка размером 551 пн между сайтами *Nde*I и *Hind*III в гене *kan*. Трансформанты штамма *E. coli* NM522, содержащие рекомбинантную плазмиду pVZ-fecB1, отбирали по фенотипу устойчивости к Сm (маркер вектора) и чувствительности к Km (негативная селекция рекомбинантной плазмиды) с помощью параллельных отпечатков индивидуальных клонов игольчатым репликатором на плотной среде с Сm (20 мкг/мл) и плотной среде с Km (50 мкг/мл).

3.11. Конъюгационный перенос плазмид в клетки мутантов *Synechocystis*

Для конъюгационного переноса (мобилизации) вектора pVZ326 и рекомбинантной плазмиды pVZ-fecB1 в клетки *Synechocystis* использовали «трехродительские» скрещивания бактерий на плотной среде (Zinchenko *et al.*, 1984). Для этого к 1 мл трехдневной культуры реципиентного мутантного штамма *Synechocystis*, Δ fecB1 или Δ fecE, добавляли по 20 мкл ночных культур двух штаммов-доноров *E. coli*, один из которых содержал мобилизующую плазмиду, а другой – конъюгативную плазмиду-помощник R751 (Таблица 3.1). Клетки осаждали центрифугированием (3 мин при 5000g), ресуспенсировали в 30 мкл супернатанта и наносили на стерильный нитроцеллюлозный фильтр (диаметр пор 0,45 мкм; Millipore) на поверхности плотной среды YBG11, содержащей 5% среды LB. После 24 часов инкубации при низкой интенсивности света (2 мкмоль фотонов $m^{-2} s^{-1}$) клетки пересевали с фильтра на плотную среду YBG11, содержащую 5 мкг/мкл Сm. Через 7 суток инкубации в стандартных фотоавтотрофных условиях отбирали устойчивые к Сm колонии трансконъюгантов, производных мутантов Δ fecB1 и Δ fecE, с введенной в них векторной (pVZ326) либо рекомбинантной (pVZ-fecB1) плазмидой. Полученные штаммы-трансконъюганты, Δ fecB1(pVZ326), Δ fecB1(pVZ-fecB1), Δ fecE(pVZ326) и Δ fecE(pVZ-fecB1) (Таблица 3.1), поддерживали на среде, содержащей 7 мкг/мкл Сm.

3.12. Анализ экспрессии генов на уровне транскрипции

В данной работе с помощью метода обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР РВ) анализировали экспрессию генов *Synechocystis*, кодирующих предполагаемые белки-транспортеры сидерофоров и регуляторы транскрипции семейства AraC/XylS, в зависимости от наличия в среде железа либо ксеносидерофора, SAV или FeSK. Для этого использовали тотальную РНК, выделенную из клеток штамма WT и регуляторных мутантов Δ pchR1, Δ pchR2 и Δ pcrR *Synechocystis* (Таблица 3.1), отмытых от железа, а затем инкубированных в течение 72 часов в средах YBG11, YBG11-Fe или YBG11-Fe с добавлением 10 мкМ ксеносидерофора.

3.12.1. Выделение тотальной РНК из клеток *Synechocystis*

Тотальную РНК экстрагировали из разрушенных в жидким азоте клеток с использованием раствора гуанидина тиоцианата в кислом феноле (реагент TRIzol; Invitrogen/Thermo Fisher Scientific) с добавлением хлороформа (Chomczynski, Sacchi, 1987). Вкратце, процедура заключалась в следующем. Для остановки клеточного метаболизма 25 мл культуры смешивали с 25 мл колотого льда и клетки осаждали центрифугированием (12 мин при 3000g и 4°C). Осадок ресуспензировали в 0,2 мл реагента TRIzol. Суспензию клеток переносили в фарфоровую ступку, замораживали жидким азотом и растирали пестиком до порошкообразной массы. К разрушенным клеткам добавляли 1 мл реагента TRIzol, содержимое ступки тщательно перемешивали и оставляли до полного оттаивания. Аликвоту объемом 1 мл полученного лизата смешивали с 0,2 мл хлороформа в 1,5-мл центрифужной пробирке, интенсивно встряхивали 15 с и центрифугировали (15 мин при 12000g и 4°C). Водную фазу (~ 0,5 мл), содержащую РНК, отбирали в новую центрифужную пробирку и смешивали с 0,5 мл изопропанола; смесь инкубировали 30 мин при -20°C и преципитат РНК осаждали центрифугированием (15 мин при 10000g и 4°C). Осадок РНК промывали 3 порциями по 0,5 мл 75% этанола (центрифугирование по 5 мин при 10000g), подсушивали 2 мин на воздухе и растворяли в 50 мкл стерильной деионизированной воды, обработанной диэтилпирокарбонатом.

3.12.2. Реакция обратной транскрипции (синтез первой цепи кДНК)

Пробы по 1 мкг каждого образца РНК обрабатывали ДНКазой I без РНКаз (Thermo Fisher Scientific), согласно прилагаемой инструкции. Из обработанных проб отбирали

аликвоты, содержащие 100 нг РНК, которые разводили в 20 мкл стерильной воды и частями по 3 мкл (15 нг) подвергали контрольной проверке на отсутствие ДНК с помощью рутинных ПЦР из 30 циклов с *Taq*-ДНК-полимеразой и праймерами, предназначенными для ОТ-ПЦР РВ (Таблица 3.2 в конце главы 3). Остатки проб (по 900 нг РНК) использовали для проведения реакции ОТ со случайным гексамерным праймером и реагентами RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, включая ревертазу M-MuLV (Thermo Fisher Scientific), согласно прилагаемой инструкции. Реакционные смеси, содержащие синтезированные кДНК, разводили стерильной десионизированной водой до 200 мкл и аликвоты по 3 мкл использовали для ПЦР РВ.

3.12.3. ПЦР в реальном времени

Относительное содержание транскриптов (относительный уровень экспрессии) генов *Synechocystis* оценивали с помощью системы MiniOpticon CFB-3120 (Bio-Rad Laboratories, Inc; Геркулес, США) для проведения ПЦР РВ и регистрации амплификации продуктов ПЦР по интенсивности флуоресценции красителя, такого как SYBR Green I, специфичного к двухцепочечной ДНК. Система состояла из прибора-амплификатора MiniOpticon MJ Mini и программного обеспечения Opticon Monitor 3.1, управляющего всеми операциями системы, в том числе, анализом относительных выражений экспрессии гена в сравнении с экспрессией референсного гена. В качестве последнего был выбран ген *rpoA* (*sll1818*), кодирующий α-субъединицу РНК-полимеразы *Synechocystis*, уровень транскрипции которого не был подвержен значительным изменениям в течение 72 часов голодания клеток по железу (Hernández-Prieto *et al.*, 2012; Kopf *et al.*, 2014).

Праймеры для ПЦР РВ (Таблица 3.2) подбирали с помощью программы Clone Manager Professional (Version 9 for Windows), согласно двум основным требованиям: температура отжига праймеров – 63°C; амплифицируемый участок гена – 180-200 пн. Пробы ПЦР, по 25 мкл в трех технических повторностях, готовили сериями, представляющими индивидуальные сочетания определенного образца кДНК с праймерами к анализируемым генам, включая референсный. Половину объема проб составляла готовая реакционная смесь Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), содержащая *Taq*-ДНК-полимеразу «с горячим стартом» и флуоресцентный краситель SYBR Green I (Thermo Fisher Scientific). Программа ПЦР РВ состояла из 1 цикла денатурации ДНК в течение 3 мин при 95°C и 35 циклов амплификации, включающих 3 шага: (1) денатурация ДНК в течение 30 с при 95°C, (2) отжиг праймеров в течение 40 с при 63°C и (3) синтез ДНК в течение 30 с при 72°C с одновременной детекцией флуоресценции красителя в комплексе с ДНК. Относительные

уровни экспрессии генов рассчитывали с помощью программного обеспечения Opticon Monitor 3.1 на основе вычислений эффективности ПЦР и разницы значений C_T в опытных и соответствующих референсных пробах (значения числа циклов амплификации до пересечения пороговой линии экспоненциального роста кривыми интенсивности флуоресценции; метод ΔC_T). Специфичность амплификации ДНК контролировали с использованием опции «анализ кривой плавления» во всех пробах.

В конечном счете, уровни экспрессии исследуемых генов в различных условиях у определенного штамма (в сравнении с референсным геном *groA*) представляли их отношениями к соответствующим уровням экспрессии в присутствии железа у штамма WT (базовые уровни, принимаемые за 1). Каждый эксперимент проводили в двух-трех независимых повторах.

Таблица 3.2. ПЦР-праймеры для конструирования и/или анализа мутантов *Synechocystis*

Праймер	Последовательность (5'→3')	Предназначение (примечание)	Мутант или ген, или кассета
exbBD_F1	CCCGTGGATTAACAAGGAACAG	Конструирование мутанта и проверка его сегрегации	
exbBD_R1	TAGGCACGCTCGATAATCAGG		
exbBD_F2	GGATGGTGTACGCCAAATCAAGG	Конструирование мутанта	ΔexbBD1
exbBD_R2	TATCAACGCCCGTCACCGTAATG		
exbBD_R3	GGCAAAGAGGAGAGTGGCAATGGC	Проверка сегрегации мутанта	
fecB1_F1	CAACCGCCCTTTGATAGCC	Конструирование мутанта и проверка его сегрегации	
fecB1_R1	ACCAAATAGCACCAGGCAGAAAG		
fecB1_F2	CGCCCACCTGCTACTAGATG	Конструирование мутанта	ΔfecB1
fecB1_R2	CGAAATTGACCGCTTGAACACC	Конструирование мутанта и проверка его сегрегации	
fecB1_N	<u>GAGACATATGAAAAGTAAACTAATAATT</u> TTACTTT	Клонирование гена для комплементационного анализа мутантов ΔfecB1 и ΔfecE	
fecB1_H	CTCT <u>AAGCTT</u> AGGCTCTAAATGTCGTTC		fecB1
fecB1_RT-f	CCGGAGATCCTTACTACGAA		
fecB1_RT-r	CCGCTTCGGCTCTGTCA	Анализ экспрессии (ОТ-ПЦР РВ)	
fecB2_F1	GGCGAATTATGGACGACCTATG	Конструирование мутанта и проверка его сегрегации	
fecB2_R1	ATGCTCAATTATCCGGCAACC		
fecB2_F2	TCTTACCAAGGAGCAGGTACATC	Конструирование мутанта	ΔfecB2
fecB2_R2	GAAAGCGTTCCCTGTCCAAG	Конструирование мутанта и проверка его сегрегации	
fecB3_F1	TAACTCGGCCAGTTGTGGTC	Конструирование мутанта и проверка его сегрегации	
fecB3_R1	ACGACCCGATCTGTGCATTC		
fecB3_F2	CAGCGGACTGGGTATTGGATG	Конструирование мутанта	ΔfecB3
fecB3_R2	AAAGGGCGGCTCCATCTAAGG	Конструирование мутанта и проверка его сегрегации	
fecB4_F1	GCCCAGTTAGAACGCTGGAC	Конструирование мутанта и проверка его сегрегации	
fecB4_R1	TACTGCTTCCCGTTGAGAGG		
fecB4_F2	TCGCCGCTAATGCCATCCTC	Конструирование мутанта	ΔfecB4
fecB4_R2	GGGAGTTGTAGGCTGGAACC	Конструирование мутанта и проверка его сегрегации	
fecC_F1	TAGTGCAACCCGTGAATCGAG	Конструирование мутанта и проверка его сегрегации	
fecC_R1	AGAAAGGGCACGGATTTAGG		
fecC_F2	GTGGGCATTATGACTGCTTGG	Конструирование мутанта	ΔfecC
fecC_R2	GGCAGCAAGGAAGGAGAAATAC	Конструирование мутанта и проверка его сегрегации	

Продолжение Таблицы 3.2.

Праймер	Последовательность (5'→3')	Предназначение (примечание)	Мутант или ген, или кассета
fecD_F1	GAAGAAGTGGCCCAGGGATTAG	Конструирование мутанта и проверка его сегрегации	
fecD_R1	ATCGAGGCGAAACGATAGGG	Конструирование мутанта	ΔfecD
fecD_F2	ACTGGAGCCTGCATTACAGAAC	Конструирование мутанта и проверка его сегрегации	
fecD_R2	AGTGAGGGCAATGGGAGTGG	Конструирование мутанта и проверка его сегрегации	
fecE_F1	ACTGGAGCCTGCATTACAGAAC	Конструирование мутанта и проверка его сегрегации	
fecE_R1	AGTGAGGGCAATGGGAGTGG	Конструирование мутанта	ΔfecE
fecE_F2	ACTGGAGAGCCGCATCATCG	Конструирование мутанта и проверка его сегрегации	
fecE_R2	AAGGGCCTGCCATAAAGAC	Конструирование мутанта и проверка его сегрегации	
feoB_F	AGCAATGCTCCCAGCATCTGTC	Клонирование гена	feoB
feoB_R	AAATAGCCAGGCCGTTACCAAGG		
feoB_Fn	GGGCAGCCCAATACAGGTAAATC	Проверка сегрегации мутанта	ΔfeoB
feoB_Rn	ACAAACTCCCGCATTCTCCC		
fhuA1_F1	CCTCCTCCTTGGCACAGTTATC	Конструирование мутанта и проверка его сегрегации	
fhuA1_R1	AAACGGCGAGCGAAGTCTG		
fhuA1_F2	GGCGAATTATGGACGACCTATG	Конструирование мутанта	ΔfhuA1
fhuA1_R2	ATGCTCAATTATCCGGCAACC		
fhuA1_R3	GGTGACAATGGGAGCGTAGG	Проверка сегрегации мутанта	
fhuA1_RT-f	GTCAAATAACCGCCGTACAG	Анализ экспрессии (ОТ-ПЦР PB)	fhuA1
fhuA1_RT-r	CTTCTTCTCTGGGTAGCA		
fhuA2_F1	CACGGAAAGCAAGCCCAATC	Конструирование мутанта и проверка его сегрегации	
fhuA2_R1	ACCAAGATGGAGCCAACTTGAG		
fhuA2_F2	GGGCTCCCTTACGGTAGTAG	Конструирование мутанта	ΔfhuA2
fhuA2_R2	CTGATTGCTTACCGTCCATTCC		
fhuA2_R3	CAGCCGCATTGTAATAGGGTTC	Проверка сегрегации мутанта	
fhuA2_RT-f	GGTGACGGGCCTTGATAATA	Анализ экспрессии (ОТ-ПЦР PB)	fhuA2
fhuA2_RT-r	GAAGCACTGGGCACAAAGTA		
fhuA3_F1	TGCCTCTGTAACCCACCTTC	Конструирование мутанта и проверка его сегрегации	
fhuA3_R1	GCCCTGGGAGCACATAGTAG		
fhuA3_F2	TAACTCGGCCAGTTGTGGTC	Конструирование мутанта	ΔfhuA3
fhuA3_R2	ACGACCCGATCTGTGCATTCC		
fhuA3_R3	CCACCGCATAGCCTTCATCC	Проверка сегрегации мутанта	
fhuA3_RT-f	GGCTGTAACAGACCCCTGAAA	Анализ экспрессии (ОТ-ПЦР PB)	fhuA3
fhuA3_RT-r	GGCTCCAGATTGTCATCCTT		

Продолжение Таблицы 3.2.

Праймер	Последовательность (5'→3')	Предназначение (примечание)	Мутант или ген, или кассета
futB_F	TCCCTGTTACGGCCTAGTGTTC	Клонирование гена <i>futB</i>	
futB_R	CAAGGTAGCGGGCAATTCCCTTC	и проверка сегрегации мутанта	Δ futB и Δ tonB- exbB/ Δ futB
futB_Fd	<u>CGGGATC</u> CTGGCAAAGTTCAGTCGGG	Конструирование мутанта	
futB_Rd	GC <u>GGATCC</u> GCAAACCTCCCTGTTCTAAAAAAGC	(инверсная ПЦР)	
futC_F	GGCCAATGCCGTAATCAG	Клонирование гена <i>futC</i>	
futC_R	AGCAGTAGCGGTATTCCCC	и проверка сегрегации мутанта	Δ futC и Δ tonB- exbB/ Δ futC
futC_Fd	<u>CGGGATC</u> CTCAACAAACAAACGCATTGCC	Конструирование мутанта	
futC_Rd	GC <u>GGATCC</u> CGCGCTAGATTAAAGTTGATTTCTGG	(инверсная ПЦР)	
pchR1_RT-f	GGAACTGTTGGCACCTCTG		
pchR1_RT-r	CCACTGTTAGGGCTGACAC	Анализ экспрессии (ОТ-ПЦР PB)	<i>pchR1</i>
pchR2_RT-f	CGCCTAGAGCAAGCTGAAAC		
pchR2_RT-r	TCAAGGTGGAGAGCCATGAG	Анализ экспрессии (ОТ-ПЦР PB)	<i>pchR2</i>
pcrR_RT-f	CCTTCCTTGGCACAGTTATC		
pcrR_RT-r	ATCCTACCCCTTGTGCTACC	Анализ экспрессии (ОТ-ПЦР PB)	<i>pcrR</i>
rpoA_RT-f	ATACATGCCAACCTAGCAG		
rpoA_RT-r	CATCGGCCGAATGTCTTCC	Анализ экспрессии (ОТ-ПЦР PB)	<i>rpoA</i>
schT_F1	CAATTACACTGTCGCCGAAGTC	Конструирование мутанта	
schT_R1	GCATAGCCATGTTCCATCAC	и проверка его сегрегации	
schT_F2	TCCAGCCCAACGAGTTGAG	Конструирование мутанта	Δ schT
schT_R2	CCGGCAGCATAACGAATCC		
schT_R3	CCTCTATCTGGCGGTTGTC	Проверка сегрегации мутанта	
schT_RT-f	CAGGTAAAGGCCATCAAAGTA		
schT_RT-r	GGGACATCGTTGGTACAAGT	Анализ экспрессии (ОТ-ПЦР PB)	<i>schT</i>
tonB_F1	TAGGCACGCTCGATAATCAGG	Конструирование мутанта	
tonB_R1	CCCGTGGATTAACAAGGAACAG	и проверка его сегрегации	
tonB_F2	AAGACCGAGGCCAGCAGTAG	Конструирование мутанта	Δ tonB
tonB_R2	CGCCGCCGTTGTATAATCC		
tonB_R3	AATTCAATCGGCTCTACGGCGGG	Проверка сегрегации мутанта	
Gm_F	CCGTGGTCGATGTTGATG	Конструирование мутантов	
Gm_R	TGTTAGGTGGCGGTACTTGG	(специфичны к кассете устойчивости к Gm)	Gm ^r
Km_F	GGCAATCAGGTGCGACAATCTATC	Конструирование мутантов	
Km_R	TGACGACTGAATCCGGTGAGAATG	(специфичны к кассете устойчивости к Km)	Km ^r

Подчеркнуты сайты узнавания эндонуклеаз рестрикций:
*Bam*HI (GGATCC), *Hind*III (AAGCTT) и *Nde*I (CATATG)

4. РЕЗУЛЬТАТЫ

4.1. TonB-зависимая утилизация дигидроксаматных ксеносидерофоров у цианобактерии *Synechocystis*

С учетом имеющейся информации о потенциальной субстратной специфичности предполагаемых транспортеров железа у *Synechocystis* (Веб-сайт CyanoBase; <http://genome.kazusa.or.jp/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 мембранны у грамотрицательных бактерий.

4.1.1. 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 4.1.А). Нами был проведен анализ сходства белков ExbB1-3, ExbD1-4 и TonB с неизбыточной базой данных белковых последовательностей нитчатой цианобактерии *Anabaena* 7120 (программа BLASTP, опция Psi-BLASTP; National Centre of Biotechnology Information, NCBI), являющейся продуcentом сидерофора шизокинина (SK) с идентифицированными компонентами системы транспорта FeSK (Stevanovic *et al.*, 2012). Проведенный анализ, результаты которого представлены в Таблице 4.1, показал, что белки ExbB1 (*Sll1404*) и ExbD1 (*Sll1405*) наиболее сходны с белками ExbB3 и ExbD3 *Anabaena* 7120, которые существенны для транспорта FeSK (Stevanovic *et al.*, 2012). Напротив, белки ExbB2 (*Slr0677*) и ExbB3 (*Sll0477*) наиболее сходны с белком ExbB1 *Anabaena* 7120, тогда как белки ExbD2 (*Slr0678*), ExbD3 (*Sll0478*) и ExbD4 (*Sll0479*) – с ExbD1 *Anabaena* 7120. Никаких экспериментальных свидетельств участия белков ExbB1 и ExbD1 *Anabaena* 7120 в утилизации железа не получено (Stevanovic *et al.*,

2012). Следует отметить, что белок TonB (Slr1484) *Synechocystis* проявляет гомологию только с одним из четырех белков TonB *Anabaena* 7120, а именно с белком TonB3, существенным для транспорта FeSK (Stevanovic *et al.*, 2012). Таким образом, данные биоинформационического анализа позволили полагать, что белковый комплекс TonB-ExbB1-ExbD1 может быть вовлечен в транспорт ксеносидерофоров у *Synechocystis*.

