

© М. Ю. Скопина¹,
Е. П. Чижевская²,
Е. Е. Андронов², А. В. Пиневи́ч¹

¹ Кафедра микробиологии Санкт-Петербургского государственного университета;

² Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, Санкт-Петербург

✳ На примере *Pleurocapsa* sp. CALU 1126 впервые для группы плеврокапсовых цианобактерий реконструированы нуклеотидные последовательности гена белка клеточного деления FtsZ и прилежащих участков генома. Сопоставление данного локуса с соответствующими участками генома других цианобактерий указывает на различия в филогении, прослеживаемой по разным генам.

✳ **Ключевые слова:** филогения цианобактерий; *Pleurocapsa*; белки клеточного деления FtsZ и FtsQ; белок CtpA; белок ThiD.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ КЛЕТОЧНОГО ДЕЛЕНИЯ И ПРИЛЕЖАЩИХ ГЕНОВ ЦИАНОБАКТЕРИИ *PLEUROCAPSA* SP.

ВВЕДЕНИЕ

Прокариоты размножаются посредством клеточного деления (цитокinesis), в котором можно выделить ряд стадий: 1) репликация хромосом (ы); 2) сегрегация сестринских хромосом; 3) выбор сайта деления; 4) сборка оргanelлы клеточного деления (дивисомы), в основе которой лежит кольцо деления (Z-кольцо); 5) собственно деление перетяжкой или септированием (Lutkenhaus, 1998; Errington et al., 2003).

Белок FtsZ, главный материал кольца деления, имеется у большинства изученных бактерий и архей; его гомологи обнаружены у пластид и митохондрий (Osteryoung, Nunnari, 2003; Maple, Møller, 2007). Вспомогательные белки FtsA и ZipA взаимодействуют с белком FtsZ и фиксируют Z-кольцо на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны. Прочие белки дивисомы (FtsK, FtsL, FtsN, FtsQ и FtsW) участвуют в процессе сегрегации дочерних клеток с помощью кольцевой инвагинации цитоплазматической мембраны, а также центрипетального роста ригидного слоя клеточной стенки и, в случае грамотрицательных бактерий, наружной мембраны (Nanninga, 2001). Бактерии и археи унаследовали Z-кольцо от «универсального общего предка» (Wang, Lutkenhaus, 1996), тогда как у эукариотов Z-белок был заменен гомологичным цитоскелетным белком — тубулином (Faguy, Doolittle, 1998).

В основе цитокinesis всех прокариотов лежат общие механизмы, с отличиями на уровне разных таксонов и внутри последних (Wang, Lutkenhaus, 1996). Особый интерес представляет цитокinesis цианобактерий, прообраз пластокинеза (деления пластид). Однако его молекулярные детали слабо изучены, в основном у *Synechococcus* sp. PCC 7904 и *Synechocystis* sp. PCC 6803, делящихся бинарно (Koksharova, Wolk, 2002; Mazouni et al., 2004; Miyagishima et al., 2005). Что касается плеврокапсовых цианобактерий, обладающих уникальной способностью к множественному делению (Waterbury, Stanier, 1978), то механизм их цитокinesis остается неизвестным. Основной подход к решению данной проблемы состоит в изучении генов белков деления и продуктов их экспрессии.

В частности, настоящая работа посвящена молекулярному анализу гена *ftsZ* и фланкирующих генов у цианобактерии *Pleurocapsa* sp.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования и условия его культивирования

В работе использована чистая культура *Pleurocapsa* sp. штамм CALU 1126 (коллекция культур микроорганизмов СПбГУ; см.: Pinevich et al., 2004). Культуру выращивали в жидкой или уплотненной (0,8 %-й агар Difco) минеральной среде BG-11M (Pinevich et al., 1997) при комнатной температуре, с непрерывным освещением интенсивностью 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{c}^{-1}$, обеспечиваемой люминесцентными лампами белого света.

Объекты, использованные при клонировании

Реципиентом при клонировании фрагментов ДНК послужил штамм DH5 α *E. coli* (F⁻, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17*, *deoR*, Δ (*lacZYA-argF*)U169) (Grant et al., 1990). Культуру *E. coli* выращивали на среде LB (Маниатис

Поступила в редакцию 13.07.2012
Принята к публикации 22.11.2012

и др., 1984), для отбора трансформантов при клонировании фрагментов ДНК использовали среду LB с добавлением ампициллина ($100 \text{ мг} \times \text{л}^{-1}$), X-Gal ($20 \text{ мг} \times \text{л}^{-1}$) и IPTG ($10 \text{ мг} \times \text{л}^{-1}$).

Для клонирования рестрикционных фрагментов использовали плазмиду pUC18 (Nogrande et al., 1983), а в качестве Т-вектора для клонирования ПЦР-фрагментов — плазмиду pTZ57R/T (MBI Fermentas, Литва).

Манипуляции с ДНК

Геномную ДНК выделяли с использованием коммерческого набора Nucleon PhytoPure Plant DNA Extraction Kit (Amersham, Великобритания) согласно протоколу фирмы-изготовителя.

Для ПЦР-амплификации фрагмента гена *ftsZ* *Pleurocapsa* sp. CALU 1126 использовали праймеры, ранее сконструированные для *Chroococcidiopsis* sp. (Billi et al., 1998): (BF) 5'-AATGCGTGAACCGSATGATT-3' и (BR) 5'-GCCYKYACRTCWGCAARTC-3', а также Taq-полимеразы (Хеликон, Москва) в автоматическом амплификаторе iCycler (Bio-Rad, США) в следующем режиме: начальная денатурация при 95°C , 3 мин (30 циклов); 94°C , 30 с; 42°C , 30 с; 72°C , 1 мин; завершающий синтез, 72°C , 15 мин.

