

## ДВУХСТУПЕНЧАТАЯ АКТИВАЦИЯ *lux*-РЕГУЛОНА ПСИХРОФИЛЬНЫХ ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ *Aliivibrio logei*

© 2022 г. С. В. Баженов<sup>1, \*</sup>, Е. С. Щеглова<sup>1</sup>, В. В. Фомин<sup>1</sup>,  
**Г. Б. Завильгельский<sup>2</sup>**, И. В. Манухов<sup>1, 2, \*\*</sup>

<sup>1</sup>Московский физико-технический институт, Московская область, Долгопрудный, 141701 Россия

<sup>2</sup>Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Москва, 117545 Россия

\*e-mail: bazhenov1994@gmail.com

\*\*e-mail: manukhovi@mail.ru

Поступила в редакцию 30.04.2021 г.

После доработки 01.07.2021 г.

Принята к публикации 12.07.2021 г.

*Lux*-регулон психрофильных морских люминесцентных бактерий *Aliivibrio logei* контролируется “quorum sensing”-системой типа LuxI/LuxR. В данной работе определен характер аутоиндуктор-зависимой регуляции промоторов *luxI* и *luxCDABEG*-генов как по скорости синтеза аутоиндуктора и интенсивности биолюминесценции клеток *A. logei*, так и в гетерологичной системе в клетках *Escherichia coli* с репортерными генами *luxCDABE Photorhabdus luminescens*, находящимися под контролем исследуемых промоторов. Показано, что существуют различия в аутоиндуктор-зависимой активации оперона *luxCDABEG* и отдельно расположенного гена *luxI A. logei*. Экспрессия *luxI* усиливается в присутствии N-3-оксо-гексаноил-L-гомосерин лактона в концентрациях порядка 10 нМ, а экспрессия генов *luxCDABEG* усиливается при значительно больших концентрациях – от 1 мкМ и выше. Это определяется как последовательностью сайта посадки регуляторных белков *lux*-бокс2 и *lux*-бокс1 в составе соответствующих промоторов, так и свойствами двух белков LuxR1 и LuxR2, различающихся по способности связываться с аутоиндукторами.

**Ключевые слова:** чувство кворума, люминесценция, аутоиндуктор, регуляция, *Aliivibrio logei*, *luxR*.

DOI: 10.31857/S0016675822020023

Люминесценция морских бактерий *Aliivibrio fischeri* и *Aliivibrio logei* управляется по механизму “quorum sensing” (QS), позволяющему за счет синтеза специальных сигнальных веществ, аутоиндукторов (АИ) и детекции их с помощью регуляторных белков типа LuxR осуществлять скоординированную регуляцию экспрессии генов с использованием N-3-оксо-гексаноил-L-гомосерин лактона (ЗОС6-HSL) в качестве АИ [1–5]. У бактерий вида *A. fischeri* гены *luxCDABEG*, определяющие светимость клетки, объединены в один оперон с геном *luxI*, отвечающим за синтез АИ, и регулируются совместно, а регуляторный ген *luxR* расположен рядом с промотором оперона, но ориентирован в противоположном направлении [6]. Психрофильные бактерии *A. logei* значительно отличаются от мезофильных бактерий вида *A. fischeri* по архитектуре *lux*-оперона: ген *luxI* и касета *luxCDABEG* транскрибируются с отдельных промоторов и регулируются двумя гомологичными генами *luxR2* и *luxR1*, расположенными

на хромосоме непосредственно рядом с регулируемым промоторами [5, 7].

Ранее в гетерологичной системе в клетках *Escherichia coli* было проведено сравнение регуляции промоторов генов *luxI* и *luxCDABEG A. logei* [8]. Исследуемые промоторы клонировались вместе с ближайшими регуляторными генами:  $P_{luxI}$  вместе с *luxR2* и  $P_{luxCDABEG}$  вместе с *luxR1*. Было показано, что комбинация  $P_{luxI}$  с *luxR2* обеспечивает большую чувствительность к АИ и большую амплитуду индукции, чем комбинация  $P_{luxCDABEG}$  с *luxR1*. В работе [9] в экспериментах в гетерологичной системе клеток *E. coli* было показано, что внесение гена *luxR2 A. logei* в *trans*-положение увеличивает чувствительность к АИ и амплитуду ответа промотора  $P_{luxCDABEG}$ , клонированного в *cis*-положении с геном *luxR1*.

В настоящей работе была исследована регуляция *luxI* и *luxCDABEG* промоторов в клетках *A. logei* и проведено сравнение результатов с данными, полученными в гетерологичных системах.

