

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

На правах рукописи

Баженов Сергей Владимирович

LuxI/LuxR "quorum sensing" система бактерий рода *Aliivibrio*

Специальность 03.01.02-Биофизика

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва, 2020

Работа прошла апробацию на кафедре биофизики федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

Научный руководитель: Манухов Илья Владимирович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией - главный научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики Центра изучения молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)".

Ведущая организация: Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра "Курчатовский институт"

Защита состоится «29» декабря 2020 года в 14.00 на заседании диссертационного совета ФБМФ 03.01.02.014, по адресу: 141701, г. Долгопрудный Московской обл., Институтский переулок, д. 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Московского физико-технического института (национальный исследовательский университет) <https://mipt.ru/education/post-graduate/soiskateli-biologicheskije-nauki.php>.

Работа представлена «16» октября 2020 г. в Аттестационную комиссию федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» для рассмотрения советом по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук в соответствии с п.3.1 ст. 4 Федерального закона «О науке и государственной научно - технической политике»

Общая характеристика работы

Актуальность темы

Биолюминесценция широко представлена в мировом океане бактериями семейства *Vibrionaceae* (Urbanczyk *et al.*, 2007, 2008). Некоторые виды способны к регуляции люминесценции по механизму Quorum Sensing (QS). Данный механизм позволяет координировать экспрессию отдельных генов и оперонов внутри популяции в зависимости от её плотности (Bassler, 1999). QS регуляция реализуется за счёт обмена низкомолекулярными сигнальными соединениями, называемыми аутоиндукторами. Впервые данная система была описана у бактерий вида *Aliivibrio fischeri*, у которых основным регулятором является белок LuxR, индуцирующий транскрипцию кассеты генов *luxICDABEG* в присутствии аутоиндуктора в концентрациях выше критической (Nealson *et al.*, 1970; Engebrecht *et al.*, 1983). Гены *luxCDABEG* отвечают за люминесценцию клеток, а ген *luxI* — за синтез аутоиндуктора. Таким образом, реализуется положительная обратная связь по аутоиндуктору.

С развитием арктических технологий и освоением северных морей возрастает интерес к адаптационным механизмам холодолюбивых микроорганизмов. К настоящему времени экологическая ниша люминесцентных бактерий в студёных северных морях изучена слабо. В настоящей работе исследуется распространённость бактерий, *Aliivibrio logei* обладающих QS регуляцией люминесценции, в акваториях Берингова и Охотского морей.

Архитектура *lux*-оперона у близкородственных психрофильных бактерий *A. logei* (симбионта кальмаров и представителя нормальной микрофлоры кишечника рыб) и *Aliivibrio salmonicida* (возбудителя холодового вибриоза сёмги) значительно отличается от таковой у бактерий мезофильного вида *A. fischeri*: ген *luxI* и кассета *luxCDABEG* транскрибируется с отдельных промоторов и регулируется двумя гомологами LuxR (Fidopiastis *et al.*, 1999; Manukhov *et al.*, 2011). Регуляторные QS системы отвечают не только за биолюминесценцию, но и экспрессию ряда вирулентных факторов (образование биоплёнок, колонизацию,

подвижность) и являются объектом пристального внимания исследователей в мире. До настоящей работы был неизвестен механизм взаимодействия QS систем LuxI/LuxR и AinS/AinR типа. Так же неизвестна была роль разделения регуляции *luxI* и *luxCDABE* генов психрофильных бактерий рода *Aliivibrio*.

Цельноклеточные биосенсоры с генами бактериальных *lux* оперонов широко применяются для исследования токсических свойств различных сред и отдельных химических компонентов. Разработка аналогичных технологий для экспресс-детектирования присутствия бактерий, обладающих QS регуляцией, (например, *A. salmonicida*) может быть актуальна для сельскохозяйственной промышленности. Разработанный в данной работе высокочувствительный цельноклеточный биосенсор позволяет детектировать N-(3-оксогексаноил)-лактон L-гомосерина в концентрациях от 0,1 нМ, являющегося сигнальным веществом у бактерий рода *Aliivibrio*.

Цель и задачи исследований

Основной целью диссертационного исследования является определение основных параметров работы LuxI/LuxR QS системы психрофильных люминесцирующих бактерий *A. logei*, обладающих двумя регуляторными генами: *luxR1* и *luxR2*, — и разделенными опероном *luxCDABEG* и геном *luxI*.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- провести сбор образцов люминесцентной микрофлоры кишечника морских рыб в акваториях Берингова и Охотского морей в зимний и летний сезоны для установления распространенности исследуемого вида бактерий и расширения числа объектов исследования;
- определить зависимость скорости синтеза АИ и уровня люминесценции клеток *A. logei* в различных фазах роста культуры и при различных концентрациях АИ;
- сконструировать цельноклеточные lux-биосенсоры на основе клеток *E. coli*, уровень люминесценции которых будет регулироваться промоторами генов *luxR1* или *luxR2* психрофильных бактерий *A. logei* или *luxR* мезофильных

A. fischeri и исследовать АИ-зависимую регуляцию транскрипции генов *luxR*, *luxR1* и *luxR2* в клетках *E. coli*;

- определить уровень экспрессии генов *luxR1*, *luxR2*, *luxI* и *luxB* в клетках *A. logei* с помощью ОТ-ПЦР при различных концентрациях АИ в среде;
- с использованием цельноклеточных биосенсоров на основе клеток *E. coli* исследовать влияние уровня экспрессии *luxR*-генов на чувствительность клеток к АИ;
- клонировать ген *litR* *A. logei* под контролем P_{lac} и определить влияние белка LitR на экспрессию генов *luxI/R* QS системы клеток *A. logei*;
- сконструировать ряд биосенсорных плазмид, содержащих различные варианты сайтов связывания регуляторных белков LuxR-семейства (*lux*-боксы), и определить роль последовательности *lux*-боксов в наблюдаемых различиях регуляции промоторов генов *luxI* и *luxCDABEG*;
- на основе полученных результатов создать модель регуляции QS системы *A. logei*.

Научная новизна работы

В рамках настоящей диссертационной работы была проведена проверка ряда ранее высказанных гипотез, представленных в диссертации Коноплевой М.Н. 2016 г., а также рассмотрены ранее неизученные аспекты регуляции люминесценции бактерий рода *Aliivibrio*, в частности *A. logei*, обладающих двумя регуляторными генами *luxR1* и *luxR2*.

Прежде всего, была подтверждена гипотеза о сезонной зависимости заселенности кишечника морских рыб бактериями данного вида в акваториях Берингова и Охотского морей. Также было подтверждено предположение о влиянии последовательностей сайтов связывания LuxR-белков на чувствительность промоторов генов *luxCDABEG* и *luxI* к АИ.

Впервые была исследована работа QS системы первого типа *A. logei* с помощью ОТ-ПЦР и были определены уровни экспрессии *luxR*-генов. В

гетерологичной системе клеток *E. coli* была продемонстрирована связь уровня экспрессии *luxR*-генов с чувствительностью всей QS системы к АИ.

Впервые было исследовано влияние гена *litR* на работу *luxI/R* QS системы *A. logei*, и, соответственно, определена связь между QS системами *luxI/R*, *luxS/PQ* и *ainS/R* в клетках *A. logei*. Ранее роль этого гена была описана только для QS системы первого типа *A. fischeri*, обладающей всего одним регуляторным геном *luxR* и транскрипционно слитыми генами *luxICDABEG*. До сегодняшнего дня аналогичных исследований с более сложно устроенной QS системой психрофильных бактерий не проводилось.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Теоретическая ценность работы заключается в углублении понимания процессов работы QS систем у психрофильных морских бактерий. QS системы, обладающие двумя гомологичными регуляторами *luxR1* и *luxR2* и отдельно друг от друга транскрибируемыми генами *luxCDABEG* и *luxI*, имеют двухэтапный характер регуляции с последовательной индукцией синтеза АИ и люминесценции. Кроме того, другие QS системы могут регулировать экспрессию *luxCDABEG* и *luxI* напрямую с помощью белка LitR.

