

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*

## Оглавление

Список сокращений и условных обозначений .....	5
ВВЕДЕНИЕ .....	7
Цель исследования .....	8
Научная новизна.....	9
Теоретическая и практическая значимость работы .....	10
Методология и методы исследования.....	10
Положения, выносимые на защиту .....	11
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Психрофильные светящиеся морские бактерии .....	13
1.2 Генетический контроль биолюминесценции бактерий.....	15
1.2.1 Биолюминесцентная реакция.....	16
1.2.2 Организация <i>lux</i> -оперонов .....	17
1.2.3 Сравнение структуры <i>lux</i> -оперонов представителей рода <i>Aliivibrio</i> .....	19
1.2.4 Системы «quorum sensing» первого типа .....	20
1.2.5 Ацил-L-гомосерин лактоны (AHL) и их взаимодействие с белками LuxR-семейства .....	23
1.2.6 QS системы первого типа психрофильных бактерий <i>A. logei</i> и <i>A. salmonicida</i> .....	27
1.3 Внутриклеточные факторы регуляции экспрессии генов, входящих в опероны QS систем.....	29
1.3.1 H-NS регуляция .....	30
1.3.2 Участие шаперонина GroEL/ES и протеазы Lon в сборке и деградации белка LuxR, активатора транскрипции генов <i>lux</i> -оперона <i>A. fischeri</i> .....	31
1.4 Фотореактивирующая способность биолюминесценции .....	32
1.5 Использование <i>lux</i> -оперонов для определения несимметричного диметил гидразина .....	34
Глава 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	36
Материалы и методы исследования.....	36

2.1 Бактериальные штаммы .....	36
2.2 Плазмиды .....	40
2.3 Реактивы, ферменты, среды .....	42
2.5 Измерение билюминесценции .....	43
2.6 Генно-инженерные методы .....	44
2.7 Мультигенный анализ .....	44
2.8 Биоинформационный анализ .....	45
2.9 УФ-облучение и фотореактивация бактерий .....	46
Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	47
3.1 Филогенетический анализ психрофильных бактерий .....	47
3.2 Сравнение термостабильности белков LuxR1 и LuxR2 из <i>A. logei</i> в гетерологичной системе .....	55
3.3 Анализ активности LuxR1 и LuxR2 регуляторов <i>lux</i> -оперона <i>A. logei</i> .....	59
3.3.1 Влияние <i>luxR1</i> и <i>luxR2</i> генов на активацию промотора Pr1 .....	59
3.3.2 Влияние <i>luxR1</i> и <i>luxR2</i> генов на активацию промотора Pr2 .....	60
3.3.3 Активность LuxR1 и LuxR2 регуляторов <i>lux</i> -оперона <i>A. logei</i> при разных концентрациях автоиндуктора .....	62
3.3.4 Анализ последовательности <i>lux</i> -бокса психрофильных бактерий <i>A. logei</i> .....	64
3.4 Влияние GroEL/ES шаперонина на регуляцию системы QS <i>A. logei</i> .....	65
3.4.1 Влияние GroEL/ES шаперонина на регуляцию промоторов <i>lux</i> -оперона <i>A. logei</i> комбинацией белков LuxR1 и LuxR2 .....	67
3.5 Влияние Lon-протеазы на регуляцию системы QS <i>A. logei</i> .....	73
3.6 Влияние Lon-протеазы на регуляцию промоторов <i>lux</i> -оперона <i>A. logei</i> комбинацией белков LuxR1 и LuxR2 .....	74
3.7 Влияние системы QS на УФ-чувствительность бактерий <i>E. coli</i> .....	79
3.7.1 Влияние <i>lux</i> -генов <i>P. leiognathi</i> на выживаемость бактерий <i>E. coli</i> при УФ- облучении .....	79
3.7.2 Влияние QS системы на УФ-чувствительность бактерий <i>E. coli</i> .....	81

3.8 Использование генов <i>lux</i> -оперонов как репортерных в цельноклеточных биосенсорах на основе <i>E.coli</i> для определения генотоксичных продуктов неполного окисления несимметричного диметилгидразина .....	84
Глава 4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	90
ВЫВОДЫ .....	99
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	100

## Список сокращений и условных обозначений

АДФ – аденозиндифосфат;

АИ – аутоиндуктор «quorum sensing» систем первого типа, для *Aliivibrio fischeri* и *Aliivibrio logei* аутоиндуктором является N-(3-оксогексаноил) лактон L-гомосерина и его производные;

а.о. – аминокислотные остатки;

в. – вес;

ВКПМ – Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов;

АТФ – аденозинтрифосфат;

АФК – активные формы кислорода;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ДСН – додецил сульфат натрия;

п.н. – пара нуклеотидов;

ИПТГ – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид;

МННГ – нитрозогуанидин (N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин);

НДМГ – несимметричный диметил гидразин

об. – объем

отн. ед. – относительные единицы;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

ФЭУ – фотоэлектронный умножитель;

ФУД – фактор уменьшения дозы УФ;

16S рРНК – 16S рибосомальная РНК;

АНЛ – ацил-L-гомосерин лактоны;

сАМР – циклический аденозинмонофосфат

CRP – белок репрессор

FMN – флавин моноклеотид;

FMNH<sub>2</sub> – восстановленный FMN;

H-NS – гистоноподобный структурирующий белок нуклеоида

NAD<sup>+</sup> – никотинамидадениндинуклеотид;

NADH – восстановленный NAD<sup>+</sup>;

NJ – метод ближайших соседей;

QS – quorum sensing;

SAM – S-аденозилметионин;

sp. – species

## ВВЕДЕНИЕ

Понятие «quorum sensing» (QS) означает 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 изучена 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 средствам 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 биолюминесценцию 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 состояния клетки (стрессового и покоя) (Grandclément et al., 2015).

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 настоящей 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 медицинских лекарственных средств, вновь разработанных, при экологическом контроле над токсическими веществами (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).

### **Цель 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 поставленной цели были решены следующие задачи в ходе исследования:

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. Прикладной задачей являлась разработка набора *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 *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* не обеспечивают фотозащиту от УФ-повреждений ДНК без добавления автоиндуктора (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 полученных результатов в диссертационной работе состоит в понимании механизмов регуляции QS систем психрофильных бактерий. Важными являются фундаментальные результаты о необходимости второго регуляторного гена *luxRI* 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 регуляцией люминесценции в зимний период имеют большое значение для разработки программы профилактических и коррекционных мероприятий для снижения риска эпизоотий и повышения продуктивности аквакультурных хозяйств на основе применения пробиотической QS активной микрофлоры в зимний и летний периоды.

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

### **Методология и методы исследования**

Методы определения принадлежности бактерий к видам включали сиквенирование и филогенетический анализ последовательностей гена 16S рРНК, генов *lux*-оперона и house keeping генов, изучение ключевых биохимических параметров (Fidopiastis et al., 1998) и фенотипических характеристик, в т.ч. способность к биолюминесценции, способность к образованию пигмента, оптимальную температуру роста (Alsina and Blanch, 1994; Lemos et al., 1985).

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 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*.

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 протеаза Lon).

При создании набора *lux*-биосенсоров на основе бактерий *E. coli*, содержащих гибридные плазмиды с *lux*-генами под контролем индуцируемых стрессовых промоторов, применяли традиционные методы генной инженерии, включая выделение ДНК, реакции рестрикции, лигирования, трансформации и ПЦР.

### **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 *A. logei* 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. Без добавления АИ *lux*-опероны психрофильных бактерий *A. logei* и мезофильных *A. fischeri* не обеспечивают фотозащиту от УФ-повреждений ДНК.

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

## Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Психрофильные светящиеся морские бактерии

подавляющее большинство биолюминесцирующих бактерий, обитающих в морях и океанах, принадлежит семейству *Vibrionaceae*, которое включает в себя роды *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aliivibrio*. Четыре вида бактерий *A. fischeri*, *A. logei*, *A. salmonicida*, *A. wodanis* ранее входили в состав рода *Vibrio*, в настоящее время формируют самостоятельный род *Aliivibrio* внутри семейства *Vibrionaceae* (Urbanczyk H. et al., 2007). Светящиеся морские бактерии представлены как психрофилами, так и мезофилами, для которых различается оптимальная температура роста.

Психрофильные бактерии обладают способностью к росту в диапазоне температур от 4°C до 30°C. Мезофильные бактерии отличаются тем, что не растут при 4°C, но растут при 30°C и выше. Оптимальная температура роста для психрофильных бактерий, обитающих в Охотском, Беринговом, Балтийском и Белом морях лежит в пределах 12-15°C. Мезофилы представлены видами *V. harveyi*, *A. fischeri*, *P. leiognathi*, а психрофилы - видами *A. logei*, *A. salmonicida*, *P. phosphoreum*.

Глубина и градиент температуры воды играют определяющую роль в заселении светящимися бактериями морей и океанов (Deming JW. et al., 2002; D'Amico S. et al., 2006). В верхних слоях теплых морей преобладают мезофилы, большей частью представленные видом *V. harveyi*. (Nealson K.H., Hastings J.W., 2006). С увеличением толщи воды и снижением температуры происходит видовое замещение бактерий. На глубине от 200 м, где температура опускается ниже 15°C, доминируют психрофилы, в основном *P. phosphoreum*. Оптимальной средой обитания для психрофильных бактерий также являются верхние слои холодных морей Арктики и Антарктики.

Ранее считалось, что ареал хозяев - кальмаров *Sepioloa robusta* и *Euprymna scolopes* определял распространенность бактерий-симбионтов *A. fischeri* и *A. logei* (Jones B.W. et al., 2007). Позднее было показано более широкое распространение

*A. logei*, связанное с обитанием в кишечнике рыб в качестве комменциалов в акваториях Охотского, Берингова и Белого морей (Хрульнова С.А., 2011а) и Черного моря (Кацев А.М. и Макемсон Дж., 2006).

Психрофилы и мезофилы существенно различаются между собой в молекулярном составе и строении. Структура молекул ДНК всех психрофильных бактерий отличается низким содержанием GC-пар. Молекулярная подвижность белков психрофильных бактерий увеличена за счет сниженного количества аланина, пролина, аргинина в аминокислотном составе белков (Casanueva A. et al., 2010). У мезофильных бактерий концентрация АТФ значительно выше, чем у психрофильных. Высокая концентрация АТФ компенсирует низкий уровень молекулярной подвижности белков у мезофилов (Parry B.R. and Shain D., 2011). Ферменты психрофилов обладают высокой активностью, которая достигается в результате снижения термостабильности белка и повышения подвижности элементов, входящих в структуру активного центра белка и его окружение, что нивелирует падение скорости реакций при холодном стрессе. Высокая активность ферментов у психрофилов является одним из жизненно важных свойств, отличающих их от мезофилов. (Feller G. and Gerday C., 2003; Siddiqui K.S. and Cavicchioli R., 2006). Второе существенное отличие психрофильных бактерий, выявленное в результате геномного анализа, заключается в том, что в их геноме некоторые гены повторяются по несколько раз, что приводит к увеличенной экспрессии целевого белка, и повышает устойчивость микроорганизмов к низким температурам (Bowman J.V., 2008).

В резистентности психрофильных бактерий к низким температурам наряду с многокопийностью жизненно важных генов и повышенной активностью ферментов вовлечены белки «холодового шока». Их синтез нарастает при снижении температуры культивирования бактерий. Эти белки присутствуют и мезофилов, в частности у *E. coli*. Различие между психрофилами и мезофилами заключается в том, что у первых «холодовая индукция» проявляется при смене температуры с 15°C на 4°C, а у вторых индукция происходит при переносе

бактерий с 37°C на 15°C. Способность психрофилов выживать при низких температурах существенным образом задается белками «холодового шока», которые являются ключевыми компонентами клетки.

Белки «теплового шока» также содействуют резистентности психрофильных бактерий к холоду (Relina L.I. et al., 2003). В результате введения в клетки *E. coli* гена шаперонина GroEL из бактерии-психрофила *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125 была зарегистрирована повышенная устойчивость клеток к холоду. (Tosco A. et al., 2003). Такой же эффект был обнаружен в результате введения в клетки *E. coli* гена *dnaK*, кодирующего другой белок «теплового шока» из психрофильной бактерий *Shewanella sp.* (Yoshimune K. et al., 2005).

Следует подчеркнуть, что культивирование при низкой температуре бактерий, применяемых в качестве суперпродуцентов в биотехнологических работах, позволяет существенно снизить энергетические расходы. Представляется интересным и перспективным применение в биотехнологии ферментов психрофильных бактерий с точки зрения их повышенной активности при холодовом стрессе (Cavicchioli R. et al., 2011).

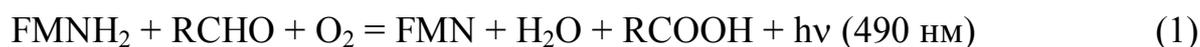
## 1.2 Генетический контроль биолюминесценции бактерий

Люминесцирующие бактерии представляют большую часть всех светящихся организмов на Земле, заселяющими как воду, так и сушу. Наиболее широко представлены люминесцирующие бактерии в океане, где они обитают и как свободно живущие организмы, и как сапрофиты, растущие на мертвой рыбе и мясе, и как симбионты, размножающиеся в пищеварительных трактах морских рыб, и как симбионты, приводящие к наличию у глубоководных рыб и у кальмаров светящихся органов. На суше люминесцирующие бактерии встречаются значительно реже. В основном, это бактерии, обитающие как паразиты у различных ракообразных и у насекомых (Hastings J.W. 1986). Практически все известные в настоящее время люминесцирующие бактерии принадлежат четырём родам: *Vibrio*, *Aliivibrio*, *Photobacterium* и *Photorhabdus*,

причем большая часть видов обитает в морской воде. Поэтому их часто называют просто морскими бактериями. Лишь бактерии рода *Photorhabdus*, являются симбионтами специальных видов нематод, которые паразитируют на личинках насекомых.

### 1.2.1 Билюминесцентная реакция

Способность к билюминесценции бактерий определяют белки – люциферазы. Бактериальные люциферазы представляют собой гетеродимеры  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц и участвуют в катализе окисления жирного альдегида (8-14 углеродов в цепочке) кислородом воздуха. Кофактором люциферазы является флавинмоноклеотид (FMN), который служит хромофором и сам окисляется в ходе люциферазной реакции (Рис.1) (Meighen E.A. 1991), которой сопутствует излучение кванта сине-зеленого света (490 нм):



Специфическая редуктаза (fatty acid reductase) в процессе восстановления жирной кислоты осуществляет синтез длинноцепочечного алифатического альдегида, служащего субстратом люциферазы, состоит из четырех субъединиц редуктазы (R), четырех субъединиц синтетазы (S) и четырех субъединиц трансферазы (T) (Рис.1). Гены *luxA* и *luxB* ответственны за синтез  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц люциферазы. Гены *luxC*, *luxD* и *luxE* определяют синтез субъединиц редуктазы жирных кислот, осуществляющей синтез длинноцепочечного алифатического альдегида, служащего субстратом люциферазы. Ген *luxE* определяет синтез полипептида – синтетазы. Ген *luxC* определяет синтез субъединицы - собственно редуктазы, и наконец, ген *luxD* ответственен за синтез трансферазы (Рис. 1) (Meighen E.A. 1991).

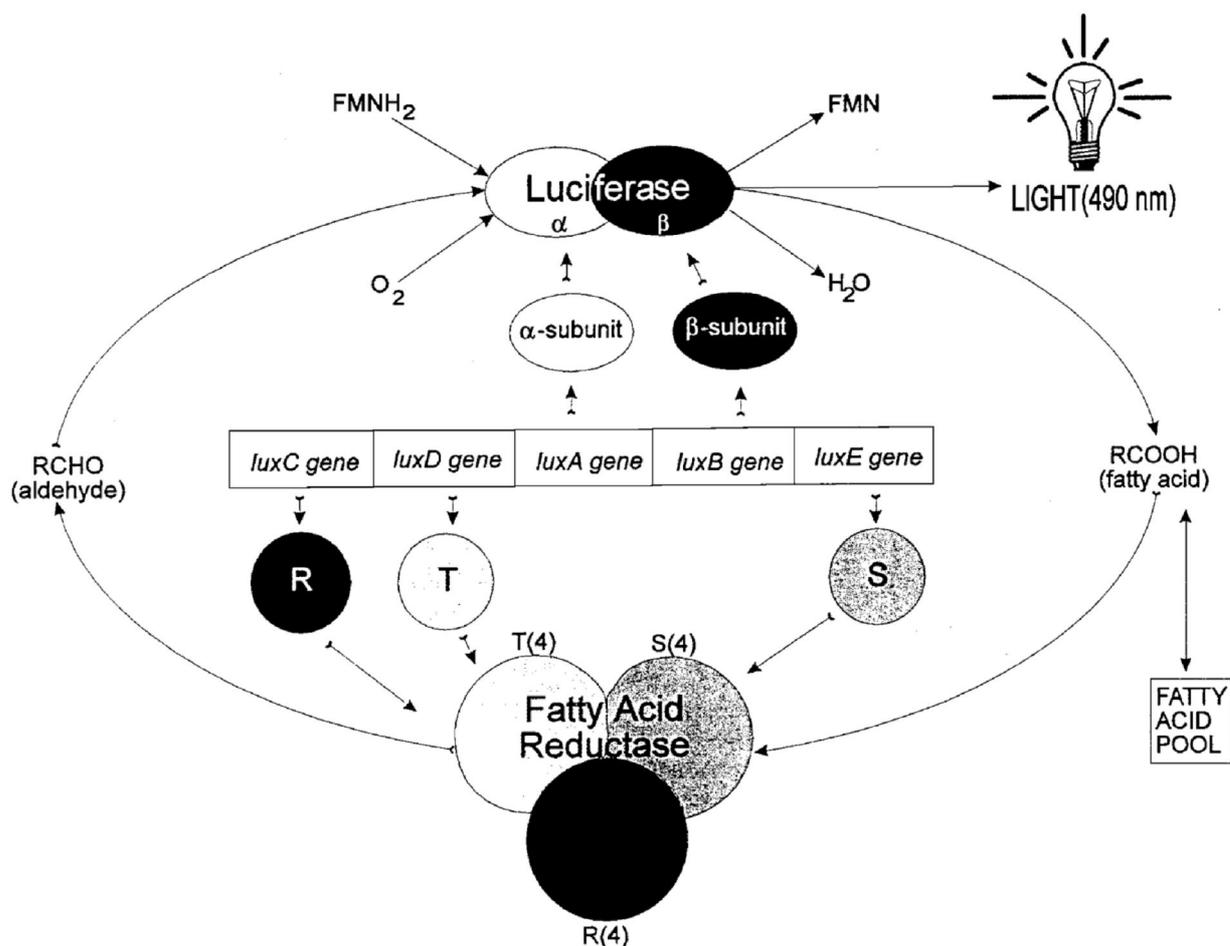


Рис.1 Схема взаимодействия *lux*-генов и их продуктов в биолюминесцентной реакции у бактерий. Комплекс редуктазы жирных кислот собирается из четырех субъединиц редуктазы (R), четырех субъединиц синтетазы (S) и четырех субъединиц трансферазы (T). Люцифераза является гетеродимером, состоящим из одной молекулы, содержащей  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы (Meighen E.A. 1991)

### 1.2.2 Организация *lux*-оперонов

В строении *lux*-оперонов представителей разных родов имеются существенные различия, однако наличие генов *luxCDABE* является общим. На Рисунке 2 приведена структурная организация *lux*-оперонов бактерий четырёх родов: *Aliibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*, *Photobacterium phosphoreum* и *Photorhabdus luminescens*.

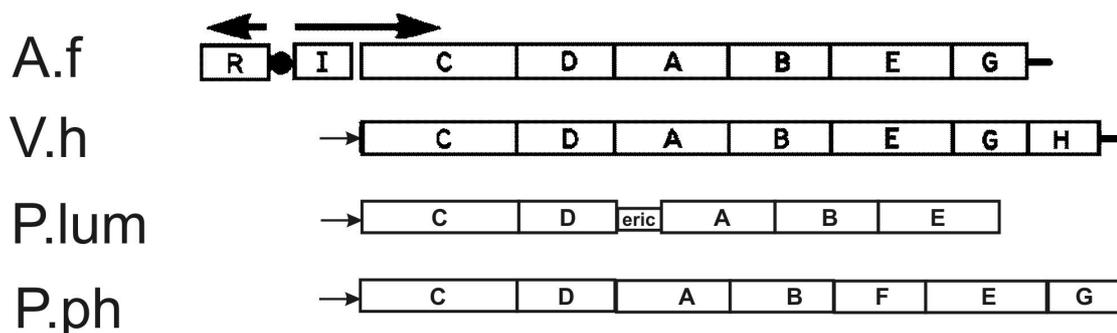


Рис.2 Структурная организация бактериальных *lux*-оперонов

A.f – *A. fishery* MJ-1 и ATCC7744;

V.h – *V.harveyi* B392;

P.lum – *Ph. luminescens* ATCC 29999;

P.ph – *P. phosphoreum* NCMB844;

eric – enterobacterial repetitive intergenic consensus;

R, I, C, D, A, B, F, E, G, H – гены *luxR*, *luxI*, *luxCDABFEGH*

(Lee C.Y. et al., 1991; Mancini J.A. et al., 1988; Г. Б. Завильгельский и др., 2002)

Кроме генов *luxCDABE*, входящих в состав всех бактериальных *lux*-оперонов, некоторых бактерий содержат дополнительные гены *luxF*, *luxG*, *luxH*. Роль *luxF* и *luxG* в биолюминесценции бактерий стала известна сравнительно недавно. *LuxG* является NADH-FMN оксидоредуктазой, ускоряющей восстановление флавина (Nijvirakul S. et al., 2007). Белок *LuxF* имеющийся у представителей рода *Photobacterium*, отличающихся повышенной способностью к биолюминесценции, связывается с производными флавина, которые возникают как побочный продукт люциферазной реакции из флавина и жирного альдегида (Bergner T. et al., 2015).

Роль гена *luxH* для биолюминесценции до сих пор остаётся под вопросом. *LuxH* является гомологом белка *RibB*, который является 3,4-дигидрокси-2-бутанон 4-фосфат синтетазой (биосинтез рибофлавина).

В *lux*-опероне бактерий *A. fisheri* расположены также регуляторные гены *luxR* и *luxI*, участвующие в регуляции люминесценции *A. fisheri* по принципу «quorum sensing» (QS), определяющему скоординированное резкое усиление биолюминесценции в ответ на достижение определённой плотности клеток.

### 1.2.3 Сравнение структуры *lux*-оперонов представителей рода *Aliivibrio*

У биолюминесцирующих бактерий *A. logei* и *A. fischeri* экспрессия *lux*-генов регулируется «quorum sensing» системой первого типа, определяющей яркость свечения делящихся клеток в зависимости от их количества: отсутствие испускания света при низкой плотности бактериальной популяции и резкое возрастание свечения при достижении клетками критической концентрации (Dunlap, P. V., 2013; Fuqua, W.C., 1994; Meighen E. A.; 1991). На Рисунке 3 изображено строение *lux*-регулонов, *A. logei*, *A. salmonicida*, *A. fischeri*.

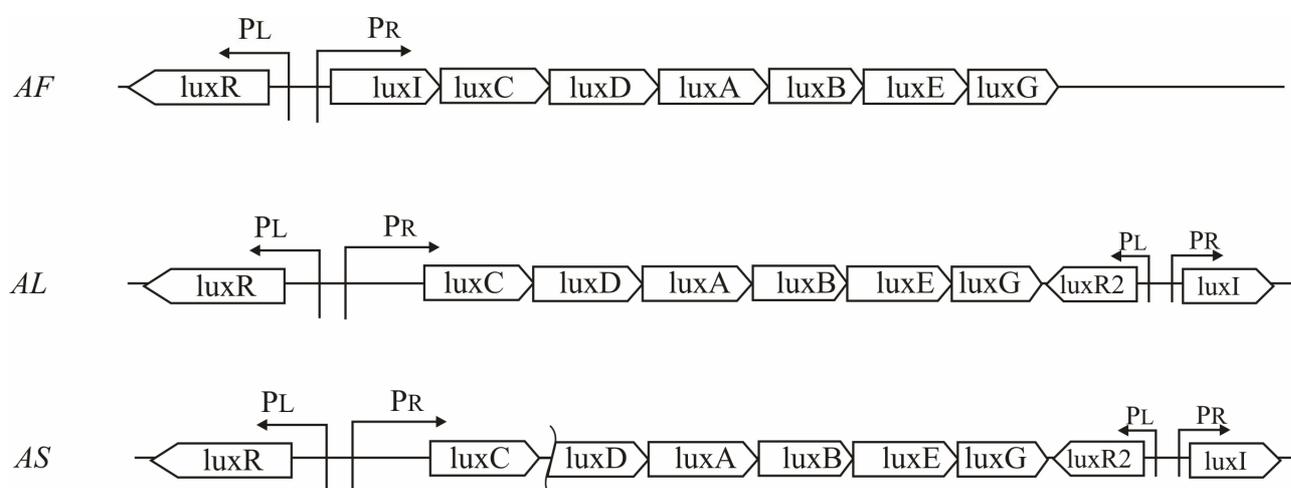


Рис. 3 Организация генов бактериальных *lux*-регулонов *A. logei* KCh1 (AL), *A. salmonicida* (AS) и *A. fischeri* (AF) (Engebrecht J. et al., 1984; Manukhov I.V. et al., 2011)

*Lux*-регулон *A. fischeri luxRICDABEG* содержит два оперона: *luxR* с промотором *Pl*, и *luxICDABEG* с промотором *Pr* (Eberhard A., et al., 1984; Хмель, И. А. и Метлицкая А.З., 2006). Гены *luxI* кодируют ацилсинтазу аутоиндуктора (АИ). АИ представляет собой низкомолекулярную молекулу (ацильное производное лактона L-гомосерина), которая свободно проникает сквозь клеточную стенку, имеет значение в коммуникации бактерий (Engebrecht J., et al., 1984; Eberhard A., et al., 1981). Ген *luxR* кодирует регуляторный белок LuxR, который в связанном состоянии с АИ в виде гомодимера взаимодействует с последовательностью ДНК (*lux*-бокс), и активировать транскрипцию оперона *luxICDABEG*. Отметим, что последовательность *lux*-бокса представляет собой палиндром из 20 пар нуклеотидов (п.н.) в *Pr* промоторной области (Kaplan H.B.

and Greenberg E.P., 1985; Завильгельский Г.Б. и Манухов И. В., 1997; Манухов И. В. и др., 2006). Гены *luxAB* отвечают за структуры  $\alpha$ - и  $\beta$ - субъединицы люциферазы. Структурные гены *luxCDE* кодируют субъединицы редуктазы, которая отвечает за синтез тетрадеканала. Тетрадеканаль служит субстратом люциферазы (Meighen E.A., 1991; Baldwin T.O. et al., 1995; Tu S.-C. and Mager H.L., 1995; Winson M.K. et al., 1998).

Структура *lux*-регулона *A. logei* отличается от таковой у *A. fischeri* наличием двух регуляторных генов *luxR*, которые называют *luxR1* и *luxR2*, а также отсутствием гена *luxI* перед геном *luxC*. При этом ген *luxI* вынесен за пределы *lux*-оперона. В *lux*-регулоне у *A. logei* последовательность между *luxR1* и промотором Pr1 составляет более 500 п.н., у *A. fischeri* эта последовательность короче и содержит 200 п.н. (Хрульнова С. А. и др., 2011; Manukhov, I.V., 2011).

Структура *lux*-регулона *A. logei* схожа с таковой патогенного для лосося вида *A. salmonicida*. В *lux*-регулоне *A. salmonicida* так же имеется две копии гена *luxR*, а ген *luxI* вынесен за пределы *luxCDABEG* оперона (Fidopiastis P.M. et al., 1999). Следует отметить, что клетки *A. salmonicida*, несмотря на наличие *lux*-оперона, не способны к биолюминесценции, это связано с делецией 5'-конца гена *luxD* (Хрульнова и др., 2011) (Рис. 3), стоит отметить, что при этом, QS система работает исправно.

#### 1.2.4 Системы «quorum sensing» первого типа

На текущий момент система QS регуляции *lux*-оперона мезофильной бактерий *A. fischeri* хорошо изучена (Nealson et al., 1970; Eberhard A., 1972; Engebrecht J., et al., 1983; Ulitzur and Dunlop, 1995; Ulitzur S., 1999, Cohn D.H. et al., 1983). Система QS регулирует интенсивность свечения клеток в зависимости от их плотности. Клетки не светятся, когда их мало. Однако, в позднелогарифмической и стационарной фазе роста, когда клетки достигают порогового количества, происходит многократное усиление свечения. Основные регуляторы LuxR и LuxI экспрессии *lux*-оперона *A. fischeri* определили название подобных систем – «типа LuxI/LuxR» или «QS система первого типа» (Рис. 3)

(Fuqua & Winans, 1994; Fuqua C. et al., 1996; Завильгельский Г.Б. и Манухов И.В., 2001; Хмель И.А. и Метлицкая А.З., 2006).

В открытом океане количество клеток *A. fischeri* составляет не более 100 клеток в миллилитре, в таких условиях люминесценция отсутствует. В замкнутой системе происходит нарастание плотности клеток выше порогового уровня  $10^7$  клеток/мл, например, в фотофорах морских животных или *in vitro*. Высокая плотность клеток влечет за собой усиленную экспрессию *lux*-оперона и, как следствие, приводит к возрастанию интенсивности биолуминесценции.

QS система *A. fischeri* имеет два ключевых гена: *luxI* и *luxR*, которые кодируют регуляторные белки LuxI и LuxR соответственно (QS система первого типа). Белок LuxR является положительным регулятором транскрипции *lux*-оперона, состоит из 250 аминокислотных остатков (а.о.), содержит два домена. С-концевой домен (а.о. 157-250) взаимодействует с ДНК. N-концевой домен связывается с АИ и блокирует активность С-домена, когда АИ отсутствует. Белок LuxR в комплексе с АИ связывается с определенной последовательностью ДНК (*lux*-бокс) (Рис. 4).

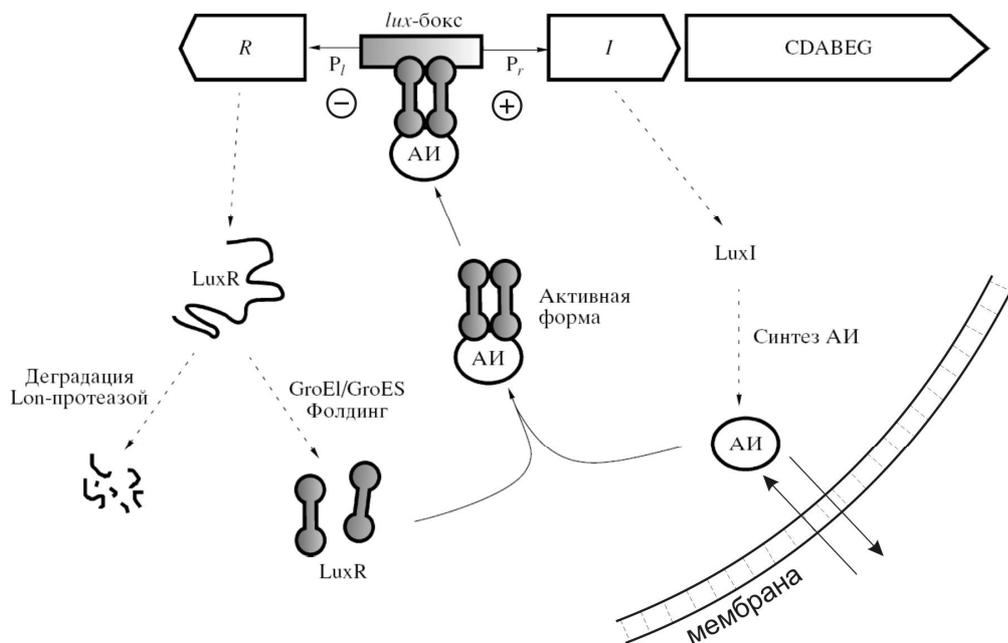


Рис. 4 Схема регуляции *lux*-оперона морских бактерий *A. fischeri*

Последовательность *lux*-бокса лежит на расстоянии  $-42,5$  от  $+1$  от начала транскрипции *lux*-оперона в области промотора P<sub>r</sub> и представляет собой палиндром из 20 пар нуклеотидов (п.н.) (Рис.5).



