

© И. Я. Худяков

ГНУ ВНИИСХМ,
Санкт-Петербург

✿ **Некоторые цианобактерии способны к дифференцировке специализированных клеток — осуществляющих аэробную фиксацию азота гетероцист, предназначенных для переживания неблагоприятных условий акинет и служащих для распространения гормогониев. В эволюции биосферы огромное значение имела способность цианобактерий к симбиозу с эукариотическими организмами, ставшая предпосылкой для появления хлоропластов. В обзоре приведены данные о генах и регуляторных системах, контролирующих дифференцировку специализированных клеток и способность цианобактерий вступать в разнообразные симбиотические ассоциации.**

✿ **Ключевые слова:** цианобактерии; клеточная дифференцировка; гетероциста; симбиоз.

ГЕНЕТИКА РАЗВИТИЯ И СИМБИОТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Оксигенные фототрофы — цианобактерии — составляют филу ВХ домена Bacteria (Castenholz, 2001), представители которой отличаются уникальным разнообразием размеров и формы клеток, способов клеточного деления, а также одноклеточным, нитчатым, сложным многоклеточным либо колониальным ростом. Многие цианобактерии обладают сложными клеточными циклами, дифференцируют разнообразные специализированные клетки и участвуют в симбиотических ассоциациях с микроорганизмами, высшими растениями и животными. Цианобактерии вносят существенный вклад в глобальный баланс углерода, кислорода и азота. Они сыграли громадную роль в процессе эволюции биосферы, совершив кислородное окисление атмосферы и тем самым создав условия, необходимые для эволюции эукариот, а цианобактериальные эндосимбионты стали предшественниками хлоропластов растений. В обзоре приводятся данные о генах и регуляторных системах, контролирующих дифференцировку специализированных клеток — гетероцист, акинет и гормогониев и способность вступать в разнообразные симбиотические ассоциации.

ГЕНЕТИКА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ГЕТЕРОЦИСТ

Гетероцисты — аэробно фиксирующие азот, конечно, дифференцированные клетки — способны формировать цианобактерии из подсекций IV и V (Castenholz, 2001). Дифференцировка гетероцист требует мобилизации значительных метаболических и энергетических ресурсов и поэтому обычно включается только при исчерпании всех источников связанного азота. Некоторые цианобактерии, в том числе модельные штаммы *Anabaena* sp. PCC 7120 и *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, образуют регулярно расположенные гетероцисты, у других они могут формироваться только на одном (как у р. *Calothrix*) или обоих (как у р. *Cylindrospermum*) концах нитей. Для того чтобы фиксировать молекулярный азот, гетероцистам необходимо прекратить выделение O_2 путем инактивации фотосистемы II, обеспечить микроаэробные условия путем формирования дополнительных слоев оболочки, синтезировать нитрогеназный комплекс и в большом количестве производить АТФ и НАДФ · Н для фиксации азота и дыхания.

Роль клеточного деления в контроле дифференцировки

Чтобы начать дифференцировку вегетативная клетка должна находиться в определенной стадии клеточного цикла. Экспрессия гена *ftsZ*, кодирующего основной белок аппарата клеточного деления, снижается в гетероцистах (Kuhn et al., 2000; Wang, Xu, 2005). Белок SulA из *E. coli*, ингибирующий ГТ-фазную активность *FtsZ in vitro*, при экспрессии в *Anabaena* PCC 7120 блокирует образование септальных колец *FtsZ* и деление клеток, что полностью подавляет дифференцировку гетероцист (Sakr et al., 2006). В то же время в мутанте *hetC*, не способном формировать гетероцисты (Khudyakov, Wolk, 1997), начавшие дифференцировку клетки продолжают делиться и усиливают экспрессию *ftsZ*, одновременно уменьшаясь в размере и теряя автофлюоресценцию (Wang, Xu, 2005; Xu, Wolk, 2001), подобно дифференцирующим гормогониям (см. ниже). По-видимому, в клеточном цикле есть короткий отрезок, когда после деления клетка может начать дифференцировку и затем заблокировать следующее деление. По аминокислотной последовательности HetC наиболее сходен с АВС-транс-

Поступила в редакцию 21.10.2012
Принята к публикации 30.10.2012

портерами бактериоцинов, индуцируется в прогетероцистах и его функцией может быть экспорт пептида, препятствующего ингибированию деления в начавших дифференцировку клетках.

Основные регуляторные гены, контролирующие дифференцировку гетероцист

В процессе формирования гетероцист происходит последовательная активация большого числа генов, специфически связанных с регуляторными, структурными или ферментативными аспектами дифференцировки и функционирования гетероцист. В отличие от многих бактерий со сложными программами развития, регулируемые переключением альтернативных сигма-факторов, у цианобактерий, несмотря на интенсивные поиски мутантов и использование методов обратной генетики, не удалось обнаружить специфические для гетероцист сигма-факторы (Khudyakov, Golden, 2001). Дифференцировка контролируется как положительными генами-регуляторами: *ntcA*, *hetR* и *patA*, так и отрицательными регуляторными генами: *patS* и *hetN*. NtcA принадлежит к CAP-семейству регуляторов транскрипции и контролирует большое количество генов, участвующих в метаболизме азота у цианобактерий (Herreger et al., 2004.). Мутанты по *ntcA* обладают плеiotропным фенотипом и не проявляют никаких признаков морфологической дифференцировки на безазотной среде. 2-оксоглутарат является сенсором азотного статуса клетки и сигнальной молекулой, передающей эту информацию на NtcA (Zhao et al., 2010). HetR, главный регулятор дифференцировки (Meeks, Elhai, 2002), обладает протеазной и ДНК-связывающей активностью и управляет экспрессией многих специфических для гетероцист генов. HetR связывается с инвертированными повторами в промоторах *hetP* (Higa, Callahan, 2010), *hetZ* (Du et al., 2012) и некоторых других генов, однако механизм HetR-зависимой регуляции транскрипции пока не известен. Транскрипции *ntcA* и *hetR* взаимозависимы (Olmedo-Verd et al., 2005), регулируются множественными промоторами и прямо или косвенно контролируются многими факторами. Инактивация *hetC* (Khudyakov, Wolk, 1997) и *hetP* (Fernández-Piñas et al., 1997) блокирует или резко замедляет дифференцировку гетероцист, а эктопическая экспрессия *hetP* в мутанте Δ *hetR* позволяет частично обойти блок дифференцировки (Higa, Callahan, 2010). PatA, белок с С-концевым доменом, гомологичным CheY-семейству респонс-регуляторов, необходим для дифференциации интеркалярных, но не концевых гетероцист и действует, вероятно, путем белок-белковых взаимодействий. Мутация *patA* супрессирует Mch фенотип (множественные прилегающие гетероцисты), проявляющийся в присутствии экстракопийного *hetR* (Liang et al., 1992), и приводит к резкому увеличению концентрации HetR в клетках (Risser, Callahan, 2008). Инактивация *hetF* блокирует дифференцировку и тоже приводит к повышению концентрации HetR (Risser, Callahan, 2008). Полностью блокирует дифференцировку также инак-

тивация гена *hanA*, кодирующего гистонподобный белок нуклеоида HU (Khudyakov, Wolk, 1996). Еще один регуляторный локус включает гены положительного регулятора *hetZ* и отрицательного регулятора *patU3* (Zhang et al., 2007). В контроле дифференциации участвуют и другие регуляторные белки (Zhang et al., 2006).

Разработанные недавно методы «глубокого секвенирования» РНК позволили выявить множество антисмысловых и некодирующих РНК, причем некоторые из этих транскриптов регулировались азотным стрессом либо являлись антисмысловыми к известным специфическим для гетероцист генам (Muro-Pastor, Hess, 2012), однако данных об их участии в регуляции дифференцировки пока нет. Рассмотрение вопросов организации и регуляции экспрессии генов нитрогеназного комплекса не входит в задачу данного обзора.

