

ОСОБЕННОСТИ quorum sensing СИСТЕМЫ SprIR  
*Serratia proteamaculans* 94 И ЕЕ УЧАСТИЕ В РЕГУЛЯЦИИ  
КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ

© 2021 г. Ю. В. Зайцева<sup>1,2</sup>, В. А. Липасова<sup>1</sup>, О. А. Кокшарова<sup>1,3</sup>, В. А. Плюта<sup>1</sup>,  
И. В. Демидюк<sup>1</sup>, Л. С. Чернин<sup>4</sup>, И. А. Хмель<sup>1</sup> \*

<sup>1</sup>Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра  
“Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

<sup>2</sup>Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Ярославль, 150003 Россия

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский  
государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119899 Россия

<sup>4</sup>Отдел патологии растений и микробиологии, Иерусалимский университет, Реховот, 76100 Израиль

\*e-mail: khmel@img.ras.ru

Поступила в редакцию 20.03.2020 г.

После доработки 19.05.2020 г.

Принята к публикации 09.06.2020 г.

Исследована регуляторная quorum sensing система SprIR психротрофного штамма *Serratia proteamaculans* 94. Сконструирован мутант с инактивированным геном *sprR*, кодирующим регуляторный рецепторный белок SprR. Показано, что инактивация этого гена влияла на состав жирных кислот, синтезируемых *S. proteamaculans* 94, и не влияла на синтез N-ацил-гомосеринлактонов (АГЛ), активности внеклеточных протеаз, хитиназ, гемолизина, на свимминг-миграцию клеток и подавление роста мицелия фитопатогенных грибов летучими соединениями, выделяемыми этим штаммом. Инактивация гена *sprI* (но не гена *sprR*) снижала образование биопленок, которое увеличивалось при внесении в культуру экзогенного АГЛ. Проведенный сравнительный протеомный анализ клеток исходного штамма и мутантов с инактивированными генами *sprI* и *sprR* показал, что экспрессия 30 белков *S. proteamaculans* 94 находится под влиянием quorum sensing системы SprIR.

**Ключевые слова:** quorum sensing, *Serratia proteamaculans*, биопленки, ферменты, жирные кислоты, протеомный анализ.

**DOI:** 10.31857/S0016675821020144

В последнее время растущее внимание исследователей привлекают quorum sensing (QS) системы регуляции экспрессии генов, участвующие в коммуникации бактерий и обеспечивающие скоординированный ответ популяций бактерий на внешние факторы. QS – это особый тип регуляции, функционирующий обычно при высоких плотностях бактериальных популяций. QS системы включают низкомолекулярные сигнальные молекулы различной химической природы, диффундирующие из клеток в культуральную среду, и рецепторные регуляторные белки, с которыми взаимодействуют сигнальные молекулы. QS системы функционируют как глобальные факторы регуляции, они играют важную роль в контроле большого количества клеточных процессов, относящихся к различным сторонам метаболизма бактерий: они участвуют во взаимодействии многих бактерий с высшими организмами, в регуляции вирулентности бактерий, регуляции экспрессии ге-

нов, связанных с синтезом различных экзоферментов, токсинов, антибиотиков и др. [1–7].

Больше всего исследованы QS системы LuxI/LuxR-типа грамотрицательных бактерий, использующие в качестве сигнальных молекул N-ацил-гомосеринлактоны (АГЛ). QS системы этого типа можно разделить на две группы в зависимости от функций и организации экспрессии QS генов.

Первая группа включает классическую QS систему *Vibrio fischeri*; у этой морской бактерии впервые был открыт феномен QS. В QS-регуляции *V. fischeri* участвуют два основных регуляторных компонента: белок LuxI – синтаза АГЛ (катализирует синтез АГЛ) и LuxR-белок – он образует димер, присоединяет АГЛ, в результате чего изменяется его конфигурация; затем этот комплекс, связываясь с промотором *lux*-оперона, активирует его транскрипцию, что приводит к синтезу люциферазы и эмиссии света. При увеличении популяции

*V. fischeri* АГЛ накапливаются до порогового уровня, который достаточен для активации LuxR, связывания его с промоторной областью *lux*-оперона и индукции этого оперона. Сходные QS системы были обнаружены в клетках различных видов псевдомонад, *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia* и др. [1, 3–7].

Вторая группа включает QS системы бактерий семейства Enterobacteriaceae (*Pantoea*, *Erwinia*, *Serratia* и др.). Регуляторные R-белки в QS системах этой группы функционируют главным образом как негативные регуляторы; они могут репрессировать транскрипцию своих собственных генов в отсутствие АГЛ.

Количество АГЛ увеличивается с увеличением плотности популяции бактерий по мере роста культуры. При достижении достаточно высокой концентрации АГЛ взаимодействует с белком LuxR-типа (например, с белком EsaR *P. stewartii*), при этом происходят изменения его конформации, препятствующие связыванию с ДНК, что приводит к депрессии [8–12].

Объектом нашего исследования была бактерия *Serratia proteamaculans* 94 [13]. QS системы бактерий этого вида изучены мало [11]. В предыдущей работе [14] мы показали, что штамм *S. proteamaculans* 94 синтезирует два главных типа сигнальных молекул АГЛ (N-3-оксо-гексаноил-L-гомосеринлактон и N-3-гидрокси-гексаноил-L-гомосеринлактон) и несколько минорных АГЛ. Гены *sprI* и *sprR* этой QS системы, кодирующие соответственно синтазу АГЛ и рецепторный регуляторный белок SprR, были клонированы и секвенированы. Было показано, что гены *sprI* и *sprR* транскрибировались конвергентно с частичным перекрыванием их рамок считывания. Изучение полученного нами мутанта с инактивированным QS геном *sprI* позволило определить роль этого гена в регуляции ряда клеточных процессов. Инактивация гена *sprI* приводила к отсутствию синтеза АГЛ, уменьшению внеклеточной протеолитической активности, отсутствию хитиноподобной активности, свимминг-миграции клеток (swimming motility), отсутствию или сильному снижению подавления роста мицелия фитопатогенных грибов летучими соединениями, выделяемыми штаммом 94, изменению состава клеточных жирных кислот, синтезируемых этим штаммом [14].

В штамме *S. proteamaculans* 94 нами была обнаружена также сигнальная молекула типа AI-2 и исследована функциональная роль гена *luxS*, ответственного за синтез AI-2. Инактивация этого гена приводила к действию, сходному с действием инактивации гена *sprI* на синтез экзоферментов, свимминг-миграцию клеток, и вызывала снижение или отсутствие ингибирования фитопатогенных грибов летучими веществами, выделяемыми *S. proteamaculans* 94 [15].

В настоящей работе был получен мутант с инактивированным геном *sprR* QS системы штамма *S. proteamaculans* 94, кодирующим рецепторный регуляторный белок SprR. Ранее мутации гена, кодирующего R-белок *S. proteamaculans*, не были получены, и информация о роли этого гена в контроле метаболизма *S. proteamaculans* отсутствует. В работе изучено влияние инактивации гена *sprR* на регуляцию клеточных процессов *S. proteamaculans* 94; исследовано действие инактивации генов *sprI* и *sprR* на образование биопленок этого штамма, проведен сравнительный протеомный анализ экспрессии белков исходного и мутантных штаммов. Полученные данные расширяют наше представление о диапазоне клеточных процессов, в регуляции которых участвуют гены QS системы *S. proteamaculans*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 1. Штаммы бактерий и условия культивирования

Штаммы бактерий, плазмиды и праймеры ПЦР, использованные в работе, приведены в табл. 1, 2. Бактерии выращивали на средах Luria Broth (LB), LA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) и M9 [16] с необходимыми добавками при температуре 28–30°C. Антибиотики отечественного производства использовали в концентрациях (мкг/мл): ампициллин, 100–200; канамицин, 100; гентамицин 40. Тетрациклин (Sigma) добавляли в среду в концентрации 20 мкг/мл.

