

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР СЕМЕЙСТВА LysR КОНТРОЛИРУЕТ ПРОДУКЦИЮ ЭКЗОФЕРМЕНТОВ PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM

Дюбо Ю.В., Бубенникова А.Н., Крук А.Н., Николайчик Е.А.
Белорусский государственный университет, Минск,
yuliyadiubo@gmail.com

Виды рода *Pectobacterium* являются патогенами культурных растений и вызывают серьезные экономические потери каждый год. Эти микроорганизмы адаптированы к широкому кругу хозяев и в ходе заражения образуют сложную патосистему. Переход от одного типа существования к другому осуществляется под контролем разветвленной системы регуляции метаболизма бактериальной клетки, ключевую роль в которой играют транскрипционные факторы.

Разницу в метаболизме свободноживущих клеток и клеток, паразитирующих в растении, хорошо демонстрируют транскриптомные эксперименты с измерением уровней экспрессии генов при заражении растений в сравнении с культурой *in vitro*. Для пектобактерий на сегодня опубликованы два массива таких данных, полученных при заражении разных растений разными видами пектобактерий. В первом случае растения табака *Nicotiana tabacum* заражались *Pectobacterium atrosepticum* SCRI 1043 [5], во втором – растения картофеля заражались *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasieliensis* PBR 1692. Для второго штамма доступны только необработанные данные (PRJNA398030), а их анализ описан в другой статье в этом сборнике [А.Н. Крук, Е.А. Николайчик].

В настоящей работе проанализированы транскрипционные факторы семейства LysR, которое представляет собой один из наиболее широко представленных типов транскрипционных регуляторов среди прокариот, контролирующих факторы вирулентности, чувство кворума, подвижность и прочие аспекты метаболизма. Члены этого семейства демонстрируют довольно консервативную структуру с N-концевым ДНК-связывающим НТН (helix-turn-helix, спираль-поворот-спираль) доменом и С-концевым субстрат-связывающим доменом [3]. Сканирование кодируемых геномами пектобактерий белковых последовательностей с помощью скрытой марковской модели ДНК-связывающего домена LysR-семейства (PF00126) выявило 56 транскрипционных факторов этого семейства у *P. carotovorum* и 59 – у *P. atrosepticum*, из последних дифференциально экспрессируются в растении 27. По комплексу характеристик для экспериментального изучения был выбран один представитель семейства, дифференциальная экспрессия которого была четко зарегистрирована у обоих штаммов. В случае SCRI 1043 в некротической зоне стеблей табака уровень экспрессии рамки считывания ECA0427 по сравнению с культивируемыми *in vitro* бактериями увеличился более чем в

25 раз, а в бессимптомной зоне — в 18 раз. У штамма PBR 1692 экспрессия ортолога ECA0427 в стеблях картофеля через 24 часа после инокуляции возростала в 2,8 раз, а через 72 часа — в 1,6 раз. Это свидетельствует в пользу более активной экспрессии данного гена на ранних стадиях инфекции.

В качестве объекта для экспериментального исследования взят ортолог ECA0427 из штамма *P. carotovorum* 3-2 (locus_tag OA04_04850). Сходство (число идентичных аминокислотных остатков) аминокислотных последовательностей трех упомянутых ортологичных транскрипционных факторов составляет около 99%.

Поиск операторного мотива изучаемого гена с помощью алгоритма поиска *de novo* программы SigmID [4] позволил идентифицировать наиболее вероятный операторный мотив для продукта рамки считывания OA04_04850 (рис. 1). Этот мотив соответствует типичному для LysR-семейства паттерну T-N11-A и показывает значимое сходство с несколькими экспериментально охарактеризованными мотивами для регуляторов LysR-семейства.

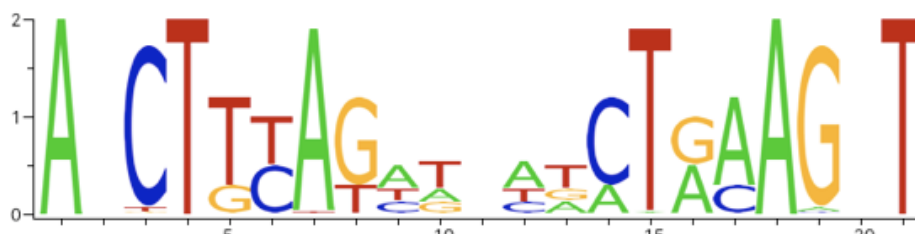


Рисунок 1 – Операторный мотив для транскрипционного фактора пектобактерий OA04_04850 (ECA0427).

Сканирование геномной последовательности *P. carotovorum* 3-2 показало присутствие трех соответствующих мотиву операторов: двух перед самим геном OA04_04850 и еще одного перед геном *rsmA*, кодирующим глобальный посттранскрипционный регулятор вторичного метаболизма (рис. 2).

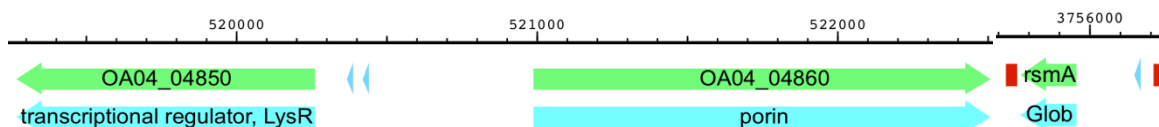


Рисунок 2 – Расположение сайтов связывания белка OA04_04850 (синие треугольники) в последовательности генома *P. carotovorum* 3-2.

