

Сравнительный анализ регуляторной активности генов *luxR1/luxR2 lux*-оперона психрофильной люминесцирующей бактерии *Aliivibrio loeigi*.

С.В. Баженов^{1,2}, С.А. Хрульнова², И.Г. Халиуллин¹, М.Н. Коноплева¹, И.В. Манухов^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов

В последние годы внимание исследователей, работающих с микроорганизмами в различных областях биологии и медицины, было обращено на явление, получившее название Quorum Sensing (QS) – особый тип регуляции экспрессии генов бактерий, зависящей от плотности их популяции. QS системы включают низкомолекулярные сигнальные молекулы – аутоиндуктор (АИ), легко диффундирующие через клеточную стенку, и регуляторные рецепторные белки, с которыми связываются АИ. Благодаря QS регуляции бактерии получают возможность скоординированно контролировать экспрессию генов во всем сообществе.

Aliivibrio loeigi — вид морских психрофильных люминесцирующих бактерий [1]. Его близкими родственниками являются *Aliivibrio fischeri* (мезофильные) и *Aliivibrio salmonicida* (психрофильные). *Lux*-опероны всех трех видов регулируются QS системой, ключевыми компонентами которой являются LuxI, катализирующий синтез АИ, и LuxR, регулирующий транскрипцию всего оперона. *Lux*-опероны *A. loeigi* и *A. salmonicida* содержат две копии гена *luxR*: *luxR1* и *luxR2* (рис.1). У *A. fischeri* всего один ген *luxR*[2]. По построенному филогенетическому дереву хорошо видно, что гены *luxR*, *luxR1* и *luxR2* образуют три различных кластера (рис.2).

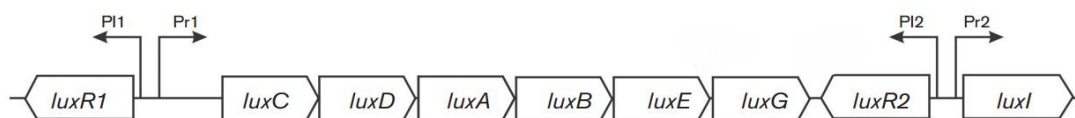


Рис. 1. Структура *lux*-оперона *A. loeigi*, включающая гены *luxR1* и *luxR2* с их регуляторными областями Pl1(2) и Pr1(2).

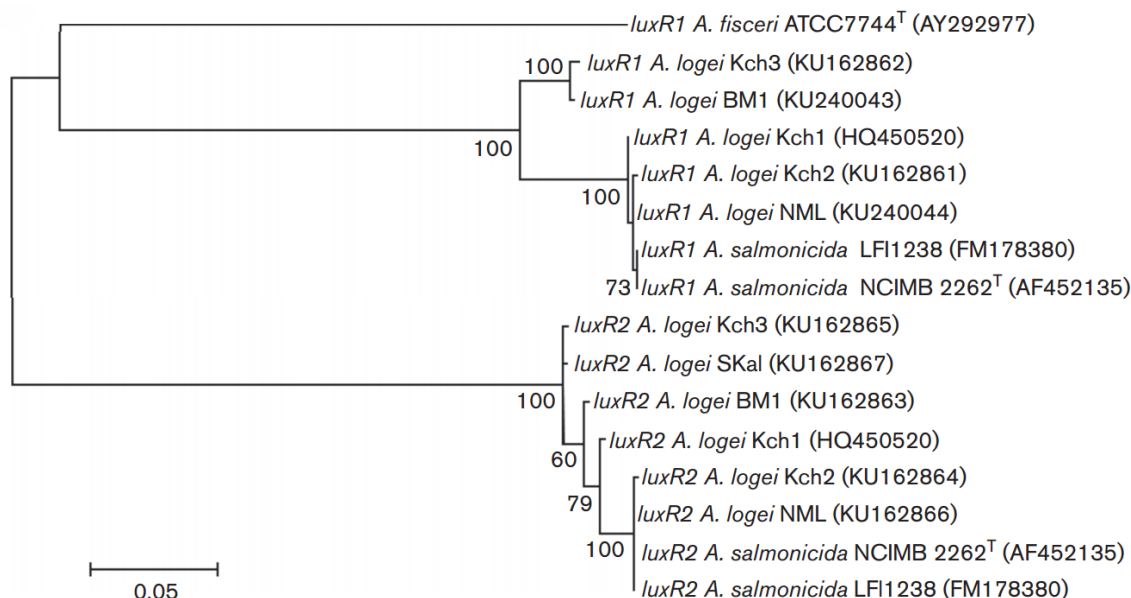


Рис. 2 Филогенетическое дерево, построенное на основе последовательностей *luxR1* и *luxR2*. Числа в узлах – вероятность объединения генов в данный кластер, длина линии отражает число замен в последовательностях генов.