**Таблица 1.** Плазмиды, использованные в работе

| Плаزمида | Описание   | Ссылка на источник |
|----------|--|--------------------|
| pIVA     | Вектор pDEW201, в котором <i>luxR1 A. lojei</i> под контролем P <sub>luxR1</sub> <i>A. lojei</i> , <i>luxCDABE P. luminescens</i> под контролем P <sub>luxCDABEG</sub> <i>A. lojei</i> , Ap <sup>r</sup> | [8]                |
| pSV16    | pDEW201, в котором <i>luxR2 A. lojei</i> под контролем P <sub>luxR2</sub> <i>A. lojei</i> , <i>luxCDABE P. luminescens</i> под контролем P <sub>lux1</sub> <i>A. lojei</i> , Ap <sup>r</sup>             | [13]               |
| pIV3     | Вектор pACYC184, в котором <i>luxR1 A. lojei</i> под контролем собственного промотора, встроенный в <i>Bam</i> HI сайт, Cm <sup>r</sup>  | [8]                |
| pIV2     | pACYC184, в котором <i>luxR2 A. lojei</i> под контролем собственного промотора, встроенный в <i>Bam</i> HI сайт, Cm <sup>r</sup>   | [8]                |
| pD-lb1   | pDEW201, в котором <i>luxCDABE P. luminescens</i> под контролем P <sub>luxCDABEG</sub> <i>A. lojei</i> с нативной последовательностью <i>lux</i> -бокс1: CTCTGTAAAGTTATACAGGT                            | Настоящая работа   |
| pD-lb2   | pDEW201, в котором <i>luxCDABE P. luminescens</i> под контролем P <sub>luxCDABEG</sub> <i>A. lojei</i> с заменой последовательности <i>lux</i> -бокс1 на <i>lux</i> -бокс2: TCCTGTAATATTGTACAGGT         | Настоящая работа   |
| pVFR1    | pDEW201, в котором <i>luxR A. fischeri</i> под контролем собственного промотора, <i>luxCDABE P. luminescens</i> под контролем P <sub>luxCDABEG</sub> <i>A. fischeri</i> , Ap <sup>r</sup>                | [14]               |
| pSVRAF   | pACYC184, в котором <i>luxR A. fischeri</i> под контролем собственного промотора, встроенный в <i>Bam</i> HI сайт, Cm <sup>r</sup>   | [15]               |

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Бактериальные штаммы и плазмиды

В работе использовались штаммы *A. lojei* K18-44 и *A. lojei* KCh1 дикого типа [3, 10] и *E. coli* MG1655 [11], трансформированный гибридными плазмидами. Для исследования регуляции отдельных промоторов использовались гибридные плазмиды на основе вектора pDEW201 [12], в котором перед генами *luxCDABE Photorhabdus luminescens* встраивались исследуемые промоторы (см. табл. 1).

### Условия культивирования

Клетки *A. lojei* выращивались при температуре 12–16°C в жидкой среде SWT (морская соль 15 г/л, триптон 5 г/л, др. экстракт 2.5 г/л, глицерин 3 г/л) с постоянным перемешиванием (150 об./мин) или на чашках с агаризованной (15 г/л) SWT. Клетки *E. coli* выращивали в среде LB при температуре 37°C.

### Конструирование гибридных плазмид

Для получения pD-lb2 фрагмент хромосомальной ДНК *A. lojei* KCh1 был амплифицирован с использованием праймеров 5'-GATTTCCTGTAATATTGTACAGGTTTACCTAAATAATTACCCTGCTA-3' и 5'-GACACCGCCGATGATAATTGGA-3', клонирован в pTZ57R/T векторе, а затем перенесен по сайтам рестрикции *Eco*RI/*Bam*HI в вектор pDEW201. В последовательности праймера

подчеркиванием выделена последовательность *lux*-бокс. Для получения pD-lb1 фрагмент хромосомальной ДНК *A. lojei* KCh1 был амплифицирован с использованием праймеров 5'-GGATCCGATCTCTGTAAAGTTATACAGGTTTACCTA-3' и 5'-GACACCGCCGATGATAATTGGA-3', клонирован в pAL2-T векторе, а затем перенесен по ориентации вставки так, чтобы гены *luxCDABE P. luminescens* были под контролем встроенного промотора *A. lojei*.

### Реактивы

Сборка гибридных плазмид проводилась с использованием ДНК-полимеразы Taq (Евроген, Россия), эндонуклеаз рестрикции *Eco*RI и *Bam*HI (Promega, США), фосфатазы и лигазы T4 (Thermo Scientific, США). Аутоиндуктор 3OC6-HSL приобретен у SigmaAldrich (США). Для приготовления SWT использовали морскую соль производства RedSea (Гватемала). Триптон, дрожжевой экстракт, агар-агар и хлорид натрия были приобретены у компании “Диа-М” (Россия), глицерин – AppliChem (США).

### Измерение биолюминесценции клеток

Биолюминесценцию клеток измеряли с использованием планшетного люминометра Synergy HT (Biotek, США) и высокочувствительного

кюветного люминометра “Биотокс-7ВМ” (Био-ФизТех, Россия) при комнатной температуре.

В экспериментах с биосенсорными клетками *E. coli* культуру клеток выращивали до OD 0.1–0.2, затем разделяли на аликвоты по 180 мкл, к клеткам добавляли контрольный раствор, раствор аутоиндуктора или исследуемые аутоиндуктор-содержащие среды в различных разведениях (по 20 мкл), после чего проводили периодические измерения светимости. В эксперименте с клетками *A. logei* суспензию клеток по 200 мкл переносили в кювету непосредственно перед измерением.