Рис. 5 Структурная организация области правого промотора P<sub>r</sub>. Чертой выделены последовательности *lux*-бокса, мотив TATAGT, первый нуклеотид мРНК. Стрелкой указаны расстояния  $-42,5$ ;  $-35$ ;  $-10$ ;  $+1$

Расстояние  $-42,5$  для формирования тесного контакта между С-доменом белка LuxR и *lux*-боксом представляется важным, т. к. согласно (Egland & Greenber, 1999; Kaplan & Greenberg, 1985) при его увеличении более чем на 5 нуклеотидов индукция транскрипции не происходит. Промотор P<sub>r</sub> не содержит консенсусную последовательность  $-35$  TTGACA и является «слабым».

Белок LuxR функционирует только в виде димера. При взаимодействии с ДНК LuxR формирует два контакта с  $\alpha$ - и  $\sigma$ -субъединицей РНК-полимеразы. Индивидуально РНК-полимераза и LuxR не связываются с правым промотором P<sub>r</sub>. РНК-полимераза транскрибирует правый оперон только в контакте с комплексом LuxR-АИ. Стабильный комплекс LuxR-АИ формируется при наличии двух молекул АИ и двух копий белка LuxR. Примечательно, что в культуре клеток индукция экспрессии *lux*-оперона наступает при достижении в среде порогового количества АИ, составляющего 3 молекулы АИ на клетку.

Экспрессия гена *luxI* находится под контролем промотора P<sub>r</sub>. Возрастание концентрации белка LuxI влечет за собой резкий рост количества молекул АИ, что в свою очередь приводит к увеличению численности активных комплексов LuxR-АИ, регулирующих транскрипцию оперона *luxICDABEG* и т. д. Т.к. ген синтазы аутоиндуктора LuxI входит в состав этого оперона, при этом число молекул АИ резко возрастает, что влечет за собой усиление экспрессии *lux*-оперона и синтезу люциферазы. В результате в системе происходит

стремительное возрастание интенсивности биолюминесценции во всей популяции бактерий одновременно. QS система первого типа (LuxI/LuxR) характеризуется положительной обратной связью, когда небольшие изменения в численности молекул АИ и/или LuxR влекут за собой лавинообразное усиление биолюминесценции клеток.

QS система первого типа (LuxI/LuxR) *A. fischeri* регулирует экспрессию генов *qsrP*, *acfA* и *rib*, наряду с генами *lux*-оперона (Qin N. et al., 2007).

### 1.2.5 Ацил-L-гомосерин лактоны (АHL) и их взаимодействие с белками LuxR-семейства

Аутоиндукторы - низкомолекулярные сигнальные молекулы QS системы. АИ связывается с регуляторным белком LuxR внутри клетки, в свободном состоянии легко диффундируют через клеточную стенку. У грамотрицательных бактерий в роли сигнальных молекул и регуляторов экспрессии генов QS систем выступают ацил-L-гомосерин лактоны (АHL) У разных видов бактерий молекулы АHL отличаются количеством ацильных групп (от 4 до 18 CH<sub>2</sub>-групп) (Fuqua C. et al., 2001; Marketon M.M. et al., 2002). На третьем углероде ацильной цепи могут присутствовать оксо- или гидроксильная группы замещения, или двойные связи (Whitehead N.A. et al., 2001). На Рис. 6 приведена формула общего вида ацил-L-гомосерин лактонов, являющихся АИ QS систем первого типа.

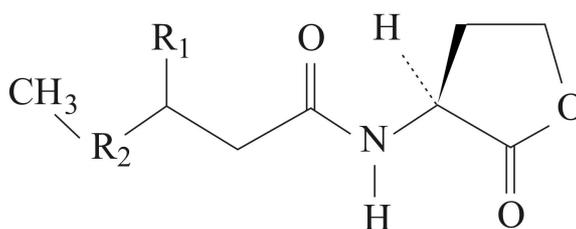


Рис. 6 Общая формула АИ QS систем первого типа у бактерий  
N-AHL; R<sub>1</sub>-H, OH или O; R<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2-14</sub> или CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH

АHL-синтазы подразделяют на три семейства. АHL-синтазы семейства LuxI являются основными и часто встречаемыми у бактерий более чем у 50 различных видов. АHL-синтазы класса LuxI применяют в качестве субстратов S-аденозилметионин (SAM) и ацил-коэнзим А. Ко второму семейству относятся

AHL-синтазы, обнаруженные только у бактерий рода *Vibrio*: AinS у *A. fischeri*, VanM у *V. anguillarum*, LuxM у *V. harveyi*. Третье семейство состоит из одной синтазы HdtS, выявленной у *Pseudomonas fluorescens*.

В подавляющем большинстве QS системы регулируют экспрессию вирулентных генов и формирование биопленок, то есть, контролируют взаимодействие бактериальных клеток с эукариотическими клетками хозяина и их колонизацию (Smith R.S. and Iglewski B.H., 2003; Ruwandeeepika H.A. et al., 2010). Например, QS система определяет экспрессию вирулентных генов у болезнетворных для человека бактерий: *Pseudomonas aeruginosa* (Wagner V.E. et al., 2003; Schuster M. et al., 2003), *Yersinia pseudotuberculosis* (Atkinson S. et al., 1999), а также фитопатогенов *Erwinia carotovora* (Whitehead N.A. et al., 2002). У большинства патогенных бактерий QS система участвует в модулировании экспрессии генов, необходимых для существования бактерий в организме хозяина. Координированная экспрессия факторов вирулентности всеми клетками бактериальной популяции позволяет возбудителю выживать в организме хозяина и успешно преодолевать систему защиты.

Химически синтезированные аналоги естественных АИ, которые ингибируют активность QS систем, можно использовать как лекарственное средство, оказывающее подавляющее воздействие именно на патогенные свойства бактерий, но не на их рост, в отличие от антибиотиков (Smith R.S. and Iglewski B.H., 2003).

Получены данные о подавлении QS регуляции аналогами AHL, несущими модификации в различных частях молекулы - в ацильных цепях и гомосеринлактонном кольце. Длина ацильной цепи имеет существенное значение для активности AHL. Аналоги AHL с более длинными, чем у нативных AHL, ацильными цепями могли быть ингибиторами активности QS систем (McClellan et al., 1997). Замена 3-оксо-групп на 3-гидроксильные или метильные, введение ненасыщенных связей в ацильные цепи приводит к значительному снижению активности AHL (Suga and Smith, 2003).

Обнаружено также, что фураноны, аналоги гомосеринлактона, в том числе галогенированные, являются природными антагонистами аутоиндукторов QS системы. (Givskov M. et al., 1996; Bauer & Robinson, 2002; Koch B. et al., 2005). Выявлено, что галоген-содержащие фураноны, изолированные из красных водорослей *Delisea pulchra*, специфически взаимодействуют с LuxR белком из *A. fischeri*, замещая молекулы гомосеринлактона (Manefield M. et al., 2002).

АИ связываются с белком LuxR и активируют его. Белок LuxR является регулятором транскрипции *lux*-оперона (Minogue T.D. et al., 2002). Представляется интересным изучить способность синтетических аналогов АИ индуцировать экспрессию генов QS системы. Химически синтезированные АИ, близкие по строению основному естественному АИ, индуцируют QS систему с меньшей силой, при этом менее сходные аналоги демонстрируют более слабую активность (Chhabra S.R. et al., 1993; Zhu J. et al., 1998). В некоторых случаях синтетические аналоги АИ функционируют в качестве антагонистов природного АИ, тем самым ингибируют индукцию целевых генов QS системы (Passador L. et al., 1996; Schaefer A.L. et al., 1996).

В Таблице 1 собраны основные регуляторные QS системы первого типа. Гомологи LuxI, синтезирующие производные N-AHL, по-видимому, участвуют в метаболизме жирных кислот на разных уровнях. Гомологи LuxI присоединяют N-ацильную группу к лактону L-гомосерина, который образуется из S-аденозилметионина. В результате этой реакции многие ферменты, аналоги LuxI, синтезируют смесь производных N-AHL. Например, LasI синтезирует наряду с основным продуктом OdDHL минорные соединения OHHL и OOHHL (Pearson J.P. et al., 1994), а синтаза RhlII помимо мажорного продукта BHL продуцирует минор HHL в соотношении 15:1 (Pearson J.P. et al., 1995).

Кроме бактерий, перечисленных в Таблице 1, ряд не люминесцирующих бактерий обладает QS системой первого типа (LuxI/LuxR): *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *Erwinia herbicola*, патогенные штаммы *E. coli* (Fuqua W.C and Greenberg E.P., 1998; Sperandio V. et

al., 1999). Клетки *E. coli* K12 и *Salmonella typhimurium* также обладают регуляторной QS системой: ген *sdhA* кодирует сигнальный рецептор, гомолог LuxR, способный в ответ на АИ из бактерий *A. fischeri* и *V. harveyi* активировать транскрипцию *ftsQAZ* (Garcia-Lara J. et al., 1996; Ahmer B.M. et al., 1998). Синегнойная палочка *Pseudomonas aeruginosa* – бактерия патогенная для человека, имеет две QS системы первого типа: *las* – система (гены *lasR-lasI*, АИ - 3-охо-C12-HSL) контролирует синтез различных вирулентных факторов: протеазы LasA и LasB, экзотоксин А и щелочную протеазу; *rhl* -система (*rhlR-rhlI* гены, АИ – C4-HSL) контролирует синтез рамнолипида, пилей типа IV, формирование биопленки и др. (Glessner A. et al., 1999; Whiteley M. et al., 1999; Parsek M.R. and Greenberg E.P., 2000).

Только у грамотрицательных бактерий выявлены QS системы первого типа, функционирующие с участием аутоиндукторов N-ацил-гомосерин лактонов. У грамположительных бактерий системы такого типа не обнаружены.

Табл. 1 Системы QS у различных видов бактерий

Вид	Функция	Система	АИ
<i>Aliivibrio fischeri</i>	Биолюминесценция	<i>luxI-luxR</i>	N-(3-оксогексаноил)-лактон L-гомосерина (ОННЛ или АИ-1))
		<i>ainS-ainR</i>	N-октаноил-лактон L-гомосерина (ОНЛ или АИ-2)
<i>Vibrio harveyi</i>	Биолюминесценция	<i>luxL, luxM</i>	N-(3-гидроксибутаноил)лактон L-гомосерина (НВНЛ или АИ-1)
		<i>luxR, luxN</i>	
		<i>luxS-luxQ</i>	АИ-2
<i>Erwinia carotovora</i>	Синтез карбапенема (антибиотик)	<i>carI-carR</i>	N-(3-оксогексаноил)-лактон L-гомосерина (ОННЛ)
	Синтез гидролитических ферментов (пектиназы, целлюлазы и др.)	<i>ecaI-ecaR (expI-expR)</i>	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Факторы конъюгативного	<i>traR-traI</i>	N-(3-оксооктаноил)-лактон L-гомосерина

Вид	Функция	Система	АИ
	переноса Ti-плазмид		(OOHL)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Факторы вирулентности (токсин А, эластаза)	<i>lasI-lasR</i>	N-(3-оксододеcanoил)-лактон L-гомосерина (OdDHL,3OC12-HSL)
	Факторы вирулентности и вторичные метаболиты (рамнолипиды)	<i>rhlI-rhlR</i>	N-бутаноил-лактон L-гомосерина (BHL, C4-HSL)

АHL включают гомосеринлактонное кольцо и боковые ацильные группы. В настоящее время описано более 40 молекул гомосеринлактона, отличие которых состоит в длине и структуре ацильных цепей. Расхождения в структуре молекулы задают специфичность действия АHL. Количество атомов углерода меняется от C4 до C14, в положении C3 может происходить замена на окси- и кето- группы (Рис. 6). АHL с короткими углеродными цепями легко проникают сквозь мембраны клеток. АHL с длинными углеродными цепями нуждаются в активном транспорте (Sitnikov D.M. et al., 1996).

Системы QS определяют не только взаимосвязи бактерий между собой, но и взаимоотношения клеток растений и животных с бактериальными клетками (Parsek M.R. and Greenberg E.P., 2000).

### 1.2.6 QS системы первого типа психрофильных бактерий *A. logei* и *A. salmonicida*

Особенностью QS системы психрофильных бактерий *A. logei* и *A. salmonicida* является наличие двух копий регуляторного гена *luxR* (получивших названия *luxR1* и *luxR2*) (Хрульнова С. А. и др., 2012) (Рис 3).

Последовательность *lux*-боксов (сайта связывания LuxR регулятора) у представителей *A. logei* и *A. salmonicida* не различается, что позволяет предположить одинаковый характер QS регуляции для этих видов.

В диссертационном исследовании (Манухов И.В., 2011), было показано, что регуляторные белки LuxR *A. fischeri* и LuxR2 *A. logei* обладают одинаковой чувствительностью к АИ, которая выше таковой у белка LuxR1 *A. logei* (Рис.7).

Данный эффект можно было объяснить как тем, что белок LuxR1 менее чувствителен к АИ, чем LuxR2, так и тем, что промотор Pr1 слабее Pr2. В настоящей диссертационной работе подробно исследована способность LuxR2 оказывать влияние на активацию экспрессии с промотора Pr1 и, наоборот, влияние LuxR1 на промотор Pr2, проведено сравнение промоторов Pr1 и Pr2 в гетерологичной системе *E. coli*.

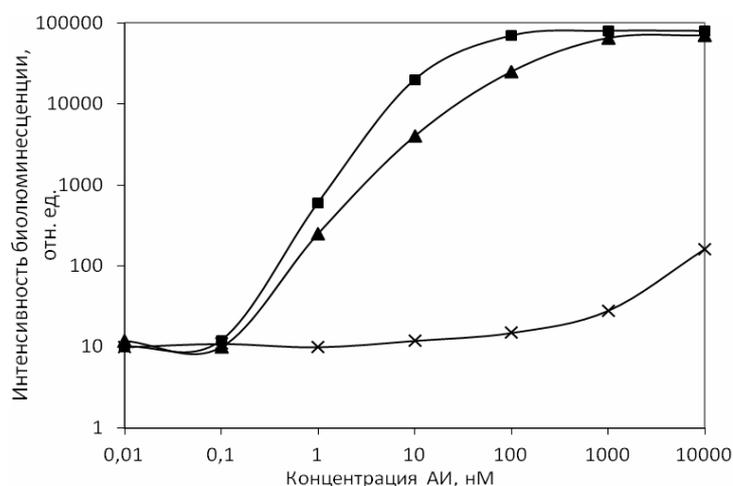


Рис. 7 Сравнение чувствительности к АИ белков LuxR *A. fischeri* (■), LuxR1 (×) и LuxR2 (▲) *A. logei* (Манухов И.В., 2011)

Синтез АИ, осуществляемый продуктом гена *luxI* в *A. salmonicida* подробно описан в работе (Hansen H. et al., 2015). Было показано, что в процессе роста клетками *A. salmonicida* синтезируется ряд различных АИ – ацильных производных лактона L-гомосерина. В максимальном количестве синтезируется основной АИ N-3-оксогексаноил лактона L-гомосерин. При этом мутации как в гене *luxR1*, так и в гене *luxR2* существенно снижают эффективность синтеза АИ. Кроме того, была показана взаимосвязь QS систем LitR/AinS и LuxR/LuxI. В мутантах по гену *ainS*, кодирующему фермент биосинтеза N-октоноил лактона L-гомосерина (C8-HSL), несколько снижается синтез и других АИ, синтезируемых белком LuxI. Авторы полагают, что QS система *lux*-оперона LuxR/LuxI опосредованно через LitR/AinS может влиять на подвижность, колонизацию, образование биоплёнок и в целом на вирулентность *A. salmonicida*. В данной работе авторы предполагают, что формируется гетеродимер LuxR1/LuxR2, который, по-видимому, важен, для работы QS системы (Рис. 8).

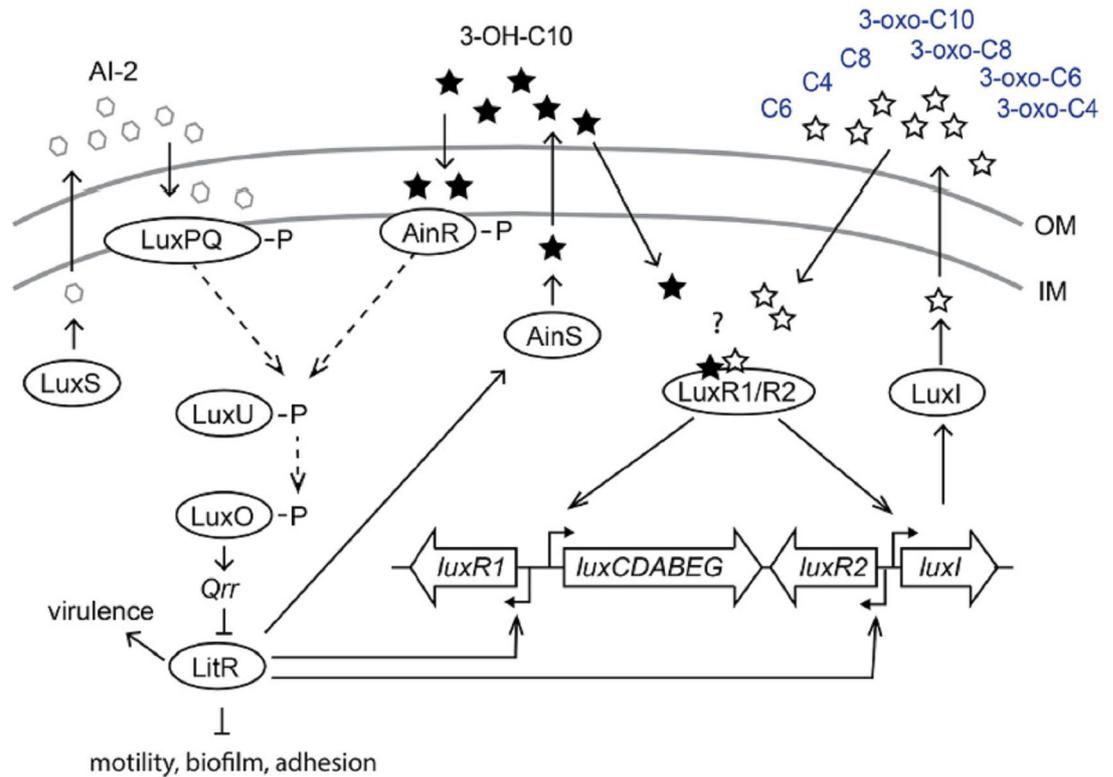


Рис.8 Модель QS системы в *A. salmonicida* LFI1238. Синтазы LuxS, LuxI и AinS производят различные молекулы AHL (3-OH-C<sub>n</sub>) и AI-2 (AI-2), которые свободно проникают через внутреннюю (IM) и наружную (OM) мембраны и взаимодействуют с гетеродимером LuxR1/LuxR2 и белками AinR и LuxPQ. Неизвестно, с какой из молекул AHL связываются белки LuxR1 и LuxR2 (показано со знаком вопроса). Сигнальный путь LuxS/LuxPQ может стать неактивным вследствие мутаций в рамке считывания в *luxP*. При низкой плотности клеток в каскаде LuxS/LuxPQ первыми фосфорилируются LuxPQ и AinR, затем LuxU, который фосфорилирует LuxO (показано пунктирными стрелками). LuxO вероятно регулирует экспрессию *Qrr*, белок которого в свою очередь контролирует синтез основного регулятора LitR. При высокой концентрации AI происходит активная экспрессия *litR*, белок которого регулируют синтез AinS, а также регулируют формирование биопленки, подвижность, адгезию, вирулентность и биолюминесценцию клеток. Вероятно, что и LitR, и оба белка LuxR1 и LuxR2 вовлечены в регуляцию *lux*-оперона (Hansen H. et al., 2015)

### 1.3 Внутриклеточные факторы регуляции экспрессии генов, входящих в опероны QS систем

Системы QS обладают обратной положительной связью и не требуют дополнительных факторов для своего проявления. Тем не менее, в клетке присутствуют молекулы, способные модулировать активность QS системы на

транскрипционном или посттрансляционном уровнях, объединенные под общим названием внутриклеточные факторы регуляции.

### 1.3.1 Н-NS регуляция

Гистоноподобный структурирующий белок нуклеоида Н-NS (histone-like nucleoid structuring protein) в бактериальной клетке выступает в качестве репрессора промотора *lux*-оперона. Однако, регулятор LuxR способен активировать экспрессию генов *luxCDABE* на фоне индуцируемой Н-NS репрессии (Завильгельский и Манухов, 1997; Ulitzur S., 1998).

Существуют механизмы регуляции транскрипции гена *luxR*, зависящие от количества молекул синтезированного белка LuxR. Во-первых, при низкой концентрации LuxR, а, следовательно, при низкой концентрации АИ и малой плотности бактериальной популяции, транскрипция с левого промотора P<sub>l</sub> индуцируется комплексом сAMP-CRP, а не комплексом АИ-LuxR. Транскрипционный фактор CRP формирует комплекс с сAMP, что делает возможным его связывание с ДНК и приводит к активации транскрипции целевых генов (Egland K.A. and Greenberg E.P., 2000).

Комплекс CRP-сAMP влияет на транскрипцию обоих оперонов. В присутствии АИ и его рецептора LuxR транскрипция оперона всех люминесцирующих белков за исключением гена рецептора активируется комплексом CRP-сAMP, а в отсутствие рецептора LuxR комплекс CRP-сAMP подавляет транскрипцию этого оперона. Транскрипция оперона кодирующего LuxR стимулируется CRP-сAMP в отсутствие самого рецептора АИ. Эти результаты подчеркивают важную роль комплекса CRP-сAMP, необходимого для контроля над люминесцентной системой бактерий *A. fischeri*, и демонстрируют, что транскрипция генов *lux*-оперона регулируется сложным механизмом. Во-вторых, при высокой концентрации белок LuxR способен подавлять собственную транскрипцию. Роль LuxR в качестве супрессора при высоких собственных концентрациях заключается в ограничении QS системы сверху, с целью избежать

излишней траты энергии клетки на свечение, которая необходима для синтеза продуктов *lux*-оперона.

### 1.3.2 Участие шаперонина GroEL/ES и протеазы Lon в сборке и деградации белка LuxR, активатора транскрипции генов *lux*-оперона *A. fischeri*

В отличие от довольно просто построенных шаперонов (состоящих из одной-двух полипептидных цепей – субъединиц), шаперонины представляют собой сложные олигомерные структуры. Первый крупный олигомерный шаперон (GroEL) был обнаружен в клетках *Escherichia coli* в начале 70-х годов как белок, необходимый для сборки фага лямбда (Hemmingsen S.M. et al., 1988). Было показано, что он способен нековалентно связываться с мономерной формой белка В фага лямбда, обеспечивая сборку головки фага. В клетке шаперонин GroEL может взаимодействовать как с вновь синтезируемыми белками, так и с белками, которые по каким-либо причинам утратили свою жесткую структуру. Нарушения экспрессии гена *groEL* приводят к гибели клеток.

В 1992 г. две группы исследователей независимо друг от друга выявили, что при введении плазмиды с полным *lux*-опероном *A. fischeri* в клетки *E. coli* мутантные по *gro* уровень свечения клеток существенно падал (Adar Y. et al., 1992; Dolan K.M. and Greenberg E. P., 1992). Было предложено, что шаперонин GroEL/ES участвует в фолдинге белка LuxR.

В настоящем исследовании изучена роль шаперонина GroEL/ES в активации QS системы психрофильных бактерий *A. logei*.

Протеаза Lon деградирует белок LuxR и приводит к отрицательной регуляции QS системы *A. fischeri* (Г. Б. Завильгельский, И. В. Манухов, 1994; 1997) и негативно влияет на QS системы в бактериях *Pseudomonas putida* и *Agrobacterium tumefaciens* (Zhu S. and Winans S.C., 2001; Bertani et al., 2007;). С-концевой мотив LuxR, характеризующий связь регулятора последовательность *lux*-бокса, не является мишенью для Lon-протеазы (Мелькина О. Е., 2010).

Шаперонин GroEL/ES необходим для сборки N-терминального мотива регулятора LuxR *A. fischeri* (Manukhov I.V. et al., 2010).

Lon-протеаза принадлежит к семейству АТФ-зависимых сериновых протеаз, а.о. S679 является ключевым в процессе деградации (Botos I., et al., 2004). При замене а.о. S679A Lon-протеаза теряет свою активность, но способность присоединять субстрат сохраняется. (Завильгельский Г.Б. и др., 1999).

Главная функция протеазы Lon заключается в деградации неправильно собранных или агрегированных белков. Кроме того, фермент модифицирует или ограниченно расщепляет полипептид у ряда регуляторов транскрипции. Активатор транскрипции генов синтеза колановых кислот RcsA и ингибитор клеточного деления SulA подвержены протеолизу Lon. Как следствие клетки *E. coli* образуют на твердом агаре слизистые колонии и растут в форме филаментов при обработке ДНК-повреждающими веществами. Протеаза Lon деградирует активаторы транскрипции белков ответа на окислительный стресс SoxS и MarA (Bissonnette S.A. et al., 2010) и другие регуляторы.

В представленной диссертационной работе исследуется влияние шаперонина GroEL/ES и протеазы Lon на белки психрофильных бактерий *A. logei* – регуляторы LuxR1 и LuxR2 и их комбинацию.

#### **1.4 Фотореактивирующая способность биолюминесценции**

Происхождение бактериальной биолюминесценции остается загадкой. В настоящее время рассматриваются несколько концепций происхождения и роли бактериального свечения в экологии современной морской фауны:

1) бактериальные люциферазы могут быть включены в процессы детоксикации активных форм кислорода (АФК), что определяет защиту бактерий от АФК особенно на ранних стадиях эволюции при низких концентрациях кислорода в атмосфере (Rees J.-F. et al., 1998; Timmins G.S. et al., 2001; Szpilewska H., 2003);

2) биолюминесценция способствует репарации ДНК, что дает клеткам дополнительную защиту от летального действия коротковолнового солнечного УФ (Czyz A. 2000; Wegrzyn G. et al., 2004; Cutter K.L. et al., 2007);

3) свечение бактерий в комплексе с питательными веществами служит приманкой и способствует более эффективному процессу питания эукариотическим организмам (зоопланктон, рыбы), “bait hypothesis” (Hastings J.W. and Nealson K.H., 1977; Nealson K.H. and Hastings J.W., 1979; Zarubin M. et al., 2012).

В работе (Kozakiewicz J. et al., 2005) было показано, что морские бактерии различных видов *V. harveyi*, *A. fischeri*, *P. leiognathi*, *P. phosphoreum* более чувствительны к УФ-облучению по сравнению с клетками дикого типа, если содержат мутации в генах *lux*-оперона. Было предположено, что биолюминесценция активирует фотореактивирующий фермент (фотолиазу), которая мономеризует циклобутановые пиримидиновые димеры в ДНК. Однако, в работе (Walker E.L et al., 2006), проведенной на морских бактериях *A. fischeri* ES114, содержащих мутацию в гене *phr* (кодирует фотолиазу) или делецию генов *luxCDABEG*, показано, что биолюминесценция не активирует фотолиазу, а добавление к дикому штамму аутоиндуктора N-3-оксо-гексаноил гомосерин лактон (3-охо-С6-HSL), повышая УФ-резистентность клеток, не зависит как от наличия активной фотолиазы, так и от интенсивности свечения.

Вызывает сомнение важность в процессе эволюции свечения у морских бактерий для репарации ДНК в связи с низкой интенсивностью свечения при концентрациях бактерий, характерных для планктона и не превышающих критическую концентрацию, при которой срабатывает QS система (Li Z. and Nair S.K., 2012).

В настоящей работе был проведён анализ влияния интенсивности биолюминесценции на репарацию ДНК на модели бактерий *Escherichia coli* с использованием гибридных плазмид, содержащих гены *lux*-оперонов различных светящихся бактерий, расположенных как под промотором QS системы, так и под

конститутивными промоторами. В работе использовали, наравне 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 протеаза Lon). Мутант *E. coli lon* характеризуется значительным усилением экспрессии *lux*-генов в связи с отсутствием деградации LuxR, белка – активатора транскрипции QS системы (Г.Б.Завильгельский и И.В. Манухов, 1994; 2010)

### **1.5 Использование *lux*-оперонов для определения несимметричного диметил гидразина**

Lux-опероны и индуцируемые бактериальные промоторы всё чаще находят применение в экотоксикологических работах. В ходе выполнения диссертационной работы была поставлена прикладная задача по созданию системы биодетекции токсичных компонентов ракетного топлива. Известен способ определения НДМГ и продуктов его окисления в окружающей среде физико-химическими средствами (Дмитриев О.Ю. и др. 2004; Лопырев В.А. и др., 2001; Кузнецова Л.В. 2004), который заключается в проведении фотометрического анализа продуктов распада НДМГ или высокоразрешающего хроматографического (газовая хроматография) разделения химических соединений с масс-спектрометрическим детектированием (Дмитриев О.Ю. и др. 2004), и идентификации НДМГ и его продуктов распада с помощью методов ЯМР и инфракрасной спектроскопии (Лопырев В.А. и др., 2001). Недостатком химических методов является необходимость использования дорогостоящей аппаратуры, а также сложность проведения анализа в связи с высокой нестабильностью НДМГ (Кузнецова Л.В. 2004).

В настоящее время широкое распространение для определения загрязнения окружающей среды токсичными веществами получили методы биотестирования с использованием *lux*-биосенсоров. Известны методы, основанные на тушении биолюминесценции токсикантами, в которых используется механизм ингибирующего действия ядовитых веществ на метаболизм клетки, в основном,

на дыхательную цепь, что опосредованно влияет на люциферазную реакцию, вызывая ослабление интенсивности биолюминесценции клеток. В этой серии методик, используемых в качестве экспресс-контроля токсичности природных сред, наибольшее распространение в странах Европы и в США получил Микротокс, в котором в качестве биосенсора используются лиофилизированные морские бактерии *Photobacterium phosphoreum*. В России в подобных тестах используется штамм *Escherichia coli*, с генами *lux*-оперона морских люминесцирующих бактерий *Photobacterium leiognathi* («Эколюм-08») (Дерябин Д.Г. и др. 2007). Недостатком метода является неспецифичность реакции и невысокая чувствительность. Для идентификации химического соединения, вызвавшего уменьшение интенсивности свечения клеток, требуется дополнительный анализ.

На основе бактерий *E. coli lux*-биосенсоры, содержащие плазмиды с *lux*-генами под контролем индуцируемых стрессовых промоторов, применяют в детекции токсикантов (La Rossa R-A et al., 1997). Эти *lux*-биосенсоры применяются для определения нитратов, фенолов, бензина и других токсикантов, но не для обнаружения в среде НДМГ или продуктов его окисления. Для определения в среде НДМГ используют набор *lux*-биосенсоров в патенте (Завильгельский Г. Б. и др. Патент РФ № 2297450 от 2007.04.20) При использовании данного набора вклад в общую токсичность генотоксичных производных НДМГ оценивается только по активации промотора бактериального SOS ответа -  $P_{гесА}$ , оставляя без внимания алкилирующие соединения, не останавливающие репликационную вилку. Прикладное направление настоящей диссертационной работы состояло в совершенствовании *lux*-биосенсоров и методики их применения для детекции генотоксичных компонентов ракетного топлива.

## Глава 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы и методы исследования

#### 2.1 Бактериальные штаммы

Объектом представленного исследования являются новые штаммы психрофильных морских люминесцирующих бактерий, изолированные в Белом, Беринговом, Охотском, Балтийском морях в разные сезоны года. Собранные образцы микрофлоры кишечника высеивали на чашки Петри с агаризованной средой SWT, инкубировали при 4°C. Через три дня в темной комнате выявляли светящиеся колонии, которые пересевали, чередуя жидкую и агаризованную среду SWT до получения чистой культуры. Ряд изолированных штаммов депонирован во ФГУП ГосНИИгенетика (Табл. 2).