Исследование экологической ниши занимаемой психрофильными бактериями с двухэтапной LuxI/LuxR QS системой показали, что наблюдается сезонная сменяемость *A. logei* с родственными бактериями семейства *Vibrionaceae* *Photobacterium phosphoreum* так, что бактерии с двухэтапной системой приобретают преимущество при заселении кишечника рыб в зимний период.

Полученные результаты повышения чувствительности клеток к АИ в условиях увеличенной экспрессии регуляторного гена дают основу для разработки более чувствительных к АИ цельноклеточных бактериальных биосенсоров, которые определяют практическую значимость работы. Метод детекции 3OC6-HSL с использованием разработанного биосенсора превосходит по чувствительности метод тандемной ВЭЖХ/масс-спектрометрии почти в 100 раз.

Положения, выносимые на защиту

- 1) В акваториях Берингова и Охотского морей в составе микрофлоры кишечников рыб широко распространены светящиеся виды бактерий. При этом наблюдается сезонная зависимость видового состава люминесцентной микрофлоры: в летний период преобладают бактерии вида *P. phosphoreum*, в зимний — *A. logei*.
- 2) В клетках *A. logei* LuxI/LuxR QS система имеет двухэтапный характер регуляции. На ранних этапах при концентрациях АИ от 1 нМ до 1 мкМ наблюдается активация экспрессии гена *luxI* и синтеза АИ, при концентрациях АИ выше 1 мкМ активируется экспрессия генов *luxCDABEG* и начинает нарастать люминесценция. Параметры данных промоторов значительно зависят от последовательностей *lux*-боксов в них.
- 3) Промотор регуляторного гена *luxR1* *A. logei* в присутствии в клетке обоих регуляторных генов *luxR1* и *luxR2* подвержен репрессии при высоких концентрациях АИ в среде.
- 4) Белок LitR положительно регулирует экспрессию генов *luxI* и *luxCDABEG* бактерий *A. fischeri*, *A. logei* и *A. salmonicida*.
- 5) Уровень экспрессии генов *luxR1* и *luxR2* *A. logei* и *luxR* *A. fischeri* значительно влияет на чувствительность LuxI/LuxR QS системы к АИ.

Степень достоверности и апробация результатов

По теме диссертации опубликованы в соавторстве четыре статьи в журналах, рецензируемых ВАК, Scopus и Web of Science, а также результаты исследований были представлены на шести конференциях.

Структура работы

Работа состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Resultados и обсуждения, Заключение, Выводов и Списка цитируемой литературы.

Содержание работы

Сезонная сменяемость люминесцентной микрофлоры

В 2015 году в работе (Коноплёва *et al.*, 2015) впервые было показано видовое замещение люминесцентной микрофлоры в кишечниках рыб в акваториях Берингова и Охотского морей на основе анализа образцов, собранных в марте 2010 года и в августе 2014 года. В зимних образцах светящиеся бактерии принадлежали, преимущественно, виду *A. logei*, в то время как в летних — *P. phosphoreum*. При этом бактерии *A. logei*, как известно, регулируют собственное свечение с помощью QS системы, в то время как бактерии *P. phosphoreum* имеют конститутивную светимость. Предположительно, данная регуляция может позволить бактериям *A. logei* получать конкурентное преимущество в зимний период, когда концентрация питательных веществ падает на порядки и экономия ресурсов становится более актуальной, за счет снижения расходов энергии на люминесценцию в условиях низкой плотности популяции. Данные различия могли быть обусловлены как результатом сукцессии, происходившей на протяжении многих лет, так и ежесезонной сменяемости видов. Имевшихся данных было недостаточно, чтобы говорить о периодическом характере изменений в составе люминесцентной микрофлоры кишечников морских рыб.

В 2016 и 2018 годах были проведены 4 экспедиции (по 2 зимой и летом) к берегам Берингова и Охотского морей для сбора образцов микрофлоры кишечников морских рыб и последующей видовой идентификации люминесцентных штаммов. При проведении филогенетического анализа по последовательностям 16S рРНК (рисунок 1) и fingerprint анализа с помощью MALDI-TOFF масс-спектрометрии было показано, что во всех экспедициях и для большинства видов рыб, являвшихся источниками образцов, сохраняется тенденция регулярного сезонного видозамещения люминесцентной микрофлоры (рисунок 2).

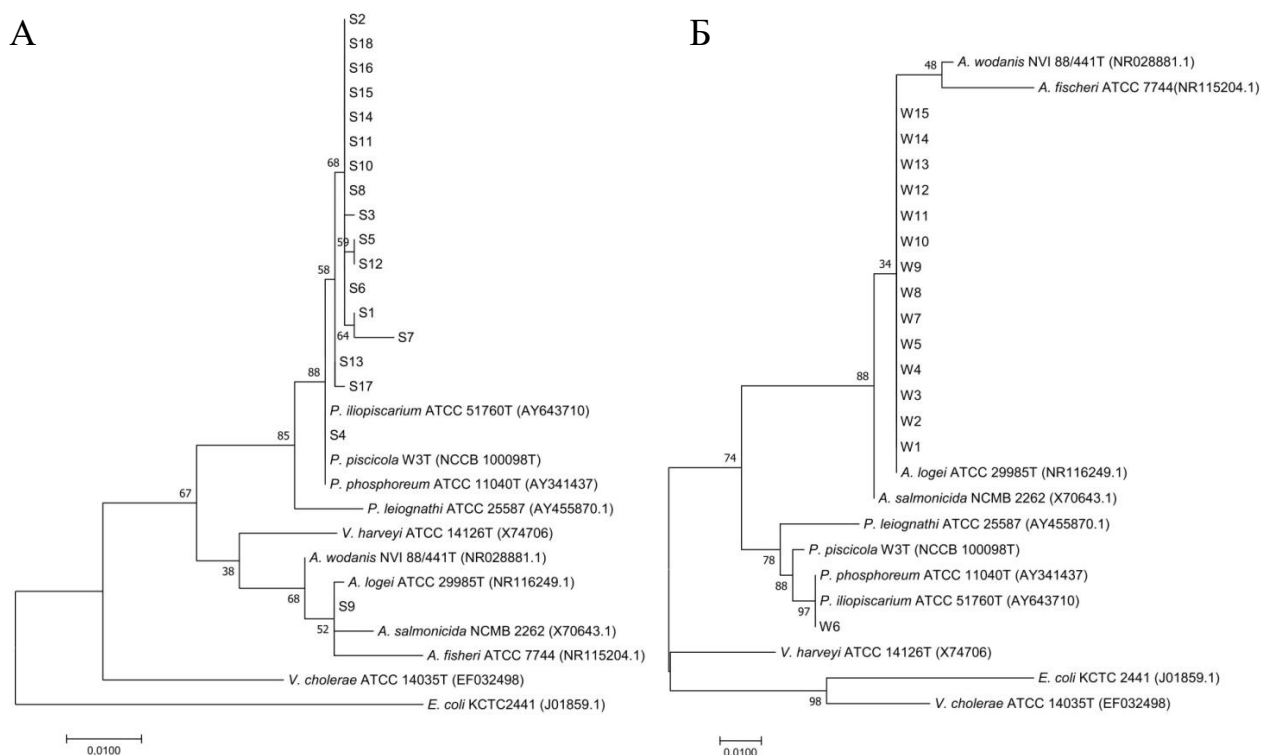


Рисунок 1 Филогенетические деревья наибольшего правдоподобия, построенные на основе сравнения последовательностей 16S рРНК референсных штаммов и люминесцирующих штаммов, изолированных в рамках экспедиций 2016 года. (А) люминесцентные штаммы, изолированные в рамках летней экспедиции 2016 (S1–S18). (Б) люминесцентные штаммы, изолированные в рамках зимней экспедиции 2016 (W1–W15). Числа в узлах обозначают достоверность топологии, вычисленную на основе 500 повторов