#### Определение концентрации АИ в образцах надосадочной культуры клеток *A. logei*

Определение концентрации АИ в растворе проводили с использованием цельноклеточного *lux*-биосенсора *E. coli* MG1655 pVFR1 pSVRAF (за счет повышенного содержания регуляторного гена *luxR* *A. fischeri* достигается повышенная чувствительность к АИ [16]), люминесценция которого возрастает в дозозависимой манере после добавления АИ в концентрациях от 0.03 до 100 нМ. Калибровку проводили по ЗОС6-HSL – основному АИ в QS типа LuxR/LuxI в бактериях рода *Aliivibrio* [4, 17].

#### Определение скорости синтеза АИ в зависимости от концентрации АИ в среде

Прирост концентрации АИ определяли следующим образом: 1 – измерение  $[AI]_{t1}$ ; 2 – инкубация определенным промежутком времени; 3 – измерение концентрации АИ ( $[AI]_{t2}$ ); 4 – расчет прироста концентрации АИ по формуле

$$\Delta[AИ] = [AI]_{t2} - [AI]_{t1}, \quad (1)$$

где  $t1$  и  $t2$  – время забора проб для измерения концентрации АИ.

Скорость синтеза АИ в зависимости от концентрации АИ в среде определяли следующим образом: 1 – измерение  $[AI]_{t1}$ ; 2 – экзогенное добавление АИ от 1 нМ до 10 мкМ ( $[AI]_{ex}$ ), инкубация 4 ч; 3 – измерение концентрации АИ  $[AI]_{t2}$ ; 4 – расчет прироста концентрации АИ по формуле

$$\Delta[AИ] = [AI]_{t2} - [AI]_{ex} - [AI]_{t1}. \quad (2)$$

При определении удельной скорости синтеза АИ значение  $\Delta[AИ]$  делили на площадь под графиком зависимости оптической плотности культуры клеток *A. logei* от времени:

$$\left(\frac{d}{dt}[AI]_{уд}\right) = \Delta[AИ] / \int_{t1}^{t2} OD(t) dt, \quad (3)$$

где  $OD(t)$  – функция зависимости оптической плотности культуры клеток *A. logei* от времени.

#### Статистическая обработка результатов

Все эксперименты с культурами клеток *A. logei* и *E. coli* проводились в трех повторах. Погрешность при измерении люминесценции и скорости синтеза АИ вычислялась по формуле стандартного отклонения на основе трех повторов, ее значение на графиках отражено планками ошибок.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

#### Люминесценция и синтез АИ клетками *A. logei*

Для изучения работы QS-системы типа LuxI/LuxR в клетках бактерий *A. logei*, в частности регуляции генов *luxCDABEG* и *luxI*, проводилось культивирование клеток *A. logei* K18-44 в жидкой среде с регулярным измерением оптической плотности, люминесценции и концентрации АИ в среде (рис. 1,а). На основе полученных данных были рассчитаны удельная светимость и удельная скорость синтеза АИ в расчете на единицу оптической плотности культуры клеток (рис. 1,б).

В ранних фазах роста культуры клетки делятся с постоянной скоростью, и зависимость оптической плотности культуры приближенно описывается следующей формулой:

