

На правах рукописи

Веселова Марина Анатольевна

ИЗУЧЕНИЕ QUORUM SENSING СИСТЕМ РЕГУЛЯЦИИ

у *Pseudomonas chlororaphis* и *Burkholderia cepacia*

Специальность 03.00.15 — генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2008

Работа выполнена в лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов
Института молекулярной генетики РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор И. А. Хмель

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, ведущий научный
сотрудник Института молекулярной генетики РАН
С.З. Миндлин

доктор биологических наук, профессор,
зав. лабораторией генетики бактерий
ФГУП «ГосНИИгенетика» Г.Б. Завильгельский

Ведущая организация: кафедра генетики и селекции биологического
факультета Московского государственного
университета им. М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2008 г. в 14:00 часов на
заседании диссертационного совета Д 217.013.01 при ФГУП «Государственный
научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных
микроорганизмов» по адресу: 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУП «ГосНИИгенетика»

Автореферат разослан

«_____» _____ 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Г.Г. Заиграева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Последние 10 лет внимание многочисленных исследователей, работающих с микроорганизмами в различных областях биологии и медицины, обращено на явление, получившее название Quorum Sensing (QS). QS — особый тип регуляции экспрессии генов, зависящей от плотности популяции бактерий; он основан на действии низкомолекулярных сигнальных молекул различной природы, аутоиндукторов, которые накапливаются в культуре при высоких плотностях популяции бактерий. С помощью аутоиндукторов осуществляется коммуникация бактерий — передача информации между клетками бактерий, принадлежащих к одному и тому же или к разным видам, родам и даже семействам. Примером аутоиндукторов грамотрицательных бактерий являются N-ацил-гомосеринлактоны (АГЛ). Благодаря QS регуляции бактерии получают возможность координированно контролировать экспрессию генов во всем сообществе. Передача информации от клетки к клетке с использованием QS систем, которая приводит к индукции специализированных наборов генов, способствует быстрой адаптации популяций бактерий к меняющимся условиям и их выживанию в природной среде.

В настоящее время QS регуляция обнаружена более чем у 50 видов бактерий. Регуляторные системы типа QS участвуют во взаимодействии бактерий с высшими организмами — животными и растениями, в регуляции вирулентности, формировании биопленок, регуляции экспрессии генов, связанных с синтезом различных экзоферментов, токсинов, антибиотиков и других вторичных метаболитов, в конъюгации и др. Исследование QS систем регуляции, их роли в метаболизме и взаимодействии бактерий определяет новый подход к изучению поведения бактерий в природных условиях. Эти исследования могут иметь огромное прикладное значение.

Особое внимание уделяется изучению роли QS в регуляции патогенности бактерий. Используя QS системы регуляции, патогенные бактерии при достижении высокой плотности популяции начинают синхронный синтез факторов вирулентности, вызывающих разрушение тканей организма, что способствует успешному преодолению бактериями иммунного ответа организма-хозяина. Данный факт обусловил появление нового направления, связанного с использованием QS регуляции в качестве потенциальной мишени для борьбы с инфекционными

заболеваниями. Лекарственные средства, подавляющие функционирование QS систем, направлены непосредственно на подавление патогенности бактерий и получили название «ядов патогенности». В настоящее время этот подход рассматривается как новая стратегия антимикробной терапии. Подобные лекарственные препараты могут быть перспективными для использования не только в медицине, но и для борьбы с бактериальными инфекциями животных и растений в сельском хозяйстве, а также в пищевых технологиях.

Большой интерес вызывает изучение QS регуляции у бактерий, используемых для биологической борьбы с заболеваниями растений, вызываемыми фитопатогенными грибами и бактериями. Экологически безопасные биологические методы защиты растений с помощью бактерий — антагонистов фитопатогенов рассматриваются как важная альтернатива традиционным методам, связанным с применением химических пестицидов. Использование и модификации QS систем могут повысить эффективность бактерий, перспективных для биологической борьбы с заболеваниями растений.

В данной работе исследуются QS системы грамотрицательных бактерий двух родов — почвенных бактерий *Pseudomonas chlororaphis*, антагонистов фитопатогенных микроорганизмов, и бактерий *Burkholderia cepacia*, являющихся патогенами человека.

Цель работы и задачи исследования. Целью настоящей работы было изучение QS систем *Pseudomonas chlororaphis* и *Burkholderia cepacia*, регуляции их функционирования и взаимодействия с клеточными процессами этих бактерий. В соответствии с этим в работе ставились следующие задачи:

1. исследовать распространение способности продуцировать АГЛ у почвенных и ризосферных бактерий, включающих различные виды *Pseudomonas*, и у клинических штаммов *B. cepacia*;
2. охарактеризовать ризосферные штаммы *P. chlororaphis*, продуценты АГЛ, исследовать их способность проявлять антагонистическую активность в отношении фитопатогенов, определить ряд ферментативных активностей, существенных для обитания бактерий в природных условиях;
3. охарактеризовать клинические штаммы *B. cepacia*, продуценты АГЛ, определить их способность продуцировать потенциальные факторы патогенности;

4. исследовать QS системы штамма *P. chlororaphis* 449, клонировать и секвенировать гены синтаз АГЛ, изучить взаимосвязь QS систем с регуляцией клеточных процессов;
5. исследовать QS систему штамма *B. ceracia* 370, идентифицировать гены *cerI* и *cerR*;
6. исследовать регуляцию функционирования QS систем *P. chlororaphis* 449 и *B. ceracia* 370, изучить роль некоторых глобальных регуляторов экспрессии бактериальных генов в регуляции QS систем и их участие в регуляции клеточных процессов этих бактерий.

Научная новизна и практическая значимость. Изучена способность к синтезу АГЛ среди большого количества почвенных и ризосферных бактерий. Полученные данные свидетельствуют о широко распространенной способности псевдомонад синтезировать АГЛ; продукция АГЛ была обнаружена у 17% исследованных штаммов, при этом частота встречаемости продукции АГЛ варьировала у разных видов *Pseudomonas*.

У группы штаммов *P. chlororaphis*, активных продуцентов АГЛ, выделенных в различных географических зонах, были идентифицированы гены двух QS систем (*phzI*, *phzR* и *csaI*, *csaR*); т.к. все тестируемые штаммы были выделены из очень отдаленных мест, мы сделали вывод о частой встречаемости этих двух систем QS регуляции у почвенных штаммов *P. chlororaphis*. У штамма *P. chlororaphis* 449 гены *phzI*, *csaI*, кодирующие синтазы АГЛ двух QS систем регуляции, были клонированы и секвенированы. Показано, что клетки штамма 449 продуцируют 4 типа АГЛ, а именно N-бутаноил-L-гомосеринлактон, N-гексаноил-L-гомосеринлактон, N-(3-оксо-гексаноил)-L-гомосерин лактон, а также минорный, не определенный пока тип АГЛ, предположительно, N-(3-оксо-октаноил)-L-гомосеринлактон. Сравнение этих данных с имеющимися в литературе для *P. chlororaphis* позволяет высказать предположение о присутствии в клетках штамма *P. chlororaphis* 449 третьей QS системы, дополнительной к уже описанным.

Показано, что исследованные штаммы *P. chlororaphis* являются антагонистами широкого спектра фитопатогенных грибов и бактерий, синтезируют феназиновые антибиотики. Изучив свойства полученных нами производных штамма *P. chlororaphis* 449, несущих мутации в генах феназинового оперона (*phzA*, *phzB*, *phzO*), мы определили, что феназины играют существенную роль в антагонизме исследуемого

штамма в отношении фитопатогенных грибов и бактерий. Впервые было обнаружено, что штаммы *P. chlororaphis* проявляют полигалактуроназную (ПГ) и пектинметилэстеразную (ПМЭ) активности.

На основании изучения мутантов *P. chlororaphis* 449 с инактивированным геном *gacS* показано, что GacA-GacS глобальная система регуляции положительно регулирует синтез всех типов АГЛ, феназиновых антибиотиков, экзопротеаз, ПГ, ПМЭ, антагонистическую активность этого штамма и практически не влияет на липазную и фосфатазные активности.

Впервые у *P. chlororaphis* клонирован, секвенирован, экспрессирован ген *vfr*, определена его локализация в хромосоме (у *P. aeruginosa* этот ген является глобальным регулятором и принимает участие в контроле синтеза АГЛ). Показано, что белок Vfr *P. chlororaphis* 449 гомологичен соответствующему белку *P. aeruginosa* и белку CRP *Escherichia coli*, частично комплементирует мутацию в гене *crp* *E. coli*. Изучение полученного инсерционного мутанта по гену *vfr* показало, что белок Vfr *P. chlororaphis* 449 не участвует в регуляции синтеза АГЛ, феназиновых антибиотиков и исследованных ферментов.

