

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Московский физико-технический институт
(государственный университет)»

На правах рукописи

Коноплева Мария Николаевна

Механизмы регуляции «quorum sensing» системы
первого типа психрофильных люминесцирующих бактерий
Aliivibrio logei

Специальность 03.02.07 - Генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
И.В. Манухов

Москва, 2016

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)» (МФТИ) и в лаборатории генетики бактерий ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ФГБУ «ГосНИИгенетика»)

Научный руководитель:

доктор биологических наук
МФТИ

Манухов Илья Владимирович

лаборатория молекулярной генетики
заведующий лабораторией;
ФГБУ «ГосНИИгенетика»
лаборатория генетики бактерий
ведущий научный сотрудник

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН
лаборатория молекулярной генетики
заведующий лабораторией

Хмель Инесса Александровна

кандидат биологических наук

Берцова Юлия Васильевна

МГУ им. М. В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского
отдел молекулярной энергетики микроорганизмов
старший научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН)

Защита состоится «__» _____ 2016 г. на заседании Диссертационного совета Д217.013.01 при ФГБУ «ГосНИИгенетика» по адресу: 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ГосНИИгенетика» и на сайте www.genetika.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук, доцент

Воюшина Татьяна Львовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Понятие «quorum sensing» (QS), означающее скоординированное изменение экспрессии генов в ответ на рост численности клеточной популяции, было предложено в 1994 году (Fuqua W.C. et al., 1994). Однако сам феномен был описан ранее при исследовании *lux*-оперона у морских бактерий *Aliivibrio fischeri* (ранее *Vibrio fischeri*) (Nealson et al., 1970; Eberhard A., 1972 Nealson and Hastings, 1979). QS система, регулирующая экспрессию генов *lux*-оперона *A. fischeri*, к настоящему времени изученная наиболее подробно, определяет интенсивность свечения делящихся клеток в зависимости от численности популяции: при низкой плотности клеток свечение отсутствует, при достижении популяцией пороговой плотности уровень люминесценции резко возрастает.

Изучение механизмов регуляции QS систем в настоящее время вызывает большой интерес в области сельскохозяйственных и медицинских направлений исследований, т. к. вирулентные гены патогенов, устойчивость к медицинским препаратам не редко регулируются QS системой (Le & Otto 2015; Chan et al., 2015; Hansen H et al., 2015; Natrah et al., 2012). В настоящее время остаются открытыми многие вопросы, связанные с эволюционным происхождением генов, ответственных за биoluminesценцию бактерий, а также с механизмами стабилизирующего отбора *lux*-оперонов бактерий. Продолжаются поиски новых регуляторных QS систем среди микроорганизмов.

Белок LuxR является ключевым регуляторным элементом QS системы *lux*-оперона. В этой связи представляется актуальным изучение модуляторов активности LuxR в зависимости от различных стрессовых факторов.

В QS системах психрофильных люминесцирующих бактерий присутствуют две копии регуляторных генов *luxR*. Такой дизайн QS систем характерен для представителя нормальной микрофлоры кишечника рыб - бактерии вида *Aliivibrio logei* и близкородственного ему вида *Aliivibrio*

salmonicida, который является патогенным и вызывает холодовой вибриозис у атлантического лосося. Остаётся до конца не понятно – является ли наличие двух копий регуляторных генов *luxR* необходимостью или это случайная дупликация? До представленной диссертационной работы не была известна роль каждого из ключевых регуляторов.

В настоящее время гены люциферазы *lux*-оперонов широко применяются в качестве генов-репортеров в генно-инженерных и селекционных работах, при тестировании вновь разработанных медицинских лекарственных препаратов, и при экологическом контроле токсических веществ (Chatterjee and Meighen, 1995; Stewart G.S., 1997). Для этих целей конструируют цельноклеточные биосенсоры, в которых гены бактериальных люцифераз транскрипционно слиты с индуцируемыми стрессовыми промоторами. В этой связи представляется актуальной разработка *lux*-биосенсоров для экологического мониторинга загрязнения окружающей среды генотоксичными производными несимметричного диметил гидразина (НДМГ).

Цели и задачи исследования. Изучить механизмы регуляции QS систем первого типа, с двумя LuxR1 и LuxR2 регуляторами экспрессии *lux*-оперона у психрофильных люминесцирующих бактерий и определить влияние QS регулируемой биолюминесценции на фотореактивацию.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Провести поиск, сбор и молекулярно-филогенетический анализ бактерий, обитающих в Белом, Охотском, Беринговом, Балтийском морях, люминесценция у которых регулируется QS системой первого типа.
2. Выявить особенности в регуляции QS системы первого типа.
3. Оценить способность люминесцирующих бактерий индуцировать фотолиазу за счёт свечения и возможную роль QS системы в фотозащите от УФ-повреждений ДНК.

4. Прикладная задача - разработать набор *lux*-биосенсоров для определения генотоксичных продуктов неполного окисления несимметричного диметил гидразина.

Научная новизна. В ходе исследовательской работы впервые установлен широкий ареал морских психрофильных бактерий вида *A. logei*, обладающих QS системой с двумя регуляторными генами *luxR1* и *luxR2*, по четырем студёным морям России: Охотское, Берингово, Балтийское, Белое.

Впервые показано сезонное изменение видового состава кишечной микрофлоры рыб в акваториях Охотского и Берингова морей. Летом бактерии *Photobacterium sp.* с конститутивной биолюминесценцией замещают бактерии *A. logei* с QS регулируемой биолюминесценцией, преобладающие зимой.

Впервые отмечено, что бактерии *A. logei* и *A. salmonicida* могут принадлежать одному виду; возможно, *A. salmonicida* является патогенным вариантом *A. logei*.

Для анализа термочувствительности регуляторных белков LuxR1 и LuxR2 из психрофильных микроорганизмов и белка LuxR из мезофильных бактерий впервые используются термостабильные люциферазы в качестве репортерных (*luxCDABE* гены из *Photobacterium luminescens*). Впервые определена роль каждого из *luxR1* и *luxR2* генов в QS регуляции *lux*-оперона *A. logei*, показана модуляция ими активности друг друга. Определена роль АТФ – зависимых шаперонов и протеаз в активации *lux*-оперона QS системой с двумя генами *luxR1* и *luxR2*.

На модели клеток *Escherichia coli*, мутантных по эксцизионной репарации, показано, что биолюминесценция приводит к индукции бактериальной фотолиазы, но QS регулируемые *lux*-опероны из психрофильных бактерий *A. logei* и мезофильных *A. fischeri* способны обеспечить фотозащиту от УФ-повреждений ДНК только при высокой концентрации аутоиндуктора (АИ).

Разработан новый набор *lux*-биосенсоров для контроля над содержанием генотоксичных, в том числе алкилирующих, продуктов неполного окисления НДМГ в окружающей среде.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая ценность результатов диссертационной работы заключается в понимании механизмов регуляции QS систем психрофильных бактерий. Важными являются фундаментальные результаты о необходимости второго регуляторного гена *luxR1* для ответа QS системы на наличие АИ в среде в случае, если клетки находятся в стрессовых условиях при недостатке шаперонов и/или избытке протеаз.

Полученные в диссертационной работе данные о преимущественном распространении люминесцирующих микроорганизмов с QS системой регуляции люминесценции в зимний период имеют большое значение для разработки профилактических и коррекционных программ для снижения риска эпизоотий и повышения продуктивности аквакультурных хозяйств на основе применения в зимний и летний периоды пробиотической QS активной микрофлоры.

Предлагаемый в диссертационной работе набор биосенсоров может быть рекомендован службам обеспечения безопасности пусков Федерального космического агентства Роскосмос для быстрой детекции в полевых условиях уровня загрязнения окружающей среды генотоксичными компонентами ракетного топлива.

Положения, выносимые на защиту. Психрофильные бактерии вида *A. logei*, обладающие QS системой с двумя регуляторными генами *luxR1* и *luxR2*, широко распространены в акваториях студеной морей России (Белое, Охотское, Берингово, Балтийское моря), зимой доминируют над психрофильными бактериями *Photobacterium sp*, преобладающими летом. Бактерии *A. logei* и *A. salmonicida* могут принадлежать одному виду.

Белки LuxR1 и LuxR2 из психрофильных бактерий *A. logei* между собой обладают одинаковой термостабильностью, уровень которой ниже, чем у белка LuxR из мезофильных бактерий *A. fischeri*.

Интенсивность транскрипции, измеренная в клетках *E. coli* с промотора Pr1 на порядок слабее, чем с Pr2, как в присутствии одного из генов, так и в комбинации *luxR1* и *luxR2*. При этом LuxR2 способствует активации промотора Pr1 белком LuxR1, в то время как белок LuxR1 снижает активацию промотора Pr2 белком LuxR2 при низких концентрациях АИ.

При высоких концентрациях АИ LuxR1 стабилизирует LuxR2 в клетках мутантных по шаперонину GroEL/ES и в клетках с активной Lon-протеазой.