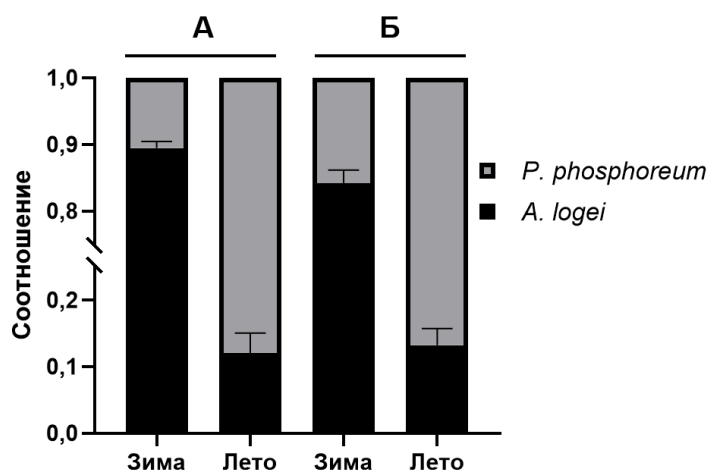


Рисунок 2 Соотношения встречаемостей видов люминесцентных бактерий в микрофлоре желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) рыб в акваториях Берингова и Охотского морей в образцах, собранных в ходе экспедиций 2010, 2014, 2016 и 2018 гг. Расчет проводился на основе числа рыб, в микробиологических посевах микрофлоры кишечника которых были выявлены штаммы данных бактерий. (А), соотношения, вычисленные на основе всех собранных образцов; (Б), соотношения, вычисленные на основе образцов из ЖКТ рыб *Eleginus gracilis*, *Cottida* spp. и *Pleuronectes* spp., которые встречаются в уловах в оба сезона во всех экспедициях

Хорошо видно, что оба вида в целом встречаются и в летних, и в зимних образцах, однако соотношение зараженных ими рыб меняется с почти 9/1 в один сезон на обратное 1/9 в другой. При этом оба вида люминесцирующих бактерий являются психрофильными и не имеют сколь-нибудь значимых различий в температурных профилях скорости деления. Среди проанализированных рыб были виды, которые встречались только в один сезон. Так корюшка попадалась в выловах только зимой, а горбуша только летом, а в их люминесцентной микробиоте были обнаружены исключительно *A. logei* у корюшки и *P. phosphoreum* у горбуши. Это может свидетельствовать о видоспецифичном заселении кишечника этих рыб люминесцирующими бактериями и заражении остальных рыб вследствие миграции корюшки и лосося, соответственно, однако данная гипотеза требует дополнительной проверки.

Двухэтапное срабатывание LuxI/LuxR QS системы A. logei

Генная организация LuxI/LuxR QS системы *A. logei* отличается от ранее подробно изученной QS системы *A. fischeri* наличием двух гомологичных регуляторов *luxR1* и *luxR2* и отделением гена *luxI* от остальной кассеты генов *luxCDABEG*. Такая структура *lux*-оперона весьма консервативна и сохраняется единообразной во всех обнаруженных штаммах по всему миру. Наблюдаемая разница в генной организации QS систем *A. logei* и *A. fischeri* обеспечивает возможность регулировать гены *luxI* и *luxCDABEG* по-разному и, возможно, достигать еще большей экономии ресурсов, необходимых для люминесценции, на ранних этапах роста культуры до срабатывания QS системы.

Для изучения работы LuxI/LuxR QS системы в клетках бактерий *A. logei*, в частности регуляции генов *luxCDABEG* и *luxI*, проводилось культивирование клеточной культуры с регулярным измерением оптической плотности, люминесценции и концентрации АИ в среде (рисунок 4).

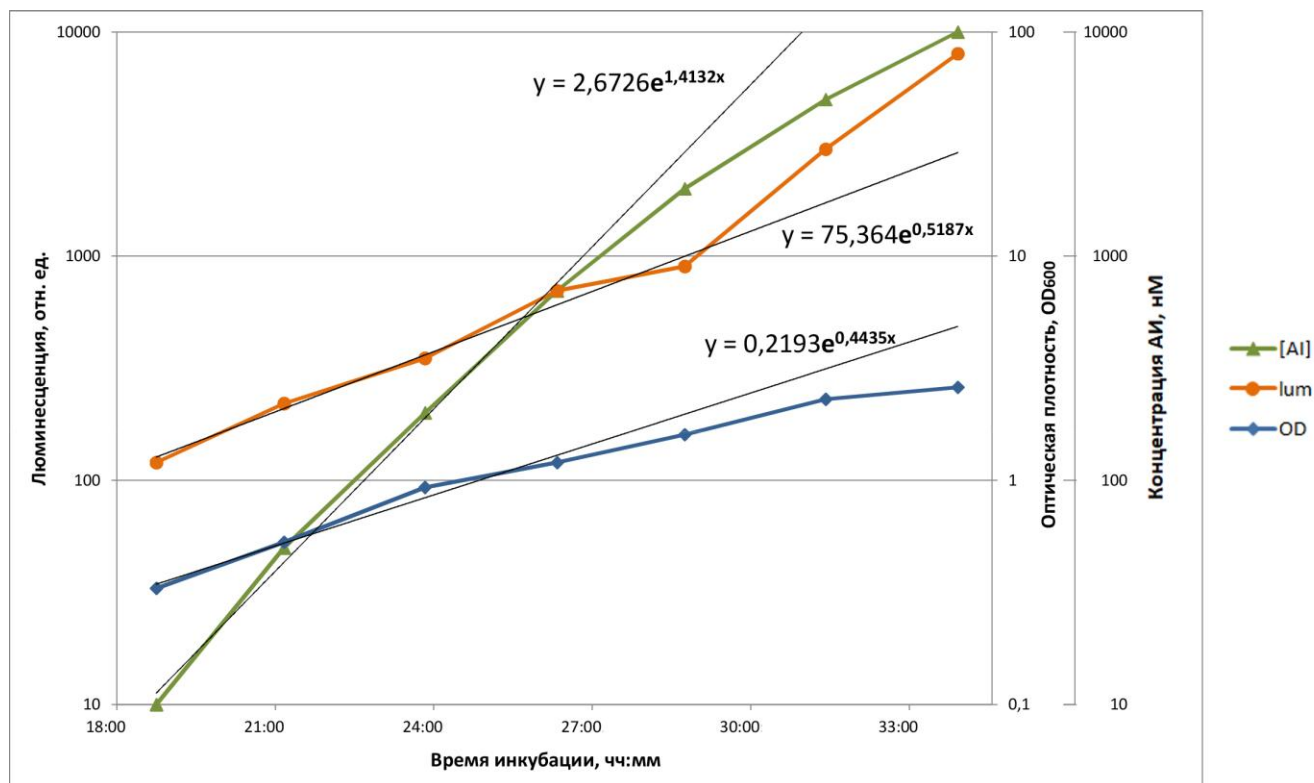


Рисунок 3 График зависимости оптической плотности, концентрации АИ и люминесценции культуры клеток *A. logei* от времени культивирования. Оптическая плотность (OD) отложена в единицах OD_{600} , концентрация АИ ($[AI]$) на графике представлена в нМ, люминесценция (lum) – в отн.ед. На графике добавлены линии тренда, приближающие первые 4 точки каждой измеряемой величины экспоненциальными функциями

Если предположить, что отдельные клетки имеют постоянную светимость и скорость синтеза АИ, то при экспоненциальном росте плотности культуры клеток следует ожидать такого же экспоненциального роста (с тем же показателем экспоненты) общей светимости культуры и концентрации АИ в среде. Однако график на рисунке 4 свидетельствует об обратной ситуации. Пока клетки растут экспоненциально, а концентрация АИ находится в пределах от 10 нМ до 1 мкМ люминесценция растет пропорционально плотности культуры клеток, а АИ накапливается значительно быстрее (показатель экспоненты примерно вдвое больше, чем для роста культуры). Это является прямым следствием QS регуляции: при концентрациях АИ свыше 10 нМ начинает активироваться промотор P_{luxI} и увеличивается скорость синтеза АИ. До достижения концентрации АИ порядка 1 мкМ люминесценция культуры клеток практически полностью определяется плотностью самой культуры и базовой светимостью клеток, однако при достижении этой концентрации АИ промотор $P_{luxCDABEG}$

индуцируется и светимость начинает возрастать гораздо быстрее, несмотря на то, что экспоненциальная фаза роста культуры уже завершается и темпы прироста числа клеток снижаются. Рост скорости синтеза АИ при средних, а люминесценции лишь при высоких концентрациях АИ в среде так же подтверждается прямыми измерениями прироста АИ в среде и люминесценции молодой культуры *A. logei* при добавлении экзогенного 3OC6-HSL в различных концентрациях (рисунок 5).