Изучена способность клинических штаммов *Burkholderia cepacia* продуцировать АГЛ. Обнаружено, что 94% исследованных штаммов синтезировали АГЛ. У всех штаммов был идентифицирован ген QS системы *cepR*, у большинства штаммов был определен ген *cepI*. Было показано, что штамм *B. cepacia* 370 синтезирует четыре вида АГЛ: N-гексаноил-L-гомосеринлактон, N-октаноил-L-гомосеринлактон и два минорных компонента, не определенные в настоящее время. Гены *cepR* и *cepI* этого штамма были клонированы и секвенированы.

Впервые у бактерий *B. cepacia* были получены мутанты с инактивированными генами *clpX* и *lon* (кодируют специфические протеиназы, глобальные регуляторы экспрессии генов), а также мутант с инактивированным геном *pps* (кодирующим фосфоэнолпируватсинтазу). Показано, что мутации в генах *clpX* и *pps* увеличивают синтез АГЛ, а мутация в гене *lon* приводит к его резкому снижению. Определено влияние мутаций в этих генах на синтез потенциальных факторов патогенности (гемолизинов, экзопротеаз, липаз).

Практическая значимость работы связана с возможностью использования полученных данных об антагонистической активности и ее регуляции у *P. chlororaphis* 449 для разработки препаратов для биологической защиты растений на

основе *P. chlororaphis*. Данные о регуляции синтеза потенциальных факторов патогенности у *B. ceracia* могут быть использованы в разработке методов подавления патогенных свойств данной бактерии.

Апробация работы и публикации. Материалы исследования по теме диссертации были представлены на Международном конгрессе «Ликвидация и Элиминация Инфекционных Болезней — Прогресс и Проблемы» (Москва, 2003); на III Съезде ВОГиС (Москва, 2004), на международных симпозиумах и конференциях в городах Москва-Тверь, 2001; Москва-Минск, 2001; Москва, 2002, 2003; Пущино 2002, 2003; Тель-Авив, 2003; Бонн, 2003; Саратов, 2005; на ежегодных отчетных научных конференциях ИМГ РАН (2001-2004 гг.), семинарах Лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов ИМГ РАН. Диссертационная работа была апробирована на заседании ученого совета Института молекулярной генетики РАН 18 июня 2007 г. и на заседании секции «Генетика микроорганизмов» ученого совета ФГУП "ГосНИИгенетика" 31 октября 2007 г. По материалам диссертации опубликовано 17 печатных работ (6 статей и 11 материалов докладов и сообщений на конференциях).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, список литературы. Работа изложена на 154 страницах машинописного текста содержит 32 рисунка и 19 таблиц. Библиография включает 254 названия, в том числе 14 русских и 240 иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Определение способности синтезировать АГЛ у штаммов *Pseudomonas* из коллекции почвенных бактерий

На первом этапе работы было проведено исследование продукции АГЛ у бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных к.б.н. Т.А. Сорокиной из различных почв и ризосферы растений в различных географических зонах России и республик бывшего СССР.

Способность бактерий продуцировать АГЛ определялась с использованием двух сенсорных штаммов. В штамме *Chromobacterium violaceum* CVO26 инсерцией транспозона mini-Tn5 инактивирован ген синтазы АГЛ *cviI*, которая отвечает за

синтез N-гексаноил-гомосерин лактона (C₆-АГЛ). Мутация в этом гене приводит к отсутствию синтеза АГЛ и фиолетового пигмента виолацеина. Синтез виолацеина в штамме CVO26 индуцируется C₆-АГЛ и другими АГЛ с длиной боковых ацильных цепочек от C₄ до C₈ с различной степенью чувствительности (McClellan et al., 1997).

Штамм *Agrobacterium tumefaciens* NT1/pZLR4 несет плазмиду pZLR4, содержащую слитые гены *traG::lacZ* и ген транскрипционного регулятора *traR*; ген синтазы *traI* а, следовательно, и синтез АГЛ, в данном штамме отсутствуют. Синтез β-галактозидазы (экспрессия *lacZ*) в этом штамме происходит только в присутствии экзогенного АГЛ. Комплекс белка TraR и АГЛ активирует экспрессию *traG::lacZ*. Штамм *A. tumefaciens* NT1/pZLR4 чувствителен к большому количеству АГЛ трех классов: АГЛ без заместителей в боковой ацильной цепочке, 3-оксо-АГЛ и 3-гидрокси-АГЛ; длина боковых ацильных цепочек у трех видов АГЛ может варьировать от C₄ до C₁₂ (Cha et al., 1998).

С помощью биосенсора CVO26 синтез АГЛ был обнаружен у 30 из 228 исследованных штаммов (13%), с помощью сенсора NT1/pZLR4 синтез АГЛ обнаружили у 38 из 228 исследованных штаммов *Pseudomonas* (17%). Способность синтезировать АГЛ была различной у разных видов *Pseudomonas*, чаще всего она встречалась у штаммов *P. aeruginosa* и *P. chlororaphis* / *aureofaciens* (таблица 1). Полученные нами данные свидетельствуют о широко распространенной способности почвенных и ризосферных псевдомонад синтезировать АГЛ.

Таблица 1

Продукция АГЛ у различных видов *Pseudomonas*

Род, вид	Число исследованных штаммов	Штаммы, продуцирующие АГЛ / биосенсоры	
		<i>A. tumefaciens</i> NT1/pZLR4	<i>C. violaceum</i> CV026
<i>P. aeruginosa</i>	6	4	3
<i>P. chlororaphis</i> (= <i>P. aureofaciens</i>)	38	13	11
<i>P. fluorescens</i> (биотип 1)	25	2	2
<i>P. fluorescens</i> (др. биотипы)	51	5	4
<i>P. geniculata</i>	20	2	1
<i>P. lemonnieri</i>	10	1	1
<i>P. putida</i>	30	5	5
<i>Pseudomonas</i> spp.	48	6	3
Всего	228	38	30

2. Характеристика штаммов *P. chlororaphis*, синтезирующих АГЛ

Для дальнейшей работы были отобраны семь штаммов *P. chlororaphis*, активных продуцентов АГЛ, выделенных из ризосферы различных растений в разных географических зонах (штаммы 62, 64, 66, 205с, 445, 449, 464). С помощью ПЦР во всех 7 штаммах были идентифицированы гены, относящиеся к QS системам (*phzI*, *phzR* и *csaI*, *csaR*). Полученные нами данные о присутствии генов двух QS систем в клетках исследованных штаммов *P. chlororaphis* были подтверждены далее секвенированием этих генов у *P. chlororaphis* 449. Эти результаты и литературные данные по анализу еще одного штамма *P. chlororaphis* показывают, что обе QS системы имеются у всех изученных в этом отношении штаммов *P. chlororaphis*, продуцирующих АГЛ.

Все исследованные штаммы синтезировали феназиновые антибиотики и были активными антагонистами фитопатогенных бактерий и грибов. С помощью ПЦР во всех штаммах был идентифицирован ген *phzO*, расположенный вблизи феназинового оперона; предполагается, что этот ген является видоспецифичным у *P. chlororaphis*. Ген *phzO* отвечает за превращение феназин-1-карбоновой кислоты в 2-гидроксифеназин и 2-гидрокси-феназин-1-карбоновую кислоту. Все 7 штаммов *P. chlororaphis* обладали экзопротеазной активностью, ни один из исследованных штаммов не обладал хитинолитической активностью. Нами было впервые обнаружено, что штаммы *P. chlororaphis* / *aureofaciens*, включая хорошо изученный штамм 30-84, проявляют полигалактуроназную активность (совместно с сотрудниками Института биохимии РАН Проценко М.А. и Бузой Н.Л.).

В качестве модельного штамма для более подробного исследования был выбран штамм *P. chlororaphis* 449, выделенный из ризосферы кукурузы (Украина, Киевская область). Мы определили, что штамм 449 обладает антагонистической активностью в отношении широкого спектра фитопатогенных грибов и бактерий; синтезирует экзоферменты: протеазы, липазы, полигалактуроназы и пектинметилэстеразы, продуцирует фосфатазы; клетки штамма способны к миграции по поверхности среды (сворминг). В совместной работе, проведенной с д-ром Л.С. Черниным (Иерусалимский Университет, Израиль), было показано, что клетки штамма 449 синтезируют три антибиотика феназиновой природы: феназин-1-карбоновую кислоту (ФКК), 2-гидрокси-феназин-1-карбоновую кислоту (2-ОН-ФКК)

и 2-гидроксифеназин (2-ОН-PHZ, приводит к появлению оранжевой окраски колоний), а также HCN и сидерофоры; все эти вещества могут участвовать в антагонистической активности бактерий в отношении фитопатогенных микроорганизмов.