Биолюминесценция активирует бактериальную фототиазу, однако *lux*-опероны психрофилов *A. logei* и мезофилов *A. fischeri* способны обеспечить фотозащиту от УФ-повреждений ДНК только при высоких концентрациях АИ.

Разработанный набор *lux*-биосенсоров предложен для контроля над содержанием генотоксичных, в том числе алкилирующих, продуктов неполного окисления НДМГ в окружающей среде.

Апробация диссертации состоялась 29 апреля 2016 г. на заседании кафедры биофизики МФТИ и 12 мая 2016 г. на заседании секции «Генетика микроорганизмов» ученого совета ФГБУ «ГосНИИгенетика».

Публикации. По теме диссертации опубликованы в соавторстве четыре статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК, а также материалы двух конференций. Получен один патент РФ.

Структура работы. Диссертация изложена на 116 страницах машинописного текста, включает 34 рисунка и 9 таблиц. Работа состоит из Введения, Обзора литературы, Экспериментальной части, включающей описание Материалов и Методов, изложения и обсуждения результатов, Заключение, Выводов и Списка цитируемой литературы (152 источника).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Филогенетический анализ изолированных бактерий. В ходе работы показано, что с сезонными колебаниями температур морских поверхностных вод происходит видовое замещение бактерий, заселяющих кишечник рыб: бактерии *Photobacterium sp.* в летний период замещают бактерии *A. logei*, преобладающие в зимний сезон низких температур, при этом оба вида относятся к психрофилам (Рис. 1).

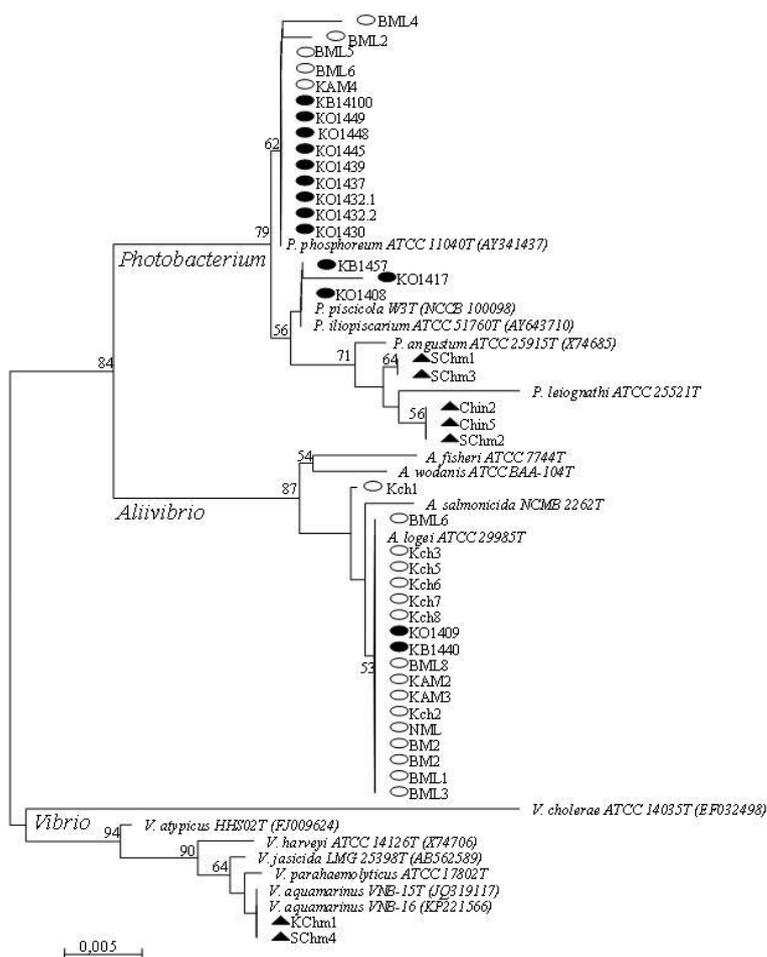


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное методом ближайших соседей нуклеотидной последовательности гена *16S pPHK* ряда биолуминесцирующих изолятов и референсных штаммов. Изоляты, выделенные в акваториях студеной морской воды: зимой 2010 г. – ○, летом 2014 г. – ●. Контрольные изоляты, выделенные в акваториях теплой морской воды в летний период 2014 г. – ▲

Следует отметить, что для психрофильных бактерий *A. logei* характерна регуляция экспрессии генов системой QS первого типа с двумя генами *luxR*. В бактериях *Photobacterium sp.* такая система отсутствует. Наши данные позволяют предположить, что преимущественное преобладание микроорганизмов вида *A. logei* над *Photobacterium sp.* в условиях низких зимних температур обусловлено именно наличием QS системы. Данная гипотеза подтверждается работой (Ruby E.G., McFall-Ngai M.J., 1999), где показано, что наличие *lux*-оперона вносит свой вклад при успешном заселении люминесцирующими бактериями животных-хозяев. Бактерии *A. logei* представляют собой симбионтов для ряда животных-хозяев, а *Photobacterium sp.* являются свободноживущими. Исходя из полученных данных, можно предположить, что благодаря QS регуляции бактерии *A. logei* имеют преимущество зимой, сохраняя ресурсы для люминесценции только в условиях высокой плотности популяции. По-видимому, бактерии *A. logei* привлекают внимание рыб биолюминесценцией, к которой способны находясь в составе сгустков, и вторично попадают в кишечник. В летний период высокое содержание органики в морской воде и более высокие температуры сводят на нет данное преимущество. Яркие светящиеся представители рода *Photobacterium* получают возможность постоянно интенсивно светиться (более интенсивная люминесценция определяется наличием *luxF* гена (Bergner T. et al., 2015)) и за счёт более эффективной защиты клеток морских бактерий от окислительного стресса, индуцируемого активными формами кислорода (АФК) (Lyzeń R and Wegrzyn G., 2005; Szpilewska H. et al., 2003), и фотореактивации димеров тимина (Kozakiewicz J. et al, 2005; настоящая работа, гл. 3.7.1.) становятся основной люминесцирующей микрофлорой морских поверхностных вод, и случайным образом заселяют кишечник рыб.

В ходе диссертационного исследования показано, что психрофильные светящиеся бактерии в составе кишечной микрофлоры рыб, обитающих в

акваториях студёных морей, являются часто встречающимися, порой доминирующими и могут составлять главную популяцию кишечной микрофлоры (до 70%). Этот факт наблюдается во всех обследованных студёных морях Белом, Балтийском, Беринговом и Охотском.

Проведён филогенетический анализ ряда изолированных штаммов на основе нуклеотидных последовательностей генов *luxR1* и *luxR2* из *A. logei* и *A. salmonicida* и *luxR* из *A. fischeri* (Рис.2). Филогенетические деревья в данной работе были построены методом ближайших соседей (Neighbor-Joining, NJ) в программе «Мега 5.2», 1000 репликаций (Saitou N. et al., 1987; Tamura K. et al., 2007). Оказалось, что последовательности генов *luxR1* и *luxR2* разных штаммов *A. logei* и *A. salmonicida* формируют два обособленных кластера, не разделяющихся по видам, и это говорит в пользу гипотезы о разной функции этих генов.

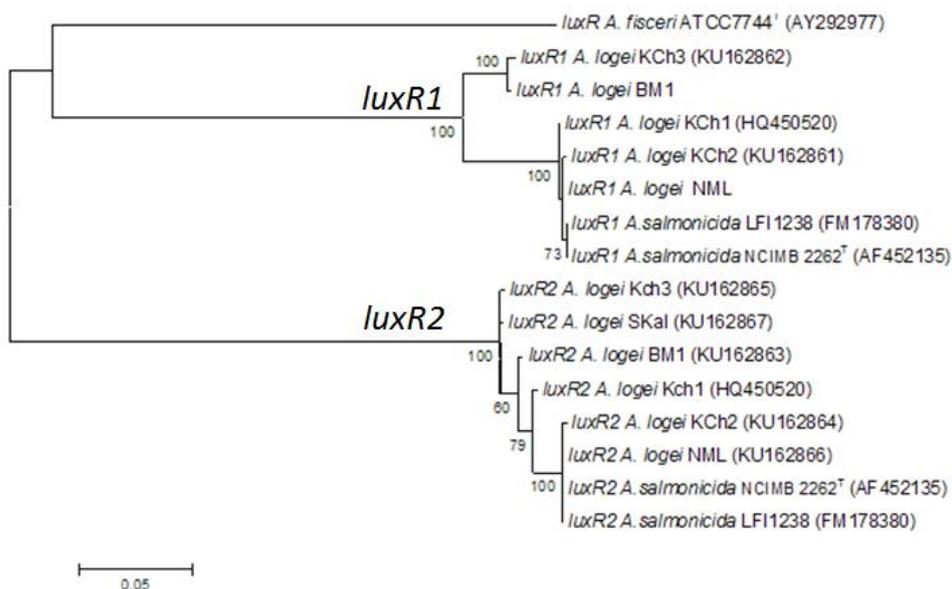


Рис. 2 Филогенетический анализ исследуемых штаммов на основе нуклеотидных последовательностей генов *luxR1* и *luxR2* из *A. logei*, BM1, KCh1-3, NML, SKal, из *A. salmonicida* NCIMB 2261T, LFI238 и *A. fischeri* ATCC7744T

Показана вариабельность некодирующей области между консервативными генами *luxR1* и *luxC*, содержащейся в структуре *lux*-оперона *A. logei*. Отметим, что в последовательности этой некодирующей регуляторной области содержится *lux*-бокс и промотор Pr1 *lux*-оперона, за

начальным кодоном ATG белка LuxI встречается стоп-кодон TAA, который блокирует трансляцию с промотора Pr1 полипептида LuxI в клетках этих штаммов. По-видимому, вариабельность этого участка связана со сравнительно недавней утратой способности к экспрессии гена *luxI* в данном месте *lux*-оперона у видов *A. logei* и *A. salmonicida*. В настоящее время мы являемся свидетелями постепенной потери данного некодирующего фрагмента *lux*-оперона в процессе эволюции (Рис.3).