Табл. 2 Бактериальные штаммы, собранные в Белом, Охотском, Беринговом, Балтийском морях

№	Штамм	№ ВКПМ	Источник
Штаммы, изолированные в зимний период в студеных морях			
1	<i>A. logei</i> BM1	В-10407	Белое море, Ругозерская губа, керчак <i>Myoxocephalus scorpius</i> , желудочно-кишечный тракт (ЖКТ)
2	<i>A. logei</i> BM2	В-11095	Белое море, Великая Салма, керчак <i>M. scorpius</i> , ЖКТ
3	<i>A. logei</i> KCh1	В-10409	Охотское море, мыс Левашова, бычок <i>Cottida sp.</i> , ЖКТ
4	<i>A. logei</i> KCh2	В-10410	оз. Калагирь (восточное побережье Камчатки), корюшка <i>Hypomesus olidus</i> , ЖКТ
5	<i>A. logei</i> KCh3	В-11096	
6	<i>A. logei</i> KCh5	В-11097	
7	<i>A. logei</i> KCh7	В-11102	
8	<i>A. logei</i> KCh8	В-11101	
9	<i>Aliivibrio sp.</i> NML	В-11098	мыс Левашова, эстуарий реки Большая, дальневосточная навага <i>Eleginus gracilis</i> , ЖКТ
10	<i>A. logei</i> BML1	В-12137	Охотское море, мыс Левашова, бычок <i>Cottida sp.</i> , ЖКТ
11	<i>A. logei</i> BML3	В-12139	
12	<i>A. logei</i> BML6	В-12142	

№	Штамм	№ ВКПМ	Источник
13	<i>A. logei</i> BML8	В-12143	
14	<i>Photobacterium sp.</i> BML2	В-12138	
15	<i>Photobacterium sp.</i> BML4	В-12140	
16	<i>Photobacterium sp.</i> BML5	В-12141	
17	<i>A. logei</i> КАМ2	В-12146	Охотское море, мыс Левашова, камбала <i>Pleuronectes sp.</i> , ЖКТ
18	<i>A. logei</i> КАМ3	В-12147	
19	<i>Photobacterium sp.</i> КАМ1	В-12145	
20	<i>Photobacterium sp.</i> КАМ4	В-12148	
21	<i>A. logei</i> SKal	-	Балтийское море, Куршская Коса, сарган <i>Belone belone</i> , ЖКТ
Штаммы, изолированные в летний период в студёных морях			
1	<i>A. logei</i> 1409	В-12193	Охотское море, мыс Левашова, дальневосточная навага <i>E. gracilis</i> , ЖКТ
2	<i>A. logei</i> 1442	-	
3	<i>Photobacterium sp.</i> 1430	-	
4	<i>Photobacterium sp.</i> 1432.2	-	
5	<i>Photobacterium sp.</i> 1437	-	
6	<i>Photobacterium sp.</i> 1439	-	
7	<i>Photobacterium sp.</i> 1463	-	
8	<i>Photobacterium sp.</i> 1464	-	Охотское море, мыс Левашова, дальневосточная навага <i>E. gracilis</i> , ЖКТ
9	<i>Photobacterium sp.</i> 1465	-	
10	<i>Photobacterium sp.</i> 1470	-	
11	<i>Photobacterium sp.</i> 1408	-	Охотское море, мыс Левашова, горбуша <i>Oncorhynchus gorboscha</i> , ЖКТ

№	Штамм	№ ВКПМ	Источник
12	<i>Photobacterium sp.</i> 1457	-	
13	<i>Photobacterium sp.</i> 1417	-	Охотское море, мыс Левашова, кета <i>Oncorhynchus keta</i> , ЖКТ
14	<i>Photobacterium sp.</i> 1402	-	Охотское море, мыс Левашова, камбала <i>Pleuronectes sp.</i> , ЖКТ
15	<i>Photobacterium sp.</i> 1405	-	
16	<i>Photobacterium sp.</i> 1445	-	
17	<i>Photobacterium sp.</i> 1448	-	Охотское море, мыс Левашова, керчак <i>Muohoccephalus</i> , ЖКТ
18	<i>Photobacterium sp.</i> 1451	-	
19	<i>A. logei</i> 1440	-	Берингово море, керчак <i>Muohoccephalus</i> , ЖКТ
20	<i>Photobacterium sp.</i> 1459	-	
21	<i>Photobacterium sp.</i> 14100	-	Берингово море, дальневосточная навага <i>E. gracilis</i> , ЖКТ
22	<i>Photobacterium sp.</i> 1449	-	Берингово море, горбуша <i>O. gorbuscha</i> , ЖКТ
23	<i>Photobacterium sp.</i> 1460	-	
24	<i>Photobacterium sp.</i> 1481	-	
Штаммы, изолированные в морях с теплыми водами			
1	<i>P. leiognathi</i> SChm1	-	Чёрное море, ставрида <i>Trachurus mediterraneus ponticu</i> , ЖКТ
2	<i>P. leiognathi</i> SChm2	-	
3	<i>P. leiognathi</i> SChm3	-	Чёрное море, ставрида <i>Trachurus mediterraneus ponticu</i> , ЖКТ
4	<i>Vibrio aquamarinus</i> SChm4	-	
5	<i>V. aquamarines</i> VNB-15T	-	Чёрное море; свободноживущие бактерии
6	<i>V. aquamarines</i> VNB-16	-	

№	Штамм	№ ВКПМ	Источник
7	<i>V. aquamarines</i> KChm1	-	Чёрное море, керчак <i>Myoxocephalus</i> , ЖКТ
8	<i>P. leiognathi</i> Chin2	-	Южно-Китайское море, о. Хайнань, ЖКТ рыб
9	<i>P. leiognathi</i> Chin5	-	

Дополнительные, использованные в работе, бактериальные штаммы представлены в Таблице 3.

Табл. 3 Бактериальные штаммы, применяемые в исследовании

№	Штамм	№ ВКПМ	Источник; характеристика штамма
1	<i>A. fischeri</i> ATCC29985T	-	МГУ, Зарубина А.П., (Завильгельский Г. Б. и др., 2002)
2	<i>A. fischeri</i> МГУ-6	-	МГУ, Зарубина А.П., (Завильгельский Г. Б. и др., 2002)
3	<i>Photorhabdus luminescens</i> ZM1	-	МГУ, Зарубина А.П.; (Завильгельский Г. Б. и др., 2002)
4	<i>A. salmonicida</i> NCIMB2262T	B-11103	Romalde J., Испания; (Beaz-Hidalgo R., et al., 2010); патогенные для лососевых рыб морские бактерии
5	<i>E. coli</i> MG1655	B-6195	ВКПМ ФГУП «ГосНИИгенетика»; F <sup>-</sup> $\lambda$ <i>ilvG-rfb-50 rph-1</i>
6	<i>E. coli</i> K12 SKB178	-	ИМГ РАН, Миндлин С.З.; F- <i>galE-sup gro+</i>
7	<i>E. coli</i> OFB1111	-	ИМГ РАН, Миндлин С.З.; <i>groE673 Gly173Asp Gly337Asp</i> , остальные генетические маркеры как у SKB178
8	<i>E. coli</i> K12 AB1157	B-1307	ВКПМ ФГУП «ГосНИИгенетика»; F- <i>thr-1 leuB6 proA2 his-4 argE3 thi-1 lacY1 galK2 ara-14 xyl-5 mtl-1 tsx-33 rpsL31 supE44</i>
9	<i>E. coli</i> K12 AB1899	B-5059	ВКПМ ФГУП «ГосНИИгенетика»; <i>lon</i> , остальные генетические маркеры как у AB1157

№	Штамм	№ ВКПМ	Источник; характеристика штамма
	<i>E. coli</i> AB1886 <i>uvrA6</i>	-	ВКПМ ФГУП «ГосНИИгенетика»; <i>uvrA6</i> , остальные маркеры, как у AB1157
	<i>E. coli</i> AB1886 <i>uvrA6</i> <i>phr::kan<sup>r</sup></i>	-	Keio collection; <i>uvrA6 phr::kan</i> (перенесен с помощью P1 трансдукции из генома <i>E. coli</i> JW0698 $\Delta(araD-araB)567 \Delta lacZ4787(::rrnB-3) \Delta phr-758::kan \lambda^- rph-1 \Delta(rhaD-rhaB)568 hsdR514$

## 2.2 Плазмиды

Использованные в работе гибридные плазмиды и их характеристика даны в Таблице 4.

Табл. 4 Плазмиды задействованные в работе

№	Плазмиды	Характеристика плазмиды, источник
1	pUC19,	Ap <sup>r</sup> ; «Fermentas» MBI
2	pUC18	Ap <sup>r</sup> ; «Fermentas» MBI
3	pACYC184	Tet <sup>R</sup> Cm <sup>r</sup> ; ВКПМ
4	pBR322	Ap <sup>r</sup> Tet <sup>R</sup> ; ВКПМ
5	pTZ57R/T	Ap <sup>r</sup> ; «Fermentas» MBI
6	pDEW201	безпромоторный вектор, содержащий репортерные гены <i>luxCDABE</i> <i>P. luminescens</i> , Ap <sup>r</sup> , (Van Dyk T. and Rosson R. A., 1998)
7	pVFR1	репортерные гены <i>luxCDABE</i> из <i>Photobacterium luminescens</i> под контролем Pr промотора (с регуляторной последовательностью <i>lux</i> -бокса) <i>lux</i> -оперона <i>A. fischeri</i> , кроме того содержит ген <i>luxR</i> под промотором P1 в векторе pDEW201, Ap <sup>r</sup> (Манухов, И. В. и др., 2006)
8	pSV16	как pVFR1, только <i>luxR2</i> ген и регуляторная область от <i>lux</i> -оперона <i>A. logei</i> KCh141, Ap <sup>r</sup> (Manukhov, I.V. et al., 2011; Khrul'nova et al., 2011)
9	pIVA	как pSV16 только ген <i>luxR1</i> промотор Pr1 из <i>A. logei</i> KCh1, Ap <sup>r</sup> (Manukhov, I.V. et al., 2011; Хрульнова С.А. и др., 2011a)

№	Плазмиды	Характеристика плазмиды, источник
10	pIV2	ген <i>luxR2</i> с собственным промотором (P12 - Pr2 область) по BamHI сайту встроен в вектор pACYC184; от Марышева И.В., ГосНИИгенетика
11	pIV3	как pIV2, но с геном <i>luxR</i> ; от Марышева И.В., ГосНИИгенетика
12	pSV10,4	полный <i>lux</i> -оперон штамма <i>A. logei</i> KCh1 в векторе pUC19; Ap <sup>r</sup> (Хрульнова С. А. и др. 2011в)
13	pF1	полный <i>lux</i> -регулон <i>A. fischeri</i> ( <i>luxRluxICDABE</i> ), встроенный по BamHI- сайту в векторе pBR322, Ap <sup>r</sup> (Zavil'gel'skiĭ G. B. et al., 1997)
14	pLeo1	вектор pUC18, содержащий гены <i>luxCDABE P. leiognathi</i> , расположенные как под собственным промотором, так и под <i>lac</i> -промотором вектора pUC18 (Zavil'gel'skiĭ G. B. et al., 2003)
15	pLeo3	вектор pUC18, содержащий под <i>lac</i> – промотором гены <i>luxABE P. leiognathi</i> (Завильгельский Г.Б. и др., 2003)
16	pKLux	гены <i>luxAB Vibrio harveyi</i> под контролем <i>lac</i> промотора (Манухов, И. В. и др., 1996)
17	pAlkA-	как pVFR1, только промотор от гена <i>alkA</i> , Ap <sup>r</sup> (Горянин И.И. и др., 2013)
18	pKatG-lux	как pVFR1, только промотор от гена <i>katG</i> , Ap <sup>r</sup> ; (Завильгельский Г. Б. и др., патент РФ № 2297450 от 2007.04.20)
19	pOxyS-lux	как pVFR1, только промотор от гена <i>oxyS</i> , Ap <sup>r</sup> , представленная работа
20	pColD-lux	как pVFR1, только промотор от гена <i>cda</i> конъюгативной плазмиды pColD-CA23, Ap <sup>r</sup> (Манухов И. В., 2009)
21	pSoxS-lux	как pVFR1, только промотор от гена <i>soxS</i> , Ap <sup>r</sup> (Завильгельский Г. Б. и др., патент РФ № 2297450 от 2007.04.20)
22	pGrpE-lux	как pVFR1, только промотор от гена <i>grpE</i> , Ap <sup>r</sup> (Завильгельский Г. Б. и др., патент РФ № 2297450 от 2007.04.20)

Структура фрагментов с *lux*-генами в биосенсорных плаزمидах pVFR1, pSV16, pIVA представлена на Рисунке 9.

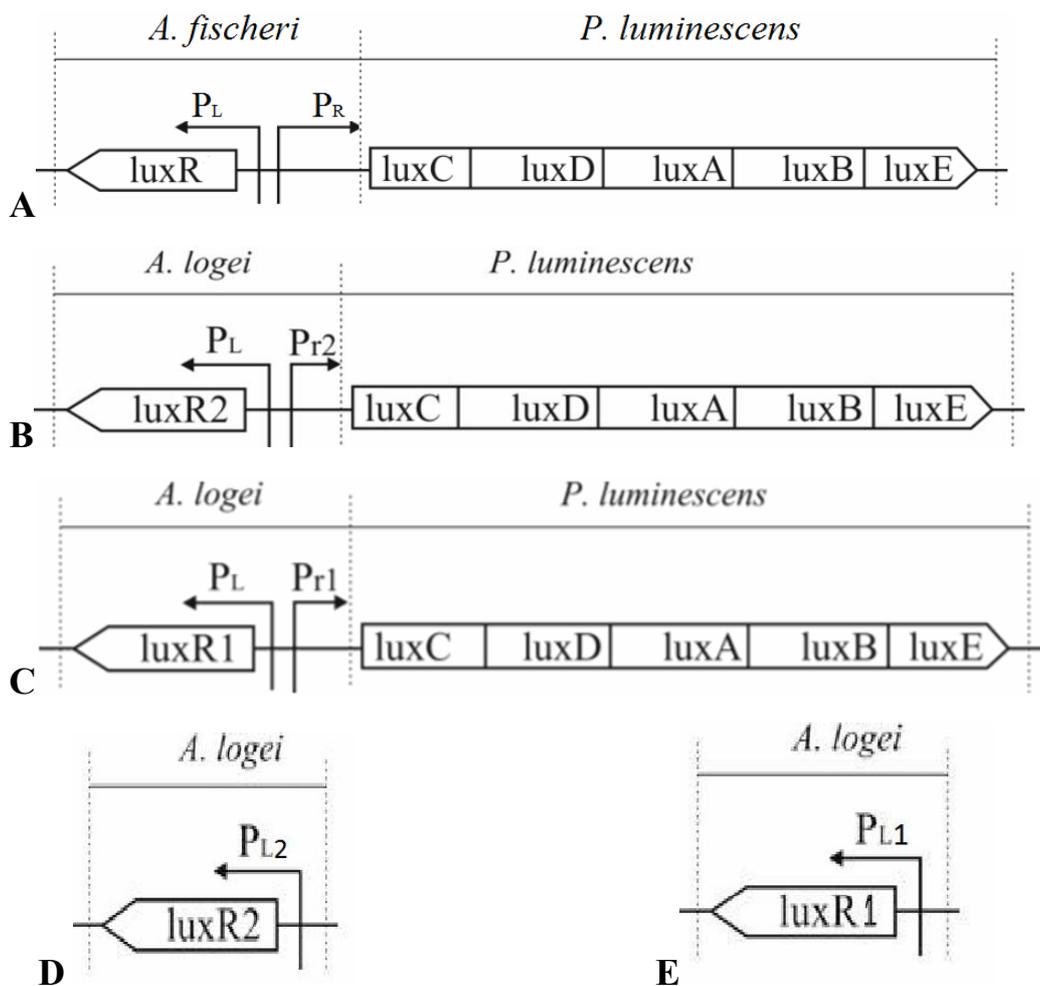


Рис. 9 Структура фрагментов с *lux*-генами в биосенсорных плаزمидах А) pVFR1; В) pSV16; С) pIVA Гены *luxCDEABE* взяты из *P. luminescens*, ген *luxR* и промоторная область из *A. fischeri*, гены *luxR1* и *luxR2* и соответствующие промоторные области из *A. logei* Манухов, И. В. И др., 2006; Manukhov I.V., et al., 2011; Хрульнова С. А. и др., 2011); D) pIV2 - ген *luxR2* с собственным промотором ( $P_{L2}$  -  $P_{r2}$  область) по BamHI сайту встроен в вектор pACYC184; E) pIV3 как pIV2, но с геном *luxR1*

### 2.3 Реактивы, ферменты, среды

В работе использовали отечественные реактивы марки не ниже ОСЧ, а также химические вещества от Sigma и Difco (США); NADH и FMN получены от Serva (Германия); ферменты для работы с ДНК получены от Fermentas (Литва); митомицин С, *n*-деканаль и аутоиндуктор N-3-оксо-гексаноил гомосерин лактон получены от Sigma Chemical Co (Чехия); при культивировании бактерий в состав

среды включали морскую соль, приобретенную в комплексном наборе микроэлементов Blue Treasure от Reafe Salt (США).

Для биохимического тестирования штаммов использовали Набор № 2 СИБ – для межродовой и межвидовой дифференциации энтеробактерий от Микроген (Россия).

Для роста морских бактерий использовали SWT– бульон и SWT-агар, для бактерий *E. coli* – L-бульон и L-агар плюс антибиотики: ампициллин (100 мкг/мл), канамицин (40 мкг/мл), хлорамфеникол (20 мкг/мл).

SWT-бульон (% , в./об.): 0,25% дрожжевого экстракта, 0,5% триптона, 1,5% морской соли и 0,3 % , об./об. глицерина. SWT-агар (% , в./об.): 0,25% дрожжевого экстракта, 0,5% триптона, 1,5% морской соли, 1.5% агар и 0,3 % , об./об. глицерина. L-бульон (% , в./об.): 1% триптона, 0.5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl. L-агар (% , в./об.): 1% триптона, 0.5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl, 1.5% агар.

## 2.5 Измерение биолюминесценции

Оптическую плотность (OD) суспензии клеток определяли при 600 нм на фотоколориметре КФК-2МП (Россия). Интенсивность свечения клеток измеряли в пробах объемом 200 мкл с помощью высокочувствительного люминометра Биотокс-7, Екоп (Россия) и микропланшетном люминометре LM-01T Immunotech (Чехия). Единицы измерения интенсивности биолюминесценции (отн. ед.) пропорциональны микровольтам на обкладках фотоэлектронного умножителя (ФЭУ). Ночную культуру разводили в LB-среде в 100 раз до концентрации клеток около  $10^7$  в мл и растили при температуре 37<sup>0</sup>С до OD=0,1 – 0,2. Объем пробы составлял 200 мкл. Контролем служила проба с добавлением дистиллированной воды (2 мкл). В другие образцы вносили по 2 мкл биологически активных веществ, например АИ. Уровень биолюминесценции полученной клеточной суспензии определяли в люминометре через определенные интервалы времени.

Средние значения рассчитывали по 5 повторам экспериментов, с расчетом стандартного отклонения согласно:

$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}, \quad (2)$$

где  $x$  — выборочное среднее (число1, число2,...), а  $n$  — размер выборки.

## 2.6 Генно-инженерные методы

Хромосомную ДНК морских люминесцирующих бактерий выделяли из клеток в фазе позднего логарифмического роста методом лизиса лизоцимом и ДСН с обработкой фенолом и переосаждением в этаноле. Гибридные плазмиды и вектора выделяли методом щелочной экстракции и набором лабораторных реагентов QIAprep SpinMiniprep Kit (США).

Рестрикцию, лигирование участков ДНК, электрофорез в агарозном геле, выделение фрагментов ДНК из агарозного геля методом электроэлюции, трансформацию кальциевых клеток проводили согласно стандартным прописям (Maniatis T. et al., 1989).

## 2.7 Мультигенный анализ

В мультигенном тесте использовали праймеры на нуклеотидные последовательности пяти house keeping генов *recA* (рекомбиназа А), *gyrB* ( $\beta$ -субъединица ДНК гиразы), *pyrH* (уридилат киназа), *rpoA* ( $\alpha$ -субъединица РНК полимеразы), *gapA* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа), гена *16S pPHK* (Ast J.C. et al., 2009) и области *luxRI-luxC* (Табл. 5).

Табл. 5 Праймеры, применяемые в диссертационной работе

Ген	Название праймера	Последовательность праймера 5'→3'
<i>gapA</i>	gapAfor1	AAGAGCGCAATGATATTGAAGTTG
	gapArev1	TAGCATCGAATACTGAAGTTTGAG
<i>gyrB</i>	22fVf	GAAGTTATCATGACGGTACTTC
	1240rVf	AGCGTACGAATGTGAGAACC
	gyrB557f	CAACGHHGATGGTGGTACNCACTTAG
	gyrB670r	CCTTCACGNGCATCATCACCAGASG
<i>pyrH</i>	pyrH-04-FW	ATGASNACBAAAYCCWAAACC
	PBPRB2966R	GAATCGGCATTTTATGGTCACG

Ген	Название праймера	Последовательность праймера 5'→3'
<i>recA</i>	recAforfisc	TCAAATTGAAAAACAATTTGGTAAAGG
	recArevfisc	ATCTTATCACCATTGTAGCTGTACC
<i>rpoA</i>	rpoA-01-F	ATGCAGGGTTCTGTDACAG
	rpoA-03-R	GHGGCCARTTTTCHARRCGC
<i>luxR-luxC</i>	SV1dir	TCACACCGCCGATGATAATTGGAA
	SV3rev	GCGCCATTTTTGTGGGTAATTATCT
<i>luxR1</i> и его регуляторная область	luxR1end	GGCCGAATTGTATGTAAAAATAAATGAG
	SV1d	TCACACCGCCGATGATAATTGGAA
<i>luxR2</i> и его регуляторная область	Revpl1	TGAAAATTAGAAGTCCGACTGCGT
	luxR2(RSt)	GTCATCCTGACCCCCTTTAATCTTT
<i>luxG</i>	SV2d	AGGTTGCTCTGAACGAACGGTT
	Sv1r	GGTGAACCAGGGTTGTTGAGCT
<i>16S pPHK</i>	Lux16SD	CGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATG
	Lux15SR	TGCAGCCCCTCCCATGGTGTGAC

Полимеразную цепную реакцию проводили на приборе Терцик, ДНК-технология (Россия) при режиме температур, подобранных в соответствии с длиной амплифицируемого фрагмента, а также с учетом количества и состава нуклеотидов, формирующих праймеры. Очистку ПЦР продуктов осуществляли набором реагентов DNA extraction kit, Fermentas (Литва).

Нуклеотидную последовательность ДНК определяли методом дидезоксинуклеотидтрифосфатов по Сэнгеру.

## 2.8 Биоинформационный анализ

Анализ сродства последовательностей генов осуществляли с таковыми типовых штаммов *A. salmonicida* ATCC 43839<sup>T</sup>, *A. fischeri* ATCC7744<sup>T</sup>, *A. logei* ATCC29985<sup>T</sup>. Правку и анализ хроматограмм сиквенирования осуществляли в программе Vector NTI 9. Выравнивание и сравнение нуклеотидных последовательностей осуществляли в BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Филогенетические деревья построены программой MEGA5.2 методом ближайших соседей (Neighbor-Joining, NJ) (Saitou N. et al., 1987; Tamura K. et al., 2007).

### **2.9 УФ-облучение и фотореактивация бактерий**

Бактерии, выросшие с аэрацией до  $OD = 0.2-0.3$ , дважды отмывали 0.02 М трис-НСl буфером (0,02М трис-НСl, 0,01 М NaCl, рН 7,8), переводили в фосфатный буфер и облучали при комнатной температуре различными дозами УФ-света ( $\lambda=254$  нм). Источником коротковолнового УФ-света служила бактерицидная лампа БУВ-30. Дозу УФ-света измеряли при помощи УФ-дозиметра с магниевым фотоэлементом (УФД-4). Выживаемость бактерий определяли путем посева на чашках Петри двуслойным методом: для верхнего и нижнего слоев чашек Петри использовали 1,8% и 0,7% LB-агар.

Источником фотореактивирующего света служила ртутная лампа высокого давления СВД-120А с фильтром ЖС-4, пропускающим свет с  $\lambda > 385$  нм. Фотореактивацию бактерий проводили в фосфатном буфере в течение 20 мин при 37°C.

## Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Филогенетический анализ психрофильных бактерий

Оптимальной средой обитания для психрофильных бактерий являются глубины от 200 м, где температура опускается ниже 15°C, а так же верхние слои студёных морей Арктики и Антарктики, прогреваемые солнечным светом. В работе (Хрульнова С. А., 2011в) было показано, что в *lux*-опероне психрофильных бактерий *A. logei* присутствуют две копии регуляторного гена *luxR*, в отличие от *lux*-оперона с одним *luxR* мезофильной бактерии *A. fischeri*. Возникли вопросы: 1) о характере дупликации регуляторных генов *luxR*: необходимость или случайность; 2) об ареале психрофильных бактерий с QS системой с двумя гена *luxR1* и *luxR2*, если дупликация закономерна и часто встречающаяся. Чтобы получить ответы, провели поиск и сбор светящихся психрофильных бактерий в холодных морях: Балтийском, Беринговом, Охотском, Белом. Сбор проводили в летний и зимний периоды, поскольку сезонные колебания температур поверхностного морского слоя оказываются значительными. Летом температура может достигать 16°C, а зимой опускаться до 4°C.

В зимний период выделен 21 штамм морских светящихся бактерий из кишечника рыб, пойманных в Охотском море: навага *Eleginus gracilis* NML, бычок *Cottida sp.* BML1-6, BML8, KCh1; камбала *Pleuronectes sp.* КАМ1-4; в Беринговом море района: корюшка *Hypomesus olidus* KCh2, KCh3, KCh5 KCh7, KCh8; в Белом море: керчак *Myoxocephalus* ВМ1, ВМ2; Балтийском море - сарган *Belone belone* SKall.

В летний период изолированы 24 штамма морских светящихся бактерий из кишечника рыб, пойманных в Охотском море: из горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* 148, 1457; из наваги *Eleginus gracilis* 149, 1430, 1432, 1442, 1437, 1439, 1463, 1464, 1465, 1470; из кеты *Oncorhynchus keta* 1417; из камбалы *Pleuronectes sp.* 1402, 1405, 1445; из керчака *Myoxocephalus* 1448, 1451; в

Беринговом море: из керчака *Myoxocephalus* 1440, 1459; из наваги *Eleginus gracilis* 14100, из горбуши *O. gorbuscha* 1449, 1460, 1481.

В качестве контроля были отобраны 9 биолюминесцирующих образцов в Чёрном море: из ставриды *Trachurus mediterraneus ponticus* SChm1, SChm2, SChm3, SChm4, из керчака *Myoxocephalus* KChm1; из воды *V. aquamarinus* VNB-15Т, *V. aquamarinus* VNB-16; в Южно-Китайском море: Chin2, Chin5.

Ряд штаммов депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИгенетика (Табл. 2).

Из всех 54 изолятов выделили хромосомальную ДНК для последующего молекулярно-генетического анализа, включающего секвенирование гена 16S рРНК и генов *lux*-оперона.

Родовую принадлежность образцов провели по последовательности 16S рРНК в сравнении с референсными штаммами (Табл.6, Рис.10).

Табл. 6 Количество изолированных штаммов и их родовая принадлежность, П–психрофил, М – мезофил

Род, вид		Зима	Лето	Всего
Студёные моря				
<i>A. logei</i>	П	16	3	19
<i>Photobacterium sp.</i>	П	5	21	26
Всего		21	24	45
Теплые моря				
<i>P. leiognathi</i>	М	-	5	5
<i>V. aquamarinus</i>	М		4	4
Всего		21	34	54

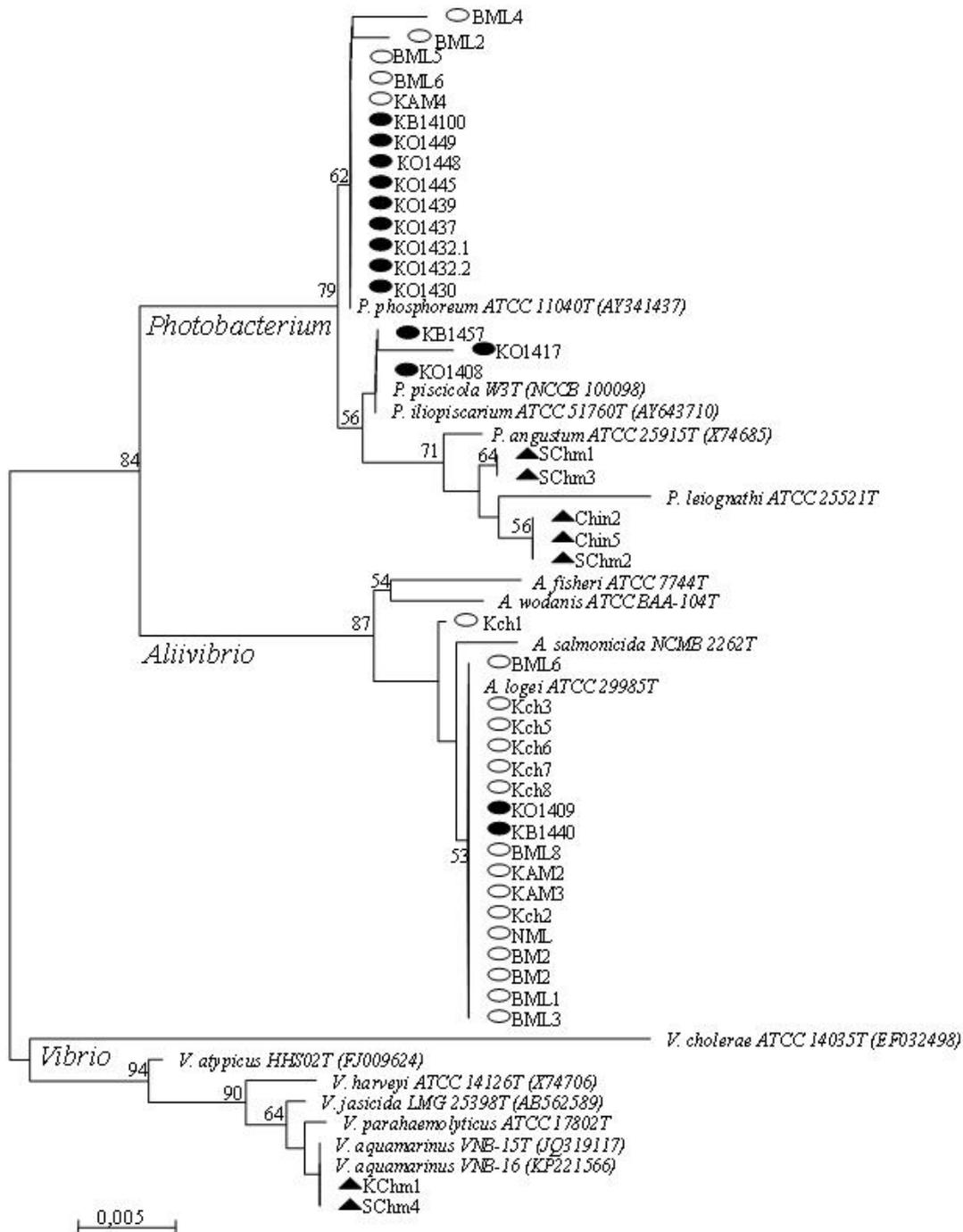


Рис. 10 Филогенетическое дерево, построенное методом ближайших соседей нуклеотидной последовательности гена *16S pPHK* ряда биолуминесцирующих изолятов и референсных штаммов. Изоляты, выделенные в акваториях студеных морей: зимой 2010 г – ○, летом 2014 г. – ●. Контрольные изоляты, выделенные в акваториях теплых морей в летний период 2014 г. –▲

Всего было изолировано 54 светящихся штамма. В холодных морях были выделены только психрофилы – 45 изолятов. Оказалось, что образцы, собранные в зимний период, представлены большей частью видом *A. logei* (16 изолятов: NML, NML2, BML1, BML3, BML6, BML8, KAM2, KCh1-KCh3, KCh5, Kch7, KCh8, BM1, BM2, Skal), в то время как среди 24 изолятов, собранных в летнее время в холодных морях, выделено только 3 изолята, отнесенных к виду *A. logei* (149, 1442, 1440). Принадлежность бактерий к указанному виду достоверно подтвердили данные мультигенного секвенирования, люминесцентных характеристик, ключевых биохимических параметров, интервалы температур, определяющие границы роста исследуемых бактерий. Остальные 22 изолята, полученных в летний период, и 5 изолятов зимнего сезона по результатам анализа последовательности 16S рРНК были отнесены роду *Photobacterium*.