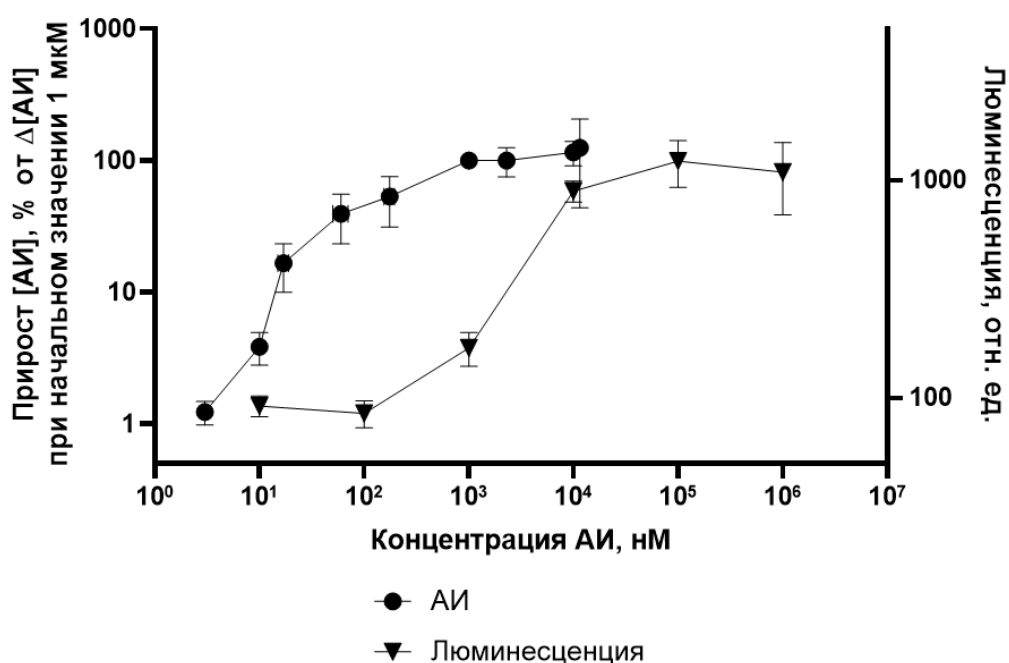


Рисунок 4 Зависимость количества синтезированного за 2 часа АИ и люминесценции культуры клеток *A. logei* от концентрации экзогенного 3OC6-HSL

Промоторы P_{luxI} и $P_{luxCDABEG}$ содержат отличные друг от друга сайты посадки LuxR-белков – *lux*-боксы. Для исследования влияния *lux*-боксов на чувствительность к АИ и амплитуду активации данных промоторов в гетерологичной системе клеток *E. coli* гены *luxCDABE* *P. luminescens* помещали под контроль $P_{luxCDABEG}$ *A. logei*, содержащего различные варианты *lux*-боксов, в присутствии в клетке гена *luxR1* или *luxR2* *A. logei*. Измерения амплитуды индукции люминесценции в ответ на внесение в среду 3OC6-HSL в различных концентрациях были проведены для 4 вариантов *lux*-боксов: два нативных

варианта из промоторов $P_{luxCDABEG}$ и P_{luxI} (рисунок 5) и два консенсусных варианта на основе (Antunes *et al.*, 2008) (рисунок 6).

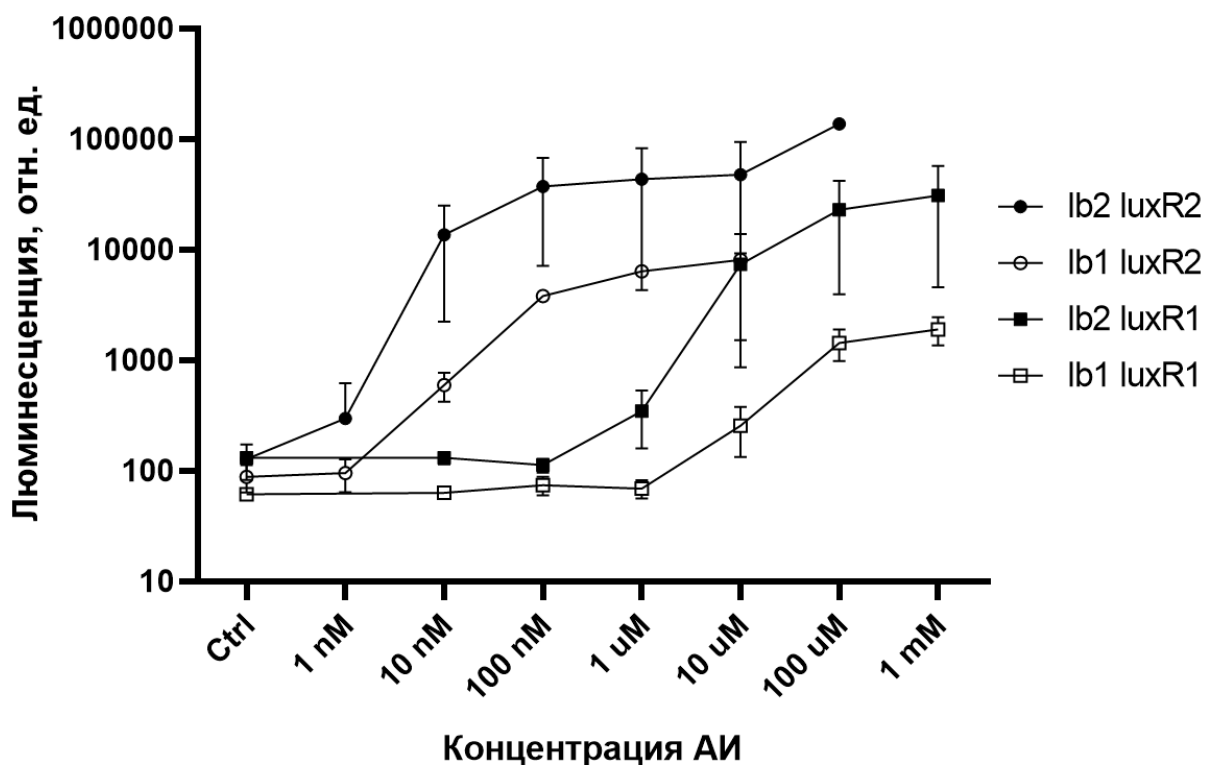


Рисунок 5 Зависимость люминесценции клеток *E. coli* MG1655, несущих гены *luxCDABEG* *P. luminescens* под контролем $P_{luxCDABEG}$ *A. logei* с нативным *lux*-боксом (lb1) и *lux*-боксом из P_{luxI} *A. logei* (lb2) в комбинациях с генами *luxR1* и *luxR2*, от концентрации AI в среде

Индукция промотора, содержащего нативный *lux*-бокс промотора $P_{luxCDABEG}$, происходит при бóльших концентрациях AI и имеет меньшую амплитуду по сравнению таковыми для промотора, содержащего нативный *lux* бокс промотора P_{luxI} . Это наблюдается с обоими генами *luxR1* и *luxR2*, а значит, природная последовательность *lux*-бокса из $P_{luxCDABEG}$ *A. logei* обладает значительно меньшим сродством к обоим гомологам, LuxR1 и LuxR2.

В этом же эксперименте впервые однозначно было показано, что сам ген *luxR2* обеспечивает значительно бóльшую чувствительность клетки к AI, чем ген *luxR1*. Этот эффект наблюдается для обеих последовательностей *lux*-бокса в промоторной области.