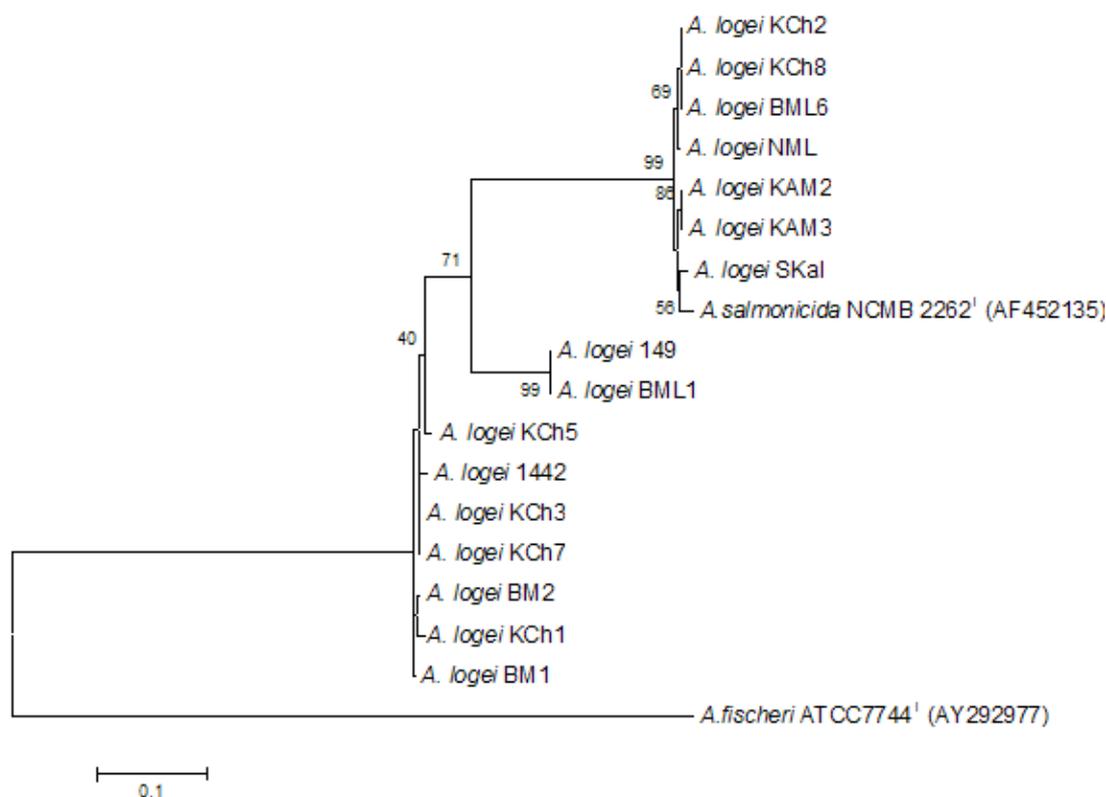


Рис. 3 Филогенетический анализ штаммов *A. logei* KCh1-3, KCh5, KCh7, KCh8, BM1, BM2, BML1, BML6, NML, KAM2, KAM3, SKal, 149, 1442 и типовых штаммов *A. salmonicida* NCIMB 2261 и *A. fischeri* ATCC7744 на основе нуклеотидных последовательностей регуляторной области *luxR1-luxC*

Анализ последовательности «house-keeping» генов ряда штаммов, определенных по биохимическим параметрам как *A. logei*, показал, что некоторые штаммы (в частности NML1) близки к виду *A. salmonicida*. Расхождение данных по биохимическим параметрам и филогенетического анализа последовательностей генов «house-keeping», а так же генов *lux*-

оперона и переменных спейсерных последовательностей свидетельствует о необходимости видовой реклассификации этих видов. Полученные данные позволяют предположить, что штаммы, распределённые в настоящее время по двум видам *A. logei* и *A. salmonicida*, должны быть сведены к одному (Рис. 4).

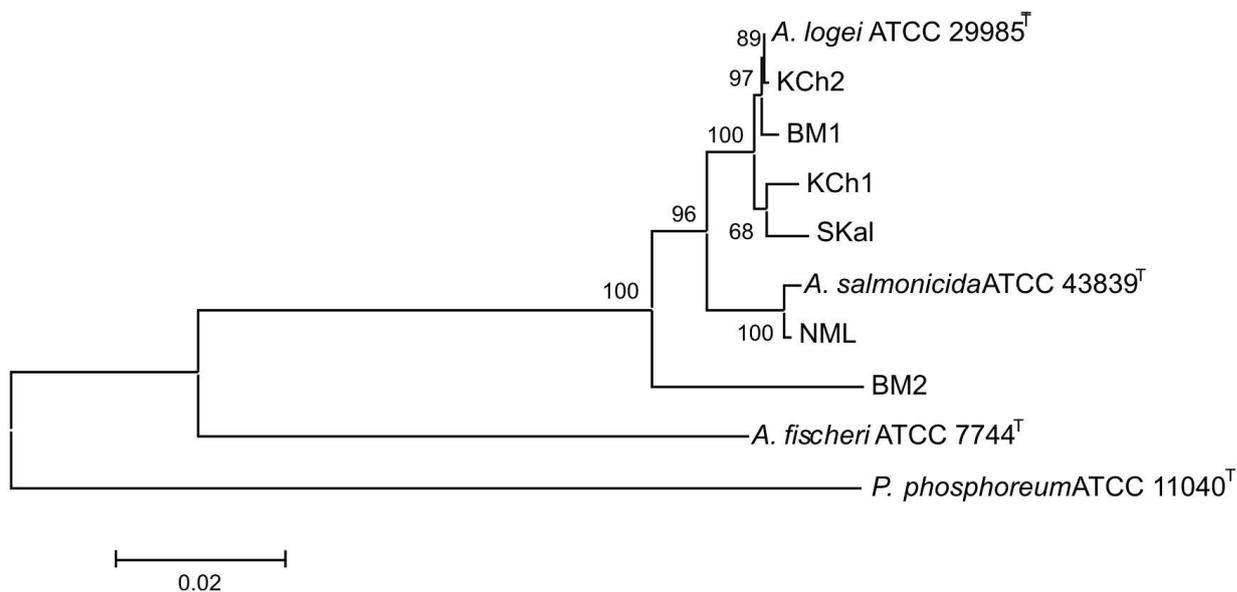


Рис. 4 Филогенетическое дерево, основанное на нуклеотидной последовательности пяти house-keeping генов (*gapA*, *gyrB*, *pyrH*, *recA*, *rpoA*) штаммов KCh1, KCh2, BM1, BM2, NML, *A. logei* ATCC 29985^T, *A. salmonicida* ATCC 43839^T, *A. fischeri* ATCC 7744^T. *P. phosphoreum* ATCC 11040^T взят для построения филогенетического дерева как представитель out-группы

Влияние белков LuxR1 и LuxR2 на активацию промотора Pr1 и Pr2. В настоящей работе на модели *E. coli* показано, что экспрессия генов *lux*-оперона *A. logei* с промотора Pr1 идет значительно слабее, чем с Pr2. Для решения этой задачи были получены на основе беспромоторного вектора pDEW201 следующие плазмиды: pSV16, несущая репортерные гены *luxCDABE* из *P. luminescens* под контролем Pr2 промотора *lux*-оперона *A. logei* и ген *luxR2*; pIVA – такая как pSV16, но с Pr1 промотором и *luxR1* геном, pVFR1 – аналогичная pSV16, но с промотором и *luxR* геном из *A. fischeri*. На основе вектора pACYC184 были получены плазмиды pIV3 и pIV2, несущие гены *luxR1* или *luxR2* соответственно под контролем собственных промоторов.

Разницу в эффективности экспрессии Pr1 и Pr2 промоторов можно объяснить тем, что сайт связывания с LuxR (*lux*-бокс) в Pr1 короче, чем *lux*-бокс Pr2, и, по-видимому, вследствие этого менее эффективен (Рис. 6).