В теплых морях: Черном и Южно-Китайском, как и ожидалось, были выявлены только мезофильные бактерии. Среди штаммов, изолированных из теплых морей 5 отнесены к *P. leiognathi*, и 4 штамма были описаны как новый вид (по данным мультигенного секвенирования, люминесцентных характеристик, ключевых биохимических параметров), который получил название *V. aquamarines*. Типовым штаммом является *V. aquamarines* VNB-15<sup>T</sup>.

Полученные данные свидетельствуют о том, что имеет место видовое замещение бактерий в связи со сменой сезонов и температуры поверхностных вод акваторий Берингова и Охотского морей, омывающих берега Камчатки: с повышением температуры летом бактерии *Photobacterium sp.* вытесняют представителей *A. logei*, преобладающих в зимний период. Оба рода бактерий принадлежат к психрофилам. Мезофильные бактерии в акваториях Охотского, Белого и Берингова и Балтийского морей не обнаружены. Следует отметить, что люминесценция бактерии вида *A. logei* регулируется системой QS, бактерии *Photobacterium sp.* QS системой не обладают, их свечение происходит постоянно.

В итоге, были изолированы 19 штаммов *A. logei* в Белом море BM1, BM2; Беринговом Kch2, KCh3, KCh5, Kch7, KCh8, 1440; Охотское море KCh1, NML, BML1, BML3, BML6, BML8, KAM2, KAM3, 1409, 1442; Балтийское море Skal,

У всех 19 изолированных штаммов *A. logei* была проанализирована структура *lux*-оперона. Наличие двух копий гена *luxR* было подтверждено методом амплификации участков *luxR1-luxC* и *luxE-luxR2*. Для этого были подобраны праймеры *luxR1end*, *Sv1d*, *Sv1r* и *luxR2RSt* (Табл.5, Рис.11).

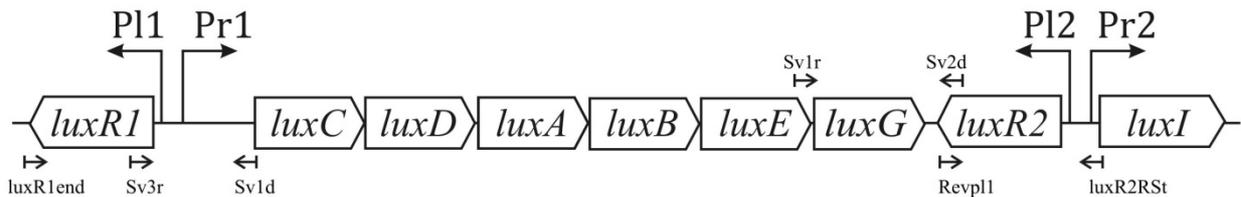


Рис.11 Структура *lux*-оперона *A. logei*. Показано расположение *luxR1* и *luxR2* генов, Pr1 и Pr2 промоторов, а также праймеров *luxR1end*, *Sv1d*, *Sv1r* и *luxR2RSt* использованных в работе

Оказалось, что у всех изученных штаммов (19 изолятов) в состав *lux*-оперона входят обе копии гена *luxR*, это может означать, что дупликация гена *luxR* неслучайна, и, по-видимому, необходима для успешного выживания бактерий в условиях низких температур. Таким образом, показано, что ареалом психрофильной бактерии *A. logei* с QS системой с двумя регуляторными генами *luxR1* и *luxR2* являются Охотское, Белое, Берингово и Балтийское моря.

У 6 случайно отобранных изолятов *A. logei* была проанализирована нуклеотидная последовательность обеих копий гена *luxR*. Филогенетический анализ генов *luxR* из *A. logei*, *A. salmonicida*, *A. fischeri* показал, что гены *luxR1* и *luxR2* формируют два обособленных друг от друга кластера (Рис. 12). Отметим, что последовательности каждого из генов *luxR1* и *luxR2* не группируются отдельно в соответствии с видом. А именно, последовательности генов *luxR1* из *A. logei* и *A. salmonicida* ложатся в один общий кластер, в то время как последовательности *luxR2* из бактерий этих же видов образуют свой обособленный кластер. Ген *luxR A. fischeri* формирует отдельную от них ветку.

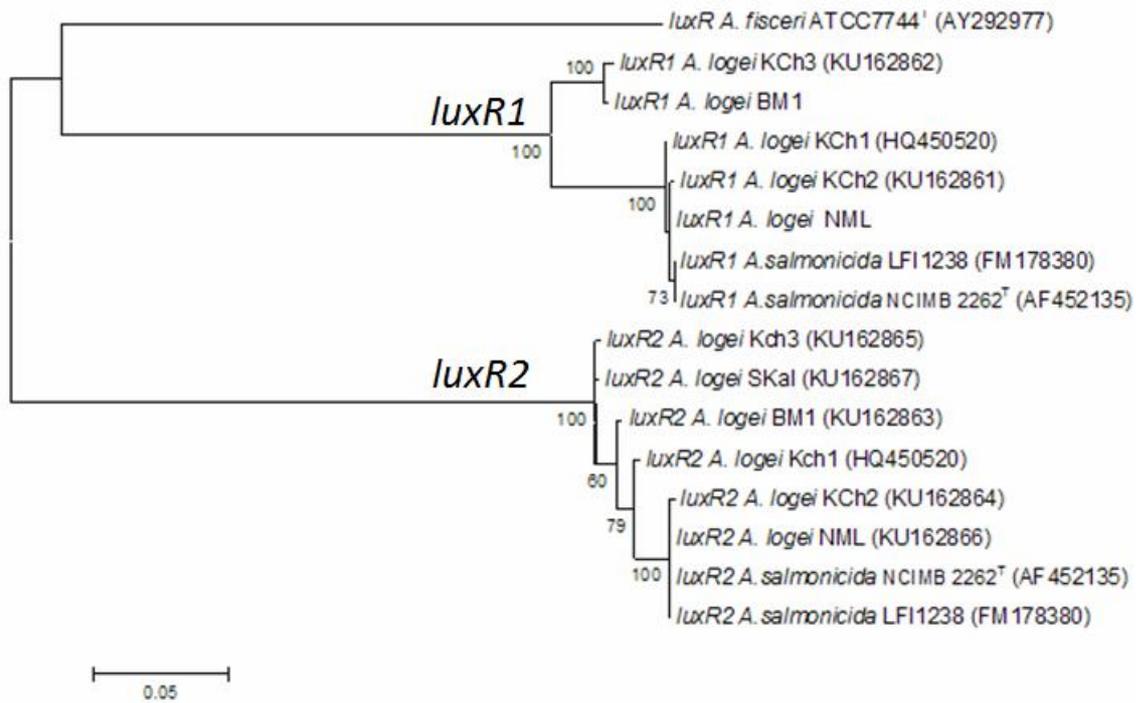


Рис. 12 Филогенетический анализ исследуемых штаммов на основе нуклеотидных последовательностей генов *luxR1* и *luxR2* из *A. logei*, BM1, KCh1-3, NML, SKal, из *A. salmonicida* NCIMB 2261T, LFI238 и *A. fischeri* ATCC7744T. Филогенетическое дерево построено методом NJ, 1000 репликаций

Последовательности *luxR1* и *luxR2* из разных штаммов внутри своего кластера имеют между собой не менее 80% гомологии, между кластерами *luxR1* и *luxR2* обладают менее 60 % гомологии. Расхождение нуклеотидных последовательностей двух копий гена свидетельствует о том, что гены обладают разными функциями.

Ранее было показано, что в структуре *lux*-оперона между генами *luxR1* и *luxC* расположена не кодирующая регуляторная область, которая отличается от области *luxR1-luxC* *A. fischeri* тем, что не содержит ген *luxI* перед геном *luxC*. Более того длина нуклеотидной последовательности между геном *luxR1* и промотором Pr существенно длиннее, чем таковая у *A. fischeri* (более 500 п.н. и 200 п.н. соответственно) (Manukhov I.V. et al., 2011). С целью исследовать возможное применение области *luxR1-luxC* для идентификации видов *A. logei* и *A. salmonicida* в настоящей работе провели анализ нуклеотидной последовательности *luxR1-luxC* из близкородственных штаммов *A. logei* и

*A. salmonicida*. Сиквенирование *luxR1-luxC* области проводили с применением праймеров SV1dir и SV3rev (Рис. 11). Филогенетический анализ показал, что последовательности *luxR1-luxC* из разных видов и штаммов не группируются в отдельные кластеры по видам *A. logei* и *A. salmonicida*. Оказалось, что данный регион *lux*-оперона, несмотря на то, что фланкирован консервативными генами *luxR1* и *luxC*, является переменным даже для близкородственных штаммов, изолированных в одной акватории. Однако, кластеризации для штаммов из акваторий разных морей, дистанционно разнесенных между собой, не выявляются (Рис. 13). Таким образом, основываясь на полученных данных, можно предположить, что миграция бактерий в северных морях: Белом, Балтийском, Беринговом и Охотском происходит быстрее, чем мутагенез переменной области *luxR1-luxC*.

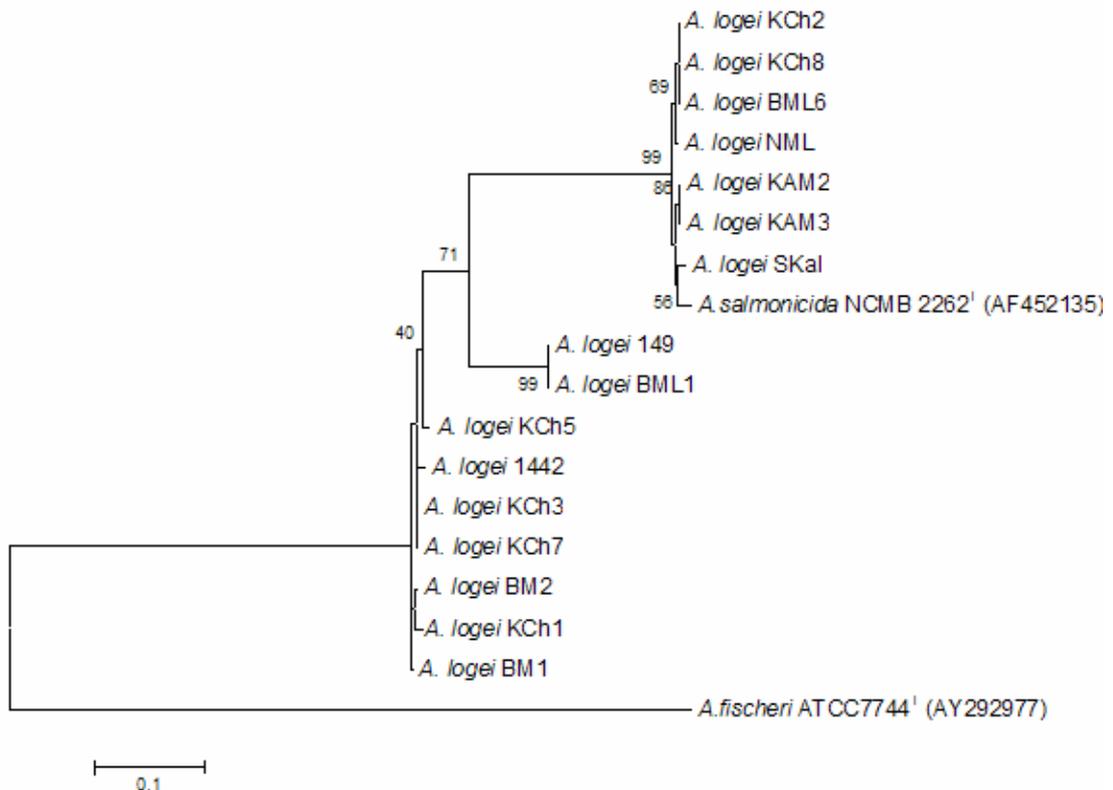


Рис. 13 Филогенетический анализ штаммов *A. logei* KCh1-3, KCh5, KCh7, KCh8, BM1, BM2, BML1, BML6, NML, KAM2, KAM3, SKal, 149, 1442 и типовых штаммов *A. salmonicida* NCIMB 2261 и *A. fischeri* ATCC7744 на основе нуклеотидных последовательностей регуляторной области *luxR1-luxC*. Филогенетическое дерево построено методом NJ, 1000 репликаций

Стоит отметить, что виды *A. logei* и *A. salmonicida* достаточно близки фенотипически. По ряду характеристик бактерии вида *A. logei* мало отличаются от бактерий близкородственного вида светящихся морских бактерий *A. salmonicida*. Основными биохимическими отличиями являются: свечение (*A. salmonicida* – крипточески-люминесцирующие бактерии, т.е. светят только при добавлении субстрата люциферазы п-деканала); наличие желтого пигмента (у *A. logei* он присутствует, у *A. salmonicida* нет); способность восстанавливать нитрат, ферментация D-галактозы и мальтозы (бактерии *A. logei* способны, *A. salmonicida* нет). Штаммы KCh1-KCh3, KCh5-KCh8, BM1, BM2, NML, BML1, BML3, BML6, BML8, KAM2, KAM3 по биохимическим параметрам относятся к *A. logei*. Однако, при филогенетическом анализе на основе 5 house-keeping генов штаммы NML и BM2 не кластеризуются с типовым штаммом *A. logei*. По результатам мультигенного анализа штамм NML ближе к виду *A. salmonicida*, чем к типовому штамму *A. logei* (Рис.14).

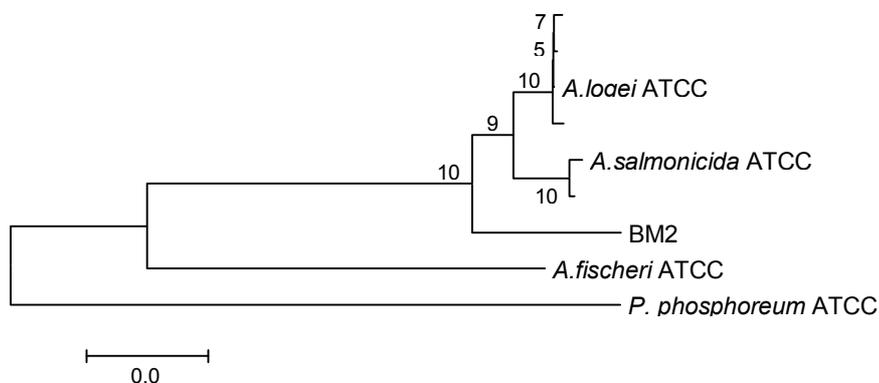


Рис. 14 Филогенетическое дерево, основанное на нуклеотидной последовательности пяти house-keeping генов (*gapA*, *gyrB*, *pyrH*, *recA*, *rpoA*) штаммов KCh1, KCh2, BM1, BM2, NML, *A. logei* ATCC 29985<sup>T</sup>, *A. salmonicida* ATCC 43839<sup>T</sup>, *A. fischeri* ATCC 7744<sup>T</sup>. *P. phosphoreum* ATCC 11040<sup>T</sup> взят для построения филогенетического дерева как представитель out-группы. Филогенетическое дерево построено методом NJ в программе «Мега 5.2», 1000 репликаций

Анализ последовательности house-keeping генов показал отсутствие кластеризации для ряда штаммов, определенных по биохимическим параметрам как *A. logei*, с видом *A. logei*, но близость их к виду *A. salmonicida*. Эти виды не разделяются по последовательности генов *luxR1* и *luxR2* (Рис. 12), и области

*luxR1-luxC* (Рис. 13). Эти данные могут указывать на необходимость проведения более углубленного анализа и реклассификации видов. Вероятно *A. logei* и *A. salmonicida* принадлежат одному виду, а *A. salmonicida* представляет собой вирулентный штамм *A. logei* (патогенный для лососевых рыб).

### **3.2 Сравнение термостабильности белков LuxR1 и LuxR2 из *A. logei* в гетерологичной системе**

В работе (Хрульнова, С. А., 2011в) было показано, что в *lux*-опероне психрофильных бактерий *A. logei* присутствуют две копии регуляторного гена *luxR1* и *luxR2*, в отличие от *lux*-оперона с одним геном *luxR* мезофильной бактерии *A. fischeri*. В представленной работе показано, что наличие двух копий *luxR1* и *luxR2* имеет неслучайный характер, поскольку в *lux*-опероне всех изученных штаммов *A. logei* и *A. salmonicida* обнаружены оба *luxR*. Следует отметить, что при сборе бактерий в Беринговом, Охотском, Балтийском и Белом морях не было изолировано ни одной психрофильной бактерии с QS системой с одним *luxR*. По-видимому, система QS первого типа с одним регулятором LuxR характерна только для мезофильных бактерий, а с двумя LuxR1 и LuxR2 – только для психрофильных систем. Нуклеотидные последовательности генов *luxR1* и *luxR2* значительно различаются между собой (55% гомологии), это говорит в пользу того, что гены *luxR1* и *luxR2* обладают разными функциями. В связи с этим, следующей задачей исследования стало изучение возможных различных функций каждого из генов *luxR1* и *luxR2*. На первом этапе, было предположено, что белок LuxR1 более термостабильный, чем LuxR2, и возможно благодаря этому становится необходимым для активации QS системы при повышенных температурах. Чтобы проверить эту гипотезу, клетки *E. coli* MG1655 трансформировали 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*.

Клетки ночных культур *E. coli* с плазмидами pIVA, pSV16, pVFR1 вносили в отношении 1/100 в пробирки со средой LB и инкубировали при 28°C с аэрацией до OD=0,2. Далее, клетки подразделяли на две группы, контрольную и тестовую. К клеткам добавляли АИ различной концентрации. Контрольную группу клеток инкубировали при 22°C, тестовую - при 42°C. Уровень свечения клеток измеряли через определённые интервалы времени, отбирая аликвоту инкубируемых клеток.

На Рисунке 15 представлена зависимость уровня свечения клеток от времени инкубации при 22°C и при 42°C. В клетки *E. coli* MG1655 вводили одну из плазмид pIVA, pSV16 или pVFR1, содержащих репортерные гены *luxCDABE* *P. luminescens* под контролем промотора, регулируемого белком LuxR1 (Рис. 15А) и LuxR2 (Рис. 15В) *A. logei* или LuxR *A. fischeri* (Рис. 15С). К клеткам, содержащим pSV16 и pVFR1, добавляли АИ 10<sup>-6</sup>М, к клеткам с pIVA добавляли более высокую концентрацию АИ 10<sup>-4</sup>М, поскольку известно, что LuxR1 менее чувствителен к АИ (Горянин И.И., 2014).

Из данных приведённых на графике видно, что при температуре 42°C наблюдается существенное снижение активности LuxR белков у психрофильных бактерий *A. logei*. Белок LuxR из мезофильных бактерий *A. fischeri* сохраняет свою активность до 80% от таковой, проявляемой при комнатной температуре. Чувствительность белков LuxR1 и LuxR2 к тепловой денатурации оказалась примерно одинаковой.

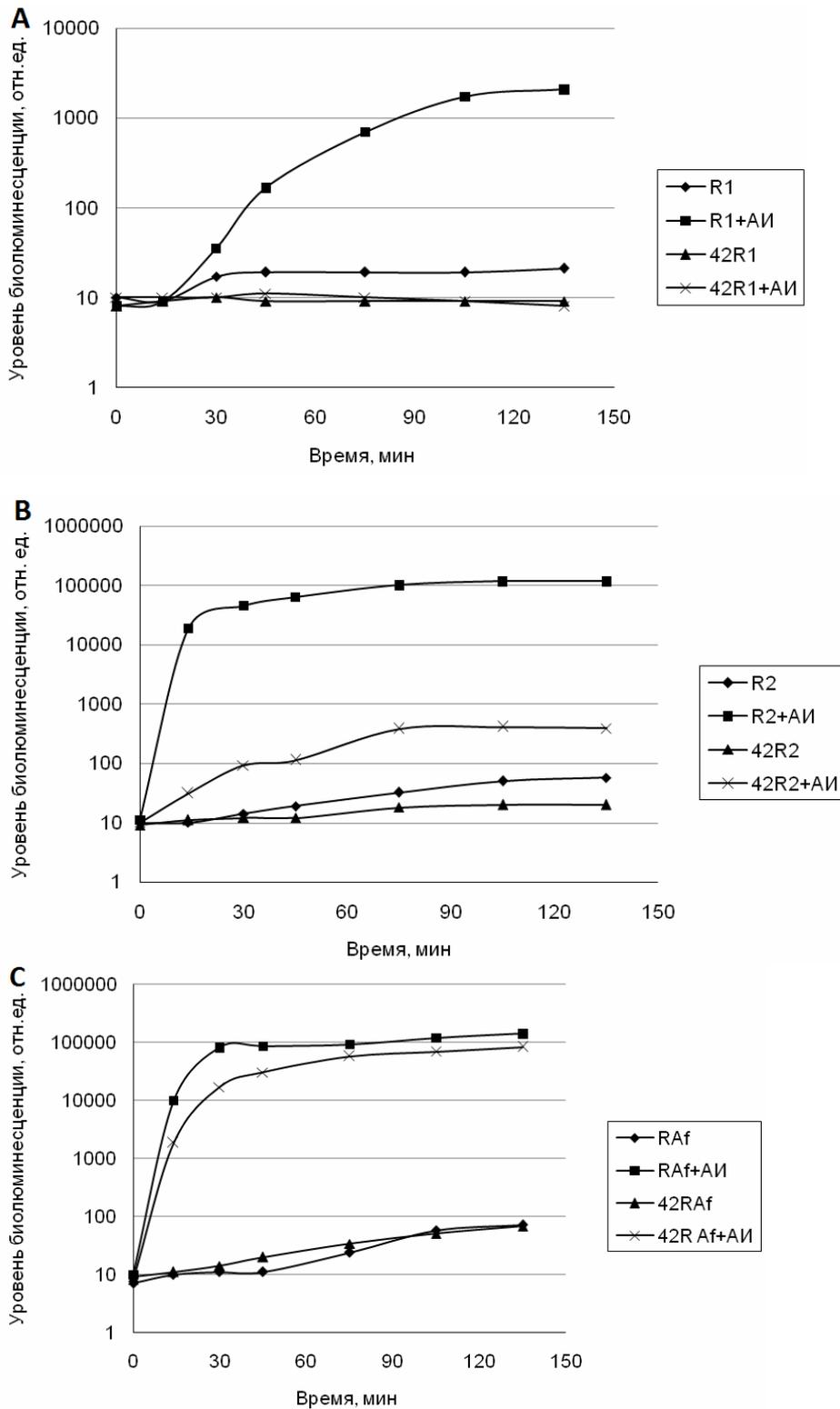


Рис.15 Сравнение термостабильности белков LuxR1 (А), LuxR2 (В) из *A. logei* и LuxR из *A. fischeri* (С) при 22°C и 42°C (42) в клетках *E. coli* MG1655, содержащих плазмиды pIVA (R1), pSV16 (R2) или pVFR1 (RAf) соответственно от времени инкубации с АИ. К клеткам, содержащим pSV16 и pVFR1, добавляли АИ  $10^{-6}$ М, к клеткам с pIVA добавляли АИ  $10^{-4}$ М

Следует отметить, что термостабильность исследуемых белков LuxR оказалась сравнительно высокой. Психрофильные LuxR белки успешно

стабилизируются добавлением АИ, и, даже при 42°C, сохраняют остаточную активность (около 1%), а при 37°C до 70% активности (Табл. 7). LuxR из *A. fischeri* ещё более термостабилен при добавлении АИ.

Табл. 7 Уровень свечения клеток *E. coli* MG1655, содержащих плазмиды pSV16, pIVA или pVFR1, измеренный через 90 мин инкубации при различных температурах после введения АИ 10<sup>-6</sup>М к pSV16 и pVFR1 и 10<sup>-4</sup>М АИ к pIVA

Плаزمид	Уровень люминесценции (отн.ед.) клеток <i>E. coli</i> MG1655 при разных температурах				
	18°C	24°C	28°C	37°C	42°C
pIVA	1536±140	1492±75	1530±125	1302±180	14,4*±3,5
pSV16	105740±7000	104420±8900	103060±8200	100020±9600	415±202
pVFR1	117340±10200	124780±21600	121180±14000	124400±24900	92780±8900

\*Фоновые значения ФЭУ ~ 5-7 отн. ед.

В то же время активация полных оперонов, способных синтезировать АИ (экзогенно АИ не добавляется) из *A. logei* не происходит в клетках *E. coli* при температурах выше 20-23°C, а полный оперон из *A. fischeri* активируется при температурах не более 28-30°C (Табл. 8).

Табл. 8 Уровень свечения клеток *E. coli* MG1655 OD = 0,9, содержащих плазмиды с полными *lux*-оперонами из *A. logei* (pSV10,4) и *A. fischeri* (pF1)

Оперон	Уровень люминесценции (отн. ед.) клеток <i>E. coli</i> MG1655 при разных температурах			
	18°C	24°C	28°C	37°C
<i>A. logei</i>	180000**±50000	300±100	10*±6	11±5
<i>A. fischeri</i>	205000±50000	870000±125000	720000±150000	300±150

\*фоновые значения ФЭУ ~ 5-7 отн. ед.

Полученные данные означают, что активация QS системы не должна зависеть от термостабильности LuxR белков при наличии АИ, т.к. в среде с АИ LuxR белки остаются активными даже при тех температурах, которые являются смертельными для психрофильных микроорганизмов.

### 3.3 Анализ активности LuxR1 и LuxR2 регуляторов *lux*-оперона *A. logei*

В настоящей диссертации показано, что только для психрофильных бактерий характерна система QS первого типа с двумя регуляторами люминесценции LuxR1 и LuxR1, и что такие системы имеют широкий ареал, который включает Белое, Балтийское, Охотское, Берингово моря. В этой связи, возникло предположение, что белки LuxR1 и LuxR2 могут взаимодействовать друг с другом при активации как Pr1, так и Pr2 промотора, а также регулировать активность друг друга.

#### 3.3.1 Влияние *luxR1* и *luxR2* генов на активацию промотора Pr1

Чтобы определить вклад регулятора LuxR2 в активацию белком LuxR1 промотора Pr1, штамм *E. coli* MG1655 с плазмидой pIVA, содержащей *luxR1* с промотором Pr1, трансформировали совместимой плазмидой pIV2 на основе вектора pACYC184 (*ori* p15) с геном *luxR2*. В качестве контроля в клетки *E. coli* MG1655 вводили биосенсорные плазмиды pIVA или pSV16, содержащие регуляторную область с геном *luxR1* или *luxR2* соответственно. Ночную культуру штаммов *lux*-биосенсоров вносили в соотношении 1/100 в пробирки с LB средой и инкубировали при 28<sup>0</sup>С с аэрацией до OD=0,2. Затем, отбирали аликвоту суспензии и детектировали уровень свечения биосенсоров с частой 1 раз в 10 мин с АИ в концентрации 10<sup>-5</sup>М или без АИ при комнатной температуре.

На Рисунке 16 представлена зависимость уровня свечения клеток *E. coli* MG1655 (pIVA), *E. coli* MG1655 (pSV16), *E. coli* MG1655 (pIVA и pIV2) от времени инкубации.

Как видим, биосенсор, содержащий регуляторную область с промотором Pr1 и ген *luxR1* (pIVA), характеризуется низкой чувствительностью к добавлению АИ по сравнению с биосенсором, содержащим регуляторную область с промотором Pr2 и ген *luxR2* (pSV16), что согласуется с данными полученными ранее. Однако, низкая чувствительность промотора Pr1 к АИ, в клетках *E. coli* с pIVA, компенсируется при введении гена *luxR2* на плазмиде pIV2.

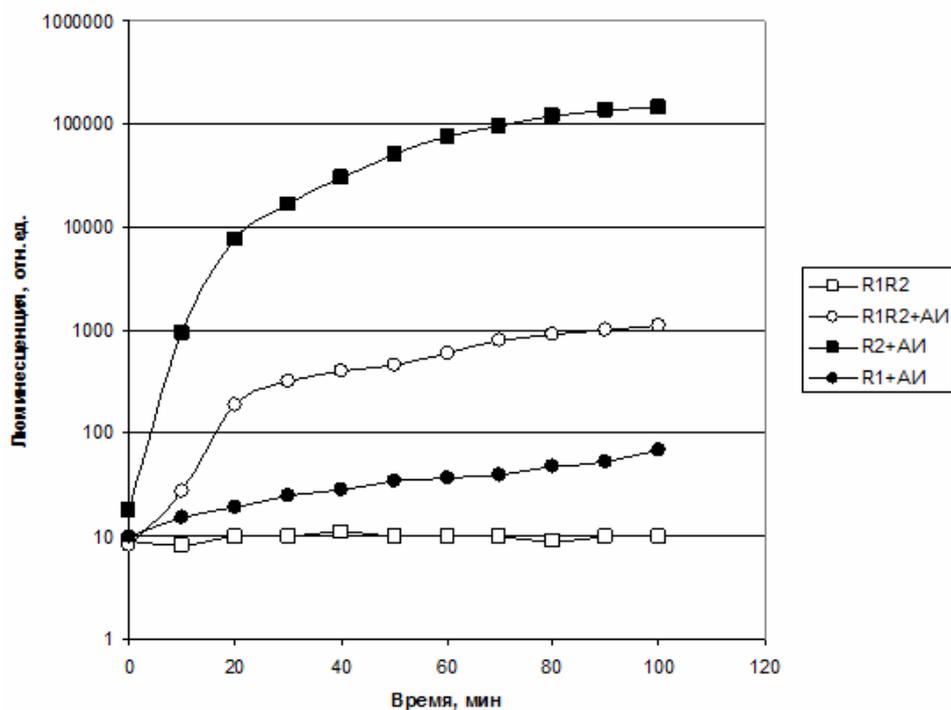


Рис. 16 Комплементационное действие гена *luxR2* на активность *luxR1*-регулируемого промотора Pr1 *lux*-оперона *A. logei*. Зависимость уровня свечения клеток *E. coli* MG1655 с плазмидами pIVA (R1), pSV16 (R2) или комбинацией плазмид pIVA и pIV2 (R1R2) от продолжительности инкубации с AI  $10^{-5}$  M (+AI) и без AI

Таким образом, наблюдается комплементационное действие регуляторного белка LuxR2 на активацию белком LuxR1 промотора Pr1. Следует отметить, что наблюдаемая комплементация не полная, т.к. интенсивность свечения клеток *E. coli*, содержащих комбинацию плазмид pIVA и pIV2, не достигает максимального уровня люминесценции клеток, содержащих плазмиду pSV16.

### 3.3.2 Влияние *luxR1* и *luxR2* генов на активацию промотора Pr2

Чтобы оценить влияние регуляторного белка LuxR1 на способность LuxR2 активировать экспрессию генов с промотора Pr2, клетки *E. coli* с введенной плазмидой pSV16, содержащей *luxR2* с основным промотором Pr2, трансформировали совместимой плазмидой pIV3 (на основе вектора pACYC184 *oriP15*), содержащей ген *luxR1* под собственным промотором. Для сравнения использовали клетки *E. coli* MG1655 с плазмидами pIVA или pSV16, содержащие регуляторную область с геном *luxR1* или *luxR2* соответственно. Клетки ночной культуры штаммов *lux*-биосенсоров вносили в отношении 1/100 в пробирки с LB средой и инкубировали при  $28^{\circ}\text{C}$  с аэрацией до OD=0,2. Далее отбирали аликвоту

суспензии и измеряли уровень свечения клеток с частотой 1 раз в 10 мин при добавлении АИ в концентрации  $10^{-6}$ М или без АИ при комнатной температуре.