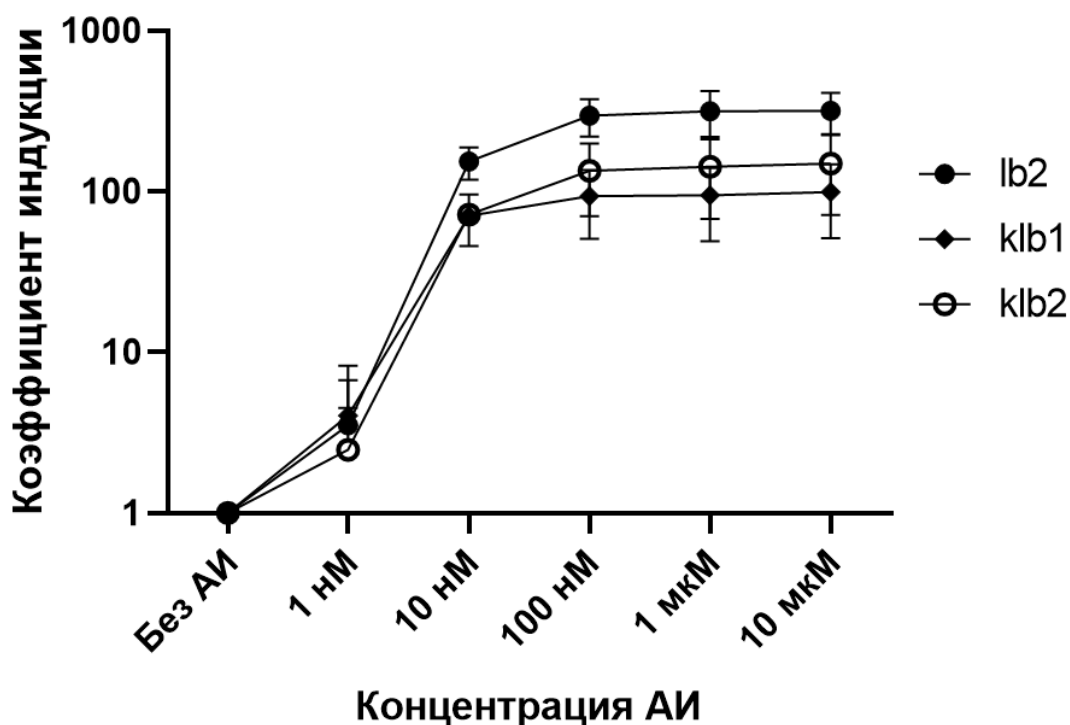


Рисунок 6 Зависимость индукции люминесценции клеток *E. coli* MG1655, несущих гены *luxCDABEG* *P. luminescens* под контролем $P_{luxCDABEG}$ *A. logei* с *lux*-боксом из P_{luxI} *A. logei* (**lb2**) или вариациями консенсусной последовательности *lux*-бокса (**klb1** и **klb2**) в комбинации с геном *luxR2*, от концентрации AI в среде

Измерения с использованием консенсусных *lux*-бокс последовательностей показали, что улучшить природный *lux*-бокс из P_{luxI} *A. logei* таким образом не получилось, кривые активации рассматриваемых вариантов промотора (рисунок 6) лежат ниже кривой lb2.

Влияние белка LitR на экспрессию генов lux-оперона

Помимо LuxI/LuxR у бактерий рода *Aliivibrio* присутствуют другие QS системы. LitR является активатором транскрипции, конечным регулятором AinS/R и LuxS/PQ QS систем бактерий рода *Aliivibrio* (Miyashiro and Ruby, 2012). Известно, что этот белок способен к активации экспрессии гена *luxR* *A. fischeri* (Fidopiastis *et al.*, 2002). Для исследования влияния этих QS систем на регуляторные гены LuxI/LuxR системы были использованы плазмида p15Tc-litR, несущая ген *litR* под контролем промотора лактозного оперона, и плазмиды с генами *luxCDABE* *P. luminescens* под контролем промоторов P_{luxR} *A. fischeri*, P_{luxR1} или P_{luxR2} *A. logei*. В данной работе было показано, что LitR способен к

значительной активации транскрипции гена *luxR A. fischeri*, в меньшей степени гена *luxR1 A. logei*, а на транскрипцию гена *luxR2 A. logei* практически не оказывает влияния (рисунок 7). Коэффициенты усиления люминесценции рассчитывались как отношение люминесценции культуры клеток с добавленным ИПТГ к люминесценции культуры клеток без добавления ИПТГ.

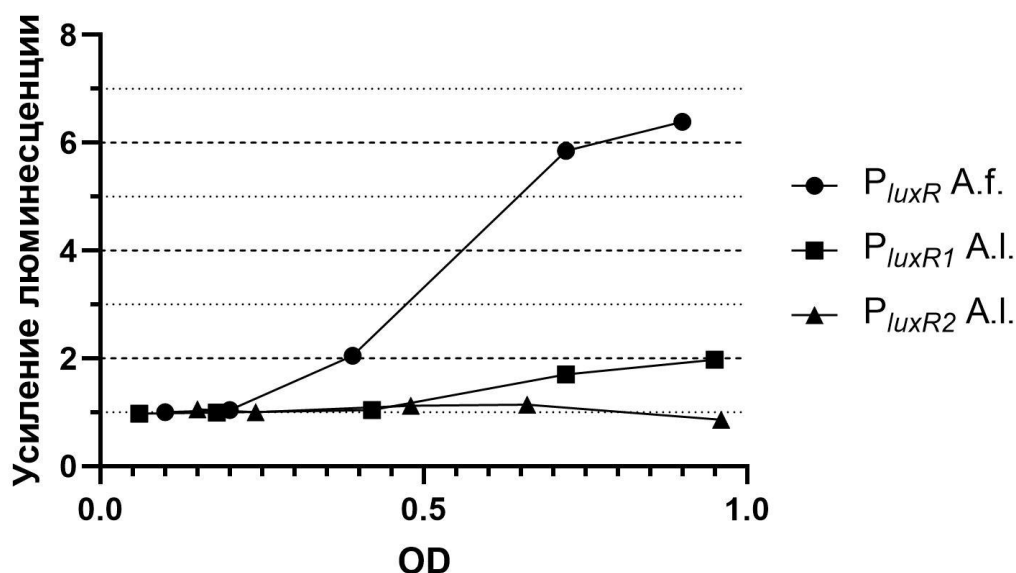


Рисунок 7 Зависимость от OD амплитуды индукции люминесценции клеток *E. coli* MG1655, несущих ген *litR A. logei* под контролем P_{lac} в комбинации с генами *luxCDABE P. luminescens* под контролем $P_{luxR} A. fischeri$, P_{luxR1} или $P_{luxR2} A. logei$, в ответ на добавление 1 мМ ИПТГ при OD = 0,1

Аналогичные эксперименты были проведены для промотора $P_{luxICDABEG} A. fischeri$ (рисунок 8) и промоторов P_{luxI} и $P_{luxCDABEG}$ бактерий *A. logei* и *A. salmonicida* (рисунок 9). Были использованы плазмиды с генами *luxCDABE P. luminescens* под контролем исследуемых промоторов в сочетании с плазмидой p15Tc-litR.

LitR оказался способен активировать транскрипцию «правого» промотора *lux*-оперона бактерий *A. fischeri*. Причем амплитуда этой активации (более 1 порядка по измерениям люминесценции) оказалась даже выше, чем для промотора гена *luxR*, про активацию которого было известно ранее.