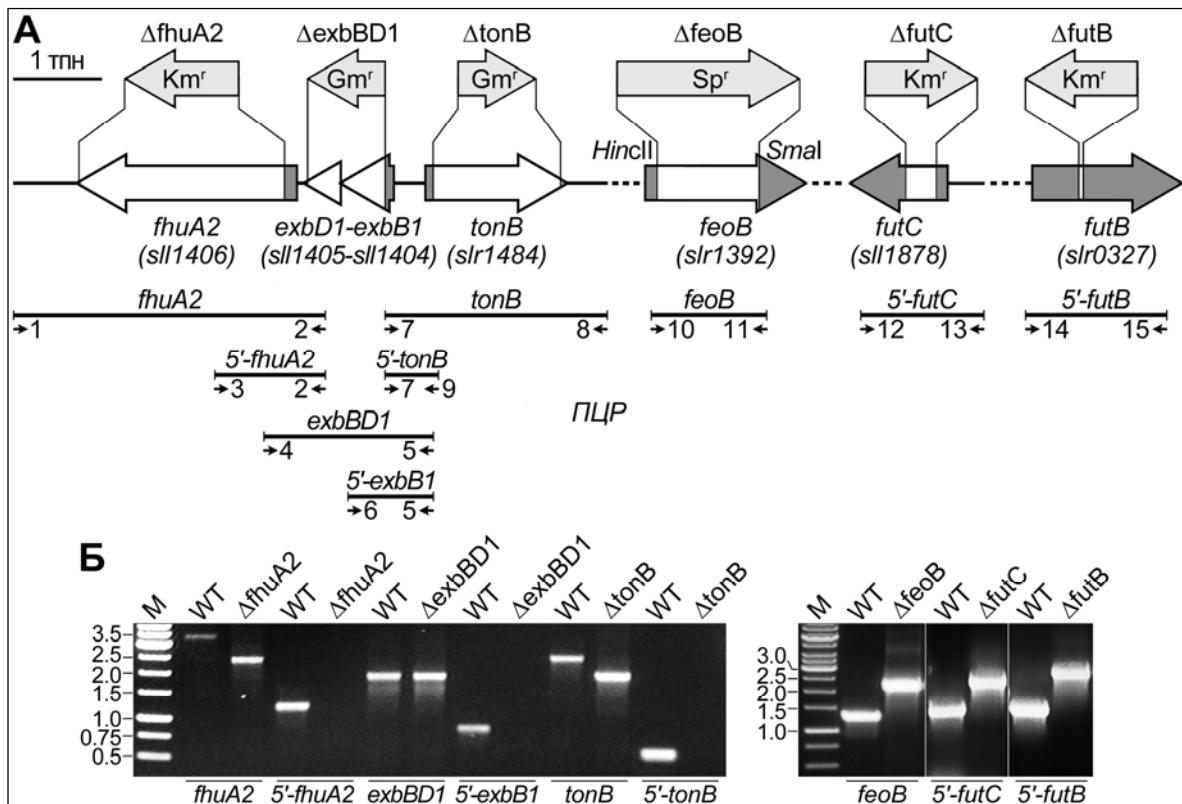


Рисунок 4.1. Конструирование и сегрегация мутантов $\Delta fhuA2$, $\Delta exbBD1$, $\Delta tonB$, $\Delta feoB$, $\Delta futC$ и $\Delta futB$ *Synechocystis*. (А) Схема делеционно-инсерционной инактивации генов *fhuA2*, *exbB1-exbD1*, *tonB*, *feoB*, *futC* и *futB*. Введенные делеции выделены белым цветом, а инсерции кассет 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 $\Delta futB$. ПЦР проводили с праймерами, указанными в части А рисунка и описанными в Таблице 3.2: (1) *fhuA2_R2*, (2) *fhuA2_F1*, (3) *fhuA2_R3*, (4) *ExbBD_R2*, (5) *ExbBD_F1*, (6) *exbBD_R3*, (7) *tonB_F1*, (8) *tonB_R2*, (9) *tonB_R3*, (10) *feoB_Fn*, (11) *feoB_Rn*, (12) *futC_R*, (13) *futC_F*, (14) *futB_F* и (15) *futB_R*. Праймеры 3, 6 и 9 специфичны к делецированным участкам генома у мутантов $\Delta fhuA2$, $\Delta exbBD1$ и $\Delta tonB$, у которых утрата ПЦР-фрагментов 5'-*fhuA2*, 5'-*exbB1* и 5'-*tonB*, амплифицируемых с парами праймеров 2/3, 6/5 и 7/9, соответственно, подтверждает отсутствие хромосомы WT. М – ДНК-маркеры указанного размера (тпн).

Таблица 4.1. Ближайшие гомологи белков ExbB1, ExbD1, ExbB2, ExbD2, ExbB3, ExbD3, ExbD4 и TonB *Synechocystis* у продуцирующей SK цианобактерии *Anabaena* 7120

Белок	Длина (ао)	Белок-гомолог <i>Anabaena</i> 7120	Общий счет (бит)	Покрытие белка (%)	Значение E	Идентичность (%)
ExbB1	210	ExbB3	196	91	$2 e^{-64}$	64
ExbD1	142	ExbD3	115	90	$6 e^{-35}$	48
ExbB2	227	ExbB1	200	89	$2 e^{-65}$	62
ExbD2	269	ExbD1	144	64	$2 e^{-43}$	46
ExbB3	254	ExbB1	155	85	$2 e^{-47}$	50
ExbD3	147	ExbD1	53	78	$8 e^{-10}$	25
ExbD4	150	ExbD1	53	87	$8 e^{-10}$	29
TonB	532	TonB3*	94	68	$1 e^{-09}$	28

*Единственный из четырех белков TonB *Anabaena* 7120, проявивший значимое сходство с белком TonB *Synechocystis*. Представлены данные по выравниванию аминокислотных последовательностей белков с использованием программы BLASTP/Psi-BLASTP (NCBI).

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 3 «Материалы и Методы». Ранее сообщалось, что инактивация этих генов приводит к пониженному росту клеток в условиях голодаания 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 4.1.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 Δ tonB и Δ exbBD1, отобранные на плотной селективной среде YBG11(Fe600).

4.1.2. Инактивация генов кластера *tonB-exbB1D1* не влияет на рост *Synechocystis* в обедненной железом среде

Согласно литературным данным, все три белковых комплекса ExbBD вовлечены в утилизацию свободного железа у *Synechocystis*, и при этом каждый обладает частично избыточной функцией (Jiang *et al.*, 2012, 2015). Мутанты, дефектные по любому из трех геновых кластеров *exbBD*, демонстрировали значительно пониженные скорости роста клеток и поглощения клетками свободного железа (в опытах с радиоактивным изотопом) при его недостатке в среде BG11-Fe. Более того, такой фенотип одиночных мутантов Δ exbBD усиливался у двойных мутантов, а тройной мутант был нежизнеспособным. Эти данные привели к заключению, что три избыточных кластера *exbBD* вносят значительный вклад в генетический контроль поглощения железа у *Synechocystis*. Инактивация гена *tonB* тоже приводила к значительному понижению роста в условиях голодания по железу; однако, скорость поглощения свободного железа понижалась умеренно. Такой фенотип авторы объяснили наличием у *Synechocystis* других, не идентифицированных белков (Jiang *et al.*, 2012, 2015), хотя в свете современных достижений сравнительной геномики это представляется маловероятным.

Среда BG11 содержит лимонноаммонийное железо, и поскольку в BG11-Fe вместо него добавляли эквимолярное количество цитрата аммония (12 мкМ), нельзя было исключать, что вышеописанный фенотип мутантов Δ tonB и Δ exbBD (Jiang *et al.*, 2012, 2015) обусловлен нарушением транспорта органического железа. В связи с этим был исследован рост штамма WT и сконструированных нами мутантов Δ tonB и Δ exbBD1 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).

Вопреки ожиданию, нами не выявлено каких-либо фенотипических различий между штаммом WT и мутантами Δ tonB и Δ exbBD1 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 4.2.А и Б). Идентичный фенотип голодания по железу у всех сравниваемых штаммов был подтвержден спектральным анализом (Рисунок 4.2.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). При этом спектры клеток в средах другого типа, YBG11 или YBG11-Fe, ничем не отличались от спектров клеток в средах BG11 или BG11-Fe, соответственно (не показано). Как видно из Рисунка 4.2.В, у клеток, растущих в обедненной железом среде (BG11-Fe), содержание хлорофилла *a* и фикоцианина существенно снижалось (уменьшение пиков), а красный пик хлорофилла сдвигался в сторону коротких волн света (с 680 до 673 нм на 4 день и до 671 нм на 7 день роста). Указанные изменения являются типичными для голодающих по железу цианобактерий (Odom *et al.*, 1993). Известно, что характерный сдвиг пика хлорофилла обусловлен связыванием этого пигмента с белком IsiA, обильно синтезирующимся при недостатке железа и являющимся индикатором развития стрессового ответа клеток на голодание по железу (Bibby *et al.*, 2001; Boekema *et al.*, 2001).

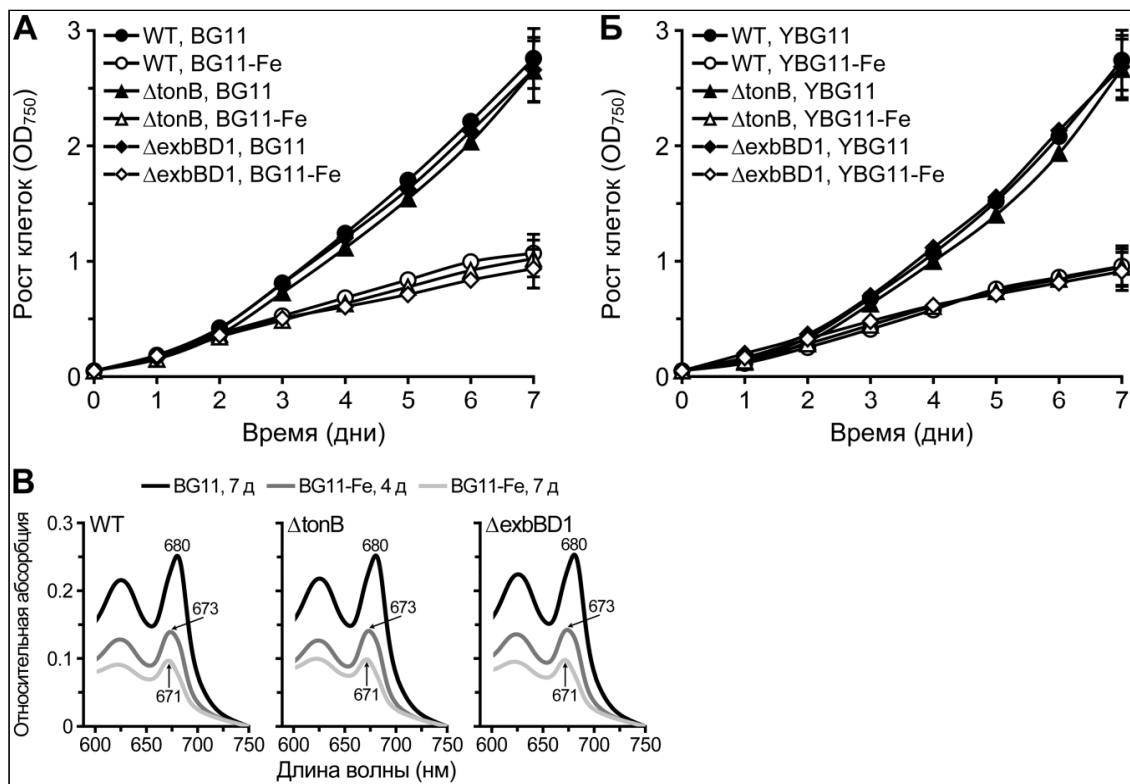


Рисунок 4.2. Кинетика роста и спектральные характеристики клеток штамма WT и мутантов Δ tonB и Δ exbBD1 *Synechocystis* в зависимости от наличия или отсутствия железа в среде. Отмытые от железа клетки засевали до $OD_{750} \sim 0,05$ в среды указанного состава и выращивали в стандартных фотоавтотрофных 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. Для удобства представления данных планки погрешностей (стандартные отклонения средних значений OD_{750} из трех независимых повторов) приведены только для 7-дневных культур. (В) Длинноволновые (600-750 нм) участки спектров клеток культур штамма WT и мутантов Δ tonB и Δ exbBD1 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).

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

4.1.3. 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 в наружной мембране (Kaneko *et al.*, 1996; Katoh *et al.*, 2001a). К данному типу сидерофоров относятся FCH и FOB, которые утилизируются в качестве ксеносидерофоров, например, грамотрицательной бактерией *Sinorhizobium meliloti* 2011. С помощью анализа ее генома *in silico* идентифицировали гены *fhuA1* и *fhuA2*, а с помощью направленной инактивации выявили существенную роль этих генов в утилизации FCH и FOB, соответственно (Ó Cuív *et al.*, 2008). Приведенная информация указывала на возможность использования клетками *Synechocystis* тригидроксаматных ксеносидерофоров FCH и FOB в качестве источников железа. С другой стороны, существовали данные, частично опровергавшие это предположение. Так, несмотря на способность *Synechocystis* поглощать Fe(III) из FOB за счет его восстановления (опыты с радиоактивным изотопом; Kranzler *et al.*, 2011), в целом FOB не удовлетворял потребность клеток в железе (Lis *et al.*, 2015a). Более того, добавляемый в десферри-форме (DFOB) к культурам *Synechocystis* в стандартной среде (YBG11/BG11), он играл роль эффективного хелатора Fe(III), позволявшего легко получать голодавшие по железу клетки для транскриптомных исследований (Hernández-Prieto *et al.*, 2012; Kopf *et al.*, 2014).

Используя FOB в качестве контрольного неутилизируемого сидерофора, мы проверили способность другого тригидроксаматного ксеносидерофора, FCH, служить единственным источником железа для *Synechocystis*. Штамм WT и мутанты Δ tonB и Δ exbBD1 росли очень медленно в обедненной железом среде YBG11-Fe, и добавление FCH или FOB не приводило к восстановлению их роста (Рисунок 4.3.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, тригидроксаматный ксеносидерофор FCH (как и FOB) не удовлетворяет потребность клеток *Synechocystis* в железе.

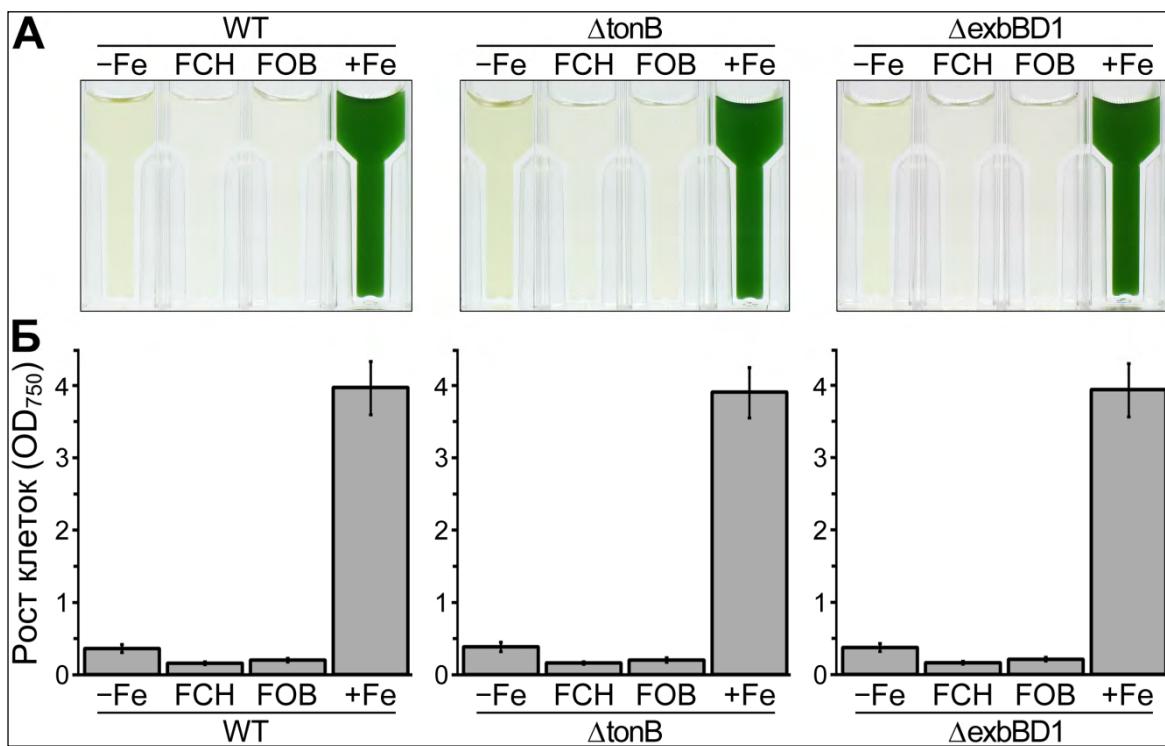


Рисунок 4.3. Рост штамма WT и мутантов Δ tonB и Δ exbBD1 *Synechocystis* в присутствии тригидроксаматных ксеносидерофоров, FCH или FOB, в качестве единственных источников железа. Голодающие по железу клетки разводили до OD₇₅₀ ~ 0,05 в средах указанного состава и 4-мл культуры инкубировали в 20-мл пробирках в стандартных фотоавтотрофных условиях без активной аэрации в течение девяти дней. (А) Фотография и (Б) соответствующие конечные OD₇₅₀ культур, выращенных в среде YBG11-Fe (-Fe) или в среде YBG11-Fe, содержащей FCH (10 мкМ DFCH/7,5 мкМ FeCl₃) либо FOB (10 мкМ DFOB/7,5 мкМ FeCl₃). Положительный контроль – культуры в среде YBG11 (+Fe). Показаны средние значения и стандартные отклонения в трех независимых экспериментах.

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

Дигидроксаматные сидерофоры SK и SAV могут синтезироваться и секретироваться в окружающую среду нитчатыми диазотрофными цианобактериями рода *Anabaena*. Продуцентами SK являются *Anabaena* sp. PCC 6411 (Simpson and Neilands, 1976) и *Anabaena* 7120 (Goldman *et al.*, 1983), тогда как единственным известным продуцентом SAV – *A. variabilis* (Trick and Kerry, 1992). Химическая структура SAV не идентифицирована; однако, показано, что по молекулярной массе он занимает промежуточное положение между сидерофорами SK и AB с известной структурой (Trick and Kerry, 1992). Следует отметить, что продуцентами AB являются *Aerobacter aerogenes* (*Klebsiella pneumoniae*) 62-1 (Gibson and Magrath, 1969), различные, в основном патогенные, штаммы *E. coli* (см. обзор Miethke and Marahiel, 2007), а также морская бактерия *Vibrio* sp. DS40M5 (Haygood *et al.*, 1993).

Нами была исследована утилизация FeSK и структурно родственных сидерофоров SAV и FeAB клетками *Synechocystis*. Как уже было отмечено выше (см. Рисунок 4.3), 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 4.4.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 4.4.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. Примечательно, что рост штамма WT в присутствии FeAB, как и рост обоих мутантов в присутствии любого из трех ксеносидерофоров, был медленнее, чем в обедненной железом среде. Тот же феномен наблюдали у всех трех указанных штаммов при добавлении тригидроксаматных ксеносидерофоров FOB и FCH в обедненную железом среду (Рисунок 4.3). Такой ингибиторный эффект сидерофоров является незначительным, но воспроизводимым, и может объясняться адсорбцией остаточного свободного железа в среде ксеносидерофорами, не использующимися клетками цианобактерии.

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 4.1) 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.

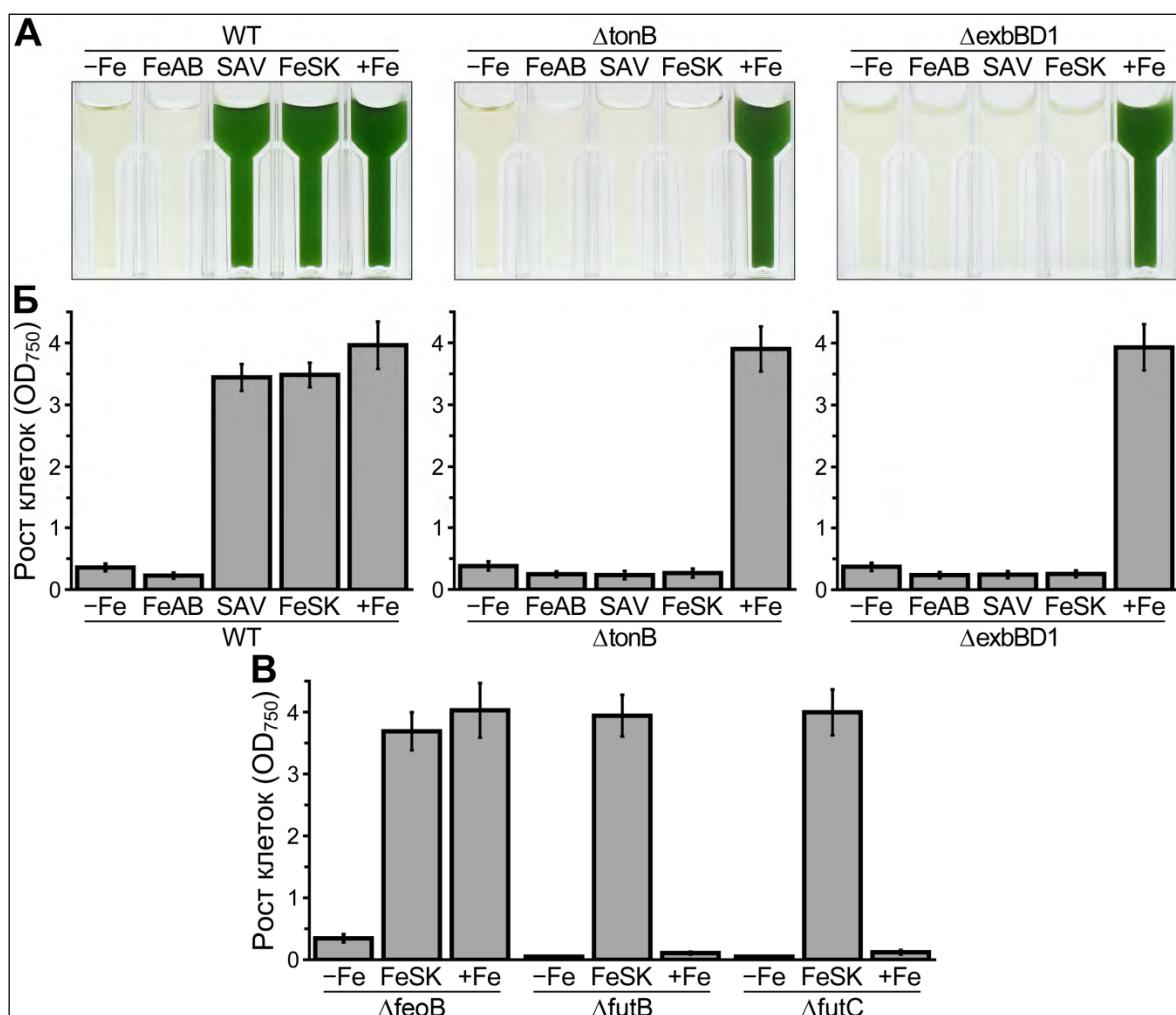


Рисунок 4.4. Рост штамма WT и мутантов Δ tonB, Δ exbBD1, Δ feoB, Δ futB и Δ futC *Synechocystis* в присутствии дигидроксаматных ксеносидерофоров в качестве единственных источников железа. Голодающие по железу клетки разводили до $OD_{750} \sim 0,05$ в средах указанного состава и 4-мл культуры инкубировали в 20-мл пробирках в стандартных фотоавтотрофных условиях без активной аэрации в течение девяти дней. (А) Фотография и (Б) соответствующие конечные OD_{750} культур штамма WT и мутантов Δ tonB и Δ 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 OD_{750} культур мутантов Δ feoB, Δ futB и Δ 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.