«Обратную» ПЦР проводили, используя праймеры (*ftsZ*483_out): 5'-TAGCCGATGATGTCTTGC-3' и (*ftsZ*71_out): 5'-GAGCATCGGTATTTATTGC-3' и набор «Long PCR Enzyme Mix» (MBI Fermentas, Литва), который позволяет амплифицировать протяженные фрагменты ДНК (до 20 т.п.н.). Реакцию проводили в режиме: начальная денатурация, 95°C , 3 мин (30 циклов); 94°C , 30 с; 50°C , 30 с; 72°C , 4 мин; завершающий синтез, 72°C , 15 мин. Матрицей служила геномная ДНК *Pleurocapsa* sp. CALU 1126, фрагментированная рестриктазой *Ava*II и лигированная в ковалентно замкнутое кольцо.

Реакции рестрикции и лигирования, а также электрофорез в агарозе и извлечение фрагментов ДНК из геля проводили по стандартным методикам (Маниатис и др., 1984). Плазмиды в клетки *E. coli* вводили посредством высокоэффективной трансформации (Hiroaki et al., 1990).

Молекулярное секвенирование ДНК

Нуклеотидные последовательности ДНК реконструировали с использованием набора реагентов фирмы Beckman Coulter (США) на автоматическом капиллярном секвенаторе SEQ8000 в соответствии с методикой фирмы-изготовителя. В случае секвенирования фрагмента, прилегающего к векторной плазмиде, были использованы стандартные M13-праймеры: M13for (–20) и M13rev (–26).

Для секвенирования центральных, не прилегающих к векторной плазмиде участков фрагмента, на основе уже известных краевых участков были сконструированы и использованы следующие праймеры:

pEE2_for1: 5'-GCGACAAGAGAGGATTGATTA-3' (для плазмиды pEE2);

pEE2_rev1: 5'-CTGGCTGCACATCTTTCAA-3' (для плазмиды pEE2);

pEE2_for2: 5'-CAACCATTGCCACCAACTG-3' (для плазмиды pEE2);

pEE2_rev2: 5'-CAGACAATCACCGCAAGC-3' (для плазмиды pEE2);

p3NH2_for1: 5'-GATGCTCCAATTTTCAGTCCA-3' (для плазмиды p3 NH2);

p3NH2_rev1: 5'-GAGCTTTATGGTGGCGAT-3' (для плазмиды p3 NH2);

p3NH2_rev2: 5'-CTCAATTAGCTGCGAGCTG-3' (для плазмиды p3 NH2);

p4NH1_rev1: 5'-GGCGTATTATACCTCCTCAAA-3' (для плазмиды p4 NH1);

p4NH1_rev2: 5'-GCAGCGAAATTAACATACATAGA-3' (для плазмиды p4 NH1).

Анализ полученных данных

Компьютерную обработку нуклеотидных последовательностей и дальнейшую их трансляцию в аминокислотные последовательности проводили с помощью программ Vector NTI, ClustalX и Mega 3.1. Матрицы генетических расстояний составляли, а дендрограммы строили с помощью программы Mega 3.1. с использованием модели PAM Matrix (Dayhoff) и метода для кластеризации Neighbor-Joining. Реконструированные последовательности сопоставляли с базой GenBank при помощи программы BLAST (Altschul et al., 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В соответствии с поставленной задачей был осуществлен детальный молекулярно-биологический анализ гена *ftsZ* *Pleurocapsa* sp., кодирующего белок, который играет ключевую роль в образовании кольца деления. С этой целью на первом этапе работы были осуществлены ПЦР-амплификации фрагмента гена *ftsZ* с его последующим клонированием и секвенированием. В связи с тем, что нуклеотидные последовательности генов клеточного деления *Pleurocapsa* sp. были ранее неизвестны, для ПЦР-амплификации фрагмента гена *ftsZ* использовались праймеры (BF, BR), ранее предложенные для *Chroococcidiopsis* sp. (Billi et al., 1998). В результате был амплифицирован фрагмент размером ~500 п. н., который был извлечен из геля, клонирован в векторе pTZ57R/T и секвенирован.

На основе реконструированной нуклеотидной последовательности были разработаны ориентированные «наружу» от секвенированного фрагмента праймеры *ftsZ*71_out и *ftsZ*483_out, предназначенные для проведения «обратной» ПЦР. Это позволило амплифицировать фрагмент генома *Pleurocapsa* sp. CALU 1126 размером ~7,5 т.п.н. Он был клонирован в векторе pTZ57R/T (сконструированная плазмида получила название pFTSZ). После этого плазмида pFTSZ была секвенирована с использованием стандартных праймеров, что позволило «прочитать» последовательности, содержащие 3'- и 5'-концевые участки гена *ftsZ*, которые затем были

Таблица 1

Результаты сравнения аминокислотной последовательности белка FtsZ *Pleurocapsa* sp. CALU 1126 и других цианобактерий

Объект сравнения (номер в GenBank)	Аминокислотная последовательность белка FtsZ (а.о.)	Сходство с аминокислотной последовательностью белка FtsZ <i>Pleurocapsa</i> sp. CALU 1126 (%)	
		По идентичным аминокислотам	По идентичным и аналогичным аминокислотам
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (ABA21459)	428	68	77
<i>Cyanotheca</i> sp. PCC 7424 (EDU18781.1)	418	74	84
<i>Lyngbya</i> sp. PCC 8106 (EAW35671.1)	429	66	79
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 (CAO87356.1)	415	68	79
<i>Nodularia spumigena</i> CCY 9414 (EAW44422.1)	427	67	77
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 (BAB75557.1)	428	68	77
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (BAA17496.1)	430	73	83
<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS 101 (ABG52815.1)	423	67	80

объединены с ранее секвенированной областью гена. В результате была реконструирована полная нуклеотидная последовательность открытой рамки считывания гена *ftsZ* размером 1266 п.н.

В результате компьютерной трансляции нуклеотидной последовательности была реконструирована первичная структура белка FtsZ (422 а.о.). Сравнение с ба-

зой данных GenBank показало его значительное сходство с белком FtsZ других цианобактерий (табл. 1). Сходство составило ~70 % по идентичным и ~80 % по аналогичным аминокислотам.