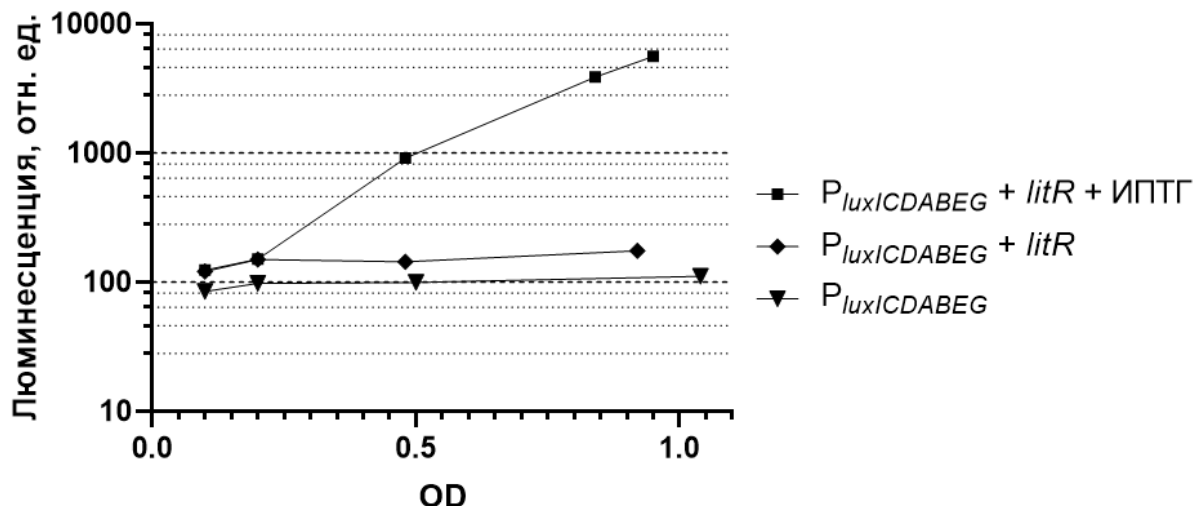


Рисунок 8 Зависимость люминесценции культур клеток *E. coli* MG1655 (p15Tc-litR, pVFR1) и *E. coli* MG1655 (pVFR1) от OD в процессе инкубации после добавления 1 мМ ИПТГ. $P_{luxCDABEG}$ – культура без p15Tc-litR; $P_{luxCDABEG+litR}$ – культура с p15Tc-litR без ИПТГ; $P_{luxCDABEG+litR} + \text{ИПТГ}$ – культура того же штамма с добавлением 1 мМ ИПТГ при OD = 0,1

На рисунке 9 приведены коэффициенты усиления люминесценции клеток *E. coli* MG1655, несущих комбинации плазмиды p15Tc-litR с плазмидами, содержащими гены *luxCDABE* *P. luminescens* под контролем промоторов P_{luxI} и $P_{luxCDABEG}$ *A. logei* и *A. salmonicida*, в ответ на добавление 1 мМ ИПТГ при OD ~0,1.

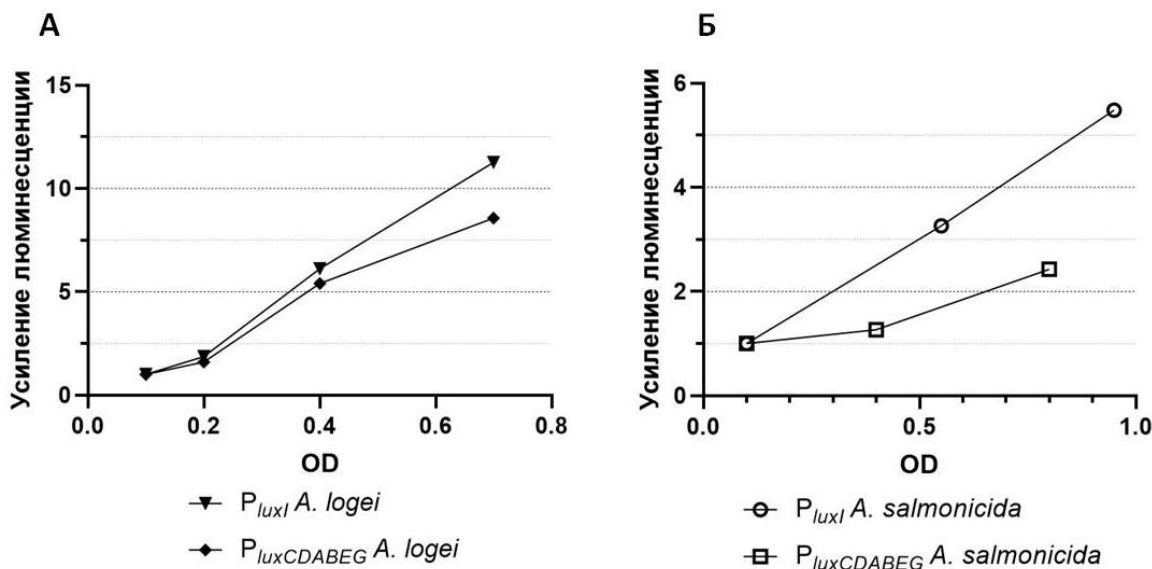


Рисунок 9 Зависимости коэффициентов индукции (по люминесценции) P_{luxI} и $P_{luxCDABEG}$ *A. logei* (А) и *A. salmonicida* (Б) от OD в процессе инкубации после добавления 1 мМ ИПТГ. Использованы следующие комбинации плазмид в клетках *E. coli* MG1655: P_{luxI} *A. logei* - (p15Tc-litR, pSV16), $P_{luxCDABEG}$ *A. logei* - (p15Tc-litR, pIVA), P_{luxI} *A. salmonicida* - (p15Tc-litR, pAS2), $P_{luxCDABEG}$ *A. salmonicida* - (p15Tc-litR, pAS1)

Аналогично, LitR активировал транскрипцию с промоторов генов *luxI* и *luxCDABEG* обоих видов психрофильных люминесцирующих бактерий *A. logei* и *A. salmonicida*.

Регуляция экспрессии генов luxR1 и luxR2 A. logei в зависимости от концентрации АИ

LuxR2 обладает значительно большей чувствительностью к АИ и способен индуцировать транскрипцию с большей амплитудой, чем LuxR1. Однако LuxR2 требует для нормального фолдинга и полноценной работы присутствия в клетке GroEL/ES шаперонов. В клетках *E. coli* OFB1111 pSV16, дефицитных по *gro* и несущих гены *luxCDABE* *P. luminescens* под контролем P_{luxI} и *luxR2* *A. logei*, амплитуда усиления люминесценции в ответ на добавление АИ в среду снижена по сравнению с клетками *E. coli* SKB178 pSV16 (*gro*⁺). Если те же клетки *E. coli* OFB1111 pSV16 и *E. coli* SKB178 pSV16 дополнительно трансформировать плазмидой pIV3, несущей ген *luxR1* *A. logei*, то при высоких концентрациях АИ мутации по *gro* перестают влиять на уровень люминесценции. Комбинация генов *luxR1* и *luxR2* *A. logei* в клетках дает ответ на появление больших концентраций АИ в среде, независящий от работы GroEL/ES шаперонина. Таким образом, в стрессовых условиях в случае повышения АИ до значений порядка 1 мкМ регулятор LuxR1 стимулирует QS систему, благодаря своей стабильности и запускает синтез АИ до максимального уровня. По достижении 10 мкМ АИ проявляется биолюминесценция, а необходимость в LuxR1 пропадает.

Для изучения предполагаемой АИ-зависимой регуляции экспрессии гена *luxR1* *A. logei* была использована плазида pALR1, в которой гены *luxCDABE* *P. luminescens* транскрипционно слиты с геном *luxR1* *A. logei* и находятся под контролем его промотора. Клетки *E. coli* MG1655 pALR1 были дополнительно трансформированы плазмидами pIV2 и pIV3 на основе вектора pACYC184, несущими ген *luxR2* *A. logei* и дополнительную копию гена *luxR1* *A. logei*, соответственно. Культуры клеток выращивали в жидкой среде LB до OD ~ 0,1, затем разделяли на равные порции и добавляли АИ в различных концентрациях.

Через 4 часа после добавления АИ наблюдалась заметная разница в люминесценции клеток, позволяющая судить о АИ-зависимой репрессии P_{luxR1} (Таблица 1).

Таблица 1. Светимость клеток *E. coli* MG1655, трансформированных различными комбинациями плазмид pALR1, pIV2 и pIV3, измеренная через 4 часа после добавления АИ в различных концентрациях.

