

31. Sor F., Bolotin-Fukuhara M., Nomura M. Mutational alterations of transcriptional coupling in the *L11* ribosomal protein operon of *Escherichia coli* // J. Bacteriol.— 1987.— 169, N 8.— P. 3495—3507.
32. Petersen C. Long-range translational coupling in the *rplJL-rpoBC* operon of *Escherichia coli* // J. Mol. Biol.— 1989.— 206.— P. 323—332.
33. Gold L., Stormo G. Translation initiation // *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* molecular and cellular biology.— New York: Amer. Soc. Microbiol., 1987.— V. 2.— P. 1302—1307.
34. Inouye M. Antisense RNA: its functions and applications in gene regulation — a review // Gene.— 1988.— 72, N 1—2.— P. 25—34.
35. Cole S. T., Honoré N. Transcription of the *sulA-ompA* region of *Escherichia coli* during the SOS response and the role of an antisense RNA molecule // Mol. Microbiol.— 1989.— 3, N 6.— P. 716—722.
36. Jaurin B. A promoter probe vector (*pJAC1*) that utilizes the *ampC* β -lactamase gene of *Escherichia coli* // Nucl. Acids Res.— 1987.— 15, N 20.— P. 8567.
37. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Особенности клонирования фрагментов *rpoBC*-оперона *Escherichia coli* в плазмидах *pUC* // Биополимеры и клетка.— 1987.— 3, № 6.— С. 307—312.
38. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Ориентационные эффекты, вызываемые присутствием в плазмиде *pUC* фрагментов *rplJL-rpoBC*-оперона *Escherichia coli* // Там же.— 1988.— 4, № 3.— С. 163—167.
39. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Возможность клонирования гена регуляторного белка *rplJL*-оперона *Escherichia coli* в высококопийной плазмиде *pUC* обеспечивается конвергентной транскрипцией, инициируемой промотором P_{lac} вектора // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.— 1989.— № 3.— С. 39—43.
40. Вудмаска М. И., Патон Е. Б. Клонирование участка *rplJL-rpoBC*-оперона *Escherichia coli* в плазмидах *pBR322* и *pHSG415* // Докл. АН УССР.— 1987.— № 9.— С. 58—60.
41. Specific-purpose plasmid cloning vectors. 1. Low copy number temperature-sensitive, mobilization defective *pSC101*-derived containment vectors / T. Haschimoto-Gotoh, F. C. Franklin, A. Nordheim, K. N. Timmis // Gene.— 1981.— 16, N 3.— P. 227—235.
42. Гены, кодирующие β -субъединицу РНК-полимеразы бактерий. I. Первичная структура *EcoRI*-С-фрагмента гена *rpoB* *Salmonella typhimurium* / Е. Д. Свердлов, П. А. Лисицин, С. О. Гурьев и др. // Биоорг. химия.— 1986.— 12, № 5.— С. 699—707.
43. Патон Е. Б., Живолуп А. Н., Вараница Л. А. Присутствие двух сильных промоторов определяет ориентацию фрагмента ДНК при встраивании в плазмиду *pUC19* // Биополимеры и клетка.— 1986.— 2, № 4.— С. 217—219.
44. Messing J. New *M13* vectors for cloning // Meth. Enzymol.— 1983.— 101.— P. 20—38.
45. Патон Е. Б., Вудмаска М. И., Свердлов Е. Д. Однонаправленная ориентация гена *rpoB* *E. coli* при клонировании в нитевидные фаги *M13mp8* и *M13mWB2348* // Биоорг. химия.— 1984.— 10, № 11.— С. 1544—1547.
46. Патон Е. Б., Живолуп А. Н. Высокая стабильность рекомбинантного нитевидного фага *M13* со встроенным участком *rpoBC*-оперона *E. coli* // Биополимеры и клетка.— 1987.— 3, № 4.— С. 226—227.
47. Вудмаска М. И., Живолуп А. Н., Патон Е. Б. Повышение стабильности рекомбинантного фага *M13*, содержащего гены *rplJL-rpoBC* *E. coli*, путем снижения экспрессии встроенных генов // Генетика.— 1990.— 26, № 3.— С. 557—559.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 10.05.90

УДК 579.25

© М. Ф. Алексеев, Н. А. Козыровская, 1990

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ ЦИАНОБАКТЕРИЙ *

Обзор посвящен молекулярной генетике цианобактерий. Суммированы данные о системах генетического обмена эндогенных плазмидах, мобильных генетических элементах, специфических эндонуклеазах, перестройках генома, клонирующих векторах и клонировании генов.

Цианобактерии, или сине-зеленые водоросли,— единственные прокариоты, способные к кислородному фотосинтезу по типу высших растений.

* Представлена членом редколлегии В. А. Кордюмом.

На основании имеющихся данных по организации генома и строению клетки их относят к грамм-отрицательным бактериям. От зеленых и пурпурных фотосинтезирующих бактерий цианобактерии отличаются наличием второй фотосистемы, в которой происходит фотоокисление воды, результатом чего является выделение молекулярного кислорода. Кроме того, среди них имеются формы, способные к гетеротрофному и фотогетеротрофному росту, фиксации молекулярного азота (по вкладу в биогенную азотфиксацию на культивируемых землях они уступают, разве что, клубеньковым бактериям) [1], хроматической адаптации и дифференциации клеток. Метаболические пути ассимиляции неорганического азота у цианобактерий очень сходны с таковыми у высших растений. Многие цианобактерии способны быстро расти. К ним могут быть применены методы исследования, разработанные для хорошо изученных гетеротрофных бактерий. Удачное сочетание прокариотической организации генома и относительной простоты работы с ними делают цианобактерии идеальным модельным объектом для изучения процессов, протекающих как в прокариотических организмах, так и в высших растениях. Вместе с тем цианобактерии являются выгодными в энергетическом отношении продуцентами [1] и могут быть использованы как экологически чистые удобрения [2, 3].

В связи с изложенным выше интенсивно развиваются исследования в области молекулярной генетики этой группы организмов.

В настоящей работе делается попытка обобщить сведения, касающиеся некоторых аспектов молекулярной генетики цианобактерий.

Плазмиды цианобактерий. Впервые экстрахромосомальные ковалентно замкнутые кольцевые молекулы ДНК (КЗК ДНК) были обнаружены Азато и Гиноза в одноклеточной цианобактерии *Synechococcus* PCC6301 [4]. К настоящему времени на присутствие плазмид скринированы многие штаммы одноклеточных и нитчатых цианобактерий, относящиеся к главным таксономическим подгруппам [5—13]. Более половины из них содержат от одной до восьми плазмид размером от 1,4 до приблизительно 1000 т. п. н. (данные электронной микроскопии и электрофоретической подвижности) [11, 14]. Интересно, что количество обнаруженных плазмид и даже сам факт их обнаружения в штаммах цианобактерий сильно зависят от метода выделения. Так, два штамма *Synechocystis* sp. PCC6711 и *Nostoc* sp. PCC8009, в которых, по данным [5], плазмид не оказалось, были вновь подвергнуты скринингу с использованием несколько измененного метода выделения плазмидной ДНК [15]. И выяснилось, что эти штаммы содержат несколько плазмид.

Заслуживает упоминания тот факт, что по меньшей мере четыре близких штамма *Synechococcus* sp. PCC6311, 6908, 7942 и 7943 различного географического происхождения, но сходных морфологически и по количеству G—C-пар в ДНК хромосомы [8, 9, 16], содержат две плазмиды с молекулярной массой $5,3 \cdot 10^6$ и $33 \cdot 10^6$, имеющие одинаковый размер и картину расщепления рестриктазами [17—19]. Более того, такие же плазмиды были обнаружены в *Cyanobium* PCC6707, который имеет в хромосоме на 13 мол. % G—C-пар больше. Аналогичные результаты получены в [6], где сравнивались безгетероцистные цианобактерии *Phormidium luridum* 426 и *Plectonema boryanum* 485, 581, 594 и 542. Все пять штаммов содержали по две плазмиды размером 1,6 и 12,9 т. п. н. Принимая во внимание эти данные и то, что некоторые плазмиды цианобактерий способны реплицироваться не только в другом штамме того же рода, но даже в цианобактериях другого рода [20, 21], можно предположить наличие межвидового или даже межродового переноса между штаммами цианобактерий в природе.

Количество копий различных типов плазмид меняется в зависимости от метаболического состояния клетки цианобактерии. Было обнаружено, что копияемость малых плазмид в клетках, находящихся в экспоненциальной фазе роста, ниже, чем в клетках, находящихся в стационарной фазе [7, 15]. Однако до сих пор ничего не известно о механизме репликации плазмид цианобактерий и о контроле копияемости

ти на молекулярном уровне, хотя и были клонированы функциональные участки начала репликации [21—23].

Много функций пытались связать с наличием плазмид в клетках цианобактерий: устойчивость к высоким концентрациям солей или ионам тяжелых металлов [18], образование газовых вакуолей [24], синтез токсинов [18, 25—27], синтез ферментов рестрикции-модификации [28, 29] и способность клеток к движению [30], однако до сих пор не получено прямых доказательств этих предположений.

Исследовав множество штаммов нитчатых цианобактерий, Симон [31] не смог связать утерю КЗК ДНК с появлением метаболических дефектов, структурных модификаций или способностью к дифференциации. Аналогично наблюдалось, что спонтанная утеря малых плазмид в одноклеточных штаммах *Synechococcus* PCC6301 и 73109 [5, 18] и *Synechocystis* PCC6803 [30] может проходить, не вызывая никаких явных фенотипических изменений. С другой стороны, интересные результаты получены Швабе с соавт. [26]. Они проверили на наличие плазмид девять штаммов *Microcystis aeruginosa*, пять из которых продуцировали токсины. Из пяти токсичных штаммов лишь один оказался бесплазмидным, остальные содержали не менее двух плазмид. Плазмиды *pMA1* и *pMA2* токсичного штамма *HUB5-2-4* были использованы в качестве зондов для поиска участков гомологии у плазмид исследованных штаммов. Показано, что плазмиды *pMA1* и *pMA2* в высокой степени гомологичны плазмидам другого токсичного штамма *HUB063*, однако они не гибридизовались с плазмидами токсичных штаммов *M. aeruginosa* PCC7820 и 7813, хотя имели участки гомологии с хромосомной ДНК этих штаммов. Авторы предполагают, что результаты, полученные Вакерия с соавт. [27], которые отметили сохранение токсичности у штаммов *M. aeruginosa*, излеченных при помощи новобицина от плазмид, могут быть объяснены интеграцией последних в хромосому. Таким образом, обнаружена значительная корреляция токсичности штаммов *M. aeruginosa* с присутствием в них плазмид или наличием последовательностей, гомологичных плазмидам в хромосоме.

Богорад с соавт. [32], основываясь на данных ДНК-РНК гибридизации, сообщили, что плаزمиды *pFDA* из *Calothrix* PCC7601 содержат гены, экспрессия которых инициируется зеленым светом, а Хайват с соавт. [33] отметили, что не содержащий плазмиды *pUH24*-штамм *Synechococcus* R2 имеет в три раза меньшую трансформируемость, чем дикий тип.

В заключение вышесказанного можно сказать, что, хотя плазмиды широко распространены среди цианобактерий и некоторые из них хорошо охарактеризованы, все они являются криптоическими в том смысле, что кодируемые ими функции и, следовательно, их физиологическая роль остаются неизвестными. Открытие связанных с плазмидами генетических маркеров может сыграть огромную роль в развитии молекулярно-генетических исследований, в особенности для конструирования клонирующих векторов и в понимании механизмов генетического переноса.