Для изучения роли феназиновых антибиотиков в антагонистической активности *P. chlororaphis* 449 с помощью транспозонного мутагенеза были получены мутантные штаммы с инактивированными генами феназинового оперона *phzA* и *phzB* (вовлечены в синтез ФКК), а также с инактивированным геном *phzO* (вовлечен в синтез 2-ОН-ФКК и 2-ОН-PHZ). Полученные мутантные штаммы были охарактеризованы, определена их антагонистическая активность в отношении грамположительных бактерий и фитопатогенных грибов (таблица 2). Приведенные данные показывают, что подавление роста грамположительных бактерий *P. chlororaphis* 449 связано, в основном, с действием ФКК, а не 2-ОН-ФКК и 2-ОН-PHZ.

Таблица 2

Характеристика *P. chlororaphis* 449 и его транспозонных мутантов, лишенных синтеза феназиновых антибиотиков

Штамм	Генотип	Пигмент	Синтез АГЛ*	Действие на грамположительные бактерии (радиус зоны подавления роста газона, мм)		Действие на фитопатогенные грибы (радиус зоны подавления роста газона, мм)	
				<i>B.subtilis</i>	<i>St.aureus</i>	<i>S.sclerotiorum</i>	<i>R.solani</i>
449	дикий тип	ярко-оранжевый	++++	10	10	10	10
449::miniTn5-3	<i>phzB</i> ::mini-Tn5Km2	белый	++++	2 сл	0	2 сл	0
449::miniTn5-14	<i>phzA</i> ::mini-Tn5Km2	белый	++++	2сл	0	2сл	0
449::miniTn5-10	<i>phzO</i> ::mini-Tn5Km2	белый	++++	8	8		

Примечание. *В качестве биосенсора использовали штамм *C. violaceum* CV026. Интенсивность синтеза виолацеина штаммом CV026 оценивали визуально

P. chlororaphis 449 *in vitro* подавлял рост фитопатогенных грибов *Rhizoctonia solani* и *Sclerotinia sclerotiorum*, у мутантных штаммов 449::miniTn5-3 и 449::miniTn5-14 эта активность была снижена (таблица 2). В условиях теплицы штамм 449 уменьшал на 70% заболеваемость растений бобов, вызываемую *R. solani*, и на 50% заболеваемость огурцов, вызываемую *S. sclerotiorum*. Штаммы 449::miniTn5-3

и 449::miniTn5-14 были практически неспособны защищать растения от заболеваний, вызванных этими фитопатогенными грибами.

Полученные результаты показывают, что феназины играют существенную роль в антагонизме исследуемой бактерии.

3. Quorum Sensing системы *P. chlororaphis* 449 и изучение их роли в регуляции клеточных процессов

С помощью тонкослойной хроматографии было проведено определение АГЛ у *P. chlororaphis* 449 (совместно со студ. Атамовой Э.Э.). Локализацию АГЛ на ТСХ пластинке проводили визуально с использованием двух биосенсоров, *C. violaceum* CV026 и *A. tumefaciens* NT1/pZLR4, как описано в (Shaw et al., 1997). По результатам ТСХ, в штамме 449 были обнаружены четыре вида АГЛ (рис. 1), это N-бутаноил-гомосеринлактон (C₄-АГЛ), N-гексаноил-гомосеринлактон (C₆-АГЛ), N-(3-оксо-гексаноил)-гомосеринлактон (3OC₆-АГЛ), а также минорный тип АГЛ, предположительно, N-(3-оксо-октаноил)-гомосерин лактон (3OC₈-АГЛ). У хорошо изученного близко родственного штамма *P. chlororaphis* / *aureofaciens* 30-84 имеются две QS системы и наблюдается синтез двух АГЛ, C₆-АГЛ и C₄-АГЛ. Тот факт, что в штамме *P. chlororaphis* 449, кроме этих АГЛ, синтезируется еще 3OC₆-АГЛ, позволяет предположить присутствие еще одной, дополнительной QS системы. Не исключено, что появление этой QS системы в клетках *P. chlororaphis* 449 могло бы быть результатом горизонтального переноса. В этой связи большой интерес представляют данные о том, что гены QS системы *Serratia marcescens* были обнаружены в составе транспозона (Wei et al., 2006). Эта QS система функционирует с участием 3OC₆-АГЛ. Вполне возможно, что этот АГЛ, обнаруженный в клетках *P. chlororaphis* 449, является компонентом QS системы из подобного мобильного элемента.

Гены АГЛ-синтаз *phzI* и *csaI* из *P. chlororaphis* 449 были клонированы и секвенированы. Нуклеотидная последовательность гена *phzI* оказалась на 93% идентичной последовательности гена *phzI* из штамма *P. chlororaphis* 30-84. Аминокислотная последовательность АГЛ-синтазы PhzI *P. chlororaphis* 449 имела значительную гомологию с другими АГЛ-синтазами, 96, 94, 92, 86, 40, 37 и 36 % идентичности с белками PhzI *P. chlororaphis* O6, PhzI *P. aureofaciens* 30-84, PhzI

P. chlororaphis (AF195615), PhzI *P. fluorescens* 2-79, RhlI *P. aeruginosa* PAOI, CsaI *P. aureofaciens* 30-84 и CepI *B. cepacia*, соответственно.

Нуклеотидная последовательность гена *csaI* была на 94% идентичной последовательности гена *csaI* из штамма 30-84. Аминокислотная последовательность АГЛ-синтазы CsaI *P. chlororaphis* 449 проявляла значительную гомологию с другими АГЛ-синтазами, 93, 50, 41, 38, 38, 38, 37 и 36 % идентичности с белками CsaI *P. aureofaciens* 30-84, RhlI *P. aeruginosa* PAOI, CepI *B. cepacia*, PhzI *P. aureofaciens* 30-84, PhzI *P. chlororaphis* (AF195615), PhzI *P. fluorescens* 2-79, PhzI *P. chlororaphis* О6 и PhzI *P. chlororaphis* 449, соответственно.

Для изучения роли исследуемых QS систем *P. chlororaphis* 449 в регуляции клеточных процессов с помощью метода замены генов (Hoang et al., 1998) были получены инсерционные мутанты с инактивированными генами синтаз *csaI* (*P. chlororaphis* 449 *csaI*:Km) и *phzI* (*P. chlororaphis* 449 *phzI*:Gm). Синтез АГЛ в мутантном штамме с инактивированным геном *phzI* был немного слабее, чем у исходного штамма, интенсивность оранжевой окраски колоний была снижена. Это соответствовало литературным данным об участии PhzI-PhzR QS системы в регуляции транскрипции феназинового оперона (Wood et al., 1997). Однако в дальнейшем нас постигла неудача: ген *phzI* в мутантном штамме довольно быстро ревертировал к исходному состоянию, при этом синтез АГЛ в клетках восстановился до прежнего уровня.

Введение мутации в ген *csaI* вызывало небольшое уменьшение продукции АГЛ (таблица 4). Инактивация этого гена, судя по анализу с биосенсором *S. violaceum* CV026, приводила к отсутствию C₄-АГЛ, 3OC₆-АГЛ и минорного вида АГЛ (рис.1) и практически не оказывала влияния на экзопроteaseзную, липазную, полигалактуроназную, пектинметилэстеразную, фосфатазную и антагонистическую активность исследуемого штамма 449 (таблица 4). Известно, что CsaI-CsaR QS система *P. aureofaciens* 30-84, вместе с PhzI-PhzR QS системой, участвует в регуляции продукции экзопроteaseз; АГЛ, продуцируемые PhzI-синтазой, могут взаимодействовать с регуляторным белком CsaR, а АГЛ, продуцируемые CsaI-синтазой — с белком PhzR при регуляции синтеза экзопроteaseз. Это показывает сложность работы с бактериями, содержащими не одну QS систему, примером которых является *P. chlororaphis* 449.