Плазмиды в клетках <i>E. coli</i> MG1655	Без АИ	10 нМ АИ	1 мкМ АИ	100 мкМ АИ
pALR1	7200±2000	5190±1500	4800±1500	5200±1500
pALR1, pIV2	1510±300	1480±300	900±200	350±100
pALR1, pIV3	8300±2000	-	10100±2000	-

Влияние уровня экспрессии регуляторных генов luxR, luxR1 и luxR2 на чувствительность клеток к АИ

Поскольку концентрация регуляторных белков LuxR, LuxR1 и LuxR2 зависит от многих внутриклеточных факторов, естественным вопросом является влияние их концентрации на работу соответствующих QS систем. Согласно математической модели регуляции LuxI/LuxR системы *A. fischeri* (Colton *et al.*, 2015) повышение количества регуляторного белка в клетке должно приводить к активации промотора при меньших концентрациях индуктора. Для исследования влияния уровня экспрессии регуляторного гена *luxR1* *A. logei* на чувствительность QS системы к АИ были использованы клетки *E. coli* MG1655 (pR2, p15Tc-luxR1). Плазмида p15Tc-luxR1 содержит ген *luxR1* *A. logei* под контролем P_{lac} , плазмида pR2 — гены *luxCDABE* *P. luminescens* под контролем промотора гена *luxI* *A. logei*. В присутствии АИ в среде LuxR1 активирует транскрипцию с промотора P_{luxI} и люминесценция клеток возрастает в дозозависимой манере. Сравнение люминесценции клеток *E. coli* MG1655 (pR2, p15Tc-luxR1) в присутствии различных концентраций АИ в зависимости от индукции экспрессии *luxR1* с помощью ИПТГ показало, что повышенная экспрессия данного регуляторного гена ведет к увеличению чувствительности к АИ. Статистически значимое изменение люминесценции наступает при добавлении АИ в концентрациях от 100 нМ в присутствии ИПТГ, и только от 1 мкМ без ИПТГ (рисунок 10). Также на

рисунке 10 приведена зависимость от концентрации АИ люминесценции клеток *E. coli* MG1655 (pR2, pIV3), в которых ген *luxR1* находится под контролем собственного промотора.

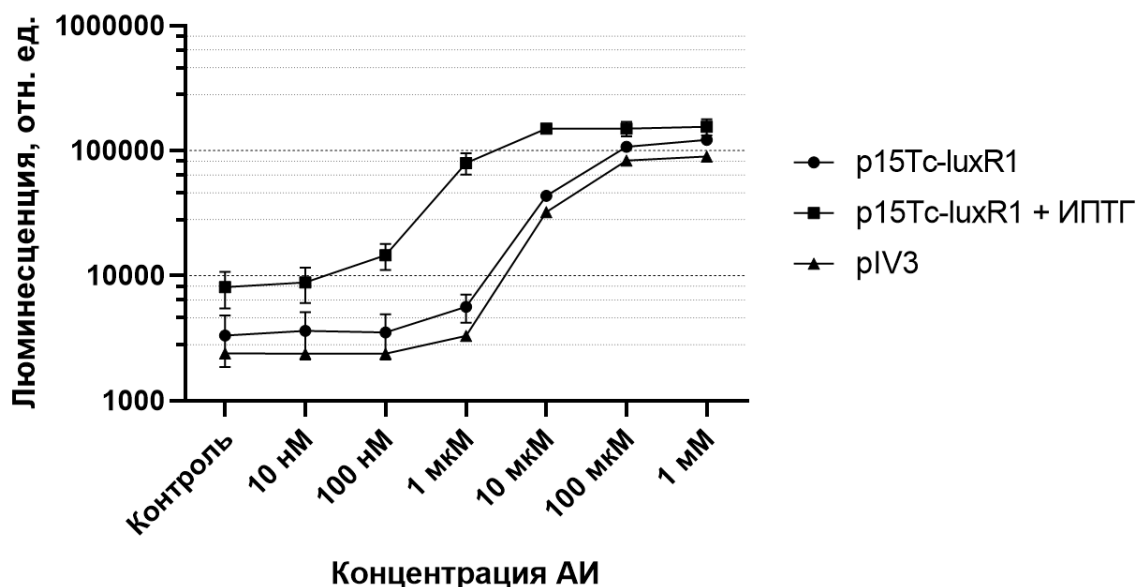


Рисунок 10 Зависимость от концентрации АИ в среде люминесценции клеток *E. coli* MG1655 pR2 p15Tc-luxR1 в присутствии 1 мМ ИПТГ и без него и клеток *E. coli* MG1655 pR2 pIV3

Для исследования влияния концентрации регуляторных белков LuxR2 *A. logei* и LuxR *A. fischeri* на чувствительность клеток к АИ применялись пары биосенсорных штаммов *E. coli* MG1655 pVFR1 и MG1655 (pVFR1, pSVRAF), MG1655 pSV16 и MG1655 (pSV16, pIV2), имеющих различные дозы генов *luxR* и *luxR2*, соответственно. При этом доза регулируемых промоторов и генов *luxCDABE* *P. luminescens* под их контролем оставалась одинакова для всех 4 штаммов. На графиках (рисунки 11 и 12) представлены кривые индукции, полученные путем деления люминесценции исследуемого образца с добавлением АИ на люминесценцию контрольного образца того же штамма без добавления АИ.

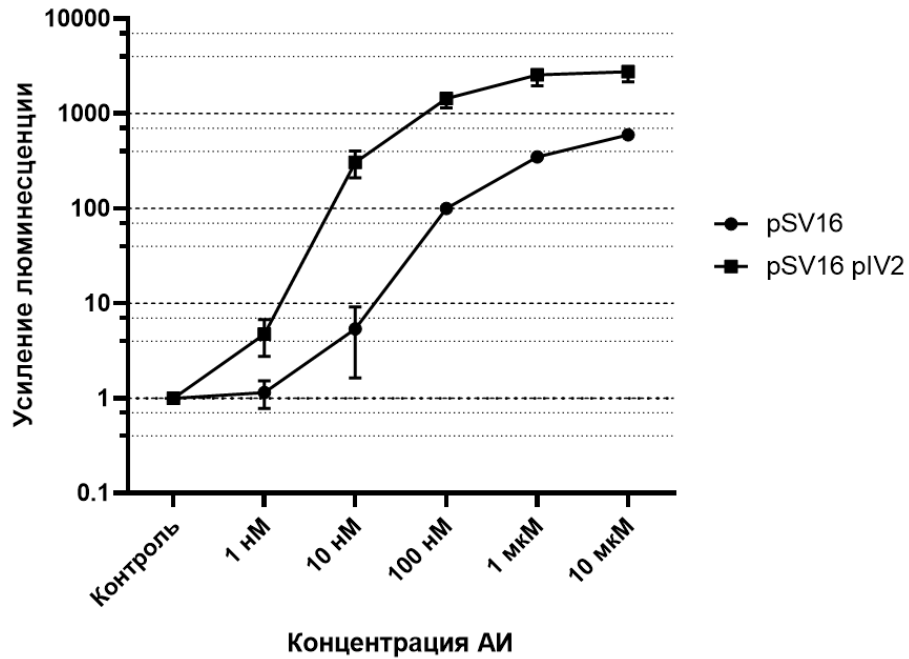


Рисунок 11 Зависимость амплитуды индукции люминесценции биосенсорных штаммов *E. coli* MG1655 pSV16 и MG1655 (pSV16, pIV2), отличающихся дозой гена *luxR2 A. logei*, в зависимости от концентрации АИ. Кривые отражают среднее значение со стандартным отклонением по трем биологическим репликациям

