

ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА SLYA У БАКТЕРИЙ *ERWINIA AMYLOVORA*

Е. С. Койда

Белорусский государственный университет, г. Минск;

elenakoida99@gmail.com;

науч. рук. – А. Л. Лагоненко, канд. биол. наук, доц.

В рамках данной работы был рассмотрен один из четырех транскрипционных факторов MarR семейства, найденных у бактерии *Erwinia amylovora* E2, белок SlyA. С помощью программы Sigmoid 2.0 [1] был определен мотив сайта связывания белка для генома этого штамма. Биоинформатический анализ выявил, что в регулон фактора входят гены, непосредственно вовлеченные в образование биопленки, противодействие окислительному стрессу, систему трансдукции сигналов из внешней среды и регуляцию подвижности. Также, в ходе работы была создана экспрессионная конструкция рFLAG-СТС::*slyA* для наработки целевого белка, с целью дальнейшего использования в верификации найденных сайтов методом EMSA и изучения влияния на фенотип повышенных концентраций SlyA.

Ключевые слова: факторы вирулентности; *Erwinia amylovora*; транскрипционный регулятор SlyA; регулон SlyA; негативная авторегуляция.

В ответ на изменения окружающей среды в клетках микроорганизмов транскрибируются разные участки ДНК, а регуляция этого процесса осуществляется высоко отлаженными механизмами, подконтрольными белковым факторам. Особенно эволюционно продвинутая регуляция этого процесса наблюдается у патогенов. «Гонка вооружений» между паразитом и хозяином приводят к тому, что паразитический микроорганизм вырабатывает множество факторов вирулентности, создавая между ними сеть взаиморегулирования, опосредованного, в том числе, транскрипционными факторами.

Данная работа посвящена транскрипционному фактору SlyA фитопатогенного микроорганизма *Erwinia amylovora*.

Erwinia amylovora – возбудитель бактериального ожога плодовых культур – заболевания, поражающего большинство видов растений подсемейства яблоневых (*Maloideae*) семейства розоцветных (*Rosaceae*). В настоящее время *E. amylovora* обнаружена в более чем 40 странах. На территории Беларуси была впервые зарегистрирована в 2007 году [2].

Патогенность и вирулентность микроорганизма детерминированы многими факторами. Продукция сидерофоров для получения молекул железа из ткани хозяина, синтез металлопротеиназ, двухкомпонентные системы передачи сигнала, разнообразие синтеза экзополисахаридов и

система секреции III типа (T3SS) являются важными факторами развития и регуляции патогенеза [3].

Транскрипционный фактор SlyA, будучи членом MarR семейства, контролирует спектр биологических функции в некоторых патогенных бактериях животных. Это семейство ответственно за регуляцию широкого спектра клеточных процессов, включая множественную антибиотикоустойчивость, невосприимчивость к органическим растворителям, бытовым дезинфектантам и агентам окислительного стресса, что вкуче носит название антибиотиконевосприимчивый фенотип.

У *Erwinia amylovora* E2 SlyA – белок из 145 аминокислотных остатков, кодируемых последовательностью *slyA*, локализованной на участке хромосомы с 1802653 по 1803090 п.н. (437 п.н.). ДНК-связывающий домен содержит НТН-мотив с так называемым крылом [4].

В работе был использован штамм E2 *Erwinia amylovora*, выделенный из пораженного бактериальным ожогом растения яблони на территории Беларуси.

Для выяснения мотива сайта связывания белка была использована программа Sigmoid 2.0. Принцип поиска сайтов связывания данной программой базируется на нескольких допущениях: последовательность сайта связывания, в основном, определяется аминокислотной последовательностью белковых доменов, а также тем, что большинство прокариотических транскрипционных регуляторов имеют сайты связывания перед собственными генами, т е являются позитивными или негативными авторегуляторами [1].

В ходе данной работы был биоинформатически предсказан мотив сайта связывания белка в геноме *Erwinia amylovora* E2. На его основе было сделано предположение о составе регулона SlyA в геноме этой бактерии. В ходе анализа выявлено несколько десятков вероятных сайтов связывания, среди которых участки регуляции генов, кодирующих белки внешней мембраны и периплазмы, секретируемые белки, вовлеченные в процесс патогенеза; найдены сайты в областях, определяющих устойчивость к антимикробным пептидам и активным формам кислорода. Предполагается, что основная роль SlyA в клетке в том, чтобы изменить ее поверхность таким образом, чтобы защищаться от токсичных соединений.

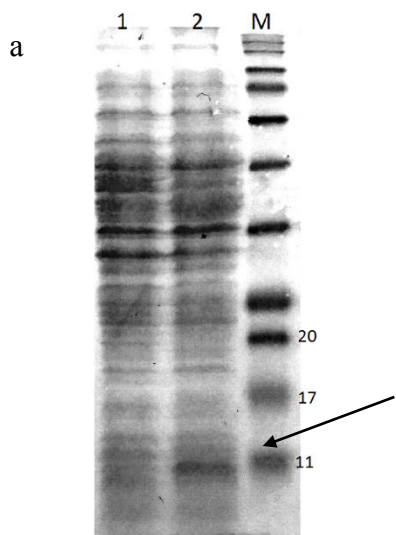
Наиболее значимые участки связывания приведены в таблице.