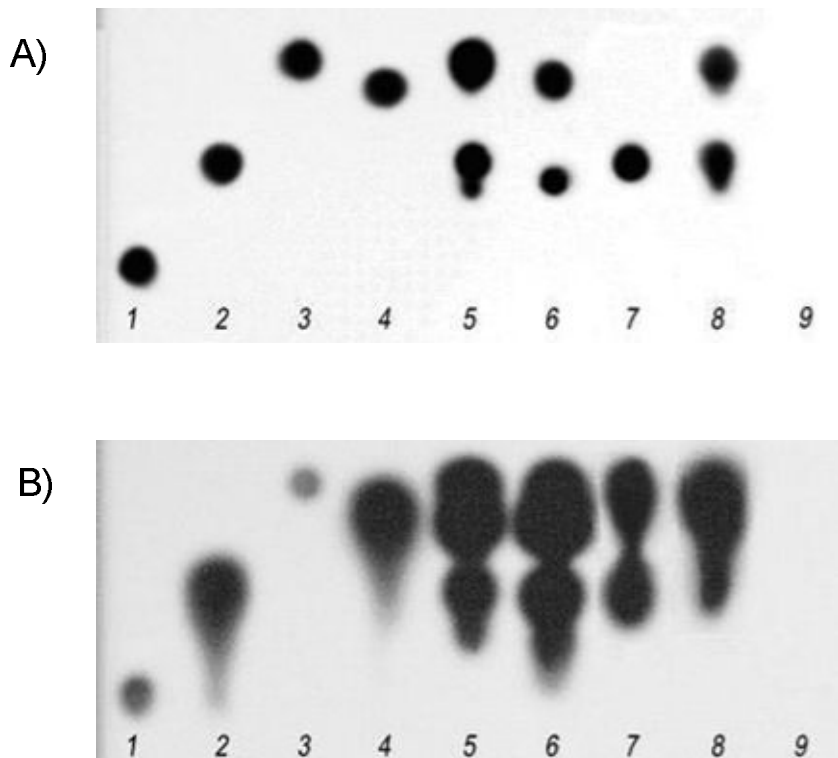


Рис.1. Идентификация АГЛ в культуральных экстрактах *P. chlororaphis* 449, мутантных штаммов, штамма *P. chlororaphis* 449 pME6863

1 — C₈-АГЛ; 2 — C₆-АГЛ; 3 — C₄-АГЛ; 4 — 3OC₆-АГЛ; 5 — экстракт АГЛ из *P. chlororaphis* 449; 6 — экстракт АГЛ из *P. chlororaphis* 449 *yfr::Gm*; 7 — экстракт АГЛ из *P. chlororaphis* 449 *csaI::Km*; 8 — экстракт АГЛ из *P. chlororaphis* 449-06 (*gacS::mini-Tn5Km2*); 9 — экстракт АГЛ из *P. chlororaphis* 449 pME6863

А) В качестве биосенсора использован штамм *C. violaceum* CVO26

В) В качестве биосенсора использован штамм *A. tumefaciens* NT1/pZLR4

Экстракт АГЛ из *P. chlororaphis* 449-06 (*gacS::mini-Tn5Km2*) был в 8 раз более концентрированным, чем в случае остальных вариантов

Новым подходом при изучении функционирования QS систем и их роли в регуляции процессов метаболизма бактерий является использование ферментов деградации АГЛ — лактоназ и ацилаз. Для деградации АГЛ в клетки штамма *P. chlororaphis* 449 была введена плазмида pME6863, содержащая клонированный ген АГЛ-лаксоназы AiiA из *Bacillus*; этот фермент расщепляет лактонное кольцо, инактивируя АГЛ. Для сравнения был использован штамм, несущий векторную плазмиду pME6000. Введение плазмиды pME6863 приводило к отсутствию синтеза всех типов АГЛ или, по крайней мере, резкому уменьшению содержания АГЛ (рис. 1) и синтеза феназиновых антибиотиков, небольшому уменьшению экзопротеазной и липазной активности в клетках исследуемого штамма (таблица 3). Способность клеток, несущих плазмиду pME6863, мигрировать по поверхности среды (сворминг) была резко подавлена по сравнению с клетками, содержащими векторную плазмиду

pME6000. Эти результаты показывают, что АГЛ (а, значит, и QS регуляция) играет важную роль в контроле миграции клеток у *P. chlororaphis*.

К нашему удивлению, антагонистическая активность бактерий, которая в исходном штамме зависела от синтеза феназинов, при введении плазмиды pME6863 не только не уменьшалась, но даже несколько увеличивалась. Одно из возможных объяснений этого неожиданного эффекта — участие АГЛ в репрессии генов, ответственных за синтез каких-то других соединений, помимо феназинов, играющих важную роль в подавлении роста грибов.

Таблица 3

Влияние плазмиды pME6863, содержащей клонированный ген АГЛ-лактоназы AiiA, на свойства клеток *P. chlororaphis* 449

Штамм	Синтез АГЛ*	Пигмент	Экзопротезная активность **	Липазная активность ***	Антагонистическая активность (радиус зоны подавления роста, мм)	
					<i>S.sclerotiorum</i>	<i>Rh.solani</i>
<i>P. chlororaphis</i> 449/ pME6000	++++	ярко-оранжевый	1,28±0,35	17,6±2,3	5,3±1,1	5,5±1,0
<i>P. chlororaphis</i> 449/ pME6863	—	желтоватый	0,62±0,18	9,1±1,4	12,3±1,7	13,0±3,6

Примечание. *Продукцию АГЛ определяли с использованием репортера CV026.

Интенсивность синтеза виолацеина штаммом CV026 оценивали визуально

** Экзопротезная активность рассчитана как $100 \times OD_{450} / OD_{600}$

*** Липазная активность рассчитана как $100 \times OD_{400} / OD_{600}$

4. Исследование взаимодействия двухкомпонентной системы GacA-GacS с QS системой и ее роли в регуляции клеточных процессов у *P. chlororaphis* 449

Двухкомпонентная система GacA-GacS является глобальной регуляторной системой; эта система консервативна во многих псевдомонадах, она принимает участие в регуляции большого числа метаболических процессов в клетке, необходима для регуляции продукции экзоферментов и вторичных метаболитов.

С помощью транспозонного мутагенеза нами были получены мутанты, лишенные синтеза АГЛ. Для определения локализации мутации проводили клонирование участка хромосомной ДНК мутантного штамма, содержащего инсерцию минитранспозона, секвенирование фланкирующих инсерцию районов и сравнение полученной в результате последовательности с нуклеотидными последовательностями в ГенБанке.

С помощью транспозонного мутагенеза нами были получены мутанты, лишенные синтеза АГЛ. Для определения локализации мутации проводили клонирование участка хромосомной ДНК мутантного штамма, содержащего инсерцию минитранспозона, секвенирование фланкирующих инсерцию районов и сравнение полученной в результате последовательности с нуклеотидными последовательностями в ГенБанке.

Мы определили, что в четырех независимо полученных мутантах мутация была локализована в гене *gacS*, кодирующем сенсор-киназу GacS. Кроме того, была клонирована часть гена *gacS*, кодирующего сенсор-киназу GacS двухкомпонентной системы регуляции GacA-GacS. Была определена нуклеотидная последовательность 944 п.н. фрагмента гена *gacS*, которая оказалась на 95% идентичной последовательности фрагмента гена *gacS* из штамма 30-84.

Мутация в гене *gacS* оказывала существенный эффект на исследованные свойства штамма 449. Мы определили, что GacA-GacS система *P. chlororaphis* 449 положительно регулирует синтез АГЛ, продукцию экзопротеаз, феназиновых антибиотиков, антагонистическую активность, полигалактуроназную и пектинметилэстеразную активности (таблица 4), способность клеток к миграции по поверхности среды (swarming). Впервые были получены данные о роли GacA-GacS системы в регуляции продукции полигалактуроназ и пектинметилэстераз у *P. chlororaphis*.

5. Клонирование, секвенирование и экспрессия гена *vfr* *P. chlororaphis* 449, изучение его роли в регуляции клеточных процессов

В клетках *Pseudomonas aeruginosa* регуляторный белок Vfr (Virulence factor regulation) контролирует работу *las* QS системы, продукцию АГЛ, регулирует экспрессию генов, определяющих синтез факторов вирулентности, экзоферментов (West et al., 1994). Vfr высоко гомологичен белку CRP *E. coli*, но функционально отличается от последнего; он не участвует в катаболитной репрессии. Белок Vfr является глобальным регулятором и оказывает или положительный, или отрицательный эффект на экспрессию по крайней мере 60 генов у *P. aeruginosa* (Suh et al., 2002). Представляло интерес выяснить, имеется ли ген *vfr* у *P. chlororaphis* и участвует ли он в функционировании QS систем этой бактерии.