На Рисунке 17 приведена зависимость уровня свечения клеток *E.coli* MG1655 (pIVA), *E.coli* MG1655 (pSV16), *E.coli* MG1655 (pSV16 и pIV3) от времени.

Как видно из данных (Рис. 17) в штамме *E. coli* MG1655 (pSV16), содержащем *luxR2* с Pr2, биолюминесценция в течение 1,5 часа после добавления АИ в концентрации  $10^{-6}$ М возрастает примерно на 3 порядка. Индукция биолюминесценции клеток *E. coli* MG1655 (pSV16, pIV3), содержащих комбинацию гена *luxR2* с промотором Pr2 и гена *luxR1* практически не изменилась или несколько снижена.

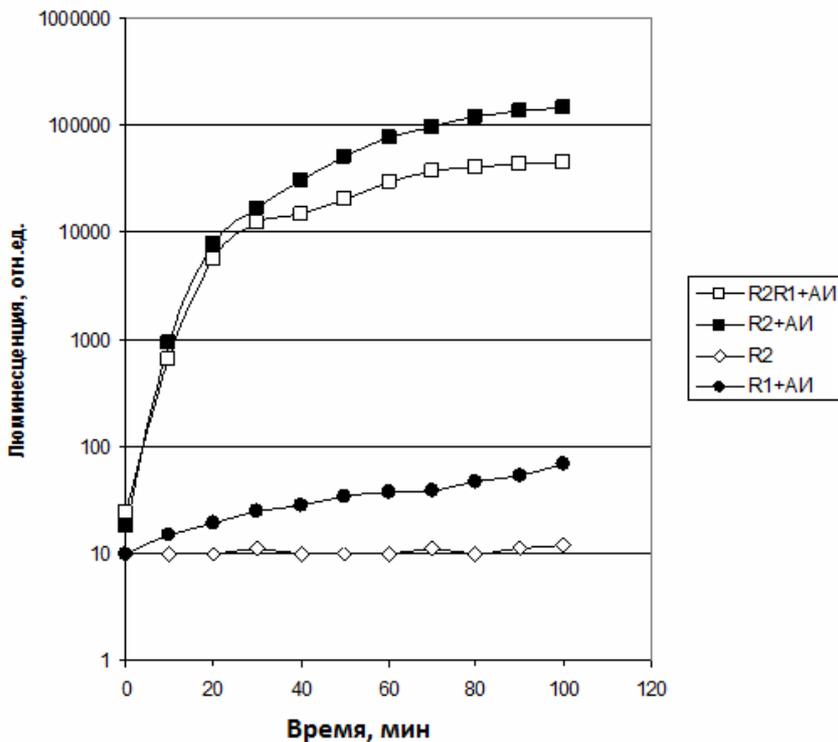


Рис. 17 Влияние белка *luxR1* на активацию Pr2 промотора *lux*-оперона *A. logei* белком *LuxR2*. Зависимость уровня свечения клеток *E. coli* MG1655 с введенными плазмидами pSV16 (R2), pIVA (R1) или комбинацией плазмид pSV16 и pIV3 (R2R1) от времени инкубации с АИ  $10^{-5}$ М и без АИ

Из полученных результатов можно заключить, что белок *LuxR1* не оказывает существенного влияния на экспрессию с промотора Pr2 или несколько снижает её при концентрации АИ  $10^{-5}$ М в штамме дикого типа.

### 3.3.3 Активность LuxR1 и LuxR2 регуляторов *lux*-оперона *A. logei* при разных концентрациях автоиндуктора

На следующем этапе оценили, как комбинация белков LuxR1 и LuxR2 влияет на активацию промоторов Pr1 и Pr2 в зависимости от концентрации АИ в среде.

С этой целью клетки *E. coli* с одной из биосенсорных плазмид pSV16, содержащей *luxR2* с основным промотором Pr2, или pIVA, содержащей *luxR1* с промотором Pr1, трансформировали совместимой плазмидой pIV3 (на основе вектора pACYC184 с *luxR1ori* p15) с геном *luxR1* под собственным промотором или pIV2 на основе вектора pACYC184 с *luxR2ori* p15 с геном *luxR2* под собственным промотором соответственно. В качестве контроля служили клетки *E. coli* MG1655, в которые вводили плазмиды pIVA или pSV16, или pVFR1. В плазмиде pVFR1 промотор, активируемый белком LuxR *A. fischeri*, контролирует репортерные гены *luxCDABE* *P. luminescens*. Клетки ночных культур засеивали в отношении 1/100 в пробирки с LB средой и инкубировали при 28<sup>0</sup>С с аэрацией до OD=0,2. Далее отбирали аликвоту суспензии и после добавления АИ в разных концентрациях регистрировали уровень свечения через 30 мин подращивания при комнатной температуре без аэрации.

На Рисунке 18 представлена зависимость уровня свечения клеток *E. coli* MG1655 с плазмидами pVFR1, pSV16, pIVA и комбинациями плазмид pSV16 с pIV3 и pIVA с pIV2 от концентрации добавленного АИ.

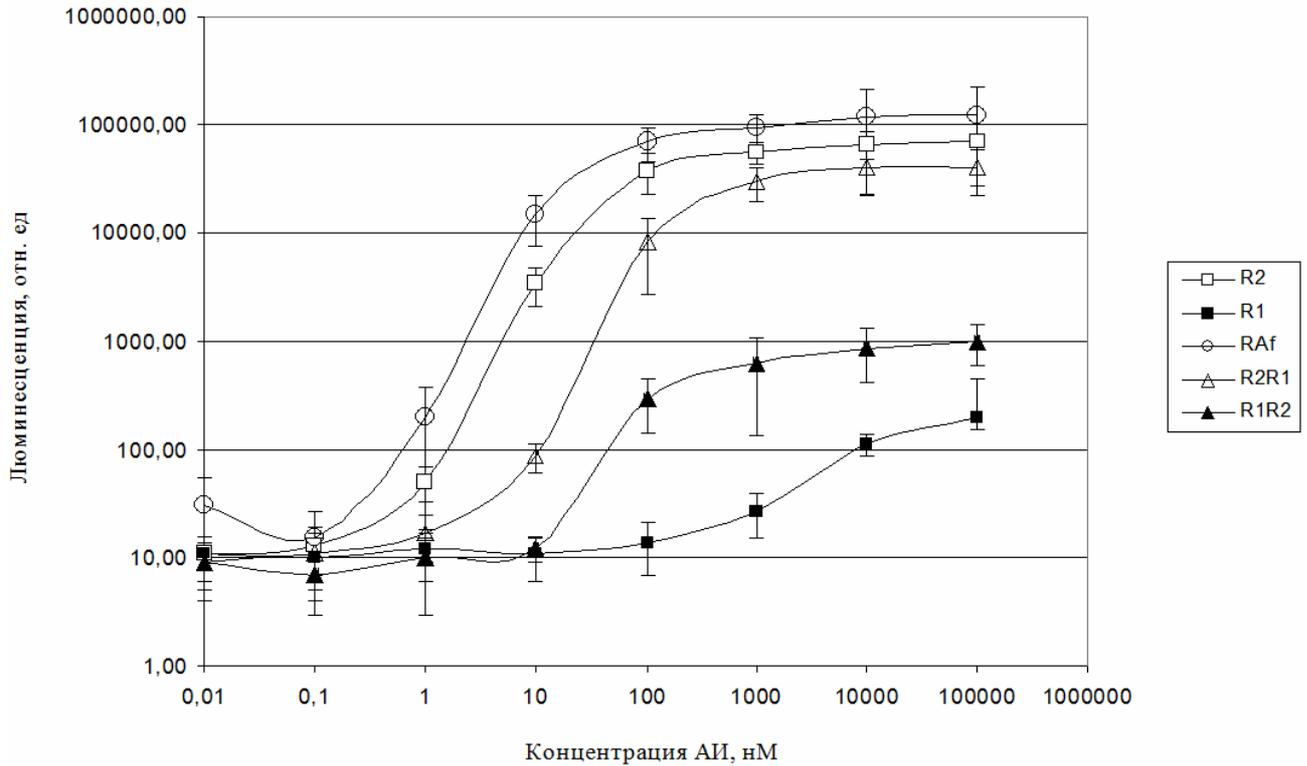


Рис. 18 Зависимость уровня свечения клеток *E. coli* MG1655 с комбинациями плазмид (pSV16, pIV3) и (pIVA, pIV2) и плазмидами pSV16, pIVA и pVFR1, измеренного через час после добавления AI, от концентрации добавленного AI

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

Как видно из данных (Рис. 18), в клетках с *luxR2* с его промотором Pr2 добавление *luxR1* приводит при малых концентрациях AI к существенному снижению уровня биолуминесценции в сравнении с клетками без *luxR1* и практически не сказывается на изменении уровня свечения при больших концентрациях AI (кривая R2R1 в сравнении с R2). Этот результат можно объяснить образованием гетеродимера LuxR1/LuxR2, который менее чувствителен к низким концентрациям AI, чем гомодимер (LuxR2)<sub>2</sub>. Добавление высоких концентраций AI, при которых белок LuxR1 способен связываться с AI приводит к нормальной работе гетеродимера LuxR1/LuxR2.

При введении *luxR2* в клетки с плазмидой, содержащей *luxR1* и промотор Pr1 (кривая R1R2 на Рис. 18) уровень интенсивности люминесценции возрастает (более чем на порядок) в сравнении с клетками, не содержащими LuxR2 (кривая R2 на Рис. 18). Однако, экспрессия генов с промотора Pr1 даже в присутствии обоих генов *luxR1* и *luxR2* как минимум на порядок ниже, чем экспрессия с промотора Pr2 в широком диапазоне концентраций АИ

### 3.3.4 Анализ последовательности *lux*-бокса психрофильных бактерий *A. logei*

Поскольку без добавления АИ уровень биолюминесценции клеток *E. coli* с промоторами Pr1 и Pr2 из *A. logei* примерно одинаковый в пересчете на одну клетку. Таким образом, можно считать, что разность в экспрессии с этих промоторов определяется эффективностью связывания белков LuxR с *lux*-боксом. Поэтому на следующем этапе мы обратились к исследованию нуклеотидную структуры *Lux*-бокса – сайта посадки регуляторов LuxR1 LuxR2 в промоторных областях Pr1 и Pr2.

*Lux*-бокс представляет собой палиндромную последовательность из 20 нуклеотидов (10 пар), где присутствует сайт связывания регуляторных рецепторных белков LuxR QS системы. Связывание LuxR с ДНК позволяет РНК полимеразе взаимодействовать с промотором и начать экспрессию генов *lux*-оперона. Из 20 нуклеотидов *lux*-бокса *A. fischeri* два нуклеотида в палиндроме являются непарными, оставшиеся 18 нуклеотидов образуют 9 пар (Рис. 19).

В *lux*-боксе Pr2 из *A. logei* только 7 пар нуклеотидов формируют палиндром, а в *lux*-боксе Pr1 парными являются только 12 нуклеотидов (6 пар). Кроме того, следует отметить, что крайние парные нуклеотиды в *lux*-боксе Pr2 образуют палиндром длиной 18 нуклеотидов, а для Pr1 только 16.

	<b>lux box</b>	-10	+1
AF luxR-luxI	AAGCACTGTAGGATCGTACAGGTTT-ACGCAAGAAAATGGTTTGT	TATAGT	CGAATAAA
AL KCh1 luxR1-luxC	GATACTCTGTAAAGTTATACAGGTTT-ACSTAAATAATTACCCTGCT	TATAGT	TTTCTAAA
AL BM1 luxR1-luxC	GATACTCTGTAAAGTTATACAGGTTT-ACSTAAATAATTACCCTGCT	TATAGT	TTTCTAAA
AL KCh1 luxR2-luxI	TCATTCCTGTAAATATGTACAGGTTTATAAGGAGGAAAATTTGCCTGCT	TATAGT	CAGTTAAA
AL BM1 luxR2-luxI	TCATTCCTGTAAATATGTACAGGTTTATAAGGAGGAAAATTTGCCTGCT	TATAGT	CAGTTAAA

	<b>RBS</b>	→ <b>luxI</b>	<b>Stop</b>
AF luxR-luxI	CG--CAAGGGAGGTTGGTATG	ACTATAATGATAAAAAAATCGGATTTTTTGGCAATTCCAT	
AL KCh1 luxR1-luxC	ATA--AGGAAGCAGAGTGATG	ACAATG--ACTTAAAAAGTAGGTTATAAATATTCTCCATC	
AL BM1 luxR1-luxC	ATA--AGGAAGCAGAGTGATG	ACAATG--ACTTAAAAAGTAGGTTATAAATATTCTCCATC	
AL KCh1 luxR2-luxI	AGATTAAAGGGGGTCAGGATG	ACAATAATGATAAGAAAATCCGAGTTTACTACTATTCCSTA	
AL BM1 luxR2-luxI	AGATTAAAGGGGGTCAGGATG	ACAATAATGATAAGAAAATCCGAGTTTACTACTATTCCSTA	

Рис. 19 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 и палиндромная последовательность *lux*-бокса отмечена зеленым; -10, RBS, ATG-кодона и стоп-кодона – желтым; первый нуклеотид мРНК подчеркнут

Таким образом, можно предположить, что экспрессия с промотора Pr1 в присутствии АИ идет слабее, чем с Pr2 потому, что сайт связывания с регуляторным рецепторным белком короче, чем *lux*-бокс Pr2, и, как следствие, менее эффективен.

### 3.4 Влияние GroEL/ES шаперонина на регуляцию системы QS *A. logei*

На следующем этапе мы исследовали способность белков влиять на активность друг друга в зависимости от состояния клетки.

Известно, что введение полного *lux*-оперона, экспрессия которого регулируется QS системой первого типа, мезофильной бактерии *A. fischeri* в клетки *E. coli* мутантные по *gro* и дикого типа *E. coli wt* приводит к существенному падению уровня свечения мутантных клеток относительно дикого типа. Шаперонин GroEL/ES участвует в положительной регуляции QS системы *A. fischeri* (Adar Y.Y. et al., 1992; Dolan and Greenberg, 1992; Завильгельский Г.Б. и Манухов И.В., 1994). В связи с этим возник вопрос о влиянии GroEL/ES шаперонина на QS регуляцию экспрессии *lux*-оперона мезофильной бактерии *A. logei*. Оценку влияния GroEL/ES проводили в гетерологичной системе. Клетки *E. coli* дикого типа и мутантные по *gro* (OFB1111groEL673 и SKB178 gro<sup>+</sup>), содержащие гибридные плазмиды pSV10,4 и pF1 с полным *lux*-опероном из *A. logei* и *A. fischeri* соответственно, инкубировали в среде со слабой аэрацией до

OD=0,8. На диаграмме (Рис. 20) представлены сравнительные данные по интенсивности биолюминесценции клеток *E. coli*, содержащих гибридные плазмиды pSV10,4 и pF1.

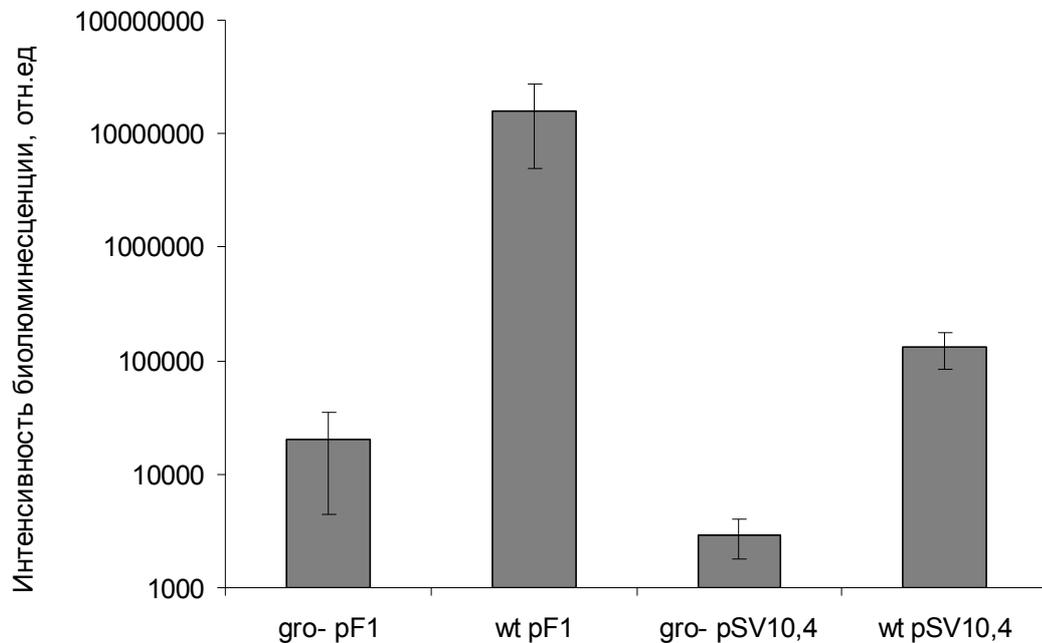


Рис. 20 Уровень свечения клеток *E. coli* OFB1111groEL673 и SKB178 gro<sup>+</sup>), с введенными плазмидами с полным *lux*-опероном *A. fischeri* pF1 и *A. logei* pSV10,4. Клетки инкубировали при комнатной температуре со слабой аэрацией. Люминесценцию измеряли при достижении культурой OD=0,8

Как видно из данных (Рис. 20), имеет место существенное уменьшение люминесценции в штамме OFB1111groEL673 мутантном по *gro* для обеих плазмид, т.е. для психрофильных бактерий показана схожая с мезофильными бактериями повышенная способность GroEL/ES шаперонина к активации QS системы *lux*-оперона при появлении АИ в среде. Это означает, что GroEL/ES шаперонин повышает чувствительность к АИ системы QS у *A. logei*. Таким образом, показано, что GroEL/ES шаперонин участвует в положительной регуляции QS системы психрофильных бактерий *A. logei* и, по-видимому, участвует в фолдинге их белков-регуляторов.

### 3.4.1 Влияние GroEL/ES шаперонина на регуляцию промоторов *lux*-оперона *A. logei* комбинацией белков LuxR1 и LuxR2

В диссертационной работе (Горянин И.И., 2014) было показано, что шаперонин участвует в фолдинге белка LuxR2 *A. logei*, и не влияет на активность белка LuxR1.

В представленной работе исследовано влияние шаперонина GroEL/ES на комбинацию LuxR1 и LuxR2 белков, исходя из предположения, что они могут образовывать гетеродимер, который может взаимодействовать с шаперонином GroEL/ES особым образом. Для этого использовались штаммы *E. coli* дикого типа и с мутацией гена *groEL* с биосенсорными конструкциями, несущими гены *luxR1*, *luxR2* и их комбинации.

На первом этапе была изучена способность белка LuxR1 регулировать активацию *luxR2*-зависимого промотора *A. logei* в зависимости от наличия или отсутствия шаперонина GroEL/ES. С этой целью использовали ряд плазмид: pSV16 - содержит фрагмент ДНК с геном *luxR2* и регуляторной областью, включающей Pr2 промотор, встроенный перед кассетой с генами *luxCDABE* *P. luminescens*, используемыми в качестве генов-репортеров; pIVA – аналогична pSV16, но с геном *luxR1* и промотором Pr1; pIV2 - вектор pACYC184, содержащий *luxR2* ген и pIV3 – аналогична pIV2, но содержит ген *luxR1*. Эти конструкции вводили в клетки *E. coli*, мутантные по GroEL/ES шаперонину, OFB1111*groEL673* и клетки дикого типа SKB178 *gro*<sup>+</sup>. Клетки ночной культуры растили в среде LB с аэрацией при 28°C до начала экспоненциальной фазы ( $OD_{600} = 0,2-0,3$ ). Затем клетки разделяли на аликвоты и после добавления различных концентраций АИ, продолжали инкубацию при комнатной температуре без перемешивания. Измерение интенсивности биолуминесценции проводили через определенные промежутки времени.

На Рисунке 21 представлена зависимость уровня свечения клеткок *E. coli* OFB1111*groEL673* и SKB178 *gro*<sup>+</sup> с плазмидой pSV16 (*luxR2* с Pr2) и

комбинацией плазмид pSV16 и pIV3 (*luxR2* с Pr2 и *luxR1* под своим промотором) при концентрации АИ  $10^{-5}$ М от времени.

Из графика видно (Рис. 21), что недостаток шаперонина GroEL/ES драматически снижает уровень биолюминесценции, регулируемой белком LuxR2 с Pr2 промотора (кривые 178R2 и groR2, Рис. 21). Эти результаты соответствуют данным, полученным ранее (Горянин И., 2014). Введение в клетки *E. coli* дикого типа комбинации *luxR1* и *luxR2* немного уменьшает уровень биолюминесценции с Pr2 промотора по сравнению с одним *luxR2* геном (кривые 178R2R1 и 178R2, Рис. 21). В то же время, в клетках с *gro* мутацией комбинация генов *luxR1* и *luxR2* обеспечивает уровень биолюминесценции на порядок выше, чем в ситуации с одним *luxR2* (кривые groR2R1 и groR2, Рис. 21).

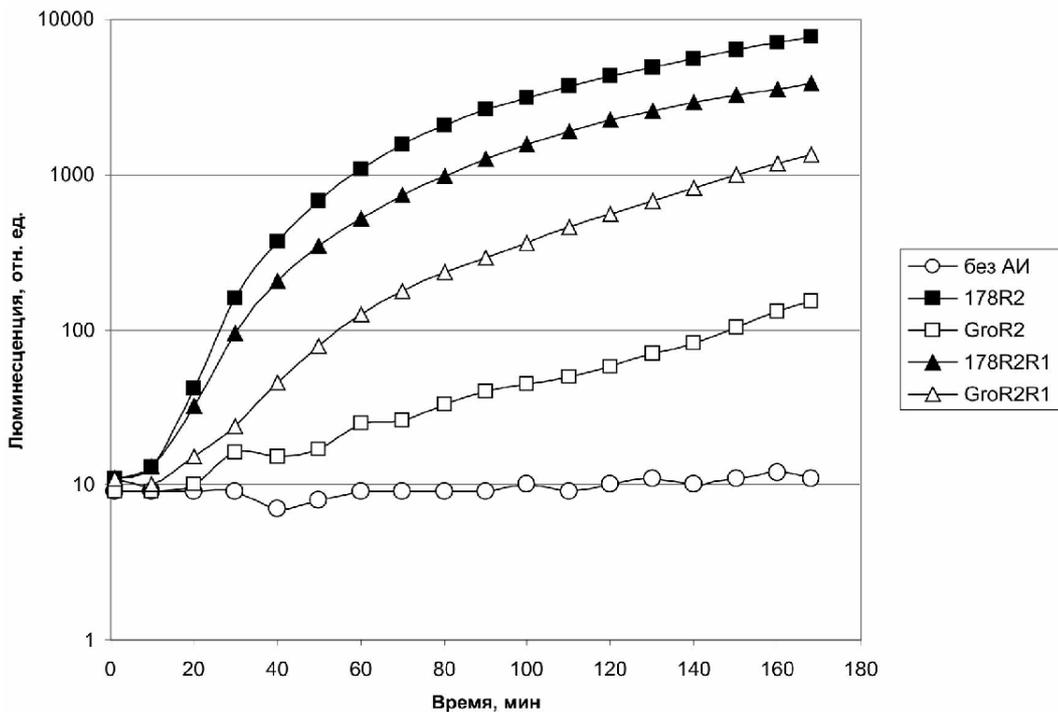


Рис. 21 Зависимость уровня свечения клеток *E. coli* OFB1111groEL673 и SKB178 gro+, содержащих гибридную плазмиду pSV16 и комбинацию плазмид pSV16 и pIV3 от времени при концентрации АИ  $10^{-5}$ М

без АИ – контроль, для всех штаммов без добавления АИ уровень люминесценции примерно одинаков; 178R2 – SKB178 (pSV16) + АИ;

GroR2 – OFB1111groEL673(pSV16) + АИ;

178R2R1 – SKB178 (pSV16, pIV3) + АИ;

GroR2R1 – OFB1111groEL673(pSV16, pIV3) + АИ

Далее были проведены исследования билюминесценции клеток *E. coli* OFB1111groEL673 и SKB178 gro<sup>+</sup> с плазмидами pIVA, pSV16 и комбинацией плазмид pSV16 и pIV3 в зависимости от концентрации АИ. Результаты сравнивали с концентрационными зависимостями активности LuxR из *A. fischeri*, используя ту же пару штаммов *E. coli*, но с введенной плазмидой pVFR1, в которой репортерные гены luxCDABE из *P. luminescens* встроены под контролем Pr промотора (с регуляторной последовательностью lux-бокса) lux-оперона *A. fischeri*, кроме того содержит ген luxR под промотором P1 в векторе pDEW201.

На Рисунке 22 представлены данные о влиянии мутации GroEL/ES на регуляцию Pr промотора lux-оперона *A. fischeri* (Рис. 22А), Pr1 и Pr2 промоторов, регулируемых luxR1 и luxR2 генами соответственно (Рис. 22В) и Pr2 промотора, регулируемого комбинацией генов luxR1 и luxR2 (Рис. 22С).

Из данных представленных на Рисунке 22 видно, что при повышении концентрации АИ в среде до 10-100 мкМ практически полностью восстанавливается активность LuxR из *A. fischeri* в gro<sup>-</sup> клетках, по-видимому, в результате стабилизации гомодимера (LuxR)<sub>2</sub> (Рис. 22А). Недостаток шаперонина GroEL/ES снижает на как минимум на порядок интенсивность билюминесценции, регулируемой белком LuxR2, но не LuxR1 (Рис. 22В). 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).

Неожиданным оказался результат измерения билюминесценции клеток *E. coli* OFB1111groEL673 и SKB178 gro<sup>+</sup> с комбинацией плазмид pSV16 и pIV3 в зависимости от концентрации АИ. Оказалось, что комбинация генов luxR1 и luxR2 позволяет восстановить люминесценцию в gro<sup>-</sup> клетках при повышении концентрации АИ до уровня клеток дикого типа (Рис. 22С).

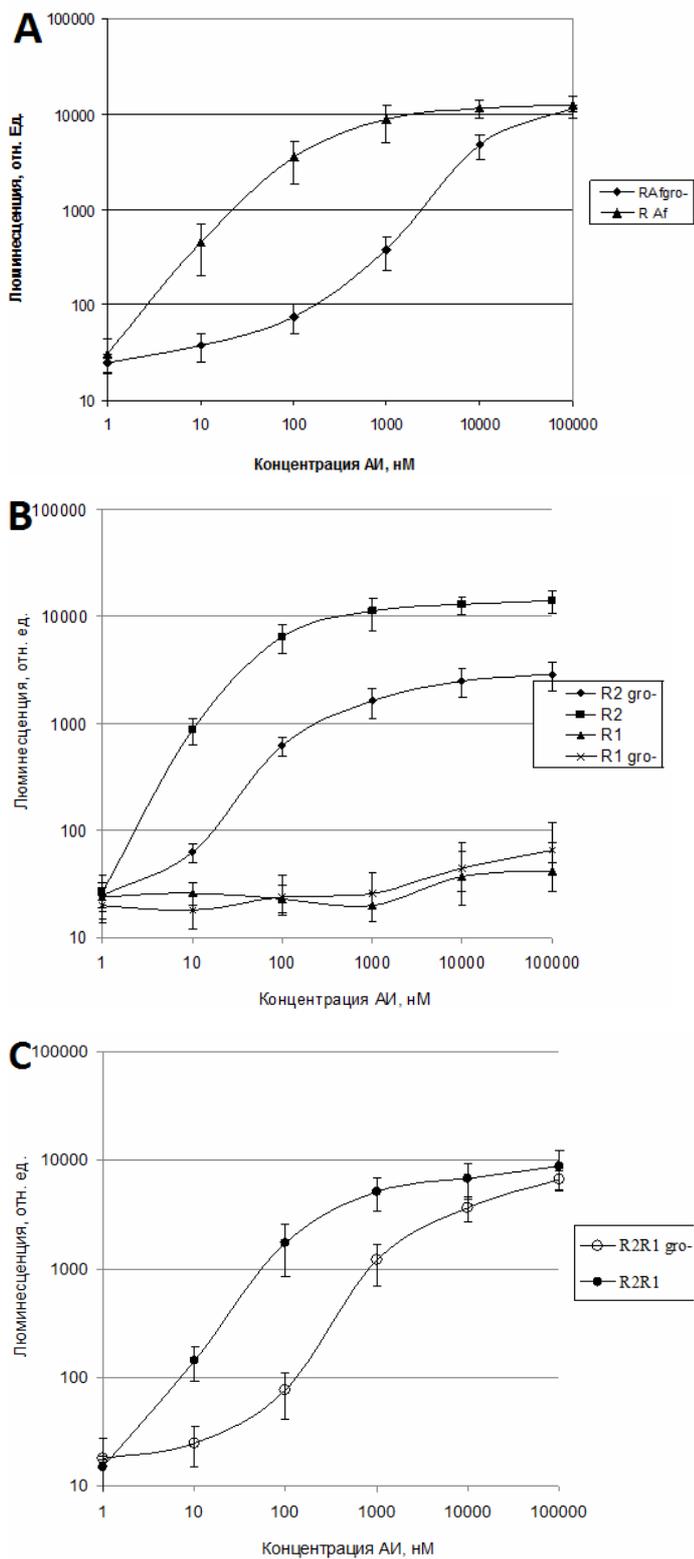


Рис. 22 Зависимость интенсивности люминесценции от концентрации АИ *E. coli* с А) pVFR1; В) pSV16 или pIVA; С) pSV16 и pIV3.  
 RAfgro- – *E. coli* OFB1111groEL673(pVFR1); RAf – *E. coli* SKB178gro<sup>+</sup>(pVFR1);  
 R1gro- – *E. coli* OFB1111groEL673(pIVA); R1 – *E. coli* SKB178gro<sup>+</sup> pIVA;  
 R2gro- – *E. coli* OFB1111groEL673(pSV16); R2 – *E. coli* SKB178gro<sup>+</sup>(pSV16);  
 R2R1gro- – *E. coli* OFB1111groEL673(pSV16, pIV3); R2R1 – *E. coli* SKB178gro<sup>+</sup>(pSV16, pIV3)

Полученные результаты позволяют предположить, что формируется гетеродимер LuxR1/LuxR2, который способен более эффективно стабилизироваться при связывании с АИ, чем гомодимер (LuxR)<sub>2</sub> и открывать Pr2 промотор даже в клетках *E. coli* OFB1111groEL673. Таким образом, 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 в стрессовых условиях при недостатке шаперонина GroEL/ES.

На следующем этапе была изучена экспрессия *lux*-генов с промотора Pr1 регулируемого как *luxR1* геном, так и комбинацией *luxR1* и *luxR2* генов в условиях наличия или отсутствия шаперонина GroEL/ES.

На Рисунке 23 приведены графики люминесценции клеток *E. coli* мутантных по гену *gro* и клеток дикого типа, содержащих плазмиды с *luxCDABE* кассетой *P. luminescens* под контролем промотора Pr1 и гена *luxR1* (плазмида pIVA), а так же комбинации генов *luxR1* и *luxR2* из *lux*-оперона *A. logei* (плазмиды pIVA и pIV2) в зависимости от времени инкубации после добавления АИ 10<sup>-7</sup>М (Рис. 23А) и 10<sup>-5</sup>М (Рис. 23В).

Как видно (Рис. 23А), при концентрации АИ в среде 10<sup>-7</sup>М недостаток шаперонина GroEL/ES приводит к снижению уровня биолюминесценции клеток, если Pr1 промотор регулируется комбинацией генов *luxR1* и *luxR2* (кривые 178R1R2 и groR1R2), и не влияет на уровень люминесценции в случае если регулятор только *luxR1* (кривые 178R1 и groR1). Добавление более высоких концентраций АИ 10<sup>-5</sup>М (Рис. 23В) приводит к тому, что и клетки дикого типа, и *gro* мутанты люминесцируют одинаково, как в случае с регуляцией Pr1 промотора комбинацией генов *luxR1* и *luxR2* (кривые 178R1R2 и groR1R2), так и одним геном *luxR1* (кривые 178R1 и groR1). Следует отметить, что клетки с комбинацией генов *luxR1* и *luxR2* во всех случаях светят в несколько раз выше, чем клетки с одним регуляторным геном *luxR1*.

