

# КОНСТРУИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЛЕЦИОННОГО МУТАНТА ПО ГЕНУ ГЛОБАЛЬНОГО ТРАНСКРИПЦИОННОГО РЕГУЛЯТОРА *SlyA* У БАКТЕРИЙ *ERWINIA AMYLOVORA*

Койда Е.С.

Белорусский государственный университет, г. Минск

*elenakoida99@gmail.com*

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

В ходе работы был сконструирован делеционный мутант *Erwinia amylovora* по гену транскрипционного фактора *SlyA* и осуществлена его фенотипическая характеристика. Были получены данные, указывающие на то, что транскрипционный регулятор *SlyA* вовлечен в регуляцию подвижности клеток *E. amylovora*, продукции амиловорана, процесса формирования биопленок и устойчивости к окислительному стрессу.

**Ключевые слова:** *Erwinia amylovora*; транскрипционный регулятор *SlyA*; регулон *SlyA*; делеционный мутант; инактивация гена по Даценко; факторы вирулентности.

Бактерии *Erwinia amylovora* являются возбудителями бактериального ожога – опаснейшей болезни плодовых деревьев. Фитопатоген относится к карантинным объектам для стран, входящих в Европейскую Организацию Защиты Растений. В 2007 году впервые были зафиксированы вспышки бактериального ожога в яблоневых садах Республики Беларусь [1]. Основными изученными факторами вирулентности бактерий *E. amylovora* являются эффекторы системы секреции третьего типа. Бактерии интенсивно образуют биопленки внутри сосудов ксилемы растения-хозяина, что непосредственно связано с продукцией экзополисахаридов амиловорана и левана, формированием фимбрий и пилей, но механизмы регуляции этого процесса слабо изучены. Несомненно, механизм взаимодействия растительной клетки с фитопатогеном намного сложен и требует участия большего количества факторов вирулентности.

Транскрипционный фактор *SlyA*, будучи членом *MarR* семейства, контролирует широкий спектр клеточных процессов в клетках бактериальных патогенов человека и животных. Однако, на данный момент, очень мало известно о роли этого транскрипционного фактора в биологии фитопатогенных микроорганизмов.

Ранее, с использованием биоинформатического подхода, нами был предсказан регулон *SlyA* в геноме *E. amylovora* E2. Так, потенциальные сайты связывания белка были найдены в регуляторных областях генов, вовлеченных в образование биопленки, задействованных в противостоянии окислительному стрессу; перед детерминантами систем трансдукции сигналов из внешней среды, перед генами, вовлеченные в регуляцию подвижности и в ряде других участков генома [3].

Для изучения роли SlyA в регуляции важных для патогенности клеточных процессов был сконструирован делеционный мутант *E. amylovora* по соответствующему гену. Клетки бактерий *E. amylovora* E2 подвергали мутагенезу по методу «PCR-based one-step inactivation of chromosomal genes» [4]. В результате проделанной работы был отобран штамм (далее  $\Delta$ slyA), устойчивый к канамицину. Для подтверждения наличия делеции ДНК из клеток  $\Delta$ slyA амплифицировали с праймерами к областям, фланкирующим делецию, а также с внутренними праймерами к гену устойчивости к канамицину. В результате ПЦР были получены фрагменты ДНК ожидаемых размеров.

На следующем этапе работы была изучена подвижность клеток бактерий  $\Delta$ slyA и E2 на питательных средах различного состава (рис. 1). Как видно из рисунка, при выращивании *E. amylovora* как на минимальной среде M9, так и на полноценной среде LB, значимых различий в подвижности клеток мутанта и исходного штамма не наблюдалось. Однако в условиях сверхэкспрессии гена *slyA* подвижность клеток снижалась почти в 2 раза по сравнению с контролем (рис. 1б). Полученные результаты косвенно указывают на возможность негативной регуляции подвижности клеток *E. amylovora* SlyA.