$$OD(t) = OD_0 e^{at}, \quad (4)$$

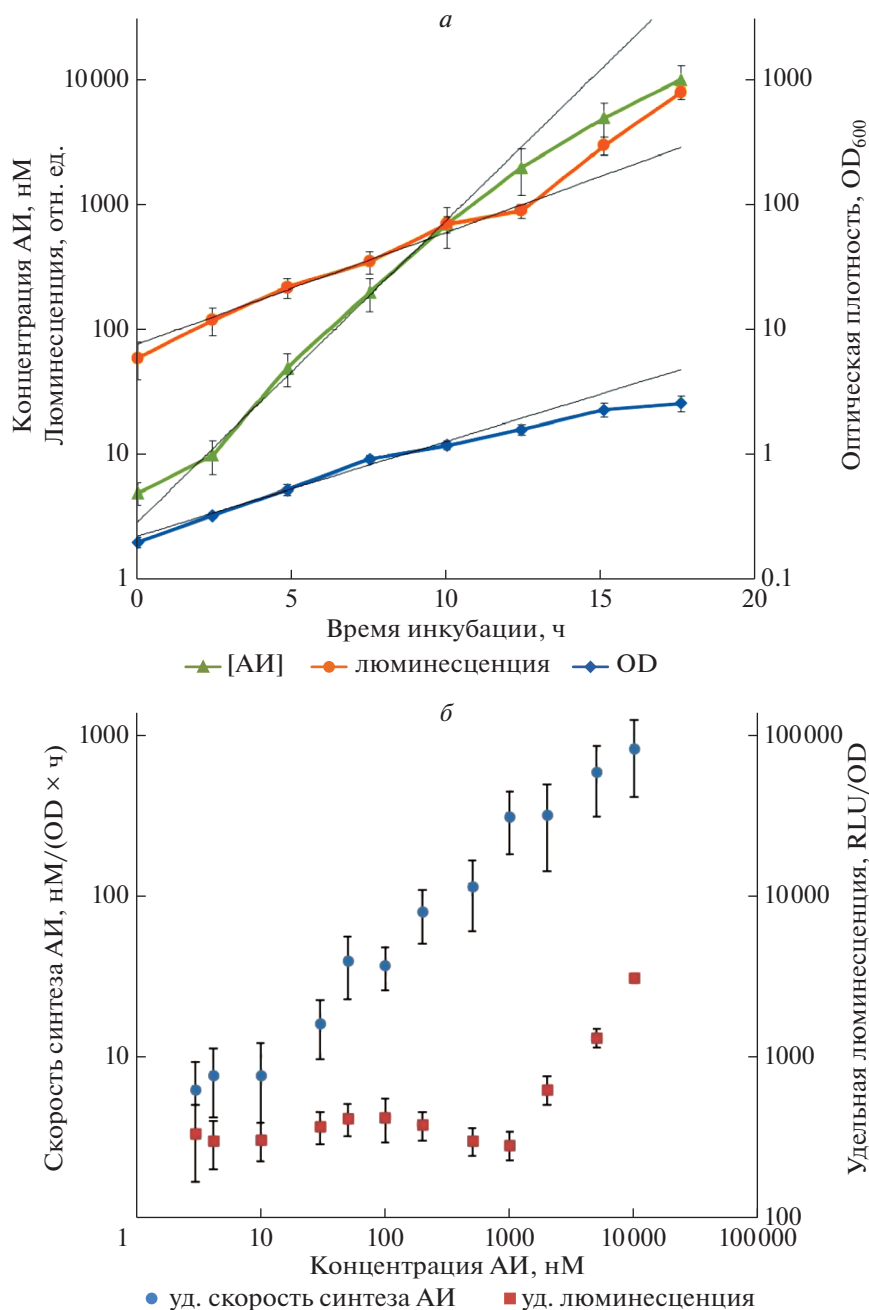
где  $OD_0$  – это оптическая плотность культуры в начале эксперимента, параметр  $a$  определяет темпы роста и зависит от множества факторов эксперимента, таких как штамм, температура, среда, скорость перемешивания и т.п., а  $t$  – это переменная времени. Если пренебречь деградацией АИ и считать, что каждая клетка синтезирует его с одинаковой скоростью в определенном интервале времени, то скорость синтеза АИ культурой клеток в целом будет зависеть от времени также экспоненциально:

$$\frac{d[AИ]}{dt} = COD(t) = COD_0 e^{at}, \quad (5)$$

где  $C$  – это скорость синтеза АИ в расчете на единицу OD в единицу времени. Для получения зависимости концентрации АИ от времени необходимо проинтегрировать уравнение (5):

$$[AI] = [AI]_0 + \frac{1}{a} COD_0 e^{at}, \quad (6)$$

где  $[AI]_0$  – это концентрация АИ в начале эксперимента. Из формул (4) и (6) явным образом следует, что при постоянстве скорости синтеза АИ каждой отдельной клеткой кривые концентрации АИ и оптической плотности культуры должны приближаться экспонентами с одинаковыми показателями  $a$ . Как видно из графика на рис. 1,а, эти кривые аппроксимируются экспонентами со значительно отличающимися показателями, причем показатель экспоненты кривой накопления АИ в среде

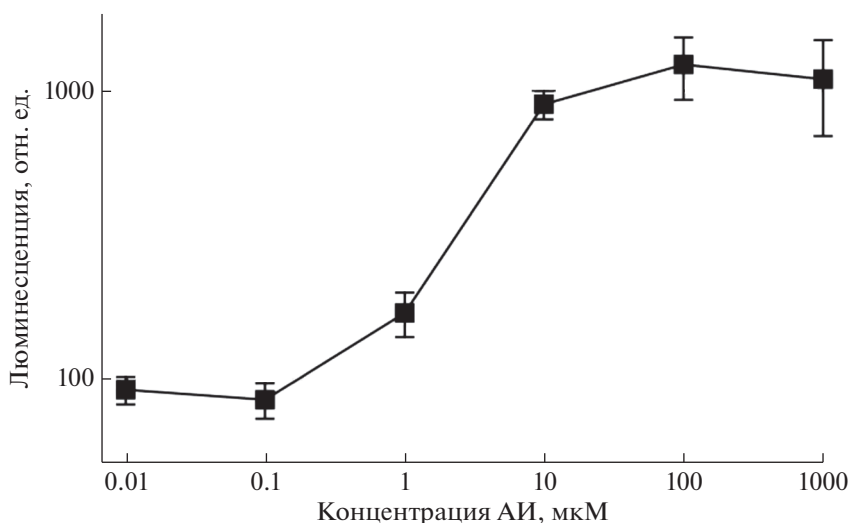


**Рис. 1.** Изменение люминесценции и скорости синтеза АИ в процессе культивирования клеток *A. logei* K18-44 и влияние концентрации АИ на эти процессы. *а* — график зависимости оптической плотности, концентрации АИ и люминесценции культуры клеток *A. logei* K18-44 от времени культивирования. На графике добавлены линии тренда, характеризующие показатель экспоненты для каждой из измеряемых величин; *б* — график изменения удельной светимости и синтеза АИ в расчете на 1 OD в зависимости от концентрации АИ в среде.