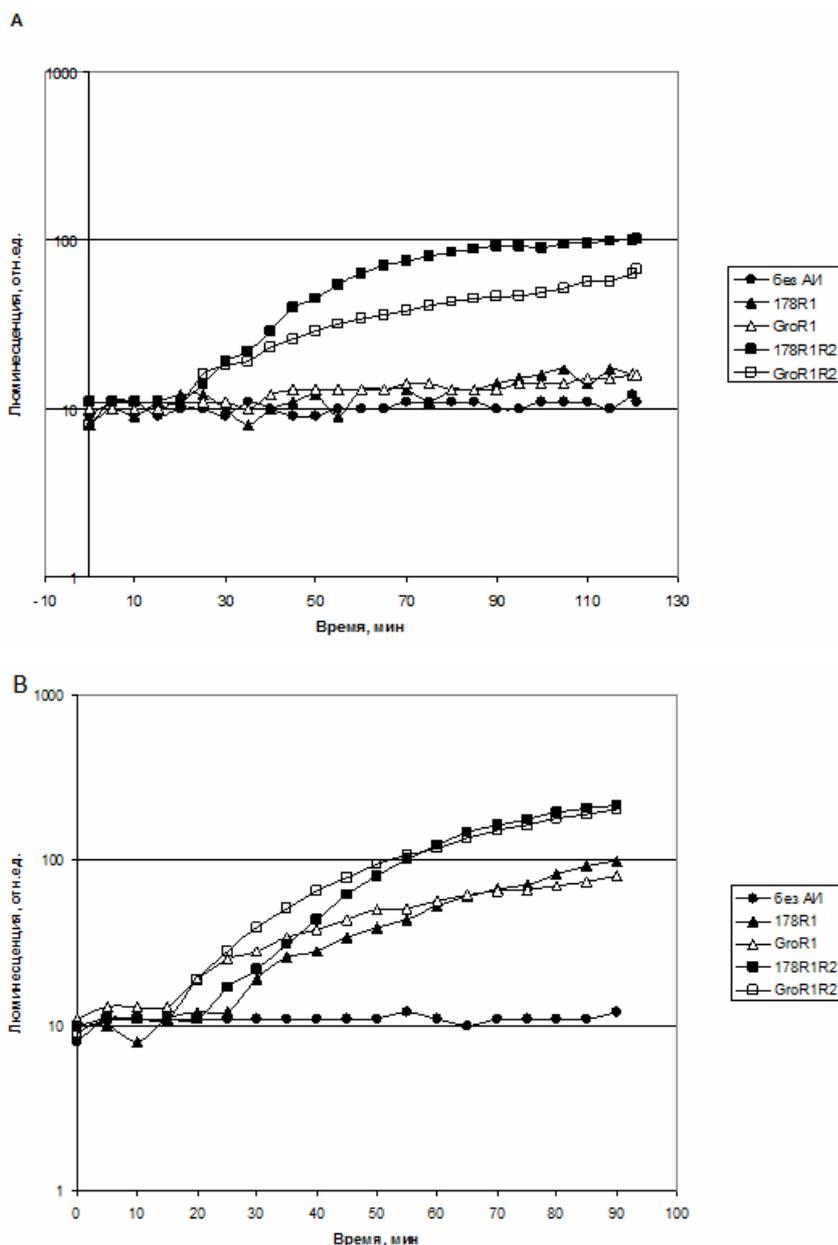


Рис. 23 Зависимость уровня свечения клеток *E. coli* OFB1111*groEL673* и SKB178 *gro+*, содержащих плазмиду pIVA (*luxR1* с промотором Pr1) или комбинацию плазмид pIVA и pIV2 (*luxR1* с Pr1 и *luxR2* ген под собственным промотором) в зависимости от времени инкубации после добавления АИ в концентрации А)  $10^{-7}$ М или В)  $10^{-5}$ М.

без АИ – контроль – для всех штаммов без добавления АИ уровень люминесценции примерно одинаков; 178R1 – *E. coli* SKB178 (pIVA) + АИ;

GroR1 – *E. coli* OFB1111*groEL673*(pIVA) + АИ;

178R1R2 – *E. coli* SKB178 (pIVA, pIV2) + АИ;

GroR1R2 – *E. coli* OFB1111*groEL673* (pIVA, pIV2) + АИ

На основе полученных данных на клетках дикого типа *E. coli* SKB178 и мутантных по шаперонину GroEL/ES *E. coli* OFB1111groEL673 можно сделать следующий вывод: белок LuxR1 помогает LuxR2 активировать промоторы при больших концентрациях АИ (10-100 мкМ), и снижает активность LuxR2 при малых концентрациях АИ, если в клетках недостаточно шаперонина GroEL/ES.

### 3.5 Влияние Lon-протеазы на регуляцию системы QS *A. logei*

Известно из работ (Завильгельский и Манухов, 1994; 1997), что протеаза Lon деградирует белки LuxR и участвует в подавлении регуляции QS системы *V. fischeri* (в настоящее время, *A. fischeri*). Позднее было показано, что Lon-протеаза негативно влияет на систему QS бактерий *Pseudomonas putida* и *Agrobacterium tumefaciens* (Bertani I. et al., 2007; Zhu J. and Winans S.C., 2001). В связи с этим возник вопрос о том, какое влияние оказывает Lon-протеаз на QS систему в психрофильных бактериях *A. logei*.

В настоящей работе представлены данные по оценке влияния Lon-протеазы на регуляцию экспрессии *lux*-оперона *A. logei*. Оценку проводили в гетерологичной системе. Клетки *E. coli* дикого типа и мутантные по Lon-протеазе (штаммы AB1157 и AB1899 *lon*<sup>-</sup>), содержащие гибридные плазмиды pSV10,4 и pF1 с полным *lux*-опероном из *A. logei* и *A. fischeri* соответственно, инкубировали при 28<sup>0</sup>С в среде со слабой аэрацией до OD=0,5. На диаграмме (Рис. 24) представлены сравнительные данные по интенсивности биолюминесценции клеток *E. coli* AB1157 и AB1899 *lon*<sup>-</sup>, содержащих гибридные плазмиды с полным *lux*-опероном *A. fischeri* и *A. logei*.

Как видно из данных (Рис. 24), имеет место существенное увеличение люминесценции для обеих плазмид в штамме *E. coli* AB1899 мутантном по Lon-протеазе, т.е. для психрофильных бактерий показана схожая с мезофильными бактериями повышенная способность *lon*-мутантов к активации QS системы *lux*-оперона при появлении АИ в среде.

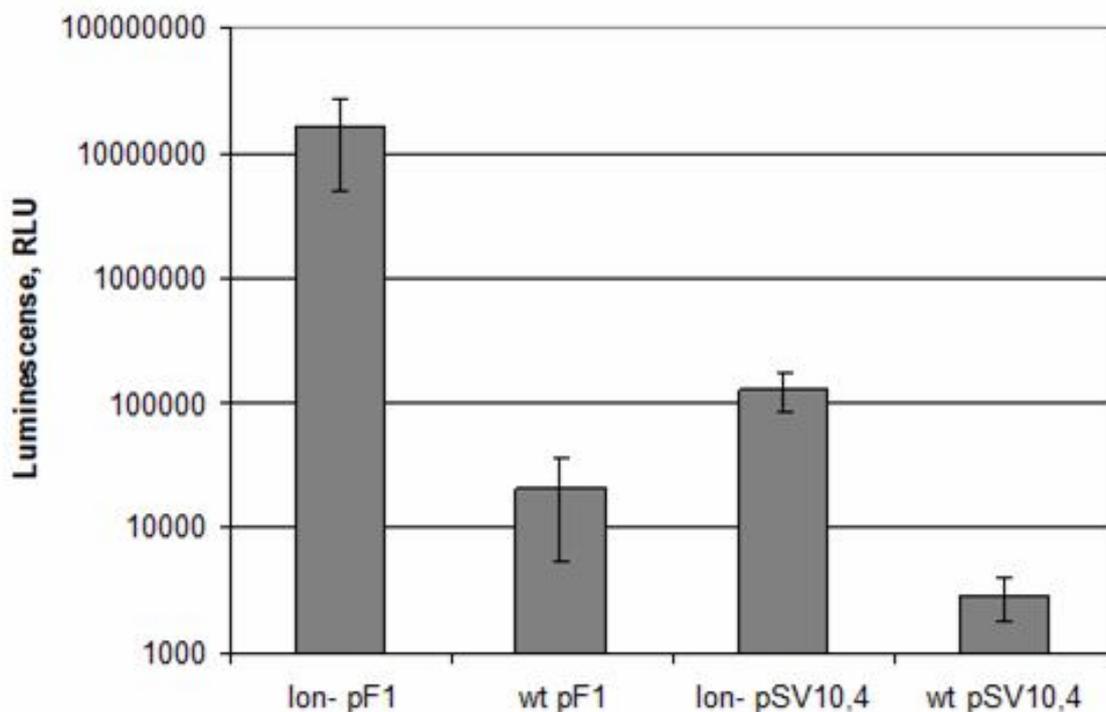


Рис. 24 Интенсивность люминесценции клеток *E. coli*, содержащих гибридные плазмиды с полным *lux*-опероном *A. fischeri* и *A. logei*. Клетки выращены при комнатной температуре со слабой аэрацией, люминесценция измерялась при достижении культурой OD=0,5.

wt pF – *E. coli* AB1157 (pF1)

lon-pF1 – *E. coli* AB1899 (pF1)

wt pSV10,4 – *E. coli* AB1157 (pSV10,4)

lon-pSV10,4 – *E. coli* AB1899 (pSV10,4)

Полученные данные свидетельствуют о том, что Lon-протеаза снижает чувствительность к АИ QS системы у *A. logei*. Таким образом, показано, что Lon-протеаза участвует в негативной регуляции QS системы психрофильных бактерий *A. logei*.

### 3.6 Влияние Lon-протеазы на регуляцию промоторов *lux*-оперона *A. logei* комбинацией белков LuxR1 и LuxR2

В диссертационной работе (Горянин И.И., 2014) было исследовано влияние Lon-протеазы на активность каждой из двух копий белка LuxR, *A. logei*. Было показано, что белок LuxR1 не чувствителен к Lon-протеазе, в отличие от LuxR2, который подвержен Lon протеолизу. В представленной работе изучено влияния Lon-протеазы на экспрессию генов *lux*-оперона в

присутствии комбинации белков LuxR1 и LuxR2 *A. logei*. С этой целью в клетки *E. coli* AB1157 *lon*<sup>+</sup> и AB1899 *lon*<sup>-</sup> вводили плазмиды, в которых гены *luxCDABE* *P. luminescens* находятся под контролем промотора, регулируемого белком LuxR2 *A. logei* (плазмида pSV16) или LuxR1 (плазмида pIVA); а также комбинацию плазмид pSV16 и pIV3 (ген *luxR1* под собственным промотором в pACYC184). Для сравнения с мезофильной QS системой использовали плазмиду pVFR1, в которой промотор и регуляторный ген *luxR* взяты из *A. fischeri*.

Ночную культуру штаммов *lux*-биосенсоров вносили в соотношении 1/100 в пробирки с LB средой и инкубировали при 28<sup>0</sup>С с аэрацией до OD=0,2. Затем, отбирали аликвоту и добавляли АИ в концентрации 10<sup>-5</sup>М или без АИ и продолжали инкубацию при комнатной температуре. Измерение уровня свечения проводили через равные промежутки времени.

На Рисунке 24 показана зависимость уровня свечения от времени для клеток *E. coli* AB1899 *lon*<sup>-</sup> с плазмидой pSV16 и с комбинацией плазмид pSV16 и pIV3 при добавлении АИ 10<sup>-4</sup>М и без АИ от времени.

Как видно из данных (Рис. 25), имеет место разница в люминесценции штаммов AB1157 *wt* и AB1899 *lon*<sup>-</sup> содержащих плазмиду pSV16 (кривые 1159R2 и 1899R2), это означает, что Lon-протеаза снижает количество активного белка LuxR2. В отличие от LuxR2 комбинация белков LuxR2 и LuxR1 (штаммы трансформированы плазмидами pSV16 и pIV3) обеспечивает практически одинаковую биолюминесценцию как в клетках *lon*<sup>-</sup>, так и дикого типа (кривые 1899R2R1 и 1157R2R1). Следует отметить, что данный эффект наблюдался только при высоких концентрациях АИ (10<sup>-5</sup>М и выше).

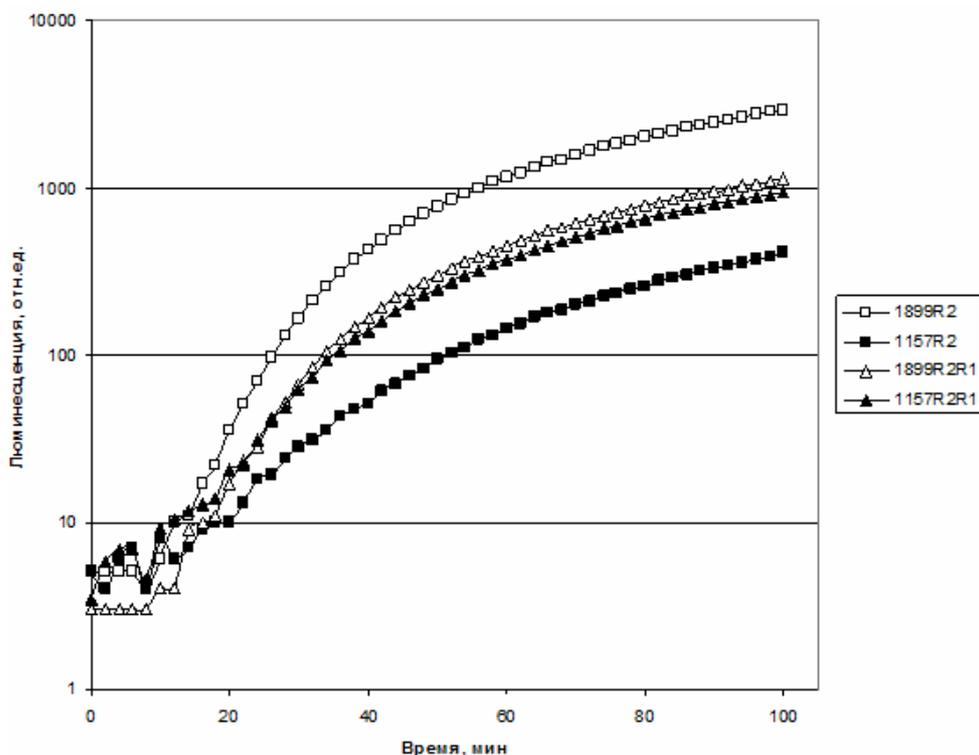


Рис. 25 Зависимость интенсивности биолюминесценции клеток *E. coli* AB1899 *lon*<sup>-</sup> и клеток дикого типа AB1157, содержащих плазмиду pSV16 (*luxR2* и промотор Pr2) или две плазмиды pSV16 и pIV3 (*luxR2* с Pr2 и *luxR1* под собственным промотором) от времени инкубации после добавления АИ 10<sup>-4</sup>М

1899R2 – клетки *E. coli* AB1899 pSV16; 1157R2 – клетки *E. coli* AB1157 pSV16

1899R2R1 – клетки *E. coli* AB1899 pSV16, pIV3;

1157R2R1 – клетки *E. coli* AB1157 pSV16, pIV3

Далее была исследована способность к биолюминесценции клеток *E. coli lon*<sup>-</sup> и *lon*<sup>+</sup>, с вышеописанными конструкциями в зависимости от концентрации АИ. Проведено сравнение активности белков LuxR из *A. logei* с LuxR из мезофильных бактерий *A. fischeri* в клетках *E. coli lon*<sup>-</sup> и *lon*<sup>+</sup>.

Данные этих экспериментов представлены на графике (Рис. 26), который отражает интенсивность люминесценции клеток *E. coli* AB1157 и *E. coli* AB1899 *lon*<sup>-</sup> с pSV16 или pIVA, или с комбинацией плазмид pSV16 и pIV3 (*luxR1* ген) в зависимости от концентрации АИ. При определении зависимости люминесценции от концентрации были взяты точки люминесценции культур клеток соответствующие двум часам инкубации.

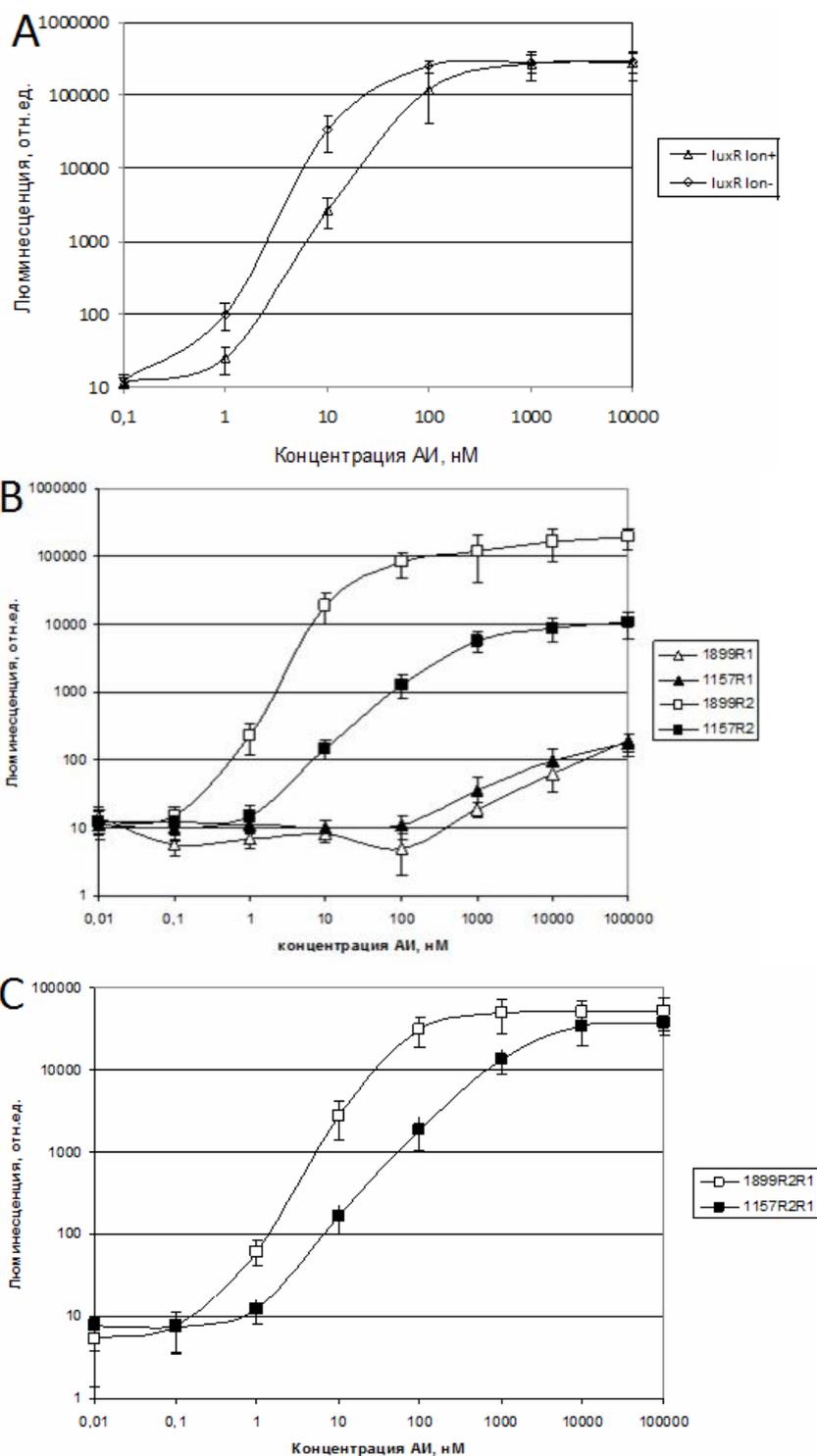


Рис. 26 Влияние Lon-протеазы на активность LuxR белков. Зависимость интенсивности люминесценции клеток *E. coli* AB1157 *lon*<sup>+</sup> и AB1899 *lon*<sup>-</sup>, трансформированных плазмидами pVFR1 (A), pSV16 или pIVA (B), и комбинацией плазмид pSV16 и pIV3 (C) от концентрации АИ. *luxR lon*<sup>+</sup> – *E. coli* AB1157 pVFR1; *luxR lon*<sup>-</sup> – *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

Как видно из полученных данных (Рис. 26) 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. 26А), 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. 26В). 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. 26В). Эти результаты соответствуют данным полученным ранее (Горянин И.И., 2014).

Иная картина наблюдалась при исследовании способности к люминесценции клеток *E. coli lon<sup>-</sup>* и *lon<sup>+</sup>* с комбинацией плазмид pSV16 и pIV3. Оказалось, что при невысоких концентрациях АИ люминесценция клеток AB1899 *lon<sup>-</sup>* в присутствии комбинации LuxR2 и LuxR1 несколько снижена по сравнению клетками дикого типа, но при больших концентрациях АИ значения люминесценции практически совпадают (кривые 1899R2R1 и 1157R2R1, Рис. 26С).

Полученные результаты позволяют предположить, что при больших концентрациях АИ гетеродимер LuxR1/LuxR2, по-видимому, стабилизируется и становится менее подверженным деградации Lon-протеазой и способным 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. Это подтверждает гипотезу о необходимости наличия белка LuxR1 в стрессовой ситуации.

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.

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.

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

Чтобы изучить влияние биолюминесценции на репарацию ДНК использовали модели бактерий *E. coli* со встроенными гибридными плазмидами, содержащими гены *lux*-оперонов различных светящихся бактерий, расположенными как под промотором системы QS, так и под УФ-индуцируемыми промоторами. В работе использовали, наравне 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 протеаза Lon). Мутант *E. coli lon* характеризуется значительным усилением экспрессии *lux*-генов в связи с отсутствием деградации LuxR, белка – активатора транскрипции системы QS (Г.Б. Завильгельский и др., 2010).

#### 3.7.1 Влияние *lux*-генов *P. leiognathi* на выживаемость бактерий *E. coli* при УФ-облучении

На Рисунке 27А представлены кривые выживаемости бактерий *E. coli* AB1886 *uvrA6* (темновой вариант) и AB1886 *uvrA6* (pLeo1) (световой вариант) в зависимости от дозы УФ (254 нм). В плазмиде pLeo1 гены *luxCDABE* *P. leiognathi* расположены как под собственным промотором, так и под *lac* - промотором вектора pUC18. Интенсивность биолюминесценции суспензии клеток при этих условиях достигает максимума (около  $5 \times 10^5$  мкВ/200 мкл), и в

расчете на клетку составляет примерно  $2 \times 10^5$  квант/сек. Как видим, наличие в клетках плазмиды pLeo1 увеличивает резистентность клеток к УФ-облучению примерно в два раза (по разности наклонов кривых выживаемости). Однако, при обработке бактерий митомицином С, который индуцирует в ДНК нефотореактивируемые моноаддукты, штаммы АВ1886 и АВ1886 (pLeo1) характеризуются равными параметрами чувствительности (Рис. 27Б).

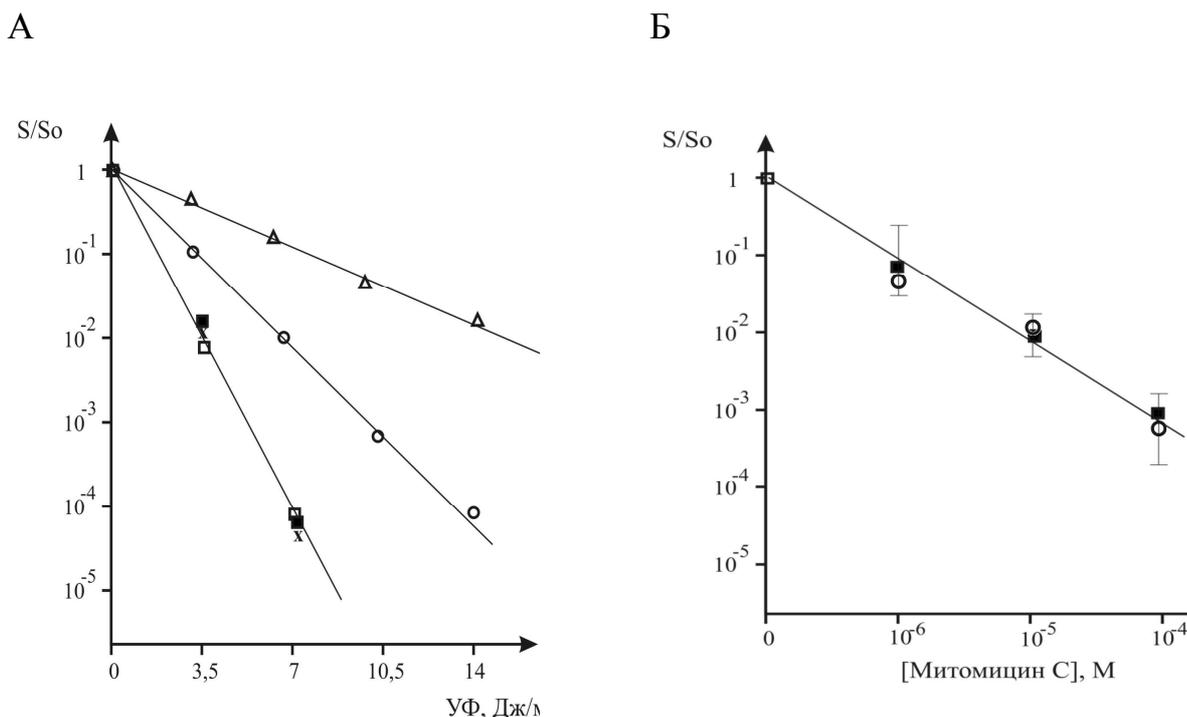


Рис. 27 Кривые выживаемости бактерий *E. coli* АВ1886 *uvrA6* (темновой вариант) и АВ1886 *uvrA6* (pLeo1) (световой вариант) в зависимости от дозы УФ (254 нм) (А) или от концентрации митомицина С (Б). Представлены кривые выживаемости бактерий при УФ-облучении штаммов *E. coli* АВ1886 *uvrA6* (pLeo3), *E. coli* АВ1886 *uvrA6* *phr::kan<sup>r</sup>* (pLeo1), а также штамма *E. coli* АВ1886 *uvrA6*, которые после УФ-облучения были фотореактивируемые при помощи света ( $\lambda > 385$  нм). Кривые выживаемости бактерий *E. coli* АВ1886 *uvrA6* (темновой вариант) и АВ1886 *uvrA6* (pLeo1) (световой вариант) при обработке бактерий митомицином С, который индуцирует в ДНК нефотореактивируемые моноаддукты. Штаммы АВ1886 и АВ1886 (pLeo1) характеризуются равными параметрами чувствительности к митомицину С. Δ - *E. coli* АВ1886 *uvrA6* + освещение фотореактивирующей лампой СВД-120А с фильтром ЖС-4. Фотореактивацию проводили в фосфатном буфере 20 мин при 37<sup>0</sup>С; ■ - *E. coli* АВ1886 *uvrA6* (темновой вариант); ○ - *E. coli* АВ1886 *uvrA6* (pLeo1) (световой вариант); □ - *E. coli* АВ1886 *uvrA6* (pLeo3) (темновой вариант); х - *E. coli* АВ1886 *uvrA6* *phr::kan<sup>r</sup>* (pLeo1) (темновой вариант)

Защитный эффект pLeo1 от УФ-облучения определяется именно биолюминесценцией, т. к. УФ-чувствительность несветящегося штамма АВ1886 (pLeo3) (плазмида pLeo3 содержит под *lac* – промотором гены *luxABE* *P. leiognathi*) совпадает с таковой исходного темного штамма АВ1886.

Из представленных данных (Рис. 27) следует также, что эффект pLeo1-индуцируемой фотозащиты определяется процессом фотореактивации, т. к. УФ-чувствительность двойного мутанта АВ1886 *uvrA6 phr:kan* (с неактивной фотолиазой) соответствует примерно таковой темного штамма АВ1886 *uvrA6*.

Необходимо отметить, что фотореактивирующая активность биолюминесценции значительно уступает таковой, измеренной с использованием света лампы СВД120А. Фактор уменьшения дозы УФ (ФУД) при фотореактивации, индуцируемой лампой СВД-120А + фильтр ЖС-4, для бактерий АВ1886 составляет примерно 4,5, в то время как ФУД УФ для бактерий АВ1157 (pLeo1) равен 2 (Рис. 27А).

В отличие от мутанта АВ1886 *uvrA6* с дефектной системой темновой эксцизионной репарации в штамме АВ1157 *uvr*<sup>+</sup> плазмида pLeo1 практически не способствует защите клеток от УФ-облучения (данные не представлены). Наличие в клетках АВ1157 эффективной системы UvrABC эксцизионной репарации циклобутановых пиримидиновых димеров в ДНК маскирует дополнительный эффект фотолиазы. Измерение степени фотореактивации у УФ-облученных бактерий АВ1157, проведенного при освещении лампой СВД-120А с фильтром ЖС-4, дало значение ФУД = 1,3, что значительно уступает ФУД = 4,5, характерному для мутантного штамма АВ1886 *uvrA6*.

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

Для анализа влияния QS системы на фотореактивацию в настоящей работе использовали мутантный штамм АВ1886 *uvrA6* с дефектной системой темновой эксцизионной репарации, содержащий гибридные плазмиды pF1 или pSV10,4. Плазмида pF1 содержит полный *lux*-оперон *luxRIABCDE* мезофильной

бактерии *A. fischeri*. Плазмида pSV10,4 содержит полный *lux*-оперон психрофильной бактерии *A. logei*. На Рисунке 28 представлены кривые выживаемости бактерий *E. coli* AB1886 *uvrA6* (темновой вариант), AB1886 *uvrA6* (pF1) (световой вариант с полным *lux*-опероном из *A. fischeri*) и AB1886 pSV10,4 (световой вариант с полным *lux*-опероном из *A. logei*) в зависимости от дозы УФ (254 нм). УФ-облучение клеток проводили через 40 мин после добавления АИ в среду.

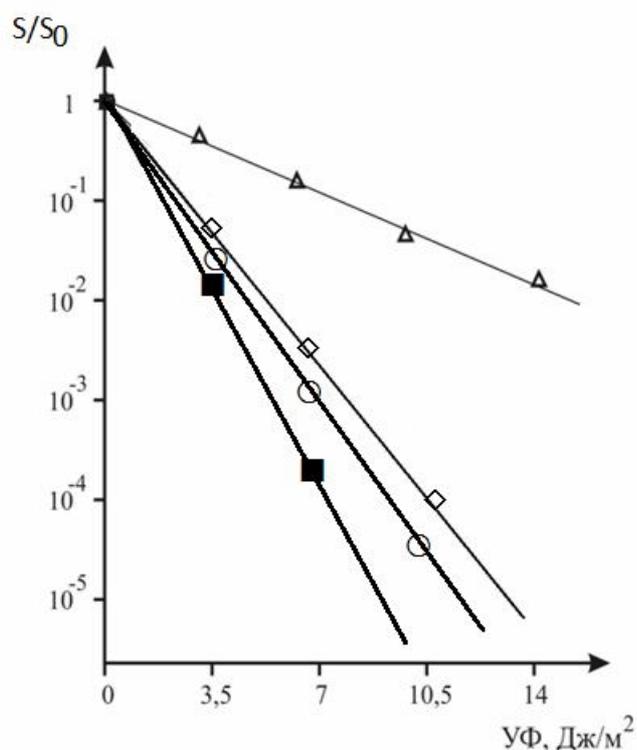


Рис. 28 Кривые выживаемости бактерий *E. coli* AB1886 *uvrA6* (темновой вариант), AB1886 *uvrA6* (pF1) (световой вариант), AB1886 *uvrA6* (pSV10,4) (световой вариант) в зависимости от дозы УФ (254 нм), а также штамма *E. coli* AB1886 *uvrA6*, который после УФ-облучения был фотореактивируем при помощи света ( $\lambda > 385$  нм).  $\Delta$  - *E. coli* AB1886 *uvrA6* + освещение фотореактивирующей лампой СВД-120А с фильтром ЖС-4. Фотореактивацию проводили в фосфатном буфере 20 мин при 37<sup>0</sup>С;  $\blacksquare$  - *E. coli* AB1886 *uvrA6* (темновой вариант);  $\circ$  - *E. coli* AB1886 *uvrA6* (pSV10,4) (световой вариант);  $\square$  - *E. coli* AB1886 *uvrA6* (pF1) (световой вариант)

Как видим, кривые УФ-инактивации бактерий в темновом и световом вариантах различаются. Введение в клетки *E. coli* AB1886 генов *lux*-оперона, экспрессия которых регулируется QS системой, 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.