4.1.5. 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. Гомозиготный мутант Δ feoB был успешно сегрегирован на стандартной селективной среде, тогда как мутанты Δ futB и Δ futC были полностью сегрегированы только на обогащенной железом селективной среде YBG11(Fe600), как подтвердили результаты ПЦР-анализа (Рисунок 4.1). 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 4.4.В). Эти ростовые характеристики мутантов Δ feoB, Δ futB и Δ futC очень сходны с описанными ранее ростовыми характеристиками таких же мутантов в работе Katoh *et al.* (2001a). 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 4.4.В показан рост клеток штамма WT и мутантов Δ feoB, Δ futB и Δ futC в среде YBG11-Fe с добавлением FeSK.

Таким образом, гены *feoB*, *futB* и *futC* не являются необходимыми для утилизации дигидроксаматных ксеносидерофоров FeSK и SAV клетками *Synechocystis*.

4.1.6. Раздельные пути утилизации свободного и связанного с сидерофорами железа с участием транспортных систем *FutABC* и *TonB-ExbB1-ExbD1* у *Synechocystis*

Главную роль в переносе ионов окисного железа через внутреннюю мембрану клеток *Synechocystis* в фотоавтотрофных условиях играет транспортер ABC-типа, *FutABC* (Katoh *et al.*, 2001a). Как показано нами в предшествующем подразделе работы (4.1.5), транспортер *FutABC* не является существенным для утилизации ксеносидерофоров FeSK и SAV в качестве единственных источников железа; для этого необходим белковый комплекс *TonB-ExbB1-ExbD1*, гомологи которого у грамотрицательных бактерий обеспечивают энергией транспорт веществ через наружную мембрану. Вместе с тем, как выше было отмечено, существуют указания на участие комплекса *TonB-ExbB1-ExbD1* в поглощении свободного железа у *Synechocystis* (Jiang *et al.*, 2012, 2015).

Для получения исчерпывающей информации о роли и возможном взаимодействии систем *FutABC* и *TonB-ExbB1-ExbD1* в утилизации различных форм окисного железа у *Synechocystis* были сконструированы гомозиготные мутанты Δ *tonB-exbB/ΔfutB* и Δ *tonB-exbB/ΔfutC* (Рисунок 4.5). У них нарушены все белки комплекса *TonB-ExbB1-ExbD1* (третий белок – вследствие полярного эффекта инсерции в инактивированном гене *exbB1* на экспрессию гена *exbD1*), а также пермеазный (*FutB*), либо АТФ-азный (*FutC*) компоненты транспортера *FutABC*. Эти мутанты получены на основе мутанта Δ *tonB-exbB* из коллекции нашей лаборатории (глава 3 «Материалы и Методы»), идентичного мутантам Δ *tonB* и Δ *exbBD1* по выявленному у них фенотипу. Как и в случае одиночных мутантов Δ *futB* и Δ *futC* (подраздел 4.1.5), мы не смогли сегрегировать комбинированные мутанты Δ *tonB-exbB/ΔfutB* и Δ *tonB-exbB/ΔfutC*, гомозиготные по мутантным аллелям *futB* либо *futC*, на селективной среде YBG11. Это удалось нам осуществить только на обогащенной железом селективной среде YBG11(Fe600). Гомозиготные мутанты Δ *futB*, Δ *futC*, Δ *tonB-exbB/ΔfutB* и Δ *tonB-exbB/ΔfutC* оказались не способны формировать колонии и рости сплошным газоном не только на плотной среде YBG11-Fe, но и на плотной стандартной YBG11, содержащей 6 мкМ FeCl₃ (Рисунок 4.6.А и Б). Они формировали отдельные колонии на среде BG11 с 25 мкМ лимонно-аммонийного железа (Stanier *et al.*, 1971), но заметно меньшего размера, чем у штаммов WT и Δ *tonB-exbB*. При росте на этой среде сплошным газоном у них проявлялся выраженный хлороз, обусловленный голоданием по железу из-за большой плотности клеток (OD₇₅₀ = 0,1) (Рисунок 4.6.В). Только на обогащенной железом среде YBG11(Fe600) мутанты Δ *futB*, Δ *futC*, Δ *tonB-exbB/ΔfutB* и Δ *tonB-exbB/ΔfutC* слабо отличались по росту от штаммов WT и Δ *tonB-exbB* (Рисунок 4.6.Г). Следует отметить, что гомозиготные мутанты Δ *futB*, Δ *futC* и Δ *futB/ΔfutC*, сконструированные Katoh *et al.* (2001a), были выделены на среде BG11

с 25 мкМ лимонно-аммонийного железа (Stanier *et al.*, 1971). Поэтому неудачные попытки полной сегрегации мутанта Δ futB и его производных в работе Xu *et al.* (2016) могли быть связаны с использованием авторами модификации среды BG11, содержащей в два раза меньшую концентрацию (12 мкМ) лимонно-аммонийного железа (Rippka *et al.*, 1979). В целом, полученные нами результаты согласуются с опубликованными данными (Katoh *et al.*, 2001a) и еще раз свидетельствуют о критической роли транспортера FutABC в утилизации неорганического окисного железа клетками *Synechocystis*.

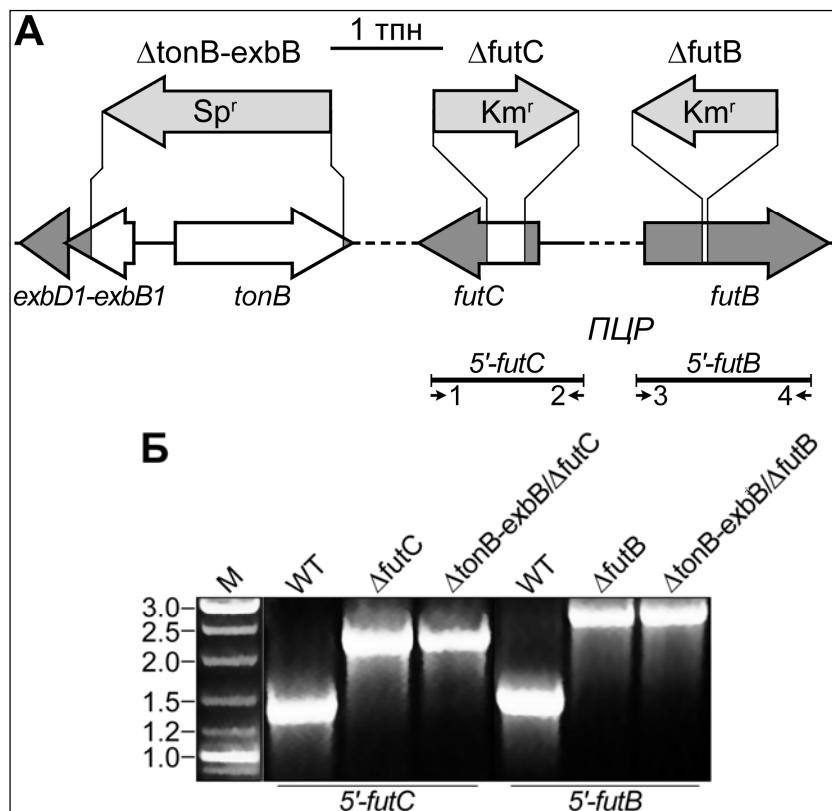


Рисунок 4.5. Конструирование и сегрегация мутантов Δ tonB-exbB/ Δ futC и Δ tonB-exbB/ Δ futB *Synechocystis*. (А) Схема делеционно-инсерционной инактивации генов *tonB-exbB1* у мутанта Δ tonB-exbB (ранее полученного в нашей лаборатории), а также генов *futC* и *futB* у сконструированных на его основе мутантов Δ tonB-exbB/ Δ futC и Δ tonB-exbB/ Δ futB. Расшифровка элементов рисунка та же, что в подписи к Рисунку 4.1.А (Б) Результаты ПЦР-анализа, доказывающие гомозиготность мутантов Δ tonB-exbB/ Δ futC и Δ tonB-exbB/ Δ futB по мутантным аллелям генов *futC* и *futB*, соответственно. Для контрольного сравнения воспроизведены результаты, свидетельствующие о гомозиготности одиночных мутантов Δ futC и Δ futB (описаны выше и показаны на Рисунке 4.1). ПЦР проводили с праймерами, изображенными нумерованными стрелками в части А рисунка: (1) *futC_R*, (2) *futC_F*, (3) *futB_F* и (4) *futB_R* (Таблица 3.2). М – ДНК-маркеры (тпн).

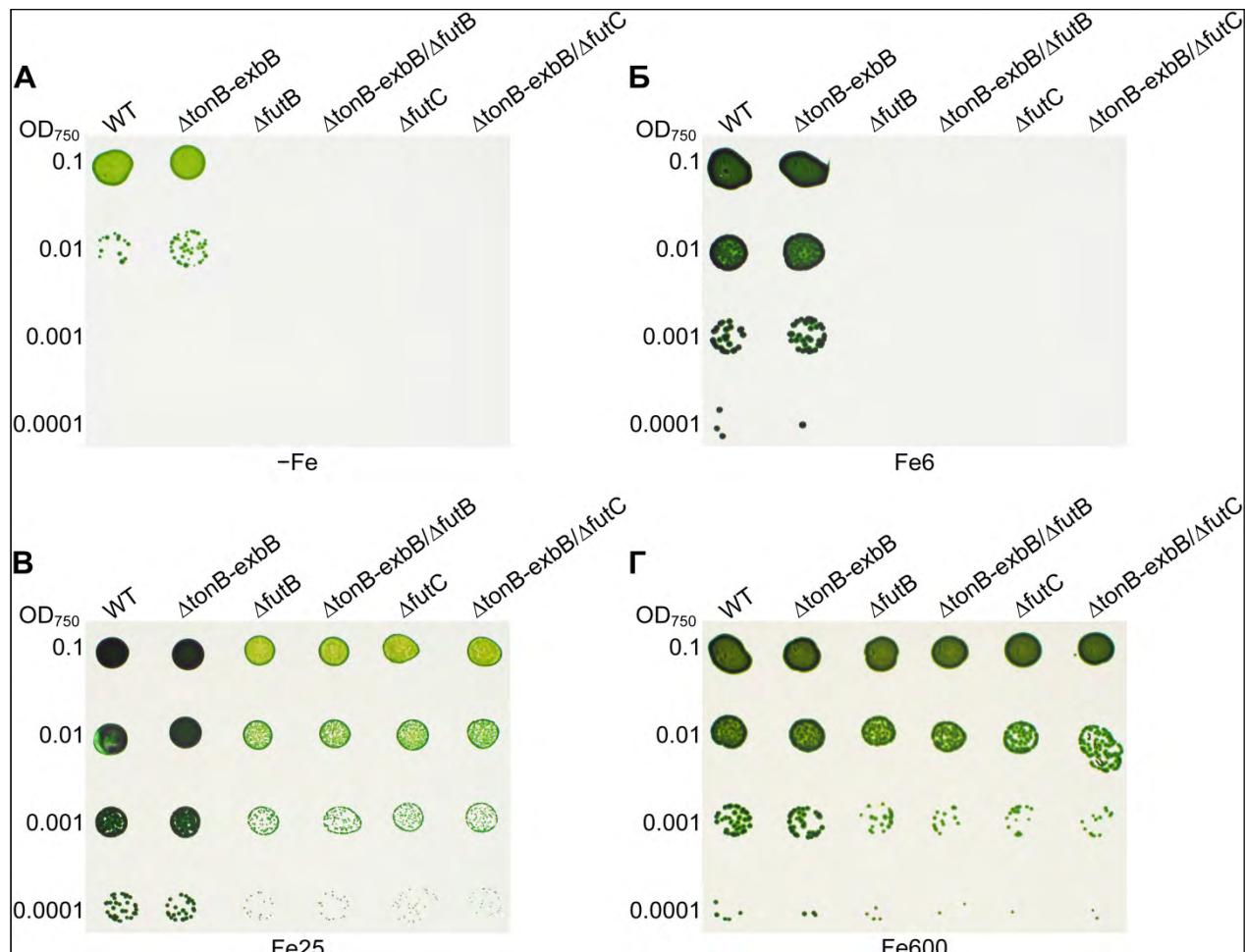


Рисунок 4.6. Рост штамма WT и мутантов Δ tonB-exbB, Δ futB, Δ tonB-exbB/ Δ futB, Δ futC и Δ tonB-exbB/ Δ futC *Synechocystis* на плотных средах с различными концентрациями неорганической или органической форм Fe(III). Отмытые от железа клетки инкубировали 3 дня в среде YBG11-Fe и по 3 мкл разведений суспензии каждого штамма со значениями OD₇₅₀ ~ 0.1, 0.01, 0.001 и 0.0001 наносили на плотные среды YBG11-Fe (A; -Fe), YBG11 (B; Fe6), BG11 (B; Fe25) и YBG11(Fe600) (Г; Fe600). Чашки инкубировали 9 дней в стандартных фотоавтотрофных условиях. Среда YBG11 содержала 6 мкМ FeCl₃, тогда как в ее производные YBG11-Fe и YBG11(Fe600) соль железа либо не добавляли, либо добавляли в 100-кратном избытке (600 мкМ). Кроме того, в данном опыте использовали модификацию среды BG11, содержащую не 12, а 25 мкМ Fe(NH₄)₃(C₆H₅O₇)₂. Пояснения в тексте.

Выявленное нами единственное различие между одиночными, Δ futB и Δ futC, и комбинированными, Δ tonB-exbB/ Δ futB и Δ tonB-exbB/ Δ futC, мутантами, заключалось в том, что только одиночные, но не комбинированные, мутанты могли расти в присутствии дигидроксаматного ксеносидерофора, FeSK или SAV, в качестве единственного источника железа. На Рисунке 4.7 показаны кривые роста мутантов Δ futC и Δ tonB-exbB/ Δ futC в среде YBG11-Fe без добавления (–Fe) или с добавлением FeSK. В обедненной железом среде (–Fe) оба мутанта демонстрировали незначительный рост, который заканчивался через шесть дней, очевидно, вследствие истощения следов Fe(III). Добавление FeSK стимулировало интенсивный рост одиночного мутанта Δ futC после двухдневного лаг-периода вплоть до завершающего девятого дня наблюдений. Напротив, у комбинированного мутанта Δ tonB-exbB/ Δ futC в присутствии FeSK не наблюдали никакого роста от начала до конца инкубации. Следовательно, мутант Δ futC с нарушенной транспортной системой FutABC способен утилизировать комплекс Fe(III) с сидерофором (FeSK), тогда как мутант Δ tonB-exbB/ Δ futC, у которого наряду с системой FutABC нарушена система TonB-ExbB1-ExbD1, неспособен утилизировать и свободное окисное железо, и Fe-сидерофор. Отсутствие роста у мутанта Δ tonB-exbB/ Δ futC в присутствии FeSK можно объяснить связыванием следов Fe(III) в среде сидерофором. В аналогичных экспериментах мутанты Δ futB и Δ tonB-exbB/ Δ futB вели себя абсолютно так же, как соответствующие им мутанты с инактивированным геном *futC*.

Представленные результаты подтвердили наличие двух разобщенных по субстратной специфичности путей утилизации окисного железа у *Synechocystis*. Один путь, в котором основную роль играет транспортер FutABC, отвечает за утилизацию Fe(III) в свободной форме, а другой, для которого необходима система TonB-ExbB1-ExbD1 – за утилизацию Fe(III) в органических комплексах с сидерофорами, такими как SK или SAV.

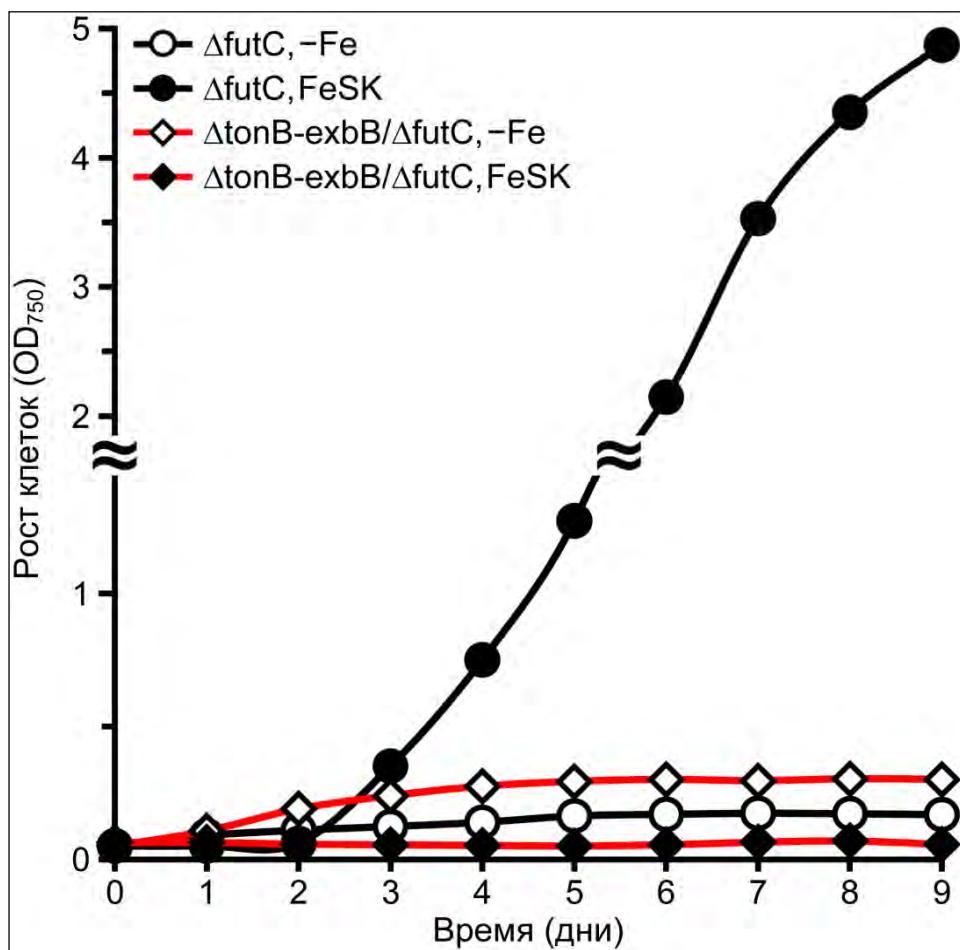


Рисунок 4.7. Рост мутантов $\Delta futC$ и $\Delta tonB-exbB/\Delta futC$ *Synechocystis* в зависимости от наличия или отсутствия ксеносидерофора FeSK в обедненной железом среде. Голодающие по железу клетки разводили до $OD_{750} \sim 0,05$ в среде YBG11-Fe без добавления ($-Fe$) или с добавлением 10 мкМ FeSK и 50-мл культуры инкубировали в 150-мл колбах в стандартных фотоавтотрофных условиях с активной аэрацией в течение девяти дней. Приведены типичные результаты из трех независимых повторов.

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

4.2.1. 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* (Рисунок 4.8).

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 (подраздел 4.1.4). 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, PBPs, тогда как FecC и FecD – трансмембранные пермеазные белки, а FecE – ассоцииированную с внутренней мембраной АТФазу. Очевидно, только белки FecC, FecD и FecE подходят для сборки корового ABC-транспортера гипотетической системы импорта Fe-сидерофоров у *Synechocystis*.