Таблица 1

Распространение продуцентов рестриктаз среди цианобактерий
Restriction enzymes producers distribution among cyanobacteria

Род	Вид	Число продуцентов	Всего обнаружено рестриктаз	Охарактеризовано	Род	Вид	Число продуцентов	Всего обнаружено рестриктаз	Охарактеризовано
<i>Agmenellum</i>	1	1	1	1	<i>Fischerella</i>	1	2	3	3
<i>Anabaena</i>	7	15	36	35	<i>Fremyella</i>	1	1	2	2
<i>Anacystis</i>	1	1	1	—	<i>Nostoc</i>	2	15	32	29
<i>Calothrix</i>	1	1	1	1	<i>Pseudoanabaena</i>	1	2	2	2
<i>Eucapsis</i>	1	1	2	1	<i>Tolypothrix</i>	1	2	2	2

Специфические эндонуклеазы и модификация ДНК. Несмотря на отсутствие сообщений об обнаружении в цианобактериях ферментов рестрикции I и III типов, многие штаммы были проверены на содержание специфических эндонуклеаз II типа. Оказалось, что цианобактерии, относящиеся к 10 различным родам (табл. 1), содержат от одной до пяти различных специфических эндонуклеаз II типа (рестриктаз) [34]. Некоторые из обнаруженных ферментов уже используются в генноинженерных работах. Как и в других группах бактерий, изошизомеры (ферменты, узнающие одну и ту же последовательность нуклеотидов) были обнаружены даже в неродственных видах, что указывает на то, что они не могут служить таксономическим признаком [35]. Из широкой распространенности некоторых изошизомеров (например, *AvaI* и *AvaII*) можно сделать вывод об их общем эволюционном происхождении. При этом гены этих систем рестрикции — модификации могли быть приобретены разными таксономическими группами путем горизонтального переноса плазмид или инфекции цианофагом. До сих пор, однако, не была установлена корреляция между содержанием плазмид в штаммах цианобактерий, чувствительностью к фагам и содержанием в них эндонуклеаз рестрикции.

Хромосомная ДНК различных нитчатых и одноклеточных цианобактерий оказывается устойчивой к расщеплению многими рестриктазами в значительно большей степени, чем следует ожидать исходя из содержания в них ферментов рестрикции II типа [36—39]. По-видимому, в клетках цианобактерий могут присутствовать метилазы, аналогичные *dam* и *dcm* метилазам *Escherichia coli* [39], необычные основания, отличные от *meA* и *meC* [37], или отсутствовать полностью или частично специфические последовательности в геноме [36].

Попытка выяснить, какой из механизмов защиты хромосомной ДНК от ферментов рестрикции действует в клетках *Anabaena sp.* PCC7120, *P. boryanum* PCC73110 и *Synechococcus cedrorum* R2, была предпринята в работе [39]. Авторы обнаружили довольно высокий уровень содержания N^6 -*meA* и 5-*meC* в геноме этих организмов, причем 5-метилцитозина во всех трех организмах оказалось больше, чем необходимо для метилирования всех *dcm*-последовательностей. Напротив, N^6 -метиладенина в геноме *Anabaena sp.* PCC7120 оказалось меньше необходимого для полного метилирования всех *dam*-узнаваемых последовательностей исходя из случайного их распределения. На основании характера расщепления геномной ДНК *Anabaena sp.* PCC7120 изошизомерами *Sau3A*, *MboI* и *DpnI* делается вывод о том, что только 1/4 *dam* (GATC) последовательностей в этом организме метилированы полностью, остальные 3/4 неометилированы.

В разных родах нитчатых цианобактерий — *Gloeotrichia*, *Nostoc* и *Plectonema* — как содержащих различные типы эндонуклеаз рестрикции, так и не имеющих их вовсе (например, *Nostoc* PCC73102) наблюдается очень сходная картина интенсивной модификации ДНК [37]. Напротив, в пяти одноклеточных видах наблюдались большие вариации в чувствительности геномной ДНК к расщеплению данным набором рестриктаз. С использованием изошизомеров было установлено, что устойчивость ДНК к расщеплению может быть как результатом контролируемых хозяином систем рестрикции — модификации, так и обуславливаться наличием *dam*-метиلاзы типа *E. coli* [40].

Примеры возможных систем рестрикции — модификации, действующих *in vivo*, были описаны для *Anabaena* PCC7937 [41] и *Synechococcus* PCC6301 [42, 43]. Цианофаг *N1*, выращенный на *Anabaena* PCC7120, образует бляшки на газоне *Anabaena* PCC7937 с очень низкой эффективностью, тогда как его потомство, выжившее на *Anabaena* PCC7937, имеет более высокую эффективность бляшкообразования на этом же самом штамме. Аналогичные различия в эффективности бляшкообразования у цианофага *AN22* на штаммах *Anabaena* и *Nostoc* наблюдались в работе [44]. Это может служить свидетельством того, что ДНК цианофага, избежавшая рестрикции в *Anabaena* PCC7937 [41]

или в других штаммах [44], может быть модифицирована хозяйскими клетками. С другой стороны, выполненные Зекерс *in vitro* эксперименты на *Synechococcus* PCC6301, показывают, что эндонуклеаза, синтезирующаяся в клетках этого организма после инфекции цианофагом ASI, может разрушать ДНК *Synechococcus* PCC6301. Инфицирующая ДНК устойчива к расщеплению. Более того, ДНК цианофага оказалась незащищенной после клонирования в плазмидном векторе и размножения в *E. coli*. По-видимому, в *Synechococcus* PCC6301 индуцируется система рестрикции — модификации для селективной дегградации хозяйской ДНК. Соответствующий процесс модификации остается неизвестным.

Был очищен модифицирующий фермент *M. Nsp MAC1* из *Nostoc* PCC8009. Этот штамм содержит фермент рестрикции *R. Nsp MAC1*, изоэнзимер *BglII* [45]. Точный сайт модификации *M. Nsp MAC1* пока не установлен. Интересно, однако, что *BglII* расщепляет ДНК, модифицированную *M. Nsp MAC1*, в то время как *R. Nsp MAC1* не способна расщепить эту же самую ДНК. Это свидетельствует о том, что сайты модификации *M. BglII* и *M. Nsp MAC1* различны [45]. Модифицирующий фермент может также существовать в *Synechococcus* PCC7942 и модифицировать центральный остаток аденина в последовательности GATC. Однако последовательность нуклеотидов, узнаваемая ферментом рестрикции, обнаруженным в этом штамме (*Ani1*), пока не определена, как не обнаружен и соответствующий модифицирующий фермент [46].

Мобильные генетические элементы цианобактерий. О мобильных генетических элементах (МГЭ) цианобактерий до сих пор известно очень мало. Систематический поиск известных бактериальных IS-элементов в штаммах цианобактерий, по-видимому, не проводился, хотя сообщения о наличии гомологичных последовательностей как в разных плаزمидах одного штамма, так и в плазмидах различного размера, выделенных из разных источников [5, 6, 18], наталкивают на мысль о том, что наличие МГЭ в геноме цианобактерий может оказаться таким же обычным явлением, как и в других про- и эукариотических организмах.

Нам известны два сообщения о присутствии классических МГЭ в штаммах цианобактерий. Первое относится к 1983 году, когда де Марсак и соавт. [16] при анализе плазмид *Calothrix sp.* PCC7601 с использованием одного и того же способа выделения из восьми субкультур клеток, выращенных при белом свете, наблюдали две различные картины «А» (семь субкультур) и «В» (одна субкультура), которые различались по четырем плазмидным полосам. Эти вариации не были связаны ни с одним явным фенотипическим изменением, однако полученные результаты вместе с предварительными данными о том, что у *Calothrix sp.* PCC7601 спонтанные пигментные мутации возникают с неожиданно высокой частотой (10^{-3} — 10^{-4}), привели к выводу о возможности существования МГЭ в этом штамме. В дальнейшем при изучении спонтанных пигментных мутантов было обнаружено, что в трех из них мутации были вызваны инсерциями фрагментов ДНК. В одном случае внедрившийся фрагмент имел длину 1,1 т. п. н., в двух других — 1,4 т. п. н. и оказался типичным бактериальным IS-элементом с инвертированными повторами длиной 25 н. п. Этот элемент получил название IS-701. Он вызывает дупликацию 4 п. н. в сайте-мишени и имеет открытую рамку считывания длиной 1 т. п. н. Предсказанная аминокислотная последовательность этой открытой рамки гомологична С-концевым последовательностям транспозаз различных бактериальных и архебактериальных IS-элементов. В геноме *Calothrix sp.* PCC7601 присутствуют около 30 копий IS-701 [47].

Второе сообщение относится к 1988 г., когда Мацрэй и соавт. при секвенировании одного из концов клонированного фрагмента ДНК *Chlorogloeopsis fritschii*, содержащего гены большой и малой субъединиц рибулезодифосфаткарбоксылазы, обнаружили, что из 210 секвени-

рованных нуклеотидов 169 (42—210) точно соответствовали первым 169 нуклеотидам (1—169) последовательности IS2 [48]. Присутствие полноразмерного IS2 было подтверждено рестрикционным картированием. Блот-гибридизация доказала присутствие IS2 в хромосоме *C. fritschii*.

Поведение *nifD*-элемента в геноме вегетативных клеток гетероцистных нитчатых цианобактерий при переносе их в среду, лишенную источника связанного азота, очень напоминает эксцизию лизогенного фага (см. ниже).

Таким образом, цианобактерии, по-видимому, не являются исключением в царстве прокариот в плане наличия в геноме МГЭ. Несмотря на недостаточную изученность цианобактериальных МГЭ, они уже сейчас могут быть использованы для конструирования искусственных транспозонов, которые потенциально являются как мощным средством получения маркированных мутантов и клонирования соответствующих генов дикого типа, так и надежным инструментом изучения транспозиции специфических цианобактериальных МГЭ.

Генетический перенос у цианобактерий. Успех генетического анализа цианобактерий в значительной мере зависит от возможности введения в клетки изучаемого штамма чужеродного генетического материала.

Из трех способов переноса генетической информации у бактерий: трансформации, конъюгации и трансдукции для цианобактерий достоверно описаны пока только трансформация и перенос векторных плазмид при помощи конъюгативных плазмид *E. coli*. Присутствующие во многих штаммах цианобактерий системы рестрикции—модификации осложняют оба эти вида генетического переноса. Разработаны три основных способа преодоления подобных затруднений:

Таблица 2

Трансформируемые цианобактерии
Transformable cyanobacteria

Цианобактерия	PCC*	ATCC*	Приблизительный мол. % C+C	Трансформация геномной ДНК			Трансформация плазмидной ДНК	Фотогетеротрофный рост	Литературный источник
				Естественная компетентность	Очищенная ДНК ³	ДНК—РНК комплекс ⁴			
<i>Synechococcus sp.</i>									
<i>Anacystis nidulans</i> 602	7943	—	?	+	+	—	—	—	[49]
<i>Anacystis nidulans</i> TX20 (UTEX625, UTEX1550)	6301	27144	55	+	+	+	—	—	[55—57]
<i>Anacystis nidulans</i> R2	7942	—	55	+	+	—	+	—	[65]
<i>Agmenellum quadruplicatum</i> PR-6	7002	27264	49	+	+	—	+	+	[58]
<i>Agmenellum quadruplicatum</i> BG-1	73109	29404	49	+	+	—	—	+	[62]
<i>Synechocystis sp.</i>									
<i>Aphanocapsa sp.</i>	6714	27178	47	+	—	+	—	+	[54]
<i>Gleocapsa alpicola</i>	6308	27150	35	—	—	+	—	—	[52]
<i>Aphanocapsa sp.</i>	6803	27184	47	+	+	—	+	+	[59]
<i>Eucapsis sp.</i>	6906	27266	47	+	+	—	—	+	[62]

* PCC — Пастеровская коллекция культур; ** ATCC — Американская коллекция типовых культур. 1 — организм трансформируется без искусственной обработки для создания состояния компетентности, как, например, обработка CaCl₂; 2 — описана трансформация, абсолютно чувствительная к добавляемой извне ДНКазе; 3 — описана трансформация смесью ДНК и РНК, частично чувствительная к добавляемой извне ДНКазе; 4 — трансформация плазмидами, способными к автономной репликации в реципиентной клетке; 5 — организм может использовать одно или более углеродных соединений в качестве источника электронов в отсутствие функции фотосистемы II.

1) селективное удаление из последовательности вектора сайтов узнавания фермента(ов) рестрикции, синтезируемого(ых) реципиентной клеткой;

2) выращивание векторных плазмид на штамме *E. coli*, способном модифицировать участки узнавания этих ферментов;

3) конструирование и использование в работе штаммов цианобактерий, дефектных по системе рестрикции.