выше. Кривые люминесценции и оптической плотности на графике (рис. 1,а) практически параллельны, что означает одинаковую светимость каждой отдельной клетки, до отметки 12.5 ч инкубации. После 12.5 ч наблюдается резкое возрастание люминесценции в расчете на клетку. Вышеописанный резкий рост удельной светимости культуры происходит в позднелогарифмической

фазе роста культуры, когда концентрация АИ достигает значений порядка 1 мкМ.

Удельная скорость прироста концентрации АИ в расчете на клетку ( $\Delta[AI]_{уд}$ ) начинает резко возрастать при концентрации АИ выше 10 нМ (рис. 1,б). Это свидетельствует об активации экспрессии гена *luxI* и росте скорости синтеза АИ в



**Рис. 2.** Зависимость люминесценции культур клеток *A. logei* K18-44 от концентрации экзогенного АИ. Измерение проводилось через 4 ч после добавления АИ.

расчете на одну клетку при концентрациях АИ 10 нМ и выше.

Таким образом, мы наблюдаем двухэтапную активацию QS-системы *A. logei*, где при низких концентрациях активируется промотор гена АИ-синтазы *luxI* и лишь при высоких концентрациях АИ активируется экспрессия генов люминесценции *luxCDABEG*.

#### Люминесценция и синтез АИ клетками *A. logei* при экзогенном добавлении АИ

Рост люминесценции *A. logei* в зависимости от АИ был проверен с помощью добавления к культуре с неактивированной QS-системой химически синтезированного АИ в различных концентрациях. Была взята культура *A. logei* K18-44, выращенная до  $OD = 0.5$ , отмыта от АИ стерильной средой SWT и затем разделена на аликвоты, к которым добавлялись различные концентрации экзогенного АИ от 10 нМ до 1 мМ. После инкубации в течение четырех часов измерялась люминесценция образцов (рис. 2).

Как видим из данных, приведенных на рис. 2, рост люминесценции начинается только при высоких концентрациях экзогенно внесенного АИ — от 1 мкМ и выше.

Изменение интенсивности синтеза АИ клетками *A. logei* в зависимости от концентрации АИ было определено с помощью добавления к культуре с неактивированной QS-системой химически синтезированного АИ в различных концентрациях. Была взята культура *A. logei* K18-44, выращенная до  $OD = 0.2$ , отмыта от АИ стерильной средой SWT и затем разделена на аликвоты. Измерения АИ в пробе после отмытки и концентрирования

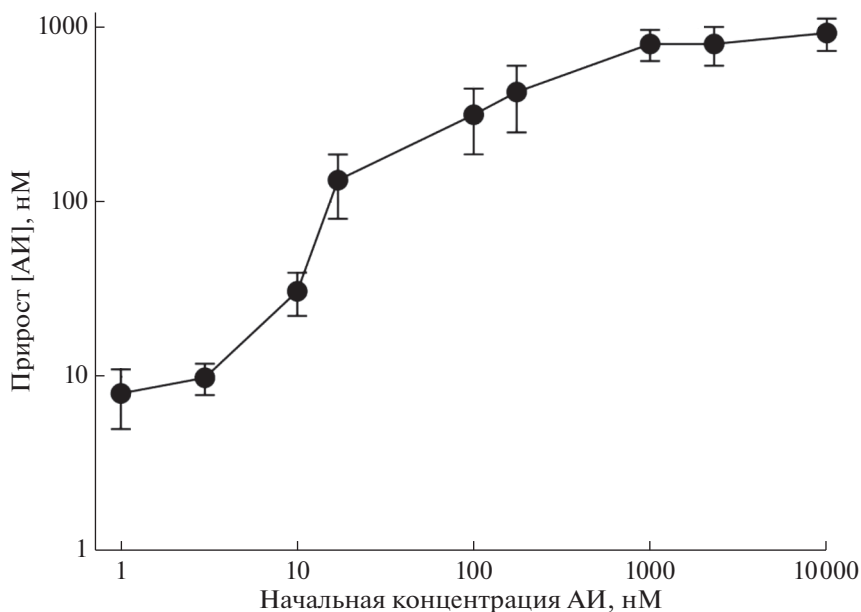
показали, что к началу эксперимента аликвоты содержали не более 1 нМ АИ. К аликвотам добавлялись различные концентрации экзогенного АИ от 1 нМ до 10 мкМ. После инкубации в течение четырех часов измерялась концентрация АИ в образцах (рис. 3).

Как можно видеть по графику на рис. 3, синтез АИ клетками *A. logei* значительно зависит от его концентрации в среде — при концентрациях выше 10 нМ АИ в среде активируется промотор  $P_{luxI}$  и увеличивается экспрессия гена аутоиндуктор-синтазы *luxI*. При этом в неактивированном состоянии клетки *A. logei* синтезируют АИ со скоростью порядка 10 нМ/( $OD \times \text{час}$ ).