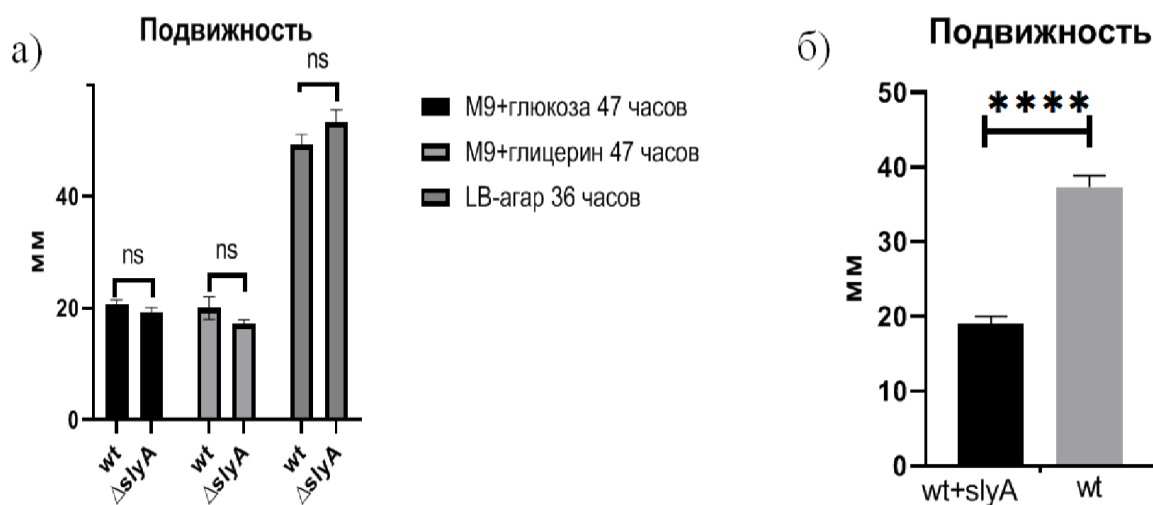


Рис.1. **а)** Подвижность клеток *E. amylovora* E2 (wt) и мутанта ( $\Delta$ slyA) на разных средах  
**б)** Подвижность клеток бактерий *E. amylovora* E2 несущих pFLAG-CTC (wt) и бактерий E2 с плазмидой pFLAG-CTC::slyA (wt+slyA) в условиях индукции на среде LB

Тест на продукцию экзополисахарида амиловорана (важнейшего фактора вирулентности и компонента биопленок) выявил два интересных момента (рис.2а). Во-первых, продукция амиловорана действительно снижена в отсутствие SlyA. Во-вторых, присутствие белка в количествах, превышающих физиологические в несколько раз, увеличивает продукцию амиловорана.

Учитывая тот факт, что инактивация *slyA* приводит к снижению продукции амиловорана, было интересно изучить эффект такой мутации на способность образовывать биопленки. Для исследования этого явления была выбрана среда M9 с сорбитолом (рис. 2б).

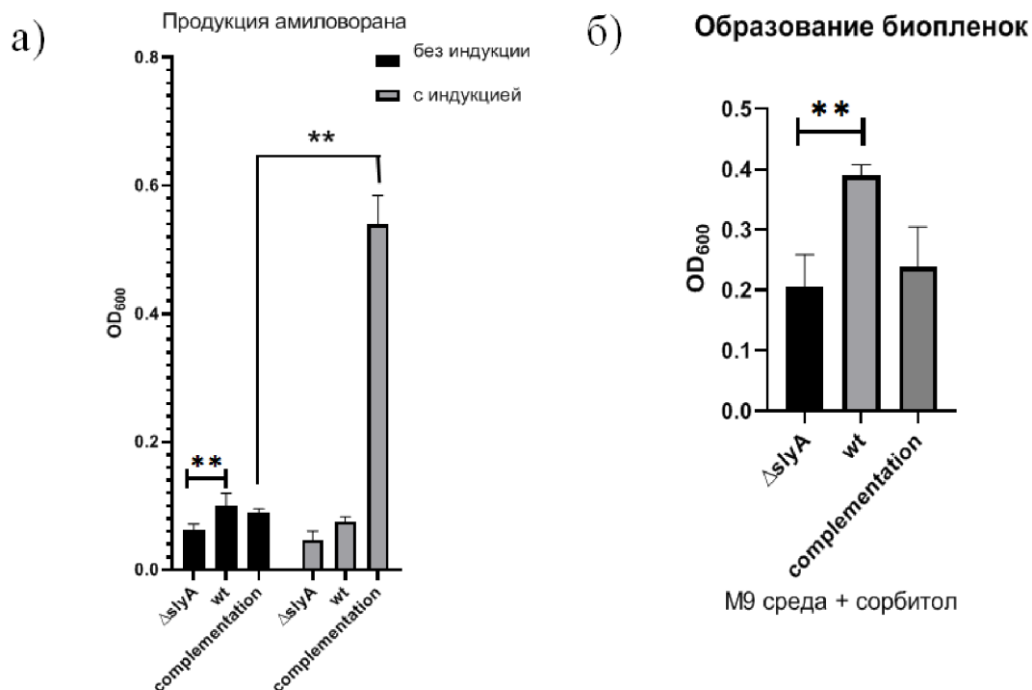


Рис.2. а) Продукция амиловорана клетками *E. amylovora* E2 (wt), мутанта ( $\Delta slyA$ ), E2 с плазмидой pFLAG-CTC::*slyA* (complementation). б) Образование биопленок клетками штамма дикого типа (wt), мутанта ( $\Delta slyA$ ), дикого типа с экспрессионной плазмидой pFLAG-CTC::*slyA* (complementation)