### 2. Определение продукции АГЛ

Для определения продукции АГЛ использовали два биосенсора. Сенсор *Chromobacterium violaceum* CV026 высевали штрихами на поверхность среды LA, пересекали их штрихами тестируемых культур, инкубировали 24–48 ч при 30°C. В случае, когда штамм продуцировал АГЛ, наблюдали окрашивание индикаторного штамма CV026 в фиолетовый цвет. Интенсивность окраски оценивали визуально [17]. Второй биосенсор *Agrobacterium tumefaciens* NT1/pZLR4 выращивали на среде LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) и гентамицина в течение ночи при 30°C. Чашку с агаризованной средой M9 с добавленным X-Gal (конечная концентрация 80 мкг/мл) заливали 3 мл M9 с 0.5% агара с добавлением 0.5 мл ночной культуры *A. tumefaciens* NT1/pZLR4. Тестируемые на продукцию АГЛ штаммы высевали уколами на поверхность агаризованной среды после ее застывания или вносили жидкую ночную культуру в лунки в агаризованной среде и инкубировали при 30°C 24–48 ч. О синтезе АГЛ штаммами судили по появлению голубых зон гидролиза X-Gal [18].

**Таблица 1.** Штаммы бактерий и плазмиды, использованные в работе

Штаммы и плазмиды	Характеристика	Источник или ссылка
<b>Штаммы</b>		
<i>Serratia proteamaculans</i> 94	Выделен из испорченного в холодильнике мяса	[13]
<i>S. proteamaculans</i> 94 <i>rif</i> -г	Спонтанный мутант <i>rif</i> -г	[14]
<i>Escherichia coli</i> S17-1 ( $\lambda$ - <i>pir</i> )	<i>thi pro hsdR hsdM recA rpsL</i> RP4-2 (Tc <sup>r</sup> ::Mu) (Km <sup>r</sup> ::Tn7) ( $\lambda$ - <i>pir</i> )	Коллекция ИМГ РАН
<i>E. coli</i> TG-1	K-12 <i>supE thi-1</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) $\Delta$ ( <i>mcrB-hsdSM</i> )5, ( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>-</sup></i> ) F' [ <i>tra D36 proAB<sup>+</sup> lac<sup>f</sup> lac Z</i> DM15]	Stratagene
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	Биосенсор для определения АГЛ на основе продукции виолацеина, Km-г	[17]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1/pZLR4	pZLR4 <i>traG::lacZ</i> . Биосенсор для определения АГЛ на основе индукции синтеза $\beta$ -галактозидазы, Gm <sup>r</sup> Cb <sup>r</sup>	[18]
<i>S. proteamaculans</i> 94 <i>rif</i> -г <i>sprI</i> ::Gm	Мутант <i>sprI</i> ::Gm штамма 94 <i>rif</i> -г	[14]
<b>Плазмиды</b>		
p34S-Gm	Источник Gm <sup>r</sup> -кассеты	[21]
pEX18Tc	Вектор для замены генов, Tet <sup>r</sup> oriT <i>sacB</i>	[20]
pAL-TA	Вектор для клонирования продуктов ПЦР, Ap <sup>r</sup> ori pUC P <sub>lac</sub>	Eurogen

**Таблица 2.** Праймеры, использованные в работе

Праймер	Последовательность (5' → 3')
SprR-F	5'-GAGCCTGTATGTTTCCATC
SprR-R	5'-CAACTTCCGCCATCACCTG
GM-F	5'-GGCTCAAGTATGGGCATCATT
GM-R	5'-GGCGGTACTTGGGTCGATA
M13-F	5'-GTAAAACGACGGCCAGT
M13-R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC

### 3. Манипуляции с ДНК

Выделение суммарной и плазмидной ДНК, рестриктицию, агарозный гель-электрофорез, лигирование, трансформацию *E. coli* проводили согласно методикам, описанным в [19]. Реакцию ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей однократный буфер для Taq ДНК-полимеразы (НПО “СибЭнзим”), по 250 мкМ dGTP, dATP, dCTP и dTTP (НПО “СибЭнзим”), 10 пМ каждого праймера (ЗАО “Синтол”), 0.5 U Taq ДНК-полимеразы (ИМГ РАН). В качестве матрицы для ПЦР использовали плазмидные ДНК или прокипяченные клетки, взятые из свежесозревших колоний. Реакцию ПЦР-амплификации проводили на четырехканальном про-

граммируемом термостате TP4-ПЦР-01-“Терцик” (ЗАО “НПФ ДНК-Технология”).

### 4. Получение мутанта *S. proteamaculans* 94 с инактивированным геном *sprR*

Мутант с нокаутом гена *sprR* был получен методом замены генов с использованием *sacB*-стратегии [20]. Ранее для клонирования генов *sprI* и *sprR* и их секвенирования нами был клонирован фрагмент ДНК размером 1660 пн, содержащий оба гена, и была определена нуклеотидная последовательность этих генов (JX901285) [14]. Для получения клонированного гена *sprR* была проведена ПЦР-амплификация с праймерами для этого

гена – *SprR-F* и *SprR-R* (табл. 2). ПЦР проводили при 94°C 2 мин, затем 30 циклов при 94°C 20 с, 58°C 20 с, 72°C 40 с, и последняя стадия была при 72°C 4 мин. Продукты ПЦР были выделены из геля (использовали Wizard SV Gel kit и PCR Clean-Up System, Promega) и лигированы с *pAL-TA* векторной ДНК. Лигазная смесь была трансформирована в *E. coli* TG1. Клетки высевали на среду LA с добавлением 200 мкг/мл ампициллина, наличие *sprR* гена в отобранных клонах определяли методом ПЦР, используя универсальные праймеры M13. Сконструированная плазмида была названа *pAL-TA-sprR*.

Для конструирования *sprR::Gm* мутанта *Bam*HI-фрагмент ДНК размером 865 пн плазмиды *p34S-Gm* [21], несущий ген резистентности к гентамицину, был клонирован в *Bgl*II-сайт внутри гена *sprR* в *pAL-TA-sprR* плазмиде. Фрагмент ДНК 1700 пн из полученной плазмиды *pAL-TA-sprR::Gm* был клонирован в *Eco*RI-сайт вектора *pEX18Tc* [20], и сконструированная в результате плазмида *pEX18Tc-sprR::Gm* была трансформирована в *E. coli* S17-1 (*λ-pir*), который был использован как донор для передачи этой плазмиды в *S. proteamaculans* 94 *rif-r* штамм конъюгацией. Полученные клетки были посеяны на среду LA, содержащую *Gm*, *Rif* и 5% (wt/vol) сахарозы, после чего клоны, резистентные к гентамицину, рифампицину и сахарозе и чувствительные к тетрациклину, были тестированы с помощью ПЦР с праймерами *Gm-F*, *Gm-R* и праймерами *sprR-F* и *sprR-R*. В результате был получен мутантный штамм *S. proteamaculans* 94 *sprR::Gm*.

## 5. Анализ биопленок

Свежие культуры, выросшие на среде LA, высевали в LB с необходимыми антибиотиками и инкубировали при аэрации в течение 24 ч при температуре 30°C. Затем культуры разбавляли в 300 раз в LB без антибиотиков. Для измерения образования биопленок культуры выращивали в полистироловых планшетах 24 ч с перемешиванием на качалке при температуре 30°C. Образование биопленок измеряли после удаления среды, промывки ячеек водой и окрашивания прикрепленных клеток красителем кристаллический фиолетовый (1 г кристалвиолета, РЕАХИМ, Россия; 2 г кристаллического фенола; 90 мл дистиллированной воды; 10 мл 96%-ного этанола) в течение 45 мин при комнатной температуре. После окрашивания жидкость сливали, краситель из биопленок экстрагировали 96%-ным этанолом, оптическую плотность раствора измеряли при 595 нм. Для измерения уровня образованных биопленок использовали Model 2550 Microplate Reader (Bio-Rad, США). По интенсивности окрашивания раствора судили об уровне образования биопленок. Каждый

эксперимент повторяли три раза, при этом в каждом варианте культуру выращивали в 4–8 лунках.