Трансформация. Трансформация у цианобактерий была впервые описана Шестаковым и Хьен [49] для *Synechococcus* PCC7943 (*A. nidulans* 602). Впоследствии были обнаружены еще несколько трансформируемых штаммов цианобактерий (табл. 2). Все они принадлежат к родам *Synechococcus* и *Synechocystis* и являются одноклеточными цианобактериями со средним молярным процентом G+C-пар (47—55 %). Единственным исключением является *Gleocapsa alpicola*, которая имеет 35 мол. % G+C [50, 51]. Этот штамм примечателен, кроме того, тем, что не может быть трансформирован без обработки CaCl_2 [52]. Впрочем, чувствительный к ДНКазе генетический обмен, наблюдаемый в смешанных культурах *Nostoc muscorum* [53], питчатой азотфиксирующей цианобактерии, возможно, заставит пересмотреть сделанное выше заключение. Хотя строго определенное опосредованной ДНК трансформации обуславливает абсолютную чувствительность процесса к добавлению ДНКазы, несколько систем трансформации цианобактерий не удовлетворяет этому критерию. Обработка ДНКазой препаратов ДНК, используемой для геномной трансформации *Aphanocapsa* 6714, снижает эффективность процесса только на 70 %, а в препаратах ДНК обнаруживается РНК [54]. В работе, посвященной трансформации *G. alpicola* (*Synechocystis* PCC6308), также использовали препараты ДНК, содержащие РНК. Обработка этих препаратов как ДНКазой, так и РНКазой снижала эффективность трансформации [52]. Трансформацию *Synechococcus* PCC6301 проводили двумя способами: очищенной ДНК в условиях, когда обработка ДНКазой предотвращала появление трансформантов [55, 56], и ДНК — РНК-комплексами, когда трансформация оказывалась неполностью чувствительной к ДНКазе [56, 57]. Возможно, РНК предохраняет ДНК от обычно присутствующих экстраклеточных ДНКаз и может частично предохранять от добавляемой ДНКазы [56]. Не исключено также, что трансформация ДНК — РНК-комплексом отличается по механизму от трансформации очищенной ДНК.

Достоверные кривые зависимости эффективности геномной трансформации от концентрации ДНК были опубликованы только для двух цианобактерий *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 (*Synechococcus* PCC7002) [58] и *Synechocystis* PCC6803 [59]. Для обоих организмов количество полученных трансформантов являлось линейной функцией от концентрации ДНК при низких ее концентрациях; при более высоких — наблюдалось насыщение. Такой тип кривой свидетельствует о том, что для трансформации клетки цианобактерии достаточно проникновения одной молекулы ДНК. Однако эти организмы значительно отличаются по эффективности процесса. У *Synechocystis* PCC6803 половина максимального количества трансформантов обнаруживается при концентрации ДНК 2 мкг/мл, а полное насыщение наступает при концентрации ДНК около 50 мкг/мл. У *A. quadruplicatum* PR-6 соответствующие концентрации составляют 80 нг/мл и 1 мкг/мл. У *Synechococcus* PCC7943 насыщение наступает при концентрации ДНК 20—40 мкг/мл [49].

Аналогичные кривые зависимости были построены для плазмидной трансформации *A. nidulans* R2. В одном случае для трансформации была использована плазида *pUC3* массой $4,6 \cdot 10^6$, и насыщение наступало при концентрации ДНК 100—150 нг/мл [33], в другом случае, когда была использована плазида *pCH1* ($8,6 \cdot 10^6$), насыщение наступало при концентрации ДНК около 750 нг/мл [60]. Эту пятикратную разницу в эффективности можно объяснить: а) разницей в

размерах плазмид; б) разницей в механизмах проникновения этих двух плазмид в клетки; в) разницей в маркере, использованном для селекции; г) различиями в методике трансформации; д) разницей в культурах одного штамма [61].

Следует упомянуть о двух вопросах, связанных с функцией времени в процессе трансформации. Первый из них касается длительности периода инкубации, в течение которого трансформирующая ДНК становится устойчивой к добавляемой извне ДНКазе. У *A. nidulans* 602 трансформанты начинают появляться через 30 мин после начала инкубации клеток с геномной ДНК и их количество продолжает возрастать вплоть до 5 ч инкубации. При этом количество трансформантов значительно больше, если процесс не терминируют ДНКазой, из чего авторы делают вывод о том, что трансформация продолжается на твердой среде [49]. Оптимальное время инкубации с геномной ДНК у *A. nidulans* 625 составляет 4 ч [55]. Для *Synechocystis* PCC6803 лучшие результаты были получены при инкубации с геномной ДНК в течение 1 ч. При этом количество трансформантов возрастало в 20—40 раз, если трансформация не терминировалась ДНКазой [59]. Очень быстро процесс интернализации геномной ДНК протекает у *A. quadruplicatum* PR-6. В тех экспериментах, когда трансформация терминировалась добавлением ДНКазы, трансформанты появлялись через 2 мин инкубации с ДНК, а максимальное количество трансформантов — через 30 мин инкубации [58]. Количество трансформантов возрастает линейно в течение 5—6 мин, затем линейность нарушается. При добавлении новой порции ДНК линейность восстанавливается. Подобные результаты были получены при трансформации *Bacillus subtilis* и, по-видимому, являются следствием частичной деградации ДНК внеклеточными нуклеазами.

Второй вопрос касается определения цикла компетентности. Здесь имеются прямо противоположные данные. Так, у *A. nidulans* UTEX625 наиболее эффективно трансформируются геномной ДНК клетки, находящиеся в поздней логарифмической фазе роста. В стационарной же фазе клетки практически не трансформируются [55]. Напротив, остальные цианобактерии, по-видимому, не имеют цикла компетентности вообще в случае трансформации геномной ДНК. Это утверждение справедливо для *A. nidulans* 602 [49], *A. quadruplicatum* PR-6 [58]; *Synechocystis* PCC6803 [59]. Для *A. nidulans* R2 получены противоречивые данные. Одни авторы обнаружили у этого организма цикл компетентности при трансформации плазмидной ДНК [33], другие — нет [60]. Однако обнаруженный цикл компетентности незначителен, и различные результаты могут объясняться просто разницей в условиях культивирования.

Была исследована зависимость эффективности плазмидной трансформации *A. nidulans* R2 от света [33, 60—62]. Оказалось, что длительная инкубация клеток в темноте перед добавлением ДНК значительно снижает количество трансформантов [33, 60]. Относительно же освещения во время инкубации клеток с ДНК во всех трех работах получены разные результаты. В одном случае количество трансформантов при инкубации клеток с ДНК в темноте и на свету было равным [33]; в другом — при инкубации клеток с ДНК в темноте, а также в присутствии ингибиторов фотосинтеза или синтеза АТФ на свету трансформация проходила эффективнее [60]. В третьем случае при инкубации клеток в темноте с ДНК плазмиды, неспособной к автономной репликации в клетках *A. nidulans* R2, количество трансформантов уменьшалось более чем в 10 раз по сравнению с контролем [62].

На эффективность трансформации плазмидной ДНК может оказывать значительное влияние присутствие в реципиентных клетках цианобактерий систем рестрикции — модификации. Так, для *A. quadruplicatum* PR-6, имеющего систему рестрикции — модификации *AquI*, было показано, что присутствие одного сайта узнавания *AquI* в челночном векторе, выделенном из *E. coli*, может в 100 раз снизить эффек-

тивность трансформации, а наличие множественных сайтов *LacI* в плазмиде предотвращает появление трансформантов [63].

Интересным случаем трансформации является гетероспецифическая трансформация, т. е. трансформация ДНК одного организма геномной ДНК, выделенной из организма, принадлежащего другому виду или даже роду. Проведение подобной трансформации может быть полезным для выяснения генетического родства организмов, если его сложно установить на основании биохимических и морфологических данных.

Подобные эксперименты были выполнены для *A. nidulans* 602 и *A. nidulans* R2 с генетически маркированной донорской ДНК других цианобактерий рода *Synechococcus* [64]. В другой работе было показано, что *Synechocystis* PCC6803 трансформируется хромосомной ДНК других представителей рода *Synechocystis*, имеющих сравнимый мол. % G+C. Трансформации не наблюдалось, если мол. % G+C донорского штамма значительно отличался от такового для *Synechocystis* PCC6803. Эти же авторы показали, что геномная ДНК из *A. nidulans* R2 не трансформирует *Synechocystis* PCC6803 и т. д. [59]. Наблюдалась также трансформация *Synechococcus* PCC6301 ДНК — РНК-комплексом *Synechocystis* PCC6308. Напротив, *Synechocystis* PCC6308 плохо трансформируется хромосомной ДНК *Synechococcus* PCC6301 [52].

Необходимо отметить, что при трансформации *A. nidulans* R2 ДНК различного происхождения успешно конкурирует с геномной ДНК этого организма за проникновение в клетку [60]. По-видимому, цианобактерии в отличие от грамм-отрицательных гетеротрофов, не проявляют специфичности в отношении проникающей ДНК, несмотря на похожее строение клеточной стенки.

При трансформации *A. nidulans* 625 геномной ДНК с высокой частотой появлялись мутации в неселектируемых локусах. При этом очищенная ДНК обладала большим мутагенным эффектом по сравнению с ДНК — РНК-комплексами. Авторы заключили, что процесс рекомбинации, связанный с трансформацией, может быть мутагенным [56].

При трансформации цианобактерий ДНК бирепликонного вектора, сконструированного на основе одной из резидентных плазмид реципиентного штамма, часто имеют место процессы рекомбинации между вектором и плазмидой реципиента. В результате могут происходить делеции [65] или объединение репликонов [66]. Интересен тот факт, что штамм *A. nidulans* R2, излеченный от плазмиды *pUH24*, трансформируется векторной плазмидой, имеющей репликон *pUH24*, в 30 раз хуже, чем исходный штамм. Это может свидетельствовать об участии рекомбинационных процессов в стабилизации векторных плазмид [33].

Особое место в изучении процесса трансформации у цианобактерий отводится трансформации плазмидами, неспособными к репликации в клетках реципиента, но имеющими клонированный участок геномной ДНК реципиента. В этом случае происходит интеграция вектора в геном цианобактерии. Первые эксперименты этого типа были проведены на *A. nidulans* R2 [62]. Во фрагмент геномной ДНК *A. nidulans* R2, клонированный в *pBR322* и способный комплекментировать *thi*-мутант *E. coli*, в различных положениях был внедрен *Stm^r* ген из *pACYC184*. Те плазмиды, которые сохранили способность комплекментировать мутант *E. coli*, были использованы для трансформации *A. nidulans* R2. Было обнаружено три типа трансформантов. Большинство трансформантов образовывались в результате замещения последовательности в геноме цианобактерии на гомологичную ей из рекомбинантной плазмиды. Последовательность же *pBR322* при этом не обнаруживалась в геноме цианобактерии. Эти трансформанты были стабильными и сохраняли устойчивость к *Stm* даже после длительной инкубации в неселективных условиях. Трансформанты этого типа (обозначенного авторами как тип 1) могут быть получены с высокой частотой (до

1 трансформанта на 200 реципиентных клеток) с использованием как кольцевой плазмидной ДНК, так и ДНК, линейаризованной расщеплением внутри последовательности *pBR322*. Геномная ДНК, приготовленная из одного такого трансформанта 1-го типа, также трансформировала с высокой частотой клетки дикого типа к St^r -фенотипу. Свойства таких вторичных трансформантов были идентичны таковым первичных трансформантов [62]. Дальнейшие исследования показали, что могут быть получены стабильные трансформанты 1-го типа, содержащие вставки до 20 т. п. н. [67]. Вероятность получения таких трансформантов обратноэкспоненциально зависит от длины гетерологичной вставки. Практически частота трансформации уменьшалась приблизительно в 2 раза при увеличении длины гетерологичной вставки на 2—3 т. п. н.

Трансформанты 2-го типа были Ar^r , St^r и возникали в результате внедрения *pBR322*, но не гетерологичной вставки в геном цианобактерий посредством рекомбинации между хромосомой и флагирующими *pBR322* последовательностями. Было высказано предположение, что трансформанты 2-го типа возникают в результате дополнительной рекомбинации плазмиды, которая потеряла маркер St^r в результате предыдущего реципрокного рекомбинационного события [62].

Трансформанты 3-го типа получали в результате интеграции всей плазмиды в гомологичную область генома *A. nidulans* R2 и были устойчивы как к St , так и к Ar [63].