Морфологические изменения при дифференцировке гетероцист

При дифференцировке гетероцист происходит радикальная перестройка оболочки клетки и организации внутренних фотосинтетических мембран и многих цитоплазматических структур, а также всего клеточного метаболизма. На ранних стадиях, когда формируется наружный фибриллярный слой оболочки, происходит тщательно регулируемое уменьшение диаметра септальной перегородки, отделяющей прогетероцисту от вегетативной клетки, по-видимому, при участии пенициллинсвязывающих белков и автолизиннов, осуществляющих синтез и гидролиз мураминового слоя клеточной стенки. Кроме того, должны быть заблокированы клеточное деление и латеральный рост клеточной стенки. За ограниченным сокращением септы следует изменение формы полярных районов гетероцисты, в результате чего образуются удлинённые шейки. Неясно, является ли это пассивным результатом физических ограничений, налагаемых формированием дополнительных слоев оболочки, либо это активный процесс изменения формы, необходимый для локализованной в этом районе сборки надмолекулярных структур экспорта и импорта метаболитов и межклеточного сигналинга между гетероцистами и вегетативными клетками. Экспорт и укладка полисахаридного слоя и образующих ламинарный слой оболочки гликолипидных фибрилл, как и массивное отложение «пробок» резервного цианофизина также могут быть локализованы в районе шейки. Все это свидетельствует о том, что полюса клеток играют важную роль на всех этапах формирования и функционирования зрелой гетероцисты. Ниже мы более подробно рассмотрим генетические аспекты этих процессов.

Синтез и транспорт компонентов гликолипидного и полисахаридного слоев оболочки гетероцисты

Большинство генов, отвечающих за формирование гликолипидного и полисахаридного слоев оболочки гетероцисты, расположены в двух хромосомных «островах экспрессии» (Ehira et al., 2003; Fan et al., 2005). Ген *devH*, кодирующий ДНК-связывающий белок, транскрипция

которого резко возрастает через 8 часов после начала дифференцировки (Hebbag, Curtis, 2000), необходим для индукции генов синтеза гликолипидов и для формирования гликолипидного слоя (Ramírez et al., 2005), однако регуляция самого *devH* остается не выясненной. *devH*, по-видимому, координирует синтез разных видов гликолипидов (HGL1 и HGL2). Две гистидин-киназы, кодируемые генами *pkn44* и *pkn30* (Shi et al., 2007), регулируют синтез HGL2, а фосфатаза PP2C-типа PrpJ (Jang et al., 2007) участвует в регуляции синтеза HGL1. Мутанты по гену *hgdD* (heterocyst glycolipid deposition) не способны аэробно фиксировать азот. *hgdD* кодирует TolC-подобный белок, образующий канал эффлюкса в наружной мембране; его синтез активируется в прогетероцистах (Moslavac et al., 2007). Мутант *hgdD* имеет такой же фенотип, как и мутанты по генам *devA*, *devB* и *devC*, кодирующим компоненты ABC-транспортера DevBCA (Fiedler et al., 1998) — они не образуют ламинарного гликолипидного слоя, хотя синтез HGL в цитоплазме не нарушается. По-видимому, HgdD и DevBCA образуют комплекс, соединяющий наружную и цитоплазматическую мембраны и служащий для экспорта гликолипидов, формирующих ламинарный гликолипидный слой оболочки. Гликолипидный «остров» (*hgl* и *hgd* гены в районе *all5341-alr5357*) отвечает за синтез гликолипидных агликонов и их гликозилирование. Гомологи генов *devB* (*hgdB*) и *devC* (*hgdC*) также участвуют в формировании ламинарного слоя, однако фенотип соответствующих мутантов отличается его аберрантным расположением (Fan et al., 2005).

Полисахаридный «остров» (*hep* гены *alr2825-alr2841*), присутствующий только у гетероцистных цианобактерий, усиленно экспрессируется через 8–24 часа после начала азотного голодания (Ehira, Ohmori, 2006). Многочисленные гены этого кластера, а также расположенные в другом районе гены гликозилтрансфераз *alr3698-3699* (Xu et al., 2008), необходимы для формирования полисахаридного слоя (Huang et al., 2005) и регулируются двухкомпонентной системой НерК-DevR_A (Zhou, Wolk, 2003), реагирующей на пока не выясненные факторы. Кроме этой пары генов, формирование полисахаридного слоя контролируют ген литической амидазы *hcwA* (Zhu et al., 2001), ген серин/треонин киназы *hepS* и гистидин-киназы *hepN*, причем все они не влияют на синтез гликолипидного слоя (см. обзор Xu et al., 2008).

Некоторые мутации в генах компонентов клеточных стенок вегетативных клеток, не сказывающиеся заметным образом на росте на среде со связанным азотом, блокируют рост на безазотной среде, например мутации по генам синтеза липополисахарида вегетативных клеток *rfbP* и *rfbZ*, лишь незначительно меняющие структуру оболочки гетероцист (Xu et al., 1997). Мутации по трем генам, кодирующим пенициллинсвязывающие белки Alr5101 (*pbpB*) (Lázaro et al., 2001), Alr4579 (*pbpC*) и Alr2981 (*pbpH*) (Leganés et al., 2005) также приводят

к дефектам в формировании гетероцист, что указывает на необходимость модификации клеточной стенки для успешной дифференцировки.

Дифференцировка цитоплазмы гетероцисты

Одной из наиболее заметных морфологических особенностей гетероцист является присутствие на полюсах преломляющих свет крупных включений — так называемых полярных пробок или цианофициновых гранул, состоящих из сополимера аргинина и аспарагиновой кислоты (Simon, 1971). Относительно небольшие гранулы цианофицина часто присутствуют и в вегетативных клетках, где служат легко мобилизуемым резервом связанного азота, однако в гетероцистах им отводится особая роль быстро пополняемого и расходуемого для транспорта в соседние клетки динамичного резервуара фиксированного азота (Carr, 1988). *Anabaena* PCC 7120 содержит два кластера генов (*cph1* и *cph2*), кодирующих ферменты синтеза (цианофицин-синтетаза, ген *cphA*) и расщепления (цианофициназа, ген *cphB*) (Picossi et al., 2004). В кластере *cph1* гены *cphB1* и *cphA1* экспрессируются сильнее (и в вегетативных клетках, и в гетероцистах) на среде без связанного азота, а в целом более низкая экспрессия в кластере *cph2* ингибируется аммонием. Мутационный анализ показал, что diaзотрофный рост сильнее подавлялся у мутантов с инактивированной цианофициназой, чем с инактивированной цианофицин-синтетазой. Это свидетельствует о том, что накопление в гетероцистах цианофицина не является необходимым, в то время как способность расщеплять цианофицин необходима для эффективного функционирования гетероцист (Picossi et al., 2004).

Цианобактерии обладают углерод-концентрирующим механизмом, позволяющим создавать высокую концентрацию CO₂ внутри находящихся в цитоплазме клеток карбоксисом — окруженных однослойной белковой мембраной полиэдральных тел, заполненных молекулами рибулозобисфосфаткарбоксилазы. В ходе дифференцировки гетероцист карбоксисомы исчезают, а активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы и транскрипция кодирующих ее генов *rbcLS* в зрелых гетероцистах не обнаруживаются (Madan, Nierzwicki-Bauer, 1993).

В гетероцистах происходит реорганизация системы фотосинтетических мембран: они фрагментируются, теряют характерное для вегетативных клеток расположение и обычно хаотично концентрируются у полюсов гетероцисты перед полярными пробками. Их основной функцией становится дыхание (Valladares et al., 2007). Какую-то роль в реорганизации мембран может играть белок FraH, поскольку в мутанте *fraH* ее не происходит (Megino-Puerto, Mariscal et al., 2011). Морфологическим изменениям тилакоидов сопутствует перестройка фотосинтетического аппарата: фотосистема II перестает функционировать и образование кислорода прекращается, а активность фотосистемы I сохраняется. Основные светособирающие пигменты II фотосистемы — фикобилипротеины и содержащие их структуры — фикобилисомы в значительной степени деградируют, а уровень

хлорофилла а снижается незначительно, при этом происходит увеличение числа реакционных центров фотосистемы I (Wolk et al., 1994; Meeks, Elhai, 2002).