Роль дупликации *luxR* в геноме психрофильных *A. logei* и *A. salmonicida* остается невыясненной. Можно предположить, что низкая температура окружающей среды требует увеличения дозы гена подобно тому, как это наблюдается у некоторых мезофильных видов. В противном случае дупликация *luxR* и последующее расхождение его копий может быть сформировано двумя различными факторами окружающей среды, что должно было привести к появлению различий в регуляторной активности LuxR1 и LuxR2. В данной работе проводилось сравнение относительной активности белков LuxR1 и LuxR2 и промоторов Pr1 и Pr2 *A. logei* в гетерогенной системе в клетках *Escherichia coli* при различных концентрациях АИ [3]. Для определения активности LuxR регуляторов использовались плазмиды pIVA и pSV16, содержащие гены *luxR1* и *luxR2*, соответственно, с их регуляторными областями (Pr1 и Pr2) транскрипционно слитыми с *Ph. luminescens luxCDABE* локусом. А также измерялась активность промоторов Pr1 и Pr2 в присутствии обоих регуляторных белков. Для этого дополнительно использовались совместимые с описанными ранее плазмиды pIV2 и pIV3, содержащие гены *luxR2* и *luxR1* под собственными промоторами.

Для определения активности промоторов измерялась зависимость биолюминесценции клеток *E. coli*, содержащих биосенсорную плазмиду pVFR, pSV16 или pIVA или комбинацию плазмид pSV16 + pIV2 или pIVA + pIV3, соответственно, от концентрации АИ (измерения проводились через 60 минут после добавления АИ в культуру клеток). На рис.3 представлен график зависимости активности промоторов Pr1 и Pr2 (сопряженных с *luxR1* и *luxR2*) и регулируемых как одним сопряженным геном, так и комбинацией генов *luxR A. logei* и аналогичной конструкции *A. fischeri* (Pr и *luxR*) от концентрации АИ. Из графика видно, что LuxR1-зависимый Pr1 оказался наименее чувствительным к АИ и был активен при его концентрациях 1мкМ и выше, в то время как для остальных двух биосенсоров пороговая концентрация составила 1нМ. LuxR1 не оказывает видимого влияния на активность промотора Pr2. И напротив, амплитуда ответа и чувствительность к АИ промотора Pr1 определяется преимущественно белком LuxR2, но даже в присутствии обоих регуляторных белков активность промотора Pr1 остается на 1-2 порядка ниже активности промотора Pr2.