## 6. Влияние *sprR::Gm* мутации на свойства клеток *S. proteamaculans* 94

### 6.1. Определение ферментативных активностей

Для определения активностей внеклеточных ферментов 3 мкл разведенной в 300 раз ночной культуры бактерий помещались на поверхность среды LA (1.5% агара) с необходимыми добавками. Эксперименты со всеми вариантами проводились 3 раза, с не менее чем тремя повторностями в каждом опыте [14].

**Определение внеклеточной протеазной активности.** Клетки штаммов высевали уколом на агаризованную среду LA с молоком (молоко с 0.5% жира составляло 1/3 часть от общего объема среды), инкубировали 24–48 ч при 30°C. В случае, когда штаммы обладали внеклеточной протеазной активностью, вокруг колоний наблюдали зоны ферментативного гидролиза казеина молока (зоны просветления). О ферментативной активности судили по радиусу зон гидролиза.

**Определение липазной активности.** Клетки тестируемых штаммов высевали уколом на среду LA с добавлением Tween-20 (1%) и CaCl<sub>2</sub> (0.01%). Инкубировали 48 ч при 30°C. В случае, когда штаммы обладали липазной активностью, вокруг колоний наблюдали мутные зоны (Tween-20 гидролизолся с образованием лауриновой кислоты, что приводило к образованию в присутствии кальция нерастворимой соли этой кислоты). О ферментативной активности судили по радиусу непрозрачных зон вокруг колоний и степени помутнения среды в пределах непрозрачной зоны.

**Определение хитинолитической активности.** Тестируемые штаммы высевали уколом на агаризованную среду (1.5% агара) следующего состава: 0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.03% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.08% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.04% KNO<sub>3</sub>, 0.05% дрожжевой экстракт (Difco); в среду добавляли 0.2% коллоидного хитина. Инкубировали 72–96 ч при 30°C. В случае, когда штаммы обладали хитинолитической активностью, около колоний наблюдали зоны ферментативного гидролиза (зоны просветления). О ферментативной активности судили по радиусу зон.

**Определение гемолитической активности.** Клетки тестируемых штаммов высевали уколом на кровяной агар (среда LA с добавлением 5% стерильной крови человека), инкубировали 3–7 суток при 28°C. О гемолитической активности судили по прозрачным зонам гемолиза вокруг колоний.

### 6.2. Определение действия летучих соединений, выделяемых *S. proteamaculans* 94

Ранее мы показали, что *S. proteamaculans* 94 синтезирует летучие вещества (ЛВ), в том числе органические летучие вещества, из которых в наибольшем количестве штамм продуцировал диметилдисульфид (ДМДС). Было показано, что общий пул летучих соединений, выделяемых этим штаммом, и индивидуально ДМДС подавляют рост агробактерий, фитопатогенных грибов, нематод и дрозифил [22]. Для определения влияния инактивации гена *sprR* на действие ЛВ на грибы были использованы чашки Петри, разделенные на две части перегородками, которые не прилегали к крышке, оставалось свободное пространство для обмена воздухом. Одну половину чашки засеивали *S. proteamaculans* 94 или мутантом *sprR::Gm* на среде LA (20 мкл ночной культуры, выросшей в ЛВ и содержащей  $\sim 4-6 \times 10^7$  клеток распределялись микробиологической петлей по поверхности LA). Чашки инкубировали 24 ч при 28°C. После этого на вторую половину чашки помещали блок с мицелием гриба. Блоки грибов диаметром 8 мм вырезали из агаризованной среды Чапека на чашках Петри, засеянных грибами в виде спор петлей с культуры гриба, после роста в течение пяти суток при 25°C. Чашки плотно герметизировали парафильмом (4 раза) ("Parafilm M" Sealing Film (Pechiney Plastic Packaging Company, Chicago, IL, США)). Рост грибов анализировали через 3–6 дней при 25°C [22].

### 6.3. Анализ состава жирных кислот

Ночные культуры бактерий разводили до  $OD_{600} \sim 0.10$ , и клетки росли в течение 20 ч при 30°C. Пробы сухой биомассы клеток (5 мг) обрабатывали в 0.4 мл 1.2 N хлористого водорода в метаноле при 80°C в течение одного часа (кислый метанолиз). Образовавшиеся метиловые эфиры жирных кислот экстрагировали дважды гексаном. Далее проводили газовую хроматографию и масс-спектрометрию. Параметры хроматографии выбирали как рекомендовано в Microbial Identification System (MIS) [23, 24] с Hewlett-Packard 5890A газовым хроматографом и Hewlett-Packard 7673A автоматическим сэмплером. Хромато-масс-спектрометрический анализ (GS-MS) проводили на хромато-масс-спектрометре AT-5975 Agilent Technologies (США). Для хроматографического разделения пробы использовали капиллярную колонку HP-5ms. Хроматографирование проводили в режиме программирования температуры от 135 до 320°C со скоростью 7 град/мин. Обработку данных проводили с помощью штатных программ прибора. Вещества в хроматографических пиках идентифицировали с помощью библиотечных программ с базой данных масс-спектров NIST.

### 7. Протеомный анализ

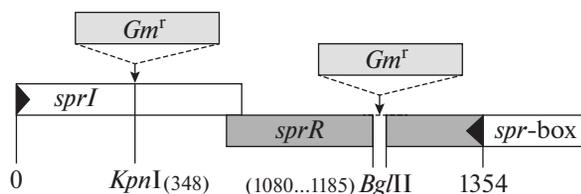
Сравнительный протеомный анализ в клетках *S. proteamaculans* 94 и двух мутантных штаммов был проведен в НИИ биомедицинской химии РАМН им. Ореховича, Москва.

**Экстракция и разделение белков.** Культуры бактерий выращивали при 30°C в течение 17 ч. Клетки осаждали центрифугированием при 10000 об./мин 5 мин, при 4°C, отмывали 3 раза стандартным фосфатным буфером (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.1 mM  $Na_2HPO_4$ , 1.8 mM  $KH_2PO_4$ , pH 7.4), затем центрифугировали. Супернатант удаляли, а осадок замораживали и хранили при  $-80^\circ C$ . Для экстракции белков осадки бактериальных клеток ресуспендировали в буфере, содержащем 7 M мочевины, 2 M тио-мочевины, 2% CHAPS, 0.5% Triton X100, 20 mM Tris-base, 2 mM  $MgCl_2$ , 5 mM PMSF, 65 mM DTT и 1 mM  $Na_2EDTA$ , и подвергали обработке ультразвуком. Для каждого образца с целью оценки качества экстракции белков проводился аналитический одномерный, а затем двумерный электрофорез при использовании программного обеспечения Quantity One software (BioRad, США). Стандартное нанесение составляло около 150 мкг на 24 см геля.

**Двумерный (2-D) электрофорез.** Для проведения электрофореза в первом направлении осуществляли гидратацию 24 см полосок (IPG Strips) с нанесенным на них гелем с pH 3–10 (Agilent, США) в буфере, содержащем 7 M мочевины, 2 M тиомочевины, 4% CHAPS, 65 mM DTT, 1.25% амфолитов 3-10 (Agilent) в течение ночи. Образцы в этом же буфере наносили на стрипы и проводили форез в первом направлении при 80 кВ на приборе Agilent Technologies 3100 Offgel Fractionator (Agilent). Второе направление электрофореза (SDS-PAGE) осуществлялось в 12%-ном полиакриламидном геле. Буфер для электрофореза содержал: Трис, 25 mM; глицин, 192 mM; SDS, 0.1%. После фиксации геля в растворе, содержащем 10% уксусной кислоты и 20% этанола, проводили его окрашивание нитратом серебра [25].