Для усиления синтеза АТФ и создания микроаэробных условий, необходимых для функционирования нитрогеназы, в гетероцистах резко активизируется дыхание. Для этого индуцируются гены терминальных оксидаз. У *Anabaena* PCC 7120 их кодируют три кластера генов: *cox1* и *cox2* кодируют по три субъединицы цитохром с оксидазы aa3-типа, а кластер *cox3* кодирует три субъединицы альтернативной терминальной оксидазы ARTO (Valladares et al., 2003). В то время как кластер *cox1* экспрессируется в вегетативных клетках, кластеры *cox2* и *cox3* экспрессируются в формирующихся и зрелых гетероцистах, и функционирование по крайней мере одного из этих кластеров необходимо для diaзотрофного роста. У двойного мутанта *cox2 cox3* нарушается реорганизация тилакоидов, наблюдается задержка деградации карбоксисом и полностью исчезает нитрогеназная активность (Valladares et al., 2007). Никаких нарушений в формировании гликолипидного и полисахаридного слоев оболочки у этого мутанта не наблюдается.

Механизмы межклеточного транспорта метаболитов и сигнальных молекул

Многоклеточные нити цианобактерий ведут себя как единый организм, обмениваясь метаболитами и, вероятно, сигнальными молекулами. Каналами такого обмена может служить непрерывное периплазматическое пространство между окружающими каждую клетку цитоплазматическими мембранами и общей для всех клеток в нити наружной мембраной, а также микроплазмодесмы — пронизывающие септальные перегородки полые структуры длиной около 30 нм и диаметром 5 нм, служащие для транспорта низкомолекулярных метаболитов. Недавно они были названы септосомами (Haselkorn, 1978; Wilk et al., 2011).

Функциональная непрерывность периплазмы вдоль всей нити остается пока предметом дискуссий. Противоречивые результаты были получены в опытах с диффузией рекомбинантного белка GFP, экспрессируемого с работающего практически исключительно в гетероцистах промоторов. В одной работе был использован P_{pats} промотор и GFP, к N-концу которого был присоединен сигнальный пептид, обеспечивавший транспорт правильно свернутого функционального белка в периплазму TAT-системой трансмембранной транслокации и последующим отрезанием сигнального пептида сигнальной пептидазой I (Mariscal et al., 2007). В безазотной среде GFP синтезировался в про- и гетероцистах, экспортировался и диффундировал по периплазме вдоль соседних клеток. Замена сигнального пептида с сайтом расщепления пептидазой I на сайт расщепления пептидазой II приводила к закориванию GFP на цитоплазматической мембране и отсутствию какой-либо его диффузии вдоль нити. В другой работе, где был использован аналогичный экспериментальный подход, отличавшийся лишь использованием других специфических

для гетероцист промоторов и выбором другой сигнальной последовательности для экспорта GFP в периплазму, был получен прямо противоположный результат, указывавший на существование периплазматических межклеточных барьеров, препятствующих свободной диффузии макромолекул вдоль филаменты (Zhang et al., 2008). Возможные причины столь кардинальных отличий в результатах обсуждаются в ряде статей (Haselkorn, 2008; Mariscal, Flores, 2010; Zhang et al., 2008;), однако дальнейшей экспериментальной проверки пока не последовало.

Первые данные о вероятных белковых компонентах микроплазмодесмы были получены при изучении фрагментирующих мутантов *Anabaena* PCC 7120. Мутанты по гену *atr2338*, названному *fraG*, фрагментируют на среде без азота, не способны синтезировать специфические для гетероцист гликолипиды и фиксировать азот (Nayar et al., 2007). Поскольку оверэкспрессия *hetR* на среде с азотом также вызывала фрагментацию, не отсутствие связанного азота, а индукция дифференцировки приводила к фрагментации. В другой лаборатории, продолжившей исследования этого гена, он получил название *sepJ* в соответствии с его локализацией (Flores et al., 2007). SepJ локализуется на полюсах клеток в септальных перегородках. Кроме того, слитой белок SepJ-GFP выявляется в виде кольца, сходного с Z-кольцом, в центре клетки в начале ее деления (Mariscal, Flores, 2010). SepJ содержит N-концевой клубок-домен, центральный линкерный и C-концевой пермеазный домены. Как показал делеционный анализ, линкер не является существенным, а клубок-домен необходим для локализации на полюсах клеток, нормального межклеточного транспорта низкомолекулярных флуоресцентных индикаторов (кальцеина и 5-CFDA) и diaзотрофии (Mariscal et al., 2011).

В септе локализуются также белки FraC и FraD, вероятно действующие скоординированно и влияющие на локализацию SepJ. Хотя формирование септосом не зависит от SepJ, в его отсутствие расстояние между цитоплазматическими мембранами в септе значительно увеличивается (Wilk et al., 2011). Инактивация *fraC* и *fraD* также приводит к фрагментации нитей. Эти три белка могут совместно участвовать в формировании септосом, либо участвовать в формировании двух независимых комплексов, один из которых включает FraC/FraD, а другой SepJ (Merino-Puerto, Schwarz et al., 2011).

Помимо этих белков в формировании септы у *Anabaena* участвует ConR (Mella-Herrera et al., 2011). Мутант *conR* образует гетероцисты с дефектными полюсами и не способен расти diaзотрофно, возможно из-за нарушенного транспорта фиксированного азота в вегетативные клетки, поскольку активность нитрогеназы снижается лишь на 30 % (Mella-Herrera et al., 2011). Необходимая для diaзотрофного роста N-ацетилмурамоил-L-аланин амидаза HcwA (Alr0093) (Zhu et al., 2001) наряду с другими гидролазами клеточной стенки может участвовать в образовании в муреине септы пор, необходимых для сборки септосом.

Контроль формирования паттерна гетероцист

HetR является главным регулятором не только процесса дифференцировки гетероцист, но и формирования их регулярного паттерна. Он интегрирует различные сигналы, поступающие из внешней среды и от других клеток (такие, как концентрация внеклеточных источников азота, внутриклеточный азотно-углеродный баланс и стадии клеточного цикла соседних клеток) и определяет, когда и какие клетки начнут дифференцировку. Инактивация *hetR* блокирует самую раннюю стадию дифференциации, а оверэкспрессия приводит к конститутивному образованию аномально большого числа гетероцист (Buikema, Haselkorn, 2001). Мутация R223W (Khudyakov, Golden, 2004) делает HetR нечувствительным к основным негативным регуляторам PatS и HetN. *patS*, кодирующий небольшой полипептид (Yoon, Golden, 1998), и *hetN*, кодирующий кетоацилредуктазу (Black, Wolk, 1994), в мультикопиях ингибируют дифференцировку и необходимы для формирования (*patS*) и поддержания (*hetN*) регулярного паттерна гетероцист. Инактивация *patS* приводит к аберрантному паттерну и образованию множественных прилегающих гетероцист (Pat Mch фенотип) (Yoon, Golden, 1998). Делеция *hetN* не изменяет первоначального паттерна, но вызывает Mch фенотип при последующих циклах дифференциации (Callahan, Buikema, 2001). Одновременная инактивация этих генов ведет к дифференциации всех клеток и гибели нитей (Borthakur et al., 2005). PatS содержит необходимый для активности С-концевой пентапептид RGSGR, который ингибирует ДНК-связывающую активность HetR (Huang et al., 2004). N- и С-концевые участки HetN могут быть делетированы без потери регуляторной функции, а центральная часть также содержит RGSGR мотив, необходимый для поддержания паттерна (Higa et al., 2012). В формировании паттерна принимают участие и другие гены. Мутация *patA* приводит к формированию гетероцист почти исключительно на концах нитей (Liang et al., 1992). Инактивация *patU3* вызывает Mch фенотип у дикого типа, а у мутанта *ΔpatA* восстанавливает образование интеркалярных гетероцист (Zhang et al., 2007). Инактивация кодирующего мембранный белок гена *patN* приводит к трехкратному увеличению частоты гетероцист и усилению транскрипции *patA* (Risser et al., 2012), что указывает на роль PatN в модуляции уровня PatA. В присутствии PatN снижается компетентность вегетативных клеток инициировать дифференцировку, а поскольку слитой белок PatN-GFP распределяется неравномерно между дочерними клетками при делении, их шансы превратиться в гетероцисту будут неравными (Risser et al., 2012). Какую-то роль в формировании паттерна может играть и *asr1734*, присутствующий только у гетероцистных цианобактерий. Его экспрессия локализуется в про- и гетероцистах, инактивация приводит к двукратному увеличению частоты гетероцист и слабому Mch фенотипу, а сверхэкспрессия блокирует дифференцировку (Wu et al., 2007).