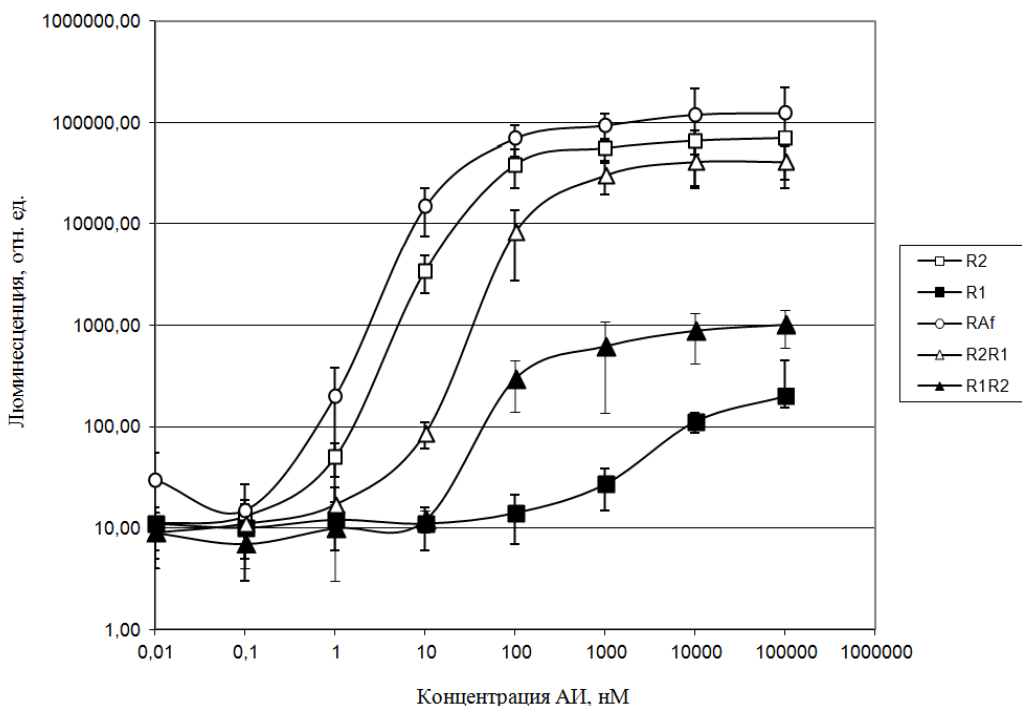


Рис. 3 Зависимость биолюминесценции клеток *E. coli* MG1655 с комбинациями плазмид (pSV16, pIV3) и (pIVA, pIV2) и плазмидами pSV16, pIVA и pVFR1, измеренного через час после добавления АИ, от концентрации добавленного АИ. R2 – pSV16; R1 – pIVA; R2R1 – pSV16+pIV3; R1R2 – pIVA+pIV2; RAf – pVFR1.

	<u>lux box</u>	-10	+1
AF luxR-luxI	AAGCAACCTGTAGGATCGTACAGGTTT-ACGCAAGAAAATGGTTTGT	TATAGT	CGAATAAAA
AL KCh1 luxR1-luxC	GATACTCTGTAAAGTTATACAGGTTT-ACCTAAATAATTACCCTGC	TATAGT	TTTCTAAA
AL BM1 luxR1-luxC	GATACTCTGTAAAGTTATACAGGTTT-ACCTAAATAATTACCCTGC	TATAGT	TTTCTAAA
AL KCh1 luxR2-luxI	TCATTCTGTAAATATGTACAGGTTATAAGGAGGAAAATTTGCCTGC	TATAGT	CAGTAAA
AL BM1 luxR2-luxI	TCATTCTGTAAATATGTACAGGTTATAAGGAGGAAAATTTGCCTGC	TATAGT	CAGTAAA

	RBS	Stop
AF luxR-luxI	CG--CAAGGGAGGTTGGTATG	ACTATAATGATAAAAAAATCGGATTTTTTTGGCAATTCCAT
AL KCh1 luxR1-luxC	ATA--AGGAAGCAGAGTGATG	ACAATG--ACTTAAAAAGTAGGTTATAAATATTCTCCATC
AL BM1 luxR1-luxC	ATA--AGGAAGCAGAGTGATG	ACAATG--ACTTAAAAAGTAGGTTATAAATATTCTCCATC
AL KCh1 luxR2-luxI	AGATTAAAGGGGTCAGGATG	ACAATAATGATAAGAAAATCCGAGTTTACTACTATTCCSTA
AL BM1 luxR2-luxI	AGATTAAAGGGGTCAGGATG	ACAATAATGATAAGAAAATCCGAGTTTACTACTATTCCSTA

Рис. 4. Последовательности регуляторных областей *lux*-оперонов штаммов *A. fischeri* (AF), *A. logei* (AL) KCh1 и *A. logei* (AL) B1.

Мы видим, что промотор Pr1 слабее промотора Pr2. Возможно, разница в силе промоторов определяется их *lux*-бок последовательностями, сайтами связывания LuxR с регуляторным участком ДНК. На рис.4 приведены последовательности фрагментов регуляторных участков для *A. fischeri* и двух видов *A. logei*. Самый полный палиндром принадлежит виду *A. fischeri*, обладающему самой высокой чувствительностью к АИ. В Pr2 палиндром состоит из 7 нуклеотидов, а в Pr1 из 6 нуклеотидов, что, видимо, обуславливает худшее связывание LuxR с Pr1.

В то же время из двух регуляторных белков за регуляцию в основном отвечает LuxR2, обладающий большей чувствительностью к АИ.

Литература

- [1] Bang, S. S., Baumann, P. & Nealson, K. H.. Phenotypic characterization of *Photobacterium logei* (sp. nov.), a species related to *P. fischeri* // *Microbiology* 1978. 1, 285–288.
- [2] Manukhov IV, Khrul'nova SA, Baranova A, Zavilgelsky GB. Comparative Analysis of the *lux* Operons in *Aliivibrio logei* KCh1 (a Kamchatka Isolate) and *Aliivibrio salmonicida* // *Journal of Bacteriology*. 2011;193(15):3998-4001. doi:10.1128/JB.05320-11.
- [3] Konopleva MN, Khrul'nova SA, Baranova A, Ekimov LV, Bazhenov SV, Goryanin II, Manukhov IV. A combination of *luxR1* and *luxR2* genes activates Pr-promoters of psychrophilic *Aliivibrio logei* *lux*-operon independently of chaperonin GroEL/ES and protease Lon at high concentrations of autoinducer. // *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 May 13; 473(4):1158-62.