**Анализ изображений 2-D гелей.** Окрашенные гели сканировали на сканере Bio-Rad GS-800 Calibrated Densitometer. Интенсивность окрашивания белковых пятен сравнивали, используя программное обеспечение Melanie III. Пятна, различавшиеся между образцами по крайней мере в 1.5 раза по интенсивности окрашивания (представлено в процентах), вырезали из геля и анализировали с помощью MALDI-TOF.

**Времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS анализ) и идентификация белков.** Обработка вырезанных из геля окрашенных серебром белковых пятен осуществлялась по методу Shevchenko et al. [26]. Масс-спектры регистрировали с использованием масс-спектрометра Ultraflex MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonics,



**Рис. 1.** Локализация мутаций *sprR*::*Gm* и *sprI*::*Gm* у *S. proteamaculans* 94. Стрелками обозначено направление транскрипции генов.

Германия), снабженного азотным ( $N_2$ ) лазером (О-350 нм). Список пиков пептидов был создан в программном обеспечении Flex Analysis 2.4 (Bruker Daltonics). Идентификация белка в соответствии с содержимым пептида проводилась с использованием программного обеспечения Mascot 2.3 (Matrix Science, США), соответствующего базе данных NCBI для таксонов Eubacteria.

Результаты, полученные в трех независимых экспериментах, были выражены в виде среднего значения с учетом среднеквадратичного отклонения (SD) и рассчитаны с помощью программного обеспечения GraphPad PRISM 5.0 (GraphPad Software Inc.).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### 1. Получение мутанта *S. proteamaculans* 94 с инактивированным геном *sprR*

Для изучения особенностей функционирования SprI/SprR QS системы *S. proteamaculans* 94 нами ранее был получен мутант с инактивированным геном *sprI* [14]. В настоящей работе мы получили методом замены гена мутант *sprR*::*Gm* с нокаутом второго гена SprI/SprR QS системы этой бактерии, кодирующего рецепторный регуляторный белок SprR. Мутация стабильно сохранялась в клетках *S. proteamaculans* 94, поддерживаемых на среде с гентамицином (40 мкг/мл). Анализ синтеза АГЛ, проведенный с двумя биосенсорами в чашках Петри на среде LA, показал, что мутантный штамм активно продуцирует АГЛ. Локализация мутаций *sprR*::*Gm* и *sprI*::*Gm* показана на рис. 1.

### 2. Влияние QS системы SprI/SprR на формирование биопленок у *S. proteamaculans* 94

В регуляции формирования биопленок различными бактериями важную роль играют QS системы регуляции экспрессии генов [12, 27, 28]. Для представителей вида *S. proteamaculans* вопрос о взаимодействии QS систем с образованием биопленок не исследовался.

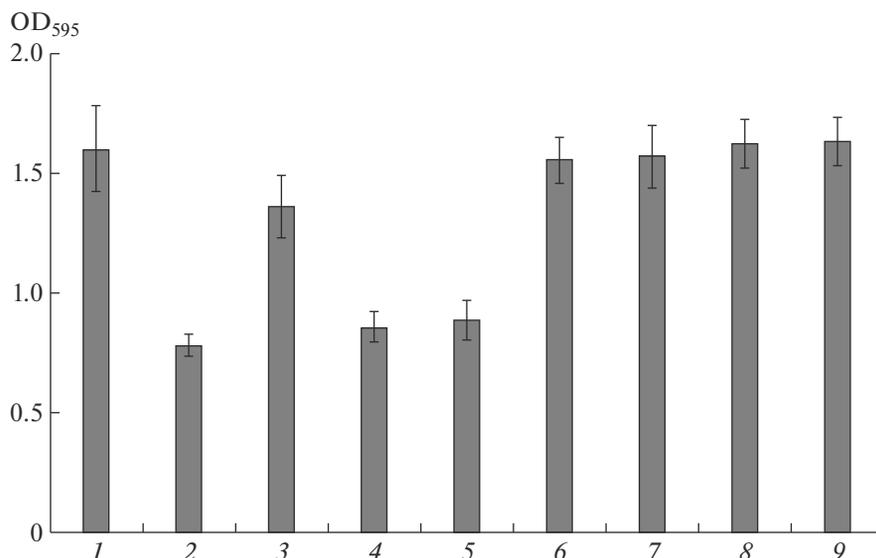
При исследовании влияния инактивации генов *sprI* и *sprR* на регуляцию образования биопленок у *S. proteamaculans* 94 было показано, что му-

тация в гене *sprR* не оказывала влияния на уровень образования биопленок (рис. 2). Как было отмечено выше, эта мутация не влияла на синтез АГЛ. Напротив, в мутантном по гену *sprI* штамме 94 образование биопленок снижалось вдвое по сравнению с уровнем биопленок в исходном штамме. Ранее мы показали, что клетки этого мутанта не продуцировали АГЛ [14]. Добавление экзогенного 3-оксо-С6-ГЛ, одного из двух доминантных АГЛ, синтезируемых штаммом *S. proteamaculans* 94 дикого типа [14], восстанавливало способность мутанта к формированию биопленки практически до уровня исходного штамма. Добавление других видов АГЛ, синтезируемых клетками *S. proteamaculans* 94 в значительно меньшем количестве (С4-ГЛ, С6-ГЛ), не давало подобного эффекта (рис. 2). Полученные результаты показывают зависимость образования биопленок у *S. proteamaculans* 94 от синтеза АГЛ; существенную роль в контроле формирования биопленок играет 3-оксо-С6-ГЛ.

Эффект мутации в гене *sprI* на формирование биопленок у *S. proteamaculans* 94 проявлялся также при проведении опытов в стеклянных пробирках на среде LB. У исходного штамма *S. proteamaculans* 94 и мутанта *sprR*::*Gm* на стенках пробирок было заметно образование рыхлых биопленок, в то время как биопленки у мутанта *S. proteamaculans sprI*::*Gm* на стенках пробирок не образовывались (рис. 3). Мутация в гене *sprI* изменяла также характер роста *S. proteamaculans* 94 в жидкой среде. Для штаммов дикого типа и мутанта по гену *sprR* было характерно образование многоклеточных агрегатов и формирование осадка, а для мутанта *S. proteamaculans* 94 по гену *sprI* был характерен диффузный планктонный рост с равномерным помутнением среды.

### 3. Изучение влияния мутации *sprR*::*Gm* на активность экзоферментов, синтезируемых *S. proteamaculans* 94

Известно, что QS системы являются глобальными регуляторами экспрессии генов бактерий. Поэтому нас интересовала роль QS в регуляции клеточных процессов, относящихся к различным сторонам метаболизма *S. proteamaculans* 94. Было исследовано, как влияет нокаут гена QS системы *sprR* на активность некоторых внеклеточных ферментов. Мы показали, что протеазная активность у мутантного штамма *sprR*::*Gm* практически не отличалась от активности исходного штамма, в отличие от активности этого фермента у штамма с мутацией *sprI*::*Gm*, где протеолитическая активность была снижена [14]. Мутант *sprR*::*Gm* не отличался по хитинолитической активности от исходного штамма, в то время как у мутантного штамма *sprI*::*Gm* хитинолитическая активность отсутствовала. Липазная и гемолитическая ак-



**Рис. 2.** Образование биопленок исходным штаммом *S. proteamaculans* 94 (1), мутантным штаммом *sprI::Gm* (2), мутантным штаммом *sprI::Gm* с добавлением: 3-оксо-С6-ГЛ (3), С6-ГЛ (4), С4-ГЛ (5); мутантным штаммом *sprR::Gm* (6), мутантным штаммом *sprR::Gm* с добавлением: 3-оксо-С6-ГЛ (7), С6-ГЛ (8), С4-ГЛ (9). Все АГЛ добавляли в конечной концентрации 25 нМ.