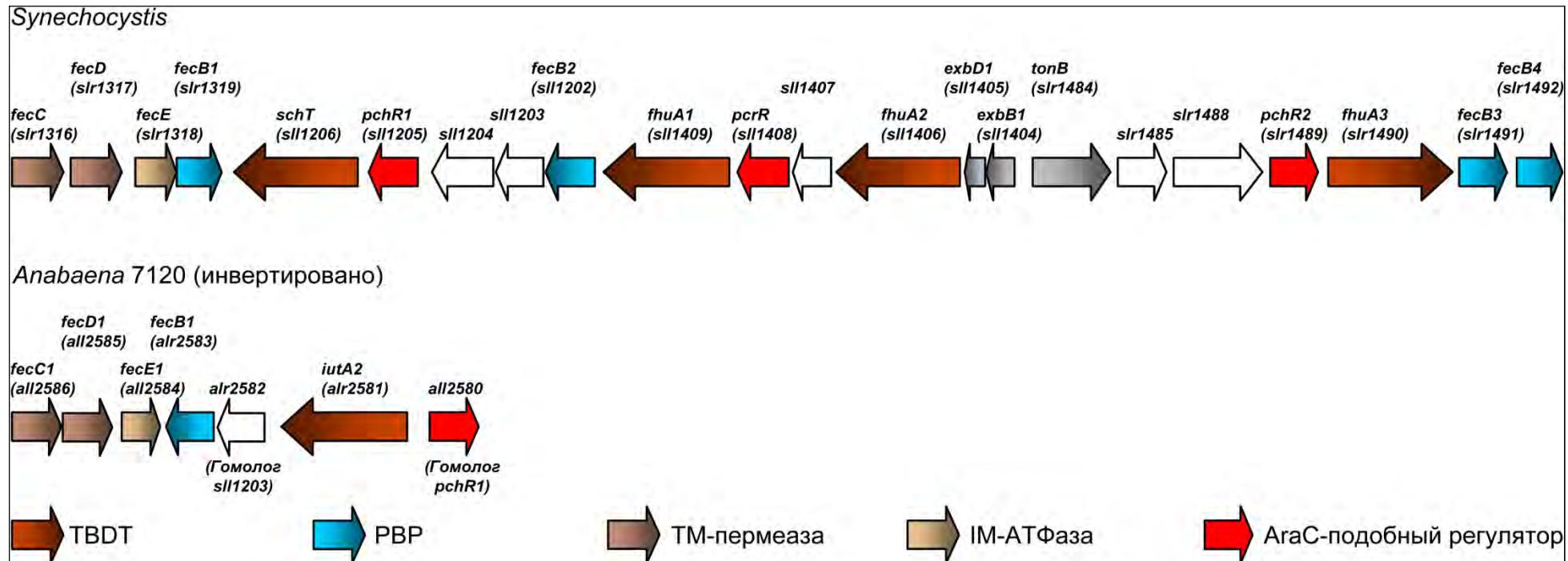


Рисунок 4.8. Участки геномов *Synechocystis* и *Anabaena* 7120, которые содержат гены, вовлеченные или предположительно вовлеченные в утилизацию Fe-сидерофоров. В указанном участке генома *Anabaena* 7120 (инвертирован) только гены *fecB1* и *iutA2* вовлечены в поглощение эндогенного дигидроксаматного сидерофора FeSK (Rudolf *et al.*, 2016). У цианобактерии *Synechocystis*, как показано нами, все пять генов кластера *fecCDEB1-schT* (слева) являются существенными для утилизации дигидроксаматных ксеносидерофоров FeSK и SAV. TM – трансмембранный (пермеаза); IM – ассоциированная с внутренней мембраной (АТФаза). Расшифровка других обозначений в тексте.

Поглощение эндогенного FeSK клетками *Anabaena* 7120 происходит с участием ABC-транспортера FhuDBC и белка FecB1 в качестве дополнительного PBP (Rudolf *et al.*, 2016). Проведенный нами анализ гомологии белков (BLASTP; NCBI) показал, что из четырех предполагаемых PBPs *Synechocystis* наибольшее сходство с белком FecB1 *Anabaena* 7120 проявляет белок FecB1 *Synechocystis*. У *Anabaena* 7120 специфичный к FeSK PBP FecB1, наряду с компонентами корового ABC-транспортера, пермеазными белками FecC1 и FecD1, а также АТФазой FecE1, кодируется генным кластером *fecB1C1D1E1* (Рисунок 4.8). Следует также отметить, что ген *iutA2* *Anabaena* 7120, кодирующий один из двух TBDTs, специфичных к FeSK (Rudolf *et al.*, 2016), примыкает к этому кластеру выше гена *fecB1* по направлению транскрипции (Рисунок 4.8).

4.2.2. 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 PBP и TBDT, соответственно. Все пять генов тесно сцеплены в хромосоме и, за исключением гена *schT*, транскрибируются в одном направлении (Рисунок 4.8). 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 3 «Материалы и Методы». Гомозиготные мутанты Δ *fecC*, Δ *fecD*, Δ *fecE*, Δ *fecB1* и Δ *schT* были успешно выделены на стандартной селективной среде, что было подтверждено результатами ПЦР-анализа (Рисунок 4.9). 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 4.10.А и Б). Добавление FeSK либо SAV приводило к восстановлению роста штамма WT. Напротив, ни один из двух ксеносидерофоров не восстанавливал рост мутантов Δ *fecB1*, Δ *fecC*, Δ *fecD*, Δ *fecE* и Δ *schT* (Рисунок 4.10.А и Б), что указывало на утрату этими мутантами способности утилизировать FeSK и SAV в качестве единственных источников железа.

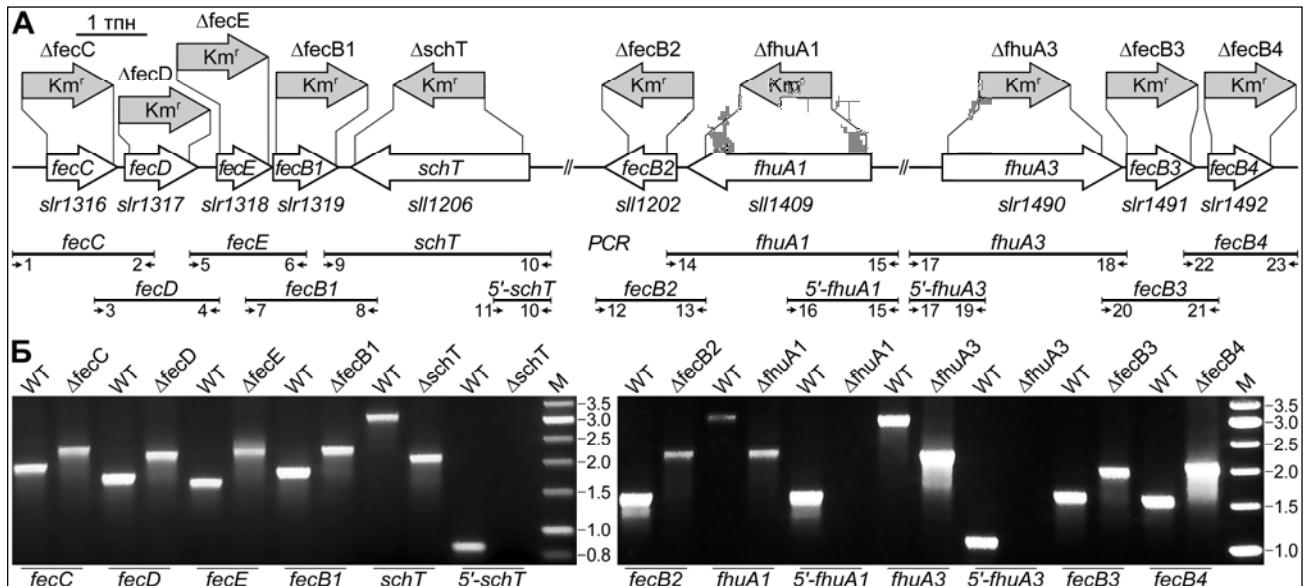


Рисунок 4.9. Конструирование и сегрегация мутантов Δ fecC, Δ fecD, Δ fecE, Δ fecB1, Δ schT, Δ fecB2, Δ fhuA1, Δ fhuA3, Δ fecB3 и Δ fecB4 *Synechocystis*. (А) Схема делеционно-инсерционной инактивации соответствующих генов. Локализация инсерций кассеты Km^r у мутантов показана над генами. Отрезки под генами соответствуют участкам, подвергнутым ПЦР-анализу с использованием праймеров, обозначенных нумерованными стрелками. (Б) Результаты ПЦР-анализа, доказывающие гомозиготность мутантов Δ fecC, Δ fecD, Δ fecE, Δ fecB1, Δ schT, Δ fecB2, Δ fhuA1, Δ fhuA3, Δ fecB3 и Δ fecB4. ПЦР проводили с праймерами, указанными в части А рисунка и описанными в Таблице 3.2: (1) fecC_F1, (2) fecC_R2, (3) fecD_F1, (4) fecD_R2, (5) fecE_F1, (6) fecE_R2, (7) fecB1_F1, (8) fecB1_R2, (9) schT_R2, (10) schT_F1, (11) schT_R3, (12) fecB2_R2, (13) fecB2_F1, (14) fhuA1_R2, (15) fhuA1_F1, (16) fhuA1_R3, (17) fhuA3_F1, (18) fhuA3_R2, (19) fhuA3_R3, (20) fecB3_F1, (21) fecB3_R2, (22) fecB4_F1 и (23) fecB4_R2. Праймеры 11, 16 и 19 специфичны к делетированным участкам генома у мутантов Δ schT, Δ fhuA1 и Δ fhuA3, у которых утрата ПЦР-фрагментов $5'$ -schT, $5'$ -fhuA1 и $5'$ -fhuA3, амплифицируемых с парами праймеров 10/11, 15/16 и 17/19, соответственно, подтверждает отсутствие хромосомы WT. M – ДНК-маркеры (тпн).

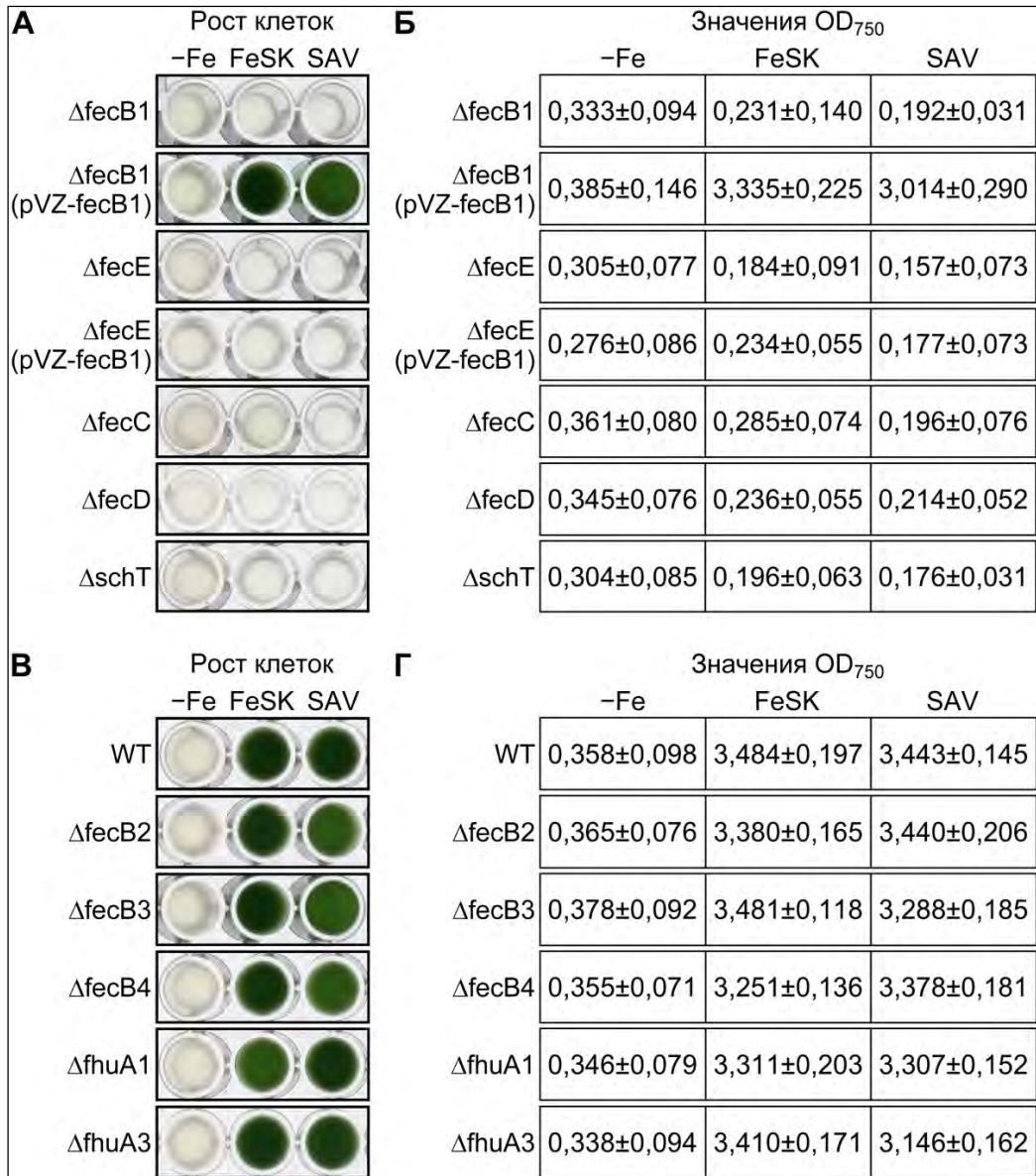


Рисунок 4.10. Рост штамма WT и мутантов Δ fecB1, Δ fecB1(pVZ-fecB1), Δ fecB2, Δ fecB3, Δ fecB4, Δ fecC, Δ fecD, Δ fecE, Δ fecE(pVZ-fecB1), Δ fhuA1, Δ fhuA3 и Δ schT *Synechocystis* в присутствии дигидроксаматных ксеносидерофоров, FeSK или SAV, в качестве единственных источников железа. Голодающие по железу клетки разводили 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 Δ fecB1(pVZ-fecB1) (А), либо способных (В) утилизировать FeSK и SAV. (Б и Г) Соответствующие конечные OD₇₅₀ культуры в виде средних значений и стандартных отклонений, полученных в трех независимых экспериментах. Штаммы Δ fecB1(pVZ-fecB1) и Δ fecE(pVZ-fecB1) представляют собой трансконъюгант мутантов Δ fecB1 и Δ fecE, соответственно, которые содержат рекомбинантную плазмиду pVZ-fecB1 с конститутивно экспрессирующимся геном *fecB1*.

4.2.2.1. Комплементационный анализ мутантов Δ fecB1 и Δ fecE

Два гена *fecE* и *fecB1* кластера *fecCDEB1-schT* перекрываются и составляют единую транскрипционную единицу (Korff *et al.*, 2014). В связи с этим нельзя было исключать, что ген *fecE* не участвует в утилизации ксеносидерофоров, и фенотип мутанта Δ 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 Δ fecE и Δ 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 конститтивного промотора (см. главу 3 «Материалы и Методы»). На Рисунке 4.11.А показаны результаты рестрикционного анализа, подтверждающие факт клонирования гена *fecB1* в векторе pVZ326. Как видно из представленных данных, рекомбинантная плазмиды pVZ-fecB1 содержит фрагмент ожидаемого размера (948 пн) между сайтами эндонуклеаз рестрикции *NdeI* и *HindIII*, который соответствует кодирующей последовательности гена *fecB1*. При этом интактный вектор pVZ326 (контроль) содержит *NdeI-HindIII*-фрагмент (551 пн), соответствующий вырезаемому участку в гене *kan*, замещаемому клонируемым геном (см. также Рисунок 3.4 в главе 3 «Материалы и Методы»).

С помощью конъюгационных скрещиваний плазмиду pVZ-fecB1 ввели в клетки мутантов Δ fecB1 и Δ fecE, как описано в главе 3 «Материалы и Методы». В скрещиваниях с использованием штамма-донора, содержащего вектор pVZ326, получили изогенные контрольные штаммы-трансконъюганты. Обе плазмиды, векторная и рекомбинантная, стабильно наследовались штаммами-трансконъюгантами в неселективных условиях (Рисунок 4.11.Б). Как показано на Рисунке 4.10.А и Б, введение плазмиды pVZ-fecB1 в мутант Δ fecB1, но не Δ fecE, приводило к восстановлению фенотипа штамма WT, то есть, способности клеток использовать FeSK или SAV в качестве единственных источников железа. Напротив, вектор pVZ326 не комплементировал генетические дефекты обоих мутантов (данные не показаны). Для подтверждения функциональной активности гена *fecB1*, клонированного в штамме Δ fecE(pVZ-fecB1), выделенную из него плазмиду pVZ-fecB1 повторно ввели в клетки мутантов Δ fecB1 и Δ fecE. У повторно полученного штамма-трансконъюганта Δ fecB1(pVZ-fecB1), но не у Δ fecE(pVZ-fecB1), вновь наблюдали восстановление фенотипа штамма WT. В совокупности эти результаты доказывают, что оба гена, и *fecE* и *fecB1*, вовлечены в контроль импорта ксеносидерофоров.

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

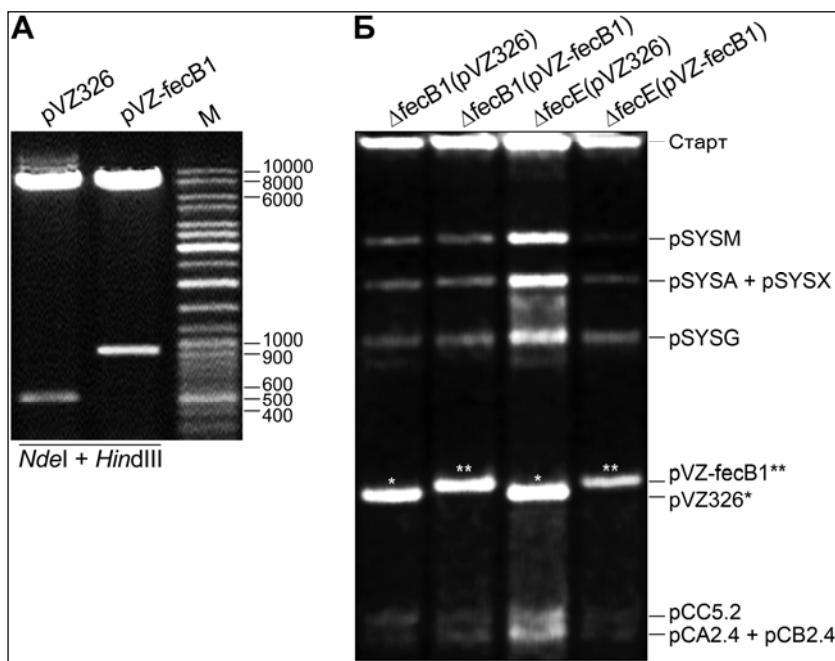


Рисунок 4.11. Клонирование гена *fecB1* в векторе экспрессии pVZ326 с широким кругом хозяев и стабильное наследование рекомбинантной плазмида pVZ-fecB1 штаммами-трансконъюгантами, производными мутантов Δ fecB1 и Δ fecE *Synechocystis*. (А) Разделение в агарозном геле фрагментов ДНК, образующихся в результате обработки плазмид pVZ326 и pVZ-fecB1 смесью эндонуклеаз рестрикции *NdeI* + *HindIII*, между сайтами которых клонировали ген *fecB1*. М – ДНК-маркеры (пн). (Б) Гель-электрофорез нативных плазмид, выделенных из клеток штаммов-трансконъюгантов Δ fecB1(pVZ326), Δ fecB1(pVZ-fecB1), Δ fecE(pVZ326) и Δ fecE(pVZ-fecB1). Клетки выращивали в среде YBG11 без добавления Сm (неселективные условия). Звездочками помечены вектор pVZ326 (контроль) и рекомбинантная плазмида pVZ-fecB1, автономно реплицирующиеся в клетках *Synechocystis* вместе с семью указанными эндогенными плазмидами (<http://genome.annotation.jp/cyanobase/Synechocystis>).

4.2.3. 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» PBPs и TBDTs *Synechocystis*, кодируемых генами вне кластера *fecCDEB1-schT*, были сконструированы гомозиготные мутанты Δ fecB2, Δ fecB3, Δ fecB4, Δ fhuA1 и Δ fhuA3 (Рисунок 4.9), как описано в главе 3 «Материалы и Методы». Все мутанты росли с такой же скоростью, как и штамм WT, в стандартной или обедненной железом среде (данные не показаны). Более того, они не отличались от штамма WT по росту в присутствии FeSK или SAV в качестве единственных источников железа (Рисунок 4.10.В и Г).

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

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

4.3.1. Геномная организация и биоинформационический анализ генов *pchR1*, *pchR2* и *pcrR* AraC-подобных регуляторов транскрипции у *Synechocystis*

Участок генома *Synechocystis*, в котором сосредоточены гены предполагаемых компонентов систем транспорта сидерофоров (Рисунок 4.8), содержит также три гомологичных гена, *pchR1* (*sll1205*), *pchR2* (*slr1489*) и *pcrR* (*sll1408*), кодирующих предполагаемые AraC-подобные факторы транскрипции семейства AraC/XylS (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* (Рисунок 4.8), вовлеченный в утилизацию дигидроксаматных ксеносидерофоров FeSK и SAV (подраздел 4.2).