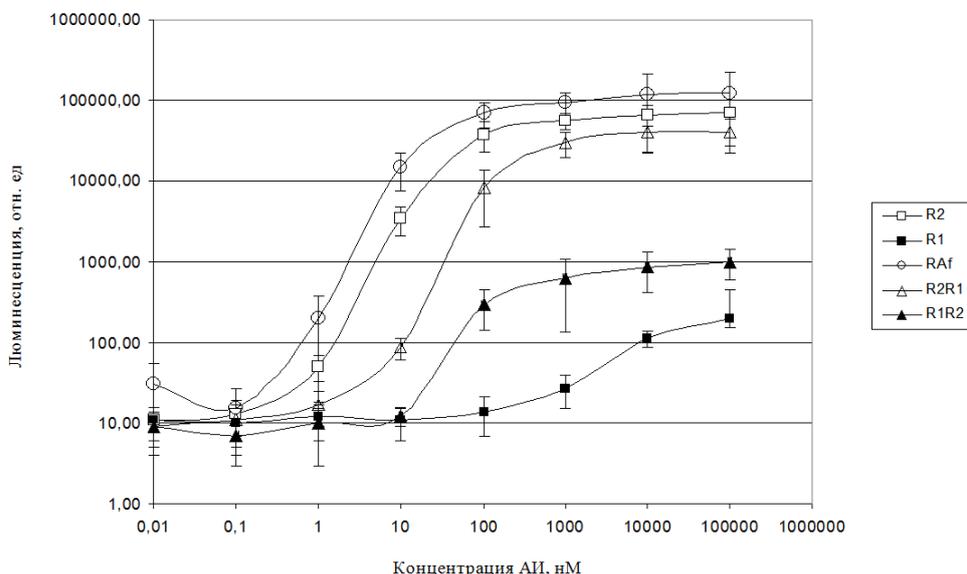


Рис. 5 Зависимость уровня свечения клеток *E. coli* MG1655 с комбинациями плазмид (pSV16, pIV3) и (pIVA, pIV2) и плазмидами pSV16, pIVA и pVFR1, измеренного через час после добавления АИ, от концентрации добавленного АИ. R2 – *E. coli* MG1655 pSV16; R1 – *E. coli* MG1655 pIVA; R2R1 – *E. coli* MG1655 pSV16 pIV3; R1R2 – *E. coli* MG1655 pIVA pIV2; RAf – *E. coli* MG1655 pVFR1

	lux box	-10	+1
AF luxR-luxI	AAGCACCTGTAGGATGGFACAGGTTT-ACGCAAGAAAATGGTTTGT	TATAGT	CGAATAAAA
AL KCh1 luxR1-luxC	GATACTCTGTAAAGTTATACAGGTTT-ACSTAAATAATTACCTGCT	TATAGT	TTTTCTAAA
AL BM1 luxR1-luxC	GATACTCTGTAAAGTTATACAGGTTT-ACSTAAATAATTACCTGCT	TATAGT	TTTTCTAAA
AL KCh1 luxR2-luxI	TCATTCCTGTAAATATGTFACAGGTTATAAGGAGGAAAATTTGCCTGCT	TATAGT	CAGTTAAA
AL BM1 luxR2-luxI	TCATTCCTGTAAATATGTFACAGGTTATAAGGAGGAAAATTTGCCTGCT	TATAGT	CAGTTAAA

	RBS	→ luxI	Stop
AF luxR-luxI	CG--CAAGGGAGGTTGGTATG	ACTATAATGATAAAAAAATCGGATTTTTTGGCAATTC	CCAT
AL KCh1 luxR1-luxC	ATA--AGGAAGCAGAGTGATG	ACAATG--ACTTAAAAAGTAGGTTATAAAATATTC	CCATC
AL BM1 luxR1-luxC	ATA--AGGAAGCAGAGTGATG	ACAATG--ACTTAAAAAGTAGGTTATAAAATATTC	CCATC
AL KCh1 luxR2-luxI	AGATTAAGGGGGTCAGGATG	ACAATAATGATAAGAAAATCCGAGTTTACTACTATTC	CCSTA
AL BM1 luxR2-luxI	AGATTAAGGGGGTCAGGATG	ACAATAATGATAAGAAAATCCGAGTTTACTACTATTC	CCSTA

Рис. 6 Нуклеотидная структура регуляторной области промоторов Pr (*luxR-luxI*), Pr1 (*luxR1-luxC*) и Pr2 (*luxR2-luxC*) *A. fischeri* (AF), *A. logei* (AL) KCh1, *A. logei* BM1, палиндромная последовательность *lux*-бокса отмечена зеленым; -10, RBS, ATG-кодны и стоп-кодны отмечены желтым; первый нуклеотид мРНК подчеркнут

Поскольку, как показывают полученные результаты, промотор Pr1 слабый, вследствие этого, по-видимому, ген *luxI* в структуре *lux*-оперона

A. logei, кодирующий АИ, вынесен под действие более сильного промотора Pr2. Гены *luxCDABE* остаются под более слабым промотором (Рис.7), поскольку в психрофильных бактериях люцифераза, субъединицы которой кодируются генами *luxAB*, обладает более высокой скоростью оборота фермента, чем у мезофилов, и при высоких концентрациях агрегирует (Manukhov I.V., et al., 1999; Завильгельский Г.Б. и др., 2004), поэтому нет необходимости синтезировать её в больших количествах.

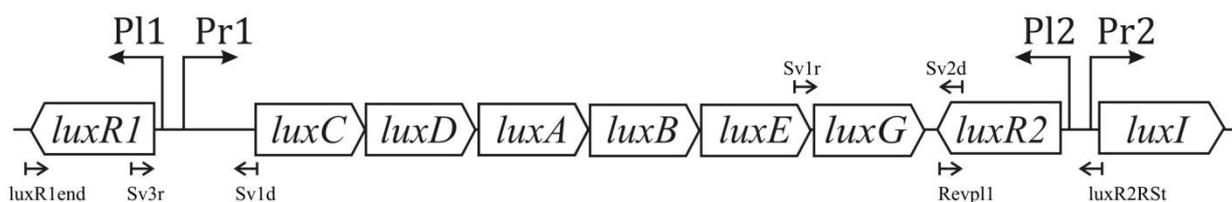


Рис.7 Структура *lux*-оперона *A. logei*. Показано расположение *luxR1* и *luxR2* генов, Pr1 и Pr2 промоторов, а также праймеров, использованных в работе

По-видимому, при низких температурах психрофильным клеткам *A. logei* требуется высокая экспрессия *luxI*, а экспрессия *luxCDABE* достаточна на сравнительно невысоком уровне для заметной люминесценции. Отчасти это верно и для мезофильных бактерии *A. fischeri*, в *lux*-опероне которых *luxI* стоит первым после Pr промотора, что в бактериальных оперонах, как правило, свидетельствует о необходимости наиболее высокой его экспрессии из числа генов данного оперона.

Влияние Lon-протеазы и шаперонина GroEL/ES на активацию промоторов, регулируемых белками LuxR1 и LuxR2, и их комбинацией. Активность регуляторных белков LuxR *A. logei* определяли на модели клеток *E. coli* с использованием гибридных биосенсорных плазмид, в которых гены *luxCDABE* *P. luminescens* находятся под контролем промотора, регулируемого исследуемым белком. Зависимость уровня люминесценции клеток от времени анализировали при различных концентрациях добавленного АИ. Роль каждого из LuxR1 и LuxR2 белков в QS регуляции *lux*-оперона определяли методом сравнительного анализа интенсивности люминесценции биосенсорных клеток, содержащих гибридные плазмиды с

одним из двух *luxR* генов. Способность одного из регуляторов модулировать активность другого, проверяли введением в клетки *E. coli* второй совместимой плазмиды, содержащей ген регулятора, модулирующая способность которого изучалась. В этих экспериментах использовали, наравне с диким штаммом *E. coli*, штаммы, содержащие мутации в генах *groEL* или *lon*.

При тепловом стрессе в клетках, несмотря на активацию «heat-shock» промоторов, возникает недостаток шаперонина GroEL/ES, который отвлекается на стабилизацию денатурированных белков. При этом возрастает концентрация Lon-протеазы, которая так же транскрибируется с «heat-shock» промотора. Несвязанные с АИ мезофильные и психрофильные белки LuxR подвержены деградации Lon-протеазой. В такой ситуации QS ответ не возможен. Однако при высоких концентрациях АИ происходит стабилизация LuxR у мезофилов, в то время как у психрофилов полная стабилизация белка LuxR2 не происходит. Данный феномен можно объяснить тем, что белок LuxR2 из психрофильных бактерий, по-видимому, менее стабилен. Однако необходимость отвечать на высокую концентрацию АИ в среде, несмотря на стрессовые ситуации, обуславливает в их *lux*-опероне присутствие еще одного гена *luxR1*. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при высоких концентрациях АИ белок LuxR1 способен запускать QS ответ, несмотря на недостаток шаперонина GroEL/ES и активную Lon-протеазу.