тивности клеток мутантов *sprR::Gm* и *sprI::Gm* не отличались от активности исходного штамма *S. proteamaculans* 94 (данные не приводятся).

#### 4. Действие летучих соединений, выделяемых *S. proteamaculans* 94 и *sprR::Gm* мутантом, на фитопатогенные грибы

Мы сравнили действие общего пула летучих соединений, выделяемых *S. proteamaculans* 94 и *sprR::Gm* мутантом, на рост мицелия двух фитопатогенных грибов – *Rhizoctonia solani* и *Helminthosporium sativum*. По данным проведенных экспериментов, мутант *sprR::Gm* подавляет рост мицелия гриба и обладает ингибирующим действием, сходным с действием *S. proteamaculans* 94, т.е. мутация *sprR::Gm*, по-видимому, не затрагивала гены, ответственные за регуляцию синтеза летучих соединений (данные не приводятся).

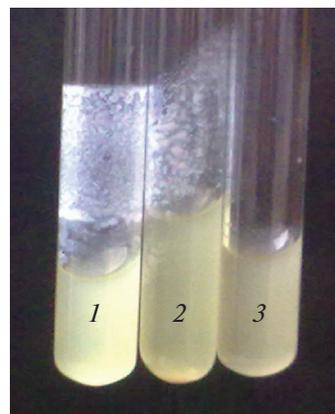
#### 5. Анализ состава бактериальных жирных кислот (ЖК)

Методом хромато-масс-спектрометрии было проведено сравнение состава жирных кислот у штамма *S. proteamaculans* 94 дикого типа и мутантного штамма *S. proteamaculans sprR::Gm* (табл. 3). В образцах исследуемых штаммов были обнаружены насыщенные, ненасыщенные и гидроксикислоты. Всего в спектрах были идентифицированы 22 жирные кислоты с длиной цепи от 12 до 20 атомов углерода.

В спектре штамма дикого типа *S. proteamaculans* 94 идентифицировано 19 жирных кислот. Ос-

новными насыщенными кислотами являлись гексадекановая, октадекановая и тетрадекановая. Доминирующими ненасыщенными кислотами были 9-октадеценная, 11-октадеценная и 9-гексадеценная. Коэффициент ненасыщенности жирных кислот, определенный как отношение  $\sum$ ненасыщенных ЖК/ $\sum$ насыщенных ЖК, у штамма *S. proteamaculans* 94 был 0.83.

Состав жирных кислот мутанта *sprR::Gm* существенно отличался от состава жирных кислот родительского штамма *S. proteamaculans* 94 (см., например, № 10, 14, 16, 17, 18). Мутация в этом гене могла приводить как к снижению, так и к увеличению относительного содержания жирных



**Рис. 3.** Образование биопленок на стенках стеклянных пробирок. 1 – *S. proteamaculans* 94, 2 – мутантный штамм *sprR::Gm*, 3 – мутантный штамм *sprI::Gm*.

**Таблица 3.** Состав жирных кислот в штаммах *S. proteamaculans* 94 (А) и мутанте *S. proteamaculans sprR::Gm* (В)

№	R.T.	Жирная кислота	Содержание жирных кислот, % от суммы площадей всех хроматографических пиков	
			А	В
1	6.983	Додекановая	0.5 ± 0.1	0.9 ± 0.1
2	9.495	9-Тетрадеценная	0	0.4 ± 0.0
3	9.578	11-Тетрадеценная	0	0.6 ± 0.1
4	9.873	Тетрадекановая	2.7 ± 0.3	5.5 ± 0.2
5	10.120	2-Гидрокси-додекановая	0	0.7 ± 0.1
6	11.305	Пентадекановая	0.6 ± 0.1	1.3 ± 0.3
7	12.379	7-Гексадеценная	0.4 ± 0.1	0
8	12.449	9-Гексадеценная	3.4 ± 1.2	20.7 ± 0.8
9	12.797	Гексадекановая	37.2 ± 1.7	36.1 ± 1.6
10	12.839	3-Гидрокси-тетрадекановая	0.6 ± 0.1	8.8 ± 0.5
11	13.570	Изо-гептадекановая	0.2 ± 0.1	0
12	13.694	Антеизо-гептадекановая	0.3 ± 0.1	0
13	13.764	Гептадеценная	0.2 ± 0.0	0
14	13.888	Циклопропан-гептадекановая	0.2 ± 0.1	10.2 ± 0.4
15	14.071	Гептадекановая	0.8 ± 0.1	1.9 ± 0.2
16	15.144	9-Октадеценная	33.2 ± 1.3	8.2 ± 0.5
17	15.186	11-Октадеценная	4.6 ± 0.2	0.4 ± 0.1
18	15.427	Октадекановая	11.0 ± 0.3	3.4 ± 0.2
19	16.170	Октадекадиеновая, конъюгированная	1.3 ± 0.1	0.9 ± 0.2
20	17.556	9-Эйкозеновая	1.5 ± 0.2	0
21	17.597	11-Эйкозеновая	0.9 ± 0.2	0
22	17.845	Эйкозановая	0.5 ± 0.1	0
Коэффициент ненасыщенности жирных кислот			0.83	0.45

Примечание. Приведены средние данные ± стандартная девиация (SD) из анализа двух независимо растущих культур каждого варианта. R.T. – retention time.

кислот. Содержание жирных кислот мутанта характеризовалось более низким коэффициентом ненасыщенности, сравнительно с исходным штаммом (0.45). Спектр жирных кислот мутанта *sprR::Gm* отличался от спектра исходного штамма 94 дикого типа резко увеличенным содержанием циклопропан-гептадекановой и 3-гидрокси-тетрадекановой кислот (в 50- и 15 раз соответственно). Несколько жирных кислот (7, 11–13, 20–22) отсутствовали у мутантного штамма, сравнительно с *S. proteamaculans* 94. Три жирные кислоты (2, 3, 5), отсутствовавшие у штамма 94, были обнаружены у мутантного штамма в количестве меньше 1%. Данные, приведенные выше, показывают, таким образом, что инактивация гена *sprR* *S. proteamaculans* 94 значительно влияла на состав жирных кислот бактерии.

#### 6. Сравнение протеомных карт культур *S. proteamaculans* 94 и мутантов *sprI::Gm* и *sprR::Gm*

Для характеристики полученных мутантов использовали метод протеомного анализа синтезируемых ими белков, сравнительно с белками исходного штамма. Более чем 600 белковых пятен выявилось на каждом из 2-Д гелей, среди которых 30 белковых пятен отличались по интенсивности окрашивания, отражающей существенные количественные изменения в протеомах бактерий дикого типа и мутантов (в 1.5 и более раз).