Стандартный анализ с помощью программы BLASTP (NCBI) белков PchR1, PchR2 и PcrR *Synechocystis* выявил множество их гомологов, аннотированных как предполагаемые или неизвестные, у различных бактерий и, прежде всего, у цианобактерий. Вместе с тем использование утилиты SMARTBLAST, нововведенной в сервер NCBI, дало более информативные результаты. Эта программа представляет «простой инструмент исследования модульной архитектуры» (SMART) белка в сочетании с поиском его гомологов (BLASTP) в протеомных базах данных 27 модельных бактерий (включая *Synechocystis*), охватывающих широкий таксономический диапазон. В качестве «лучших гомологов» белков PchR1, PchR2 и PcrR *Synechocystis* были идентифицированы сами они перекрестно, а также белок PchR грамотрицательной бактерии *P. aeruginosa* PAO1 (Таблица 4.2). Функция белка PchR *P. aeruginosa*, являющегося AraC-подобным регулятором транскрипции и обозначаемого нами PchR-PAO1, определена экспериментально. В комплексе с эндогенным сидерофором Fe-пиохелином в роли эффектора белок PchR-PAO1 негативно регулирует экспрессию собственного гена (*pchR*) и позитивно – экспрессию генов биосинтеза пиохелина и гена *fptA*, кодирующего специфический TBDT Fe-пиохелина (Heinrichs and Poole, 1996; Michel *et al.*, 2005; Youard *et al.*, 2011). С использованием программы SMARTBLAST нами выполнен анализ еще шести известных AraC-подобных факторов транскрипции, YbtA, AlcR, MpeR, DhbR, RhrA и DesR, вовлеченных в регуляцию метаболизма сидерофоров у различных бактерий. Лучшими гомологами четырех из них, YbtA, AlcR, MpeR и DhbR, были определены белки PchR1 или PchR2 *Synechocystis*, а также одним из лучших гомологов YbtA и AlcR был определен белок PchR-PAO1 *P. aeruginosa* (Таблица 4.2).

Таблица 4.2. Сходство белков PchR1, PchR2 и PcrR *Synechocystis* с AraC-подобными регуляторами транскрипции генов метаболизма сидерофоров у бактерий

Белок	Длина (ао)	Гомолог [*]	Общий счет (бит)	Покрытие белка (%)	Значение E	Идентичность (%)
PchR1	326	PchR2	186	99%	$3 e^{-55}$	34%
		PchR-PAO1 ^{a)}	105	46%	$9 e^{-25}$	39%
PchR2	330	PchR1	186	97%	$3 e^{-55}$	34%
		PchR-PAO1	108	46%	$5 e^{-26}$	38%
PcrR	346	PchR2	171	85%	$3 e^{-49}$	36%
		PchR-PAO1	119	42%	$6 e^{-30}$	39%
YbtA ^{б)}	319	PchR1	96	87%	$3 e^{-21}$	28%
		PchR-PAO1	80	42%	$8 e^{-16}$	35%
AlcR ^{в)}	303	PchR-PAO1	70	49%	$2 e^{-12}$	32%
		PchR2	60	44%	$6 e^{-09}$	28%
MpeR ^{г)}	318	PchR1	57	30%	$7 e^{-08}$	34%
DhbR ^{д)}	259	PchR1	63	44%	$3 e^{-10}$	29%

^{*}Из пяти лучших гомологов, идентифицируемых программой SMARTBLAST, представлены только первый и второй гомологи белков PchR1, PchR2, PcrR, YbtA^{б)} и AlcR^{в)}, только первый гомолог белка MpeR^{г)} и только третий – белка DhbR^{д)}. Гомологи, которые не представлены, либо не изучены экспериментально, либо не являются белками *Synechocystis*, либо их функции не связаны с метаболизмом сидерофоров (худшие из лучших гомологов).

Надстрочными буквами помечены известные AraC-подобные активаторы транскрипции:

^{a)}PchR-PAO1 – генов синтеза и импорта пиохелина у *P. aeruginosa*;

^{б)}YbtA – гена TBDT йерсиниабактерии у *Yersinia pestis* (Fetherston *et al.*, 1996);

^{в)}AlcR – генов синтеза и импорта алкалигина у *Bordetella bronchiseptica* (Brickman *et al.*, 2001);

^{г)}MpeR – гена TBDT энтеробактерии у *Neisseria gonorrhoeae* (Hollander *et al.*, 2011);

^{д)}DhbR – генов биосинтеза бруцебактерии у *Brucella abortus* (Anderson *et al.*, 2008).

Примечательно, что у нитчатой цианобактерии *Anabaena* 7120 ген *iutA2* (*alr2581*), кодирующий один из двух специфичных к FeSK TBDTs (Rudolf *et al.*, 2016), сцеплен с геном *all2580* предполагаемого AraC-подобного регулятора транскрипции (Рисунок 4.8). При этом TBDT *IutA2* *Anabaena* 7120 является вторым после TBDT *SchT* *Anabaena* 7120 ближайшим гомологом TBDT *SchT* *Synechocystis* (белок *Sll1206*; Mirus *et al.*, 2009), существенного для утилизации ксеносидерофора FeSK (подраздел 4.2). Выполненный нами поиск гомологов гена *all2580* у *Synechocystis* (интегрированная в CyanoBase утилита BLAST2) показал, что его ближайшими гомологами являются следующие гены: в первую очередь, *pchR1* (194 бит; $4 e^{-61}$), а за ним – *pchR2* (156 бит; $1 e^{-46}$) и *pcrR* (120 бит; $1 e^{-32}$). Не менее показательными оказались результаты поиска гомологов гена *all2580* у самой *Anabaena* 7120. Выяснилось, что ее геном содержит еще 15 гомологичных генов предполагаемых AraC-подобных

регуляторов транскрипции, каждый из которых физически кластеризован с геном предполагаемого TBDT типа *IutA* или *FhuA* (Таблица А.1 в Приложении А).

Известно, что голодание по железу индуцирует в клетках *Synechocystis* экспрессию не только предполагаемых структурных генов систем транспорта сидерофоров (Hernandez-Prieto *et al.*, 2012; Houot *et al.*, 2007; Katoh *et al.*, 2001a; Kopf *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2003), но и регуляторных генов *pchR1*, *pchR2* и *pcrR* (Houot *et al.*, 2007; Kopf *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2003). Результаты, полученные с помощью ОТ-ПЦР РВ в настоящей работе, тоже демонстрировали повышение экспрессии всех исследованных генов при недостатке железа (следующий подраздел). Эти данные в совокупности с вышеописанными результатами определения функции белков PchR1, PchR2 и PcrR *in silico* и фактом кластеризации генов AraC-подобных факторов транскрипции с генами TBDTs в геномах *Synechocystis* и *Anabaena* 7120 предполагают важную роль факторов транскрипции AraC-типа в регуляции систем поглощения Fe-сидерофоров у цианобактерий.

4.3.2. 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 в условиях голодания клеток по железу ксеносидерофор SAV стимулирует экспрессию генов *schT* и *fecB1*, кодирующих предполагаемые TBDT и РВР дигидроксаматных ксеносидерофоров FeSK и SAV у *Synechocystis*. Добавление 10 мкМ SAV в обедненную, но не в богатую (не показано), железом среду приводило к значительному повышению уровней транскрипции этих двух генов у штамма WT (Рисунок 4.12.А). При этом не было обнаружено существенного влияния SAV на транскрипцию генов *fecB2*, *fecB3* и *fecB4*, кодирующих другие предполагаемые РВР, и генов *fecC*, *fecD* и *fecE*, кодирующих компоненты предполагаемого корового ABC-транспортера Fe-сидерофоров (данные не показаны). Ксеносидерофор SAV не стимулировал экспрессию генов предполагаемых TBDTs, *fhuA1*, *fhuA2* и *fhuA3* (Рисунок 4.12.Д), которые не являются существенными для его (и FeSK) утилизации. Более того, в присутствии SAV транскрипция генов *fhuA1* и *fhuA3* понижалась; причем гена *fhuA3* – до базового уровня, характерного для богатых железом клеток (Рисунок 4.12.Д).

Следует отметить, что добавление в обедненную железом среду 10 мкМ ксеносидерофора FeSK приводило не к повышению, а к понижению экспрессии генов *schT* и *fecB1* до базового уровня у штамма WT. В данном случае отсутствие стимулирующего транскрипцию эффекта можно объяснить результатами изучения роли дигидроксаматного сидерофора алкалигина в регуляции его собственного метаболизма у патогенных бактерий

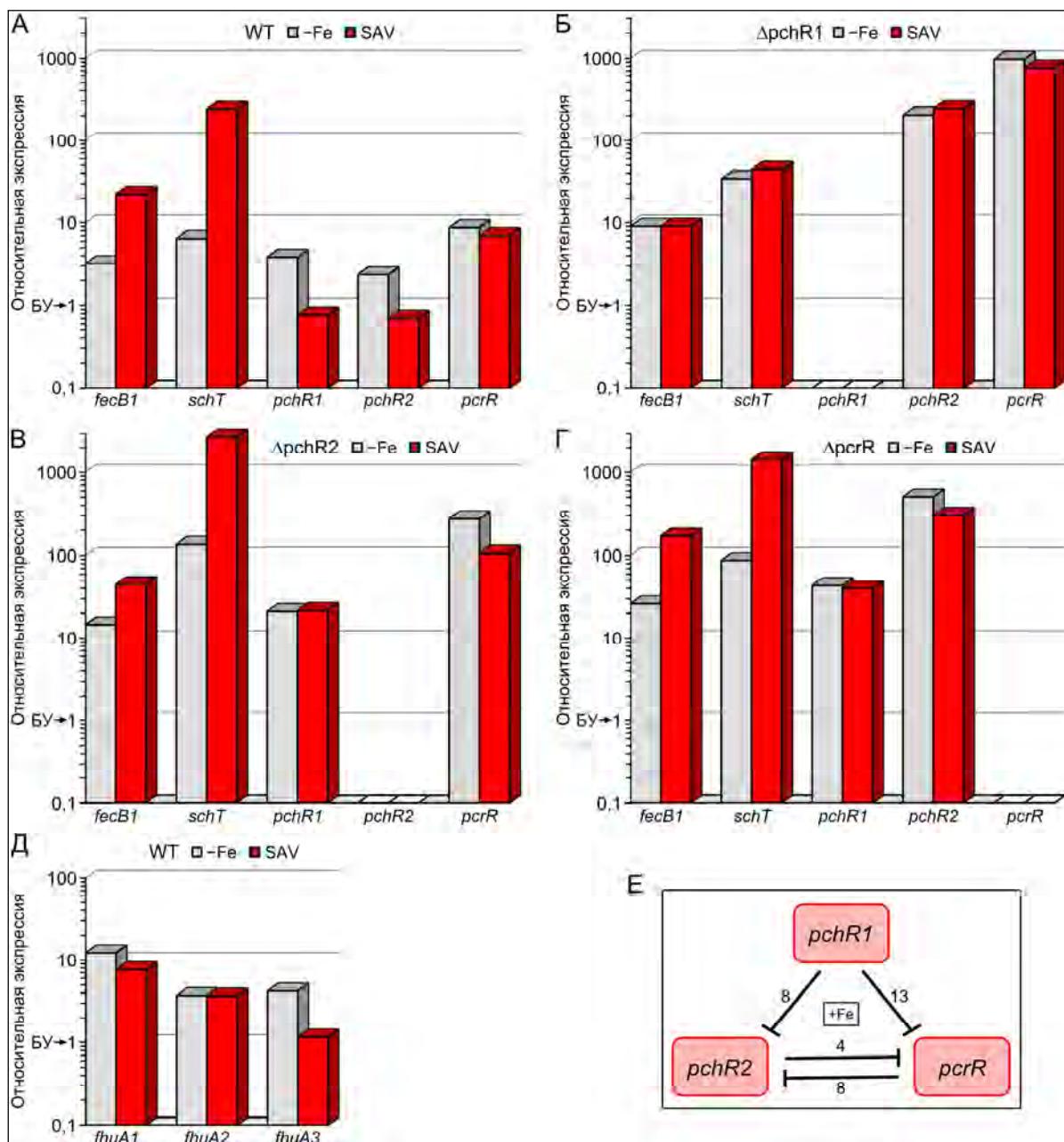


Рисунок 4.12. Изменения в экспрессии ряда генов *Synechocystis*, обусловленные ксеносидерофором SAV и инактивацией регуляторных генов *pchR1*, *pchR2* и *pcrR*. Типичные результаты двух-трех независимых опытов по оценке с помощью ОТ-ПЦР РВ относительных уровней транскрипции (относительной экспрессии) 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 ТБДТs (Д). Отмытые от железа клетки инкубировали 72 часа в средах YBG11 (контроль с железом), YBG11-Fe (-Fe) или YBG11-Fe с добавлением 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.

рода *Bordetella*. Было показано, что пороговая концентрация Fe-алкалигина, требующаяся для индукции экспрессии генов, контролирующих его биосинтез и поглощение, более чем на три порядка ниже концентрации, достаточной для поддержания роста бактерий-продуцентов, *B. pertussis* или *B. bronchiseptica* (Brickman *et al.*, 1996; Brickman and Armstrong, 1999). Ксеносидерофор FeSK в качестве источника железа для *Synechocystis* был использован нами в виде готового препарата (EMC microcollections GmbH), тогда как SAV – в виде фильтрата культуры *A. variabilis*, выращенной в обедненной железом среде. При этом номинальное значение 10 мкМ отражало концентрацию SAV в свободной от железа форме, определяемой с помощью CAS-анализа (глава 3 «Материалы и Методы»). Очевидно, содержание SAV в Fe-форме, имевшейся в фильтрате и образующейся за счет связывания следов железа в среде YBG11-Fe, было физиологически оптимальным для *Synechocystis*, как в отношении индукции собственного (Fe-SAV) поглощения, так и в отношении последующего поддержания роста клеток. В связи с вышеуказанным определение пороговой концентрации FeSK, требующейся для индукции экспрессии генов *Synechocystis*, было выделено в задачу будущего детального исследования в нашей лаборатории, а здесь представлены результаты, полученные исключительно с ксеносидерофором SAV.

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 ранее сконструированные в нашей лаборатории мутанты Δ pchR1, Δ pchR2 и Δ pcrR (глава 3 «Материалы и Методы»). 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*, несущественных для утилизации FeSK и SAV (данные не показаны). Вместе с тем каждый мутант демонстрировал повышение транскрипции (дерепрессию) двух либо одного из двух других регуляторных генов. У мутанта Δ pchR1 были дерепрессированы гены *pchR2* и *pcrR*, у мутанта Δ pchR2 – ген *pcrR*, а у мутанта Δ pcrR – ген *pchR2* (Рисунок 4.12.Е). При недостатке железа уровни транскрипции всех трех регуляторных генов заметно повышались у штамма WT (Рисунок 4.12.А). В этих же условиях у мутантов наблюдали существенную дерепрессию (повышение уровней транскрипции на 1-2 порядка в сравнении со штаммом WT) других регуляторных генов: у Δ pchR1 – генов *pchR2* и *pcrR*, а у Δ pchR2 и Δ pcrR – гена *pchR1* и соответственно генов *pcrR* или *pchR2* (Рисунок 4.12.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 4.12.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 4.12.А). Напротив, у мутанта $\Delta pchR1$ SAV не стимулировал транскрипцию генов *fecB1* и *schT* (Рисунок 4.12.Б); однако, стимулировал их транскрипцию до максимально высоких уровней у мутантов $\Delta pchR2$ и $\Delta pcrR$ (Рисунок 4.12.В и Г). Следует отметить, что при дерепрессии гена *pchR1* у мутантов $\Delta pchR2$ и $\Delta pcrR$, как и при дерепрессии гена *pchR2* у мутанта $\Delta pchR1$, отсутствовал выраженный ингибирующий эффект SAV на транскрипцию этих двух генов, наблюдавшийся у штамма WT. С другой стороны, обнаружена тенденция к понижению транскрипции генов *pcrR* и *pchR2* в присутствии SAV (слабый ингибирующий эффект) у мутантов $\Delta pchR2$ и $\Delta pcrR$, соответственно, у которых дерепрессирован ген *pchR1* (Рисунок 4.12.В и Г).

Таким образом, дигидроксаматный ксеносидерофор SAV в качестве единственного источника железа стимулирует экспрессию существенных для его утилизации генов *schT* и *fecB1*, кодирующих предполагаемые специфические белки-импортеры в наружной мемbrane (TBDT SchT) и перiplазме (PBP FecB1) *Synechocystis*, и подавляет экспрессию тесно сцепленного с ними регуляторного гена *pchR1*. Экспрессия генов *schT* и *fecB1* при недостатке железа негативно регулируется AraC-подобными факторами транскрипции PchR1, PchR2 и PcrR, которые сами взаимообразно репрессируют друг друга. Нельзя исключать, что при этом 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*.

5. 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*. Поскольку кластер *exbB1D1* является существенным для транспорта FeSK и SAV через наружную мембрану, генные кластеры *exbB2D2* и *exbB3D3D4* не обладают избыточными функциями в поглощении ксеносидерофоров. Следует подчеркнуть, что из всех белков ExbB и ExbD *Synechocystis* белки ExbB1 и ExbD1 демонстрируют наибольшее сходство с белками ExbB3 и ExbD3, вовлеченными в транспорт эндогенного сидерофора FeSK у нитчатой цианобактерии *Anabaena* 7120.

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 нам удалось идентифицировать генный кластер *fecCDEB1-schT*, вовлеченный в утилизацию дигидроксаматных ксеносидерофоров FeSK и SAV клетками *Synechocystis*. Белки, кодируемые пятью генами этого кластера, включают, согласно их предполагаемым функциям, TBDT (SchT), PBP (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. Эти данные согласуются с представленными нами доказательствами того, что утилизация FeSK и SAV у *Synechocystis* зависит от необходимого для транспорта сидерофоров через наружную мембрану комплекса TonB-ExbB1-ExbD1, но не зависит от основных транспортеров неорганического железа FetABC и FeoB во внутренней мембране клетки. В совокупности приведенные данные предполагают следующую модель пути транспорта дигидроксаматных ксеносидерофоров в цианобактерию *Synechocystis* при недостатке железа в природных местах ее обитания (Рисунок 5.1). Согласно этой модели, внеклеточный Fe-сидерофор, такой как FeSK или SAV, транспортируется через наружную мембрану специфическим ТВДТ SchT, который обеспечивается энергией протон-движущей силы через систему TonB-ExbB1-ExbD1. Поступив в периплазму, Fe-сидерофор связывается с специфическим РВР FecB1 и доставляется к коровому ABC-транспортеру FecCDE, состоящему из мембранных 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»).

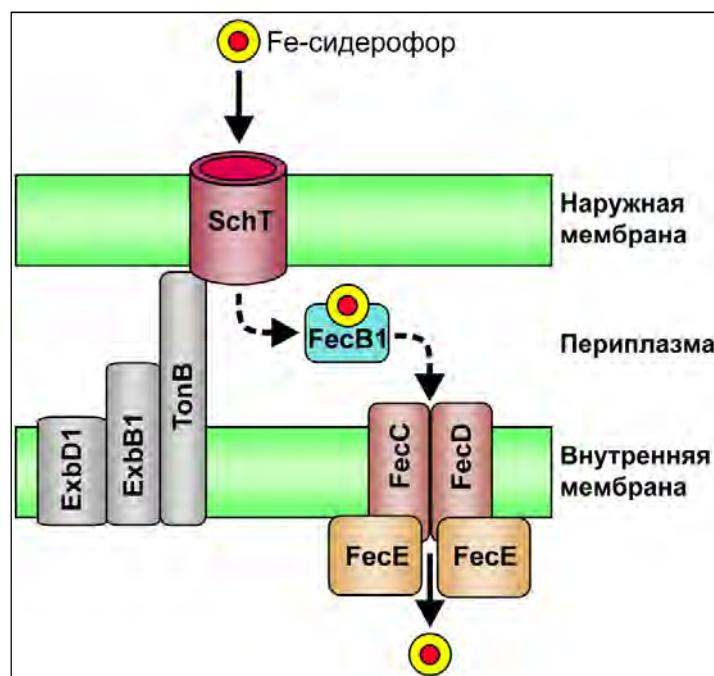


Рисунок 5.1. Модель пути транспорта дигидроксаматных ксеносидерофоров в клетку *Synechocystis*. Fe-сидерофор – ксеносидерофор FeSK либо SAV. Пояснения в тексте.

Неудивительно, что для утилизации FeSK и SAV клетками *Synechocystis* требуется предполагаемый TBDT SchT, поскольку его ближайшие гомологи SchT и IutA2 *Anabaena* 7120 (Nicolaisen *et al.*, 2008; Rudolf *et al.*, 2015), как и IutA *E. coli* (O Cuív *et al.*, 2004), являются специфичными к FeSK TBDTs. Известно, что эти транспортеры наружной мембраны *Anabaena* 7120 (Rudolf *et al.*, 2016) и *E. coli* (Carbonetti and Williams, 1984; Krone *et al.*, 1983) вовлечены также в утилизацию структурно сходного Fe-сидерофора, FeAB. Было показано, что у *Synechocystis* поглощение железа из FeAB, которое, как установлено нами, не является достаточным для поддержания роста клеток, основано на его восстановлении и не связано с интернализацией этого комплекса (Kranzler *et al.*, 2011). Однако использованный в цитируемой работе экспериментальный подход не позволял определить, где происходит восстановление связанного с сидерофором железа, на поверхности наружной мембраны или в периплазме. Таким образом, вопрос о том, переносится ли FeAB через наружную мембрану у *Synechocystis*, и если да, участвует ли TBDT SchT в транспорте FeAB, остается открытым.