На Рисунке 8 представлены данные о влиянии мутации GroEL/ES на регуляцию Pr промотора *lux*-оперона *A. fischeri* (Рис. 8А), Pr1 и Pr2 промоторов *A. logei*, регулируемых *luxR1* и *luxR2* генами соответственно (Рис. 8Б) и Pr2 промотора, регулируемого комбинацией генов *luxR1* и *luxR2* (Рис. 8В).

Из данных представленных на Рисунке 8 видно, что при повышении концентрации АИ в среде до 10-100 мкМ практически полностью восстанавливается активность LuxR из *A. fischeri* в *gro⁻* клетках, по-

видимому, в результате стабилизации гомодимера (LuxR)₂ (Рис. 8А). Недосток шаперонина GroEL/ES снижает, как минимум, на порядок интенсивность биолюминесценции, регулируемой белком LuxR2, но не LuxR1 (Рис. 8Б). В отличие от LuxR из *A. fischeri* активность LuxR2 из *A. logei* не восстанавливается полностью при повышении концентрации АИ в среде. Эти результаты согласуются с данными полученными ранее (Горянин И., 2014).

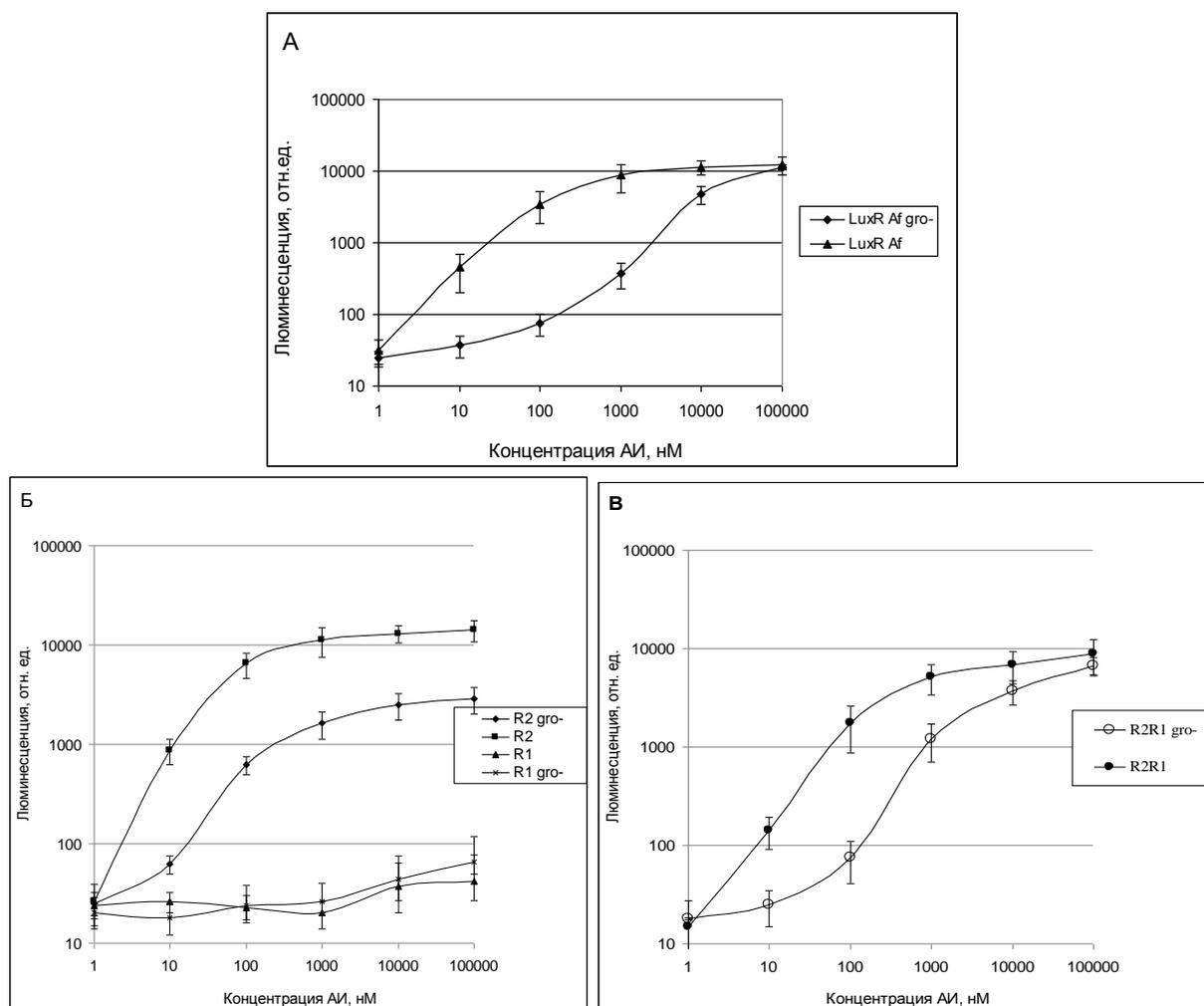


Рис. 8 Зависимость интенсивности люминесценции от концентрации АИ *E. coli* с плазмидами: А) pVFR1; Б) pSV16 или pIVA; В) pSV16 + pIV3. RAfgro- – *E. coli* OFB1111groEL673(pVFR1); RAf – *E. coli* SKB178gro⁺(pVFR1); R1gro- – *E. coli* OFB1111groEL673(pIVA); R1 – *E. coli* SKB178gro⁺ (pIVA); R2gro- – *E. coli* OFB1111groEL673(pSV16); R2 – *E. coli* SKB178gro⁺(pSV16); R2R1gro- – *E. coli* OFB1111groEL673(pSV16, pIV3); R2R1gro – *E. coli* SKB178gro⁺(pSV16, pIV3)

Неожиданным оказался результат измерения биолюминесценции клеток *E. coli* OFB1111groEL673 и SKB178 gro⁺ с комбинацией плазмид pSV16 и pIV3 в зависимости от концентрации АИ (Рис. 8В). Полученные данные свидетельствуют о том, что комбинация генов *luxR1* и *luxR2* позволяет восстановить люминесценцию в gro⁻ клетках при повышении концентрации АИ до уровня свечения клеток дикого типа.

Далее было исследовано влияния Lon-протеазы на регуляцию Pr1 и Pr2 промоторов *A. logei*, регулируемых *luxR1* и *luxR2* генами соответственно и Pr2 промотора, регулируемого комбинацией генов *luxR1* и *luxR2* (Рис. 9).

