

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ СЕМЕЙСТВ *OmpR* И *LuxR* *PECTOBACTERIUM* SPP., ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЕМЫХ ПРИ КОЛОНИЗАЦИИ РАСТЕНИЙ

Крук А.Н., Николайчик Е.А.

Белорусский государственный университет, Минск,
krukaaal@gmail.com

Успешность микробной инвазии растений патогенами рода *Pectobacterium* зависит от синтеза последними многочисленных факторов вирулентности. А поскольку растения способны детектировать многие факторы вирулентности и в ответ активировать различные защитные реакции, своевременная активация и инактивация экспрессии каждого фактора вирулентности критична для установления определенного типа взаимоотношений между патогеном и хозяином. Поэтому понимание механизмов регуляции факторов патогенности может способствовать разработке мер борьбы с заболеваниями. Достаточно хорошо изучены биохимические пути, лежащие в основе патогенеза пектобактерий, однако механизмы координации экспрессии наборов генов, соответствующих разным стадиям развития заболевания, исследованы лишь поверхностно. Исторически энтеробактериальный фитопатоген *Pectobacterium atrosepticum* считался основным патогеном, ответственным за гниение или увядание стеблей растений картофеля. Однако недавние исследования с целью выявления причин симптомов черной ножки привели к изоляции в качестве возбудителей представителей других видов пектобактерий. Например, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* был выделен из картофеля в Бразилии, где он являлся основной причиной черной ножки [1]. Новые данные, полученные для бактерий рода *Pectobacterium* методом RNA-seq, дают возможность выделить видоспецифичные особенности в развитии инфекции на транскрипционном уровне.

В настоящей работе с использованием открытых данных RNA-Seq (коды доступа PRJNA403794, PRJNA398030) сравнены три транскриптомных профиля *P. atrosepticum* SCRI1043 (культивированных *in vivo* на двух стадиях системной колонизации растений *Nicotiana tabacum* и *in vitro*) и три профиля *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* PBR 1692 (*invivo* в клубнях картофеля на ранних и поздних стадиях инфекции и *in vitro*).

Поскольку опубликованная геномная последовательность штамма PBR 1692 [2] сильно фрагментирована (1370 контигов), содержит множество протяженных пробелов и огромное число замен оснований, делающей невозможной ее аннотацию, для оценки транскриптомных данных сделана новая сборка этого генома. Для этого использован геномный ассемблер SPAdes

версии 3.12 и более 170 млн парных транскриптомных прочтений (коды доступа SRR5928621, SRR5928622, SRR5928624, SRR5928625, SRR5928626). Доступная геномная последовательность (код доступа ABVX01.1) использована для верификации сборки и закрытия пробелов. В результате получена высококачественная сборка с минимальным числом замен и инделов со всего 26 пробелами. Аннотация последовательности выполнена с помощью конвейера PROKKA с использованием высококачественной аннотации близкого генома *P. atrosepticum* 21A [3] в качестве референсной.

Количественная оценка уровней экспрессии генов PBR 1692 выполнена при помощи Kallisto [4]. Статистический анализ дифференциальной экспрессии проводили с помощью пакета edgeR программной среды вычислений R [5]. Для сравнения с *P. atrosepticum* использованы полученные ранее данные [6].

Из примерно 300 транскрипционных факторов в настоящей работе проанализированы представители семейств OmpR и LuxR. С помощью моделей PFAM PF00196 и PF00486 в геномах *P. atrosepticum* SCRI1043 и *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* идентифицированы 12 и 15 транскрипционных факторов семейства LuxR, а также 12 и 13 – семейства OmpR. Примерно половина ТФ этих семейств достоверно меняла уровни экспрессии в растениях (табл. 1).

Семейство OmpR представлено белками-регуляторами ответа, чаще всего являющимися частью двухкомпонентных систем. Они характеризуются консервативным регуляторным N-концом, состояние фосфорилирования-дефосфорилирования которого, контролируемое сенсорной гистидинкиназой, приводит к конформационным изменениям ДНК-связывающего домена [7]. Детекция различных по своей природе сигналов (рН среды, ионы, антимикробные пептиды и др. стрессовые условия) приводит к соответствующему клеточному ответу за счет дифференциальной экспрессии генов-мишеней. В условиях проанализированных экспериментов дифференциальная экспрессия хотя бы в одном случае выявлена у девяти генов, кодирующих ТФ этого семейства. Для *P. atrosepticum* SCRI1043 семь генов ТФ этого семейства экспрессировались дифференциально в растениях табака по сравнению с условиями *in vitro*, причем экспрессия одного фактора (*flpR*) сильно увеличивалась, а остальных шести – подавлялась. Разница в экспрессии данных генов на разных стадиях заражения не наблюдалась. Только три из семи генов, показавших дифференциальную экспрессию при заражении растений табака бактериями *P. atrosepticum* (*flpR*, *phoP* и *basR*), сходным образом меняли характер экспрессии и у бактерий *P. brasiliensis* при заражении ими растений картофеля. Для еще четырех генов (*phoB*, *rstA*, *arcA*, *ECA0889*) дифференциальной экспрессии у *P. carotovorum* выявлено не было. Два гена (*ompR* и *kdpE*) показали дифференциальную экспрессию в случае *P. carotovorum*, но не *P. atrosepticum*. Следует отметить, что у *P. carotovorum*, в отличие от *P. atrosepticum*, для четырех из пяти дифференциально экспрессируемых генов четко прослеживается увеличение разницы (как

индукции, так и репрессии) в уровне экспрессии в сравнении с контролем по мере развития заболевания. Следует также отметить, что только два гена из вышеописанных (*phoP* и *flpR*) показали изменение экспрессии во всех проанализированных вариантах эксперимента.