Соотношение количества трансформантов 1-го и 3-го типов, полученное в этих экспериментах (около 100:1), в свете простых рекомбинационных явлений оказалось неожиданно высоким. В случае рекомбинации с геномом кольцевой молекулы ДНК одного рекомбинационного события достаточно для получения трансформанта 3-го типа, в то время как для возникновения трансформанта 1-го типа необходимы два реципрокных рекомбинационных события. Так как вероятность двойного кроссинговера ниже вероятности одиночного, было сделано предположение о том, что трансформанты 1-го типа возникают в результате одиночного реципрокного события рекомбинации [62]. Однако возможно также, что на наблюдаемую разницу в количестве трансформантов разных типов сильно влияет относительная частота, с которой молекулы ДНК обнаруживаются внутри клеток в виде интактных колец. Возможно, внутри клетки донорская ДНК находится преимущественно в линейной форме. Это предположение подтверждается наблюдением за частотой появления трансформантов 2-го типа. Как упоминалось выше, трансформанты 2-го типа возникают в результате внедрения в геном последовательности *pBR322*, но не гетерологичной вставки. При увеличении длины гетерологичной вставки количество трансформантов 2-го типа практически не изменяется, в то время как количество трансформантов 1-го и 3-го типов быстро уменьшается [67]. Если гетерологичную вставку вырезали перед трансформацией путем обработки рестриктазой, это не влияло на количество трансформантов 2-го типа [62]. Учитывая эти факты, можно заключить, что трансформанты 2-го типа, вероятнее всего, возникают в результате рекомбинации с геномом линейного фрагмента ДНК. Этот вывод может объяснить ту низкую частоту, с которой возникали трансформанты 3-го типа [61].

Конъюгация. До сих пор описан только один пример переноса конъюгативных плазмид широкого спектра хозяев в цианобактерии. Деланей и Рейхельт показали, что плазмиды группы несовместимости P1 (*RP1*, *RP4*, *R68* и *R68.45*) могут переноситься, хотя и с очень низкой эффективностью (10^{-6} — 10^{-10}), из *E. coli* в одноклеточный штамм *Synechococcus* PCC6301. Посредством рестрикционного и гибридного анализа плазмид, выделенных из трансконъюгантов, авторы показали, что в большинстве из них автономная плаزمида *R68.45* присутствовала наряду с коинтегратами этой R-плазмиды и эндогенной плазмиды *pUH2* размером 48,8 т. п. н. Было также обнаружено, что

R-плазмида интегрировала в хромосому. В обоих случаях интеграция опосредована транспозирующимися элементами R-плазмиды.

Известно, что плазмида *RP4* способна мобилизовать производные *pBR322* в различные грамм-отрицательные бактерии, в том числе и в те, в которых сама *RP4* реплицироваться не может, если *pBR322* имеет интактный *bot*-район (*basis of mobility*) и если в клетке присутствуют дополнительные транс-действующие факторы. Такие факторы могут быть обеспечены плазмидами *pDS4101* (*ColK:Tn1*) или *pGI28* (*ColD, Km^r*).

Эти факты были использованы Волком с соавт. для конструирования семейства челночных векторов, способных реплицироваться как в *E. coli*, так и в цианобактериях родов *Anabaena* и *Nostoc* [20, 68]. В системе конъюгативного переноса, разработанной авторами, бипериконные векторы *pRL*, состоящие из *pBR322* и плазмиды *pDUI Nostoc PCC7524*, сначала использовали для трансформации штамма *E. coli* HB101, содержащего плазмиду-помощник (*pGI28* или *pDS4101*), а затем проводили трехродительское скрещивание между: 1) *E. coli* HB101, содержащей вектор *pRL* и плазмиду-помощник; 2) *E. coli* J53, содержащей плазмиду *RP4*; 3) *Anabaena*.

Эксконъюгантов отбирали на твердой среде, содержащей антибиотик. Эти клетки освобождали от примеси *E. coli*, рассеивая их до отдельных колоний на минеральной среде для цианобактерий, содержащей селективный агент. Плазмиды *pRL* выдсляли из эксконъюгантов без изменения в рестрикционной картине. Важно отметить, что успех этой системы зависел от двух главных факторов: селективной элиминации в векторе сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции *AvaI* и *AvaII*, синтезируемых клетками цианобактерий, и способности цианобактериального репликона функционировать в реципиентных клетках. Эта система может быть применена к другим видам цианобактерий при условии, что репликон конъюгативной плазмиды способен функционировать в реципиентных клетках. Кроме того, это единственная на сегодняшний день система генетического переноса для нитчатых цианобактерий. Наконец, она позволяет переносить гены с очень высокой частотой (до $3 \cdot 10^{-2}$). Очевидно, описанная система конъюгации будет особенно полезна при изучении таких процессов, как дифференциация клеток, фиксация атмосферного азота и комплементарная хроматическая адаптация, протекающих в некоторых видах одноклеточных и нитчатых цианобактерий, для которых никаких других систем переноса генов пока нет.

Конструирование клонирующих векторов. Успех генетического анализа цианобактерий во многом зависит от наличия надежной векторной системы для клонирования генов. Существуют три различных подхода к конструированию векторных систем для цианобактерий: 1) создание векторов на основе репликонов цианобактерий; 2) создание интегративных векторов на основе плазмид *E. coli*; 3) создание челночных векторов, способных реплицироваться как в *E. coli*, так и в цианобактериях.

Исторически первую попытку создать вектор на основе плазмиды цианобактерии предприняли Ван ден Хондел с соавт. [69] для *Synechococcus* PCC7942. Неспособность плазмид *E. coli* реплицироваться в этой цианобактерии была использована для внедрения в меньшую из двух плазмид (*pUH24*) транспозона *Tn901* (*Ap^r*) из плазмиды *E. coli* *R146*. Это дало первую цианобактериальную плазмиду, несущую селективный маркер, которая впоследствии явилась основой для получения паг- и *met*-мутантов посредством транспозонного мутагенеза и клонирования соответствующих генов дикого типа из *Synechococcus* PCC7942 [70]. Однако использование подобных векторов оказалось ограниченным их неспособностью реплицироваться в *E. coli*.

Другим подходом к созданию систем клонирования генов является конструирование интегративных векторов. Интеграция чужеродной ДНК в хромосому цианобактерии может достигаться в том случае,

когда донорская плазмида неспособна к самостоятельной репликации в цианобактериальной клетке, но имеет область гомологии с хромосомной ДНК. За счет этой области гомологии происходит рекомбинация донорской молекулы с хромосомой.

Интегративные векторы были сконструированы для цианобактерии *Synechococcus* PCC7942 путем клонирования фрагментов хромосомной ДНК в цианобактерии в плазмиде *pBR322*. Ген устойчивости к хлорамфениколу из плазмиды *E. coli pACYC184* был встроен в цианобактериальную ДНК или пришит к ней в качестве фланкирующей последовательности [62]. Серия интегративных векторов была сконструирована для *Synechocystis* PCC6803 [71]. Рекомбинантные векторы интеграции содержали фрагменты хромосомной ДНК цианобактерий в составе векторной плазмиды *E. coli pACYC184*.

Иной подход к созданию векторов интеграции продемонстрировали недавно Борриас с соавт. [72]. Они получили два рециссивных штамма *Synechococcus* PCC7942, в хромосоме которых находятся беспромоторный *bla*- ген и *oriV pBR322* (мишень для интеграции производных *pBR*), разделенные в одном случае геном устойчивости к канамицину, в другом — к стрептомицину. Любой ген, клонированный в производном *pBR*, может быть интегрирован в хромосому такого штамма. Интеграция сопутствует восстановлению устойчивости к ампициллину и утере устойчивости к канамицину или стрептомицину. Интеграция осуществляется всегда в одно место. Это означает, что эффект положения должен быть исследован лишь один раз.

Наибольшее распространение получили векторы для цианобактерий, способные реплицироваться как в *E. coli*, так и в клетках цианобактерий (челночные векторы) и сочетающие, таким образом, преимущества первых двух групп векторов.

В 1981 г. Кюхлемер с соавт. объединили *in vitro* плазмиду *E. coli pACYC184* и цианобактериальную плазмиду *pUC1*, производную меньшей плазмиды *Synechococcus* PCC7942 *pUH24* [73]. Полученная в результате Ap^r , St^r плазида *pUC104* стабильно поддерживалась в клетках цианобактерий вне зависимости от антибиотиков, используемых для селекции, и послужила основой для конструирования космиды *pUC29* путем инсерции *BglII*-фрагмента, несущего липкие концы бактериофага λ [70]. Космида *pUC29* позволяет клонировать фрагменты ДНК длиной от 20 до 45 т. п. н. и может быть легко переведена как в *E. coli* (посредством инфекции после упаковки ДНК *in vitro*), так и в *Synechococcus* PCC7942 (трансформацией).

Другие авторы для конструирования подобных векторов применяли производные *pBR322* и *pUH24* [74], укороченные *pBR322* и *pUH24*, либо укороченные *pBR322* и *ori pUH24* [75, 76]. Был создан вектор, позволяющий вести селекцию рекомбинантов в *E. coli* по экспрессии β -галактозидазы [76]. Наконец, Фридберг и Сайджферс [77] соединили репликон *Synechococcus* PCC7942 с операторно-промоторной областью гена термочувствительного рецептора бактериофага λ . Это первый пример системы клонирования в цианобактериальном хозяине, допускающей контролируемую экспрессию генов.

Системы клонирования генов также были созданы для фотогетеротрофных цианобактерий *Synechocystis* PCC6803 на основе небольшой плазмиды *pSS2* (называемой также *pUG1*) [71, 78], причем в последнем случае наблюдалась экспрессия *lac*-гена даже в клетках цианобактерий. Это открывает возможность экспрессии других генов под контролем *lac*-промотора.

В 1984 г. Волк с соавт. сообщили о конструировании семейства челночных векторов, способных реплицироваться как в *E. coli*, так и в различных питчатых цианобактериях родов *Anabaena* и *Nostoc* и передаваться путем конъюгации [20]. Эта система генетического переноса, разработанная на основе бактериальной конъюгативной плазмиды *RP4*, может способствовать переносу производных *pBR322*, если дополнительные транс-действующие факторы обеспечиваются такими плаз-

мидами *E. coli*, как *pGI28* или *pDS4101*. Гибридные векторы, сконструированные для этой цели, содержат интактные *oriV* и *boi* *pBR322* и плазмиду *pDU1* из *Nostoc PCC7524* (репликон, функционирующий в *Anabaena*). Сайты узнавания *AvaI* и *AvaII* были селективно удалены для минимизации возможной деградации входящей ДНК [20].

Впоследствии были усовершенствованы как сами векторы путем клонирования участка начала репликации *pDU1* длиной 1,3 т. п. н. и создания векторов на его основе [21], а также использования в качестве селективного маркера гена бактериальной люциферазы [79], так и условия конъюгативного переноса [80, 81]. Интересно, что в [79] авторам удалось наблюдать в микроскоп свечение одиночной клетки *Anabaena*, содержащей вектор *pRL308P*, несущий ген бактериальной люциферазы. Кроме того, так как при создании новых генетических конструкций трудно, а порой и невозможно избежать появления в векторе новых сайтов узнавания для ферментов рестрикции *AvaI* и особенно *AvaII*, синтезируемых клетками многих нитчатых цианобактерий, авторы модифицировали плазмиду-помощник за счет клонирования в ней генов метилазы *M. AvaI* и/или *M. AvaII* так, что синтезируемые в клетке донора метилазы специфически модифицируют челночный вектор, предотвращая его деградацию в реципиентных клетках под действием *R. AvaI* и *R. AvaII* [82]. Аналогичные конъюгативные векторы разработаны для *Fremyella diplosiphon* и *Synechococcus R2* [82].

Клонирование генов цианобактерий. Разработка технологии рекомбинантных ДНК дает возможность изучить организацию и регуляцию активности генов цианобактерий.

В настоящее время для клонирования генов цианобактерий используют три принципиально различных подхода: 1) клонирование при помощи ДНК- и РНК-зондов; 2) прямое клонирование при помощи фенотипической комплементации мутантов; 3) клонирование в экспрессирующем векторе с использованием для скрининга банка генов антител к продукту искомого гена.

Первый подход имеет три направления: гибридизация с гетерологичными ДНК- и РНК-зондами, с РНК и с искусственно синтезированными олигонуклеотидами. Выбор конкретного метода клонирования определяется спецификой объекта и задачами, которые ставит перед собой исследователь.