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА АКИНЕТ

Акинеты (от греческого *akinetos*, неподвижные) — это специализированные покоящиеся клетки цианобактерий, способные к прорастанию в благоприятных условиях. Акинеты устойчивы к обезвоживанию и к низкой, но не к повышенной температуре, что позволяет им не только переживать холодные и засушливые сезоны, но и многие годы сохранять жизнеспособность в экстремальных условиях. В донных отложениях озер способность акинет к прорастанию сохраняется более ста лет (Wood et al., 2009). К формированию акинет способны только нитчатые гетероцистные цианобактерии из подсекций IV и V (Castenholz, 2001). Акинеты легко отличить от вегетативных клеток по их увеличенным размерам, утолщенной клеточной стенке, дополнительной многослойной оболочке и многочисленным гранулам цианофицина, благодаря которым цитоплазма выглядит зернистой (Jensen, Clark, 1969). Помимо цианофицина акинеты аккумулируют гликоген, липиды и каротиноиды, а полифосфаты исчезают (Castenholz, 2001).

В экспериментальных условиях формирование акинет наблюдается в стареющих неаэрируемых, энергетически лимитированных культурах, при слабой освещенности и при дефиците фосфора (Adams, Duggan, 1999). В зрелых покоящихся акинетах сохраняется низкий уровень метаболической активности, детектируемый по включению метки в белки и липиды, поглощению кислорода в темноте и выделению на свету (Thiel, Wolk, 1983). В процессе дифференцировки акинет из вегетативных клеток содержание ДНК в них возрастает в среднем с 8 геномных эквивалентов до 119, т.е. в 15 раз (Sukenik et al., 2012). Это, очевидно, необходимо при прорастании, которое индуцируется повышением освещенности и разбавлением суспензии в свежей среде и сопровождается локальным лизисом либо растворением всей оболочки и выходом короткой нити (Meeks et al., 2002).

Первым шагом в генетических исследованиях формирования акинет было обнаружение маркерного гена *avaK* (ортолога *all4050*), экспрессирующегося практически исключительно в акинетах *A. cylindrica* ATCC29414 и кодирующего белок с неизвестной функцией (Zhao, Wolk, 2002). Следующим шагом стала разработка модельной системы, позволяющей применить весь арсенал уже опробованных в исследованиях гетероцист методов. Было обнаружено, что использование *zwf* мутанта *N. punctiforme* ATCC 29133 позволяет получить легко контролируемую синхронную индукцию дифференцировки акинет (Argueta, Summers, 2005). *zwf* кодирует глюкозо-6-фосфат дегидрогеназу, начальный фермент окислительного пентозофосфатного пути. При инкубации в темноте в присутствии фруктозы мутант прекращал рост и полностью дифференцировал в подобные акинетам клетки, в то время как исходный дикий тип переключался на гетеротрофный рост. Дифференцировка именно акинет подтверждалась окраской оболочки специфическими для акинет красителями, устой-

чивостью к охлаждению, высушиванию и лизоциму, а также резким усилением экспрессии маркерного гена *avaK*. С использованием этой модельной системы методом обратной транскрипции-ПЦР в реальном времени были идентифицированы три новых гена, экспрессирующихся в акинетах: аминопептидазы (*aapN*), цинк-зависимой металлопротеазы (*hap*) и АВС-транспортера (*aet*). Экспрессия *hap* усиливалась также в дифференцирующих гормогониях (Argueta et al., 2006). Более тщательный анализ экспрессии генов методом ДНК-микрочипов выявил 497 генов, дифференциально экспрессирующихся в акинетах (Campbell et al., 2007). Подавляемая фракция была обогащена генами основного метаболизма, что согласуется с переходом в покоящуюся стадию. В дифференцировке акинет, по-видимому, участвует относительно небольшое количество адаптивных белков (11 %), что может облегчить анализ их функциональной роли в развитии. Усиливается транскрипция маркерного гена *avaK*, а также *patA* и *hetF*, гораздо лучше изученных у *Anabaena sp.* PCC 7120 и считавшихся специфичными для гетероцист, и нескольких транскрипционных факторов, в том числе вероятно специфичного для акинет сигма-фактора группы 2. Среди подавлявшихся генов нужно особо отметить *hetR*, однако в целом перекрытие со специфичными для гетероцист генами было незначительным (Campbell et al., 2007).

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ГОРМОГОНИЕВ

Гормогонии представляют собой специализированные короткие недифференцированные нерастущие филаменты, образующиеся в результате фрагментации родительских вегетативных трихомов у разнообразных нитчатых цианобактерий. Фрагментация трихомов происходит в местах соединения гетероцист с вегетативными клетками (Meeks et al., 2002) либо в результате лизиса отдельных клеток, называемых некрдиями (Castenholz, 2001). Клетки в гормогониях обычно отличаются по форме и мельче вегетативных клеток. Гормогонии являются временной нерастущей стадией в жизненном цикле, по завершении которой они опять превращаются в вегетативные нити (Tandeau de Marsac, 1994). Гормогонии не образуют гетероцист и неспособны к аэробной фиксации азота. Их функция — распространение и колонизация новых ниш. Этой цели служит и образование газовых везикул, обеспечивающих гормогониям плавучесть (Tandeau de Marsac, 1994; Damerval et al., 1987).

Хотя функцией гормогониев является распространение, парадоксально, что их образование является ответом не на ухудшение, а на улучшение условий окружающей среды (Adams, 1997); кроме того, оно стимулируется факторами растительного происхождения (см. ниже). Еще одним важным регулятором дифференцировки гормогониев является освещение: красный свет (640–650 нм) ее стимулирует, а зеленый свет ингибирует (Robinson, Miller, 1970; Damerval et al., 1991)

Дифференцировка гормогониев начинается с одного-двух раундов быстрого и синхронного деления клеток, разобщенного с ростом и репликацией ДНК, что приводит к уменьшению размеров (диаметр уменьшается в 2–3 раза) и массы клеток и пloidности генома (Herdman, Ripka, 1988; Tandeau de Marsac, 1994). При этом наблюдается общее снижение уровня синтеза пигментов и макромолекул при усилении синтеза некоторых специфических белков (Damerval et al., 1991).