После выравнивания аминокислотной последовательности белка FtsZ *Pleurocapsa* sp. с таковыми других цианобактерий (рис. 1) были выявлены четыре типич-

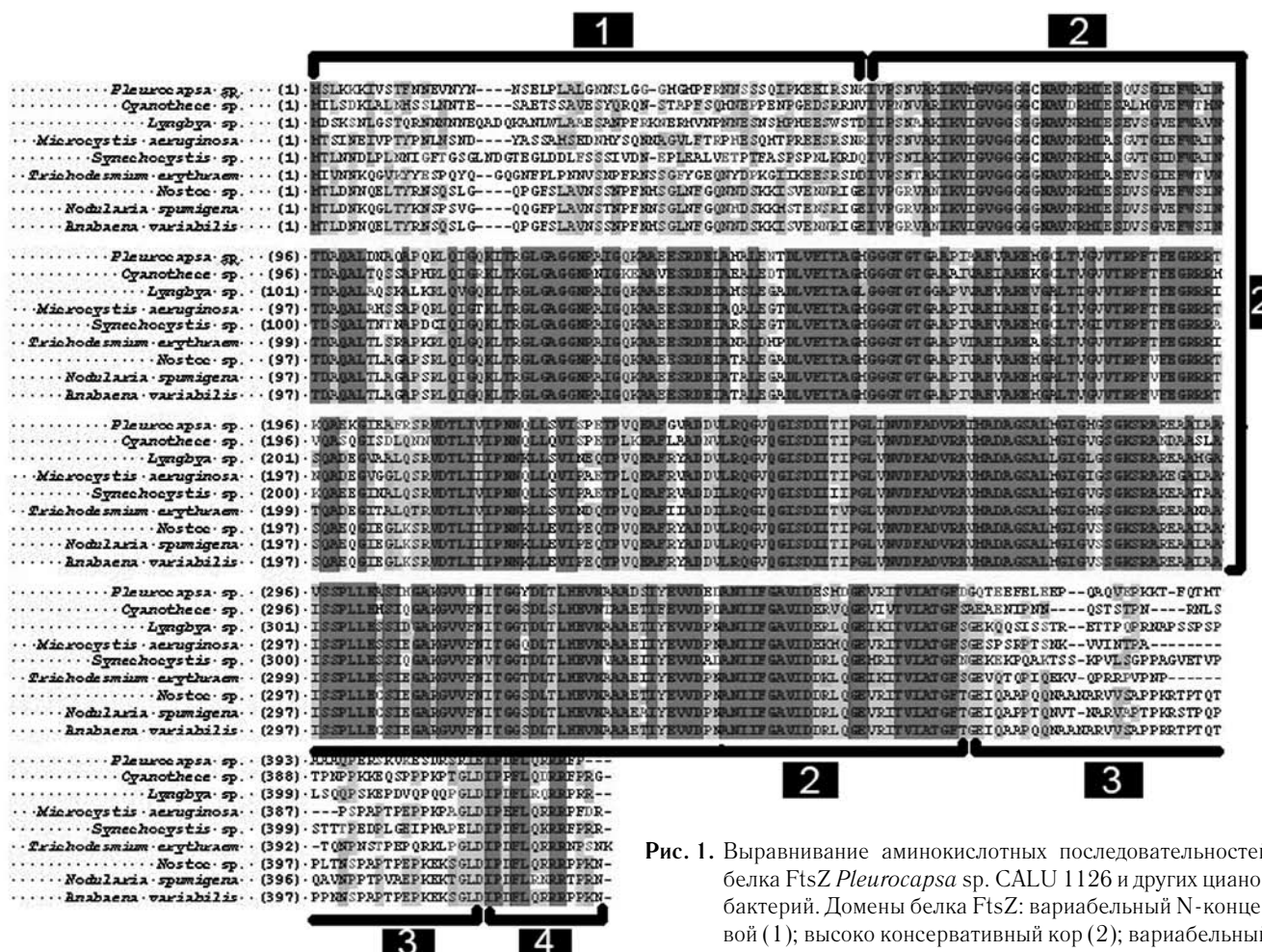


Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей белка FtsZ *Pleurocapsa* sp. CALU 1126 и других цианобактерий. Домены белка FtsZ: вариабельный N-концевой (1); высоко консервативный кор (2); вариабельный спейсер (3); С-терминальный (4)

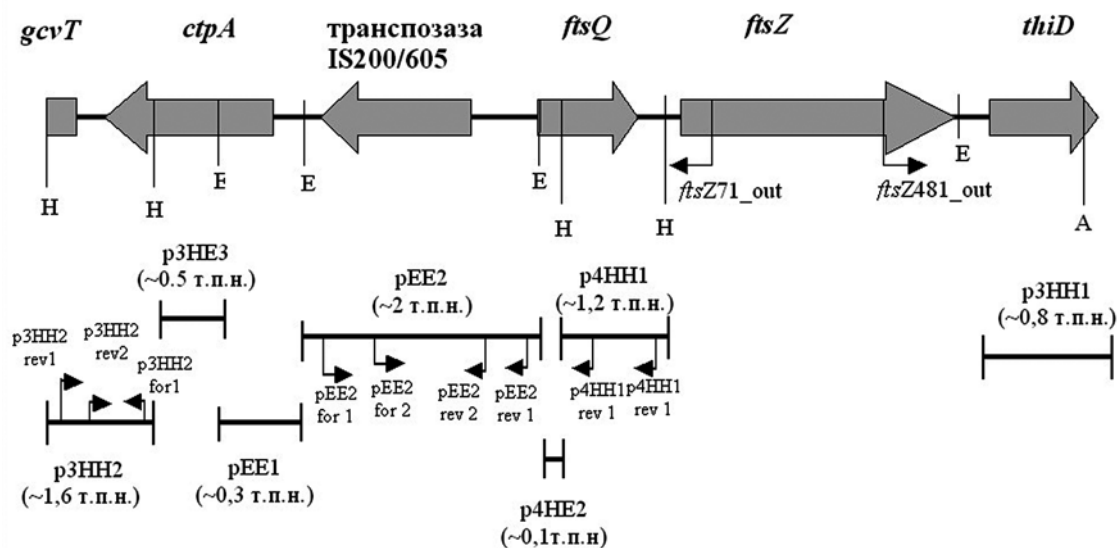


Рис. 2. Локальная генетическая карта клонированного участка генома *Pleurocapsa* sp. CALU 1126. Серые стрелки — полные открытые рамки считывания; прямоугольник — часть рамки считывания гена *gcvT*; черные стрелки — дополнительно сконструированные праймеры; H, E и A — сайты рестрикции ферментами *Hind*III, *Eco*RI и *Ava*II

