

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра биохимии

КРАВЧЕНКО
Ульяна Арсеновна

РОЛЬ ДВУХКОМПОНЕНТНОЙ СИСТЕМЫ PhoQ/PhoP В РЕГУЛЯЦИИ

В
И
Дипломная работа

У

Л

Е

Н

Т

Н

Ы

Х

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
доцент Е.А. Николайчик

Допущена к защите

«___» _____ 2021 г.

Зав. кафедрой биохимии

кандидат биологических наук, доцент

_____ И.В. Семак

С

В

О

Й

С

Т

В

Р

Е

С

Т

Минск 2021

О

В

А

С

Т

Е

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 68 с., 20 рис., 6 табл., 81 источников.

Двухкомпонентная система PhoQ/PhoP, RNA-seq, *Pectobacterium versatile*, пектин, арабиноза, цитрат, вирулентность.

Объект исследования: Двухкомпонентная система PhoQ/PhoP

Цель: исследовать роль двухкомпонентной системы PhoQ/PhoP в вирулентности *P. versatile*, описать PhoP-регулон, найти лиганды гистидин

Методы исследования: RNA-seq, ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, клонирование, тесты на вирулентность.

Pectobacterium versatile (ранее *P. carotovorum*) вид энтеробактерий мягкой внили, способный инфицировать множество растений-хозяев и повреждать различные ткани. Для настолько универсального патогена можно ожидать сложной транскрипционной регуляции свойств вирулентности. Соответствующая информация доступна только по родственным видам и весьма ограничена. С помощью инсерционного *phoP*-мутанта *Pectobacterium versatile* было продемонстрировано, что PhoP регулирует по крайней мере 115 генов, большинство из которых специфичны для пектобактерий. Функции, выполняемые PhoP-контролируемыми генами, включают деградацию, транспорт и метаболизм источников углерода растительного происхождения, модификацию оболочки бактериальных клеток и устойчивость к стрессу. Также было продемонстрировано участие PhoP в установлении порядка распада клеточной стенки растений и утилизации соответствующих продуктов распада. На основании экспериментальных данных и анализа *in silico* был определен мотив сайта связывания PhoP, было предоставлено доказательство его универсальности для кишечных бактерий. Сканирование генома *P. versatile* на предмет расположения этого мотива позволило предположить, что регулон PhoP гораздо большего размера, что делает PhoP глобальным регулятором вирулентности. Потенциальные мишени PhoP включают множество регуляторных генов, и контроль PhoP над одним из них, *expI*, был подтвержден экспериментально, что подчеркивает связь между двухкомпонентной системой PhoPQ и системой чувства кворума. Было обнаружено, что высокие концентрации ионов кальция и магния отменяют PhoPQ-зависимую активацию транскрипции, но не снижают репрессию. Предполагается, что система PhoPQ является ключевым переключателем уровней экспрессии множества связанных с вирулентностью генов, настроенных для контроля развития патосистемы *P. versatile* универсального растения-хозяина

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа 67 с., 20 мал., 6 табл., 81 крыніц.

Двухкампанентная сістэма PhoQ / PhoP, RNA-seq, *Pectobacterium versatile*, пектын, арабіноза, цытрат, вірулентнасць.

Аб'ект даследавання: двухкампанентная сістэма PhoQ/PhoP

Мэта: даследаваць ролю двухкампанентнай сістэмы PhoQ / PhoP у вірульнасці *P. versatile*, апісаць рэгулон PhoP, знайсці ліганды гістыдын кіназы PhoQ у *Pectobacterium versatile*.

Метады даследавання: RNA-seq, ПЛР, ПЛР у рэжыме рэальнага часу, кланіраванне, тэсты на вірулентнасць.