Предсказанные гены регулона SlyA

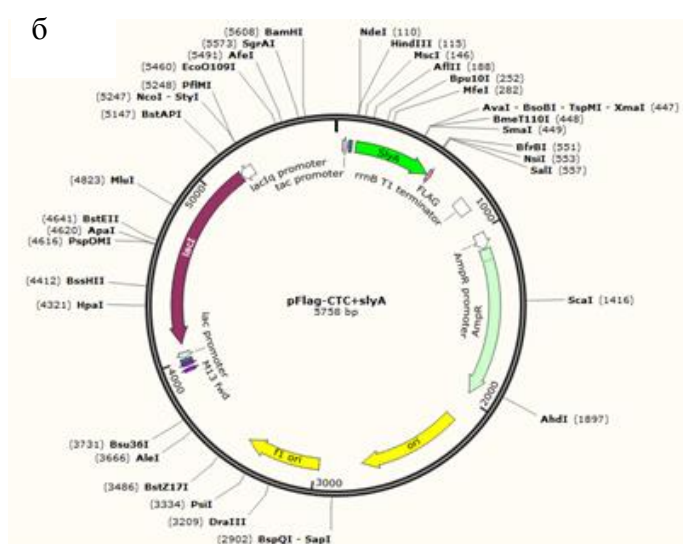
Расположение п.н.	Ген	Продукт	Функция
648319-648687	Оперон системы секреции бго типа	Ассоциированный с СС6Т Fha домен белка TagH	СС6Т важна для межвидовых коммуникаций, как внутривидовых бактерия-бактерия, путем инъекции эффекторных молекул в периплазму близкородственного вида, так и в межвидовых в модели патоген-эукариотический хозяин.
1729880-1730953	<i>ompF</i>	Порин OmpF	Порин внешней мембраны грамотрицательных бактерий.
759893-760657	<i>yabI</i>	Член белкового семейства DedA	Мембранный транспортер, необходимый для протондвижущей силы при работе эффлюксного насоса антимикробных агентов.
1036234-1036935	–	Белок, несущий домен DUF2076	Этот домен найден во многих прокариотических белках, однако его функция до конца не выяснена. Характерен для множества периплазматических лиганд-связывающих сенсорных белков.
1296292-1301382	<i>rhs</i>	Rhs-белок системы секреции 4го типа.	Составной компонент (В и С части) ABC-комплекса токсинов.
2062284-2063297	<i>rssB</i>	Двухкомпонентная система регуляции ответа RssB	Данная группа филогенетически близка к семейству белков, связанных с резистентностью посредством эффлюкса из клетки тяжелых металлов (медь, серебро, кадмий и / или цинк).
2807474-2807971	Оперон <i>fliL</i>	Флагеллярный, ассоциированный с базальным телом белок FliL	Подвижность, Флагеллярный, ассоциированный с базальным телом белок. Белок FliL контролирует направление вращения жгутиков во время хемотаксиса.
3420469-3420732	–	DUF1471 Белок, содержащий домен DUF1471	Функция белка неизвестна, но некоторые члены семейства, к которому оно относится потенциально влияют на образование биопленок, подвижность и реакцию на биотический стресс.
3717346-3717774	<i>ohr</i>	Ohr - белок резистентности к органическим гидропероксидам	Член белкового семейства, которое включает осмотически индуцируемые белки (OsmC).

Также, сайт связывания SlyA находится в регуляторной области гена *slyA*, что говорит о его авторегуляции, предположительно, негативной.

Кодирующая последовательность гена *slyA* *E. amylovora* E2 была амплифицирована в ходе ПЦР и встроена по рестрикционным сайтам HindIII и SalI под промотор P_{tac} в экспрессионный вектор pFLAG-CTC. Полученная рекомбинантная плазмида (Puc. б) была введена в клетки *E. coli* XL-1 Blue. Полученные трансформанты выращивали в условиях индукции P_{tac}-промотора в течении 14 часов при 28°C. Как видно из Puc. а, в клетках, несущих рекомбинантную плазмиду pFLAG-CTC::*slyA* синтезируется искомый транскрипционный регулятор.



Puc. а. Электрофореграмма клеточного лизата *E. coli* XL-1 Blue: 1 – pFLAG-CTC; 2 – pFLAG-CTC::*slyA* M – маркер молекулярного веса PS-104 JenaBioscience



Puc. б. Схематическая карта рекомбинантной плазмиды pFLAG-CTC::*slyA*

Таким образом, в ходе работы был предсказан регулон транскрипционного фактора, а также создана конструкция для наработки целевого белка. Планируется работа по уточнению биологических функций SlyA.

Библиографические ссылки

1. Nikolaichik Y., Damienikan A. Sigmoid: a user-friendly tool for improving bacterial genome annotation through analysis of transcription control signals // Peer J. 2016. Vol. 4. P. e2056.
2. First Report of *Erwinia amylovora* Fire Blight in Belarus / A. Lagonenko [et al.] // Journal of Phytopathology. 2008. Vol. 156, № 10. P. 638–640.
3. Pathogenicity and infection strategies of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in Rosaceae: State of the art / K. Vrancken [et al.] // Microbiology. 2013. Vol. 159, № 5. P. 823–832.
4. Ellison D. W., Miller V. L. Regulation of virulence by members of the MarR/SlyA family // Current Opinion in Microbiology. 2006. Vol. 9, № 2. P. 153–159.