В случае мутанта *sprI::Gm* экспрессия 20 белков изменялась по сравнению со штаммом дикого типа: экспрессия 11 белков значительно усиливалась, в то время как экспрессия 9 белков снижалась. В случае мутанта *S. proteamaculans sprR::Gm* экспрессия 14 белков изменялась по сравнению со штаммом ди-

**Таблица 4.** Белковые пятна, демонстрирующие статистически достоверные отличия, и их относительные интенсивности

№	%V		№	%V	
	<i>S. prot.</i> 94	<i>sprI::Gm</i>		<i>S. prot.</i> 94	<i>sprR::Gm</i>
175	0.15 ± 0.00	0.09 ± 0.02	64	0.03 ± 0.00	0
187	0.37 ± 0.01	0.23 ± 0.02	131	0.11 ± 0.01	0.06 ± 0.00
<b>195</b>	<b>1.00 ± 0.11</b>	<b>0.36 ± 0.17</b>	142	0.41 ± 0.06	0.18 ± 0.02
232	0.15 ± 0.01	0.08 ± 0.00	187	0.37 ± 0.01	0.15 ± 0.05
304	0.06 ± 0.00	0	<b>190</b>	<b>0.31 ± 0.00</b>	<b>0.06 ± 0.01</b>
<b>477</b>	<b>0.59 ± 0.07</b>	<b>1.05 ± 0.07</b>	<b>195</b>	<b>1.00 ± 0.11</b>	<b>0.09 ± 0.02</b>
487	0.14 ± 0.01	0.24 ± 0.02	237	0.08 ± 0.01	0
495	0.46 ± 0.08	0.69 ± 0.02	376	0.06 ± 0.00	0
524	0.14 ± 0.00	0.22 ± 0.01	391	0.04 ± 0.01	0
<b>540</b>	<b>0.31 ± 0.08</b>	<b>0.69 ± 0.06</b>	<b>406</b>	<b>0.20 ± 0.01</b>	<b>0.09 ± 0.01</b>
546	0.07 ± 0.01	0.17 ± 0.01	408	0.14 ± 0.03	0
560	0.11 ± 0.03	0	<b>447</b>	<b>0.03 ± 0.01</b>	<b>0.94 ± 0.16</b>
595	0.15 ± 0.01	0.43 ± 0.01	<b>596</b>	<b>0</b>	<b>1.77 ± 0.41</b>
<b>596</b>	<b>0</b>	<b>1.97 ± 0.11</b>	635	0.04 ± 0.01	0
610	0.11 ± 0.00	0.23 ± 0.02			
<b>617</b>	<b>0.26 ± 0.01</b>	<b>0.54 ± 0.04</b>			
<b>619</b>	<b>0.30 ± 0.05</b>	<b>1.16 ± 0.27</b>			
621	0.31 ± 0.02	0.08 ± 0.02			
631	0.14 ± 0.03	0			
642	0.61 ± 0.07	0.05 ± 0.07			

Примечание. Растворимые белки из клеток *S. proteamaculans* 94 и двух мутантов (*sprI::Gm* и *sprR::Gm*) были проанализированы путем разделения на двумерных гелях (2-Д гелях); в первом направлении – по суммарному заряду белков в диапазоне pI 4–7, во втором направлении – по относительной молекулярной массе в районе 75–10 кДа. Каждый штамм представлен тремя независимыми биологическими повторностями. Всего было проанализировано девять гелей (по три для каждого образца). Полужирным шрифтом выделены белки, которые удалось идентифицировать. Значение 0 соответствует отсутствию пятна в данных координатах на геле.

кого типа: экспрессия двух белков заметно усиливалась, а экспрессия 12 белков снижалась (табл. 4).

Выявленные по разнице в интенсивности белковые пятна были проанализированы при помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии. В итоге удалось успешно идентифицировать восемь белков (табл. 5). В обоих мутантах наблюдался повышенный уровень экспрессии белков, связанных с устойчивостью штаммов к антибиотикам. Наличие аминогликозид-(3)-N-ацетилтрансферазы (596) в мутантных штаммах, которая отсутствует в штамме дикого типа, определяет их устойчивость к гентамицину. Аминогликозид-(3)-N-ацетилтрансфераза кодируется геном *accC1*, который несет ген-

тамициновая кассета из *p34S-Gm* [21], использованная при получении мутантов. У мутанта *sprR::Gm* была значительно повышена экспрессия β-лактамазы (447). В обоих мутантах наблюдалось значительное снижение экспрессии ФМН-редуктазы (195). У мутанта *sprI::Gm* наблюдалось усиление экспрессии белков, участвующих в защите клеток от стрессов (619, 617, 540). У мутантного штамма *sprR::Gm* происходило снижение уровня экспрессии сукцинил-СоА-синтетазы. Таким образом, мутации в генах, продукты которых были вовлечены в QS-регуляцию, приводили к изменению экспрессии белков, существенных для метаболизма клеток *S. proteamaculans*.

Таблица 5. Белки, идентифицированные в *S. proteamaculans* 94

№	Название белка	Предполагаемые М.в./рI	Номер в базе данных NCBI
Цикл трикарбоновых кислот			
406	Сукцинил-СоА-синтетаза ( $\alpha$ -субъединица)	29.8/5.9	157369513
190	Сукцинил-СоА-синтетаза ( $\beta$ -субъединица)	41.3/5.3	157369512
Окислительно-восстановительные реакции			
195	ФМН-редуктаза	26.2/5.0	157368508
Белки общего ответа на стресс			
540	Белок теплового шока GrpE	21.4/4.9	157371919
Защита от окислительного стресса			
619	Тиоредоксин 2	15.6/4.9	157371981
617	Тиоредоксин-зависимая тиолпероксидаза	17.3/5.0	157371748
Устойчивость к антибиотикам			
596	Аминогликозид-(3)-N-ацетилтрансфераза	19.4/5.8	239721
447	$\beta$ -Лактамаза	31.7/5.7	46129905

## ОБСУЖДЕНИЕ

Феномен QS-регуляции вызывает в настоящее время большой интерес исследователей, работающих в различных фундаментальных и прикладных областях биологии, медицины и биотехнологии. Показано, что этот тип регуляции широко распространен у бактерий различных таксономических групп.

Настоящая работа посвящена изучению QS систем грамотрицательных бактерий *Serratia proteamaculans*. Нас интересовало изучение роли QS систем в регуляции ряда метаболических процессов, существенных для жизнедеятельности этих бактерий. Бактерии этого вида характеризуются приспособленностью к обитанию в различных экологических нишах – они используют различные субстраты для питания, живут в почве, в ризосфере растений, участвуют в порче сельскохозяйственных продуктов [11, 13, 29]. QS системы у бактерий *S. proteamaculans* изучены мало, до наших работ [14, 15] имелась только одна статья с достаточно изученной системой QS-регуляции *S. proteamaculans* [11]. В качестве модельного объекта нами был выбран штамм *S. proteamaculans* 94, выделенный из мяса, испортившегося в холодильной камере мясокомбината. Штамм способен гидролизовать коллаген при низкой температуре и является продуцентом нескольких внеклеточных протеиназ [13].

В настоящей работе мы показали, что синтез АГЛ у *S. proteamaculans* 94 не зависит от белка SprR. Организация генов SprI/SprR системы была конвергентной [14]. Ранее было показано, что у бактерий с конвергентной организацией QS генов экспрессия гена синтазы *luxI*-типа, как правило, не зависит от R-белка [8–10, 12]. Это отличается от основной концепции QS-регуляции, где необходима активация АГЛ белка LuxR для экспрессии гена синтазы АГЛ (в случае классической QS системы *Vibrio fischeri*). Анализ нуклеотидной последовательности промоторной области перед геном *sprI* не выявил регуляторного элемента типа *lux*-бокс [14], с которым в системе *V. fischeri* связывается комплекс белка LuxR с АГЛ, что приводит к дальнейшей активации транскрипции *lux*-оперона. Таким образом, приведенные выше данные показывают, что аутоиндукция синтеза АГЛ, наблюдаемая у *V. fischeri*, не характерна для исследуемого штамма *S. proteamaculans* 94. Как мы показали в предыдущей работе, в промоторном районе гена *sprR* присутствует гомолог *lux*-бокса, *spr*-бокс, который перекрывается с –10 сайтом в этом промоторе. Поэтому связывание белка SprR с *spr*-боксом может ингибировать транскрипцию *sprR* гена, мешая связыванию РНК-полимеразы. Такая закономерность была показана для регуляции транскрипции некоторых белков R-типа у *Serratia* и *Pantoea* [14]. Полученные данные показывают сходство регуляторной SprI/SprR QS системы

*S. proteamaculans* 94 с QS системами других бактерий семейства Enterobacteriaceae.