(раней *P. carotovorum*) - від энтрабактэрыі мягкай гнілі, здольны да інфекцыі мноства раслін і пашкоджання розных тканак. У настолькі ўніверсальнага патагена можна чакаць складаную транскрыпцыйную рэгуляцыю ўласцівасцяў вірулентнасці. Адапаведная інфармацыя даступна толькі па роднасных відах і ў вельмі абмежаванай колькасці. З дапамогай інсерцыйнага *phoP*-мутанта генаў, большасць з якіх спецыфічныя для пектабактэрыі. Функцыі, якія выконваюцца PhoP-падкантрольнымі генамі, уключаюць дэградацыю, транспарт і метабалізм крыніц вугляроду расліннага паходжання (полігалактуронат, арабіноза, поліцукрыды і цытрат), мадыфікацыю абалонкі бактэрыяльных клетак і ўстойлівасць да стрэсу. Таксама быў прадэманстраваны ўдзел PhoP ва ўсталяванні парадку распаду клеткавай сценкі раслін і ўтылізацыі адапаведных прадуктаў распаду. На падставе эксперыментальных дадзеных і аналізу *in silico* быў вызначаны матыў сайту звязвання PhoP, быў прадастаўлены доказ ягонай універсальнасці для кішэчных бактэрыі. Секвенаванне геному *P. versatile* на прадмет размяшчэння гэтага матыву дазволіла выказаць здагадку, што рэгулон PhoP значна большага памеру, што робіць PhoP глабальным рэгулятарам вірулентнасці. Патэнцыйныя мішэні PhoP уключаюць мноства рэгуляторных генаў, і кантроль PhoP над адным з іх, *expI*, быў пацверджаны эксперыментальна, што падкрэслівае сувязь паміж двухкампанентнай сістэмай PhoPQ і сістэмай пачуцця кворуму. Было высветлена, што высокія канцэнтрацыі іонаў кальцыю і магнію спыняюць PhoPQ-залежную актывацыю транскрыпцыі, але не зніжаюць рэпрэсію. Мяркуецца, што сістэма PhoPQ з'яўляецца ключавым рэгулятарам узроўняў экспрэсіі мноства звязаных з вірулентнасцю генаў, аптымізаваных для кантролю развіцця патасістэмы *Pectobacterium versatile* і расліны-гаспадара.

ABSTRACT

Thesis 68 p., 20 figures, 7 tables, 81 sources.

Two-component system PhoQ / PhoP, RNA-seq, *Pectobacterium versatile*, pectin, arabinose, citrate, virulence.

Research object: two-component system PhoQ / PhoP *Pectobacterium universal*.

Purpose: to investigate the role of the PhoQ / PhoP two-component system in *P. versatile* virulence, to describe the PhoP-regulon, to find ligands of histidine kinase PhoQ for the strain under study

Methods: RNA-seq, qRT-PCR, cloning, virulence tests

Pectobacterium versatile (formerly *P. carotovorum*) is a recently defined species of soft rot enterobacteria capable of infecting many plant hosts and damaging different tissues. Complex transcriptional regulation of virulence properties can be expected for such a versatile pathogen. However, the relevant information is available only for related species and is rather limited. The PhoPQ two-component system, originally described in pectobacteria as PehRS, was previously shown to regulate a single gene, *pehA*. Using an insertional *phoP* mutant of *Pectobacterium versatile* (earlier—*P. carotovorum*), it was demonstrated that PhoP regulates at least 115 genes with a majority of them specific for pectobacteria. The functions performed by PhoP-controlled genes include degradation, transport and metabolism of plant-derived carbon sources (polygalacturonate, arabinose-containing polysaccharides and citrate), modification of bacterial cell envelope and stress resistance. It also was demonstrated PhoP involvement in establishing the order of plant cell wall decomposition and utilisation of the corresponding breakdown products. Based on experimental data and *in silico* analysis, PhoP binding site motif was defined and proof was provided for its universality in enteric bacteria. Scanning *P. versatile* genome for the locations of this motif suggested a much larger PhoP regulon enriched with the genes important for a plant pathogen, which makes PhoP a global virulence regulator. Potential PhoP targets include many regulatory genes and PhoP control over one of them, *expI*, was confirmed experimentally, highlighting the link between the PhoPQ two-component and quorum sensing systems. High concentrations of calcium and magnesium ions were found to abolish the PhoPQ-dependent transcription activation but did not relieve repression. It is suggested that PhoPQ system is a key switch of expression levels of multiple virulence-related genes fine-tuned to control the development of *P. versatile*-host plant pathosystem.