Клонирование с использованием гетерологичных зондов основано на эволюционной консервативности генов бактерий, водорослей и высших растений. В качестве зондов для скрининга банков генов используют уже проклонированные гены других организмов, кодирующие образование тех же продуктов. Метод используется в основном для клонирования генов компонентов фотосинтетического аппарата и генов азотфиксации. Высокий процент гомологии во многих случаях свидетельствует об эволюционном сходстве фотосинтетических аппаратов цианобактерий и высших растений [83].

При клонировании кластера генов, кодирующего компоненты АТФ-синтетазы *Anabaena PCC7120*, в качестве зондов использовали фрагмент хлоропластной ДНК *Chlamydomonas reinhardtii*, содержащий 5'-конец гена *atpA* этого организма, и ген *ptpH* гороха [84]. Авторы обнаружили два кластера генов: кластер *atp1*, состоящий из 7 генов (*atp1*, *H*, *G*, *F*, *D*, *A*, *C*), и отстоящий от него по меньшей мере на 10 т. п. н. кластер *atp2*, кодирующий β (*atpB*) и ϵ (*atpE*) субъединицы АТФ-синтетазы. Интересно, что кодирующие последовательности генов *atpF* и *atpD* перекрываются у *Anabaena PCC7120* [84].

Гены *nifH* и *nifD* *Azotobacter vinelandii* были использованы в качестве зондов для клонирования соответствующих генов *Nostoc commune* UTEX584 [85]. Зонды авторы метили биотин-II-dUTP, что, однако, позволило им обнаружить в библиотеке генов, сконструированной на основе *pBR322*, помимо генов *nifH* и *nifD* две *nifH*-подобные последовательности *nifH1* и *nifH2* [85].

При клонировании генов супероксиддисмутазы *A. nidulans* в качестве зонда для скрининга библиотеки *Pst*I-фрагментов хромосомной ДНК этого организма в *pUC18* был использован ген *sodB E. coli*. Клонированный ген экспрессировался с *lac*-промотора *pUC18* и мог комплементировать мутанты *sodA, sodB E. coli* [86].

Для клонирования генов рибосомных РНК *Synechococcus* PCC6301 использовали в качестве зонда меченую очищенную РНК [92]. Были обнаружены два кластера генов *rrnA* и *rrnB* сходной организации. Кластер *rrnA* кодирует 16S рРНК, рРНК^{11e}, тРНК^{Ala}, 23S рРНК и 5S рРНК. Гены были секвенированы [93—97]. Оказалось, что гомология как между генами тРНК, так и между генами рРНК цианобактерий и хлоропластов высших растений выше, чем между соответствующими генами цианобактерий и *E. coli*. Это еще один аргумент в пользу широко распространенной эндосимбиотической гипотезы, согласно которой хлоропласты берут свое начало от фотосинтезирующих прокариот.

Синтетические олигонуклеотиды используются для клонирования генов, продукты которых хотя бы частично секвенированы. Поскольку генетический код вырожден, могут быть синтезированы как несколько коротких олигомеров (14—17 нуклеотидов), так и один более длинный олигонуклеотид, последовательность которого является наиболее вероятной, исходя из частоты употребления кодонов в данном организме. Предварительная гибридизация синтезированных зондов с тотальной клеточной РНК [87] или ДНК [88] в некоторых случаях позволяет выбрать из нескольких синтетических олигонуклеотидов наиболее подходящий. При использовании синтетических олигонуклеотидов часто оказывается возможным создавать не полную, а обогащенную библиотеку генов, что облегчает скрининг [87, 89].

Так, были клонированы гены α - и β -субъединиц фикоцианина — главного фикобилипротеина, обнаруженного во всех бактериях [87—89], ген с молекулярной массой 9 000 компонента фотосистемы II *Phormidium laminosum* [90], ген газовых везикул *Anabaena flos-aquae* [91].

Клонирование генов путем прямой селекции на фенотипическую комплементацию мутантов является, в принципе, очень простым. Этот подход ограничен теми видами цианобактерий, для которых разработаны эффективные системы переноса генетической информации. Тем не менее трудность в нескольких случаях удалось обойти, клонируя с помощью фенотипической комплементации хорошо охарактеризованных мутантов *E. coli*. Так были клонированы гены фосфоенолпируваткарбоксилазы *A. nidulans* [98], гены биосинтеза тиамина, пролина и треонина *A. quadruplicatum* [99].

В настоящее время прямое клонирование с использованием мутантов применяется для поиска новых генов, кодирующих компоненты фотосинтетического аппарата цианобактерий. Мутанты могут быть выделены при помощи химического мутагенеза [100] или генноинженерным методом [101]. До сих пор не было сообщений о получении фотосинтетических (ФС⁻) мутантов транспозонным мутагенезом, хотя *pag*- и *met*-мутации этим способом удалось получить [70, 102]. Выделенные ФС⁻-мутанты могут быть комплементированы хромосомной ДНК, банком генов или рестрикционными фрагментами хромосомной ДНК дикого типа. Так, ФС⁻-мутант *Synechocystis* PCC6803 был комплементирован сначала рестрикционными фрагментами хромосомной ДНК, фракционированными в легкоплавкой агарозе или сахарозном градиенте, а затем созданным на основе комплементирующей фракции обогащенным банком генов [103].

Волк с соавт. успешно комплементировали полученные при обработке ультрафиолетовыми лучами мутанты *Anabaena sp.* PCC7120, неспособные расти с N₂ в качестве единственного источника азота банком генов дикого типа, сконструированным на основе конъюгативной космиды *pRL25C* [104]. Это первое сообщение о клонировании генов у

нитчатой цианобактерии при помощи фенотипической комплементации мутантов.

Недавно Редди с соавт. сообщили о клонировании гена *irpA* *Synechococcus* PCC7942. Для скрининга библиотеки на основе экспрессирующего вектора *λgt11* авторами были впервые использованы поликлональные антитела. Они были получены к белкам, накапливающимся в клетках *Synechococcus* PCC7942 во время роста при недостатке железа [105].

Таким образом, для клонирования генов цианобактерий применимы все основные методы, используемые при решении аналогичных задач на других прокариотах.

Перестройки генома и азотфиксация. В настоящее время известно относительно мало случаев, когда перестройки генома выступают в качестве механизма регуляции экспрессии генов, и еще меньше примеров, когда перестройки ДНК контролируются состоянием окружающей среды. Для прокариот описаны перестройки, связанные с перемещением IS- и Tn-элементов, фазовые вариации сальмонелл и антигенные вариации. Перестройки генома, связанные с онтогенезом, характерны в основном для эукариот. Это диминуция хроматина у нематод [106], перестройка иммуноглобулиновых генов в лимфоцитах позвоночных [107] и перестройки, связанные с изменением типа спаривания у дрожжей [108].

У некоторых нитчатых цианобактерий наблюдается уникальный для прокариотического мира процесс регулируемой перестройки генома при дифференциации гетероцист, наиболее полно охарактеризованный для *Anabaena* PCC7120 [109].

У хорошо изученного diaзотрофа, бактерии *Klebsiella pneumoniae*, 17 генов, отвечающих за фиксацию атмосферного азота (*nif*-генов), организованы в 8 оперонов, находящихся в пределах кластера длиной 24 т. п. н. Один из этих оперонов содержит три гена: *nifH*, *nifD*, *nifK*, которые кодируют главные компоненты нитрогеназного комплекса, отвечающего за фиксацию атмосферного азота. Это три гена в высокой степени консервативны у всех азотфиксирующих организмов.

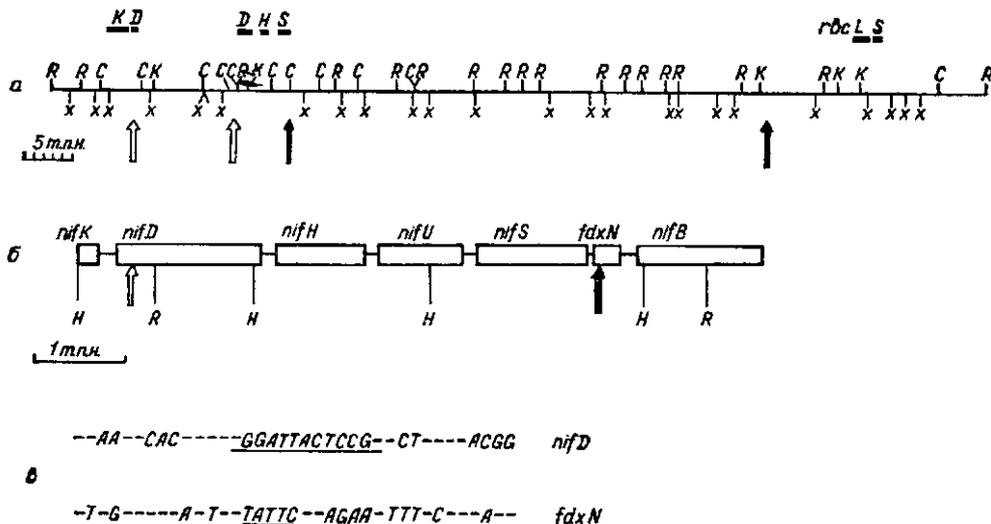
Среди нитчатых цианобактерий наблюдаются различия в организации *nif*-генов. У безгетероцистных азотфиксирующих нитчатых цианобактерий, объединенных Риппка в раздел III [8], гена *nifH*, *nifD* и *nifK* прилегают друг к другу и образуют оперон. У ветвящейся гетероцистной цианобактерии *Fischerella* ATCC29929 (раздел V) наблюдается аналогичная организация *nif*-генов [111]. Большинство же свободноживущих неветвящихся нитчатых гетероцистных цианобактерий (раздел IV) имеет в геноме вегетативных клеток протяженную вставку внутри гена *nifD* [109—112].

В отсутствие источника связанного азота в среде роста приблизительно 10-я вегетативная клетка в нити *Anabaena* sp. PCC7120 претерпевает превращение в гетероцисту, нефотосинтезирующую толстостенную клетку, которая морфологически и биохимически приспособлена для фиксации азота [113]. Гетероцисты обеспечивают анаэробные условия для функционирования нитрогеназы, которая обратимо инактивируется кислородом. Связанный азот в виде глутамина поступает из гетероцист в вегетативные клетки. В свою очередь, из вегетативных клеток в гетероцисты поступают продукты фотосинтеза. Дифференциация вегетативной клетки в гетероцисту подавляется внешним источником связанного азота, например, аммонием или находящейся поблизости гетероцистой.

В процессе превращения вегетативной клетки в гетероцисту у *Anabaena* sp. PCC7120 происходят, по крайней мере, две перестройки генома. Обе они осуществляются на одной из поздних стадий дифференцировки гетероцисты (начинаются через 18 ч после переноса культуры в среду, не содержащую связанного азота, и заканчиваются через 30 ч) [114], когда уже заметны морфологические изменения, и почти одно-

временно с этими перестройками среди клеточной РНК нозерн-анализом обнаруживается мРНК *nif*-генов [109].