ных домена: варибельный N-концевой домен (1); консервативный кор, служащий для связывания ГТФ (2); варибельный спейсер (3); консервативный С-концевой домен, необходимый для взаимодействия с другими белками клеточного деления (4).

Следующей задачей стала реконструкция нуклеотидных последовательностей, фланкирующих ген *ftsZ*, и идентификация входящих в них генов. Для этого из состава плазмиды рFTSZ были повторно клонированы в векторе рUC18 семь *Eco*RI- и *Hind*III-фрагментов. В результате было получено семь плазмид: рЕЕ1 (размер клонированного фрагмента 0,3 т. п. н.); рЕЕ2 (2 т. п. н.); р3 НН1 (0,8 т. п. н.); р3 НН2 (1,6 т. п. н.); р3 НН3 (0,5 т. п. н.); р4 НН1 (1,2 т. п. н.); р4 НН2 (0,1 т. п. н.). Все они были секвенированы с использованием стандартных праймеров. Для плазмид рЕЕ2, р3 НН2 и р4 НН1 на основе реконструированных нуклеотидных последовательностей были разработаны внутренние (дополнительные) праймеры, и затем было продолжено секвенирование (рис. 2).

После объединения центральной и фланкирующих нуклеотидных последовательностей была получена общая последовательность, размером ~7,5 т. п. н. В результате ее компьютерного анализа были выявлены четыре полные открытые рамки считывания для генов *ctpA*, гена транспозазы из молекулярного семейства *IS200/IS605*, гена *ftsQ* и гена *thiD* а также часть рамки считывания для гена *gcvT* (рис. 2).

Ген *ctpA* у окислительных фототрофов кодирует «С-концевую» протеазу из молекулярного семейства эндопротеаз (Inagaki et al., 2001). Она катализирует «С-концевой» процессинг белка D1, принимающего участие в сборке марганцевого кластера — активного центра

окисляющего воду комплекса второй фотосистемы. Мутанты с инактивированным геном *ctpA* теряют способность использовать воду в качестве донора электронов (Anbudurai et al., 1994). Сходство гена *ctpA* *Pleurocapsa* sp. с генами, кодирующими «С-концевую» протеазу у других цианобактерий составляет ~80 %.

Мобильный элемент IS 605 является инсерционным элементом из широко представленного у бактерий молекулярного семейства IS200/IS605 (Mahillon, Chandler, 1998). Оно особо интересно тем, что у его представителей отсутствуют концевые инвертированные последовательности, характерные для большинства транспозонов у прокариотов и эукариотов. Как и другие IS-элементы, IS 605 содержит транспозазу TnpA (фермент, связывающий одноцепочную ДНК и встраивающий ее в геномную ДНК). Гены транспозазы в составе инсерционных элементов IS200/IS605 имеют самый маленький размер и наименее изучены (Varabas et al., 2007). Участки, фланкирующие ген транспозазы *IS605*, содержат последовательности, которые формируют небольшие шпильчатые структуры, играющие важную роль в перемещении транспозона (они служат сайтами распознавания транспозазы и связывают ее с одноцепочной ДНК). Шпильчатые структуры транспозона IS605 могут выборочно сохраняться в ходе эволюции, даже после исчезновения самого гена транспозазы (Varabas et al., 2007; Delihias, 2009). Семейство инсерционных элементов IS200/IS605 имеет интересную особенность: его представители всегда встраиваются непосредственно за 3'-концевой четырехпяти нуклеотидной последовательностью — в отличие от большинства транспозонов, которые встраиваются случайным образом (Varabas et al., 2007). Сходство гена транспозазы у *Pleurocapsa* sp. CALU 1126 с транспоза-