В настоящей работе была изучена роль QS систем в регуляции клеточных процессов, относящихся к различным сторонам метаболизма *S. proteamaculans* 94. Энтеробактерии рода *Serratia* являются продуцентами большого количества внеклеточных ферментов, используя их для утилизации высокомолекулярных соединений окружающей среды и в качестве факторов вирулентности при инвазии и колонизации других организмов. Мы исследовали влияние мутаций в генах QS системы *S. proteamaculans* 94 на синтез протеаз, липаз, хитиназ и гемолизина. В предыдущей работе было показано, что инактивация гена *sprI* приводила к снижению экзопротеазной, хитинолитической активностей и не вызывала изменения липазной и гемолитической активностей [14]. Мутация в гене *sprR* не оказывала заметного влияния на изученные ферментативные активности.

Представляло интерес исследовать влияние мутаций в QS генах *sprI* и *sprR* на регуляцию образования биопленок у *S. proteamaculans* 94 – процесс, который у многих бактерий зависит от QS-регуляции [12, 27, 28]. Было показано, что мутация в гене *sprR* не оказывала влияния на уровень образования биопленок. В мутантном по гену *sprI* штамме образование биопленок снижалось вдвое по сравнению с уровнем биопленок в исходном штамме. При этом добавление экзогенного 3-оксо-С6-АГЛ (доминирующий тип АГЛ у *S. proteamaculans* 94) восстанавливало способность к формированию биопленки практически до уровня штамма дикого типа. Полученные результаты показывают, что образование биопленок у *S. proteamaculans* 94 регулируется позитивно 3-оксо-С6-ГЛ-зависимой QS системой. Эти данные согласуются с результатами аналогичных исследований *S. liquefaciens* и *S. marcescens* [28, 30]. По данным этих авторов, у АГЛ-дефицитных мутантов способность формировать биопленки снижалась по сравнению со штаммом дикого типа.

Интересно, что у другого исследованного нами вида *Serratia* – *S. plymuthica* (штамм HRO-C48) инактивация гена синтазы АГЛ *splI* вызывала увеличение уровня образованных биопленок в 2–2.5 раза, а введение в клетки этого мутанта плазмиды с клонированными генами *splI/splR* снижало формирование биопленок до нормального уровня. В этом случае формирование биопленок у *S. plymuthica* регулировалось негативно SplIR QS системой. У другого штамма этого вида, *S. plymuthica* IC1270, QS система SplIR также оказывала негативное влияние на образование биопленок.

Введение в клетки *S. plymuthica* IC1270 рекомбинантной плазмиды, несущей клонированные гены *splI/splR* из *S. plymuthica* HRO-C48, приводило к снижению вдвое формирования биопленок [31]. Эти данные показывают, что QS-регуляция формирования биопленок у рода *Serratia* может быть видоспецифичной.

Успешное формирование биопленок связано со способностью бактерий к адгезии. Мы показали, что мутация в гене *sprI* приводила к изменению характера роста клеток *S. proteamaculans* 94 в жидкой среде и резко снижала способность клеток адсорбироваться на поверхности стекла. Это могло быть вызвано изменением структуры клеточных стенок бактерий. В связи с этим мы исследовали состав жирных кислот, многие из которых входят в состав клеточных мембран бактерий, у *S. proteamaculans* 94 и мутантных штаммов [[14] и настоящая работа].

Сравнительный анализ показал значительные изменения состава жирных кислот мутантных штаммов по сравнению со штаммом дикого типа: содержание некоторых жирных кислот изменялось более чем на порядок, существенно изменилось соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. По сравнению со штаммом *S. proteamaculans* 94 дикого типа жирнокислотный состав мутантов с нокаутом генов *sprI* [14] и *sprR* характеризовался меньшей ненасыщенностью, что свидетельствует о более плотной упаковке ЛПС на клеточной поверхности. Возможно, это один из механизмов адаптации клеток к неблагоприятным условиям окружающей среды, позволяющий повысить толерантность мембран к стрессовым факторам. Известно, что соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в составе ЛПС влияет на физические свойства мембран бактерий [32, 33]. Фазовое состояние жидкокристаллической структуры липидного слоя мембраны, степень ее текучести, в свою очередь, оказывают весьма существенное влияние на вязко-эластические свойства клеток, их способность к деформации, на активность мембранно-связанных ферментов, на проницаемость мембран.

Чтобы получить общую оценку количества белков, синтез которых зависел от QS-регуляции, был проведен сравнительный протеомный анализ клеток исходного штамма и мутантов. Полученные результаты демонстрируют, что экспрессия более 30 белков находится под влиянием SprIR QS-системы. Ранее было показано, что экспрессия как минимум 39 белков у *S. proteamaculans* B5a находилась под контролем 3-оксо-С6-ГЛ-зависимой QS системы [11]. Таким образом, наши

данные согласуются с результатами аналогичных исследований других авторов.

В рамках настоящей работы впервые была проведена идентификация некоторых белков, для которых наблюдались отличия в уровне экспрессии в штамме дикого типа и мутантах. В обоих мутантах обнаружены изменения в синтезе существенно важных для метаболизма бактерий белков. Например, мы показали значительное снижение экспрессии ФМН-редуктазы, являющейся одним из компонентов дыхательной цепи бактерий, у обоих мутантов — почти в 3 раза для *sprI::Gm* мутанта и более чем в 10 раз для мутанта *sprR::Gm*. У мутантного штамма *sprI::Gm* наблюдалась усиленная экспрессия белков, участвующих в защите клеток от стрессов: тиоредоксина 2, тиоредоксин-зависимой тиолпероксидазы, белка теплового шока GrpE.

У мутантного штамма *sprR::Gm* отмечено снижение уровня экспрессии двух субъединиц белка сукцинил-СоА-синтетазы: более чем в 2 раза для  $\alpha$ -субъединицы и в 5 раз для  $\beta$ -субъединицы. Сукцинил-СоА-синтетаза — один из ключевых ферментов цикла лимонной кислоты, катализирующий реакцию образования свободного сукцината. При этой реакции происходит образование богатого энергией АТФ (ГТФ) за счет АДФ и минерального фосфата с использованием сукцинил-СоА. Изменения, вызванные мутацией в гене *sprR*, могли привести к дефициту АТФ и общего уровня энергии в клетке.

Кроме того, было обнаружено, что у мутанта *sprR::Gm* значительно усиливалась экспрессия  $\beta$ -лактамазы — более чем в 30 раз по сравнению с ее экспрессией в исходном штамме. Эти ферменты отвечают за устойчивость бактерий к  $\beta$ -лактамам антибиотикам, включая карбапенемы. Синтез карбапенемов обнаружен у бактерий рода *Serratia* [12]. Хотя мы не имеем данных о синтезе карбапенема у *S. proteamaculans* 94, можно предположить, что этот антибиотик также продуцируется штаммом 94. В этом случае репрессия синтеза  $\beta$ -лактамазы в штамме дикого типа полезна для бактерии, так как  $\beta$ -лактамаза разлагает карбапенем, который может играть существенную роль в конкуренции с другими бактериями.

Полученные нами данные протеомного анализа показывают, что идентифицированные белки, экспрессия которых изменяется в результате мутаций QS-генов, являются компонентами важных клеточных процессов.