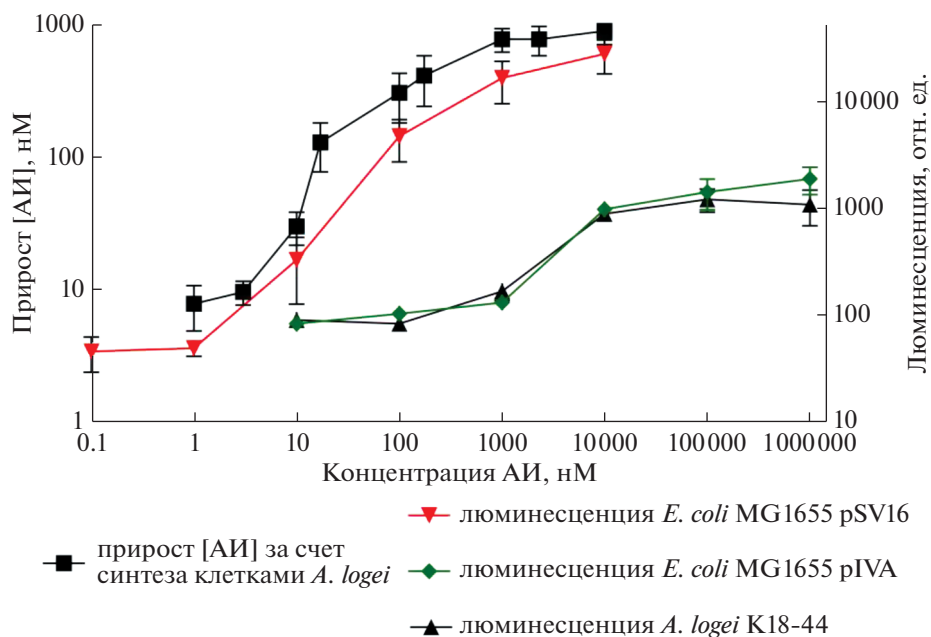
#### Определение АИ-зависимой регуляции $P_{luxI}$ и $P_{luxCDABEG}$ *A. logei* в гетерологичной системе *E. coli*

Для подтверждения различия АИ-зависимой регуляции генов *luxCDABEG* и *luxI* клеток *A. logei* был проведен сравнительный анализ их регуляции в гетерологичной системе клеток *E. coli* (рис. 4). Были использованы клетки *E. coli* MG1655, трансформированные плазмидой pSV16, в которой имеется ген *luxR2*, а гены *luxCDABEG* *P. luminescens* поставлены под контроль  $P_{luxI}$ , или плазмидой pIVA с *luxRI* геном и *luxCDABEG* *P. luminescens* под контролем  $P_{luxCDABEG}$  (табл. 1). Активность промоторов оценивалась по люминесценции соответствующих культур клеток *E. coli*, измеренной через 2 ч после экзогенного добавления 3OC6-HSL.

Результаты определения характера АИ-зависимой активации промоторов  $P_{luxI}$  и  $P_{luxCDABEG}$  *A. logei* в клетках *A. logei* и *E. coli* хорошо согласуются. Очевидны различия исследуемых промоторов по амплитуде активации и по пороговым концентрациям



**Рис. 3.** Зависимость прироста концентрации АИ за четыре часа в культуре клеток *A. logei* от концентрации АИ в начале временного интервала.



**Рис. 4.** Сопоставление результатов исследования АИ-зависимой регуляции промоторов  $P_{luxI}$  и  $P_{luxCDABEG}$  *A. logei* по скорости синтеза АИ и люминесценции клеток *A. logei* и по люминесценции биосенсорных клеток *E. coli* MG1655 pSV16 (промотор  $P_{luxI}$ ) и *E. coli* MG1655 pIVA (промотор  $P_{luxCDABEG}$ ).

АИ.  $P_{luxI}$ , а следовательно и синтез АИ в *A. logei* активируются при концентрациях АИ от 10 нМ.  $P_{luxCDABEG}$  *A. logei* как в клетках *A. logei*, так и в гетерологической системе *E. coli* активируется при концентрациях АИ от 1 мкМ.

*Роль последовательностей lux-боксов в последовательной активации промоторов  $P_{luxI}$  и  $P_{luxCDABEG}$*

Промоторы  $P_{luxI}$  и  $P_{luxCDABEG}$  различаются по последовательности связывания LuxR-белков с

|    |                   | 0          | 1          | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 9 | 8 | 7 | 6 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 |
|----|-------------------|------------|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| AF | <i>lux</i> -бокс  | ACCTGTAGGA | TCGTACAGGT |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| AL | <i>lux</i> -бокс1 | CTCTGTAAAG | TTATACAGGT |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| AL | <i>lux</i> -бокс2 | TCCTGTAATA | TTGTACAGGT |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

**Рис. 5.** Сравнение последовательностей *lux*-боксов промоторных областей *luxR-luxI A. fischeri* (AF), *luxR1-luxC* и *luxR2-luxI A. logei* (AL). Выделение нуклеотидов: синим – нуклеотиды критичные для связывания LuxR согласно [18]; зеленым – расположенные симметрично в *lux*-боксе; полужирным шрифтом – консервативные позиции.