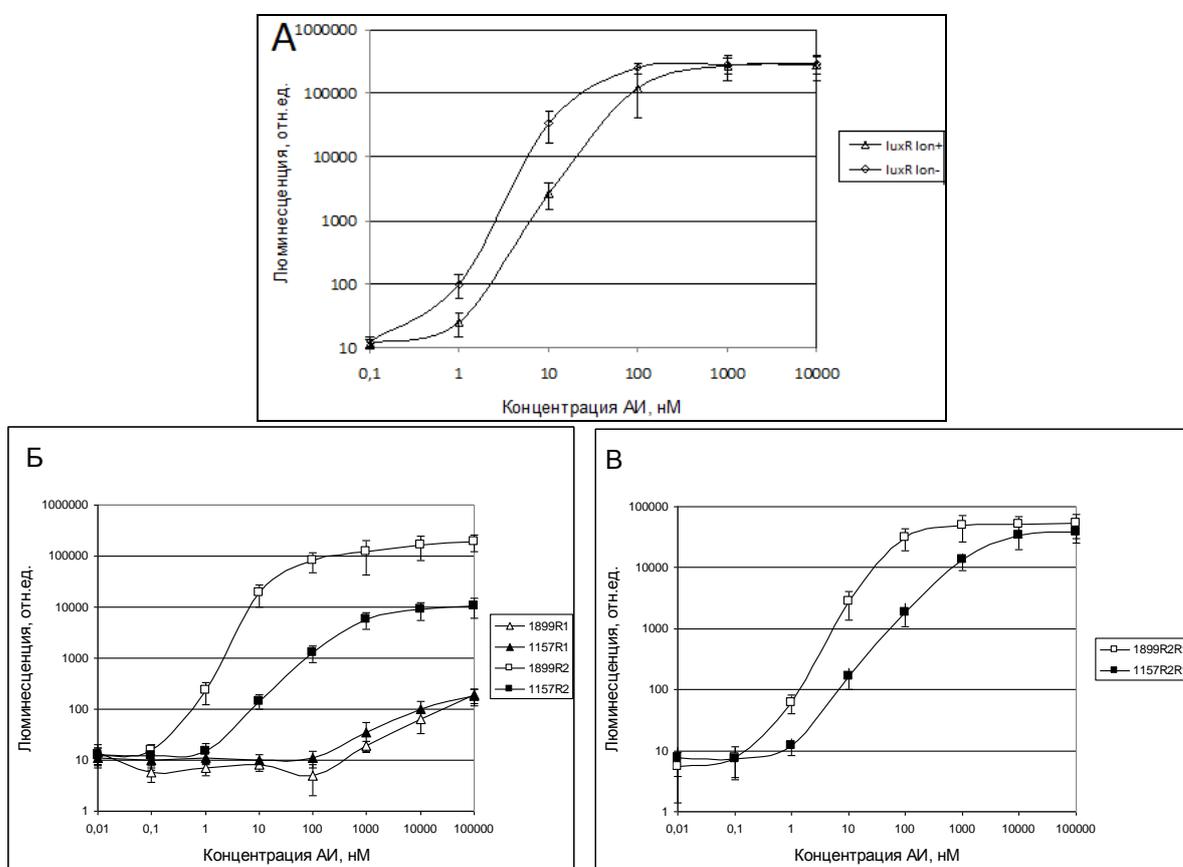


Рис. 9 Влияние Lon-протеазы на активность LuxR белков. Зависимость интенсивности люминесценции клеток *E. coli* AB1157 lon⁺ и AB1899 lon⁻, трансформированных плазмидами pVFR1 (А), pSV16 или pIVA (Б), и комбинацией плазмид pSV16 и pIV3 (В) от концентрации АИ. luxR lon⁺ – *E. coli* AB1157 pVFR1; luxR lon⁻ – *E. coli* AB1899 pVFR1; 1899R1 – *E. coli* AB1899 pIVA; 1157R1 – *E. coli* AB1157 pIVA; 1899R2 – *E. coli* AB1899 pSV16; 1157R2 – *E. coli* AB1157 pSV16; 1899R2R1 – *E. coli* AB1899 pSV16 pIV3; 1157R2R1 – *E. coli* AB1157 pSV16 pIV3

Данные этих экспериментов представлены на графике (Рис. 9), который отражает интенсивность люминесценции клеток *E. coli* AB1157 и *E. coli* AB1899 *lon*⁻ с pSV16 или pIVA, или с комбинацией плазмид pSV16 и pIV3 (*luxR1* ген) в зависимости от концентрации АИ. Интенсивность свечения клеток измеряли через 2 часа инкубации после добавления АИ.

Как видно из полученных данных (Рис. 9) в клетках *E. coli* мутантных по Lon-протеазе экспрессия генов *lux*-оперона под контролем *luxR A. fischeri* выше, чем в клетках дикого типа, однако при повышении концентрации АИ до 1-10 мкМ уровень биолюминесценции выравнивается (Рис. 9А), т.е. активность LuxR от Lon-протеазы перестаёт зависеть. Люминесценция клеток *E. coli* AB1899 pSV16, где экспрессия генов *lux*-оперона находится под контролем LuxR2, выше, чем клеток дикого типа *E. coli* AB1157 pSV16. примерно на порядок (кривые 1899R2 и 1157R2 на Рис. 9Б). Эта разница не уменьшается с увеличением концентрации АИ. На люминесценцию клеток, содержащих *luxR1* и промотор Pr1, Lon-протеаза влияния не оказывает (кривые 1899R1 и 1157R1 на Рис. 9Б). Эти результаты соответствуют данным полученным ранее (Горянин И.И., 2014). Иная картина наблюдалась при исследовании способности к люминесценции клеток *E. coli lon*⁻ и *lon*⁺ с комбинацией плазмид pSV16 и pIV3. Оказалось, что при невысоких концентрациях АИ люминесценция клеток AB1899 *lon*⁻ в присутствии комбинации LuxR2 и LuxR1 несколько снижена по сравнению с клетками дикого типа, но при больших концентрациях АИ значения люминесценции практически совпадают (кривые 1899R2R1 и 1157R2R1, Рис. 9В).

На основании наблюдаемых данных было выдвинуто предположение, что формируется гетеродимер LuxR1/LuxR2, который, по всей видимости, обладает свойством стабилизироваться при высоких концентрациях АИ (не требуя наличия GroEL/ES), при этом становится менее подверженным деградации Lon-протеазой и, как следствие, приобретает способность активировать *lux*-оперон, а значит откликаться на наличие в среде АИ,

несмотря на стрессовые условия. Самостоятельно (без LuxR1) белок LuxR2 при активной Lon- протеазе и больших концентрациях АИ на это не способен. Эти данные подтверждают гипотезу о необходимости наличия белка LuxR1 в стрессовой ситуации для психрофильных бактерий *A. logei*.

Следует отметить, что комбинация генов *luxR1* и *luxR2* психрофильных бактерий *A. logei* ведёт себя сходным образом с *luxR* из мезофильных бактерий *A. fischeri*, т.е. высокие концентрации АИ позволяют открыть QS регулируемые промоторы независимо от наличия или отсутствия Lon- протеазы и шаперонина GroEL/ES.

По результатам исследования влияния Lon-протеазы и шаперонина GroEL/ES на активацию промоторов, регулируемых белками LuxR1 и LuxR2 и их комбинацией, можно сделать общий вывод. Белок LuxR1 слабо открывает промотор Pr1 в виде гомодимера, но модулирует активность белка LuxR2 при избытке Lon-протеазы и недостатке шаперонина GroEL/ES, уменьшая его активность при малых концентрациях АИ, и помогая экспрессировать гены *lux*-оперона при больших (Рис. 10).

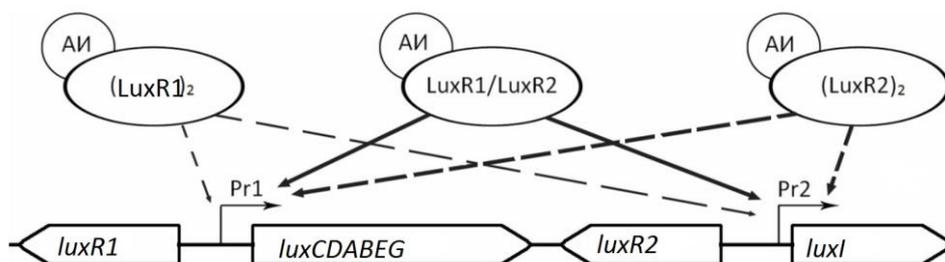


Рис. 10 Схема образования гомодимеров $(LuxR1)_2$, $(LuxR2)_2$ и гетеродимера LuxR1/LuxR2 и их вклад в активацию экспрессии генов *lux*-оперона. Pr1 – слабый промотор, Pr2 – сильный промотор. Гетеродимер LuxR1/LuxR2 в связанном состоянии с АИ не подвержен протеолизу и стабилизируется, несмотря на отсутствие шаперонина GroEL/ES, в полной мере проявляет свою активность (отмечено сплошными стрелками), преодолевая стрессовое состояние, активирует оба промотора. Гомодимер $(LuxR1)_2$ слабо активирует промотор Pr1 и Pr2 (отмечено тонкими пунктирными стрелками), не чувствителен к АИ. Гомодимер $(LuxR1)_2$ сильно активирует промоторы (отмечено толстыми пунктирными стрелками). Высокие концентрации АИ стабилизируют $(LuxR2)_2$ не полностью, в этом случае его активность ниже, чем у гетеродимера LuxR1/LuxR2. LuxR2 является основным активатором, а в стрессовых условиях его активность поддерживается белком LuxR1

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что формируется гетеродимер LuxR1/LuxR2, который очевидно обладает рядом преимуществ над гомодимером. Гетеродимер способен эффективнее стабилизироваться при связывании с АИ, чем гомодимер (LuxR)₂, и открывать Pr2 промотор даже в клетках *E. coli* OFB1111groEL673.

Сравнение термостабильности белков LuxR1 и LuxR2 из *A. logei*.

Термостабильность белков LuxR из мезофильных бактерий *A. fischeri* изучали на модели *E. coli* MG1655, трансформированных гибридными плазмидами, в которых репортерные гены *luxCDABE* *P. luminescens* находятся в одном случае под контролем промотора Pr1, регулируемого белком LuxR1 *A. logei* (плазмида pIVA), в другом под контролем промотора Pr2, регулируемого белком LuxR2 *A. logei* (плазмида pSV16). Термостабильность белков оценивали по уровню свечения клеток при 42°C, контрольные клетки инкубировали при 22°C. Для сравнения результатов с термостабильностью белка LuxR из мезофильных бактерий *A. fischeri*, использовали клетки *E. coli* MG1655, содержащие плазмиду pVFR1, в составе которой репортерные гены *luxCDABE* *P. luminescens* встроены под контроль промотора Pr, регулируемого белком LuxR из мезофильных бактерий *A. fischeri*. Оказалось, что активация QS системы не зависит от термостабильности LuxR белков при наличии АИ, при этом LuxR1 и LuxR2 менее термостабильны, чем белок LuxR из мезофильных бактерий *A. fischeri*.

Влияние QS системы на УФ-чувствительность бактерий *E. coli*.