Таблица 1 – Дифференциальная экспрессия транскрипционных факторов семейств OmpR и LuxR *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* PBR1692 и *P. atrosepticum* SCRI1043.

Ген	Locus_tag	Белковый продукт	PBR1692		SCRI1043	
			24h	72h	Zone 1	Zone 2
OmpR						
<i>flpR</i>	ECA0785	Response regulator of flp/tad pili	1,01	3,03	5,65	7,22
<i>ompR</i>	ECA4108	Osmolarity response regulator	1,04	nDE	nDE	nDE
<i>phoP</i>	ECA2445	DNA-binding transcriptional regulator	-2,66	-2,53	-1,80	-2,37
<i>kdpE</i>	ECA1338	DNA-binding transcriptional activator	-1,21	-1,26	nDE	nDE
<i>basR</i>	ECA4044	Lipid A modification genes regulator	nDE	-1,38	-2,55	-2,20
	ECA0889	Two-component response regulator	nDE	nDE	-1,14	-1,14
<i>phoB</i>	ECA1110	Phosphate regulon response regulator	nDE	nDE	-1,88	-1,83
<i>rstA</i>	ECA2013	Two-component response regulator	nDE	nDE	-1,27	-1,07
<i>arcA</i>	ECA3893	Aerobic respiration control protein	nDE	nDE	-1,24	nDE
LuxR						
<i>expR</i>	ECA0106	Quorum sensing regulator	nDE	nDE	3,53	3,81
<i>virR</i>	ECA1561	Quorum sensing regulator	nDE	1,06	1,41	1,25
	ECA0933	LuxR-family transcriptional regulator	1,24	1,53	4,17	4,21
	ECA2873	putative transcriptional regulator	nDE	nDE	2,37	2,22
<i>evr</i>	ECA0708	Virulence regulator	nDE	1,1	3,07	2,06
	ECA3917	LuxR-family transcriptional regulator	1,39	1,27	nDE	nDE
	-	LuxR-family transcriptional regulator	2,31	3,05	no gene	no gene
Приведены значения log ₂ указанных соотношений уровней экспрессии: для штамма PBR1692 через 24 и 72 часа после инокуляции стеблей картофеля (24h/0h и 72h/0h), для штамма SCRI1043 – бактерий из бессимптомной (zone1) и некротической (zone2) зон стеблей табака по отношению к культурам в момент инокуляции. nDE – нет дифференциальной экспрессии						

Семейство LuxR объединяет белки с однотипной структурой С-концевого ДНК-связывающего домена – спираль-поворот-спираль. N-конец содержит домен, связывающий аутоиндукторы (ацилгомосеринлактоны) чувства кворума либо мотивы, детектирующие иные сигналы. Большинство транскрипционных факторов LuxR-семейства работают как активаторы, однако встречаются и репрессоры. Пять генов транскрипционных факторов LuxR-семейства экспрессировались дифференциально у *P. atrosepticum* SCRI1043, уровень транскрипции в условиях эксперимента для всех увеличивался. Для *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* в целом представители этого семейства меняли

экспрессию в меньшей степени (на грани порога детекции в большинстве случаев), но три из пяти дифференциально экспрессирующихся генов оказались теми же, что и у SCRI1043 (*evr*, *expR2/virR* и *ECA0933*), а паралог пятого гена в геноме *P. atrosepticum* отсутствует.

Таким образом, были выявлены гены транскрипционных факторов семейств OmpR и LuxR, экспрессируемые дифференциально в растениях в сравнении с условиями *in vitro*. Спектр дифференциально экспрессируемых генов транскрипционных факторов двух штаммов пектобактерий радикально отличается: из 16 генов для 9 дифференциальная экспрессия зафиксирована только у одного штамма, а для большинства остальных генов степень индукции/репрессии сильно отличается между штаммами, что может быть связано с разной динамикой экспрессии факторов вирулентности в двух патосистемах. В частности, неожиданно резкие различия характера экспрессии паралогичных регуляторов чувства кворума требуют отдельного исследования на разных стадиях развития заболевания. Только для гена *phoP* можно говорить о сходном характере и уровне репрессии у двух штаммов пектобактерий. Можно также отметить в 3-4 раза более сильную индукцию регулятора *flp/tad* пилей у обоих видов пектобактерий на более поздней стадии инфекции, что подчеркивает роль этой малоизученной системы подвижности в прогрессе заболевания.

Литература

1. *Pectobacterium atrosepticum* and *Pectobacterium carotovorum* Harbor Distinct, Independently Acquired Integrative and Conjugative Elements Encoding Coronafacic Acid that Enhance Virulence on Potato Stems / P. Panda [et al.] // Front. Microbiol. – 2016. – Vol. 7.
2. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *pectobacterium* and *dickeya* / B. Ma [et al.] // Phytopathology. – 2007. – Vol. 97, № 9. – P. 1150-1163.
3. Genome Sequence of *Pectobacterium atrosepticum* Strain 21A / Y. Nikolaichik [et al.] // Genome Announc. – 2014. – Vol. 2, № 5.
4. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification / N.L. Bray [et al.] // Nat. Biotechnol. – 2016. – Vol. 34, № 5. – P. 525-527.
5. Robinson, M.D. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data / M.D. Robinson, D.J. McCarthy, G.K. Smyth // Bioinformatics. – 2010. – Vol. 26, № 1. – P. 139-140.
6. 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.
7. Martínez-Hackert, E. Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors / E. Martínez-Hackert, A.M. Stock // J. Mol. Biol. – 1997. – Vol. 269, № 3. – P. 301-312.