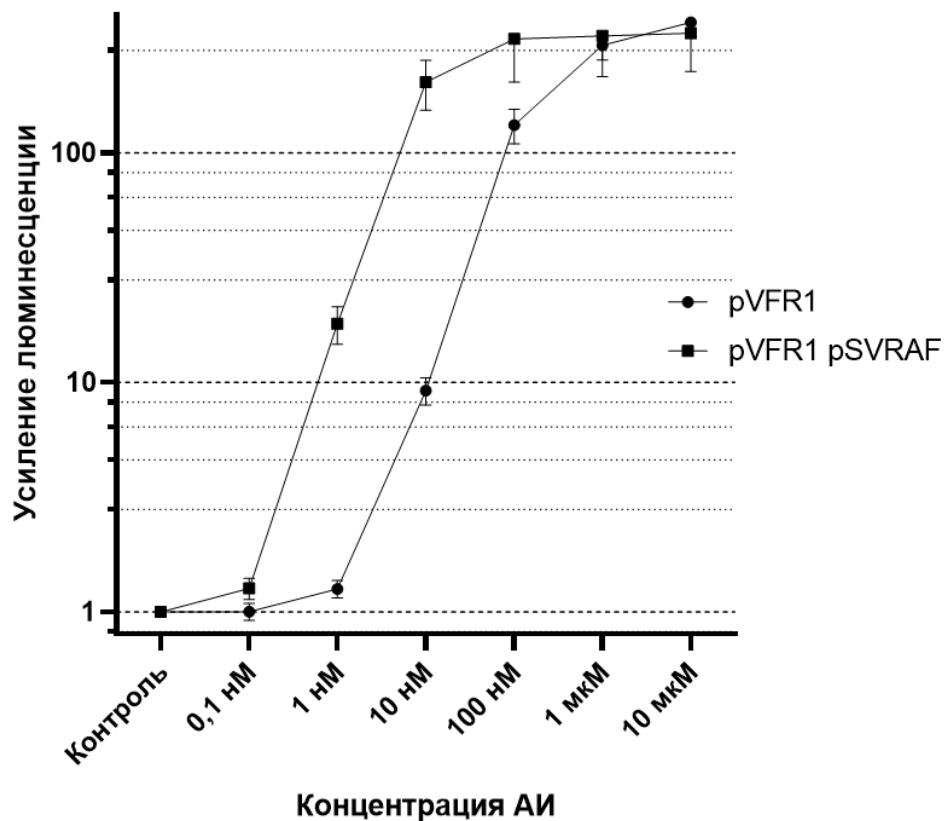


Рисунок 12 Зависимость амплитуды индукции люминесценции биосенсорных штаммов *E. coli* MG1655 pVFR1 и MG1655 (pVFR1, pSVRAF), отличающихся дозой гена *luxR A. fischeri*, в зависимости от концентрации АИ. Кривые отражают среднее значение со стандартным отклонением по трем биологическим репликациям

Как видно, повышение дозы регуляторного гена и, очевидно, концентрации соответствующего белка ведет к повышению чувствительности клеток к АИ приблизительно на 1 порядок по его концентрации. Этот результат верен для всех исследованных генов *luxR* семейства, что позволяет говорить о фундаментальной природе связи уровня экспрессии регуляторного гена и чувствительности клеток к сигнальному веществу.

В результате данного исследования был получен высокочувствительный цельноклеточный биосенсор к аутоиндуктору первого типа MG1655 pVFR1 pSVRAF, детектирующий присутствие 3OC6-HSL в концентрациях от 0,1 нМ.

Заключение

Данная работа является продолжением исследований QS систем бактерий рода *Aliivibrio*, проводившихся коллективами лаборатории генетики бактерий ГосНИИГенетики и лаборатории молекулярной генетики МФТИ. В результате работы была подтверждена сезонная зависимость распространенности бактерий видов *A. logei* и *P. phosphoreum* в акваториях Берингова и Охотского морей, предположение о которой высказывалось ранее (Коноплёва и др., 2015).

Было показано, что белок LitR, являющийся регуляторным элементом LuxS/LuxPQ и AinS/AinR QS систем, способен напрямую стимулировать экспрессию генов *luxI* и *luxCDABEG* и психрофильных *A. logei* и *A. salmonicida*, и у мезофильных *A. fischeri*.

Было показано, что у психрофильных бактерий разделение генов *luxI* и *luxCDABEG* на две отдельные единицы транскрипции сопровождается различиями в их регуляции, в частности по концентрациям АИ, необходимым для их индукции и по амплитуде индукции. При этом впервые свойства этих промоторов исследовались в самих клетках *A. logei*, а не в только в гетерологичной системе клеток *E. coli*.

В работе была подтверждена ранее высказанная гипотеза о роли последовательности *lux*-боксов в различиях промоторов P_{luxI} и $P_{luxCDABEG}$. Было показано, что доза и уровень экспрессии *luxR*-генов положительно влияют на

чувствительность QS системы к АИ, в результате чего был сконструирован более чувствительный к АИ цельноклеточный *lux*-босенсор.

Выводы:

1) В акваториях Берингова и Охотского морей в составе микрофлоры кишечника рыб широко распространены светящиеся виды бактерий. При этом наблюдается сезонная зависимость видового состава люминесцентной микрофлоры: в летний период преобладают бактерии вида *Photobacterium phosphoreum*, в зимний — *A. logei*.

2) В клетках *A. logei* LuxI/LuxR QS система имеет двухэтапный характер регуляции. На ранних этапах при концентрациях АИ от 1 нМ до 1 мкМ наблюдается активация экспрессии гена *luxI* и синтеза АИ, при концентрациях АИ свыше 1 мкМ активируется экспрессия генов *luxCDABEG* и начинает нарастать люминесценция. Параметры данных промоторов значительно зависят от последовательностей *lux*-боксов в них.

3) Промотор регуляторного гена *luxR1* *A. logei* в присутствии в клетке обоих регуляторных генов *luxR1* и *luxR2* подвержен репрессии при высоких концентрациях АИ в среде.

4) Белок LitR положительно регулирует экспрессию генов *luxI* и *luxCDABEG* бактерий *A. fischeri*, *A. logei* и *A. salmonicida*. Это может способствовать индукции синтеза АИ и росту люминесценции в стрессовых условиях, когда наблюдается нехватка LuxR-белков.

5) Уровень экспрессии генов *luxR1* и *luxR2* *A. logei* и *luxR* *A. fischeri* значительно влияет на чувствительность LuxI/LuxR QS системы к АИ.

Публикации аспиранта

1. Khrulnova S. A., Baranova A., Bazhenov S. V., Goryanin I. I., Konopleva M. N., Maryshev I. V., Zavilgelsky G. B. (2016). Lux-operon of the marine psychrophilic bacterium *Aliivibrio logei*: A comparative analysis of the LuxR1/LuxR2 regulatory activity in *Escherichia coli* cells. *Microbiology (United Kingdom)*, 162(4), 717-724. doi:10.1099/mic.0.000253
2. Konopleva M. N., Khrulnova S. A., Baranova A., Ekimov L. V., Bazhenov S. V., Goryanin I. I., Manukhov, I. V. (2016). A combination of luxR1 and luxR2 genes activates pr-promoters of psychrophilic *Aliivibrio logei* lux-operon independently of chaperonin GroEL/ES and protease lon at high concentrations of autoinducer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 473(4), 1158-1162. doi:10.1016/j.bbrc.2016.04.032
3. Sergey V Bazhenov, Svetlana A Khrulnova, Maria N Konopleva, Ilya V Manukhov; Seasonal changes in luminescent intestinal microflora of the fish inhabiting the Bering and Okhotsk seas., *FEMS Microbiology Letters*, Volume 366, Issue 4, <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz040>
4. Olga E. Melkina, Ignatyi I. Goryanin, Sergey V. Bazhenov, Ilya V. Manukhov, Gennadii B. Zavilgelsky; Comparative analysis of *Aliivibrio logei luxR1* and *luxR2* genes regulation in *Escherichia coli* cells., *Archives of Microbiology*, pp 1–11, <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01691-3>

Отпечатано с оригиналов-макетов Заказчика
в типографии «Переплетофф»
Адрес: г.Долгопрудный, ул. Циолковского, 4.
Тел: 8 (903) 511 76 03. www.prepletoff.ru
Формат А5. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Тираж 50 экз.
Мягкий переплет.
Заказ № 8803 от 21.10.2019