Влияние интенсивности биолюминесценции на репарацию ДНК изучали на модели бактерий *E. coli* с использованием гибридных плазмид, содержащих гены *lux*-оперонов различных светящихся бактерий, регулируемых QS системой. В работе применяли, наряду с диким штаммом *E. coli*, штаммы, содержащие мутации в генах *uvrABC* (дефект темновой эксцизионной репарации), *phr* (отсутствие активной фотолиазы), а также в гене *lon*

(дефектная Lon-протеаза). Как видно из данных, приведённых на Рисунке 11, наличие в клетках плазмиды pLeo1 (содержит полный lux-оперон из *P. leiognathi*) увеличивает резистентность клеток к УФ-облучению примерно в два раза (по разности наклонов кривых выживаемости). Необходимо отметить, что фотореактивирующая активность биолюминесценции значительно уступает таковой, измеренной с использованием света лампы СВД120А.

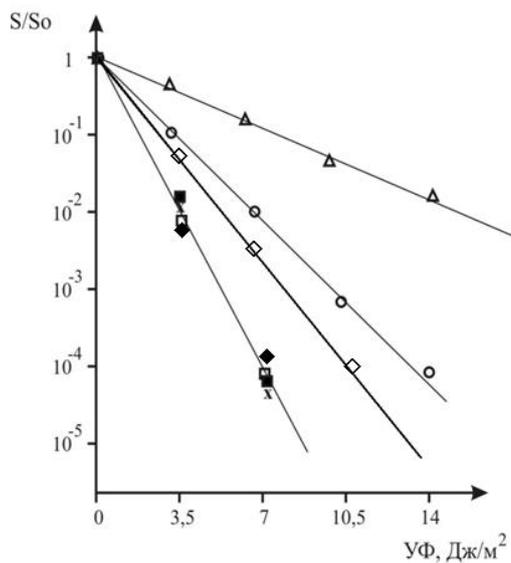


Рис. 11 Кривые выживаемости бактерий *E. coli*. Δ - освещение фотореактивирующей лампой СВД-120А; ■ - не светящиеся клетки; ○ - *E. coli* AB1886 *uvrA6* pLeo1 (светящиеся клетки/ lux-оперон из *P. leiognathi*); □ - *E. coli* AB1886 *phr::kan^r* (pLeo1) светящиеся клетки; ◆ - *E. coli* pF1 без АИ; ◇ - *E. coli* pF1 + АИ, х - pSV10,4

В интервале длин волн (400-500 нм) имеет место перекрывание спектров действия фотолиазы и люминесценции люциферазы *P. leiognathi* (Рис. 12). По-видимому, в результате данного перекрывания и происходит фотореактивация УФ-повреждений в бактериальной ДНК биолюминесцентным светом, наблюдаемая нами (Рис. 11, Рис. 12).

Введение в клетки *E. coli* AB1886 генов lux-оперона, экспрессия которых регулируется QS системой, в присутствии АИ снижает чувствительность клеток к УФ. Следовательно, lux-опероны, регулируемые по принципу QS, теоретически способны активировать фотозащиту от УФ-повреждений ДНК как в мезофильных, так и в психрофильных бактериях.

Следует отметить, что в открытом океане система QS закрыта из-за отсутствия АИ и, следовательно, в природных условиях мало вероятно, что *lux*-опероны таких бактерий как *A. logei* и *A. fischeri*, способны играть существенную роль в защите от УФ.

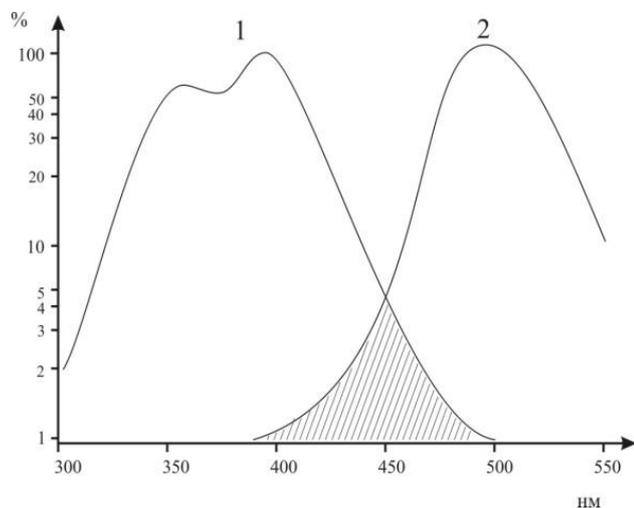


Рис. 12 Перекрытие спектра поглощения фотолиазы (1) и спектра люминесценции люциферазы *P. leiognathi* (2)

Использование генов *lux*-оперонов как репортерных в цельноклеточных биосенсорах на основе *E. coli* для определения генотоксичных продуктов неполного окисления НДМГ. Прикладным аспектом настоящей работы являлась разработка набора *lux*-биосенсоров для биодетекции токсичных компонентов ракетного топлива - несимметричного диметил гидразина и продуктов его окисления на основе используемых в исследованиях репортерных конструкций и индуцируемых стрессовых промоторов.

Известно, что НДМГ является сильным восстановителем, при попадании в окружающую среду начинает окисляться атмосферным кислородом с образованием более стабильных продуктов окисления, некоторые из которых являются генотоксичными (Zavilgelsky, G. B, et al., 2007; Горянин И.И. и др., 2013). Важной составляющей генотоксичности производных окисления НДМГ является алкилирующее соединение N-нитрозодиметиламин.

В настоящей работе для определения генотоксичных продуктов неполного окисления НДМГ было предложено использовать набор *lux*-биосенсоров на основе бактерий *E. coli*, содержащих гибридные плазмиды с *lux*-генами под контролем индуцируемых стрессовых промоторов P_{alkA} , P_{oxyS} , P_{soxS} , P_{colD} и P_{grpE} , получившие названия *pAlkA-lux*, *pOxyS-lux*, *pSoxS-lux*, *pColD-lux* и *pGrpE-lux* соответственно. Клетки *E. coli* MG1655, трансформированные данными плазмидами, обладают свойством индукции сигнала биолюминесценции клеток в ответ на алкилирование ДНК, окислительный стресс, вызываемый появлением перекиси водорода или супероксид анион радикалами, на повреждения в ДНК, останавливающие репликационную вилку и, в качестве контроля, на денатурацию клеточных белков. На Рисунке 13 показана зависимость люминесценции от времени действия продуктов неполного окисления НДМГ 1мМ на биосенсор *E. coli* *pAlkA-lux*.

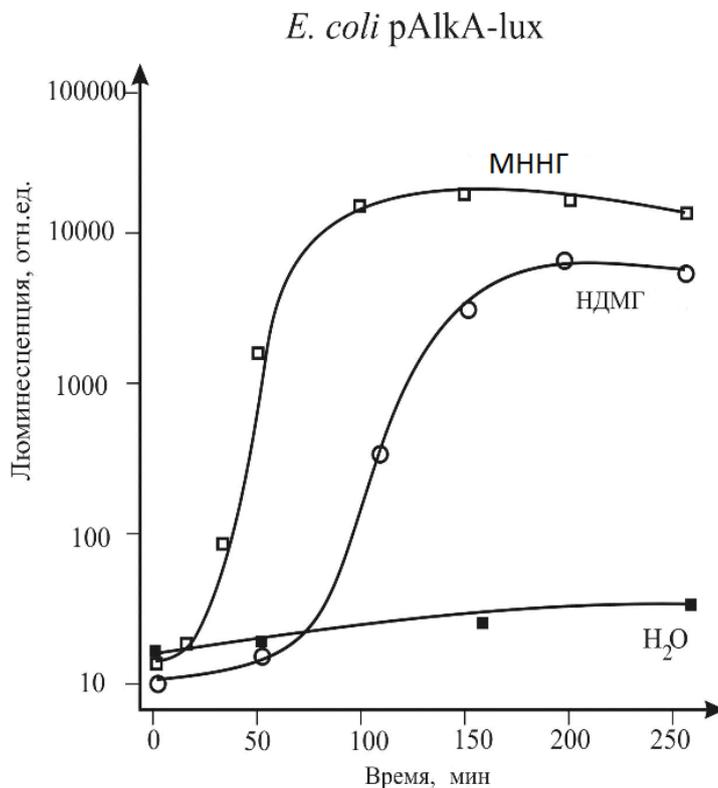


Рис. 13 Зависимость люминесценции клеток *E. coli* MG1655 *pAlkA-lux* от времени инкубации после добавления в качестве положительного контроля нитрозогуанидина в концентрации 1 мМ (МННГ) или несимметричного диметилгидразина 7,5 мМ,

предварительно окисленный перекисью водорода 7 мМ (НДМГ). В контрольные клетки добавлена вода (H₂O)

Как видно из Рисунка 13, в процессе действия продуктов неполного окисления НДМГ на клетку происходит индукция биолюминесценции у биосенсора *E. coli* pAlkA-lux на 2 – 3 порядка по амплитуде ниже таковой в ответ на воздействие нитрозогуанидином, а через 2 часа немного не достигает уровня индукции классического алкилирующего агента нитрозогуанидина, взятого в оптимальной для данного генотоксиканта концентрации 1мМ.

Сравнение уровня люминесценции клеток *E. coli* pKatG-lux, применяемых для детекции НДМГ ранее (Завильгельский Г. Б. и др. Патент РФ № 2297450 от 2007.04.20), и клеток *E. coli* pOxyS-lux, полученных в рамках настоящей работы представлены на Рисунках 14. На Рисунке 14 показана зависимость люминесценции биосенсоров от концентрации НДМГ.