ДНК (*lux*-бокс2 и *lux*-бокс1 соответственно). Было проведено сравнение последовательностей *lux*-боксов промоторных областей *luxR-luxI A. fischeri*, *luxR1-luxC* и *luxR2-luxI A. logei* (рис. 5).

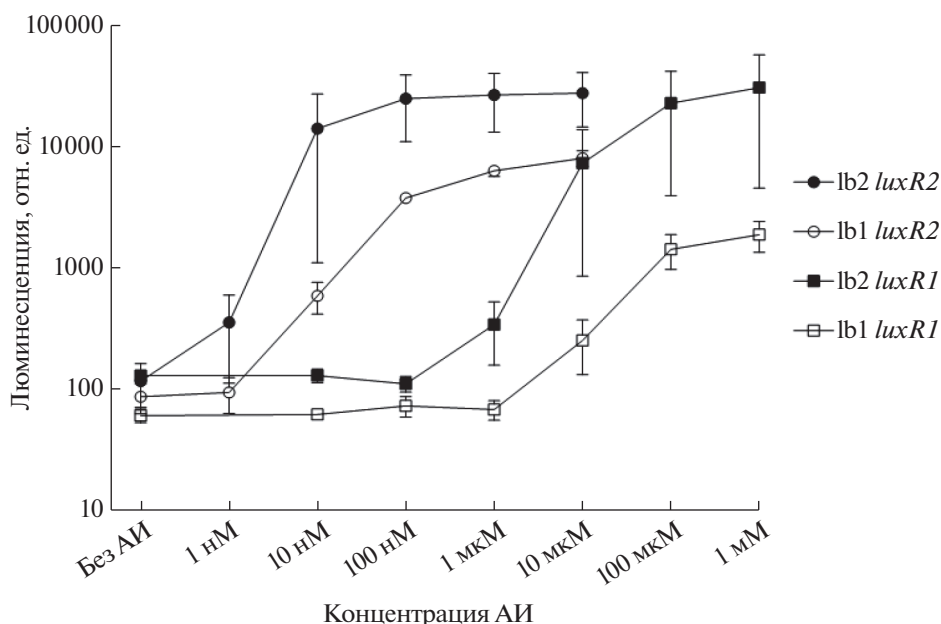
Большинство нуклеотидов в *lux*-боксов-последовательности являются консервативными и совпадают даже в геномах бактерий разных видов (*A. fischeri*, *A. logei* и *A. salmonicida*). Среди консервативных позиций есть описанные в [18] – CTG-CAG-, ключевые для связывания LuxR с сайтом посадки. Также сразу видна разница в степени симметричности разных *lux*-боксов: наиболее симметричный в промоторе  $P_{luxI}$  *A. fischeri*, менее симметричный в промоторе  $P_{luxI}$  *A. logei* и наименее симметричный в промоторе  $P_{luxCDABEG}$  *A. logei*.

Чтобы исследовать роль последовательности *lux*-боксов в наблюдаемых различиях в регуляции промоторов  $P_{luxI}$  и  $P_{luxCDABEG}$ , были сконструиро-

ваны плазмиды pD-lb1 и pD-lb2, в которых гены *luxCDABE P. luminescens* находятся под контролем промотора  $P_{luxCDABEG}$  *A. logei* с разными *lux*-боксов-последовательностями – *lux*-бокс1 и *lux*-бокс2 соответственно (рис. 5). Плазмиды pD-lb1 и pD-lb2 не содержат гены *luxR1* или *luxR2* в отличие от pSV16 и pIVA, эти гены вносились в клетки на отдельных плаزمиды pIV3 и pIV2 (табл. 1) соответственно. Такой подход позволил сравнить специфичность каждого из LuxR-белков к каждому из сайтов связывания и изучить влияние замены *lux*-боксов на регуляцию промотора при прочих равных условиях. Клетки *E. coli* MG1655 трансформировали различными комбинациями плазмид pD-lb1/pD-lb2 и pIV3/pIV2, после чего исследовали зависимость люминесценции полученных клеток от концентрации АИ в среде (рис. 6).

Индукция промотора, содержащего нативный *lux*-боксов промотора  $P_{luxCDABEG}$  (lb1), происходит при больших концентрациях АИ и имеет меньшую амплитуду по сравнению с таковыми для промотора, содержащего *lux*-боксов промотора  $P_{luxI}$  (lb2). Эта закономерность наблюдается в случае с обоими регуляторными генами *luxR1* и *luxR2*, откуда следует, что природная последовательность *lux*-боксов из  $P_{luxCDABEG}$  *A. logei* обладает значительно меньшим сродством к обоим гомологам: LuxR1 и LuxR2.