Первая перестройка является результатом эксцизии фрагмента ДНК длиной 11 т. п. н., находящегося внутри гена *nifD*, ближе к его 3'-концу (в дальнейшем для краткости называемого *nifD*-элементом). Фрагмент фланкирован прямыми повторами длиной 11 п. н., которые окружены областями, имеющими меньшую гомологию. Сайт-специфическая рекомбинация внутри этих прямых повторов приводит к делеции фрагмента из хромосомы (рисунок). Вырезанный *nifD*-элемент обнару-



Физические карты участков хромосомы вегетативной клетки (а) и гетероцисты (б) *Anabaena* sp. PCC7120 в районе перестроек и консенсусные последовательности нуклеотидов вблизи точек разрыва (в): а — показано расположение генов *nifH* (H), *nifD* (D), *nifK* (K), *nifS* (S) и оперона *rbclS*. Светлыми стрелками указаны границы *nifD*-элемента (11 т. п. н.); черными — *fdxN*-элемента; б — светлая стрелка — сайт рекомбинации *nifD*-перестройки; чёрная стрелка — сайт рекомбинации *fdxN*-перестройки; сайты рестрикции: R — *EcoRI*; H — *HindIII*; C — *ClaI*; X — *XbaI*; K — *KpnI*; в — подчеркнуты последовательности, внутри которых происходят рекомбинации при перестройках

Physical maps of the *Anabaena* PCC7120 vegetative cell (a) and heterocyst (b) chromosome in the rearrangement region and consensus sequences near breakpoints (v): a — positions for the *nifH* (H), *nifD* (D), *nifK* (K), *nifS* (S) genes and *rbclS* operon are shown. The open arrows indicate borders of the *nifD* element (11 kb). Solid arrows indicate borders of the *fdxN* element (55 kb); б — open arrow indicates the *nifD* rearrangement breakpoint; solid arrow indicates the *fdxN* rearrangement breakpoint; restriction sites are: R — *EcoRI*, H — *HindIII*, C — *ClaI*, X — *XbaI*, K — *KpnI*; в — sequences within which recombinations occur are underlined

живается в гетероцистах в виде стабильной кольцевой молекулы, которая может быть выделена в суперскрученной и открытой кольцевой форме. Функция ее неизвестна. Эксцизия *nifD*-элемента (в дальнейшем *nifD*-перестройка) приводит к восстановлению открытой рамки считывания (ОРС) гена *nifD* и образованию оперона *nifHDK* под контролем промотора *nifH* [115]. Неизвестно, может ли ген *nifK* экспрессироваться в вегетативных клетках [109]. При нозерн-анализе РНК гетероцист *Anabaena* PCC7120 с использованием в качестве зонда генов *nifH*, *nifD*, *nifK* обнаруживается единственная мРНК длиной 4,7 т. п. [109].

Один из прямых повторов длиной 11 п. н. находится на расстоянии около 330 п. н. от 5'-конца гена *nifK* против направления транскрипции. Второй расположен внутри гена *nifD*. Перестройка приводит к замене 27 С-концевых аминокислотных остатков, кодируемых ОРС вегетативной клетки, 43 аминокислотными остатками ОРС гетероцисты. Сравнение предсказанных С-концевых аминокислотных последовательностей генов *nifD* двух видов *Rhizobium* с таковой ОРС вегетативных клеток не выявило гомологии, в то время как была обнаруже-

на высокая гомологичность этих последовательностей с С-концевой аминокислотной последовательностью ОРС гетероцисты. Данные вестерн-блоттинга свидетельствуют о наличии единственной формы белка *nifD*. Следовательно, в *Anabaena sp.* PCC7120 экспрессируется только «перестроенный» ген *nifD* [109].

Вторая перестройка, происходящая при дифференциации гетероцист, заключается в эксцизии фрагмента ДНК длиной около 55 т. п. н. из гена *fdxN* (*fdxN*-перестройка). Вырезающийся фрагмент ДНК длиной 55 т. п. н. (*fdxN*-элемент) в хромосоме вегетативных клеток фланкирован прямыми повторами длиной 5 п. н., которые в свою очередь фланкированы областями частичной гомологии, более протяженными с одной стороны, чем с другой (рисунок). *FdxN*-перестройка происходит в результате сайт-специфической рекомбинации между этими повторами. Повторы, вовлеченные в *nifD*- и *fdxN*-перестройки, не гомологичны друг другу (рисунок). Кроме того, при индукции гетероцист в микроаэробных условиях происходит только *fdxN*-перестройка, в то время как *nifD*-перестройки не происходит. При этом в культуре не обнаруживаются морфологических изменений [116]. Инактивация гена *xisA* в хромосоме *Anabaena* PCC7120, который вовлекается в *nifD*-перестройку, блокирует ее, в то время как *fdxN*-перестройка при этом происходит нормально [80]. По-видимому, ферменты, вовлекаемые в эти перестройки, различны [109, 117].

FdxN-элемент вырезается из хромосомы в виде кольца и присутствует в гетероцистах, не деградируя и не амплифицируясь заметным образом, хотя и не может быть выделен в кольцевой форме [116].

FdxN-перестройка приводит к восстановлению целостности гена *FdxN*. В результате гены *nifB*, *fdxN*, *nifS* и *nifU* оказываются в непосредственной близости и, возможно, образуют оперон, а *rbcLS*-оперон, находящийся в хромосоме вегетативной клетки на расстоянии около 65 т. п. н. от гена *nifS*, оказывается в гетероцисте на расстоянии 10 т. п. н. от него [116, 117].

Было обнаружено, что препараты плазмиды *pAn207* (получена в результате клонирования в *pBR322* 17 т. п. н. *EcoRI*-фрагмента ДНК вегетативных клеток *Anabaena sp.* PCC7120, внутри которого происходит *nifD*-перестройка), выделенные из *E. coli*, помимо *pAn207* размером 21 т. п. н. содержат другую плазмиду, меньшую на 11 т. п. н. Оказалось, что в *E. coli* с низкой частотой происходит спонтанная *nifD*-перестройка, результатом которой является появление меньшей плазмиды. При помощи транспозонного мутагенеза в пределах *nifD*-элемента вблизи повтора величиной 11 п. н., проксимального к гену *nifK*, был локализован ген *xisA*, кодирующий сайт-специфическую рекомбиназу, ответственную за *nifD*-перестройку [118]. При определении нуклеотидной последовательности этой области обнаружили ОРС длиной 1 062 п. н., которая может кодировать полипептид с молекулярной массой 416 000. Предсказанный белок имеет суммарный заряд +18, что согласуется с ожидаемым для ДНК-связывающего белка [109, 118].

Впоследствии авторы произвели сайт-направленную инактивацию гена *xisA* в хромосоме *Anabaena sp.* PCC7120. Мутанты в ответ на дефицит в среде связанного азота образовывали гетероцисты, в которых нормально происходила эксцизия *fdxN*-элемента, однако не происходила *nifD*-перестройка. Клетки таких мутантов нормально росли на среде с NH_4^+ , но не могли использовать N_2 в качестве единственного источника азота. Очевидно, ген *xisA* необходим для нормальной эксцизии *nifD*-элемента, так же как эксцизия — для нормальной экспрессии генов азотфиксации [80].

У *A. variabilis* ATCC29413 наблюдается организация *nif*-генов, сходная с таковой у *Anabaena sp.* PCC7120, и при дифференциации гетероцист происходит аналогичный процесс эксцизии фрагмента ДНК длиной 11 т. п. н. из гена *nifD* (*nifD*-перестройка) [119, 120]. При этом последовательности прямых повторов длиной 11 п. н., фланкирующих *nifD*-элементы *Anabaena sp.* PCC7120 и *A. variabilis* ATCC29413, иден-

тичны. Идентична и локализация гена *xisA* в пределах *nifD*-элемента обоих организмов. Более того, ген *xisA* *A. variabilis* ATCC29413 способен комплементировать мутацию *xisA* гена *Anabaena sp.* PCC7120. Однако у *A. variabilis* ATCC29413 в процессе дифференциации гетероцист не наблюдается перестройки, аналогичной *fdxN*-перестройке *Anabaena sp.* PCC7120. Оперон *rbcLS* *A. variabilis* ATCC29413 удален от гена *nifS* в вегетативных клетках и в гетероцистах приблизительно на 10 т. п. н., что аналогично расположению этих генов в гетероцистах *Anabaena sp.* PCC7120 [119].

Прерывистый *nifHDK*-оперон, по-видимому, является общим признаком невставящихся цианобактерий [110—112]. Неизвестно пока, все ли цианобактерии этой группы имеют последовательность, аналогичную *nifD*-элементу *Anabaena sp.* PCC7120. Сходство *nifD*-элементов в *Anabaena sp.* PCC7120 и *A. variabilis* ATCC29413 может быть результатом инсерции у общего предка. Возможно и противоположное: элемент распространился горизонтально в результате независимых инсерций в последовательности-мишени длиной 11 н. п., которые должны быть консервативны у невставящихся гетероцистных цианобактерий вследствие расположенного внутри ОРС высококонсервативного гена [119].

Экцизия *nifD*-элемента напоминает таковую лизогенного фага. Элемент *e14*, присутствующий в некоторых штаммах *E. coli*, может быть примером дефектного лизогенного фага. Этот элемент вырезается из хромосомы *E. coli* под действием УФ-облучения [121] и кодирует гены, необходимые для лизогении и перестройки в сайтах *att* и *e14* [122, 123]. Элемент *e14* содержит также ген *pin*-рекомбиназы — член *hin*, *gin*, *pin*-семейства рекомбиназ, — катализирующих инверсию прилегающей области *P* длиной 1,8 т. п. н. [123]. Если *nifD*-элемент является дефектным лизогенным фагом, он может давать преимущества вегетативным клеткам хозяина в виде иммунности к инфекции тем же или родственным фагом или посредством сообщения системы рестрикции — модификации. Или, наоборот, элемент *nifD* может защищать от инфекции фагом, не родственным элементу.

SOME ASPECTS OF MOLECULAR CYANOBACTERIAL GENETICS

M. F. Alekseyev, N. A. KozYROVSKAYA

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The review is devoted to the molecular cyanobacterial genetics. Data on systems of genetic exchange, endogenous plasmids, mobile genetic elements, specific endonucleases, developmental gene rearrangements, gene cloning and cloning vectors are summarized.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шестаков С. В. Перспективы использования фототрофных бактерий в биотехнологии // Биотехнология / Под ред. А. А. Баева. — М.: Наука, 1984. — С. 212—216.
2. Ammonium ion-excreting cyanobacterial mutant as a source of nitrogen for growth of rice: a feasibility study / C. Latoree, J. H. Lee, H. Spiller, T. Shanmugam // Biotechnology Lett. — 1986. — 8, N 7. — P. 507—512.
3. Padhy R. N. Cyanobacteria employed as fertilizers and waste disposers // Nature. — 1985. — 317, N 6037. — P. 475—476.
4. Asato Y., Ginosa H. S. Separation of small circular DNA molecules from the blue-green alga *Anacystis nidulans* // Ibid. — 1973. — 244, N 5412. — P. 132—133.
5. Lau R. H., Sapienza C., Doolittle W. F. Cyanobacterial plasmids: their widespread occurrence and the existence of regions of homology between plasmids in the same and different species // Mol. and Gen. Genet. — 1980. — 178, N 2. — P. 203—211.
6. Felkner R. H., Barnum S. R. Plasmid content and homology of 16 strains of filamentous, non-heterocystous cyanobacteria // Curr. Microbiol. — 1988. — 17, N 1. — P. 37—41.
7. Lambert G. R., Scott J. G., Curr N. G. Characterization and cloning of extrachromosomal DNA from filamentous cyanobacteria // FEMS Microbiol. Lett. — 1984. — 21, N 2. — P. 225—231.