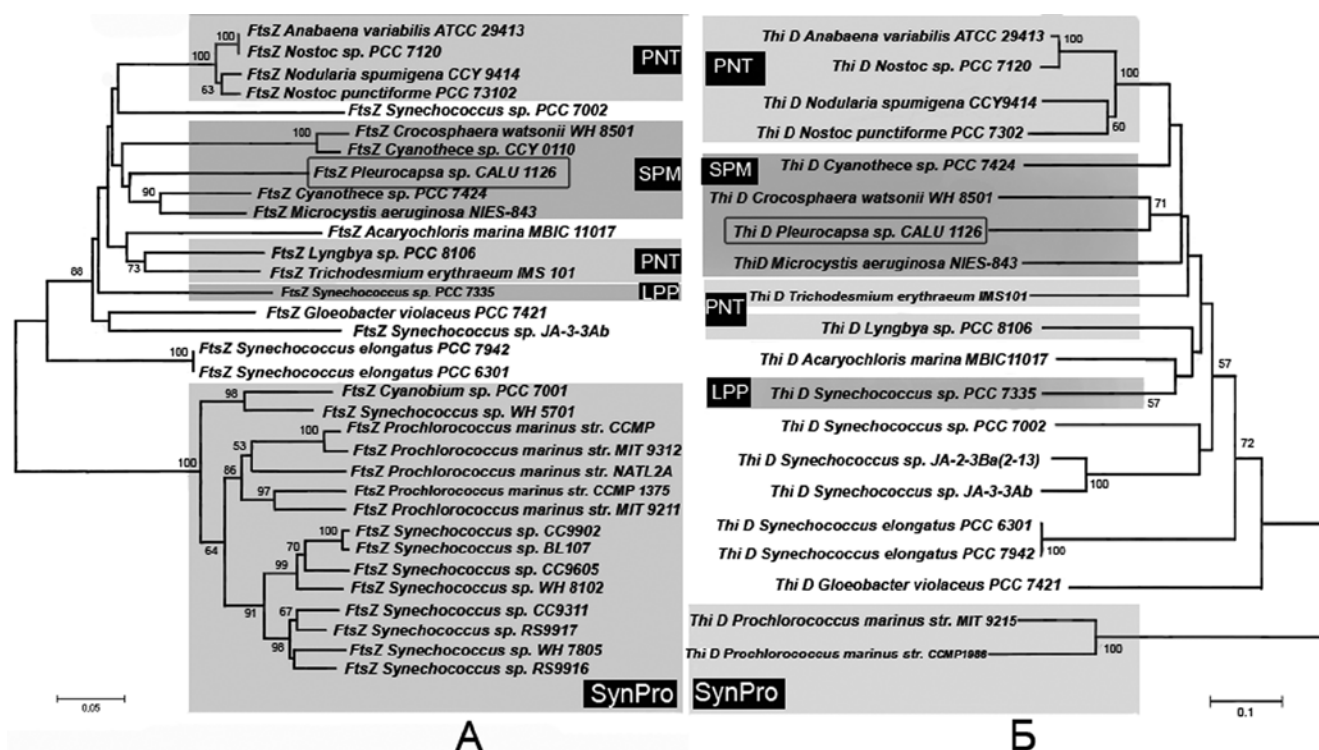


Рис. 3. Дендрограмма, построенная на основе сравнения аминокислотных последовательностей белка FtsZ (А) и белка ThiD (Б). LPP — клада *Leptolyngbya*, *Plectonema*, *Phormidium* и *Synechococcus* sp. PCC 7335; SPM — клада *Synechococcus* sp. PCC 7002, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Microcystis aeruginosa* NIES-843, *Crocospheera watsonii* WH 8501 и *Cyanothece* sp. CCY 0110; PNT — клада *Lyngbya* sp. PCC 8106, *Trichodesmium erythraeum* IMS 101, *Nodularia spumigena* CCY 9414, *Nostoc punctiforme* PCC 73102, *Nostoc* sp. PCC 7120 и *Anabaena variabilis* ATCC 29413; SynPro — клада морских пикоцианобактерий *Synechococcus* sp. и *Prochlorococcus marinus*, морского штамма *Synechococcus* sp. WH 5701 и пресноводного штамма *Cyanobium* sp. PCC 7001 (по: Blank, Sanchez-Baracaldo, 2010). Цифры — статистическая достоверность очередности ветвления, %. Масштаб — 0,05 замены на сайт

зами в составе мобильных элементов IS 605 у других цианобактерий составляет 72–78 %.

Ген *ftsQ* кодирует белок, который состоит из трансмембранного и периплазматического домена и играет важную роль в формировании дивисомы. Предполагается, что он вместе с другими вспомогательными белками деления, локализация которых зависит от предшествующей локализации белка FtsZ, координирует биосинтез материала клеточной стенки и инвагинацию цитоплазматической мембраны (Robson, King, 2006).. В клетке содержится не более 20 копий этого белка (Robson, King, 2006, Villanelo et al., 2011). Из числа анализируемых генов ген *ftsQ* *Pleurocapsa* sp. характеризуется наиболее низким сходством с соответствующими генами у других цианобактерий (54–57 %).

Ген *thiD* кодирует фосфометилпиримидинкиназу из молекулярного семейства фосфотрансфераз. Она катализирует реакцию синтеза тиаминпирофосфата (Mizote et al., 1999). Сходство гена *thiD* *Pleurocapsa* sp. с соответствующими генами у других цианобактерий составляет 75–81 %.

Ген *gcvT* кодирует аминотетилтрансферазу — один из четырех компонентов системы расщепления глици-

на. Белок GcvT участвует в передаче метильной группы с глицина на тетрагидрофолат (Terlyakov et al., 2004). Для гена *gcvT* сходство с соответствующими генами у других цианобактерий составляет 52–61 %.

Накопленная информация о генах, содержащихся в анализируемом участке генома *Pleurocapsa* sp., позволила сравнить его с соответствующими участками у других цианобактерий и сопоставить полученные схемы расположения (локальные генетические карты). Описываемый участок может иметь разное строение у разных родов и даже разных штаммов одного и того же рода — примером служат *Cyanothece* sp. PCC 8802 и *Cyanothece* sp. PCC 8801. Тем не менее в анализируемом случае локальная генетическая карта *Pleurocapsa* sp. сходна с таковыми *Cyanothece* sp. PCC 7882 и *Microcystis aeruginosa* NIES-843.

Исследованные у цианобактерий гены *ftsQ* и *ftsZ* сцеплены и транскрибируются в одинаковом направлении. Ген *ctpA* расположен в upstream-положении от гена *ftsQ*; между ними находится ген транспозазы, входящий в состав мобильного элемента из молекулярного семейства IS200/IS605, представители которого часто встречаются в разных участках генома у цианобактерий. В частности, у *Microcystis aeruginosa* PCC