На Рисунке 29 представлены кривые УФ-выживаемости бактерий *E. coli* AB1899 с активной системой темновой эксцизионной репарации (темновой вариант), AB1899 (pF1) (световой вариант с полным *lux*-опероном из *A. fischeri*) и AB1899 (pSV10,4) (световой вариант с полным *lux*-опероном из *A. logei*). УФ-облучение клеток проводили через 40 мин после добавления в среду аутоиндуктора.

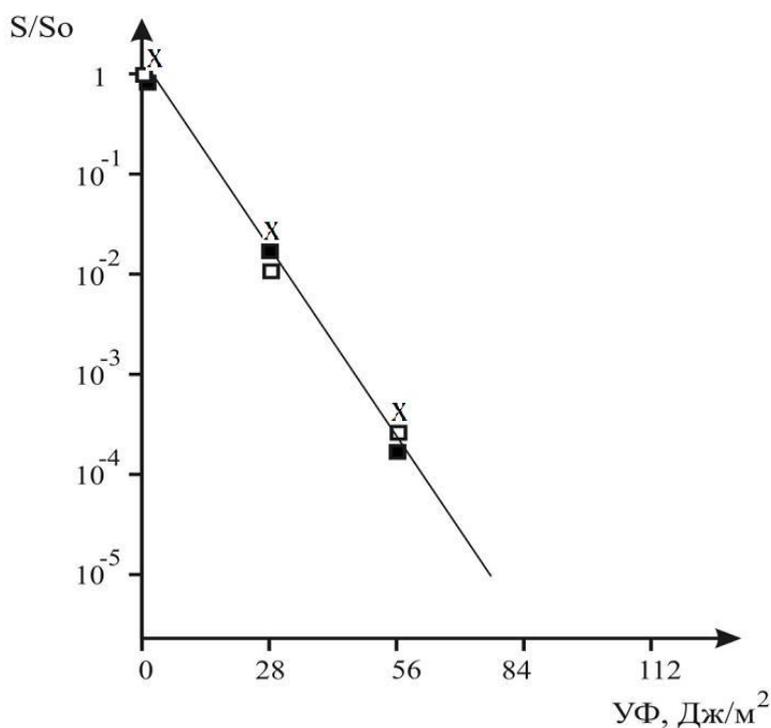


Рис. 29 Кривые УФ-выживаемости бактерий AB1899 (темновой вариант) и AB1899 (pF1) (световой вариант), AB1899(pSV10,4). УФ-облучение клеток проводили через 40 мин после добавления в среду АИ. ■ – *E. coli* AB1899; □ – *E. coli* AB1899 (pF1); x - *E. coli* AB1899 (pSV10,4)

Как видим, кривые УФ-инактивации бактерий в темновом и световом вариантах практически не различаются. Чувствительность клеток *E. coli* AB1899, *E. coli* AB1899 (pF1) и *E. coli* AB1899 (pSV10,4) к УФ-облучению оказалась примерно одинаковой с темновым контролем. По-видимому, несмотря на активную QS систему наличие в клетках AB1899 эффективной

эксцизионной репарации циклобутановых пиримидиновых димеров в ДНК (UvrABC) маскирует дополнительный эффект активации фототиазы биолюминесценцией.

Следует отметить, что роль биолюминесценции, регулируемой QS системой, в фотореактивации в природе незначительна т.к. при попадании бактерий из кишечника рыб в морскую воду АИ выходит из клетки и экспрессия *lux*-оперона прекращается.

### **3.8 Использование генов *lux*-оперонов как репортерных в цельноклеточных биосенсорах на основе *E. coli* для определения генотоксичных продуктов неполного окисления несимметричного диметилгидразина**

Прикладным аспектом настоящей работы являлась разработка набора *lux*-биосенсоров на основе используемых в исследованиях репортерных конструкций и индуцируемых стрессовых промоторов. *Lux*-опероны и индуцируемые бактериальные промоторы всё чаще находят применение в экотоксикологических работах. В ходе выполнения диссертационной работы была поставлена задача по созданию системы биодетекции токсичных компонентов ракетного топлива - несимметричного диметил гидразина и продуктов его окисления.

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 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 (усиления) 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 30 показана зависимость люминесценции от времени действия продуктов неполного окисления НДМГ 1 мМ на биосенсор *E. coli* pAlkA-lux.

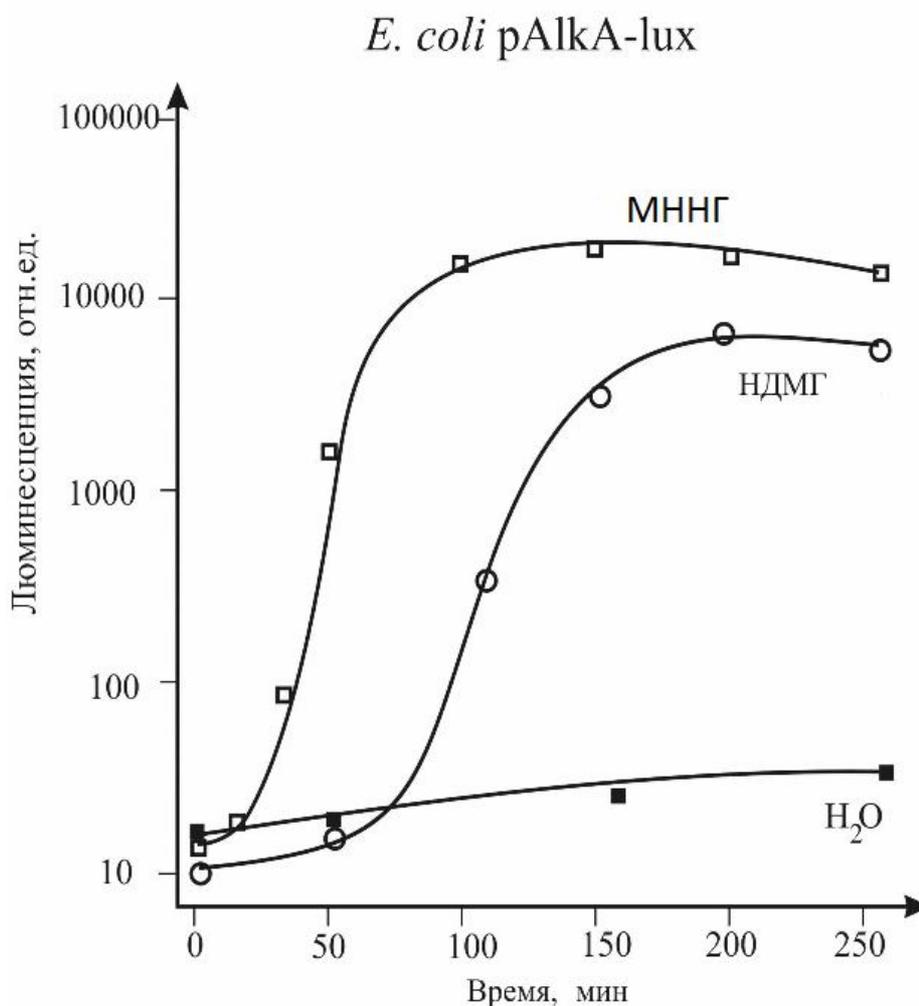


Рис. 30 Зависимость люминесценции клеток *E. coli* MG1655 pAlkA-lux от времени инкубации после добавления нитрозогуанидина в концентрации МННГ 1 мМ или НДМГ 7,5 мМ, предварительно окисленный перекисью водорода 7 мМ (НДМГ). В контрольные клетки добавлена вода (H<sub>2</sub>O)

Как видно из Рисунка 30, 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 31 и 32. На Рисунке 31 показана зависимость люминесценции от времени, на Рисунке 32 - от концентрации НДМГ.

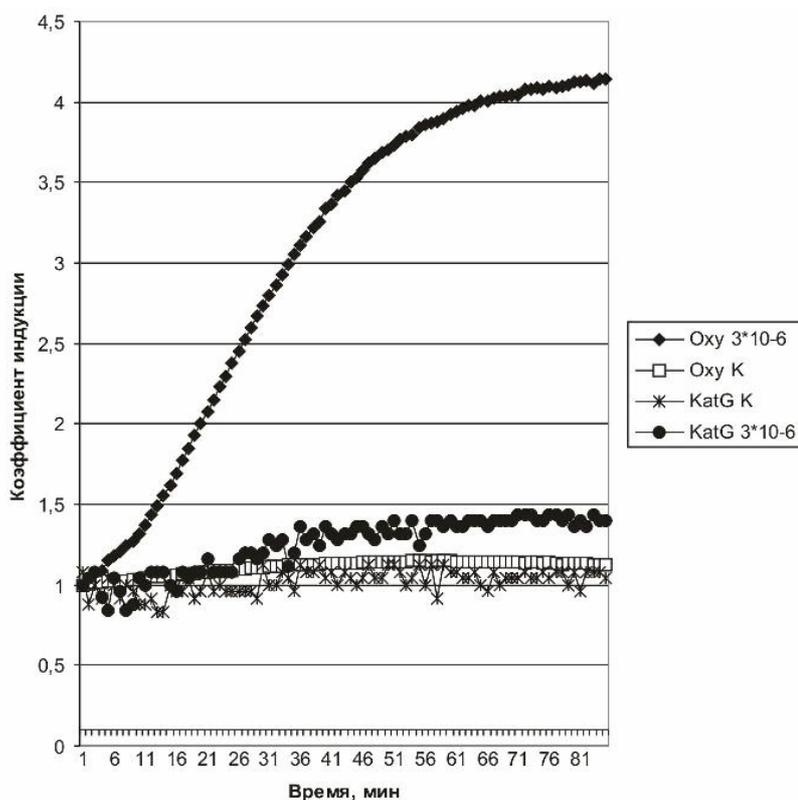


Рис. 31 Зависимость люминесценции биосенсора *E. coli* MG1655 pKatG-lux и биосенсора *E. coli* MG1655 pOxyR-lux от времени инкубации в присутствии НДМГ

Oxy  $3 \times 10^{-6}$  – добавлен НДМГ до концентрации 0,02 мкг/мл

Oxy k – контрольная культура с добавлением воды

Katg k – контрольная культура с добавлением воды

Katg $3 \times 10^{-6}$  – добавлен НДМГ до концентрации 0,02 мкг/мл

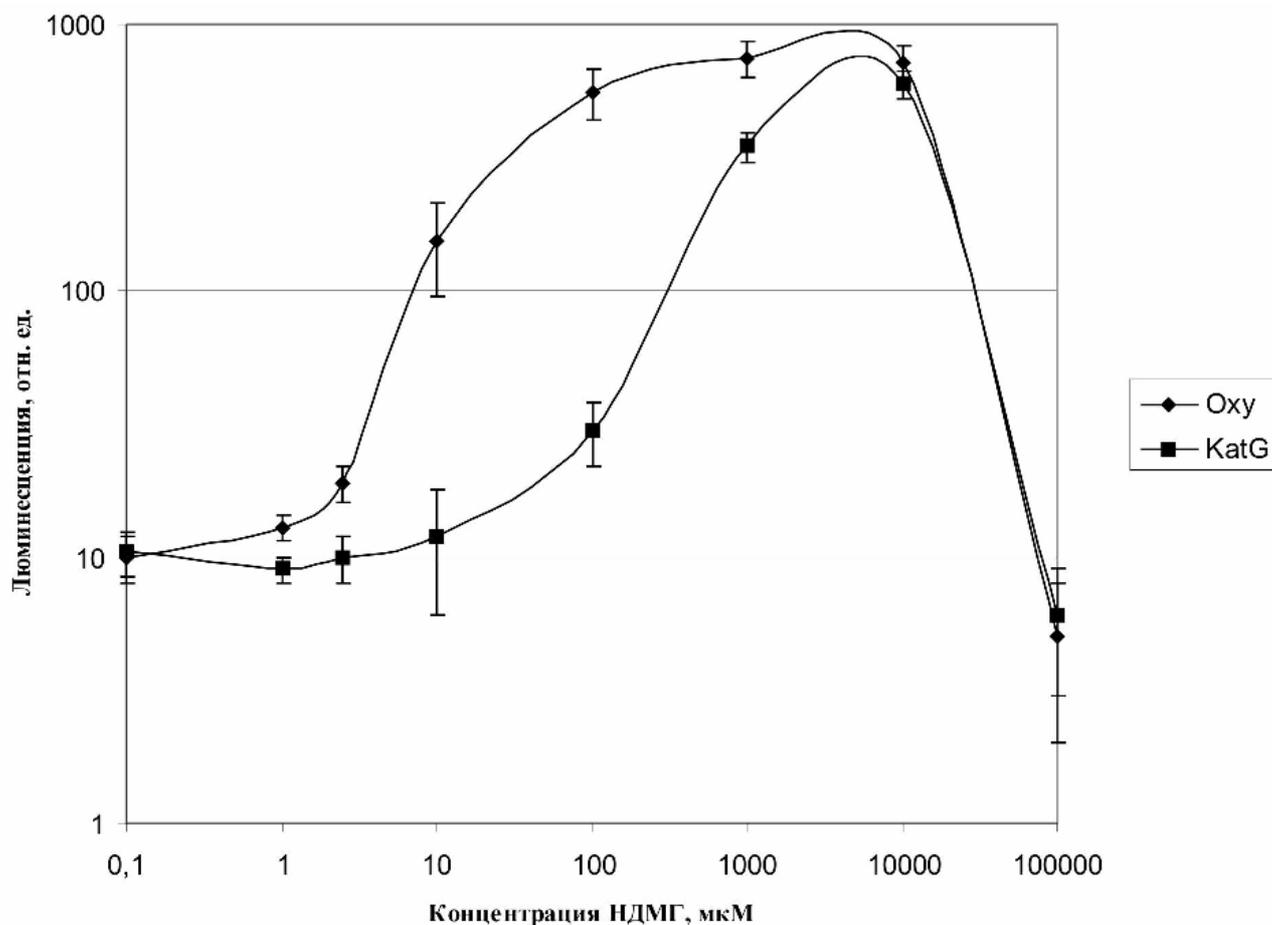


Рис. 32 Зависимость люминесценции биосенсора *E. coli* MG1655 pKatG-lux и биосенсора *E. coli* MG1655 pOxyR-lux от концентрации НДМГ в пробе

Oxy - культура биосенсора *E. coli* MG1655 pOxyR-lux;

KatG - культура биосенсора *E. coli* MG1655 pKatG-lux

Как видно из полученных результатов (Рис. 31 и 32), в процессе действия продуктов неполного окисления НДМГ на клетку происходит индукция биолюминесценции у обоих биосенсоров *E. coli* pKatG-lux и *E. coli* pOxyS-lux, причём, 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<sub>recA</sub> (Манухов И. В. и др., 2009). Влияние НДМГ на биосенсор *E. coli* pGrpE-lux практически отсутствует, поэтому данный биосенсор служит отрицательным контролем в данном наборе биосенсоров.

Биосенсор *E. coli* pSoxS-lux, открывающийся в присутствии НДМГ, применялся ранее (Завильгельский Г. Б. и др. Патент РФ № 2297450 от 2007.04.20). В Таблице 9 представлены данные о минимальных (пороговых) концентрациях стандартных, специфических для данного промотора веществ, индуцирующих заметный (в 1,5 - 2 раза) эффект усиления биолюминесценции, в сконструированных *lux*-биосенсорах (митомицин С индуцирует повреждения в ДНК, этанол – в белках, перекись водорода и паракват индуцируют окислительный стресс, нитрозогуанидин алкилирует ДНК. Максимальная амплитуда ответа измерена при оптимальных концентрациях стандартов.

Табл. 9 Пороговые концентрации стандартных, специфических для используемых промоторов веществ.

Биосенсор	Стандартное вещество	Пороговая концентрация, М/л	Максимальная амплитуда ответа*	Амплитуда ответа на оптимальные концентрации НДМГ
pAlkA-lux	МННГ	$10^{-8}$	1000	400
pColD-lux	Митомицин С	$10^{-9}$	1000	200
pRecA-lux	Митомицин С	$10^{-8}$	300	100
pOxyS-lux	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$5 \times 10^{-7}$	300	200
pKatG-lux	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$3 \times 10^{-6}$	50	20
pGrpE-lux	Этанол	0,5%	20	0
pSoxS-lux	Паракват	$10^{-7}$	1000	70

\* амплитуда ответа рассчитывается как  $AO = I_{\max}/I_k$ , где  $I_{\max}$  – интенсивность биолюминесценции биосенсора после добавления токсиканта взятая для времени  $t_{\max}$ , при котором имеется максимальная разница с контролем, а  $I_k$  – интенсивность люминесценции контрольных клеток для времени  $t_{\max}$ .

Как видно из данных, приведённых на Рисунках 30-32 и в Таблице 9, 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  $P_{grpE}$ . В предложенном изобретении для определения токсичных продуктов неполного окисления НДМГ использована группа биосенсоров, обладающих большей чувствительностью к малым концентрациям токсикантов, чем биосенсоры применяемые ранее, кроме того используется не применявшаяся ранее *lux*-биосенсор, чувствительный к алкилирующим агентам. Таким образом, расширена способность к специфической детекции токсикантов и чувствительность метода.

#### Глава 4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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 (более 50%). Этот факт наблюдается во всех обследованных студёных морях Белом, Балтийском, Беринговом и Охотском. 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 все эти микроорганизмы относятся к психрофилам.

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. Можно предположить, что преимущественное преобладание микроорганизмов вида *A. logei* над *Photobacterium sp.* в условиях более 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. Мы предполагаем, что благодаря QS регуляции бактерии *A. logei* имеют преимущество зимой, сохраняя ресурсы для люминесценции только в условиях высокой плотности популяции. Бактерии *A. logei* привлекают внимание рыб, 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. Ярко светящиеся представители рода *Phosphoreum* 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 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.

Филогенетический анализ последовательности генов *luxR* разных штаммов *A. logei* и *A. salmonicida* показал, что гены *luxR1* и *luxR2* формируют два обособленных кластера, не разделяющихся по видам, что косвенно подтверждает гипотезу о разной функции каждой из двух копий гена *luxR*.

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.

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 биохимического и филогенетического анализа последовательностей генов «house-keeping», а так же филогенетический анализ вариабельных спейсерных последовательностей и генов *lux*-оперона свидетельствует о необходимости видовой реклассификации этих видов.

Предполагается, что штаммы, распределённые в настоящее время по двум видам *A. logei* и *A. salmonicida* должны быть сведены к одному.

В настоящей диссертации на модели *E. coli* показано, что экспрессия генов *lux*-оперона *A. logei* с промотора Pr1 идет значительно слабее, чем с Pr2. Предполагается, что это связано с тем, что сайт связывания с LuxR (*lux*-бокс) в Pr1 короче, чем *lux*-бокс Pr2, и, по-видимому, менее эффективен.

Поскольку промотор Pr1 слабый, ген *luxI* в структуре *lux*-оперона *A. logei*, кодирующий АИ, вынесен под действие более сильного промотора Pr2. Гены *luxCDABE* остаются под более слабым промотором, 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 ее синтезировать в больших количествах нет необходимости.

По-видимому, для психрофильных клеток *A. logei* при низких температурах 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 P<sub>g</sub> промотора, что в бактериальных оперонах, как правило, свидетельствует о необходимости наиболее высокой его экспрессии из числа генов данного оперона.

При тепловом стрессе в клетках, несмотря на активацию heat-shock промоторов, возникает недостаток шаперонина GroEL/ES, которые 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*. Как оказалось, при высоких концентрациях АИ белок LuxR1 способен запускать QS ответ, несмотря на недостаток шаперонина GroEL/ES и активную Lon-протеазу.

Полученные результаты позволяют предположить, что при больших концентрациях АИ гетеродимер LuxR1/LuxR2, стабилизируется (не требует наличия GroEL/ES) и становится менее подверженным деградации Lon-протеазой способным активировать *lux*-оперон, а значит откликаться на наличие в среде АИ, несмотря на стрессовые условия. Самостоятельно (без LuxR1) белок LuxR2 образует гомодимер (LuxR2)<sub>2</sub>, который даже при больших концентрациях АИ на это не способен (см. схему на Рис. 33). 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.

По результатам исследования влияния Lon-протеазы и шаперонина GroEL/ES на активацию промоторов, регулируемых белками LuxR1 и LuxR2 и их комбинацией, можно сделать общее заключение: белок LuxR1 слабо открывает промотор Pr1 в виде гомодимера, но модулирует активность белка LuxR2. При избытке Lon-протеазы и недостатке шаперонина GroEL/ES белок LuxR1 уменьшает активность LuxR2 при малых концентрациях АИ, и помогает экспрессировать гены *lux*-оперона при больших концентрациях АИ.

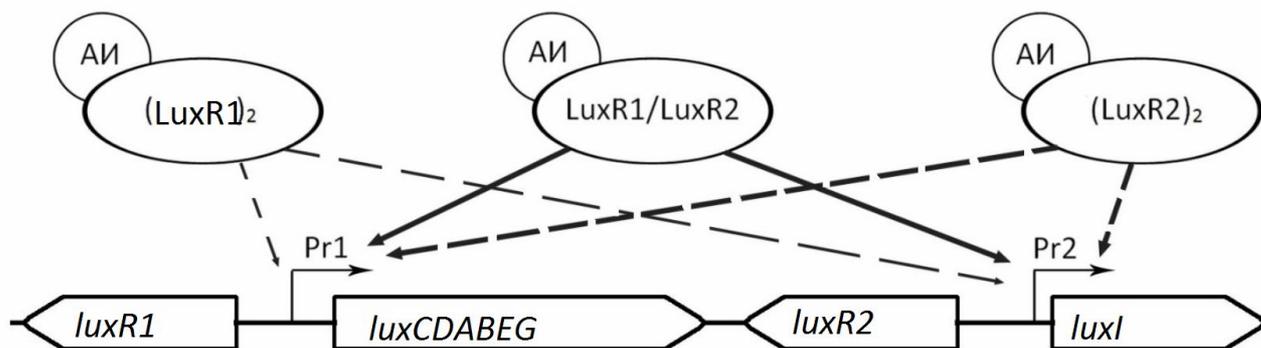


Рис. 33 Схема образования гомодимеров  $(LuxR1)_2$ ,  $(LuxR2)_2$  и гетеродимера  $LuxR1/LuxR2$  и их вклад в активацию экспрессии генов *lux*-оперона. Pr1 – слабый промотор, Pr2 – сильный промотор. Гетеродимер  $LuxR1/LuxR2$  в связанном состоянии с АИ не подвержен протеолизу и стабилизируется, несмотря на отсутствие шаперонина GroEL/ES, в полной мере проявляет свою активность, преодолевая стрессовое состояние, активирует оба промотора. Гомодимер  $(LuxR1)_2$  слабо активирует промотор Pr1 и Pr2, не чувствителен к АИ. Гомодимер  $(LuxR1)_2$  сильно активирует промоторы, однако большие 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  $LuxR1$

Особенности регуляции QS системы первого типа психрофильных бактерий *A. logei* заключаются в следующем:

- всегда присутствуют две копии регуляторного гена *luxR1* и *luxR2*;
- активация QS системы не зависит от термостабильности  $LuxR$  белков при наличии АИ;  $LuxR1$  и  $LuxR2$  менее термостабильны, чем белок  $LuxR$  из мезофильных бактерий *A. fischeri*;
- $LuxR2$  является основным регулятором,  $LuxR1$  – вспомогательным; при высоких концентрациях АИ белок  $LuxR1$  стабилизирует белок  $LuxR2$  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*;

Необходимо отметить, что основные результаты по сравнению УФ-чувствительности светящихся и несветящихся штаммов были получены на *lux*-

оперонах морских бактерий *V. harveyi* (Czyz A. et al., 2000). Базовые УФ-чувствительности природных светящихся морских бактерий выше по сравнению с бактериями *E. coli* (Wegrzyn G. et al., 2004), что позволяет предполагать в морских бактериях пониженную эффективность системы темновой эксцизионной репарации и, как следствие, наводит на предположение, что влияние фотореактивирующей активности биолюминесценции на УФ-выживаемость клеток должно возрастать.

В бактериях *E. coli* фотолиаза содержится в небольшом количестве (10-20 молекул на клетку) (Sancar A. et al., 1984). В качестве кофакторов, поглощающих свет и участвующих в репарации ДНК, в бактериальной люциферазе используются FADH<sub>2</sub> и птерин (Sancar G.B. and Sancar A., 1987). Спектр действия бактериальной люциферазы представляет собой широкую полосу в интервале (300-500 нм) с двумя максимумами (355 нм и 385 нм) (Rayne G. and Sancar A., 1990) (Рис. 34). Показано, что в процессе темновой стадии фотолиаза формирует тесный комплекс с циклобутановыми пиримидиновыми димерами в ДНК. При последующем поглощении кванта света происходит мономеризация димеров пиримидинов в результате разрыва циклобутанового кольца (Husain I. et al., 1987). Максимумом спектра люминесценции люциферазы *P. leiognathi* находится при 495 нм (Lavelle P. et al., 1970).

В интервале длин волн (400-500 нм) имеет место перекрывание спектров действия фотолиазы и люминесценции люциферазы *P. leiognathi* (Рис. 34). По-видимому, в результате данного перекрывания и происходит фотореактивация УФ-повреждений в бактериальной ДНК биолюминесцентным светом, наблюдаемая нами (Рис. 27А, Рис. 28). Следовательно, система QS способна активировать фотозащиту от УФ-повреждений ДНК как в мезофильных, так и в психрофильных бактериях за счет перекрывания спектров биолюминесценции и поглощения фотолиазы.

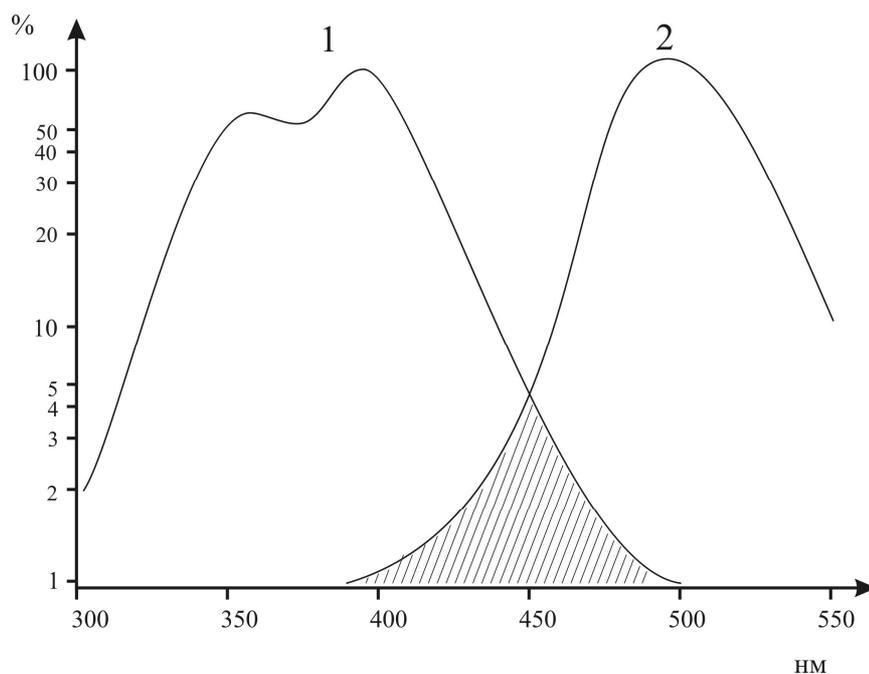


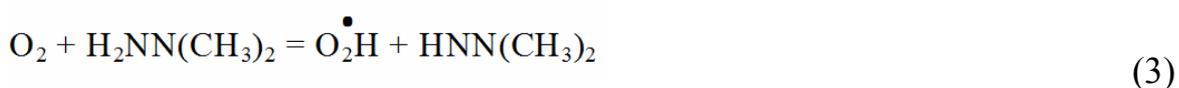
Рис. 34 Перекрывание спектра поглощения фотолиазы (1) и спектра люминесценции люциферазы *P. Leiognathi* (2)

Поскольку мы показали, что введение полного *lux*-оперона в клетки *E. coli* с эффективной системой UvrABC эксцизионной репарации не сказывается на чувствительности клеток к УФ-облучению, то относительно эволюционного значения биолюминесценции как репарирующего фактора можно предположить, что хотя фотореактивирующая активность биолюминесценции имеет место, ее роль в эволюции светящихся бактерий вторична. Следует допустить активное участие люцифераз в процессах детоксификации АФК, особенно на ранних стадиях эволюционного цикла при небольших концентрациях кислорода в атмосфере (Rees J-F. et al., 1998; Timmins G.S. et al., 2001). Тем более, что в модельных опытах было показано, что люциферазы эффективно защищают клетки морских бактерий от окислительного стресса, индуцируемого АФК (Lyzeń R. and Wegrzyn G., 2005; Szpilewska H. et al., 2003).

Прикладной аспект настоящей работы состоял в разработке набора *lux*-биосенсоров для детекции генотоксичных производных НДМГ. Показано, что добавление в среду НДМГ вызывает активацию экспрессии с промоторов  $P_{katG}$ ,  $P_{oxyS}$  и  $P_{soxS}$ . Поскольку данные промоторы открываются лишь при воздействии

перекиси водорода и супероксид-ион-радикала на белки-регуляторы OxyR (для P<sub>katG</sub>, P<sub>oxyS</sub>) и SoxR (для P<sub>soxS</sub>), в результате окисления активного центра [Fe-S], то можно считать доказанным, что действие НДМГ на бактериальную клетку во многом определяется формированием АФК, в частности, гидроперекиси и супероксид-ион-радикала (в результате восстановления кислорода воздуха до перекиси водорода).

Гидроперекись, образованная в результате химических реакций НДМГ H<sub>2</sub>NN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> в присутствии O<sub>2</sub>, открывает промотор P<sub>katG</sub>, причем столь же эффективно, как и перекись водорода, используемая в качестве стандарта:



Супероксид-радикал быстро переходит в перекись водорода:



Превращение супероксид-радикала в перекись водорода происходит как спонтанно, так и в результате действия клеточного фермента супероксид-дисмутазы.

Действие НДМГ на ДНК и, соответственно, на промоторы P<sub>colD</sub> и P<sub>гесА</sub>, на первых порах в начальную стадию окисления атмосферным кислородом носит косвенный характер и определяется в основном формирующимися активными формами кислорода. Этот вывод следует из данных о влиянии перекиси водорода на биосенсор pRecA-lux, а также из данных по снижению активации промотора P<sub>гесА</sub> в присутствии каталазы (Zavilgelsky, G.V. et al., 2007). Дальнейшее окисление НДМГ приводит к появлению алкилирующих ДНК соединений, фиксируемых биосенсором *E. coli* pAlkA-lux. Взаимодействие НДМГ с гумусом почв приводит к появлению соединений, приводящих к повреждениям в ДНК, вызывающим SOS-ответ бактерий, не снимающийся в присутствии каталазы (Горянин И. И., 2013).

Влияние НДМГ на биосенсор *E. coli* pGrpE-lux практически отсутствует, поэтому данные о воздействии НДМГ на этот биосенсор не приводятся. НДМГ

не модифицирует клеточные белки, так как, по-видимому, не проникает в цитоплазму клетки, а весь расходуется (окисляется) вне клетки.