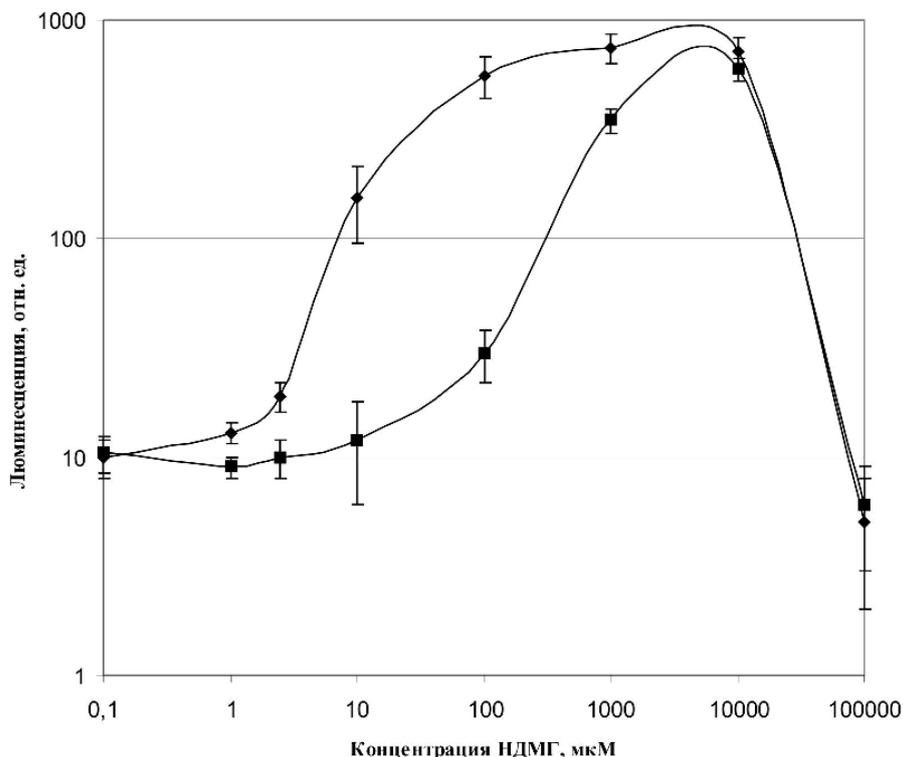


Рис. 14 Зависимость люминесценции биосенсора *E. coli* MG1655 pKatG-lux и биосенсора *E. coli* MG1655 pOxyR-lux от концентрации НДМГ в пробе. Oxy - культура биосенсора *E. coli* MG1655 pOxyR-lux; KatG - культура биосенсора *E. coli* MG1655 pKatG-lux

Как видно из полученных результатов (Рис. 14), в процессе действия продуктов неполного окисления НДМГ на клетку происходит индукция биолюминесценции у обоих биосенсоров *E. coli* pKatG-lux и *E. coli* pOxyS-lux. Следует отметить, что при воздействии малых концентрации НДМГ амплитуда ответа нового lux-биосенсора, основанного на промоторе гена *oxyS*, значительно выше, чем сконструированного ранее на основе промотора *katG*.

Биосенсор *E. coli* pColD-lux, выбранный для данного набора, более чувствителен и обладает большей амплитудой ответа, чем используемый ранее на основе промотора P_{recA} (Манухов И. В. и др., 2009).

Для определения токсичных производных НДМГ оптимально использовать набор lux-биосенсоров на основе бактерий *E. coli*, содержащих гибридные плазмиды с lux-генами под контролем следующих индуцируемых стрессовых промоторов P_{oxyR}, P_{colD}, P_{alkA}, P_{soxS} и P_{grpE}. В предложенном наборе промоторы P_{oxyR}, P_{colD} используются вместо P_{katG} и P_{recA} соответственно, а промотор P_{alkA} используется для определения алкилирующих производных НДМГ, прежде всего нитрозодиметиламина, остальные промоторы, как в патенте (Завильгельский Г. Б. и др. Патент РФ № 2297450 от 2007.04.20), а именно, P_{soxS} и P_{grpE}. Таким образом, для определения токсичных продуктов неполного окисления НДМГ разработана новая группа биосенсоров, обладающих большей чувствительностью к малым концентрациям токсикантов, чем биосенсоры, применяемые ранее. Кроме того, используется lux-биосенсор чувствительный к алкилирующим агентам, не применявшейся ранее. Вследствие этого в предложенном новом наборе lux-биосенсоров расширена способность к специфической детекции токсикантов и чувствительность метода.

ВЫВОДЫ

1. Психрофильные бактерии вида *A. logei*, обладающие QS системой первого типа, широко распространены в акваториях студеной морей России (Белое, Охотское, Берингово, Балтийское), при этом бактерии *Photobacterium sp.* в летний период доминируют над бактериями *A. logei*, преобладающими в зимний сезон при низких температурах.

2. Особенности регуляции QS системы первого типа с двумя регуляторными генами психрофильных бактерий *A. logei* заключаются в следующем:

- активация QS системы не зависит от термостабильности LuxR белков при наличии АИ, при этом LuxR1 и LuxR2 менее термостабильны, чем белок LuxR из мезофильных бактерий *A. fischeri*;

- при высоких концентрациях АИ белок LuxR1 стабилизирует белок LuxR2, который является основным регулятором, в клетках, мутантных по шаперонину GroEL/ES и в клетках с активной Lon-протеазой;

- промотор гена *luxI* открывается на порядок сильнее, чем промотор структурных генов *luxCDABEG*.

4. Биолюминесценция активирует бактериальную фотолиазу, однако *lux*-опероны, регулируемые QS системой первого типа, у психрофильных бактерий *A. logei* и мезофильных *A. fischeri* обеспечивают фотозащиту от УФ-повреждений ДНК только при высоких концентрациях АИ.

5. Разработанный набор *lux*-биосенсоров (*E. coli* MG1655 pAlkA-lux, pOxyS-lux, pSoxS-lux, pColD-lux и pGrpE-lux) обладает высокой чувствительностью и предложен для контроля над содержанием генотоксичных, в том числе алкилирующих, продуктов неполного окисления НДМГ в окружающей среде.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) Коноплева М.Н., Хрульнова С.А., Осетрова М.С., Дегтев Д.И., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. Анализ люминесцирующей микрофлоры кишечника рыб студёных морей: Белого, Берингова и Охотского // *Труды ВНИРО*– 2015. – Т. 157. – С. 23–30.
- 2) Мелькина О. Е., Котова В. Ю., Коноплева М.Н., Манухов И. В., Пустовойт К. С., Завильгельский Г. Б. Фотореактивация УФ-облученных бактерий *Escherichia coli* АВ 1886 *uvrA6*, индуцируемая свечением люциферазы *Photobacterium leiognathi* // *Молекулярная биология*. - 2015. - Т. 49, № 6. - С. 1035-1040.
- 3) Khrulnova SA, Baranova A, Bazhenov SV, Goryanin II, Konopleva MN, Maryshev IV, Salykhova AI, Vasilyeva AV, Manukhov IV, Zavilgelsky GB. Lux-operon of the Marine Psychrophilic Bacteria *Aliivibrio logei*: a Comparative Analysis of the LuxR1/LuxR2 Regulatory Activity in *Escherichia coli* cells // *Microbiology*. - 2016 - 162: 717-724.
- 4) Konopleva MN, Khrulnova SA, Baranova A, Ekimov LV, Bazhenov SV, Goryanin II, Manukhov IV. A combination of *luxR1* and *luxR2* genes activates Pr-promoters of psychrophilic *A. logei* lux-operon independently of chaperonin GroEL/ES and protease Lon at high concentrations of autoinducer // *Biochem Biophys Res Commun*. - 2016 - 473(4):1158-62.
- 5) Манухов И. В., Горбунов М. А., Дёгтев Д. И., Завильгельский Г. Б., Кессених А. Г., Коноплева М. Н., Котова В. Ю., Краснопеева Е. Д., Мотовилов К. А., Осетрова М. С., Чалкин С. Ф., Шатров Т. Я. «Набор lux-биосенсоров для определения генотоксичных продуктов неполного окисления несимметричного диметилгидразина в среде» // Патент РФ №2569156 Дата подачи 18.12.2014.
- 6) Коноплева М.Н., Хрульнова С.А., Осетрова М.С., Дегтев Д.И., Манухов И.В. Сравнение активности LuxR1 и LuxR2-регуляторных белков Lux-оперона *Aliivibrio logei* // *Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов»*. – Москва, 2014. – С. 126.
- 7) Екимов Л.В., Хрульнова С.А., Коноплева М.Н., Манухов И.В. Влияние шаперонина и протеазы Lon на активность LuxR1 и LuxR2 - регуляторных белков Lux-оперона *Aliivibrio logei* // *Сборник материалов 19-ой Международной пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века»*. Пушино, 2015. - С. 229