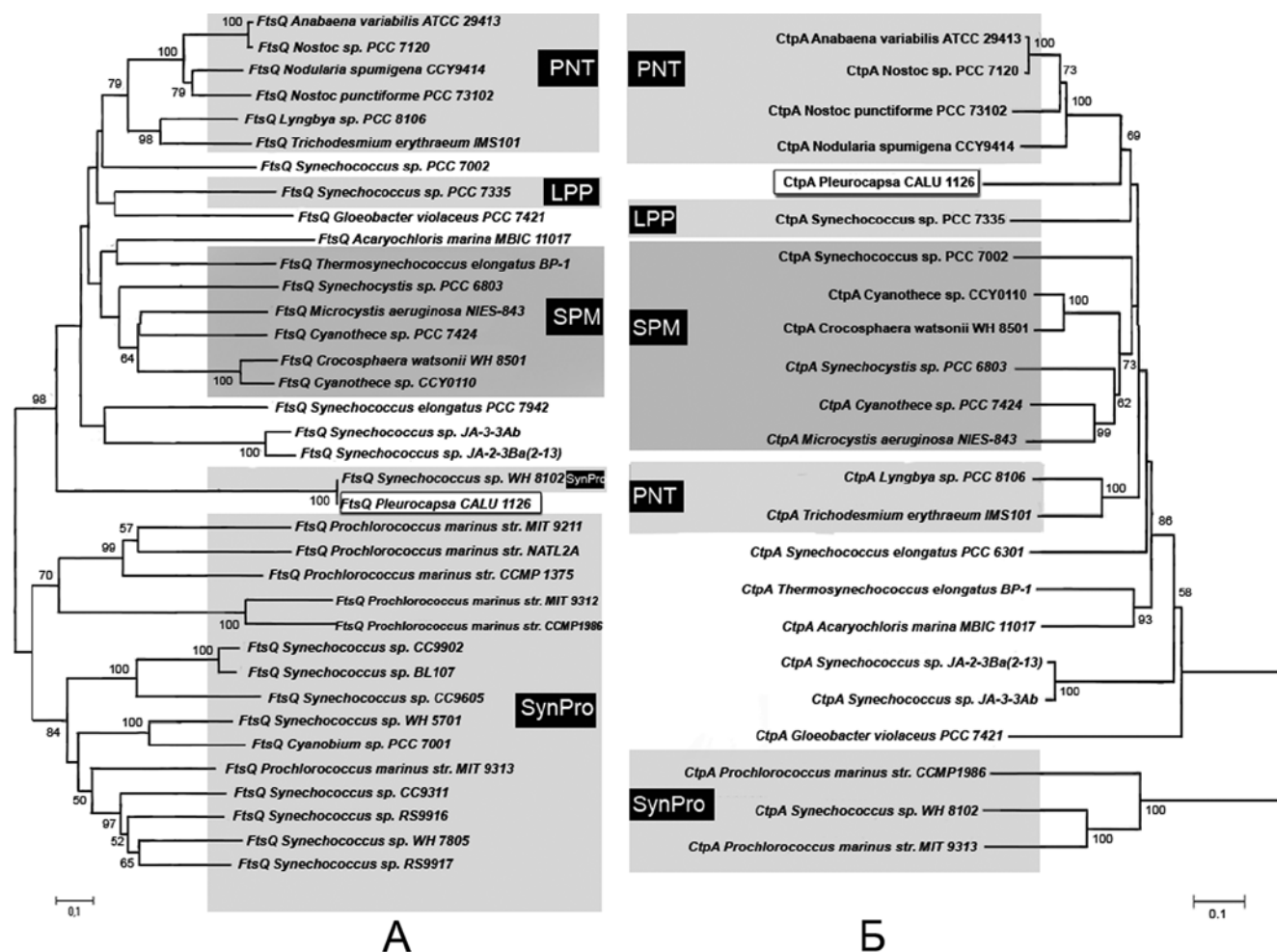


Рис. 4. Дендрограмма, построенная на основе сравнения аминокислотных последовательностей белка FtsQ (В) и белка CtpA (Г). Обозначения см. рис. 3

7806 и *Trichodesmium erythraeum* IMS 101 он находится в upstream-положении от гена *ftsQ*, тогда как у *Microcystis aeruginosa* NIES-843 он в downstream-положении от гена *thiD*.

При построении дендрограмм использовалось древо цианобактерий, реконструированное по данным сопоставления нуклеотидных последовательностей РНК большой и малой субъединицы рибосомы, а также выведенных путем компьютерной трансляции аминокислотных последовательностей 137 консервативных белков (Blank, Sanchez-Baracaldo, 2010). Основа этого древа — обособленный вид *Gloeobacter violaceus* и четыре клады: **SPM** (*Synechococcus* sp. PCC 7002, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Microcystis aeruginosa* NIES-843, *Crocospheara watsonii* WH 8501 и *Cyanothece* sp. CCY 0110); **PNT** (*Lyngbya* sp. PCC 8106, *Trichodesmium erythraeum* IMS 101, *Nodularia spumigena* CCY 9414, *Nostoc punctiforme* PCC 73102, *Nostoc* sp. PCC 7120 и *Anabaena variabilis* ATCC 29413); **SynPro** (морские пикоцианобактерии *Synechococcus* sp. и *Prochlorococcus marinus*, а также морской штамм *Synechococcus* sp. WH

5701 и пресноводный штамм *Cyanobium* sp. PCC 7001) и **LPP** (*Leptolyngbya*, *Plectonema*, *Phormidium* и *Synechococcus* sp. PCC 7335).

Отметим, что к обособленной кладе SynPro относятся пикоцианобактерии диаметром < 0,2 мкм, которые численно доминируют в эуфотической зоне Мирового океана (Goericke, Welschmeyer, 1993). Термофильные штаммы *Synechococcus* sp. (JA-2-3Ba (2-13) и JA-3-3Ab) также образуют достоверно обособленную группу. В то же время различие в филогении *Acaryochloris marina*, *Thermosynechococcus elongatus*, *Synechococcus elongatus* и *Synechococcus* sp. PCC 7335, прослеживаемой по разным генам, может быть следствием ложного объединения «длинных» ветвей (Blank, Sanchez-Baracaldo, 2010).