Таблица 4

Характеристика *P. chlororaphis* 449 и мутантных штаммов

Штаммы <i>P. chlororaphis</i>	Синтез АГЛ/ сенсор		Качественное определение (радиус зоны гидролиза, мм)		Количественное определение		Активность ферментов (радиус просветления мм / 100 мкг белка		Фосфатазная активность (1μM PNPP/мин/мг белка) ****			Антагонистическая активность в отношении <i>S. sclerotiorum</i> (радиус зоны подавления роста, мм)
	CVO26*	NT1/pZLR4**	Экзопротеазная активность	Липазная активность	Экзопротеазная активность***	Липазная активность****	ПГ	ПМЭ	pH 2,5	pH 5,6	pH 8,8	
449, дикий тип	+++++	13	4	4	1,23 ± 0,28	6,46 ± 1,2	2,5	2,5	0,065±0,012	0,90±0,11	0,29±0,10	7
449 <i>csaI</i> :Km	+++	10	4	4	1,16 ± 0,3	6,74 ± 1,7	2,5	2,5	0,073±0,007	0,86±0,16	0,21±0,040	6
449-06 (<i>gacS</i> ::mini-Tn5Km2)	—	4	0	3	0,59± 0,07	5,2 ± 1,3	0	0	0,046±0,006	1,20±0,23	0,13±0,06	0
449 <i>vfr</i> :Gm	++++	11	4	4	1,5 ± 0,1	8,9 ± 1,7	2,5	2,5	0,077±0,004	0,84±0,08	0,28±0,07	7

Примечание. *Интенсивность синтеза виолацеина штаммом *C. violaceum* CV026 оценивали визуально

**Радиус (мм) голубых зон гидролиза X-Gal вокруг колоний исследуемых штаммов

***Экзопротеазная активность рассчитана как 100хOD450 / OD600

**** Липазная активность рассчитана как 100хOD400 / OD600

*****Значения являются средними из четырех проведенных опытов

В хромосоме *P. aeruginosa* PAO1 ген *vfr* фланкирован генами *orfX* и *trpC* (рис. 2), в этих генах мы подобрали праймеры для амплификации гена *vfr* с хромосомной ДНК *P. chlororaphis* 49. Полученный ПЦР-продукт был клонирован и секвенирован. Мы определили, что ген *vfr* из *P. chlororaphis* 449 высоко гомологичен соответствующему гену *P. aeruginosa* PAO1 (84% идентичности) и проявляет гомологию с генами других псевдомонад, названными так же, но не исследованными (гены из *P. fluorescens* Pf-5 и *P. entomophila* L48 87 и 84% идентичности, соответственно).

После определения нуклеотидной последовательности фрагмента хромосомы штамма 449, расположенной между генами *orfX* и *trpC*, мы обнаружили, что локализация в хромосоме генов *vfr* у *P. chlororaphis* 449 и *P. aeruginosa* различна. В случае с *P. chlororaphis* 449 между генами *vfr* и *trpC* расположена дополнительная открытая рамка считывания (рис. 2).

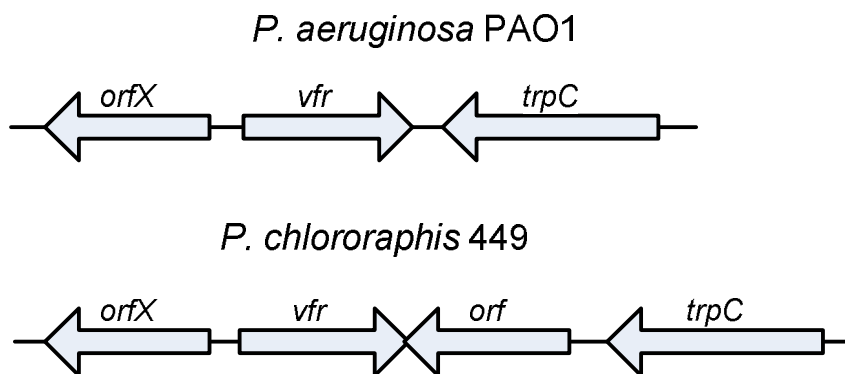


Рис. 2. Локализация генов *vfr* в хромосомах *P. aeruginosa* PAO1 и *P. chlororaphis* 449

Аминокислотная последовательность белка, кодируемого геном *vfr* у *P. chlororaphis* 449, имеет идентичность 83% с белком Vfr *P. aeruginosa* и 63% с белком Ctr *E. coli*. Аминокислотные остатки, которые обеспечивают наиболее важные структурные особенности белка Ctr, т.е. его связывание с cAMP, РНК-полимеразой и ДНК, идентичны или очень консервативны в обоих белках Vfr (рис. 3).

Ген *vfr* из штамма 449 был экспрессирован, для осуществления экспрессии этот ген был клонирован из геномной библиотеки в экспрессионном векторе pEX20T под контролем *tac* промотора (Dykxhoorn et al., 1996). При анализе в SDS-PAGE электрофорезе мы подтвердили, что молекулярная масса белка Vfr штамма 449

соответствует расчетной молекулярной массе 24,3 kDa и близка молекулярной массе белка Vfr *P. aeruginosa*. Было показано, что клонированный ген *vfr* *P. chlororaphis* 449 частично комплементировал мутацию в гене *crp* в клетках *E. coli* (таблица 5).

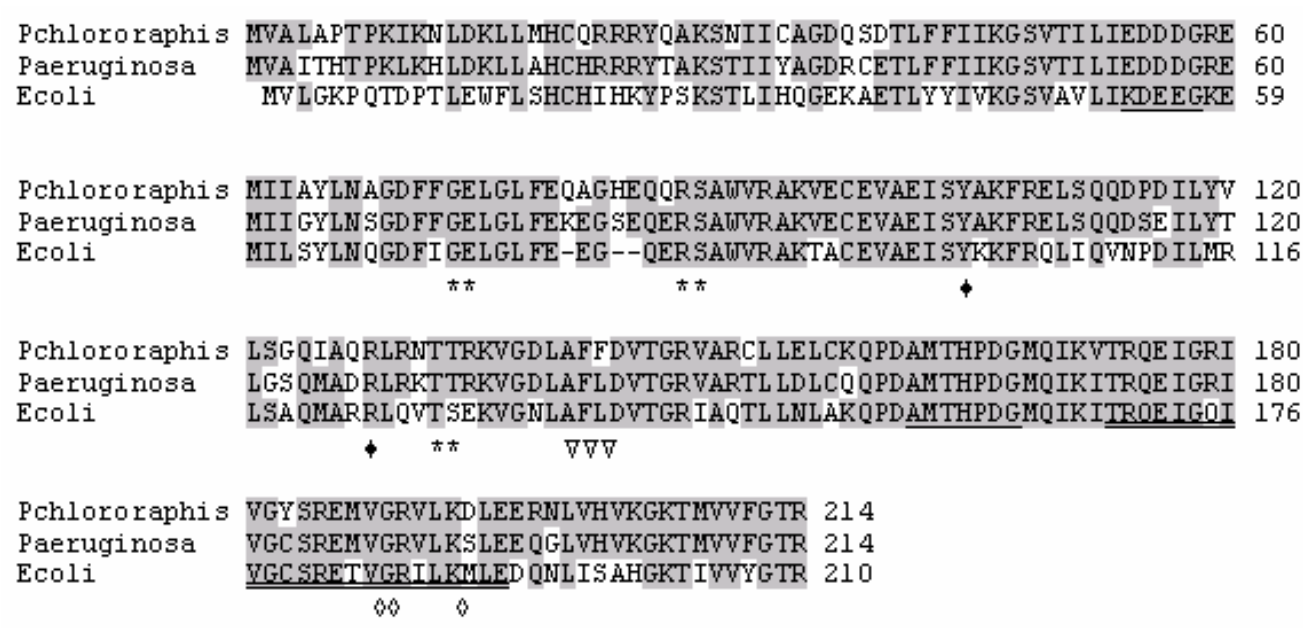


Рис.3. Выравнивание аминокислотных последовательностей белков Vfr *P. chlororaphis* 449, Vfr *P. aeruginosa* PAO1 и CRP *E. coli* Crp

На рисунке выделены идентичные АК остатки и области, важные для активности белка Crp: *, АК остатки, вовлеченные в связывание с сАМР; ♦, АК остатки, стабилизирующие сАМР-связывающий карман; ▽, АК остатки, которые формируют петлю между двумя доменами сАМР; подчеркивание, АК остатки, которые участвуют во взаимодействии Crp и РНК-полимеразы; двойное подчеркивание, АК остатки, которые образуют мотив спираль-поворот-спираль, вовлеченный в связывание ДНК; ♦♦, АК остатки из мотива НТН, которые осуществляют непосредственный контакт с нуклеотидами в сайтах связывания белка Crp. Обозначения — названия штаммов и гены: Pchlororaphis — *P. chlororaphis* 449, Vfr; Paeruginosa — *P. aeruginosa* PAO1, Vfr; Ecoli — *E. coli*, Crp

Таблица 5

Комплементация мутации в гене *crp* в клетках *E. coli* клонированным геном *vfr*

Штамм	β-галактозидазная активность, ед.Миллера
AM306 (<i>crp</i> ⁻)	22,8
AM306 / pHA5 (<i>crp</i> ⁺)	2094,0
AM306 / pEXV449 (<i>vfr</i> ⁺)	221,5

Примечание. Ночные культуры бактерий разводили в 100 раз в LB с добавлением 1 мМ ИПТГ и соответствующих антибиотиков. Инкубировали 12 часов при 37°C

Методом замены генов был получен инсерционный мутант с инактивированным геном *vfr*. Было проведено исследование влияния мутации в этом гене на синтез АГЛ и исследуемые ферментативные активности (таблица 4). В настоящее время нам не удалось установить функциональную роль белка Vfr в *P. chlororaphis* 449, мутация в этом гене не влияла на изученные свойства клеток. Таким образом, мы показали, что имеются отличия в регуляции этих процессов у *P. chlororaphis* 449 и *P. aeruginosa*.