8. *Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria* / R. Rippka, J. Derules, J. B. Waterbury et al. // *J. Gen. Microbiol.*— 1979.— 111, N 1.— P. 1—61.
9. *Rippka R., Cohen-Basire G.* The cyanobacteriales: a legitimate order based on the type strain cyanobacterium stanieri // *Ann. Inst. Pasteur.*— 1983.— 134b.— P. 1357—1363.
10. *Friedberg D., Seiffers J.* Plasmids in two cyanobacterial strains // *FEBS Lett.*— 1979.— 107, N 1.— P. 165—168.
11. *Plasmid distribution among unicellular and filamentous cyanobacteria: occurrence of large and mega-plasmids* / M. C. Rebiere, A. M. Castes, J. Houmard, T. N. de Marsac // *FEMS Microbiol. Lett.*— 1986.— 37, N 3.— P. 269—275.
12. *Potts M.* Distribution of plasmids in cyanobacteria of LPP group // *Ibid.*— 1984.— 24, N 2—3.— P. 351—354.
13. *Frauche C., Reunaud P. A.* Characterization of several tropical strains of *Anabaena* and *Nostoc*: morphological and physiological properties and plasmid content // *Ann. Inst. Pasteur.*— 1986.— 137A.— P. 179—197.
14. *De Marsac T. N., Houmard J.* Advances in cyanobacterial molecular genetics // *The cyanobacteria* / Eds P. Fay, C. Van Baalen.— Amsterdam: Elsevier, 1987.— P. 251—302.
15. *Lambert G. R., Carr N. Y.* Rapid small-scale plasmid isolation by several methods from filamentous cyanobacteria // *Arch. Microbiol.*— 1982.— 133, N 1.— P. 122—125.
16. *De Marsac T. N.* Phycobilisomes and complementary chromatic adaptation // *Bull. Inst. Pasteur.*— 1983.— 81.— P. 201—254.
17. *Lau R. H., Doolittle W. F.* Covalently closed circular DNAs in closely related unicellular cyanobacteria // *J. Bacteriol.*— 1979.— 137, N 2.— P. 648—652.
18. *Homology of plasmids in strains of unicellular cyanobacteria* / C. A. M. J. van den Hondel, W. Keegstra, W. E. Borrias, G. A. van Arkel // *Plasmid.*— 1979.— 2, N 4.— P. 323—333.
19. *Van den Hondel C. A. M. J. J., van Arkel G. A.* Development of a cloning system in cyanobacteria // *Antonie van Leeuwenhoek.*— 1980.— 46.— P. 228—229.
20. *Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from Escherichia coli to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria* / C. P. Wolk, A. Vonshak, P. Kehoc, J. Elhai // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1984.— 81, N 5.— P. 1561—1565.
21. *Schmetterer G., Wolk C. P.* Identification of the region of cyanobacterial plasmid *pDU1* necessary for replication in *Anabaena* sp. strain M-131 // *Gene.*— 1988.— 62, N 1.— P. 101—109.
22. *The large endogenous plasmid of Anacystis nidulans: mapping, cloning and localization of the origin of replication* / D. Laudenbach, N. A. Straus, S. Gendel, J. P. Williams // *Mol. and Gen. Genet.*— 1983.— 192, N 3.— P. 402—407.
23. *Laudenbach D. E., Straus N. A., Williams J. P.* Evidence for two distinct origins of replication in the large endogenous plasmid of *Anacystis nidulans* R2 // *Ibid.*— 1985.— 199, N 2.— P. 300—305.
24. *Walsby A. E.* Absence of gas vesicle protein in a mutant of *Anabaena flos-aquae* // *Arch. Microbiol.*— 1977.— 114, N 2.— P. 167—170.
25. *Hauman J. H.* Is a plasmid(s) involved in toxicity of *Microcystis aeruginosa*? // *The water environment. Algal toxins and health* / Ed. W. W. Carmichael.— New York: London: Plenum press, 1981.— 20.— P. 97—102.
26. *Plasmids in toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium Microcystis aeruginosa* / W. Schwabe, A. Weihe, T. Börner et al. // *Curr. Microbiol.*— 1988.— 17, N 3.— P. 133—137.
27. *Toxicity and extrachromosomal DNA in strains of the cyanobacterium Microcystis aeruginosa* / D. Vakeria, G. A. Godd, G. Bells et al. // *FEMS Microbiol. Lett.*— 1985.— 29, N 1—2.— P. 69—79.
28. *Whitehead P. R., Brown N. K.* Three restriction endonucleases from *Anabaena flos-aquae* // *J. Gen. Microbiol.*— 1985.— 131, N 4.— P. 951—958.
29. *Whitehead P. R., Brown N. L.* A simple and rapid method for screening bacteria for type II restriction endonucleases: Enzymes in *Aphanothece halophytica* // *Arch. Microbiol.*— 1985.— 141, N 1.— P. 70—74.
30. *Castes A.-M., Houmard J., de Marsac T. N.* Is cell motility a plasmid-encoded function in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803? // *FEMS Microbiol. Lett.*— 1986.— 37, N 3.— P. 277—281.
31. *Simon R. D.* Survey extrachromosomal DNA found in filamentous cyanobacteria // *J. Bacteriol.*— 1978.— 136, N 1.— P. 414—418.
32. *Photomorphogenesis and complementary chromatic adaptation in Fremyella diplosiphon* / L. Bogorad, S. M. Gendel, J. H. Hauray, K. P. Koller // *Photosynthetic prokaryotes: cell differentiation and function* / Eds G. C. Papageorgion, L. Packer.— New York: Elsevier, 1983.— P. 119—126.
33. *Transformation in the cyanobacterium Synechococcus R2: improvement of efficiency; role of the pU124 plasmid* / F. Chauvat, C. Astier, F. Vedel, F. Joset-Espardellier // *Mol. and Gen. Genet.*— 1983.— 191, N 1.— P. 39—45.
34. *Янулайтис А. А.* Ферменты рестрикции и их применение // *Итоги науки и техники.*— М.: ВИНТИ, 1989.— С. 12—25.— (Сер. Биотехнология; Т. 17).
35. *De Waard A., Duyvesteyn M.* Are sequence-specific deoxyribonucleases of value as taxonomic markers of cyanobacterial species // *Arch. Microbiol.*— 1980.— 128, N 2.— P. 242—247.

36. Infrequent cleavage of cloned *Anabaena variabilis* DNA by restriction nucleases from *A. variabilis* / A. Herrero, J. Elhai, B. Hohn, C. P. Wolk // J. Bacteriol.—1984.—160, N 2.—P. 781—784.
37. Lambert G. R., Carr N. G. Resistance of DNA from filamentous and unicellular cyanobacteria to restriction endonuclease cleavage // Biochim. et biophys. acta.—1984.—781, N 1.—P. 45—55.
38. Sequence-specific nucleases from the cyanobacterium *Fremyella diplosiphon*, and a peculiar resistance of its chromosomal DNA towards cleavage by other restriction enzymes / C. A. M. J. J. van den Hodel, R. W. van Leen, C. A. van Arkel et al. // FEMS Microbiol. Lett.—1983.—16, N 1.—P. 7—12.
39. Restriction analysis and quantitative estimation of methylated bases of filamentous and unicellular cyanobacterial DNAs / R. N. Padhy, F. G. Hottat, M. M. Coene, P. P. Hoet // J. Bacteriol.—1988.—170, N 4.—P. 1934—1939.
40. Geir G. E., Modrich P. Recognition sequence of the dam methylase of *Escherichia coli* K12 and mode of cleavage of *dpn I* endonuclease // J. Biol. Chem.—1979.—254, N 4.—P. 1408—1414.
41. Currier T. C., Wolk C. P. Characterization of *Anabaena variabilis* influencing plaque formation by cyanophage *NI* // J. Bacteriol.—1979.—139, N 1.—P. 88—99.
42. Szekers M. Phage-induced development of a site-specific endonuclease in *Anacystis nidulans*, a cyanobacterium // Virology.—1981.—111, N 1.—P. 1—10.
43. Szekers M., Szmidt A. E., Torok I. Evidence for a restriction-modification-like system in *Anacystis nidulans* infected by cyanophage *AS-1* // Eur. J. Biochem.—1983.—131, N 1.—P. 137—141.
44. Sequence-specific endonucleases in strains of *Anabaena* and *Nostoc* / M. G. G. Duyvesteyn, J. Korstuijse, A. de Waard et al. // Arch. Microbiol.—1983.—134, N 1—4.—P. 276—284.
45. Reaston J., Carr N. G. Purification of the modification enzyme *M. Nsp MAC 1* from the filamentous cyanobacterium *Nostoc* PCC 8009 // Vth Int. symp. on photosynthetic prokaryotes: Abstr.—Grindelvald, 1985.—P. 332.
46. Gallagher M. L., Burke W. F., Jr. Sequence-specific endonuclease from the transformable cyanobacterium *Anacystis nidulans* *R2* // FEMS Microbiol. Lett.—1985.—26, N 3.—P. 317—321.
47. Cyanobacterial insertion elements: characterization and potential / D. Masel, A.-M. Castes, J. Houmard, N. T. de Marsak // Int. symp. on photosynthetic prokaryotes: Abstr.—Noodwijkerhout, 1988.—P. 227.
48. Insertion sequence IS 2 in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis fritschii* / G. C. Machray, D. Vakeria, G. A. Gold, W. D. P. Stewart // Gene.—1988.—67, N 2.—P. 301—305.
49. Shestakov S., Nhyen N. Evidence for genetic transformation in blue-green alga *Anacystis nidulans* // Mol. and Gen. Genet.—1970.—107, N 3.—P. 372—375.
50. Wilmotte A. M. R., Stam W. T. Genetic relationships among cyanobacterial strains originally designated as «*Anacystis nidulans*» and some other *Synechococcus* strains // J. Gen. Microbiol.—1984.—103, N 1.—P. 27—37.
51. Deoxyribonucleic acid base composition of cyanobacteria / M. Herdman, M. Janiver, J. B. Waterbury et al. // Ibid.—1979.—111, N 1.—P. 63—71.
52. Devilly C., Houghton J. A study of genetics transformation in *Gleocapsa alpicola* // Ibid.—1977.—98, N 2.—P. 277—280.
53. Genetic transfer of herbicide resistance gene(s) from *Gleocapsa* spp. to *Nostoc muscorum* / D. T. Singh, K. Nirmala, D. R. Modi et al. // Mol. and Gen. Genet.—1987.—208, N 3.—P. 436—438.
54. Astier C., Espardellier F. Mise en evidence d'un systeme de transfert genetique chez une cyanophycee du genre *Aphanocapsa* // C. r. Hebd. seances Acad. Sci., Paris.—1976.—282D.—P. 795—797.
55. Orkiszewski K., Kaney A. Genetic transformation of the blue-green bacterium *Anacystis nidulans* // Arch. Microbiol.—1974.—98, N 1.—P. 31—37.
56. Herdman M. Mutations arising during transformation in the blue-green alga *Anacystis nidulans* // Mol. and Gen. Genet.—1973.—120, N 3.—P. 369—378.
57. Herdman M., Carr N. G. Recombination in *Anacystis nidulans* mediated by an extracellular DNA-RNA complex // J. Gen. Microbiol.—1971.—68, N 1.—P. 97—102.
58. Stevens S., Porter R. Transformation in *Agmenellum quadruplicatum* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1980.—77, N 10.—P. 6052—6056.
59. Grigorieva G., Shestakov S. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803 // FEMS Microbiol. Lett.—1982.—13, N 4.—P. 367—370.
60. Golden S. S., Sherman L. A. Optimal conditions for genetic transformation of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* *R2* // J. Bacteriol.—1984.—158, N 1.—P. 36—42.
61. Porter R. D. Transformation in cyanobacteria // CRC Crit. Rev. Microbiol.—1987.—13, N 2.—P. 11—132.
62. Williams J., Szalay A. Stable integration of foreign DNA into the chromosome of the cyanobacterium *Synechococcus* *R2* // Gene.—1983.—24, N 1.—P. 37—51.
63. Buzby J. S., Porter R. D., Stevens S. E., Jr. Plasmid transformation in *Agmenellum quadruplicatum* *PR-6*: construction of biphasic plasmids and characterization of their transformation properties // J. Bacteriol.—1983.—154, N 3.—P. 1446—1450.
64. Grigorieva G., Shestakov S. Application of the genetic transformation method for taxonomic analysis of unicellular blue-green algae // 2nd Int. symp. on photosynthetic prokaryotes: Abstr.—Dundee, 1976.—P. 220—222.