Исходя из данных, представленных на рисунке, образование биопленок у делеционного мутанта достоверно снижено по сравнению с диким типом.

Устойчивость бактерий к окислительному стрессу была изучена с использованием двух методов. В соответствии с первым, выживаемость в присутствии перекиси водорода оценивалась по оптической плотности культур, со вторым – подсчетом выживших клеток после посева на агаризованную среду. Согласно результатам эксперимента с подсчетом колоний, выживаемость дикого типа – 0,957%, мутанта – 0,662%, что соотносится с результатами на графике рис.3а.

Сходным образом оценивалась и выживаемость бактерий в условиях кислотного стресса. Однако достоверных различий в устойчивости клеток исходного штамма и мутанта к кислотному стрессу (pH 4.7) выявить не удалось (рис. 3б).

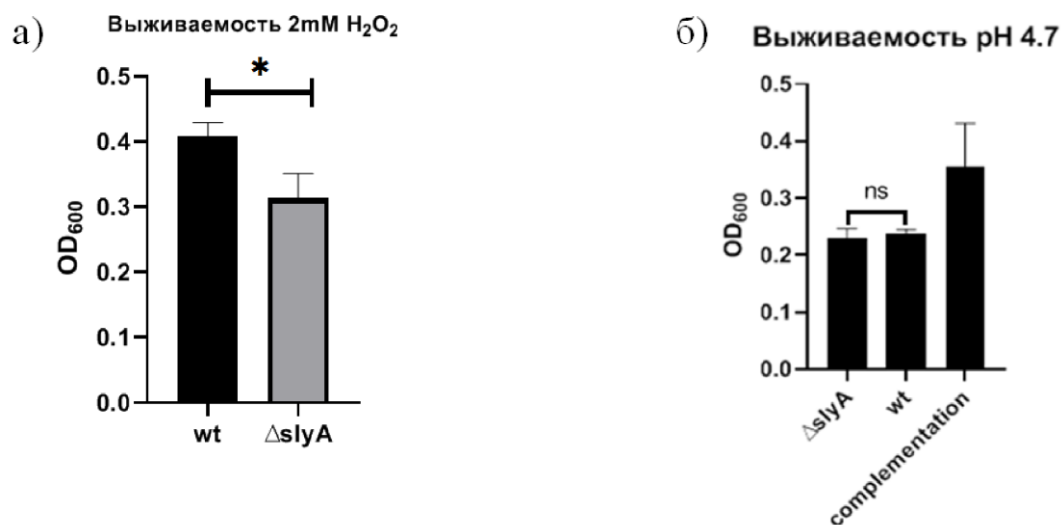


Рис.3. Выживаемость клеток бактерий *E. amylovora* E2 (wt) и мутанта ( $\Delta$ slyA) в условиях стресса а) окислительного б) кислотного

Таким образом, в ходе исследования нами были получены данные, указывающие на то, что транскрипционный регулятор SlyA вовлечен в регуляцию подвижности клеток *E. amylovora*, продукции амиловорана, процесса формирования биопленок и устойчивости к окислительному стрессу.

#### Библиографические ссылки

1. Lagonenko A. First Report of *Erwinia amylovora* Fire Blight in Belarus. // *Journal of Phytopathology*. 2008. Vol. 156, № 10. P. 638–640.
2. Vrancken K. Pathogenicity and infection strategies of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in Rosaceae: State of the art // *Microbiology*. 2013. Vol. 159, № 5. P. 823–832.
3. Койда Е.С., Лагоненко А.Л., Характеристика транскрипционного фактора SlyA у бактерий *Erwinia amylovora* // *Материалы 76-й научной конференции студентов, и аспирантов Белорусского государственного университета*. 2019. Т.1. С. 306–309.
4. Datsenko K. A., Wanner B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000. Vol. 97, № 12. P. 6640–6645.