Ввиду того, что участие RsmA в регуляции синтеза экзоферментов пектобактерий было ранее продемонстрировано [2], наличие связи между изучаемым геном OA04_04850 и глобальным регулятором RsmA оценивали по активности ключевых для патогенного образа жизни пектобактерий экзоферментов – пектатлиаз и целлюлаз.

Для проверки этой гипотезы, ген OA04_04850 вместе со своей регуляторной последовательностью был амплифицирован и клонирован в векторе pUC18. Полученной конструкцией pUC18::OA04_04850 были

трансформированы клетки *P. carotovorum* 3-2. Полученные трансформанты были протестированы на продукцию экзоферментов.

Для измерения активности экзоферментов бактерии культивировались в питательном бульоне с добавлением полипектата натрия (0,2%) и аэрацией, активность экзоферментов оценивали в культуральной жидкости. Определение активности пектатлиаз в культуральной жидкости *P. carotovorum* с конструкцией pUC18::OA04_04850 и контрольной плазмидой pUC18 проводили по протоколу из работы [1]. Определение активности целлюлаз в культуральной жидкости проводилось по модифицированной методике, основанной на представленной в работе [6]. Изменения заключались в использовании натрий-фосфатного буфера (рН 7) и увеличенном времени инкубации при 50°C (3 часа). Активности ферментов нормализовали по оптической плотности культур и выражали в условных единицах.

Активность пектатлиаз штамма JN42 с конструкцией pUC18::OA04_04850 оказалась в три раза выше, чем у контрольных образцов с векторной плазмидой (рис. 3А). Активность целлюлаз в культуральной жидкости штамма с конструкцией pUC18::OA04_04850 также оказалась выше, чем у контрольных образцов (рис. 3Б).

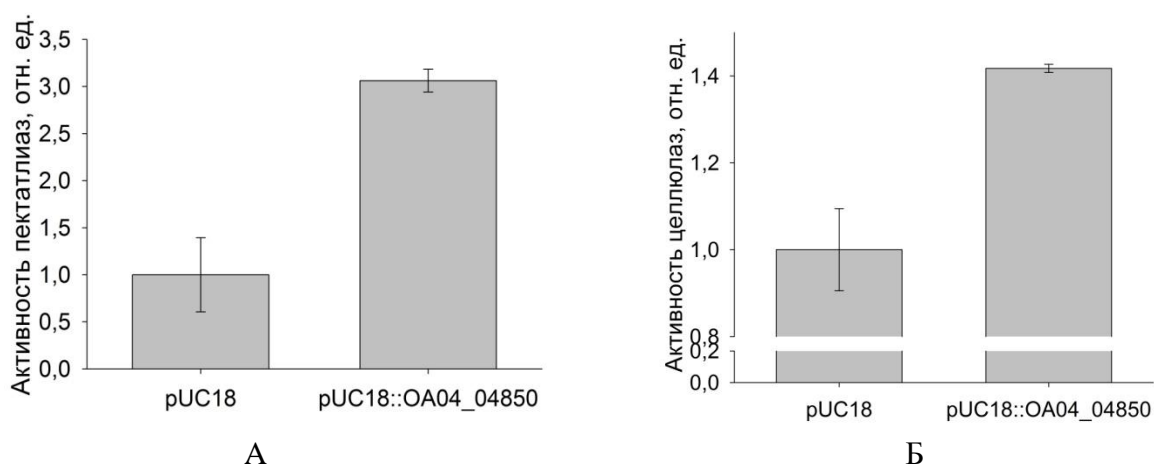


Рисунок 3 – Активность пектатлиаз (А) и целлюлаз (Б) в культуральной жидкости *P. carotovorum*. Приведены средние трех измерений со стандартной ошибкой.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что высокая доза гена OA04_04850 увеличивает продукцию экзоферментов, что свидетельствует о возможной репрессии транскрипции *rsmA* продуктом рамки считывания OA04_04850. В дальнейшем планируется непосредственно измерить уровни транскрипции *rsmA* в присутствии разных доз гена OA04_04850 и изучить фенотип мутанта с инактивированным геном.

Литература

1. Collmer, A. Assay methods for pectic enzymes / A. Collmer, J.L. Ried, M.S. Mount // *Methods in Enzymology*. – Elsevier, 1988. – Vol. 161. – P. 329-335.
2. Inactivation of rsmA leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone / A. Chatterjee [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – Т. 61, № 5. – С. 1959-1967.
3. Maddocks, S.E. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins / S.E. Maddocks, P.C.F. Oyston // *Microbiology*. – 2008. – Vol. 154, № 12. – P. 3609-3623.
4. Nikolaichik, Y. Sigmoid: a user-friendly tool for improving bacterial genome annotation through analysis of transcription control signals / Y. Nikolaichik, A.U. Damienikan // *PeerJ*. – 2016. – Vol. 4 – P. e2056.
5. Transcriptome profiling helps to identify potential and true molecular switches of stealth to brute force behavior in *Pectobacterium atrosepticum* during systemic colonization of tobacco plants / V. Gorshkov [et al.] // *Eur. J. Plant Pathol.* – 2018. – Vol. 152, № 4. – P. 957-976.
6. Wood, T.M. Methods for measuring cellulase activities / T.M. Wood, K.M. Bhat // *Methods in Enzymology*. – Elsevier, 1988. – Vol. 160. – P. 87-112.