Обычно гормогонии являются единственной подвижной стадией благодаря способности к скользящему движению по твердой поверхности, для чего, по-видимому, необходимы пили IV типа (Duggan et al., 2007). Вегетативные клетки *N. punctiforme* лишены пилей, но в процессе дифференцировки гормогониев их поверхность покрывается многочисленными перитрихально расположенными нитями, сходными с пилиями IV типа. Их роль в подвижности и колонизации хозяев в процессе установления симбиоза, а также свойства описанных *pil* мутантов подробно рассмотрены в недавнем обзоре (Adams, Duggan, 2008). Другим механизмом, способным обеспечить подвижность гормогониев, является направленная секреция полисахаридной слизи (Hoiczky, Baumeister, 1998). Недавно были описаны мутанты *N. punctiforme* в кластере генов, обозначенном *che2*, утратившие подвижность гормогониев и секрецию полисахаридов (Risser, Meeks, 2012). Белки из этого кластера локализовались в виде колец на полюсах клеток около септы, где расположены так называемые соединительные поры, через которые происходит секреция полисахаридной слизи. В мутанте *che2* не индуцируется экспрессия полисахаридного локуса, содержащего многочисленные гены гликозилтрансфераз и другие гены, которые могут кодировать компоненты соединительных пор. Делеции в этом локусе также приводили к потере подвижности и секреции полисахаридов (Risser, Meeks, 2012).

ЦИАНОБАКТЕРИИ В СИМБИОТИЧЕСКИХ АССОЦИАЦИЯХ

Цианобактерии образуют симбиотические ассоциации с грибами (лишайники и близкий к гломеромицетам *Geosiphon pyriformis*), животными (динофлагелляты, губки, асцидии), низшими (диатомовые водоросли) и высшими растениями (талломные мхи классов *Anthocerotae* и *Hepaticae*, водяные папоротники рода *Azolla*, голосеменные порядка *Cycadales* (саговники) и покрытосеменные рода *Gunnera*) (Raven, 2002). Цианобактерии обеспечивают эукариотическим партнерам способность к росту и развитию в условиях дефицита связанного азота. В симбиотических ассоциациях они не индуцируют морфологических изменений в инфицируемых органах. В разных симбиозах с растениями инфицироваться может таллом, лист, корень или стебель хозяина. Каждый из симбиозов (за исключением *Azolla* spp.) воспроизводится в поколениях растения *de novo*, и не имеет строгой специфичности. Инфицировать

одного хозяина могут несколько разных штаммов цианобактерий, которые обычно обладают инфекционностью в отношении таксономически различных растений. Важную роль в процессе установления симбиотических ассоциаций играют продуцируемые растительными партнерами химические соединения, способные как стимулировать, так и ингибировать дифференциацию гормогониев (Cohen, Meeks, 1997), а также быть факторами их положительного и отрицательного таксиса. Дифференцировка подвижных гормогониев и способность к положительному хемотаксису являются необходимыми условиями колонизации. Об этом свидетельствует способность обладающих положительным фототаксисом гормогониев мигрировать в противоположном от источника света направлении при колонизации *Gunnera* (Johansson, Bergman, 1992), а также другие экспериментальные данные (Knight, Adams, 1996).

В симбиотических ассоциациях цианобактерии могут переключаться с фотоавтотрофного роста на фото- или хемогетеротрофию, усиливать азотфиксирующую активность и экскретировать продукты азотфиксации, изменять морфологию и стратегию клеточной дифференцировки. Происходит замедление трех физиологических процессов — роста и ассимиляции CO_2 и NH_4^+ , и увеличение частоты гетероцист и усиление фиксации N_2 . Различные экспериментальные данные свидетельствуют, что в симбиотических ассоциациях *Nostoc* сохраняет низкий уровень фотосинтетической активности, а высокая активность нитрогеназы поддерживается за счет продуктов фотосинтеза хозяина (Meeks, Elhai, 2002). Специфическая активность нитрогеназы у *Nostoc* в разных симбиотических ассоциациях в 3–5 раз выше, чем в свободноживущих культурах, а количество восстановленного из N_2 и экскретированного NH_4^+ достигает 40–90 %, что может быть связано (частично и не во всех ассоциациях) с ингибированием глутаминсинтетазы (Meeks, Elhai, 2002).

Ставший модельным штамм *N. punctiforme* ATCC 29133 был выделен из симбиотической ассоциации с саговником *Macrozamia* sp. (Rippka, Herdman, 1992). В лабораторных условиях можно реконструировать его внеклеточную симбиотическую ассоциацию с *Anthoceros punctatus* и внутриклеточную с *Gunnera* spp. (Meeks, 1998). Собственно генетических данных по механизмам симбиотического взаимодействия пока очень мало. Мутант этого штамма по одному из ключевых регуляторных генов *ntcA*, хотя и образует гормогонии, не способен инфицировать хозяина. Этот дефект не может быть обусловлен Fix^- фенотипом мутанта, поскольку другие Fix^- мутанты сохраняют инфекционность, что говорит о том, что роль *NtcA* не ограничивается азотной регуляцией (Wong, Meeks, 2002). Инактивация *sigH*, гена одного из сигма-факторов группы 2, в шесть раз повышает эффективность первичной колонизации хозяина *Anthoceros*, хотя и не приводит к повышению частоты дифференцировки гормогониев или удлинению их подвижной стадии (Campbell et al., 1998). *sigH* не экспрессируется в обычных или стрессовых условиях

и на среде без азота, но активируется между 1,5 и 6 часами после добавления в среду индуцирующего фактора хозяина. Гены, транскрипцию которых регулирует *sigH*, не известны, однако они явно участвуют в модуляции инфекционного процесса (Campbell et al., 1998). Мутация в гене *hrmA* в локусе, вероятно связанном с катаболизмом глюкуроновой и галактурановой кислот, также приводит к 8–10-кратному повышению инфекционности и 2–3-кратному увеличению частоты дифференцировки гормогониев (Cohen, Meeks, 1997). Несмотря на сходство фенотипов, механизмы действия *hrmA* и *sigH* различны, поскольку фенотип *hrmA* мутанта не обусловлен SigH-зависимой транскрипцией *hrm* локуса (Meeks et al., 2002).

В отличие от других симбиозов цианобактерий с растениями, внеклеточный эндосимбиоз *Nostoc azollae* 0708 с водяным папоротником *Azolla microphylla* является непрерывным (Ran et al., 2010). Потерявшая способность к автономному росту цианобактерия наследуется вертикально в поколениях растения либо путем фрагментации боковых побегов хозяина, либо половым путем внутри мегаспорокарпов. В последнем случае часть цианобактериальной популяции, живущей эндосимбиотически в листьях *Azolla*, служит инокулюмом для новых поколений растения. Половой путь основан на способности эндосимбионта продуцировать подвижные гормогонии, которые проникают в спорокарп через узкую пору. После проникновения гормогонии дифференцируют в акинеты и находятся в состоянии покоя до прорастания спорокарпа (Zheng et al., 2009). Коэволюция партнеров в этой ассоциации длилась около 140 млн лет (Ran et al., 2010).

Полностью секвенированный геном этой цианобактерии состоит из одной хромосомы и двух плазмид. Хромосома содержит более 600 инсерционных последовательностей, из 5357 предсказанных кодирующих последовательностей только 3668 являются интактными, а остальные являются псевдогенами. Несмотря на утерю многих важных функций цианобионт способен к медленному росту и делению и полностью сохранил способность к дифференцировке специализированных клеток — гетероцист, акинет и гормогониев. Это первый случай обнаружения деградации генома у фенотипически сложной эндосимбиотической цианобактерии и один из немногих примеров редуцированной эволюции генома у внеклеточных эндосимбионтов.

Одним из самых неожиданных результатов масштабного применения современных методов параллельного пиросеквенирования для исследования биоценозов в пробах морской воды стала реконструкция генома широко распространенной некультивируемой одноклеточной азотфиксирующей цианобактерии (UCYN-A). В нем отсутствуют гены ферментов многих метаболических путей, в том числе циклов Кальвина, трикарбоновых кислот и выделяющей кислород фотосистемы II. Размер этого редуцированного генома всего 1,44 Мб, и благодаря присутствию инвертированных повторов оперонов рибосомальной РНК структурно он сходен с геномами многих хлоропластов. Отсутствие пу-

тей биосинтеза нескольких аминокислот и пуринов указывало, что эта цианобактерия должна находиться в пищевой зависимости и существовать в тесной ассоциации или симбиозе с другими организмами (Bothe et al., 2010; Tripp et al., 2010; Zehr et al., 2008). Совсем недавно удалось выяснить, что UCYN-A находится в симбиотической ассоциации с одноклеточной примнезиофитовой водорослью (Thompson et al., 2012). Таким образом, технологический прорыв в области геномного секвенирования приносит удивительные новые данные, существенно расширяющие и углубляющие наши представления о происхождении и вероятных этапах эволюции хлоропластов.