Анализ дендрограмм, построенных на основе сравнения аминокислотных последовательностей белков FtsZ, FtsQ, ThiD и CtpA, показал, что филогенетическое распределение их генов у *Pleurocapsa* sp. CALU 1126 существенно различается (рис. 3 и 4). Так, в соответствии с особенностями первичной структуры белков FtsZ и ThiD *Pleurocapsa* sp. CALU 1126 попадает в кладу SPM, что соответствует литератур-

ным данным (рис. 3 А, Б) (Blank, Sanchez-Baracaldo, 2010). Однако если для белка ThiD наблюдается кластеризация с *Crocospaera watsonii* WH 8501, то для белка FtsZ штамм *Pleurocapsa* sp. CALU 1126 обособлен от других представителей клады. Для белка CtpA можно говорить о кластеризации с представителями клады PNT (нитчатые цианобактерии родов *Pseudanabaena*, *Nostoc* и *Trichodesmium*), тогда как в случае белка FtsQ *Pleurocapsa* sp. CALU 1126 проявляет родство с представителями клады SynPro (рис. 4 А, Б).

Такое разнообразие филогенетической «топологии» *Pleurocapsa* sp. CALU 1126 можно объяснить либо горизонтальным переносом генов, либо ложным объединением «длинных» ветвей (см. выше). Вопрос требует дальнейшего анализа; возможно, что после получения данных по генам других плеврокапсовых цианобактерий последние составят обособленную кладу.

Следует отметить, что различия филогении, прослеживаемой по рассматриваемым генам, проявляется не только *Pleurocapsa* sp. CALU 1126. Так, для *Synechococcus* sp. PCC 7002, который попадает в кладу SPM (Blank, Sanchez-Baracaldo, 2010), не показана кластеризация с другими цианобактериями ни по одному из данных генов (рис. 3 и 4).

Клада PNT сохраняет целостность только при кластеризации по белку FtsQ (рис. 4 А). В остальных случаях она распадается на две группы: представители Субсекции «*Nostocales*» (*Anabaena variabilis* ATCC 29413, *Nostoc* sp. PCC 7120, *Nodularia spumigena* CCY 9414 и *Nostoc punctiforme* PCC 73102) и представители Субсекции «*Oscillatoriales*» (*Lyngbya* sp. PCC 8106 и *Trichodesmium erythraeum* IMS 101). Вторая группа образует обособленный кластер в случае белков FtsZ и CtpA (рис. 3 А и 4 Б). В то же время по белку ThiD данные цианобактерии не кластеризуются (рис. 3 Б).

Таким образом, на примере *Pleurocapsa* sp. CALU 1126 впервые для группы плеврокапсовых цианобактерий определены нуклеотидные последовательности гена *ftsZ* и фланкирующих его генов. Показано также, что структура локуса *ftsZ* *Pleurocapsa* sp. CALU 1126 различается у разных цианобактерий, равно как и филогения, прослеживаемая по его отдельным генам. Такой неординарный факт требует более глубокого анализа на основе дальнейшего накопления экспериментальных данных.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии и клеточная биология» ГНУ ВНИИСХМ ОЗ Россельхозакадемии (ГК Министерства образования и науки № 16.552.11.7047).

ЛИТЕРАТУРА

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж., 1984. Методы геной инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 480 с.

2. Altschul S.F., Gish W., Miller W. et al., 1990. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. Vol. 215. P. 403–410.
3. Anbudurai P.R., Mor T.S., Ohad I. et al., 1994. The ctpA gene encodes the C-terminal processing protease for the D1 protein of the photosystem II reaction center complex // Plant Biol. Vol. 91. P. 8082–8086.
4. Barabas O., Ronning D.R., Guynet C. et al., 2007. Mechanism of IS200/IS605 family DNA transposases: activation and transposon-directed target site selection // Cell. Vol. 132. P. 208–220.
5. Billi D., Caiola M. G., Paolozzi L. et al., 1998. A method for DNA extraction from the desert cyanobacterium *Chroococcidiopsis* and its application to identification of *ftsZ* gene // Appl. Environ. Microbiol. Vol. 64. P. 4053–4056.
6. Blank C.E., Sanchez-Baracaldo P.A., 2010. Timing of morphological and ecological innovations in the cyanobacteria — a key to understanding the rise in atmospheric oxygen // Geobiology. Vol. 8. P. 1–23.
7. Delihias N., 2009. Stem-loop sequences specific to transposable element IS605 are found linked to lipoprotein genes in *Borrelia plasmids* // PLoS ONE. Vol. 4. P. 1–10.
8. Errington J., Daniel R.A., Scheffers D.-J., 2003. Cytokinesis in bacteria // Microbiol. Mol. Biol. Rev. Vol. 67. P. 52–65.
9. Faguy D.M., Doolittle W.F., 1998. The evolution of cell division // Curr. Biol. Vol. 8. P. R338–R341.
10. Goericke R., Welschmeyer A., 1993. The marine prochlorophyte *Prochlorococcus marinus* contributes significantly to phytoplankton biomass and primary production in the Sargasso Sea // Deep-Sea Res. Vol. 40. P. 2283–2294.
11. Grant S.G.N., Jessee J., Bloom F.R., 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutant // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 87. P. 4645–4649.
12. Hiroaki I., Nogima H., Okayama H., 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // Gene. Vol. 96. P. 23–28.
13. Inagaki N., Maitra R., Sato K. et al., 2001. Amino acid residues that are critical for in vivo catalytic activity of CtpA, the carboxyl-terminal processing protease for the D1 protein of photosystem II // J. Biol. Chem. Vol. 276. N. 32. P. 30099–30105.
14. Koksharova O.A. Wolk C.P., 2002. A novel gene that bears a DnaJ motif influences cyanobacterial cell division // J. Bacteriol. Vol. 184. P. 5524–5528.
15. Lutkenhaus J., 1998. The regulation of bacterial cell division: a time and place for it // Curr. Opin. Microbiol. Vol. 1. P. 210–215.