65. *A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium Anacystis nidulans R2* / C. J. Kuhlmeier, A. M. M. Thomas, A. van der Ende et al. // *Plasmid*.—1983.—10, N 2.—P. 156—163.
66. *Shestakov S., Elanskaya I., Bibikova M.* Vectors for gene cloning in *Synechocystis* sp. 6803 // Vth Int. symp. on photosynthetic prokaryotes: Abstr.—Grindelwald, 1985.—P. 109.
67. *Kolowsky K. S., Williams J. G. K., Szalay A. A.* Length of foreign DNA in the chromosome of the cyanobacterium *Synechococcus R2* // *Gene*.—1984.—27, N 3.—P. 289—299.
68. *Flores E., Wolk C. P.* Identification of facultatively heterotrophic, N₂-fixing cyanobacteria able to receive plasmid vectors from *Escherichia coli* by conjugation // *J. Bacteriol.*—1985.—162, N 3.—P. 1339—1341.
69. *Introduction of transposon Tn 901 into a plasmid of Anacystis nidulans: preparation for cloning in cyanobacteria* / C. A. M. J. J. van den Hondel, S. Verbeek, A. van der Ende et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1980.—77, N 3.—P. 1570—1574.
70. *A new approach for molecular cloning in cyanobacteria: cloning of an Anacystis nidulans met gene using a Tn 901-induced mutant* / T. N. de Marsac, W. E. Borrias, C. J. Kuhlmeier et al. // *Gene*.—1982.—20, N 1—2.—P. 111—119.
71. *Шестаков С. В., Еланская И. В., Бибикова М. В.* Векторы интеграции для цианобактерии *Synechocystis* PCC6803 // Докл. АН СССР.—1985.—282, № 1.—С. 176—179.
72. *Integrative recombination in Anacystis nidulans R2* / M. T. Borrias, T. van der Plas, G. de Vrieze, K. P. Weisbeek // Vth Int. symp. on photosynthetic prokaryotes: Abstr.—Noodwijkerhout, 1988.—P. 16.
73. *Kuhlmeier W. E., Borrias M. T., van den Hondel C. A. M. J. J.* Vectors for cloning in cyanobacteria: construction and characterization of two recombinant plasmids capable of transformation to *Escherichia coli* K-12 and *Anacystis nidulans R2* // *Mol. and Gen. Genet.*—1981.—184, N 2—3.—P. 249—254.
74. *Sherman L. A., van den Putte P.* Construction of a hybrid plasmid capable of replication in the bacterium *Escherichia coli* and the cyanobacterium *Anacystis nidulans* // *J. Bacteriol.*—1982.—150, N 1.—P. 410—413.
75. *Shuttle cloning vectors for the cyanobacterium Anacystis nidulans* / S. Gendel, N. Straus, D. B. Pulley, J. Williams // *J. Bacteriol.*—1983.—156, N 1.—P. 148—154.
76. *Lau R. H., Straus N. A.* Versatile shuttle cloning vectors for the unicellular cyanobacterium *Anacystis nidulans R2* // *FEMS Microbiol. Lett.*—1985.—27, N 3.—P. 253—256.
77. *Friedberg D., Seiffers J.* A new hybrid plasmid capable of transforming *Escherichia coli* and *Anacystis nidulans* // *Gene*.—1983.—22, N 2.—P. 267—275.
78. *A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803* / F. Chauvat, L. de Vries, A. van der Ende, G. A. van Arkel // *Mol. and Gen. Genet.*—1986.—204, N 1.—P. 185—191.
79. *Shmetterer G., Wolk C. P., Elhai J.* Expression of luciferases from *Vibrio harveyi* and *Vibrio fischerii* in filamentous cyanobacteria // *J. Bacteriol.*—1986.—167, N 1.—P. 411—414.
80. *Golden J., Wiest D. R.* Genome rearrangement and nitrogen fixation in *Anabaena* blocked by inactivation of *xisA* gene // *Science*.—1988.—242, N 4884.—P. 1421—1423.
81. *McFarlane G. J. B., Machray G. C., Stewart W. D. P.* A simplified method for conjugal gene transfer into the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 27893 // *J. Microbiol. Meth.*—1987.—6, N 2.—P. 301—305.
82. *Elhai J., Wolk C. P.* Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria // *Meth. Enzymol.*—1987.—167.—P. 747—754.
83. *Organization and nucleotide sequence of genes encoding core components of the phycobilisomes from Synechococcus 6301* / J. Houmard, D. Mazel, T. Moquet, D. A. Bryant // *Mol. and Gen. Genet.*—1986.—205, N 3.—P. 404—410.
84. *Genes encoding the alpha, gamma, delta and four F₀ subunits at ATP synthase constitute an operon in the cyanobacterium Anabaena sp. strain PCC 7120* / D. F. McCarr, R. A. Whitaker, J. Alam et al. // *J. Bacteriol.*—1988.—170, N 8.—P. 3448—3458.
85. *DeFrancesco N., Potts M.* Cloning of *nifHD* from *Nostoc commune* UTEX 584 and of the flanking region homologous to part of the *Azotobacter vinelandii nifU* gene // *Ibid.*—N. 7.—P. 3297—3300.
86. *Laudenbach D. E., Trick C. G., Straus N. A.* Cloning and characterization of *Anacystis nidulans R2* superoxide dismutase gene // *Mol. and Gen. Genet.*—1989.—216, N 2—3.—P. 455—462.
87. *Genes for alpha and beta subunits of phycocyanin* / R. de Lorimier, D. A. Bryant, R. D. Porter et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1984.—81, N 24.—P. 7946—7950.
88. *Alvarado-Urbina G., Lau P. C. K.* Phycocyanin α -subunit gene of *Anacystis nidulans R2*: cloning, nucleotide sequencing and expression in *Escherichia coli* // *Gene*.—1987.—52, N 1.—P. 21—29.
89. *Pilot T. J., Fox J. L.* Cloning and sequencing of the genes encoding the alpha and beta subunit C-phycocyanin from the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1984.—81, N 22.—P. 6983—6987.
90. *Gene sequence for the 9 kDa component of photosystem II from the cyanobacterium Phormidium laminosum indicates similarities between cyanobacterial and other lea-*

- der sequences / T. P. Wallace, A. C. Stewart, D. Pappin, C. J. Howe // Mol. and Gen. Genet.—1989.—216, N 2—3.— P. 334—340.
91. Molecular cloning and nucleotide sequence of a developmentally regulated gene from cyanobacterium *Calothrix* PCC7601: a gas vesicle protein gene / N. de Marsac, D. Mascl, D. A. Braunt, J. Houmard // Nucl. Acids Res.—1985.—13, N 20.— P. 7223—7236.
 92. Tomioka N., Shinozaki K., Sugiura M. Molecular cloning and characterization of ribosomal RNA genes from a blue-green alga, *Anacystis nidulans* // Mol. and Gen. Genet.—1981.—184, N 3.— P. 359—363.
 93. Tomioka N., Sugiura M. Nucleotide sequence of the 16S—23S spacer region in the *rRNA* operon from the blue-green alga, *Anacystis nidulans* // Ibid.—1984.—193, N 3.— P. 427—430.
 94. Tomioka N., Sugiura M. The complete nucleotide sequence of a 16S-rRNA gene from a blue-green alga, *Anacystis nidulans* // Ibid.—1983.—191, N 1.— P. 46—50.
 95. Douglas S. E., Doolittle W. F. Nucleotide sequence of the 5S rRNA gene and flanking regions in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* // FEBS Lett.—1984.—166, N 2.— P. 307—310.
 96. Douglas S. E., Doolittle W. F. Complete nucleotide sequence of the 23S rRNA gene of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* // Nucl. Acids Res.—1984.—12, N 7.— P. 3373—3386.
 97. Kumano M., Tomioka N., Sugiura M. The complete nucleotide sequence of a 23S rRNA gene from a blue-green alga *Anacystis nidulans* // Gene.—1983.—24, N 2.— P. 219—225.
 98. Cloning of phosphoenolpyruvate carboxylase gene from a cyanobacterium *Anacystis nidulans* in *Escherichia coli* / T. Kodaki, F. Katagiri, M. Asano et al. // J. Biochem.—1985.—97, N 2.— P. 533—539.
 99. Genes from the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* isolated by complementation: characterization and production of merodiploids / R. D. Porter, J. S. Buzby, A. Pilon et al. // Gene.—1986.—41, N 2—3.— P. 249—254.
 100. Дефективные по фотосинтезу мутанты цианобактерии *Synechocystis* PCC6803 / С. В. Шестаков, О. А. Кокшарова, В. В. Грошев, И. В. Еланская // Биол. науки.—1988.—1, № 1.— С. 75—80.
 101. Mutagenesis by random cloning of an *Escherichia coli* kanamycin resistance gene into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803; selection of mutants defective in photosynthesis / F. Chauvat, P. Rouel, H. Bottin, A. Boussac // Mol. and Gen. Genet.—1989.—216, N 1.— P. 51—59.
 102. Cloning of a third nitrate reductase gene from the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2 using cosmid library / C. J. Kuhlemcier, V. J. P. Teenwsen, M. J. Janssen, G. A. Arkel // Gene.—1984.—31, N 1.— P. 109—116.
 103. Dzelkalns V. A., Bogorad L. Molecular analysis of a mutant defective in photosynthetic oxygen evolution and isolation of a complementing clone by a novel screening procedure // EMBO J.—1988.—7, N 2.— P. 333—338.
 104. Isolation and complementation of mutants *Anabaena* sp. strain PCC7120 unable to grow aerobically on dinitrogen / C. P. Wolk, Y. Cai, L. Cardemil et al. // J. Bacteriol.—1988.—170, N 3.— P. 1239—1244.
 105. Cloning, nucleotide sequence and mutagenesis of a gene (*irp A*) involved in iron-deficient growth of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 / K. J. Reddy, G. S. Bullerjahn, D. M. Sherman, L. A. Sherman // Ibid.—1988.—170, N 10.— P. 4466—4476.
 106. Streeck R. E., Moritz K. B., Beek K. Chromatin diminution in *Ascaris*: nucleotide sequence of the eliminated satellite DNA // Nucl. Acids Res.—1982.—10, N 11.— P. 3495—3502.
 107. Honjo T., Kataoka T. Organization of immunoglobulin heavy chain genes and allelic deletion model // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1978.—75, N 4.— P. 2140—2144.
 108. Haber J. E. Mating-type genes of *Saccharomyces cerevisiae* // Mobile genetic elements / Ed. J. A. Shapiro.—New York: Acad. press, 1983.— P. 559—619.
 109. Developmental rearrangement of cyanobacterial nitrogen fixation genes / R. Haselkorn, J. W. Golden, P. J. Lammers, M. E. Mulligan // Trends Genet.—1986.—2, N 4.— P. 486—492.
 110. Saville B., Straus N., Coleman J. R. Contiguous organization of nitrogenase genes in a heterocystous cyanobacterium // Plant Physiol.—1987.—85, N 1.— P. 26—29.
 111. Meeks J. C., Joseph C. M., Haselkorn R. Organization of the *nif* genes in cyanobacteria in symbiotic association with *Azolla* and *Anthoceros* // Arch. Microbiol.—1988.—150, N 1.— P. 61—71.
 112. Kallas T., Coursin T., Rippha R. Different organization of *nif* genes in nonheterocystous and heterocystous cyanobacteria // Plant. Mol. Biol.—1985.—5, N 5.— P. 321—329.
 113. Haselkorn R. Heterocystis // Annu. Rev. Plant Physiol.—1978.—29.— P. 319—344.
 114. Golden J. W., Robinson S. J., Haselkorn R. Rearrangement of nitrogen fixation genes during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* // Nature.—1985.—314, N 6010.— P. 419—423.
 115. Golden J. W., Mulligan M. E., Haselkorn R. Different recombination site specificity of two developmentally regulated genome rearrangement // Ibid.—1987.—327, N 6122.— P. 526—529.
 116. Deletion of a 55-kilobase-pair DNA element from the chromosome during heterocyst differentiation of *Anabaena* sp. strain PCC7120 / J. W. Golden, C. D. Carrasco, M. E. Mulligan et al. // J. Bacteriol.—1988.—170, N 11.— P. 5034—5041.

117. Mulligan M. E., Buikema W. J., Haselkorn R. Bacterial-type ferredoxin genes in the nitrogen fixation regions of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 and *Rhizobium meliloti* // *Ibid.*—N 9.— P. 4406—4410.
118. Lammers P. J., Golden J. W., Haselkorn R. Identification and sequence of a gene required for a developmentally regulated DNA excision in *Anabaena* // *Cell.*—1986.— **44**, N 6.— P. 905—911.
119. Excision of an 11 kb-pair DNA element from within the *hif D* gene in *Anabaena variabilis* heterocystis / J. S. Brusca, M. A. Hale, C. D. Carrasco, J. W. Golden // *J. Bacteriol.*—1989.— **171**, N 8.— P. 4138—4145.
120. Herrero A., Wolk C. P. Genetic mapping of the chromosome of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* // *J. Biol. Chem.*—1986.— **261**, N 17.— P. 7748—7754.
121. Greener A., Hill C. W. Identification of a novel genetic element in *Escherichia coli* K-12 // *J. Bacteriol.*—1980.— **144**, N 1.— P. 312—321.
122. Brody H., Hill C. W. Attachment site of the genetic element *e 14* // *Ibid.*—1988.— **170**, N 5.— P. 2040—2044.
123. Van den Putte P., Plasterk R., Kuijpers P. A Mu *gin*-complementing function and an invertible DNA region in *Escherichia coli* K-12 are situated on the genetic element *e14* // *Ibid.*—1984.— **158**, N 2.— P. 517—522.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 14.03.90