Утилизация дигидроксаматных ксеносидерофоров FeSK и SAV клетками *Synechocystis* зависит также от Fec-подобного ABC-транспортера FecB1CDE. Примечательно, что *Synechocystis* не обладает транспортером Fe-дицитратом FecA в наружной мембране, и, согласно результатам одного из двух исследований, посвященных этому вопросу (Katoh *et al.*, 2001b; Labouré *et al.*, 1993), не может поглощать Fe-дицитрат (Katoh *et al.*, 2001b). Кроме того, геном данной цианобактерии не содержит генов, кодирующих компоненты Fhu-подобного ABC-транспортера (Kaneko *et al.*, 1996), и белковый комплекс FecCDE является единственным предсказываемым коровым ABC-транспортером, который может участвовать в поглощении Fe-сидерофоров. У модельной грамотрицательной бактерии *E. coli* за опосредованный цитратом перенос железа через внутреннюю мембрану отвечает ABC-транспортер FecBCDE (Braun, 1997), тогда как за перенос различных гидроксаматных сидерофоров, включая FeSK – ABC-транспортер FhuDBC (Braun *et al.*, 1998; Köster, 1997). Коровий транспортер FhuBC играет также центральную роль в поглощении эндогенного FeSK клетками *Anabaena* 7120. Транспорт FeSK у *Anabaena* 7120 необычен тем, что в нем участвуют PBPs двух типов, FhuD и FecB1 (Rudolf *et al.*, 2016). Важно отметить, что белок FecB1 кодируется генным кластером *fecC1D1E1B1* наряду с компонентами корового транспортера FecC1D1E1 (Рисунок 4.8), которые являются ближайшими гомологами белков FecC, FecD и FecE *Synechocystis*. Более того, ген *iutA2*, кодирующий один из рецепторов FeSK у *Anabaena* 7120, расположен в непосредственной близости к данному генному кластеру (Рисунок 4.8). По-видимому, за исключением гена *fecB1*, *fec*-кластер *Anabaena* 7120 не является существенным для поглощения FeSK, которое, как было показано, не нарушается при инактивации гена *fecE1*. Поэтому белок FecB1 можно рассматривать в

качестве специфичного к FeSK сиротского PBP, кооперирующего с Fhu-системой у *Anabaena* 7120 (Rudolf *et al.*, 2016). С другой стороны, геном этой цианобактерии содержит еще два *fec*-кластера (Stevanovic *et al.*, 2012), которые могут быть функционально избыточными в отношении кластера *fecC1D1E1B1* и, в частности, гена *fecE1*.

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). Все гены, кодирующие предполагаемые компоненты систем транспорта Fe-сидерофоров у *Synechocystis*, индуцируются голоданием по железу (Hernandez-Prieto *et al.*, 2012; Houot *et al.*, 2007; Katoh *et al.*, 2001a; Kopf *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2003). Это служит убедительным свидетельством их участия в контроле метаболизма железа.

Несмотря на наличие в геноме *Synechocystis* трех генов, *fhuA1*, *fhuA2* и *fhuA3*, кодирующих гомологи TBDTs, специфичных к FCH и FOB у других грамотрицательных бактерий (например, у *S. meliloti* 2011; Ó Cuív *et al.*, 2008), указанные тригидроксаматные ксеносидерофоры неспособны поддерживать рост *Synechocystis* в качестве единственных источников железа. Свидетельством тому служат результаты нашей работы, а также результаты известных работ с использованием DFOB в качестве хелатора Fe(III) для получения голодящих по железу клеток *Synechocystis* (Hernández-Prieto *et al.*, 2012; Kopf *et al.*, 2014). Не исключено, что предполагаемые TBDTs FhuA1, FhuA2 и FhuA3 *Synechocystis* отличаются высокой избирательностью в отношении различных тригидроксаматных ксеносидерофоров, и FCH и FOB не являются транспортируемыми ими субстратами. Вполне возможно, что расширение круга тестируемых тригидроксаматных ксеносидерофоров позволит найти среди них такие, которые окажутся эффективными источниками железа для данной цианобактерии.

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 связанных железа (Kranzler *et al.*, 2011; Lis *et al.*, 2015a), представляется переоцененным для *Synechocystis*. Ксеносидерофоры, использованные в этих исследованиях, FeAB и FOB, были недостаточны для удовлетворения потребностей *Synechocystis* в железе, и, согласно нашим данным, неспособны поддерживать рост цианобактерии *in situ*. Система транспорта Fec обычно участвует в узнавании и импорте Fe-цитратных комплексов как у грамотрицательных (например, Staudenmaier *et al.*, 1989; Luck *et al.*, 2001), так и у грамположительных (например, Ollinger *et al.*, 2006; Pi and Helmann, 2017) бактерий. Молекулярная основа необычной субстратной специфичности транспортера FecB1CDE *Synechocystis* остается неизвестной.

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, производимый 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 SK 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 SK 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 SK, но обладают системами транспорта FeSK.

6. ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что цианобактерия *Synechocystis*, не синтезирующая собственные сидерофоры, способна утилизировать в качестве единственных источников железа дигидроксаматные ксеносидерофоры, FeSK, 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 мембранны, периплазматический сидерофор-связывающий белок FecB1 и компоненты корового ABC-транспортера внутренней мембранны, 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*.

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / Дж. Миллер. – М.: Мир, 1976. – 440 с.
2. Akers H.A. Isolation of the siderophore Schizokinen from soil of rice fields / H.A. Akers // Appl. Environ. Microbiol. – 1983. – 45. – P. 1704–1706.
3. Albrecht-Gary A.M. Coordination chemistry of siderophores: thermodynamics and kinetics of iron chelation and release / A.M. Albrecht-Gary, A.L. Crumbliss // Met. Ions Biol. Syst. – 1998. – 35. – P. 239–327.
4. Alexander D.B. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria / D.B. Alexander, D.A. Zuberer // Biol. Fertil. Soils. – 1991. – 12. – P. 39–45.
5. Anderson E.S. The AraC-like transcriptional regulator DhbR is required for maximum expression of the 2,3-dihydroxybenzoic acid biosynthesis genes in *Brucella abortus* 2308 in response to iron deprivation / E.S. Anderson, J.T. Paulley, R.M. Roop // J. Bacteriol. – 2008. – 190. – P. 1838–1842.
6. Andrews S.C. Iron storage in bacteria / S.C. Andrews // Adv. Microb.Phys. – 1998. – 40. – P. 281–351.
7. Andrews S.C. Bacterial iron homeostasis / S.C. Andrews, A.K. Robinson, F. Rodríguez-Quiñones // FEMS Microbiol. Rev. – 2003. – 27. – P. 215–237.
8. Archibald F. *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron / F. Archibald // FEMS Microbiol. Lett. – 1983. – 19. – P. 29–32.
9. Armstrong J.E. Iron transport in microalgae: the isolation and biological activity of a hydroxamate siderophore from the blue-green alga *Agmenellum quadruplicatum* / J.E. Armstrong, C. van Baalen, 1979 // Microbiol. – 1979. – 111. – P. 253–262.
10. Badarau A. FutA2 is a ferric binding protein from *Synechocystis* PCC 6803 / A. Badarau, S.J. Firbank, K.J. Waldron, S. Yanagisawa et al. // J. Biol. Chem. – 2008. – 283. – P. 12520–12527.
11. Bailey K.M. Effects of hydroxamate siderophores (strong Fe(III) chelators) on the growth of algae / K.M. Bailey, F.B. Taub // J. Phycol. – 1980. – 16. – P. 334–339.
12. Barchini E. Extracellular iron reductase activity produced by *Listeria monocytogenes* / E. Barchini, R.E. Cowart // Arch. Microbiol. – 1996. – 166. – P. 51–57.

13. Beiderbeck H. Anachelin, the siderophore of the cyanobacterium *Anabaena cylindrica* CCAP 1403/2A / H. Beiderbeck, K. Taraz, H. Budzikiewicz, A.E. Walsby // Z. Naturforsch. – 2000. – 55. – P. 681–687.
14. Beis K. Structural basis for the mechanism of ABC transporters / K. Beis // Biochem. Soc. Trans. – 2015. – 43. – P. 889–893.
15. Bibby T.S. Iron deficiency induces the formation of an antenna ring around trimeric Photosystem I in cyanobacteria / T.S. Bibby, J. Nield, J. Barber // Nature. – 2001. – 412. – P. 743–745.
16. Blanvillain S. Plant carbohydrate scavenging through tonbdependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria / S. Blanvillain, D. Meyer, A. Boulanger, M. Lautier et al. // PLoS ONE. – 2007. – 2. – P. e224.
17. Boekema E.J. A giant chlorophyll-protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria / E.J. Boekema, A. Hifney, A.E. Yakushevska, M. Piotrowski et al. // Nature. – 2001. – 412. – P. 745–748.
18. Boiteau R.M. An extended siderophore suite from *Synechococcus* sp. PCC 7002 revealed by LC-ICPMSESIMS / R.M. Boiteau, D.J. Repeta // Metallomics. – 2015. – 7. – P. 877–884.
19. Botello-Morte L. Functional genomics of metalloregulators in cyanobacteria / L. Botello-Morte, A. Gonzalez, M.T. Bes, M.L. Peleato et al. // Adv. Bot. Res. – 2013. – 65. – P. 107–156.
20. Boyd P.W. Mesoscale iron enrichment experiments 1993–2005: synthesis and future directions / P.W. Boyd, T. Jickells, C.S. Law, S. Blain et al. // Science. – 2007. – 315. – P. 612–617.
21. Boyd P.W. The biogeochemical cycle of iron in the ocean / P.W. Boyd, M.J. Ellwood // Nat. Geo. – 2010. – 3. – P. 675–682.
22. Boyer G.L. Iron chelation and uptake / G.L. Boyer, A.H. Gillam, C. Trick // The cyanobacteria [P. Fay, C. van Baalen (Eds)]. Amsterdam: Elsevier, 1987. – P. 415–436.
23. Braud A. The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity / A. Braud, M. Hannauer, G.L.A. Mislin, I.J. Schalk // J. Bacteriol. – 2009a. – 191. – P. 5317–5325.
24. Braud A. New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway / A. Braud, F. Hoegy, K. Jezequel, T. Lebeau et al. // Environ. Microbiol. – 2009b. – 11. – P. 1079–1091.
25. Braun V. Surface signaling: novel transcription initiation mechanism starting from the cell surface / V. Braun // Arch. Microbiol. – 1997. – 167. – P. 325–331.

26. Braun V. Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation / V. Braun, K. Hantke, W. Koster // *Met. Ions Biol. Syst.* – 1998. – 35. – P. 67–145.
27. Braun V. Recent insights into iron import by bacteria / V. Braun, K. Hantke // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2011. – 15. – P. 328–334.
28. Brickman T.J. Purification, spectroscopic analysis, and biological activity of the macrocyclic dihydroxamate siderophore alcaligin produced by *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica* / T.J. Brickman, J.-G. Hansel, M.J. Miller, S.K. Armstrong // *BioMetals*. – 1996. – 9. – P. 191–203.
29. Brickman T.J. Essential role of the iron-regulated outer membrane receptor FauA in alcaligin siderophore-mediated iron uptake in *Bordetella* species. / T.J. Brickman, S.K. Armstrong // *J. Bacteriol.* – 1999. – 181. – P. 5958–5966.
30. Brickman T.J. Transcriptional activation of *Bordetella alcaligin* siderophore genes requires the AlcR regulator with alcaligin as inducer / T.J. Brickman, H.Y. Kang, S.K. Armstrong // *J. Bacteriol.* – 2001. – 183. – P. 483–489.
31. Budzikiewicz H. Schizokinen, the siderophore of the plant deleterious bacterium *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* ATCC 11696 / H. Budzikiewicz, M. Munzinger, K. Taraz, J.M. Meyer // *Z. Naturforsch.* – 1997. – 52c. – P. 496–503.
32. Budzikiewicz H. Microbial Siderophores / H. Budzikiewicz // *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* – 2010. – 92. – P. 1–75.
33. Bullerjahn G.S. Physiology and molecular biology of aquatic cyanobacteria / G.S. Bullerjahn, A.F. Post // *Front. Microbiol.* – 2014. – 5. – P. 359.
34. Byers B.R. Iron chelating hydroxamic acid (schizokinen) active in initiation of cell division in *Bacillus megaterium* / B.R. Byers, M.V. Powell, C.E. Lankford // *J. Bacteriol.* – 1967. – 93. – P. 286–294.
35. Byrne R.H. Solubility of hydrous ferric oxide and iron speciation in seawater / R.H. Byrne, D.R. Kester // *Mar. Chem.* – 1976. – 4. – P. 255–274.
36. Capela D. Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021 / D. Capela, F. Barloy-Hubler, J. Gouzy, G. Bothe et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2001. – 98. – P. 9877–9882.
37. Carbonetti N.H. A cluster of five genes specifying the aerobactin iron uptake system of plasmid ColVK30 / N.H. Carbonetti, P.H. Williams // *Infect. Immun.* – 1984. – 46. – P. 7–12.

38. Cartron M.L. Feo – transport of ferrous iron into bacteria / M.L. Cartron, S. Maddocks, P. Gillingham, C.J. Craven et al. // *BioMetals*. – 2006. – 19. – P. 143–157.
39. Cassier-Chauvat C. Genomics of the resistance to metal and oxidative stresses in cyanobacteria / C. Cassier-Chauvat, F. Chauvat // *Stress and environmental regulation of gene expression and adaptation in bacteria* [de Bruijn F.J. (edc)]. – USA, New Jersey, Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2016. – Ch. 20.3.
40. Challis G.L. A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases / G.L. Challis // *ChemBioChem*. – 2005. – 6(4). – P. 601–611.
41. Chen M. Accelerated uptake by phytoplankton of iron bound to humic acids / M. Chen, W. Wang // *Aquat. Biol.* – 2008. – 3. – P. 155–166.
42. Chomczynski P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // *Anal. Biochem.* – 1987. – 162. – P. 156–159.
43. Chu B.C. Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view / B.C. Chu, A. Garcia-Herrero, T.H. Johanson, K.D. Krewulak et al. // *BioMetals*. – 2010. – 23. – P. 601–611.
44. Clarke S.E. Induction of siderophore activity in *Anabaena spp.* and moderation of copper toxicity / S.E. Clarke, J. Stuart, J. Sanders-Loehr // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1987. – 53. – P. 917–922.
45. Cornell R.M. The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses, 2nd edn / R.M. Cornell, U. Schwertmann. – Hoboken: Wiley, 2006. – 705 p.
46. Creutz C. The complexities of ascorbate as a reducing agent / C. Creutz // *Inorg. Chem.* – 1981. – 20. – P. 4449–4452.
47. Davidson A.L. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems / A.L. Davidson, E. Dassa, C. Orelle, J. Chen // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2008. – 72. – P. 317–364.
48. De Baar H.J.W. Synthesis of iron fertilization experiments: from the Iron age in the age of enlightenment / H.J.W. De Baar, P.W. Boyd, K.H. Coale, M.R. Landry et al. // *J. Geophys. Res.* – 2005. – 110. – C09S16.

49. De Lorenzo V. Fur (ferric uptake regulation) protein and CAP (catabolite activator protein) modulate transcription of fur gene in *Escherichia coli* / V. De Lorenzo, M. Herrero, F. Giovannini, B. Neilands // Eur. J. Biochem. – 1988. – 173. – P. 1537–1546.
50. Dertz E.A. Bacillibactin-mediated iron transport in *Bacillus subtilis* / E.A. Dertz, J. Xu, A. Stintzi, K.N. Raymond // J. Am. Chem. Soc. – 2006. – 128. – P. 22–23.
51. Dhungana S. Kinetics of iron release from ferric binding protein (FbpA): mechanistic implications in bacterial periplasm-to-cytosol Fe³⁺ transport / S. Dhungana, D.S. Anderson, T.A. Mietzner, A.L. Crumbliss // Biochemistry. – 2005. – 44. – P. 9606–9618.
52. Du L. Biosynthesis of hybrid peptide-polyketide natural products / L. Du, B. Shen // Curr. Opin. Drug. Discov. Devel. – 2001. – 4. – P. 215–228.
53. Ehrenreich I.M. Distribution and diversity of natural product genes in marine and freshwater cyanobacterial cultures and genomes / I.M. Ehrenreich, J.B. Waterbury, E.A. Webb // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – 71. – P. 7401–7413.
54. Escolar L. Binding of the Fur (ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence / L. Escolar, J. Perez-Martin, V. De Lorenzo // J. Mol. Biol. – 1998. – 283. – P. 537–547.
55. Escolar L. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein / L. Escolar, J. Perez-Martin, V. De Lorenzo // J. Bacteriol. – 1999. – 181. – P. 6223–6229.
56. Estep M. Evidence for the occurrence of specific iron (III)-binding compounds in near-shore marine ecosystems / M. Estep, J.E. Armstrong, C. van Baalen // App. Microbiol. – 1975. – 30. – P. 186–188.
57. Fairman J.W. The structural biology of beta-barrel membrane proteins: a summary of recent reports / J.W. Fairman, N. Noinaj, S.K. Buchanan // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2011. – 21. – P. 523–531.
58. Falkowski P.G. Photosynthesis: the paradox carbon dioxide efflux / P.G. Falkowski // Curr. Bio. – 1997. – 7. – P. R637–R639.
59. Faraldo-Gómez J.D. Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria / J.D. Faraldo-Gómez, M.S.P. Sansom // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2003. – 4. – P. 105–116.
60. Ferguson A.D. Crystal structure of the antibiotic albomycin in complex with the outer membrane transporter FhuA / A.D. Ferguson, V. Braun, H.P. Fiedler, J.W. Coulton et al. // Protein Sci. – 2000. – 9. – P. 956–963.

61. Fetherston J.D. YbtA, an AraC-type regulator of the *Yersinia pestis* pesticin/yersiniabactin receptor / J.D. Fetherston, S.W. Bearden, R.D. Perry // Mol. Microbiol. – 1996. – 22. – P. 315–325.
62. Fillat M.F. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators / M.F. Fillat // Arch. Biochem.o Biophys. – 2014. – 546. – P. 41–52.
63. Fiore M.F. Cell composition and metal tolerance in cyanobacteria / M.F. Fiore, J.T. Trevors J. // BioMetals. – 1994. – 7. – P. 83–103.
64. Fischer E. Involvement of ExbB and TonB in transport across the outer membrane of *Escherichia coli*: phenotypic complementation of Exb mutants by overexpressed TonB and physical stabilization of TonB by ExbB / E. Fischer, K. Günter, V. Braun // J. Bacteriol. – 1989. – 171. – P. 5127–5134.
65. Flombaum P. Present and future global distributions of the marine cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus* // P. Flombaum, J.L. Gallegos, R.A. Gordillo, J. Rincón et al. / Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2013. – 110. – P. 9824–9829.
66. Frausto da Silva J.J.R. The biological chemistry of the elements: The inorganic chemistry of life (2nd ed.) / J.J.R. Frausto da Silva, R.J.P Williams. – Oxford: University Press, 2001. – 575 p.
67. Fuchs R. Siderotyping: a powerful tool for the characterization of pyoverdines / R. Fuchs, M. Schafer, V. Geoffroy, J.M. Meyer // Curr. Top. Med. Chem. – 2001. – 1. – P. 31–57.
68. Fujii M. Iron uptake by toxic and nontoxic strains of *Microcystis aeruginosa* / M. Fujii, A.L. Rose, T.D. Waite // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – 77. – P. 7068–7071.
69. Fujii M. Competitive effects of calcium and magnesium ions on the photochemical transformation and associated cellular uptake of iron by the fresh water cyanobacterial phytoplankton *Microcystis aeruginosa* / M. Fujii, A.C.Y. Yeung, T.D. Waite // Environ. Sci. Technol. – 2015. – 49. – P. 9133–9142.
70. Gallegos M.T. Arac/XylS family of transcriptional regulators / M.T. Gallegos, Schleif R., Bairoch A., Hofmann K. et al. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1997. – 61. – P. 393–410.
71. Garcia-Pichel F. The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria / F. Garcia-Pichel, U. Nübel, G. Muyzer // Arch. Mikrobiol. – 1998. – 169. – P. 469–482.
72. Garcia-Pichel F. Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado Plateau / F. Garcia-Pichel, A. López-Cortés, U. Nübel // Appl. Environ. Microb. – 2001. – 67. – P. 1902–1910.

73. Ghassemian M. Fur regulates the expression of iron-stress genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 / M. Ghassemian, N. Straus // J. Microbiol. – 1996. – 142. – P. 1469–1476.
74. Gibson F. The isolation and characterization of a hydroxamic acid (aerobactin) formed by *Aerobacter aerogenes* 62-1 / F. Gibson, D.I. Magrath // Biochim. Biophys. Acta. – 1969. – 192. – P. 175–184.
75. Gledhill M. Determination of complexation of iron(III) with natural organic complexing ligands in seawater using cathodic stripping voltammetry / M. Gledhill, C.M.G. van den Berg // Mar. Chem. – 1994. – 47. – P. 41–54.
76. Gledhill M. The organic complexation of iron in the marine environment: a review / M. Gledhill, K.N. Buck // Front. Microbiol. – 2012. – 3. – P. 69.
77. Goldman S.J. Siderophore-mediated uptake in different strains of *Anabaena* sp. / S.J. Goldman, P.J. Lammers, M.S. Berman, J. Sanders-Loehr // J. Bacteriol. – 1983. – 156. – P. 1144–1150.
78. González A. Overexpression of FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120 reveals new targets for this regulator involved in photosynthesis, iron uptake and cellular morphology / A. González, M.T. Bes, F. Barja, M.L. Peleato et al. // Plant. Cell Physiol. – 2010. – 51. – P. 1900–1914.
79. González A. Unravelling the regulatory function of FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120 through 2-D DIGE proteomic analysis / A. González, M.T. Bes, M.L. Peleato, M.F. Fillat // J. Proteom. – 2011. – 74(5). – P. 660–671.
80. González A. FurA is the master regulator of iron homeostasis and modulates the expression of tetrapyrrole biosynthesis genes in *Anabaena* sp. PCC 7120 / A. González, M.T. Bes, A. Valladares, M.L. Peleato et al. // Environ. Microbiol. – 2012. – 14(12). P. 3175–3187.
81. González A. FurA influences heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. PCC 7120 / A. González, A. Valladares, M.L. Peleato, M.F. Fillat // FEBS Lett. – 2013. – 587(16). – P. 2682–2690.
82. González A. The FurA regulon in sp. PCC 7120: *In silico* prediction and experimental validation of novel target genes / A. González, V.E. Angarica, J. Sancho, M.F. Fillat // Nucleic Acids Res. – 2014. – 42(8). – P. 4833–4846.
83. González A. Expanding the role of FurA as essential global regulator in cyanobacteria / A. González, M.T. Bes, M.L. Peleato, M.F. Fillat // PLoS One. – 2016. – 11(3). – e0151384.
84. Gough J. Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules / J. Gough, N. Murray // J. Mol. Biol. – 1983. – 166. – P. 1–19.