Работа частично финансировалась грантами РФФИ № 18-04-00375, 19-04-00756 и грантом

Минобрнауки России, государственное задание ЯрГУ, работа № 0856-2020-0008.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fuqua C., Winans S.C., Greenberg E.P.* Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR\_LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators // *Annu. Rev. Microbiol.* 1996. V. 50. P. 727–751. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.727>
2. *Waters C.M., Bassler B.L.* Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2005. V. 21. P. 319–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>
3. *Хмель И.А., Метлицкая А.З.* Quorum Sensing регуляция экспрессии генов — перспективная мишень для создания лекарств против патогенности бактерий // *Мол. биология.* 2006. Т. 40. С. 195–210.
4. *Веселова М.А.* Quorum Sensing регуляция у псевдомонад // *Генетика.* 2010. Т. 46. № 2. С. 149–158.
5. *Зайцева Ю.В., Попова А.А., Хмель И.А.* Регуляция типа Quorum Sensing у бактерий семейства Enterobacteriaceae // *Генетика.* 2014. Т. 50. № 14. С. 373–391.
6. *Papenford K., Bassler B.* Quorum-sensing signal-response systems in gram-negative Bacteria // *Nat. Rev. Microbiol.* 2016. V. 14. P. 576–588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>
7. *Whiteley M., Diggle S.P., Greenberg E.P.* Bacterial quorum sensing: The progress and promise of an emerging research area // *Nature.* 2017. V. 551(7680). P. 313–320. <https://doi.org/10.1038/nature.24624>
8. *Beck von Bodman S., Majerczak D.R., Coplin D.L.* A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii* // *Proc. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 7687–7692. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7687>
9. *Hornig Y.T., Deng S.C., Daykin M. et al.* The LuxR family protein SpnR functions as a negative regulator of N-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia marcescens* // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 45. P. 1655–1671. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03117.x>
10. *Minogue T.D., Wehland-von Trebra M., Bernhard F., von Bodman S.B.* The autoregulatory role of EsaR, a quorum-sensing regulator in *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii*: evidence for a repressor function // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 44. P. 1625–1635. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02987.x>

11. Christensen A.B., Riedel K., Eberl L. et al. Quorum-sensing-directed protein expression in *Serratia proteamaculans* B5a // *Microbiology*. 2003. V. 149. P. 471–483.  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.25575-0>
12. Van Houdt R., Givskov M., Michiels C.W. Quorum sensing in *Serratia* // *FEMS Microbiol. Rev.* 2007. V. 31. P. 407–424.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00071.x>
13. Demidyuk I.V., Kalashnikov A.E., Gromova T.Y. et al. Cloning, sequencing, expression, and characterization of protealysin, a novel neutral proteinase from *Serratia proteamaculans* representing a new group of thermolysin-like proteases with short N-terminal region of precursor // *Protein Expression and Purification*. 2006. V. 47. P. 551–561.  
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.12.005>
14. Zaitseva Y.V., Koksharova O.A., Lipasova V.A. et al. SprI/SprR Quorum Sensing System of *Serratia proteamaculans* 94 // *BioMed. Res. Internat.* Volume 2019, Article ID 3865780, 10 p.  
<https://doi.org/10.1155/2019/3865780>
15. Zaitseva Y.V., Lipasova V.A., Plyuta V.A. et al. Effect of inactivation of *luxS* gene on the properties of *Serratia proteamaculans* 94 strain // *Folia Microbiol. (Praha)*. 2019. V. 64. P. 265–272.  
<https://doi.org/10.1007/s12223-018-0657-5>
16. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 436 с.
17. McClean K.H., Winson M.K., Fish L. et al. Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones // *Microbiology*. 1997. V. 143. P. 3703–3711.  
<https://doi.org/10.1099/00221287-143-12-3703>
18. Shaw P.D., Ping G., Daly S.L. et al. Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 6036–6041.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6036>
19. Ausubel F.M., Brentt R., Kingston R.E. (Eds) *Current Protocols in Molecular Biology*. N.Y.: John Wiley & Sons Inc., 1994.
20. Hoang T.T., Karkhoff-Schweizer R.R., Kutchma A.J., Schweizer H.P. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants // *Gene*. 1998. V. 212. P. 77–86.  
[https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(98\)00130-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00130-9)
21. Dennis J.J., Zylstra G.J. Plasmids: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes // *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. V. 64. P. 2710–2715. 0099-2240/98/\$04.0010
22. Popova A.A., Koksharova O.A., Lipasova V.A. et al. Inhibitory and toxic effects of volatiles emitted by strains of *Pseudomonas* and *Serratia* on growth and survival of selected microorganisms, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster* // *BioMed Res. Int.* 2014. V. 2014. Article ID 125704, 11 p.  
<https://doi.org/10.1155/2014/125704>
23. Microbial ID Inc. *Microbial identification system operational manual, version 4*. Microbial ID Inc., Newark, Del, 1992.
24. Stead D.E., Sellwood J.E., Wilson J., Viney I. Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid, accurate identification of plant pathogenic bacteria // *J. Appl. Bacteriol.* 1992. V. 72. P. 315–321.
25. Yan J.X., Wait R., Berkelman T. et al. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry // *Electrophoresis*. 2000. V. 21. P. 3666–3672.  
[https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200011\)21:17<3666::AID-ELPS3666>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200011)21:17<3666::AID-ELPS3666>3.0.CO;2-6)
26. Shevchenko A., Chernushevich I., Wilm M., Mann M. De novo peptide sequencing by nano-electrospray tandem mass spectrometry using triple quadrupole and quadrupole/time-of-flight instruments // *Methods Mol. Biol.* 2000. V. 146. P. 1–16.  
<https://doi.org/10.1385/1-59259-045-4:1>
27. Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P. et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm // *Science*. 1998. V. 280. P. 295–298.
28. Labbate M., Queck S.Y., Koh K.S. et al. Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1 // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. P. 692–698.  
<https://doi.org/10.1128/jb.186.3.692-698.2004>
29. Ercolini D., Russo F., Nasi A. et al. Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 1990–2001.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.02762-08>
30. Rice S.A., Koh K.S., Queck S.Y. et al. Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. P. 3477–3485.  
<https://doi.org/10.1128/JB.187.10.3477-3485.2005>
31. Зайцева Ю.В., Волошина П.В., Луи Х. и др. Участие глобальных регуляторов GrrS, RpoS и SplIR в формировании биопленок у *Serratia plymuthica* // *Генетика*. 2010. Т. 46. № 5. С. 616–621.
32. Sinensky M. Homeoviscous adaptation – a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1974. V. 71. P. 522–525.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.71.2.522>
33. Cybulski L.E., Albanesi D., Mansilla M.C. et al. Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the *Bacillus subtilis* acyl-lipid desaturase // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 45. P. 1379–1388.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03103.x>

## Features of the SprIR Quorum Sensing System of *Serratia proteamaculans* 94 and Its Participation in the Regulation of Cellular Processes

Yu. V. Zaitseva<sup>a, b</sup>, V. A. Lipasova<sup>a</sup>, O. A. Koksharova<sup>a, c</sup>, V. A. Plyuta<sup>a</sup>,  
I. V. Demidyuk<sup>a</sup>, L. S. Chernin<sup>d</sup>, and I. A. Khmel<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Molecular Genetics of National Research  
Center "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia

<sup>b</sup>Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, 150003 Russia

<sup>c</sup>Belozersky Institute of Physical-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

<sup>d</sup>Department of Plant Pathology and Microbiology, the Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, 76100 Israel

\*e-mail: khmel@img.ras.ru

The quorum sensing (QS) regulatory system of the psychrotrophic strain *Serratia proteamaculans* 94 was investigated. A mutant was constructed with inactivated gene *sprR* encoding the regulatory receptor protein SprR. Inactivation of this gene was shown to affect the composition of fatty acids synthesized by *S. proteamaculans* 94, and did not affect the N-acyl-L-homoserine-lactones (AHL) synthesis, the activities of extracellular proteases, chitinases, hemolysins, swimming motility of cells and suppression of mycelium growth of fungal plant pathogens by volatile compounds emitted by this strain. Inactivation of the *sprI* gene (but not the *sprR* gene) reduced the biofilm formation which increased when exogenous AHL was added to the culture. The comparative proteomic analysis of cells of the parent strain and mutant strains with inactivated *sprI* and *sprR* genes showed that the expression of 30 proteins in *S. proteamaculans* 94 is affected by SprIR quorum sensing system.

**Keywords:** quorum sensing, *Serratia proteamaculans*, biofilms, enzymes, fatty acids, proteomic analysis.