6. Определение синтеза АГЛ и продукции потенциальных факторов патогенности в коллекции штаммов *B. ceracia*

При исследовании клинических штаммов *B. ceracia* нас интересовали QS системы этих бактерий, АГЛ, участвующие в их функционировании, регуляция работы QS системы и ее роль в синтезе факторов патогенности. Была определена продукция АГЛ в 33 клинических штаммах *B. ceracia*, выделенных от больных в ряде стационаров г. Москвы. Все штаммы были идентифицированы в Государственном научном центре по антибиотикам и ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН. Работа проводилась совместно с сотрудниками ГУ НИИ ЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН.

Способность бактерий продуцировать АГЛ определялась с использованием двух сенсорных штаммов *C. violaceum* CVO26 и *A. tumefaciens* NT1/pZLR4. Результаты определения показали, что большинство исследованных штаммов — 31 из 33 (94%) синтезировали АГЛ (таблица 6). С помощью метода ПЦР у исследуемых штаммов *B. ceracia* были идентифицированы гены *SerI-SerR* QS системы. Во всех штаммах был обнаружен ген *serR*, у большинства штаммов (67%) был определен ген *serI* (таблица 6).

Все исследованные штаммы обладали экзопроteaseзной активностью, 39% штаммов проявляли гемолитическую активность и 97% штаммов — липазную активность (таблица 6). У двух штаммов (6%) была определена хитинолитическая активность. Бактерии *B. ceracia* характеризуются полигостальностью, т.е. способностью существовать в различных условиях обитания и различных хозяевах. Разнообразие условий обитания этой бактерии предполагает наличие большого количества генов, обеспечивающих их существование в различных экологических

Таблица 6

Определение продукции АГЛ, некоторых ферментативных активностей, генов *sepI* и *sepR* среди клинических штаммов *B. cerasia*

Штамм <i>B. cerasia</i>	Наличие генов (ПЦР)		Синтез АГЛ/ биосенсор		Экзопротеазная активность (радиус зоны гидролиза, мм)/сутки		Хитинолити- ческая активность (радиус зоны гидролиза, мм)	Гемолитичес- кая активность (радиус зоны гемолиза, мм)	Липазная активность (радиус зоны гидролиза, мм)
	<i>sepI</i>	<i>sepR</i>	CV026*	NT1/pZLR**	1	4			
Б-288	+-	+	++	5 Сл	4	11	—	+	+
Б-511	—	+	+	8	5	10	—	+	—
Б-515	+	+	Сл	3 Сл	4	10	—	+	+
Б-0467	+	+	Сл	Сл	5	18	—	Сл	+
Б-0462	+	+	+	—	6	12	—	Сл	+
Б-349	+-	+	+	3	4	10	—	+	+
Б-433	+	+	+	8	5	12	—	+	+
Б-158	+-	+	+	8 Сл	6	12	—	+	+
303	+-	+	Сл	10	7	13	—	+	+
321	+-	+	Сл	10	5	10	—	—	+
382	—	+	Сл	10 Сл	5	10	—	—	+
320	—	+	—	7 Сл	2	11	—	—	+
323	+-	+	Сл	7 Сл	7	13	—	—	+
203	+-	+	+	7 Сл	6	10	—	—	+
270	+	+	++	6	3	9	+	+	+
226	+-	+	Сл	8	5	12	—	—	+
428	+-	+	+	11	5	10	—	—	+
225	+	+	Сл	—	4	10	—	—	+
282	+	+	Сл	11	3	11	—	+	+
420	—	+	-	—	3	9	—	—	+
421	+	+	Сл	—	5	12	—	—	+
423	+	+	—	Сл	6	10	—	—	+
426	+-	+	+	5 Сл	6	10	—	—	+
427	—	+	—	—	—	2	—	+	+
275	—	+	+	8	5	11	—	—	+
227	—	+	Сл	8	5	10	—	—	+
370	+	+	++	10	4	9	+	+	+
299	—	+	+	Сл	5	11	—	—	+
375	—	+	Сл	Сл	6	11	—	—	+
399	+-	+	+	—	5	10	—	—	+
425	—	+	+	5 Сл	7	11	—	—	+
281	+	+	Сл	—	6	10	—	—	+
422	—	+	Сл	10 Сл	5	10	—	—	+

Примечание. * Интенсивность синтеза виолацеина штаммом CV026 оценивали визуально.

** Радиус (мм) голубых зон гидролиза X-Gal вокруг колоний исследуемых штаммов

Сл — слабое окрашивание

нишах. В случае исследуемого нами штамма *B. seracia* синтез гемолизина, экзопроteaseзная и липазная активности относятся к потенциальным факторам патогенности, важным для обитания бактерий в организме хозяина, а синтез хитиназ может быть орудием конкурентных отношений *B. seracia* в почве и ризосфере растений.

7. Изучение QS системы и ее регуляции у *B. seracia* 370

7.1. Клонирование генов *sepI* и *sepR* из *B. seracia* 370 и идентификация АГЛ

B. seracia 370

В качестве модели для дальнейшего изучения QS системы, генетического контроля ее функционирования и роли в регуляции клеточных процессов среди исследуемых бактерий был выбран продуцент АГЛ штамм *B. seracia* 370, обладающий экзопроteaseзной, гемолитической, хитинолитической и липазной активностью и чувствительный к канамицину.

Ген АГЛ-синтазы *sepI* из *B. seracia* 370 449 был клонирован и секвенирован. Нуклеотидная последовательность клонированного гена оказалась в разной степени идентична последовательности гена *sepI* из различных штаммов *B. seracia* (88-95%), *B. vietnamiensis* (88-92%), *B. multivorans* (80-91%). Мы определили, что аминокислотная последовательность АГЛ-синтазы SepI из *B. seracia* 370 имеет значительную гомологию с другими АГЛ-синтазами, 31, 31, 38, 41, 65, 74, 87 и 96 % идентичности с белками PhzI *P. fluorescens* 2-79, PhzI *P. aureofaciens* 30-84, RhII *P. aeruginosa* PAO1, CsaI *P. aureofaciens* 30-84, SolI *Ralstonia solanacearum* UW551, SepI *B. multivorans* LMG16660, SepI *B. vietnamiensis* R-92 и SepI *B. seracia* (AF019654), соответственно.

Ген регуляторного белка *sepR* был клонирован, была определена нуклеотидная последовательность части клонированного гена, которая оказалась в разной степени идентична последовательности гена *sepR* из различных штаммов *B. seracia* (89-96%), *B. vietnamiensis* (90-93%), *B. multivorans* (90-93%). Аминокислотная последовательность регуляторного белка SepR из *B. seracia* 370 имеет значительную гомологию с другими регуляторными белками QS систем: 27, 27, 30, 30, 63, 94, 94 и 97 % идентичности с белками PhzR *P. fluorescens* 2-79, PhzR *P. aureofaciens* 30-84, RhIR *P. aeruginosa* PAO1, CsaR *P. aureofaciens* 30-84, SolR *Ralstonia solanacearum*

UW551, CepR *B. multivorans* LMG16660, CepR *B. vietnamiensis* R-92 и CepR *B. ceracia* (AF019654), соответственно.