Работа поддержана грантом РФФИ 10-04-01177-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Adams D.G., 1997. Cyanobacteria. // *Bacteria as multicellular organisms* / Eds. J. A. Shapiro et al. Oxford University Press, New York. P. 109–148.
2. Adams, D.G., Duggan P.S., 1999. Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria // *New Phytol.* Vol. 144. P. 3–33.
3. Adams D.G., Duggan P.S., 2008. Cyanobacteria-bryophyte symbioses // *J. Exp. Bot.* Vol. 59. P. 1047–1058.
4. Anderson D. C., Campbell E. L., Meeks J. C., 2006. A soluble 3D LC/MS/MS proteome of the filamentous cyanobacterium *Nostoc punctiforme* // *J. Proteome Res.* Vol. 5. P. 3096–3104.
5. Argueta C., Summers M. L., 2005. Characterization of a model system for the study of *Nostoc punctiforme* akinetes // *Arch. Microbiol.* Vol. 183. P. 338–346.
6. Argueta C., Yuksek K., Patel R. et al., 2006. Identification of *Nostoc punctiforme* akinete-expressed genes using differential display // *Mol. Microbiol.* Vol. 61. P. 748–757.
7. Black T.A., Wolk C.P., 1994. Analysis of a Het⁻ mutation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 implicates a secondary metabolite in the regulation of heterocyst spacing // *J. Bacteriol.* Vol. 176. P. 2282–2292.
8. Borthakur P.B., Orozco C.C., Young-Robbins S.S. et al., 2005. Inactivation of patS and hetN causes lethal levels of heterocyst differentiation in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 // *Mol. Microbiol.* Vol. 57. P. 111–123.
9. Bothe H., Tripp H.J., Zehr J.P., 2010. Unicellular cyanobacteria with a new mode of life: the lack of photosynthetic oxygen evolution allows nitrogen fixation to proceed // *Arch. Microbiol.* Vol. 192. P. 783–790.
10. Buikema W.J., Haselkorn R., 2001. Expression of the *Anabaena* hetR gene from a copper-regulated promoter leads to heterocyst differentiation under repressing conditions // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Vol. 98. P. 2729–2734.
11. Callahan S. M., Buikema W. J., 2001. The role of HetN in maintenance of the heterocyst pattern in *Anabaena* sp. PCC 7120 // *Mol. Microbiol.* Vol. 40. P. 941–950.
12. Campbell E.L., Brahamsha B., Meeks J.C., 1998. Mutation of an alternative sigma factor in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* results in increased infection of its symbiotic plant partner, *Anthoceros punctatus* // *J. Bacteriol.* Vol. 180. P. 4938–4941.
13. Campbell E.L., Summers M.L., Christman H. et al., 2007. Global gene expression patterns of *Nostoc punctiforme* in steady-state dinitrogen-grown heterocyst-containing cultures and at single time points during the differentiation of akinetes and hormogonia // *J. Bacteriol.* Vol. 189. P. 5247–5256.
14. Carr N.G., 1988. Nitrogen reserves and dynamic reservoirs in cyanobacteria // *Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria* / Eds. L. J. Rogers and J. R. Gallon, Clarendon Press, Oxford, United Kingdom, P. 13–39.
15. Castenholz R. W., 2001. Phylum BX. Cyanobacteria // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / Eds. D. R. Boone and R. W. Castenholz. New York, Springer, 2nd edn, Vol. 1. P. 473–487.
16. Cohen M.F., Meeks J.C., 1997. A hormogonium regulating locus, hrmUA, of the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* strain ATCC 29133 and its response to an extract of a symbiotic plant partner *Anthoceros punctatus* // *Mol. Plant-Microbe Interact.* Vol. 10. P. 280–289.
17. Damerval T., Houmard J., Guglielmi G. et al., 1987. A developmentally regulated gvpABC operon is involved in the formation of gas vesicles in the cyanobacterium *Calothrix* 7601 // *Plant Cell.* Vol. 3. P. 191–201.
18. Damerval T., Guglielmi G., Houmard J., Tandeau de Marsac N., 1991. Hormogonium differentiation in the cyanobacterium *Calothrix*: a photoregulated developmental process // *Plant Cell* Vol. 3. P. 191–201.
19. Du Y., Cai Y., Hou S., Xu X., 2012. Identification of the HetR recognition sequence upstream of hetZ in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *J. Bacteriol.* Vol. 194. P. 2297–2306.
20. Duggan P.S., Gottardello P., Adams D.G., 2007. Molecular analysis of genes in *Nostoc punctiforme* involved in pilus biogenesis and plant infection // *J. Bacteriol.* Vol. 198. P. 4547–4551.
21. Ehira S., Ohmori M., Sato N., 2003. Genome-wide expression analysis of the responses to nitrogen deprivation in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *DNA Res.* Vol. 10. P. 97–113.
22. Ehira S., Ohmori M., 2006. NrrA, a nitrogen responsive response regulator facilitates heterocyst development in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *Mol. Microbiol.* Vol. 59. P. 1692–1703.
23. Fan Q., Huang G., Lechno-Yossef S. et al., 2005. Clustered genes required for synthesis and deposition of envelope glycolipids in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *Mol. Microbiol.* Vol. 58. P. 227–243.
24. Fernández-Piñas F., Leganés F., Wolk C.P., 1994. A third genetic locus required for the formation of heterocysts in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *J. Bacteriol.* Vol. 176. P. 5277–83.