НДМГ, по всей видимости, в отличие от представленных в Таблице 9 соединений, не обладает высокой специфичностью к тому или другому биосенсору, так как в связи с высокой реакционной активностью (очень сильный восстановитель) способен повреждать макромолекулы. В результате появляется большой набор продуктов окисления НДМГ, а так же органических соединений из водной среды и почвы, взаимодействующих с внесённым НДМГ. Поэтому оптимальным решением проблемы фиксации генотоксичных производных неполного окисления НДМГ в среде является использование набора биосенсоров, детектирующих все основные направления токсического воздействия производных НДМГ. Итог настоящей работы состоит в том, что для определения токсичных продуктов неполного окисления НДМГ предложено использовать группу *lux*-биосенсоров, обладающих большей чувствительностью к малым концентрациям токсикантов, чем биосенсоры применяемые ранее, кроме того используется не применявшаяся ранее *lux*-биосенсор, чувствительный к алкилирующим агентам. Таким образом, в результате применения *lux*-биосенсоров на основе плазмид *pOxyS-lux*, *pCold-lux* и *pAlkA-lux*, 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* не обеспечивают фотозащиту от УФ-повреждений ДНК без добавления 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 ЛИТЕРАТУРЫ

- Горянин И.И., Котова В.Ю., Краснопеева Е.Д., Чубуков П.А., Балабанов В.П., Пустовойт К.С., Чалкин С.Ф., Шатров Я.Т., Завильгельский Г.Б., Манухов И.В. 2013. Генотоксическое действие 1,1 - диметилгидразина определяется алкилирующими соединениями, возникающими при его окислении, и перекисью водорода // Труды МФТИ. 5(1), 103-111.
- Горянин И.Г. Шапероны Hsp60, Hsp70, Hsp100, Триггер Фактор и протеаза Lon как эффективные модуляторы активности люцифераз и белков LuxR мезофильных и психрофильных морских бактерий: дис. к.б.н.: 03.02.07/ Горянин Игнатий Игоревич. – М. 2014 – 110с.
- Дерябин Д.Г., Каримов И.Ф. Биохемилюминесцентный способ определения фагоцитарной активности нейтрофилов // Патент РФ №2366953 от 23.10.2007 заявитель: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Оренбургский государственный университет.
- Дмитриев О.Ю., Иваненко С.И., Овсянников Д.А., Смирнова С.С., Чистова Ж.А. 2004 Экологические проблемы разработки и эксплуатации ракетно-космической техники // Сб. Труды Российской инженерной академии, Секция «Инженерные проблемы стабильности и конверсии». 11, 40-43.
- Завильгельский Г.Б., Манухов И.В. 1994. Lon-протеаза участвует в регуляции транскрипции *lux*-оперона *Vibrio fischeri* // Генетика. 30, 337-341.
- Завильгельский Г.Б., Манухов И.В. 1997. Роль La-протеазы в негативном контроле экспрессии *luxCDABE* генов *Vibrio fischeri* в клетках *Escherichia coli* // Молекулярная биология. 31, 945-949.
- Завильгельский Г.Б., Гинопман Л. М., Ерошников Г.Е., Манухов И.В., Мельников Э.Э., Расулова Ф.С., Ротанова Т.В., Старкова Н.Н. 1999. Анализ *in vivo* протеолитической активности и эффектов "секвестрирования" и негативного доминирования *lon*-мутантов *Escherichia coli* с помощью *lux*-регулона *Vibrio fischeri* // Молекулярная биология. 33, 797-802.

- Завильгельский Г.Б., Манухов И.В. 2001. Quorum sensing, или как бактерии разговаривают друг с другом // Молекулярная биология. 35, 268-277.
- Завильгельский Г. Б., Зарубина А. П., Манухов И. В. 2002. Определение и сравнительный анализ нуклеотидной последовательности *lux*-оперона *Photorhabdus luminescens*, штамм ZM1. ERIC – элементы как предполагаемые «горячие» точки рекомбинации // Молекулярная биология. 36(5), 792-804.
- Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю., Манухов И.В. 2003. Влияние белков – регуляторов RcsA и RcsB на экспрессию *lux*-оперона *Vibrio fischeri* в клетках *Escherichia coli* // Молекулярная биология. 37, 704-711.
- Завильгельский Г.Б., Котова В. Ю., Мажуль М. М., Манухов И. В. 2004. Влияние белков семейства Clp на DnaK-зависимый рефолдинг бактериальных люцифераз // Молекулярная биология (Mol Biol (Mosk)). 38(3), 507-14.
- Завильгельский Г. Б., Котова В. Ю., Манухов И. В., Кондратьев А. Д., Самброс В. В., Шатров Я. Т., Чалкин С. Ф. Набор *lux*-биосенсоров для определения гептила в среде // Патент РФ № 2297450 от 2007.04.20 (дата приоритета 11.07.2005).
- Кузнецова Л.В. 2004. Экологические проблемы разработки и эксплуатации ракетно-космической техники // Сб. Труды Российской инженерной академии, Секция «Инженерные проблемы стабильности и конверсии». 12, 24-25.
- Лопырев В.А., Долгушин Г.В., Ласкин Б.М. 2001. Рос.хим. об-ва им. Д.И. Менделеева. XLV, № 5-6,149-156.
- Манухов И.В., Котова В.Ю., Завильгельский Г.Б. 2006. Внутриклеточные факторы регуляции экспрессии *lux*-оперона *Vibrio fischeri* в клетках *Escherichia coli* // Микробиология . 75, 525-531.
- Манухов И. В., Котова В.Ю., Завильгельский Г. Б. 2009. *Lux*-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса // Биотехнология. 6, 16-25.
- Манухов И.В. Структура *lux*-оперона и механизмы регуляции типа «quorum sensing» у морских бактерий: дис. д-ра биол. наук: 03.02.07/ Манухов Илья Вадимович - М. 2011 - 151 с.

- Мелькина О. Е., Манухов И. В., Завильгельский Г. Б. 2010. С - домен LuxR, активатора транскрипции *lux*-оперона *Vibrio fischeri*, не является мишенью для Lon - протеазы // Молекулярная биология. 44(3), 515-519.
- Хмель И.А., Метлицкая А.З. 2006. Quorum sensing регуляция экспрессии генов – перспективная модель для создания лекарств против патогенных бактерий // Молекулярная биология. 40, 195 – 211.
- Хрульнова С.А., Манухов, И. В., Завильгельский Г. Б. 2011. “Quorum sensing” регуляция экспрессии *lux*-генов и структура *lux*-оперона у морских бактерий *Aliivibrio logei* // Генетика. 47(12), 1596-1603.
- Хрульнова С. А., Манухов И. В., Завильгельский Г. Б. 2010. *Aliivibrio logei* KCh1 (изолят Камчатка): биохимические и люминесцентные характеристики, клонирование *lux*-оперона // Микробиология. 79, 349-358.
- Хрульнова С.А., Марышев И.В., Куликовский А.Д., Манухов И. В., Завильгельский Г. Б. 2012. Сравнительный анализ “Quorum Sensing” систем у психрофильных *Aliivibrio logei* и мезофильных *A. fischeri* светящихся морских бактерий // Биологические мембраны. 29(5), 362–366.
- Adar Y. Y., Stmaan M., Ulitzur S. 1992. Formation of the LuxR protein in the *Vibrio fischeri lux* system is controlled by HtpR through the GroESL proteins // J. Bacteriol. 174,7138-7143.
- Ahmer B.M., van Reeuwijk J., Timmers C.D., Valentine P.J., Heffron F. 1998. *Salmonella typhimurium* encodes an SdiA homolog, a putative quorum sensor of the LuxR family, that regulates genes on the virulence plasmid // J. Bacteriol. 180, 1185-1193.
- Alsina M, Blanch AR. 1994. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio species* // J Appl Bacteriol. 76(1), 79-85.
- Ast J.C., Urbanczyk H.U., Dunlap P.V. 2009. Multi-gene analysis reveals previously unrecognized phylogenetic diversity in *Aliivibrio* // Syst. Applied. Microbiol. 32, 379-386.
- Atkinson S., Throup J.P., Stewart G.S., Williams P. 1999. A hierarchical quorum-sensing system in *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of motility and clumping // Mol Microbiol. 33, 1267-77.

- Baldwin T.O., Christopher J.A., Raushel F.M., Sincjair J.F., Ziegler M.M., Fisher A.J., Rayment I. 1995. Structure of bacterial luciferase // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 798-809.
- Bang S.S., Baumann P., Nealson K.H. 1978. Phenotypic characterization of *Photobacterium logei* (*sp. nov.*), a species related to *P. fischeri* // *Curr. Microbiol.* 1, 285-288.
- Bauer W.D., Robinson J.B. 2002. Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms // *Curr Opin Biotechnol.* 13, 234-241.
- Beaz-Hidalgo R., Doce, A., Balboa, S., Barja, J.L. & Romalde, J.L. 2010. *Aliivibrio finisterrensis sp. nov.*, isolated from Manila clam, *Ruditapes philippinarum* and emended description of the genus *Aliivibrio* // *Int J Syst Evol Microbiol.* 60, 223-228.
- Bergner T., Tabib C.R., Winkler A., Stipsits S., Kayer H., Lee J., Malthouse J.P., Mayhew S., Müller F., Gruber K., Macheroux P. 2015. Structural and biochemical properties of LuxF from *Photobacterium leiognathi* // *Biochim Biophys Acta.* 26, 220-226.
- Bertani I., Rampioni G., Leoni L., Venturi L. 2007. The *Pseudomonas putida* Lon protease is involved in N-acyl homoserine lactone quorum sensing regulation // *BMC Microbiology.* 7, 71-79.
- Bissonnette S.A., Rivera-Rivera I., Sauer R.T., Baker T.A. 2010. The IbpA and IbpB small heat-shock proteins are substrates of the AAA+ Lon protease // *Mol. Microbiol.* 75, 1530-1549.
- Botos I., Melnikov E.E., Cherry S., Tropea J.E., Khalatova A.G., Rasulova F., Dauter Z., Maurizi M.R., Rotanova T.V., Wlodawer A., Gustchina A 2004. The catalytic domain of *Escherichia coli* Lon protease has a unique fold and a Ser-Lys dyad in the active site. // *J. Biol . Chem.* 279, 8140-8148.
- Bowman J.B., Margesin. R., Schinner F., Marx J.C., Gerday C. 2008. Genomic analysis of psychrophilic procaryotes. In: *Psychrophiles, from Biodiversity to Biotechnologt* // Berlin Heidelberg. 54, 65-284.

- Campbell J., Lin Q., Geske G.D., Blackwell H.E. 2009. New and unexpected insights into the modulation of LuxR-type quorum sensing by cyclic dipeptides // *ACS Chem Biol.* 4, 1051-1059.
- Casanueva A., Tuffin M., Cary C., Cowan D.A. 2010. Molecular adaptations to psychrophily: the impact of 'omic' technologies // *Trends Microbiol.* 18, 374-381
- Cavicchioli R., Charlton T., Ertan H., Omar S.M., Siddiqui K.S., Williams T.J. 2011. Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles // *Microb Biotechnol.* 4(4), 449-60.
- Chatterjee J., Meighen E.A. 1995. Biotechnical applications of bacterial bioluminescence (*lux*) genes // *Photochem. Photobiol.* 62, 641-650.
- Chhabra S. R., Stead P., Bainton N. J., Salmond G. P., Stewart G. S., Williams P., Bycroft B. W. 1993. Autoregulation of carbapenem biosynthesis in *Erwinia carotovora* by analogues of N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone // *J Antibiot.* 46, 441-454.
- Cohn D.H., Ogden R.C., Abelson J.N., Baldwin T.O., Neelson K.H., Simon M.I., Mileham A.J. 1983. Cloning of the *Vibrio harveyi* luciferase genes: use of a synthetic oligonucleotide probe // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 120-123.
- Cutter K.L., Alloush H.M., Salisbury V.C. 2007. Stimulation of DNA repair and increased light output in response to UV irradiation in *Escherichia coli* expressing *lux* genes // *Luminescence.* 22, 177-181.
- Czyz A., Wrobel B., Wegrzyn G. 2000. *Vibrio harveyi* bioluminescence plays a role in stimulation of DNA repair // *Microbiology.* 146, 283-288.
- D'Amico S., Collins T., Marx J.C., Feller G., Gerday C. 2006. Psychrophilic microorganisms: challenges for life // *EMBO Rep.* 7, 385-389.
- Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W., Greenberg E.P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm // *Science.* 280, 295-298.
- Deming J.W. 2002. Psychrophiles and Polar Regions // *Curr. Opin Microbiol.* 5, 301-309.

- Dolan, K.M., Greenberg E. P. 1992. Evidence that GroEL, not sigma 32, is involved in transcriptional regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence genes in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 174, 5132-5135.
- Dunlap P.V., Greenberg E.P. 1988. Control of *Vibrio fischeri lux* gene transcription by a cyclic AMP receptor protein-LuxR protein regulatory circuit // J. Bacteriol. 170, 4040-4046.
- Eberhard A. 1972. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. // J. Bacteriol. 109, 1101-1105.
- Eberhard A., Burlingame A.L., Eberhard C., Kenyon G.L., Nealson K.H., Oppenheimer N.J. 1981. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase // Biochemistry. 20, 2444-2449.
- Egland K.A., Greenberg E.P. 1999. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the *luxI* promoter // Mol. Microbiol. 31, 1197-1204.
- Egland K.A., Greenberg E.P. 2000. Conversion of the *Vibrio fischeri* transcriptional activator, LuxR, to a repressor. // J. Bacteriol. 182, 805-811.
- Engebrecht J., Nealson K., Silverman M. 1983. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri* // Cell. 32, 773-781.
- Feller G., Gerday C. 2003. Microbiol. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation // Nat.Rev. 1, 200-208.
- Fidopiastis P.M., von Boletzky S., Ruby E.G. 1998. A new niche for *Vibrio logei*, the predominant light organ symbiont of squids in the genus *Sepiola* // J. Bacteriol. 180, 59-64.
- Fuqua W.C., Winans S.C. 1994. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium Ti* plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite // J. Bacteriol. 176, 2796-2808.
- Fuqua C., Winans S.C., Greenberg E.P. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators // Annu. Rev. Microbiol. 50, 727-751.

- Fuqua W.C., Greenberg E.P. 1998. Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones // *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 183-189.
- Fuqua C., Parsek M.R., Greenberg E.P. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing // *Annu. Rev. Genet.* 35, 439-468.
- Garcia-Lara J., Shang L.H., Rothfield L.I. 1996. An extracellular factor regulates expression of *sdiA*, a transcriptional activator of cell division genes in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 178, 2742-2748.
- Givskov M., de Nys R., Manefield M., Gram L., Maximilien R., Eberl L., Molin S., Steinberg P.D., Kjelleberg S. 1996. Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling // *J Bacteriol.* 178, 6618-6622.
- Glessner A., Smith E.S., Iglewski B.H., Robinson J.P. 1999. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of twitching motility // *J. Bacteriol.* 181, 1623-1629.
- Grandclément C., Tannières M., Moréra S., Dessaux Y., Faure D. 2016. Quorum quenching: role in nature and applied developments // *FEMS Microbiol Rev.* 40(1), 86-116.
- Griffith K. L., Griffith, I.M. Shah, R.E., Wolf Jr. 2004. Proteolytic degradation of *Escherichia coli* transcription activators SoxS and MarA as the mechanism for reversing the induction of the superoxide (SoxRS) and multiple antibiotic resistance (Mar) regulons // *Mol. Microbiol.* 51(6), 1801-16.
- Hansen H., Purohit A.A., Leiros H.-K.S., Johansen J.A., Kellermann S.J., Bjelland A.M., Willassen N. P. 2015. The autoinducer synthases LuxI and AinS are responsible for temperature-dependent AHL production in the fish pathogen *Aliivibrio salmonicida* // *BMC Microbiology.* 15, 63-79.
- Harwood C.S., Bang S.S., Baumann P., and Nealson K.H. 1980. *Photobacterium logei* sp. nov., nom. rev., *Beneckea nereida* sp. nov., nom. rev. and *Beneckea gasogenes* sp. nov., nom. rev. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30, 655.

- Hastings J.W., Govindjee A.J., Fork D.C. 1986. Bioluminescence in bacteria and dinoflagellates // In: Light emission by plants and bacteria. Academic Press. Inc. New York.363-398.
- Hastings J.W., Nealson K.H. 1977. Bacterial bioluminescence // Annu. Rev. Microbio.31,549-595.
- Hentzer M., Wu H., Andersen J.B., Riedel K., Rasmussen T.B., Bagge N., Kumar N., Schembri M.A., Song Z., Kristoffersen P., Manefield M., Costerton J.W., Molin S., Eberl L., Steinberg P., Kjelleberg S., Hoiby N., Givskov M. 2003. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors // EMBO J. 22, 3803-3815.
- Holden M.T., Ram Chhabra S., de Nys R., Stead P., Bainton N.J., Hill P.J., Manefield M., Kumar N., Labatte M., England D., Rice S., Givskov M., Salmond G.P., Stewaeet G.S., Bycroft B.W., Kjelleberg S., Williams P. 1999. Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria // Mol. Microbiol. 33, 1254-1266.
- Holden M.T., Swift S., Williams P. 2000. New signal molecules on the quorum-sensing block // Trends Microbiol. 8, 101-103.
- Husain I., Sancar G.B., Holbrook S.R., Sancar A. 1987.Mechanism of damage recognition by *Escherichia coli* DNA photolyase // J. Biol Chem. 262,13188-13197.
- Jiang W., Hou Y., Inouye M. 1997. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone // J Biol Chem. 3, 272(1), 196-202.
- Jones B.W., Maruyama A., Ouverney C.C., Nishiguchi M.K. 2007. Spatial and temporal distribution of the *Vibrionaceae* in coastal waters of Hawaii, Australia, and France // Microb ecol. 54(2), 314-323.
- Jung Y.H., Yi J.Y., Jung H.J., Lee H.K., Naicker M.C., Uh J.H., Jo I.S., Jung E.J., Im H. 2010. Overexpression of cold shock protein A of *Psychromonas arctica* KOPRI 22215 confers cold-resistance // Protein J. 29(2), 136-42.
- Kaplan H.B., Greenberg E.P. 1985. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system // J. Bacteriol. 163, 1210-1214.

- Koch B., Liljefors T., Persson T., Nielsen J., Kjelleberg S., Givskov M. 2005. The LuxR receptor: the sites of interaction with quorum-sensing signals and inhibitors // *Microbiology*. 151, 3589-602.
- Kozakiewicz J., Gajewska M., Lyzen R., Czyz A., Wegrzyn G. 2005. Bioluminescence-mediated stimulation of photoreactivation in bacteria // *FEMS Microbiol Lett*. 250,105-110.
- Kuts V.V. and Ismailov A.D. 2009. Physiological and Emission Characteristics of the Luminescent Bacterium *Photobacterium phosphoreum* from the White Sea // *Microbiology*. 78, №5, 554-558.
- LaRossa R.A., Majarian W.R., Van Dyk T.K. Патент США № 5,683,868. Highly sensitive method for detecting environmental insults. Заявитель: E. I. Du Pont de Nemours and Company November 4, 1997
- Lavelle P., Henry J.P., Michelson A.M. 1970. Etude in million fluide et a basic temperature de la reactive d'emission de bioluminescence de *P. leiognathi* // *Compt. Rend. Acad. Sci., ser. D*.270,21-26.
- Le K.Y., Otto M. 2015. Quorum-sensing regulation in *staphylococci*—an overview // *Frontiers in Microbiology*. 6, 1174-80.
- Lee C.Y., Szittner R.B., Meighen E.A. 1991. The *lux* genes of the luminous bacterial symbiont, *Photobacterium leiognathi*, of the ponyfish. Nucleotide sequence, difference in gene organization, and high expression in mutant *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem*. 201, 161–167.
- Lemos M.L., Toranzo A.E., Barja J.L. 1985. Modified medium for the oxidation-fermentation test in the identification of marine bacteria // *Appl Environ Microbiol* .49(6), 1541-1543.
- Li Z., Nair S.K. 2012. Quorum sensing: how bacteria can coordinate activity and synchronize their response to external signals? // *Protein Science*. 21,1403-1417.
- Liu Y.-C., Chan K.-G. & Chang C.-Y. 2015. Modulation of host biology by *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecules: messengers or traitors. // *Frontiers in Microbiology*. 6, 1226.

- Lyżeń R., Wegrzyn G. 2005. Sensitivity of dark mutants of various strains of luminescent bacteria to reactive oxygen species // Arch Microbiol. 183(3),203-8.
- Mancini J.A., Boylan M., Soly R.R., Graham A.F., Meighen E.A. 1988. Cloning and expression of the *Photobacterium phosphoreum* luminescence system demonstrates a unique *lux* gene organization // J. Biol. Chem. 263, 14308–14314.
- Maniatis T., Fritsch F., Sambrook J. 1989. Molecular cloning: A laboratory Manual // Cold Spring Harbor. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Manukhov I.V., Eroshnikov G.E., Vyssokikh M.Yu., Zavilgelsky G.B. 1999. Folding and refolding of thermolabile and thermostable bacterial luciferases: the role of DnaKJ heat-shock proteins // Молекулярная биология. 448,265-268.
- Manukhov I.V., Melkina O.E., Goryanin I.I., Baranova A.V., Zavilgelsky G.B. 2010. The N-terminal domain of *Aliivibrio fischeri* LuxR is a target of the GroEL chaperonin // J Bacteriol. 192(20), 5549-51.
- Manukhov I.V., Khrul'nova S.A., Baranova A., Zavilgelsky G.B. 2011. Comparative analysis of the *lux* operons in *Aliivibrio logei* KCh1 // J. Bacteriol. 193. 3998-4001.
- Marketon M.M., Gronquist M.R., Eberhard A., Gonzales J.E. 2002. Characterization of the *Sinorhizobium meliloti sinR/sinI* locus and the production of novel N-acyl homoserine lactone // J. Bacteriol. 184, 5686-5695.
- McKnight S.L., Iglewski B.H., Pesci E.C. 2000. The *Pseudomonas quinolone* signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol. 182, 2702-2708.
- Meighen E.A. 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence // Microbiol. Rev. 55, 123-142.
- Minogue T.D., Wehland-von Trebra M., Bernhard F., von Bodman S.B. 2002. The autoregulatory role of EsaR, a quorum-sensing regulator in *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii*: evidence for a repressor function // Mol Microbiol. 44, 1625-1635.
- Natrah F.M., Alam M.I., Pawar S., Harzevili A.S., Nevejan N., Boon N., Sorgeloos P., Bossier P., Defoirdt T. 2012. The impact of quorum sensing on the virulence of

*Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida* towards burbot (*Lota lota* L.) larvae // Vet Microbiol. 159(1-2), 77-82.

- Nealson K.H., Platt T., Hastings J.W. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system // J. Bacteriol. 104, 313-322.

- Nealson K.H., Hastings J.W. 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. // Microbiol Rev.43,496-518.

- Nealson K.H., Hastings J.W. 2006. Quorum sensing on a global scale: massive numbers of bioluminescent bacteria make milky seas // Appl Environ Microbiol. 72(4), 2295-2297.

- Nicolaus B., Kambourova M., Oner E.T. 2010. Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology // Environ Technol. 31(10), 1145-1158.

- Nijvipakul S., Wongratana J., Suadee C., Entsch B., Ballou D.P., Chaiyen P. 2008. LuxG is a functioning flavin reductase for bacterial luminescence // J Bacteriol. 190(5), 1531-8.

- Parry B.R. and Shain D. 2011. Manipulations of AMP metabolic genes increase growth rate and cold tolerance in *Escherichia coli*: implications for psychrophilic evolution // Mol. Biol. Evol. 28, 2139-2145.

- Parsek M.R., Greenberg E.P. 2000. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram - negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97, 8789-8791.

- Passador L., Tucker K.D., Guertin K.R., Journet M.P., Kende A.S., Iglewski B.H. 1996. Functional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer PAI // J Bacteriol.178,5995–6000.

- Payne G., Sancar A. 1990. Absolute action spectrum of E- FADH<sub>2</sub> and E-FADH<sub>2</sub>-MTHF forms of E. coli DNA photolyase // Biochemistry.29,7715-7727.

- Pearson J.P., Gray K.M., Passador L., Tucker K.D., Eberhard A., Iglewski B.H., Greenberg E.P. 1994. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes // Proc. Natl. Ac. Sci USA. 91, 197-200.

- Pearson J.P., Passador L., Iglewski B.H., Greenberg E.P. 1995. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92, 1490-1494.
- Pesci E.C., Iglewski B.H. 1997. The chain of command in *Pseudomonas* quorum sensing // Trends Microbiol. 5, 132-135.
- Phadtare S., Inouye M. 2004. Genome-wide transcriptional analysis of the cold shock response in wild-type and cold-sensitive, quadruple-csp-deletion strains of *Escherichia coli* // J Bacteriol. 186(20), 7007-7014.
- Piette F., D'Amico S., Struvay C., Mazzucchelli G., Renaut J., Tutino M.L., Danchin A., Leprince P., Feller G. 2010. Proteomics of life at low temperatures: trigger factor is the primary chaperone in the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 // Mol Microbiol. 76(1), 120-132.
- Qin N., Callahan S.M., Dunlap P.V., Stevens A.M. 2007. Analysis of LuxR regulon gene expression during Quorum Sensing in *Vibrio fischeri* // J. Bacteriol. 189, 4127-2134
- Rees J-F., De Wergifosse B., Noiser O., Dubuisson M., Jansens B., Thompson E.M. 1998. The origins of marine bioluminescence: timing oxygen defence mechanisms into deep-sea communication tools // J. Exp. Biol. 201,1211-1221.
- Relina L.I., Gulevsky A.K. 2003. A possible role of molecular chaperones in cold adaptation // Cryo Letters. 24(4), 203-212.
- Robin S., Togashi D.M., Ryder A.G., Wall J.G. 2009. Trigger factor from the psychrophilic bacterium *Psychrobacter frigidicola* is a monomeric chaperone // J. Bacteriol. 191, 1162-1168.
- Ruby E.C., McFall-Ngai M.J. 1992. A squid that glows in the night: development of an animal-bacterial mutualism // J. Bacteriol. 174, 4865-4870.
- Ruby E.G., McFall-Ngai M.J. 1999. Oxygen-utilizing reactions and symbiotic colonization of the squid light organ by *Vibrio fischeri* // Trends Microbiol. 10,414-420.
- Ruwandeeepika H.A., Defoirdt T., Bhowmick P.P., Karunasagar I., Karunasagar I., Bossier P. 2010. *In vitro* and *in vivo* expression of virulence genes in *Vibrio* isolates

belonging to the *Harveyi* clade in relation to their virulence towards gnotobiotic brine shrimp (*Artemia franciscana*) // Environ Microbiol. 13, 506-517.

- Saitou N. & Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol Biol Evol .4, 406–425.

- Sancar A., Smith F.W., Sancar G.B. 1984. J. Biol. Chem. 259, 6028-6032.

- Sancar G.B., Sancar A. 1987. Structure and function of DNA photolyases // TIBS.12,259-265.

- Schaefer A.L., Hanzelka B.L., Eberhard A., Greenberg E.P.1996. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs // J Bacteriol.178,2897–2901.

- Schuster M., Lostroh C.P., Ogi T., Greenberg E.P. 2003. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis // J. Bacteriol. 185, 2066-2079.

- Siddiqui K.S., Cavicchioli R. 2006. Cold-adapted enzymes // Annu. Rev. Biochem. 75, 403-433.

- Smith R.S., Iglewski B.H. 2003. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence // Curr Opin Microbiol. 6, 56-60.

- Sperandio V., Mellies J.L., Nguyen W., Shin S., Kaper J.B. 1999. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96, 15196-15201.

- Stewart G.S. 1997. Challenging food microbiology from a molecular perspective // Microbiology. 143, 2099-2108.

- Suga H., Smith K. 2003. Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target // Current Opinion in Chemical Biology. 7, 586-591

- Szpilewska H., Czyz A., Wegrzyn G. 2003. Experimental evidence for the physiological role of bacterial luciferase in the protection of cells against oxidative stress // Current Microbiology.47,379-382.

- Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. // *Mol Biol Evol* 24, 1596–1599.
- Timmins G.S., Jackson S.K. Swartz H.M. 2001. The evolution of bioluminescent oxygen consumption as an ancient oxygen detoxification mechanism // *J. Mol. Evol.* 52, 321-332.
- Tosco A., Birolo L., Madonna S., Lolli G., Sannia G., Marino G. 2003. GroEL from the psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125: molecular characterization and gene cloning // *Extremophiles*. 7(1), 17-28.
- Tu S.-C., Mager H.L. 1995. Biochemistry of bacterial bioluminescence // *Photochem. Photobiol.* 62, 615-624.
- Uh J.H., Jung Y.H., Lee Y.K., Lee H.K., Im H. 2010. Rescue of a cold-sensitive mutant at low temperatures by cold shock proteins from *Polaribacter irgensii* KOPRI 22228 // *J. Microbiol.* 48(6), 798-802.
- Ulitzur S., Dunlop P. 1995. Regulatory circuitry controlling luminescence autoinduction in *Vibrio fischeri* // *Photochem. Photobiol.* 62, 625-632.
- Ulitzur S. 1998. H-NS controls the transcription of three promoters of *Vibrio fischeri lux* cloned in *Escherichia coli* // *J. Biolumin. Chemilumin.* 13, 185-188.
- Ulitzur S. 1999 // *Microbial Ecology and Infectious Disease* / Ed. Rosenberg E. Washington: American Society for Microbiology. 123-132.
- Urbanczyk H., Ast J.C., Higgins M.J., Carson J., Dunlap P.V. 2007. Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov., and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. // *Int J Syst Evol Microbiol.* 57, 2823-2829.
- Van Dyk T. and Rosson R.A. 1998. *Photorhabdus luminescens luxCDABE* promoter probe vectors // R.A. LaRossa (ed.), *Methods in Molecular Biology*, 102, 85-95.
- Wagner V.E., Bushnell D., Passador L., Brooks A.I., Iglewski B.H. 2003. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment // *J Bacteriol.* 185, 2080-2095.

- Walker E.L., Bose J.L., Stabb E.V. 2006. Photolyase confers resistance to UV light but does not contribute to the symbiotic benefit of bioluminescence in *Vibrio fischeri* ES114 // Appl. Environ. Microbiol.72,6600-6606.
- Wegrzyn G., Czyz A., Olzewska K. 2004. Biological functions and early evolution of bacterial luminescence // Current Trends in Microbiology.1,43-49.
- Whitehead N.A., Barnard A.M., Slater H., Simpson N.J., Salmond G.P. et al. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria // FEMS Microbiol. 25, 365-404.
- Whitehead N.A., Byers J.T., Commander P., Corbett M.J., Coulthurst S.J., Everson L., Harris A.K., Pemberton C.L., Simpson N.J., Slater H., Smith D.S., Welch M., Williamson N., Salmond G.P. 2002. The regulation of virulence in phytopathogenic *Erwinia species*: quorum sensing, antibiotics and ecological considerations // Antonie Van Leeuwenhoek. 81, 223-231.
- Whiteley M., Lee K.M., Greenberg E.P. 1999. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96, 13904-13909.
- Winson M.K., Swift S., Fish L., Throup J.P., Jorgensen F., Chhabra S., Bycroft B.W., Williams P., Stewart G.S. 1998. Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing // FEMS Microbiol. Lett. 163, 185-192.
- Woolford C.V, Tilly K., Dennis D.T., Georgopoulos C.P., Hendrix R.W., Ellis R.J. 1988. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly // Nature. 333, 330–334.
- Yoshimune K., Galkin A., Kulakova L., Yoshimura T., Esaki N. 2005. Cold-active DnaK of an Antarctic psychrotroph *Shewanella* sp. Ac10 supporting the growth of dnaK-null mutant of *Escherichia coli* at cold temperatures // Extremophiles. 9(2), 145-150.
- Zarubin M., Belkin S., Ionescu M., Genin A. 2012. Bacterial bioluminescence as a lure for marine zooplankton and fish // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 109,853-857.

•Zavilgelsky G. B., Kotova V. Yu., Manukhov I.V. 2007. Action of 1,1-dimethylhydrazine on bacterial cells is determined by hydrogen peroxide. // Mutation research-genetic toxicology and environmental mutagenesis. 634 (1-2), 172-176

•Zhu, J. and Winans S. C. 2001. The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization // Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 80-92.