С помощью тонкослойной хроматографии было проведено определение АГЛ у *B. ceracia* 370. Локализацию АГЛ на ТСХ пластинке проводили визуально с использованием двух биосенсоров, *C. violaceum* CV026 и *A. tumefaciens* NT1/pZLR4. По результатам ТСХ, штамм 370 синтезировал четыре вида АГЛ (рис. 4), это N-гексаноил-гомосеринлактон (С6-АГЛ), N-октаноил-гомосеринлактон (С8-АГЛ) и два минорных компонента, не установленные в настоящее время.

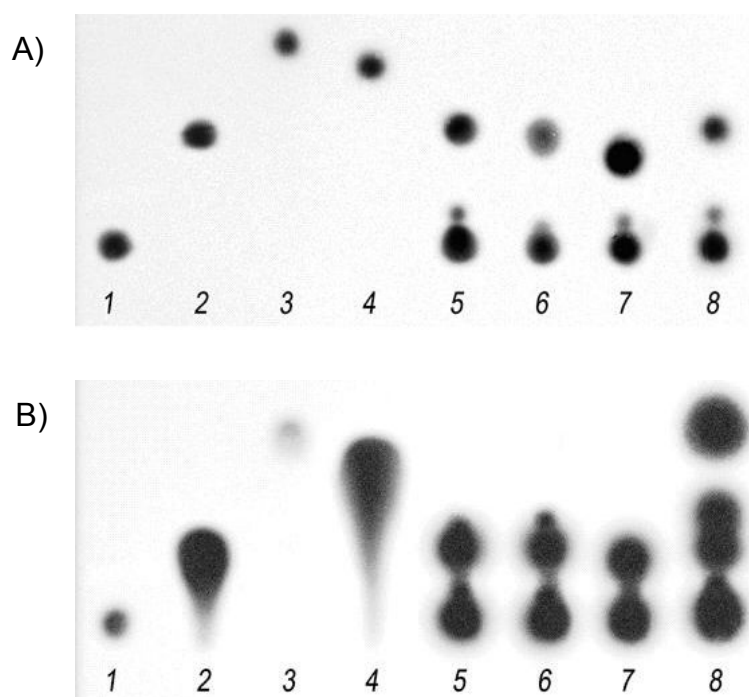


Рис.4. Идентификация АГЛ в культуральных экстрактах *B. ceracia* 370 и мутантных штаммов

1 — С₈-АГЛ; 2 — С₆-АГЛ; 3 — С₄-АГЛ; 4 — 3ОС₆-АГЛ; 5 — экстракт АГЛ из *B. ceracia* 370; 6 — экстракт АГЛ из *B. ceracia* 370-B2 (*pps*⁻); 7 — экстракт АГЛ из *B. ceracia* 370-B6 (*clpX*⁻); 8 — экстракт АГЛ из *B. ceracia* 370-B10(*lon*⁻)

А) В качестве репортера использован штамм *C. violaceum* CVO26

В) В качестве репортера использован штамм *A. tumefaciens* NT1/pZLR4

Экстракт АГЛ из *B. ceracia* 370-B10(*lon*⁻) был в 8 раз более концентрированным, чем в случае остальных вариантов

7.2. Изучение регуляции функционирования QS системы *B. ceracia* 370

Бактерии *B. ceracia* продуцируют АГЛ в очень низких концентрациях. С помощью пласпозонного мутагенеза (Dennis et al., 1998) нами были получены мутации, приводящие к увеличению синтеза АГЛ в штамме 370, а также мутация, приводящая к отсутствию синтеза АГЛ; синтез АГЛ определяли, используя сенсорный штамм *C. violaceum* CVO26 (рис. 5).

Для локализации мутаций мы провели клонирование участка хромосомной ДНК мутантных штаммов из района инсерции плазмиды. Было определено, что мутации локализованы в генах *pps*, *clpX* и *lon*. Мутации в этих генах были получены впервые у *B. ceracia*.

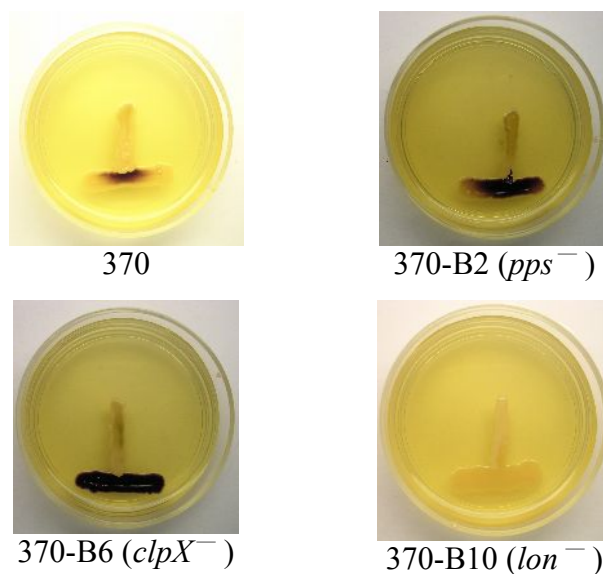


Рис. 5. Определение продукции АГЛ в штамме *B. ceracia* 370 и мутантных штаммах с использованием в качестве репортера штамма *C. violaceum* CVO26
Вертикальный штрих на всех фотографиях — исследуемый штамм, горизонтальный штрих — штамм CVO26

Мутация в гене *pps* (кодирует фосфоенолпируват синтазу) привела к усилению синтеза АГЛ, что говорит о связи, вероятно, косвенной, фосфоенолпируват синтазы и QS системы регуляции. Никаких данных о подобной связи у *B. ceracia* и у других грамотрицательных бактерий нами обнаружено не было. За исключением усиления синтеза АГЛ, мы не выявили свойств штамма 370, на которые мутация в гене *pps* оказывала бы заметное влияние (таблица 7). Механизм действия данной мутации не ясен. Можно сделать предположение о ее влиянии на биосинтез АГЛ или каких-то промежуточных продуктов в пути биосинтеза АГЛ.

Мутация в гене *clpX* (кодирует ClpX — АТФазную субъединицу ClpXP протеиназы) привела к усилению синтеза АГЛ, при этом синтез одного из минорных АГЛ отсутствовал (рис. 4). Мы не выявили значительного изменения исследуемых ферментативных активностей в мутантном штамме по гену *clpX* (таблица 7). В настоящее время не существует информации о влиянии мутации в гене *clpX* на изучаемые нами свойства штаммов *B. ceracia*.

Мутация в гене *lon* (кодирует Lon протеиназу) привела к резкому снижению синтеза АГЛ и к появлению в клетках минорного АГЛ (рис. 4). В мутантных штаммах, по сравнению с исходным штаммом 370, наблюдалось почти полное отсутствие экзопротеазной, гемолитической и хитинолитической активностей. Инактивация гена *lon* не привела к изменению липазной активности. (таблица 7). Объединив данные об изменении синтеза АГЛ с определенными свойствами мутантных штаммов, можно сделать предположение о позитивной роли QS системы и/или Lon-протеиназы в регуляции синтеза указанных ферментов *B. ceracia* 370.

Таблица 7

Характеристика *B. ceracia* 370 и мутантных штаммов с измененным синтезом АГЛ

Штаммы <i>B. ceracia</i>	Синтез АГЛ/ сенсор		Экзопротеазная активность (радиус зоны гидролиза, мм)	Липазная активность (радиус зоны гидролиза, мм)	Гемолитическая активность (радиус зоны гемолиза, мм)	Хитинолитическая активность (радиус зоны гидролиза, мм)
	CVO26*	NT1/pZLR**				
370, дикий тип	++	11	3	7	3	3
370-B2 (<i>pps</i> ⁻)	+++	10	3	7	3,5	2,5
370-B6 (<i>clpX</i> ⁻)	+++++	17	3	4	3	3
370-B11 (<i>lon</i> ⁻)	—	5сл	0,5	7	1	0

Примечание. * Интенсивность синтеза виолацеина штаммом CV026 оценивали визуально

** Радиус (мм) голубых зон гидролиза X-Gal вокруг колоний исследуемых штаммов

Сл — слабый

Протеиназы Lon и ClpXP являются глобальными регуляторами экспрессии генов, они осуществляют регуляторную функцию, деградируя целый ряд короткоживущих регуляторных белков. Механизм их воздействия на синтез АГЛ может быть связан с деградацией репрессоров или активаторов, принимающих участие в регуляции синтеза АГЛ. Эффект воздействия на регуляторные белки данных протеиназ известен для *E. coli*, мало изучен в случае *Pseudomonas* и не изучен у бактерий комплекса *B. ceracia*. Полученные нами мутации в генах *lon* и *clpX* открывают возможность изучения функций этих протеиназ в регуляции клеточных процессов у бактерий рода *Burkholderia*.