25. Flores E., Pernil R., Muro-Pastor A.M. et al., 2007. Septum-localized protein required for filament integrity and diazotrophy in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // J. Bacteriol. Vol. 189. P. 3884–3890.
26. Fiedler G., Arnold M., Hannus S. et al., 1998. The DevBCA exporter is essential for envelope formation in heterocysts of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // Mol. Microbiol. Vol. 27. P. 1193–1202.
27. Haselkorn R., 1978. Heterocysts // Annu. Rev. Plant Physiol. Vol. 29. P. 319–344.
28. Haselkorn R. 2008. Cell-cell communication in filamentous cyanobacteria // Mol. Microbiol. Vol. 70. P. 783–785.
29. Hebbar P.B., Curtis S.E., 2000. Characterization of devH, a gene encoding a putative DNA binding protein required for heterocyst function in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // J. Bacteriol. Vol. 182. P. 3572–3581.
30. Herdman M., Rippka R., 1988. Cellular differentiation: hormogonia and baeocytes // Methods Enzymol. Vol. 167. P. 232–242.
31. Herrero A., Muro-Pastor A.M., Valladares A., Flores E., 2004. Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria // FEMS Microbiol. Rev. Vol. 28. P. 469–487.
32. Higa K.C., Callahan S.M., 2010. Ectopic expression of hetP can partially bypass the need for hetR in heterocyst differentiation by *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // Mol. Microbiol. Vol. 77. P. 562–574.
33. Higa K.C., Rajagopalan R., Risser D.D. et al., 2012. The RGSGR amino acid motif of the intercellular signalling protein, HetN, is required for patterning of heterocysts in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // Mol. Microbiol. Vol. 83. P. 682–693.
34. Hoiczky E., Baumeister W., 1998. The junctional pore complex, a prokaryotic secretion organelle, is the molecular motor underlying gliding motility in cyanobacteria // Curr. Biol. Vol. 8. P. 1161–1168.
35. Huang X., Dong Y., Zhao J., 2004. HetR homodimer is a DNA-binding protein required for heterocyst differentiation, and the DNA-binding activity is inhibited by PatS // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Vol. 101. P. 4848–4853.
36. Huang G., Fan Q., Lechno-Yossef S. et al., 2005. Clustered genes required for the synthesis of heterocyst envelope polysaccharide in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // J. Bacteriol. Vol. 187. P. 1114–1123.
37. Jang J., Wang L., Jeanjean R. et al., 2007. PrpJ, a PP2C-type protein phosphatase located on the plasma membrane, is involved in heterocyst maturation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 // Mol. Microbiol. Vol. 64. P. 347–358.
38. Jensen T.E., Clark R.L., 1969. Cell wall and coat of the developing akinete of a *Cylindrospermum* species // J. Bacteriol. Vol. 97. P. 1494–1495.
39. Johansson C., Bergman B., 1992. Early events during the establishment of the *Gunnera* / *Nostoc symbiosis* // Planta Vol. 188. P. 403–413.
40. Khudyakov I.Y., Golden J.W., 2001. Identification and inactivation of three group 2 sigma factor genes in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // J. Bacteriol. Vol. 183. P. 6667–6675.
41. Khudyakov I.Y., Golden J.W., 2004. Different functions of HetR, a master regulator of heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. PCC 7120 can be separated by mutation // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Vol. 101. P. 16040–16045.
42. Khudyakov I., Wolk C.P., 1996. Evidence that the *hanA* gene coding for HU protein is essential for heterocyst differentiation in, and cyanophage A-4(L) sensitivity of, *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // J. Bacteriol. Vol. 178. P. 3572–3577.
43. Khudyakov I., Wolk C.P. 1997. hetC, a gene coding for a protein similar to bacterial ABC protein exporters, is involved in early regulation of heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // J. Bacteriol. Vol. 179. P. 6971–6978.
44. Knight C.D., Adams D.G., 1996. A method for studying chemotaxis in nitrogen fixing cyanobacterium-plant symbioses // Physiol. Mol. Plant Pathol. Vol. 49. P. 73–77.
45. Kuhn I., Peng L., Bedu S., Zhang C.C., 2000. Developmental regulation of the cell division protein FtsZ in *Anabaena* sp. strain PCC 7120, a cyanobacterium capable of terminal differentiation // J. Bacteriol. Vol. 182. P. 4640–4643.
46. Lázaro S., Fernández-Piñas F., Fernández-Vallente E. et al., 2001. *pbpB*, a gene coding for a putative penicillin-binding protein, is required for aerobic nitrogen fixation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120 // J. Bacteriol. Vol. 183. P. 628–636.
47. Leganés F, Blanco-Rivero A, Fernández-Piñas F. et al., 2005. Wide variation in the cyanobacterial complement of presumptive penicillin-binding proteins // Arch. Microbiol. Vol. 184. P. 234–248.
48. Liang J., Scappino L., Haselkorn R., 1992. The *patA* gene product, which contains a region similar to CheY of *Escherichia coli*, controls heterocyst pattern formation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120 // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Vol. 89. P. 5655–5659.
49. Madan A.P., Nierzwicki-Bauer S.A., 1993. *In situ* detection of transcripts for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in cyanobacterial heterocysts // J. Bacteriol. Vol. 175. P. 7301–7306.
50. Mariscal V., Flores E., 2010. Multicellularity in a heterocyst-forming cyanobacterium: pathways for intercellular communication // Adv. Exp. Med. Bio.l. Vol. 675. P. 123–135.
51. Mariscal V., Herrero A., Flores E., 2007. Continuous periplasm in a filamentous, heterocyst-forming cyanobacterium // Mol. Microbiol. Vol. 65. P. 1139–1145.

52. Mariscal V., Herrero A., Nenninger A. et al., 2011. Functional dissection of the three-domain SepJ protein joining the cells in cyanobacterial trichomes // *Mol. Microbiol.* Vol. 79. P. 1077–1088.
53. Meeks J. C., 1998. Symbiosis between nitrogen-fixing cyanobacteria and plants // *BioScience.* Vol. 48. P. 266–276.
54. Meeks J. C., Campbell E. L., Summers M. L., Wong F. C., 2002. Cellular differentiation in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* // *Arch. Microbiol.* Vol. 178. P. 395–403.
55. Meeks J. C., Elhai J., 2002. Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Vol. 66. P. 94–121.
56. Mella-Herrera R. A., Neunuebel M. R., Golden J. W., 2011. *Anabaena* sp. strain PCC 7120 conR contains a LytR-CpsA-Psr domain, is developmentally regulated, and is essential for diazotrophic growth and heterocyst morphogenesis // *Microbiology* Vol. 157. P. 617–626.
57. Merino-Puerto V, Mariscal V, Schwarz H. et al., 2011. FraH is required for reorganization of intracellular membranes during heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *J. Bacteriol.* Vol. 193. P. 6815–6823.
58. Merino-Puerto V., Schwarz H., Maldener I. et al., 2011. FraC/FraD-dependent intercellular molecular exchange in the filaments of a heterocyst-forming cyanobacterium, *Anabaena* sp // *Mol. Microbiol.* Vol. 82. P. 87–98.
59. Moslavac S., Nicolaisen K., Mirus O. et al., 2007. A TolC-like protein is required for heterocyst development in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *J. Bacteriol.* Vol. 189. P. 7887–7895.
60. Muro-Pastor A. M., Hess W. R. 2012. Heterocyst differentiation: from single mutants to global approaches // *Trends Microbiol.* Vol. 20. P. 548–557
61. Nayar A. S., Yamaura H., Rajagopalan R. et al., 2007. FraG is necessary for filament integrity and heterocyst maturation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *Microbiology.* Vol. 153. P. 601–607.
62. Olmedo-Verd E., Flores E., Herrero A., Muro-Pastor A. M., 2005. HetR-dependent and -independent expression of heterocyst-related genes in an *Anabaena* strain overproducing the NtcA transcription factor // *J. Bacteriol.* Vol. 187. P. 1985–1991.
63. Picossi S., Valladares A., Flores E. et al., 2004. Nitrogen-regulated genes for the metabolism of cyanophycin, a bacterial nitrogen reserve polymer: expression and mutational analysis of two cyanophycin synthetase and cyanophycinase gene clusters in heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 // *J. Biol. Chem.* Vol. 279. P. 11582–11592.
64. Ramírez M. E., Hebbar P. B., Zhou R. et al., 2005. *Anabaena* sp. strain PCC 7120 gene *devH* is required for synthesis of the heterocyst glycolipid layer // *J. Bacteriol.* Vol. 187. P. 2326–2331.
65. Ran L., Larsson J., Vigil-Stenman T., et al. 2010. Genome erosion in a nitrogen-fixing vertically transmitted endosymbiotic multicellular cyanobacterium // *PLoS One.* Vol. 5. P. e11486.
66. Raven J. A. 2002. Evolution of cyanobacterial symbioses // *Cyanobacteria in symbiosis* / Eds. A. N. Rai et al., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. P. 329–346.
67. Rippka R., Herdman M., 1992. Pasteur Culture Collection of Cyanobacterial Strains in Axenic Culture, Catalogue and Taxonomic Handbook // *Catalog of strains*, Institut Pasteur, Paris. P. 1–103.
68. Risser D. D., Callahan S. M., 2008. HetF and PatA control levels of HetR in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *J. Bacteriol.* Vol. 190. P. 7645–7654.
69. Risser D. D., Wong F. C., Meeks J. C., 2012. Biased inheritance of the protein PatN frees vegetative cells to initiate patterned heterocyst differentiation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Vol. 109. P. 15342–15347.
70. Risser R. D., Meeks J. C., 2012. Identification of a novel polysaccharide secretion system essential for gliding motility in *Nostoc punctiforme* // *Abstr. XIV Intern. Symp. Phototr. Prokar.*, Porto, Portugal. P42.
71. Robinson B. L., Miller J. H., 1970. Photomorphogenesis in the blue-green alga *Nostoc commune* 584 // *Physiol. Plantarum.* Vol. 23. P. 461–472.
72. Sakr S., Jeanjean R., Zhang C.-C. et al., 2006. Inhibition of cell division suppresses heterocyst development in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *J. Bacteriol.* Vol. 188. P. 1396–1404.
73. Shi L., Li J. H., Cheng Y. et al., 2007. Two genes encoding protein kinases of the HstK family are involved in synthesis of the minor heterocyst-specific glycolipid in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *J. Bacteriol.* Vol. 189. P. 5075–5081.
74. Simon R. D. 1971. Cyanophycin granules from the blue-green alga *Anabaena cylindrica*: A reserve material consisting of copolymers of aspartic acid and arginine // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Vol. 68. P. 265–267.
75. Sukenik A., Kaplan-Levy R. N., Welch J. M. et al., 2012. Massive multiplication of genome and ribosomes in dormant cells (akinetes) of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria) // *ISME J.* Vol. 6. P. 670–679.
76. Tandeau de Marsac N., 1994. Differentiation of hormogonia and relationships with other biological processes // *The molecular biology of cyanobacteria* / Ed. D. A. Bryant, Kluwer. Academic Publishers, Boston. P. 825–842.
77. Thiel T., Wolk C. P., 1983. Metabolic activities of spores of *Nostoc spongiaeforme* // *J. Bacteriol.* Vol. 156. P. 369–374.
78. Thompson A. W., Foster R. A., Krupke A. et al., 2012. Unicellular cyanobacterium symbiotic with a single-celled eukaryotic alga // *Science* Vol. 337. P. 1546–1550.
79. Tripp H. J., Bench S. R., Turk K. A., 2010. Metabolic streamlining in an open-ocean nitrogen-fixing cyanobacterium // *Nature* Vol. 464. P. 90–94.