85. Greenwald J. FpvA bound to non-cognate pyoverdines: molecular basis of siderophore recognition by an iron transporter / J. Greenwald, M. Nader, H. Celia, C. Gruffaz et al. // Mol. Microbiol. – 2009. – 72. – P. 1246–1259.
86. Griese M. Ploidy in cyanobacteria / M. Griese, C. Lange, J. Soppa // FEMS Microbiol. Lett. – 2012. – 323. – P. 124–131.
87. Grigorieva G. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803 / G. Grigorieva, S. Shestakov // FEMS Microbiol. Lett. – 1982. – 13. – P. 367–370.
88. Hannauer M. The ferrichrome uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa* involves an iron release mechanism with acylation of the siderophore and a recycling of the modified desferrichrome / M. Hannauer, Y. Barda, G.L. Mislin, A. Shanzer et al. // J. Bacteriol. – 2010. – 192. – P. 1212–1220.
89. Hannauer M. The PvdRT-OpmQ efflux pump controls the metal selectivity of the iron uptake pathway mediated by the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* / M. Hannauer, A. Braud, F. Hoegy, P. Ronot et al. // Environ. Microbiol. – 2012. – 14. – P. 1696–1708.
90. Hantke K. Iron and metal regulation in bacteria / K. Hantke // Curr. Opin. Microbiol. – 2001. – 4(2). – P. 172–177.
91. Hantke K. Is the bacterial ferrous iron transporter FeoB a living fossil? / K. Hantke // Trends Microbiol. – 2003. – 11. – P. 192–195.
92. Harrington J.M. The redox hypothesis in siderophore-mediated iron uptake / J.M. Harrington, A.L. Crumbliss // BioMetals. – 2009. – 22. – P. 679–689.
93. Hartman A. Iron transport in *Escherichia coli*: uptake and modification of ferrichrome / A. Hartman, V. Braun // J. Bacteriol. – 1980. – 143. – P. 246–255.
94. Haygood M.G. Aerobactin production by a planktonic marine *Vibrio* sp. / P.D. Holt, A. Butler // Limnol. Oceanogr. – 1993. – 38. – P. 1091–1097.
95. Heinrichs D. PchR, a regulator of ferripyochelin receptor gene (*fptA*) expression in *Pseudomonas aeruginosa*, functions both as an activator and as a repressor / D. Heinrichs, K. Poole // J. Bacteriol. – 1996. – 178. – P. 2586–2592.
96. Hernández J.A. Three *fur* homologues from *Anabaena* sp. PCC 7120: exploring reciprocal protein-protein promoter recognition / J.A. Hernández, S. López-Gomollón, M.T. Bes, M.F. Fillat et al. // FEMS Microbiol. Lett. – 2004. – 236. – P. 275–282.

97. Hernández J.A. Identification of a *furA* cis antisense RNA in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 / J.A. Hernández, A.M. Muro-Pastor, E. Flores, M.T. Bes et al. // J. Mol. Biol. – 2006a. – 355. – P. 325–334.
98. Hernández J.A. Interaction of FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120 with DNA: a reducing environment and the presence of Mn²⁺ are positive effectors in the binding to *isiB* and *furA* promoters / J.A. Hernández, S. López-Gomollón, A. Muro-Pastor, A. Valladares et al. // BioMetals. – 2006 – 19. – P. 259–268.
99. Hernández-Prieto M.A. Iron deprivation in *Synechocystis*: inference of pathways, non-coding RNAs, and regulatory elements from comprehensive expression profiling / M.A. Hernández-Prieto, V. Schön, J. Georg, L. Barreira et al. // G3 (Bethesda). – 2012. – 2. – P. 1475–1495.
100. Hider R.C. Chemistry and biology of siderophores / R.C. Hider, X. Kong // Nat. Prod. Rep. – 2011. – 27. – P. 637–657.
101. Hoegy F. Stereospecificity of the siderophore pyochelin outer membrane transporters in fluorescent pseudomonads / F. Hoegy, X. Lee, S. Noel, G.L. Mislin et al. // J. Biol. Chem. – 2009. – 284. – P. 14949–14957.
102. Hoegy F. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to catechol-substituted cephalosporin is unrelated to the pyochelin-Fe transporter FptA / F. Hoegy, M.N. Gwynn, I.J. Schalk // Amino Acids. – 2010. – 38. – P. 1627–1629.
103. Hoffman L. Marine cyanobacteria in tropical regions: diversity and ecology / L. Hoffman // Eur. J. Phycol. – 1999. – 34. – P. 371–379.
104. Hollander A. The iron-repressed, AraC-like regulator MpeR activates expression of *fetA* in *Neisseria gonorrhoeae* / A. Hollander, A.D. Mercante, W.M. Shafer, C.N. Cornelissen // Infect. Immun. – 2011. – 79. – P. 4764–4776.
105. Hopkinson B.M. The role of siderophores in iron acquisition by photosynthetic marine microorganisms / B.M. Hopkinson, F.M. Morel // BioMetals. – 2009. – 22. P. 659–669.
106. Hopkinson B.M. Iron transporters in marine prokaryotic genomes and metagenomes / B.M. Hopkinson, K. Barbeau, // Environ. Microbiol. – 2012. – 14(1). – P. 114–128.
107. Houot L. Cadmium triggers an integrated reprogramming of the metabolism of *Synechocystis PCC6803*, under the control of the Slr1738 regulator / L. Houot, M. Floutier, B. Marteyn, M. Michaut et al. // BMC Genomics. – 2007. – 8. – P. 350.

108. Huang F. Proteomics of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: identification of plasma membrane proteins / F. Huang, I. Parmryd, F. Nilsson, A.L. Persson et al. // Mol. Cell Proteom. – 2002. – 1. – P. 956–966.
109. Hudson R.J.M. Distinguishing between extra- and intracellular iron in marine phytoplankton / R.J.M. Hudson, F.M.M. Morel // Limnol. Oceanogr. – 1989. – 34. – P. 1113–1120.
110. Hunter K.A. Iron-binding ligands and their role in the ocean biogeochemistry of iron / K.A. Hunter, P.W. Boyd // Environ. Chem. – 2007. – 4. – P. 221–232.
111. Hvorup R.N. Asymmetry in the structure of the ABC transporter-binding protein complex BtuCD-BtuF / R.N. Hvorup, B.A. Goetz, M. Niederer, K. Hollenstein et al. // Science. – 2007. – 317. – P. 1387–1390.
112. Imai A. Effect of iron limitation and aquatic humic substances on the growth of *Microcystis aeruginosa* / A. Imai, T. Fukushima, K. Matsushige // Can. J. Fish. Aquat. Sci. – 1999. – 56. – P. 1929–1937.
113. Ito Y. Structure of synechobactins, new siderophores of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 / Y. Ito, A. Butler // Limnol. Oceanogr. – 2005. – 50. – P. 1918–1923.
114. Itou Y. Two structural isomeric siderophores from the freshwater cyanobacterium *Anabaena cylindrica* (NIES-19) / Y. Itou, S. Okada, M. Murakami // Tetrahedron. – 2001. – 57. – P. 9093–9099.
115. Jeanjean R. A large gene cluster encoding peptide synthetases and polyketide synthases is involved in production of siderophores and oxidative stress response in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 / R. Jeanjean, E. Talla, A. Latifi, M. Havaux et al. // Environ. Microbiol. – 2008. – 10. – P. 2574–2585.
116. Jiang H.B. Sl11263, a unique cation diffusion facilitator protein that promotes iron uptake in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 / H.B. Jiang, W.J. Lou, H.Y. Du, N.M. Price et al. // Plant Cell Physiol. – 2012. – 53(8). – P. 1404–17.
117. Jiang H.B. New insights into iron acquisition by cyanobacteria: an essential role for ExbB-ExbD complex in inorganic iron uptake / H.B. Jiang, W.J. Lou, W.T. Ke, W.Y. Song et al. // ISME J. – 2015. – 9. – P. 297–309.
118. Johnson K.S. What controls dissolved iron concentrations in the world ocean?: Authors' closing comments / K.S. Johnson, R.M. Gordon, K.H. Coale // Mar. Chem. – 1997. – 57 (3–4). – P. 181–186.

119. Kaneko T. Sequence analysis of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions / T. Kaneko, S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka et al. // DNA Res. – 1996. – 3. – P. 109–136.
120. Kaneko T. Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 / T. Kaneko, Y. Nakamura, C.P. Wolk, T. Kuritz et al. // DNA Res. – 2001. – 8. – P. 205–213; 227–253.
121. Karl D. The role of nitrogen fixation in biogeochemical cycling in the subtropical North Pacific Ocean / D. Karl, R. Letelier, L. Tupas, J. Dore et al. // Nature. – 1997. – 388. – P. 533–538.
122. Karl D. Dinitrogen fixation in the world's oceans / D. Karl, A. Michaels, B. Bergman, D. Capone et al. // Biogeochem. – 2002. – 57. – P. 47–98.
123. Katoh H. A gene of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 encoding a novel Iron transporter / H. Katoh, A. R. Grossman, N. Hagino, T. Ogawa // J. Bacteriol. – 2000. – 182. – P. 6523–6524.
124. Katoh H. Genes essential to Iron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 / H. Katoh, N. Hagino, A.R. Grossman, T. Ogawa // J. Bacteriol. – 2001a. – 183. – P. 2779–2784.
125. Katoh H. Iron-binding activity of FetA1 subunit of an ABC-type iron transporter in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 / H. Katoh, N. Hagino, T. Ogawa // Plant Cell Physiol. – 2001b. – 42. – P. 823–827.
126. Keren N. Critical roles of bacterioferritins in iron storage and proliferation of cyanobacteria / N. Keren, R. Aurora, H.B. Pakrasi // Plant. Physiol. – 2004. – 135. – P. 1666–1673.
127. Kerry A. Influence of iron limitation and nitrogen source on growth and siderophore production by cyanobacteria / A. Kerry, D.E. Laudenbach, C.G. Trick // J. Phycol. – 1988. – 24. – P. 566–571.
128. Kirilovsky D. Structural, mechanistic and genomic insights into OCP-mediated photoprotection / D. Kirilovsky, C.A. Kerfeld // Adv. Bot. Res. – 2013. – 65. – P. 1–26.
129. Klausner R.D. Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism / R.D. Klausner, T.A. Rouault, J.B. Harford // Cell. – 1993. – 72. – P. 19–28.
130. Kopf M. Comparative analysis of the primary transcriptome of *Synechocystis* sp. PCC 6803 / M. Kopf, S. Klähn, I. Scholz, J.K.F. Matthiessen et al. // DNA Res. – 2014. – 21. – P. 527–539.

131. Köster W. Transport of iron(III) hydroxamates across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* / W. Köster // Trautwein AX (ed) Bioinorganic chemistry, transition metals in biology and their coordination chemistry. – Weinheim: Wiley-VCH, 1997. – P. 56–68.
132. Köster W. ABC transporter mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12 / W. Köster // Res. Microbiol. – 2001. – 152. – P. 291–301.
133. Kraemer S. Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores / S. Kraemer // Aquatic Sciences. – 2004. – 66. – P. 3–18.
134. Kranzler C. The role of reduction in iron uptake processes in a unicellular, planktonic cyanobacterium / C. Kranzler, H. Lis, Y. Shaked, N. Keren // Environ. Microbiol. – 2011. – 13. – P. 2990–2999.
135. Kranzler C. Iron in cyanobacteria / C. Kranzler, M. Rudolf, N. Keren, E. Schleiff // Adv. Bot. Res. – 2013. – 65. – P. 57–105.
136. Kranzler C. Coordinated transporter activity shapes high-affinity iron acquisition in cyanobacteria / C. Kranzler, H. Lis, O.M. Finkel, G. Schmetterer et al. // ISME J. – 2014. – 8. – P. 409–417.
137. Krewulak K.D. Structural biology of bacterial iron uptake / K.D. Krewulak, H.J. Vogel // Biochim. Biophys. Acta. – 2008. – 1778(9). – P. 1781–1804.
138. Krone W.J.A. Subcloning of the cloacin DF13/aerobactin receptor protein and identification of a pColV-K30-determined polypeptide involved in ferric-aerobactin uptake / W.J.A. Krone, J. Luirink, G. Koningstein, B. Oudega et al. // J. Bacteriol. – 1983. – 156. – P. 945–948.
139. Kunert A. Repression by Fur is not the main mechanism controlling the iron-inducible *isiAB* operon in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 / A. Kunert, J. Vinnemeier, N. Erdmann, M. Hagemann // FEMS Microbiol. Lett. – 2003. – 227. – P. 255–262.
140. Labouré A.M. Uptake of iron from ferric-citrate in the cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6803 / A.M. Labouré, J.F. Briat // C. R. Acad. Sci. Ser III. – 1993. – 316. – P. 661–666.
141. Lamb J.J. Functional role of PilA in iron acquisition in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 / J.J. Lamb, R.E. Hill, J.J. Eaton-Rye, M.F. Hohmann-Marriott // PLoS ONE. – 2014. – 9(8): e105761.
142. Latifi A. Iron starvation leads to oxidative stress in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 / A. Latifi, R. Jeanjean, S. Lemeille, M. Havaux et al. // J. Bacteriol. – 2005. – 187. – P. 6596–6598.
143. Latifi A. Oxidative stress in cyanobacteria / A. Latifi, M. Ruiz, C.C. Zhang // FEMS Microbiol. Rev. – 2009. – 33(2). – P. 258–278.

144. Lau C.K.Y. Bacterial ferrous iron transport: the Feo system / C.K.Y. Lau, K.D. Krewulak, H.J. Vogel // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2016. – 40. – P. 273–298.
145. Lee W. An evolutionary mechanism for diversity in siderophore-producing bacteria / W. Lee, M. van Baalen, V.A. Jansen // *Ecol. Lett.* – 2012. – 15. – P. 119–125.
146. Lill R. Function and biogenesis of iron–sulphur proteins / R. Lill // *Nature*. – 2009. – 460. – P. 831–838.
147. Lis H. Probing the bioavailability of organically bound iron: a case study in the *Synechococcus*-rich waters of the Gulf of Aqaba / H. Lis, Y. Shaked // *Aquat. Microb. Ecol.* – 2009. – 56. – P. 241–253.
148. Lis H. A comparative study of iron uptake rates and mechanisms amongst marine and fresh water cyanobacteria: prevalence of reductive iron uptake / H. Lis, C. Kranzler, N. Keren, Y. Shaked // *Life*. – 2015a. – 5. – P. 841–860.
149. Lis H. Iron bioavailability to phytoplankton: an empirical approach / H. Lis, Y. Shaked, C. Kranzler, N. Keren et al. // *ISME J.* – 2015b. – 9. – P. 1003–1013.
150. Llamas M.A. The heterologous siderophores ferrioxamine B and ferrichrome activate signaling pathways in *Pseudomonas aeruginosa* / M.A. Llamas, M. Sparrius, R. Kloet, C.R. Jimenez et al. // *J. Bacteriol.* – 2006. – 188. – P. 1882–1891.
151. Loomis L. Solution equilibria of enterobactin complexes / L. Loomis, K.N. Raymond // *Inorg. Chem.* – 1991. – 30. – P. 906–911.
152. López-Gomollón S. Interaction of FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120 with DNA: a reducing environment and the presence of Mn(2+) are positive effectors in the binding to *isiB* and *furA* promoters / S. López-Gomollón, A. Muro-Pastor, A. Valladares et al. // *BioMetals*. – 2006. – 19. – P. 259–268.
153. Luck S.N. Ferric dicitrate transport system (Fec) of *Shigella flexneri* 2a YSH6000 is encoded on a novel pathogenicity island carrying multiple antibiotic resistance genes / S.N. Luck, S.A. Turner, K. Rajakumar, H. Sakellaris et al. // *Infect. Immun.* – 2001. – 69. – P. 6012–6021.
154. Ludwig M. Fur-type transcriptional repressors and metal homeostasis in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 / M. Ludwig, T.T. Chua, C.Y. Chew, D.A. Bryant // *Front. Microbiol.* – 2015. – 6. – P. 1217.
155. Mademidis A. ATP-dependent ferric hydroxamate transport system in *Escherichia coli*: periplasmic FhuD interacts with a periplasmic and with a transmembrane/cytoplasmic region of the integral membrane protein FhuB, as revealed by competitive peptide mapping / A.

Mademidis, H. Killmann, W. Kraas, I. Flechsler et al. // Mol. Microbiol. – 1997. – 26. – P. 1109–1123.

156. Mademidis A. Transport activity of FhuA, FhuC, FhuD, and FhuB derivatives in a system free of polar effects, and stoichiometry of components involved in ferrichrome uptake / A. Mademidis, W. Koster // Mol. Gen. Genet. – 1998. – 258. – P. 156–165.
157. Mann E.L. Iron limits the cell division rate of *Prochlorococcus* in the eastern equatorial Pacific / E.L. Mann, S.W. Chisholm // Limnol. Oceanogr. – 2000. – 45. – P. 1067–1076.
158. Marahiel M.A. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis / M.A. Marahiel, T. Stachelhaus, H.D. Mootz // Chem. Rev. – 1997. – 97. – P. 2651–2674.
159. Martin J.H. The case for iron / J.H. Martin, R.M. Gordon, S.E. Fitzwater // Limnol. Oceanogr. – 1991. – 36. – P. 1793–1802.
160. Martin J.H. Testing the iron hypothesis in ecosystems of the equatorial Pacific Ocean / J.H. Martin, K.H. Coale, K.S. Johnson, S.E. Fitzwater et al. // Nature. – 1994. – 371. – P. 123–129.
161. Matzanke B.F. FhuF, part of a siderophore-reductase system / B.F. Matzanke, S. Anemuller, V. Schunemann, A.X. Trautwein et al. // Biochemistry. – 2004. – 43. – P. 1386–1392.
162. McHugh J. Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli* – a new mechanism for iron homeostasis / J. McHugh, F. Rodriguez-Quinones, H. Abdul-Tehrani, D. Svistunenko et al. // J. Biol. Chem. – 2003. – 278(32). – P. 29478–29486.
163. McKnight D.M. Release of weak and strong copper-complexing agents by algae / D.M. McKnight, F.M.M. Morel // Limnol. Oceanogr. – 1979. – 24. – P. 823–837.
164. McKnight M.D. Copper complexation by siderophores from filamentous blue-green algae / D.M. McKnight, F.M.M. Morel // Limnol. Oceanogr. – 1980. – 25. – P. 62–71.
165. McKay R.M.L. Consideration of the bioavailability of iron in the North American Great Lakes: development of novel approaches toward understanding iron biogeochemistry / R.M.L. McKay, G.S. Bullerjahn, D. Porta, E.T. Brown et al. // Aquat. Ecosyst. Health Manag. – 2004. – 7. – P. 475–490.
166. Mei B. *Sid1*, a gene initiating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis* – molecular characterization, regulation by iron, and role in phytopathogenicity / B. Mei, A. Budde, S. Leong // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1993. – 90(3). – P. 903–907.
167. Meyer R.J. Genetic organization of the broad-host-range IncP-1 plasmid R751 / R.J. Meyer, J.A. Shapiro // J. Bacteriol. – 1980. – 143. – P. 1362–1373.

168. Michel K.P. Unusual regulatory elements for iron deficiency induction of the *idiA* gene of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 / K.P. Michel, E.K. Pistorius, S.S. Golden // J. Bacteriol. – 2001. – 183. – P. 5015–5024.
169. Michel L. PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of *Pseudomonas aeruginosa* requires the siderophore pyochelin as an effector / L. Michel, N. González, S. Jagdeep, T. Nguyen-Ngoc et al. // Mol. Microbiol. – 2005. – 58(2). – P. 495–509.
170. Mies K.A. Ternary complex formation facilitates a redox mechanism for iron release from a siderophore / K.A. Mies, J.L. Wirgau, A.L. Crumbliss // BioMetals. – 2006. – 19. – P. 115–126.
171. Miethke M. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control / M. Miethke, M.A. Marahiel // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2007. – 71. – P. 413–451.
172. Millero F.J. The oxidation kinetics of Fe(II) in seawater / F.J. Millero, S. Sotolongo, M. Izaguirre // Geochim. Cosmochim. Acta. – 1987. – 51. – P. 793–801.
173. Millis K.K. Oxidation/reduction potential of glutathione / K.K. Millis, K.H. Weaver, D.L. Rabenstein // J. Org. Chem. – 1993. – 58. – P. 4144–4146.
174. Mirus O. TonB-dependent transporters and their occurrence in cyanobacteria / O. Mirus, S. Strauss, K. Nicolaisen, A. von Haeseler et al. // BMC Biology. – 2009. – 7. – P. 68.
175. Mislin G.L.A. Binding properties of pyochelin and structurally related molecules to FptA of *Pseudomonas aeruginosa* / G.L.A. Mislin, F. Hoegy, D. Cobessi, K/ Poole et al. // J. Mol. Biol. – 2006. – 357. – P. 1437–1448.
176. Morel F.M.M. The role of unchelated Fe in the iron nutrition of phytoplankton / F.M.M. Morel, A.B. Kustka, Y. Shaked // Limnol. Oceanogr. – 2008. – 53. – P. 400–404.
177. Morrissey J. Iron utilization in marine cyanobacteria and eukaryotic algae / J. Morrissey, C. Bowler // Front. Microbiol. – 2012. – 3. – P. 43.
178. Mullis K.B. Structure of schizokinen, an iron-transport compound from *Bacillus megaterium* / K.B. Mullis, J.R. Pollack, J.B. Neilands // Biochemistry. – 1971. – 10. – P. 4894–4898.
179. Mur L.R. Cyanobacteria in the environment / L.R. Mur, O.M. Skulberg, H. Utkilen // Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences and management [I. Chorus, J. Bartram (Eds.)]. – London, UK: E&FN Spon, 1999. – P. 25–54.
180. Murphy T.P. Blue-green algae: their excretion of ironselective chelators enables them to dominate other algae / T.P. Murphy, D.R. Lean, C. Nalewajko // Science. – 1976. – 192. – P. 900–902.