16. *Lutkenhaus J., Addinal S.G.* Bacterial cell division // Biochem. J. 1997. Vol. 66 P. 93–116.
17. *Mahillon J., Chandler M.*, 1998. Insertion sequences // Microbiol. Mol. Biol. Rev. Vol. 62. P. 725–774.
18. *Maple J., Møller S.G.*, 2007. Plastid division: evolution, mechanism and complexity // Ann. Bot. Vol. 99. P. 565–579.
19. *Mazouni K., Domain F., Cassier-Chauvat C.* et al., 2004. Molecular analysis of the key cytokinetic components of cyanobacteria: FtsZ, ZipN and Min CDE // Mol. Microbiol. Vol. 52. P. 1145–1158.
20. *Miyagishima S., Wolk C.P., Osteryoung K.W.*, 2005. Identification of cyanobacterial cell division genes by comparative and mutational analyses // Mol. Microbiol. Vol. 56. P. 126–143.
21. *Mizote T., Tsuda M., Smith S.* et al., 1999. Cloning and haracterization of the thiD/J gene of *Escherichia coli* encoding a thiamine-synthesizing bifunctional enzyme, hydroxymethylpyrimidine kinase/phosphomethylpyrimidine kinase // Microbiol. Vol. 145. P. 495–501.
22. *Nanninga N.*, 2001. Cytokinesis in prokaryotes and eukaryotes: common principles and different solutions// Microbiol. Mol. Biol. Rev. Vol. 65. P. 319–333.
23. *Norrande J., Kempe T., Messing J.*, 1983. Construction of improved M13 vectors using oligonucleotide-directed mutagenesis // Gene. Vol. 26. P. 101–106.
24. *Osteryoung K.W., Nunnari J.*, 2003. The division of endosymbiotic organelles // Science. Vol. 302. P. 1698–1704.
25. *Pinevich A.V., Mamkaeva K.A., Titova N.N.* et al., 2004. St. Petersburg Culture Collection (CALU): four decades of storage and research with microscopic algae, cyanobacteria and other microorganisms // Nova Hedwigia. Vol. 79. P. 115–126.
26. *Pinevich A.V., Matthijs H.C.P., Averina S.G.* et al., 1997. Picocyanophyte (cyanobacterium) from the bo-
real inland water accumulates phycoerythrin as a major biliprotein // Algol. Studies. Vol. 87. P. 99–108.
27. *Robson S.A., King G.F.*, 2006. Domain architecture and structure of the bacterial cell division protein DivIB // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 103. P. 6700–6705.
28. *Teplakov A., Obmolova G., Sarikaya E.* et al., 2004. Crystal structure of the YgfZ protein from *Escherichia coli* suggests a folate-dependent regulatory role in one-carbon metabolism // J. Bacteriol. Vol. 186. P. 7134–7140.
29. *Villanelo F., Ordenes A., Brunet J.* et al., 2011. A model for the *Escherichia coli* FtsB/FtsL/FtsQ cell division complex // BMC Struct. Biol. Vol. 11. P. 1–15.
30. *Wang X., Lutkenhaus J.*, 1996. FtsZ ring: the eubacterial division apparatus conserved in achaeobacteria // Mol. Microbiol. Vol. 21. P. 313–319.
31. *Waterbury J.B., Stanier R.Y.*, 1978. Patterns of growth and development in pleurocapsalean cyanobacteria// Microbiol. Rev. Vol. 42. P. 2–44.

MOLECULAR ANALYSIS OF CELL DIVISION GENES AND ADJACENT GENES IN THE CYANOBACTERIUM *PLEUROCPSA* SP. CALU 1126

Skopina M. Yu., Chizhevskaya Ye. P., Andronov E. E., Pinevich A. V.

✿ **SUMMARY:** For the first time for cyanobacteria of the “*Pleurocapsa*” group (*Pleurocapsa* sp. CALU 1126), nucleotide sequences of cell division gene *ftsZ* and adjacent genome sites were determined. The comparison of this locus indicates differences in phylogeny traced by separate genes.

✿ **KEY WORDS:** phylogeny of cyanobacteria; *Pleurocapsa*; cell division; proteins FtsZ and FtsQ; CtpA protein; ThiD protein.

✿ Информация об авторах

Скопина Мария Юрьевна — м. н. с. Аспирант кафедры микробиологии. Санкт-Петербургский государственный университет. 199178, Санкт-Петербург, 16-я линия ВО, д. 29.
E-mail: masha_sk@list.ru.

Чижевская Елена Петровна — к. б. н., с. н. с. Лаборатория генетики и селекции микроорганизмов. ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, д. 3.
E-mail: chizhevskaya@yandex.ru.

Андронов Евгений Евгеньевич — к. б. н. Заведующий лабораторией микробиологического мониторинга и биоремедиации почв. ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, д. 3. E-mail: eeandr@gmail.com.

Пиневиц Александр Васильевич — д. б. н., профессор. Заведующий кафедрой микробиологии. Санкт-Петербургский государственный университет. 199178, Санкт-Петербург, 16-я линия ВО, д. 29.
E-mail: Pinevich.A@mail.ru.

Skopina Mariya Yuryevna — Postgraduate student, Junior Researcher. Department of Microbiology. Saint-Petersburg State University. 199034, Saint-Petersburg, Sredniy pr., VO, 29. Russia.
E-mail: masha_sk@list.ru.

Chizhevskaya Elena Petrovna — Ph. D. Senior Researcher. Department of Genetics and Breeding of Microorganisms. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology. Podbelskiy chausse, 3, Saint-Petersburg, Pushkin, 196608, Russia.
E-mail: chizhevskaya@yandex.ru.

Andronov Evgeny Evgenyevich — Ph. D. Head of the Laboratory of Microbiological Monitoring and Mioremediation of Soils. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology. Podbelskiy chausse, 3, Saint-Petersburg, Pushkin, 196608, Russia.
E-mail: eeandr@gmail.com.

Pinevich Aleksandr Vasilyevich — Doctor of Biological Sciences, Professor. Head of the Department of Microbiology. Saint-Petersburg State University. 199034, Saint-Petersburg, Sredniy pr., VO, 29. Russia.
E-mail: Pinevich.A@mail.ru.