80. Valladares A., Herrero A., Pils D. et al., 2003. Cytochrome c oxidase genes required for nitrogenase activity and diazotrophic growth in *Anabaena* sp. PCC 7120 // *Mol. Microbiol.* Vol. 47. P. 1239–1249.
81. Valladares A., Maldener I., Muro-Pastor A.M. et al., 2007. Heterocyst development and diazotrophic metabolism in terminal respiratory oxidase mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *J. Bacteriol.* Vol. 189. P. 4425–4430.
82. Wang Y., Xu X., 2005. Regulation by hetC of genes required for heterocyst differentiation and cell division in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *J. Bacteriol.* Vol. 187. P. 8489–8493.
83. Wilk L., Strauss M., Rudolf M. et al., 2011. Outer membrane continuity and septosome formation between vegetative cells in the filaments of *Anabaena* sp. PCC 7120 // *Cell Microbiol.* Vol. 13. P. 1744–1754.
84. Wolk C.P., Ernst A., Elhai J., 1994. Heterocyst metabolism and development // *The molecular biology of cyanobacteria* / Ed. D. A. Bryant, Kluwer Academic Publishers, Boston. P. 769–823.
85. Wong F. C. Y., Meeke J. C., 2002. Establishment of a functional symbiosis between the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* and the bryophyte hornwort *Anthoceros punctatus* requires genes involved in nitrogen control and initiation of heterocyst differentiation // *Microbiology* Vol. 148. P. 315–323.
86. Wood S.A., Jentsch K., Rueckert A. et al., 2009. Hindcasting cyanobacterial communities in Lake Okaro with germination experiments and genetic analyses // *FEMS Microbiol. Ecol.* Vol. 67. P. 252–260.
87. Wu X., Lee D. W., Mella R.A., Golden J. W., 2007. The *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *asr1734* gene encodes a negative regulator of heterocyst development // *Mol. Microbiol.* Vol. 64. P. 782–794.
88. Xu X., Elhai J., Wolk C.P., 2008. Transcriptional and developmental responses by *Anabaena* to deprivation of fixed nitrogen // *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution* / Eds. Herrero A., Flores E., Caister Academic Press, Norfolk. P. 383–422.
89. Xu X., Khudyakov I., Wolk C.P., 1997. Lipopolysaccharide dependence of cyanophage sensitivity and aerobic nitrogen fixation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *J. Bacteriol.* Vol. 179. P. 2884–2891
90. Xu X., Wolk C.P., 2001. Role for hetC in the transition to a nondividing state during heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. // *J. Bacteriol.* Vol. 183. P. 393–396.
91. Yoon H-S, Golden J.W., 1998. Heterocyst pattern formation controlled by a diffusible peptide // *Science*. Vol. 282. P. 935–938.
92. Zehr J.P., Bench S.R., Carter B.J. et al., 2008. Globally distributed uncultivated oceanic N₂-fixing cyanobacteria lack oxygenic photosystem II // *Science*. Vol. 322. P. 1110–1112.
93. Zhang C.C., Laurent S., Sakr S. et al., 2006. Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: a chorus of signals // *Mol. Microbiol.* Vol. 59. P. 367–375.
94. Zhang L. C., Chen Y.F., Chen W.L., Zhang C.C., 2008. Existence of periplasmic barriers preventing green fluorescent protein diffusion from cell to cell in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *Mol. Microbiol.* Vol. 70. P. 814–823.
95. Zhang W., Du Y., Khudyakov I. et al., 2007. A gene cluster that regulates both heterocyst differentiation and pattern formation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *Mol. Microbiol.* Vol. 66. P. 1429–1443.
96. Zhao M.X., Jiang Y.L., He Y.X. et al., 2010. Structural basis for the allosteric control of the global transcription factor NtcA by the nitrogen starvation signal 2-oxoglutarate // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol. 107. P. 12487–12492
97. Zheng W., Bergman B., Chen B. et al., 2009. Cellular responses in the cyanobacterial symbiont during its vertical transfer between plant generations in the *Azolla microphylla* symbiosis // *New Phytol.* Vol. 181. P. 53–61.
98. Zhou R., Wolk C.P., 2002. Identification of an akinete marker gene in *Anabaena variabilis* // *J. Bacteriol.* Vol. 184. P. 2529–2532.
99. Zhou R., Wolk C.P., 2003. A two-component system mediates developmental regulation of biosynthesis of a heterocyst polysaccharide // *J. Biol. Chem.* Vol. 278. P. 19939–19946.
100. Zhu J., Jäger K., Black T. et al., 2001. *HcwA*, an autolysin, is required for heterocyst maturation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 // *J. Bacteriol.* Vol. 183. P. 6841–6851.

DEVELOPMENTAL GENETICS AND SYMBIOTIC POTENTIAL OF CYANOBACTERIA

Khudyakov I. Y.

☉ **SUMMARY:** Many cyanobacteria can differentiate specialized cells – heterocysts that fix nitrogen aerobically, akinetes able to survive under unfavorable conditions, and hormogonia providing a means of dispersal. Of great importance for evolution of the biosphere was the ability of cyanobacteria to establish symbioses with eukaryotic organisms that was a prerequisite for the emergence of chloroplasts. This review describes the genes and regulatory systems that control differentiation of specialized cells and the ability of cyanobacteria to establish symbiotic associations with a variety of hosts.

☉ **KEY WORDS:** cyanobacteria; cell differentiation; heterocyst; symbiosis.

☉ Информация об авторе

Худяков Иван Яковлевич — к. б. н., лаборатория биологии ризосферы. ГНУ ВНИИСХМ. 196608, Санкт-Петербург, ш. Подбельского д. 3. E-mail: iykhudyakov@yandex.ru.

Khudyakov Ivan Yakovlevich — PhD, Laboratory of Rhizospheric Biology ARRIAM. Podbelsky chausse, 3, Saint-Petersburg, 196608, Russia. E-mail: iykhudyakov@yandex.ru.