181. Nagai T. Voltammetric determination of dissolved iron and its speciation in freshwater / T. Nagai, A. Imai, K. Matsushige, K. Yokoi et al. // Limnology. – 2004. – 5. – P. 87–94.
182. Naka H. Two ABC transporter systems participate in siderophore transport in the marine pathogen *Vibrio anguillarum* 775 (pJM1) / H. Naka, M. Liu, J.H. Crosa // FEMS Microbiol. Lett. – 2013. – 341(2). – P. 79–86.
183. Neilands J.B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds / J.B. Neilands // J. Biol. Chem. – 1995. – 270. – P. 26723–26726.
184. Nicolaisen K. Alr0397 is an outer membrane transporter for the siderophore schizokinen in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 / K. Nicolaisen, S. Moslavac, A. Samborski, M. Valdebenito et al. // J. Bacteriol. – 2008. – 190. – P. 7500–7507.
185. Nikawa J. PCR- and ligation-mediated synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae* / J. Nikawa, M. Kawabata // Nucleic Acids Res. – 1998. – 26. – P. 860–861.
186. Noinaj N. TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function / N. Noinaj, M. Guillier, T.J. Barnard, S.K. Buchanan // Annu. Rev. Microbiol. – 2010. – 64. – P. 43–60.
187. Nübel U. The halotolerance and phylogeny of cyanobacteria with helical tightly coiled trichomes (*Spirulina* spp. Turpin) and the description of *Halospira tapetiscola* gen. nov. sp. nov. / U. Nübel, F. Garcia-Pichel, G. Muyzer // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2000. – 50. – P. 1265–1277.
188. Odom W. R. Characterization of *Synechocystis* sp. PCC 6803 in iron-supplied and iron-deficient media / W. R. Odom, R. Hodges, P. R. Chitnis, J. A. Guikema // Plant. Mol. Biol. – 1993. – 23(6). – P. 1255–1264.
189. Ó Cuív P. Identification of *rhtX* and *fptX*, novel genes encoding proteins that show homology and function in the utilization of the siderophores rhizobactin 1021 by *Sinorhizobium meliloti* and pyochelin by 240 *Pseudomonas aeruginosa*, respectively / P. Ó Cuív, P. Clarke, D. Lynch, M. O'Connell // J. Bacteriol. – 2004. – 186(10). – P. 2996–3005.
190. Ó Cuív P. The *hmuUV* genes of *Sinorhizobium meliloti* 2011 encode the permease and ATPase components of an ABC transport system for the utilization of both haem and the hydroxamate siderophores, ferrichrome and ferrioxamine B / P. Ó Cuív, D. Keogh, P. Clarke, M. O'Connell // Mol. Microbiol. – 2008. – 70(5). – P. 1261–1273.
191. Ollinger J. Role of the Fur regulon in iron transport in *Bacillus subtilis* / J. Ollinger, K.B. Song, H. Antelmann, M. Hecker et al. // J. Bacteriol. – 2006. – 188. – P. 3664–3673.

192. Pace N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere / N.R. Pace // Science. – 1997. – 276. – P. 734–740.
193. Palyada K. Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni* / K. Palyada, D. Threadgill, A. Stintzi // J. Bacteriol. – 2004. – 186. – P. 4714–4729.
194. Pi H. Sequential induction of Fur-regulated genes in response to iron limitation in *Bacillus subtilis* / H. Pi, J.D. Helmann // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2017. – 114. – P. 12785–12790.
195. Poole K. Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: many roads lead to Rome / K. Poole, G.A. McKay // Front Biosci. – 2003. – 8. – P. d661–d686.
196. Posey J.E. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen / J.E. Posey, F.C. Gherardini // Science. – 2000. – 288. – P. 1651–1653.
197. Postle K. TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes / K. Postle, R.A. Larsen // BioMetals. – 2007. – 20. – P. 453–465.
198. Prentki P. *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment / P. Prentki, H.M. Krisch // Gene. – 1984. – 29. – P. 303–313.
199. Raines D.J. Siderophores / D.J. Raines, T.J. Sanderson, E.J. Wilde, A.-K. Duhme-Klair // Reference module in chemistry, molecular sciences and chemical engineering. – Waltham: Elsevier, 2015. – P. 1–32.
200. Raymond K.N. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport / K.N. Raymond, E.A. Dertz, S.S. Kim // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – 100. – P. 3584–3588.
201. Raymond K.N. Coordination chemistry of microbial iron transport / K.N. Raymond, B.E. Allred, A.K. Sia // Acc. Chem. Res. – 2015. – 48. – P. 2496–2505.
202. Rich H.W. Availability of well-defined iron colloids to the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* / H.W. Rich, F.M.M. Morel // Limnol. Oceanogr. – 1990. – 35. – P. 652–662.
203. Rippka R. Genetic assignment, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria / R. Rippka, J. Desrulles, J.B. Waterbury, M. Herdman et al. // J. Gen. Microbiol. – 1979. – 11. – p. 1–61.
204. Rose A.L. Use of superoxide as an electron shuttle for iron acquisition by the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscule* / A.L. Rose, T.P. Salmon, T. Lukonkeh, B.A. Neilan et al. // Environ. Sci. Technol. – 2005. – 39. – P. 3708–3715.

205. Rue E.L. Complexation of iron(III) by natural organic ligands in the Central North Pacific as determined by a new competitive ligand equilibration/adsorptive cathodic stripping voltammetric method / E.L. Rue, K.W. Bruland // Mar. Chem. – 1995. – 50. – P. 117–138.
206. Rudolf M. Multiple modes of iron uptake by the filamentous, siderophore-producing cyanobacterium, *Anabaena* sp. PCC 7120 / M. Rudolf, C. Kranzler, H. Lis, K. Margulis et al. // Mol. Microbiol. – 2015. – 97. – P. 577–588.
207. Rudolf M. Multiplicity and specificity of siderophore uptake in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 / M. Rudolf, M. Stevanovic, C. Kranzler, R. Pernil et al. // Plant. Mol. Biol. – 2016. – 92. – P. 57–69.
208. Sambrook J. Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd Ed. / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. – NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 626 p.
209. Schalk I.J. Metal trafficking via siderophores in Gram-negative bacteria: specificities and characteristics of the pyoverdine pathway / I.J. Schalk // J. Inorg. Biochem. – 2008. – 102. – P. 1159–1169.
210. Schalk I.J. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance / I.J. Schalk, M. Hannauer, A. Braud // Environ. Microbiol. – 2011. – 13. – P. 2844–2854.
211. Schalk I.J. Structure, function and binding selectivity and stereoselectivity of siderophore-iron outer membrane transporters / I.J. Schalk, G.L. Mislin, K. Brillet // Curr. Top Membr. – 2012. – 69. – P. 37–66.
212. Schauer K. New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the ‘tip of the iceberg’? / K. Schauer, D.A. Rodionov, H. de Reuse // Trends Biochem. Sci. – 2008. – 33. – P. 330–338.
213. Schleif R. AraC protein, regulation of the L-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action / R. Schleif // FEMS Microbiol. Rev. – 2010. – 34(5). – P. 779–796.
214. Schmidt W. Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants / W. Schmidt // New Phytologist. – 1999. – 141. – P. 1–26.
215. Schweizer H.P. Small broad-host-range gentamycin resistance gene cassettes for site-specific insertion and deletion mutagenesis / H.P. Schweizer // BioTechniques. – 1993. – 15. – P. 831–834.
216. Shaked Y. Disassembling iron availability to phytoplankton / Y. Shaked, H. Lis // Front. Microbiol. – 2012. – 3. – P. 123.

217. Shcolnick S. Metal homeostasis in cyanobacteria and chloroplasts. Balancing benefits and risks to the photosynthetic apparatus / S. Shcolnick, N. Keren // Plant Physiol. – 2006. – 141(3). – P. 805–810.
218. Shcolnick S. A role for *mrgA*, a DPS family protein, in the internal transport of Fe in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 / S. Shcolnick, Y. Shaked, N. Keren // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – 1767. – P. 814–819.
219. Shcolnick S. The mechanism of iron homeostasis in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its relationship to oxidative stress / S. Shcolnick, T.C. Summerfield, L. Reytman, L.A. Sherman et al. // Plant Physiol. – 2009. – 150(4). – P. 2045–2056.
220. Shea C.M. Nucleotide sequence and genetic organization of the ferric enterobactin transport system: homology to other periplasmic binding protein-dependent systems in *Escherichia coli* / C.M. Shea, M.A. McIntosh // Mol. Microbiol. – 1991. – 5. – P. 1415–1428.
221. Silva-Stenico M.E. Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity / M.E. Silva-Stenico, C.S. Silva, A.S. Lorenzi, T.K. Shishido et al. // Microbiol. Research. – 2011. – 166(3). – P. 161–175.
222. Simpson F.B. Siderochromes in cyanophyceae: isolation and characterization of schizokinen from *Anabaena* sp. / F.B. Simpson, J.B. Neilands // J. Phycol. – 1976. – 12. – P. 44–48.
223. Singh A.K. Microarray analysis of the genomewide response to iron deficiency and iron reconstitution in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 / A.K. Singh, L.M. McIntyre, L.A. Sherman // Plant Physiol. – 2003. – 132. – P. 1825–1839.
224. Soni B. Prominent role of the three *Synechocystis* PchR-like regulators in the defense against metal and oxidative stresses / B. Soni, L. Houot, C. Cassier-Chauvat, F. Chauvat // Open J. Biol. Biochem. – 2012. – 1. – P. 1.
225. Spasojevic I. Aqueous solution speciation of Fe(III) complexes with dihydroxamate siderophores alcaligin and rhodotorulic acid and synthetic analogues using electrospray ionization mass spectrometry / I. Spasojevic, H. Boukhalfa, R.D. Stevens, A.L. Crumbliss // Inorg. Chem. – 2001. – 40. – P. 49–58.
226. Stal L.J. The metabolic versatility of the mat-building cyanobacteria *Microcoleus chthonoplastes* and *Oscillatoria limosa* and its ecological significance / L.J. Stal // Arch. Hydrobiol. Suppl. – 1991. – 92. – P. 453–467.

227. Stanier R.Y. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*) / R.Y. Stanier, R. Kunisawa, M. Mandel, G. Cohen-Bazire // Bacteriol. Rev. – 1971. – 35. – P. 171–205.
228. Staudenmaier H. Nucleotide sequences of the *fecBCDE* genes and locations of the proteins suggest a periplasmic-binding-protein-dependent transport mechanism for iron(III) dicitrate in *Escherichia coli* / H. Staudenmaier, B. Vanhove, Z. Yaraghi, V. Braun // J. Bacteriol. – 1989. – 171. – P. 2626–2633.
229. Stevanovic M. The components of the putative iron transport system in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 / M. Stevanovic, A. Hahn, K. Nicolaisen, O. Mirus et al. // Environ. Microbiol. – 2012. – 14. – P. 1655–1670.
230. Stevanovic M. The response of the TonB-dependent transport network in *Anabaena* sp. PCC 7120 to cell density and metal availability / M. Stevanovic, C. Lehmann, E. Schleiff // BioMetals. – 2013. – 26. – P. 549–560.
231. Stockner J.G. Algal picoplankton from marine and freshwater ecosystems: a multidisciplinary perspective / J.G. Stockner, N.J. Antia // Can. J. Fish. Aquat. Sci. – 1986. – 43. – P. 2472–2503.
232. Storey E.P. Characterization of ‘schizokinen’; a dihydroxamate-type siderophore produced by *Rhizobium leguminosarum* IARI 917 / E.P. Storey, R. Boghozian, J.L. Little, D.W. Lowman et al. // BioMetals. – 2006. – 19. – P. 637–649.
233. Suzuki I. Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik33 in *Synechocystis* / I. Suzuki, Y. Kanesaki, K. Mikami, M. Kanehisa et al. // Mol. Microbiol. – 2001. – 40. – P. 235–244.
234. Tang X. The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E. coli* / X. Tang, Y. Nakata, H.-O. Li, M. Zhang et al. // Nucl. Acids Res. – 1994. – 22. – P. 2857–2858.
235. Taton A. Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica: a morphological and molecular approach / A. Taton, S. Grubisic, E. Brambilla, R. DeWit et al. // Appl. Environ. Microb. – 2003. – 69. – P. 5157–5169.
236. Taton A. Polyphasic study of Antarctic cyanobacterial strains / A. Taton, S. Grubisic, D. Ertz, D.A. Hodgson et al. // J. Phycol. – 2006. – 42. – P. 1257–1270.
237. Thomas G.H. Homes for the orphans: utilization of multiple substrate-binding proteins by ABC transporters / G.H. Thomas // Mol. Microbiol. – 2010. – 75. – P. 6–9.

238. Tom-Yew S.A.L. Anion-independent iron coordination by the *Campylobacter jejuni* ferric binding protein / S.A.L. Tom-Yew, D.T. Cui, E.G. Bekker, M.E.P. Murphy // J. Biol. Chem. – 2005. – 280. – P. 9283–9290.
239. Trick C.G. Isolation and purification of siderophores produced by cyanobacteria, *Synechococcus* sp. PCC 7942 and *Anabaena variabilis* ATCC 29413 / C.G. Trick, A. Kerry // Curr. Microbiol. – 1992. – 24. – P. 241–245.
240. Twiss M.R. An investigation into iron-stimulated phytoplankton productivity in epi-pelagic lake Erie during thermal stratification using trace metal clean techniques / M.R. Twiss, J.C. Auclair, M.N. Charlton // Can. J. Fish. Aquat. Sci. – 2000. – 57. – P. 86–95.
241. Vraspir J.M. Chemistry of marine ligands and siderophores / J.M. Vraspir, A. Butler // Annu. Rev. Mar. Sci. – 2009. – 1. – P. 43–63.
242. Walker E.L. Time to pump iron: iron-deficiency-signaling mechanisms of higher plants / E.L. Walker, E.L. Connolly // Curr. Opin. Plant Biol. – 2008. – 11. – P. 530–535.
243. Wandersman C. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores / C. Wandersman, P. Delepeulaire // Annu. Rev. Microbiol. – 2004. – 58. – P. 611–647.
244. Wang C.C. An additional step in the transport of iron defined by the *tonB* locus of *Escherichia coli* / C.C. Wang, A. Newton // J. Biol. Chem. – 1971. – 246. – P. 2147–2151.
245. Ward D.M. A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities / D.M. Ward, M.J. Ferris, S.C. Nold, M.M. Bateson // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1998. – 62. – P. 1353–1370.
246. Weller R. 16S RNA sequence of uncultivated hot spring cyanobacterial mat inhabitants retrieved as randomly primed cDNA / R. Weller, J.W. Weller, D.M. Ward // Appl. Environ. Microbiol. – 1991. – 57. – P. 1146–1151.
247. Williams K.E. Outer-sphere electron-transfer reactions of ascorbate anions / K.E. Williams, J.K. Yandel // Aust. J. Chem. – 1982. – 35. – P. 1133–1144.
248. Wilhelm S.W. Iron-limited growth of cyanobacteria: multiple siderophore production is a common response / S.W. Wilhelm, C.G. Trick // Limnol. Oceanogr. – 1994. – 39. – P. 1979–1984.
249. Winterberg B. Elucidation of the complete ferrichrome A biosynthetic pathway in *Ustilago maydis* / B. Winterberg, S. Uhlmann, U. Linne, F. Lessing et al. // Mol. Microbiol. – 2010. – 75(5). – P. 1260–1271.

250. Wu J. Complexation of Fe(III) by natural organic ligands in the Northwest Atlantic Ocean by a competitive ligand equilibration method and a kinetic approach / J. Wu, G.W. Luther // Mar. Chem. – 1995. – 50. – P. 159–177.
251. Wyckoff E.E. Iron acquisition in *Vibrio cholera* / E.E. Wyckoff, A.R. Mey, S.M. Payne // BioMetals. – 2007. – 20. – P. 405–416.
252. Wyckoff E.E. The *Vibrio cholerae* VctPDGC system transports catechol siderophores and a siderophore-free iron ligand / E.E. Wyckoff, S.M. Payne // Mol. Microbiol. – 2011. – 81. – P. 1446–1458.
253. Yuan W. Characterization of the *Ustilago maydis* *sid2* gene, encoding a multidomain peptide synthetase in the ferrichrome biosynthetic gene cluster / W. Yuan, G. Gentil, A. Budde, S. Leong // J. Bacteriol. – 2001. – 183(13). – P. 4040–4051.
254. Youard Z.A. Iron acquisition with the natural siderophore enantiomers pyochelin and enantio-pyochelin in *Pseudomonas* species / Z.A. Youard, N. Wenner, C. Reimann // BioMetals. – 2011. – 24. – P. 513–522.
255. Xu H. Growth response of *Microcystis* spp. to iron enrichment in different regions of lake Taihu, China / H. Xu, G. Zhu, B. Qin, H.W. Paerl // Hydrobiologia. – 2013. – 700. – P. 187–202.
256. Xu H. Identification of an iron permease, cFTR1, in cyanobacteria involved in the iron reduction/re-oxidation uptake pathway / H. Xu, G.W. Qiu, W.G. Lou, Z.K. Li et al. // Environ. Microbiol. – 2016. – 18. – P. 5005–5017.
257. Zappa S. Iron homeostasis in the *Rhodobacter* genus / S. Zappa, C.E. Bauer // Adv. Bot. Res. – 2013. – 66. – P. 289–326.
258. Zappa S. The maintenance of iron homeostasis among prokaryotic phototrophs / S. Zappa, C.E. Bauer // Modern topics in the phototrophic prokaryotes [P.C. Hallenbeck (edc)]. – Cham: Springer International Publishing AG, 2017. – P. 123–161.
259. Zinchenko V.V. Mobilization of non-conjugative plasmids into *Rhodopseudomonas sphaeroides* / V.V. Zinchenko, M.M. Babykin, S.V. Shestakov // J. Gen. Microbiol. – 1984. – 130. – P. 1587–1590.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

Таблица А.1. Гомологи гена *all2580* AraC-подобного фактора транскрипции и кластеризованные с ними гены TBDTs в геноме цианобактерии *Anabaena* 7120

Ген- гомолог	Сходство белка с All2580		Физический кластер с геном предполагаемого TBDT(Тип)	Ориентация генов в геноме
	Счет (бит)	Значение E		
<i>all2580</i>	681	0	<i>all2580-all2581</i> (IutA2)	↔→
<i>alr2178</i>	322	$1 e^{-110}$	<i>alr2178-alr2179</i> (FhuA)	→→
<i>alr2174</i>	315	$1 e^{-107}$	<i>alr2174-alr2175</i> (FhuA)	→→
<i>all2159</i>	229	$1 e^{-073}$	<i>all2158</i> (FhuA)- <i>all2159</i>	↔↔
<i>alr2625</i>	190	$2 e^{-058}$	<i>alr2625-alr2626</i> (FhuA)	→→
<i>alr2208</i>	181	$7 e^{-055}$	<i>alr2208-alr2209</i> (IutA)	→→
<i>all2237</i>	176	$5 e^{-053}$	<i>all2236</i> (FhuA)- <i>all2237</i>	↔↔
<i>all2613</i>	172	$1 e^{-051}$	<i>all2610</i> (FhuA)- <i>all2611-all2612-all2613</i>	↔↔↔↔
<i>alr2587</i>	167	$9 e^{-050}$	<i>alr2587-alr2588</i> (FhuA)	→→
<i>all4925</i>	166	$3 e^{-049}$	<i>all4924</i> (FhuA)- <i>all4925</i>	↔↔
<i>alr2591</i>	165	$7 e^{-049}$	<i>alr2591-alr2592</i> (FhuA)	→→
<i>alr2184</i>	154	$1 e^{-044}$	<i>alr2184-alr2185</i> (FhuA)	→→
<i>alr2575</i>	152	$5 e^{-044}$	<i>alr2575-alr2576-alr2577-all2578</i> (FhuA)	→→→↔
<i>alr2595</i>	151	$1 e^{-043}$	<i>alr2595-alr2596</i> (FhuA)	→→
<i>all2621</i>	144	$1 e^{-042}$	<i>all2620</i> (IutA)- <i>all2621</i>	↔↔
<i>all2149</i>	132	$2 e^{-036}$	<i>all2148</i> (FhuA)- <i>all2149</i>	↔↔

Представлены гомологи гена *all2580* в геноме *Anabaena* 7120, выявленные с использованием программы BLAST2 (CyanoBase), а также сцепленные с ними гены предполагаемых TBDTs. В скобках после гена TBDT – тип транспортера (IutA или FhuA). Затененная строка – результат идентификации самого гена *all2580* по предсказываемой аминокислотной последовательности кодируемого им белка (All2580) в геноме *Anabaena* 7120.

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.