ВЫВОДЫ

1. Изучено распространение способности продуцировать АГЛ у 228 штаммов почвенных и ризосферных псевдомонад; продукцию АГЛ наблюдали у 17% исследованных штаммов. Частота встречаемости продукции АГЛ варьировала у разных видов *Pseudomonas*.
2. У всех исследованных штаммов *Pseudomonas chlororaphis*, выделенных в различных географических областях и продуцирующих АГЛ, идентифицированы гены двух Quorum Sensing (QS) систем *phzI*, *phzR*, *csaI*, *csaR*.
3. Клонированы и секвенированы гены синтаз АГЛ *P. chlororaphis* 449 *phzI* и *csaI*. Показано, что клетки штамма 449 продуцируют 4 типа АГЛ: N-бутаноил-L-гомосеринлактон, N-гексаноил-L-гомосеринлактон, N-(3-оксогексаноил)-L-гомосерин лактон, а также минорный тип АГЛ. Предполагается присутствие в клетках *P. chlororaphis* 449 третьей QS системы.
4. Показано, что GacA-GacS глобальная система регуляции положительно регулирует синтез всех типов АГЛ, феназиновых антибиотиков, экзопротеаз, полигалактуроназы, пектинметилэстеразы, антагонистическую активность в отношении фитопатогенных грибов и практически не влияет на липазную и фосфатазные активности.
5. Клонирован, секвенирован и экспрессирован ген *vfr* *P. chlororaphis* 449, определена его локализация в хромосоме. Белок Vfr *P. chlororaphis* 449 гомологичен белку Vfr *P. aeruginosa* (глобальному регулятору экспрессии генов), белку CRP *E. coli*; клонированный ген *vfr* частично комплементирует мутацию в гене *crp* *E. coli*. Показано, что белок Vfr в клетках *P. chlororaphis* 449 не участвует в регуляции синтеза АГЛ, феназинов, экзопротеаз, антагонистической активности бактерии.
6. Определено, что большинство исследованных клинических штаммов *Burkholderia cenocepacia* продуцировали АГЛ, содержали гены CsrI-CsrR QS системы, синтезировали потенциальные факторы вирулентности — экзопротеазы и липазы, 39% штаммов продуцировали гемолизины.
7. Показано участие глобальных регуляторов протеиназ ClpXP и Lon в регуляции продукции АГЛ у *B. cenocepacia*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Хмель И.А., Веселова М.А., Метлицкая А.З., Клейн Ш., Липасова В.А., Маяцкая А.В., Чернин Л.С. Синтез сигнальных N-ацил-гомосерин-лактонов, участвующих в межклеточном обмене информацией, у ризосферных и почвенных бактерий *Pseudomonas* и *Xanthomonas*. Генетика. т.38, 2002, с.568-570
2. Veselova M., Kholmeckaya M., Klein S., Voronina E., Lipasova V., Metlitskaya A., Mayatskaya A., Lobanok E., Khmel I., Chernin L. Production of N-acylhomoserine lactone signal molecules by Gram-negative soil-borne and plant-associated bacteria. *Folia Microbiol.* v.48, 2003, p.794-798
3. Шагинян И.А., Хмель И.А., Романова Ю.М., Веселова М.А., Чернуха М.Ю., Чернин Л.С., Сидоренко С.В., Липасова В.А., Ковтун В.П., Алексеева Г.В., Алексеева Н.В., Степанова Т.В., Гинцбург А.Л. Клинические штаммы комплекса *Burkholderia cepacia*: характеристика и выявление компонентов регуляторной системы Quorum Sensing. Молек. генетика, микробиол. и вирусол. № 4, 2003, с.15-20
4. Chernin L., Khmel I., Klein S., Veselova M., Mayatskaya A., Metlitskaya A., Kholmeckaya M., Bass I., Lobanok L., Ovadis M., Lipasova V., Liu Xiaoguang, Chet I. Intracellular signaling in the environment and biocontrol activity of plant-associated bacteria producing N-acyl homoserine lactone molecules. *Scientific Israel–Technological Advantages.* v.6, N 1-2 «Environmental Engineering&Energy Engineering», 2004, p.19-30
5. Klein S., Veselova M., Mayatskaya A., Khmel I., Chet I., Chernin L. Biocontrol activity of phenazine-producing rhizobacterium *Pseudomonas chlororaphis* 449. In: R. Sikora, S. Gowen, R. Hauschild a. Kiewnick, Multitrophic integrations in Soil, *Bulletin of the International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants*, v.27, 2004, p.145-150
6. Веселова М.А., Липасова В.А., Астаурова О.Б., Атамова Э.Э., Проценко М.А., Буза Н.Л., Метлицкая А.З., Данилова Н.Н., Чернин Л.С., Хмель И.А. Quorum Sensing регуляция у почвенных псевдомонад. *Микробиология.* № 4, 2006, с.465-468
7. Веселова М.А. Хмель И.А. 2001. Исследование антагонизма *Pseudomonas* и фитопатогенных микроорганизмов и его регуляции. Конференция «От фундаментальной науки к новым технологиям». Москва-Тверь. Тезисы докладов молодых ученых, с.125-126
8. Лобанок Е.В., Хмель И.А., Холмецкая М.О., Воронина Е.В., Веселова М.А., Липасова В.А., Метлицкая А.З., Чернин Л.С. 2001. Определение продукции N-ацил-гомосерин лактоновых Quorum-sensing сигнальных молекул некоторыми грамотрицательными непатогенными и ризосферными бактериями. Международный симпозиум «Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология». Москва-Минск. Тезисы докладов, с.103-104

9. Веселова М.А., Маяцкая А.В. 2002. Аутоиндукторы Quorum-sensing системы грамотрицательных почвенных бактерий. 14 зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва. Тезисы докладов и стендовых сообщений, с.16
10. Веселова М.А., Маяцкая А.В. 2002. Аутоиндукторы Quorum-sensing системы бактерий рода *Pseudomonas*. 6-я Пущинская школа конференция молодых ученых: Пущино. Сборник тезисов, т.1. с.225-226
11. Klein S., Veselova M., Lipasova V., Metlitskaya A., Mayatskaya A., Khmel I., Chernin L. 2003. Biocontrol activity of phenazine producing rhizobacterium *Pseudomonas aureofaciens* 449. The Annual Meeting of the Israeli Society for Microbiology, Tel-Aviv University, February 3-4. p.77
12. Chernin L., Kholmeckaya M., Veselova M., Klein S., Voronina E., Lipasova V., Metlitskaya A., Lobanok E., Khmel I. 2003. Production of N-acyl homoserine lactone signal molecules in Gram-negative soil-borne and plant -associated bacteria. The Annual Meeting of the Israeli Society for Microbiology, Tel-Aviv University, February 3-4. p.77
13. Веселова М.А., Маяцкая А.В., Метлицкая А.З., Хмель И. А. 2003. Антагонистическая активность *Pseudomonas aureofaciens* в отношении фитопатогенных микроорганизмов и ее генетический контроль. Актуальные проблемы генетики. Материалы 2-й научной конференции МОГиС, посвященной 115-летию со дня рождения академика Н.И.Вавилова. Москва. Сборник тезисов, т.2, с.65-66
14. Веселова М.А., Маяцкая А.В. 2003. Quorum-sensing регуляция экспрессии генов у грамотрицательных почвенных бактерий. Биология--наука XXI века: 7-ая Пущинская школа конференция молодых ученых. Пущино. Сборник тезисов, с.316
15. Чернуха М.Ю., Шагинян И.А., Романова Ю.М., Хмель И.А., Веселова М.А., Алексеева Г.В., Гинцбург А.Л. 2003. Факторы патогенности и компоненты регуляторной системы Quorum-sensing у клинических штаммов комплекса *Burkholderia cepacia*. Международный конгресс Ликвидация и Элиминация Инфекционных Болезней — Прогресс и Проблемы. Сборник тезисов, с.181
16. Веселова М.А., Басс И.А., Зайцев Д.С., Маяцкая А.В., Метлицкая А.З., Чернин Л.С., Хмель И.А. 2004. Quorum-sensing система регуляция экспрессии генов у грамотрицательных почвенных бактерий. III ВОГиС. Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития. Москва. Сборник тезисов, т.1, с.353
17. Буза Н.Л., Криницына А.А., Веселова М.А., Хмель И.А., Проценко М.А. 2005. Действие белкового ингибитора полигалактуроназы растений на полигалактуроназу из ризосферных бактерий рода *Pseudomonas*. Материалы Всероссийской конференции «Молекулярные механизмы взаимодействия микроорганизмов и растений: фундаментальные и прикладные аспекты». Саратов. Сборник тезисов, с.26-27