В этом же эксперименте впервые однозначно было показано, что сам ген *luxR2* обеспечивает значительно большую чувствительность клетки к АИ, чем ген *luxR1*. Этот эффект наблюдается для обеих последовательностей *lux*-боксов в промотор-



**Рис. 6.** Зависимость люминесценции клеток *E. coli* MG1655, несущих гены *luxCDABE P. luminescens* под контролем  $P_{luxCDABE}$  *A. logei* с нативным *lux*-боксом и *lux*-боксом из  $P_{luxI}$  *A. logei* в комбинации с геном *luxR1 A. logei* или *luxR2 A. logei*, от концентрации АИ в среде.

ной области (сравнение кривых с закрашенными символами и кривых с пустыми символами, рис. 6). LuxR2 активирует обе версии промотора при концентрациях АИ 1 и 10 нМ в зависимости от последовательности сайта связывания, а LuxR1 – при концентрациях 1 и 10 мкМ соответственно.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то что бактерии *A. logei* были обнаружены и описаны более 40 лет назад [19], а структура их *lux*-оперона известна с 2011 г. [13], двухэтапная активация *lux*-оперона бактерий *A. logei* с последовательной активацией экспрессии генов *luxI* и *luxCDABEG* (рис. 1, б) была впервые показана в настоящей работе. Эти результаты проливают свет на значение отличий в структуре *lux*-оперонов *A. fischeri* и *A. logei*.

Промоторы гена *luxI* у бактерий *A. logei* и *A. fischeri* обладают очень схожими характеристиками по амплитуде индукции и пороговым концентрациям АИ, необходимым для их индукции (порядка 10 нМ), что было показано в гетерологичной системе клеток *E. coli* [13]. Но в клетках *A. fischeri* этот промотор регулирует одновременно два процесса – синтез АИ и люминесценцию [20], а у *A. logei* только синтез АИ. При этом активация промотора генов *luxCDABEG* *A. logei* происходит лишь при высоких концентрациях АИ (порядка 1–10 мкМ, рис. 2). Концентрация АИ 10–20 мкМ в среде является предельной, более высокой концентрации АИ не удавалось достичь при культивировании клеток *A. logei* в жидкой среде SWT при температурах от 4 до 20°C (наши неопубликованные данные), это согласуется с результатами для *A. salmonicida* [4].

Различия в регуляции промоторов генов *luxI* и *luxCDABEG* были описаны в гетерологичной системе клеток *E. coli* с использованием биосенсорных плазмид [21] и в клетках *A. logei* по скорости синтеза АИ и люминесценции при различных концентрациях АИ (настоящая работа), а полученные результаты с высокой точностью согласуются друг с другом (рис. 4).

Таким образом, наблюдаются два этапа активации *lux*-оперона: при концентрациях АИ от 10 нМ усиливается его синтез, а при достижении концентрации 1–10 мкМ начинает расти светимость клеток. У психрофильных бактерий стадия роста при промежуточных концентрациях АИ может быть растянута до нескольких суток, в то время как для мезофильных бактерий рост культуры и активация QS-системы происходят быстро, например при 28°C *lux*-оперон *A. fischeri* полностью активируется в течение часа или даже быстрее [14]. Полученные результаты позволяют высказать гипотезу: двухстадийный механизм регуляции QS-системы позволяет психрофильным бактериям экономить ресурсы и не использовать восстановленные эквиваленты для люминесценции клеток в процессе накопления АИ до тех пор,

пока плотность популяции не достигнет значений, обеспечивающих видимость биолоуминесценции невооруженным глазом.

Исследования, проводимые С.В. Баженовым, включающие разработку идеи, постановку основных экспериментов, обработку результатов и написание манускрипта, выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90020.

Работа И.В. Манухова, включающая разработку идеи, плана экспериментов и интерпретацию результатов, финансировалась в рамках проекта FSMG-2020-0003, соглашение № 075-00337-20-03, заказчик Министерство науки и высшего образования РФ.

Работа В.В. Фомина, включающая эксперименты с различными *lux*-боксами, финансировалась в рамках соглашения № 075-15-2019-1672 от 31.10.2019 г., заказчик Министерство науки и высшего образования РФ.

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 W.C., Winans S.C., Greenberg E.P.* Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators // *J. Bacteriol.* 1994. V. 176. № 2. P. 269–275. <https://doi.org/10.1128/jb.176.2.269-275.1994>
2. *Eberhard A., Burlingame A.L., Eberhard C. et al.* Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase // *Biochemistry.* 1981. V. 20. № 9. P. 2444–2449. <https://doi.org/10.1021/bi00512a013>
3. *Khrulnova S.A., Manukhov I.V., Zarubina A.P., Zavilgelsky G.B.* *Aliivibrio logei* KCh1 (Kamchatka Isolate): Biochemical and bioluminescence characteristics and cloning of the *lux* operon // *Microbiology.* 2010. № 3. P. 349–355. <https://doi.org/10.1134/S0026261710030112>
4. *Hansen H., Purohit A.A., Leiros H.K.S. et al.* The autoinducer synthases LuxI and AinS are responsible for temperature-dependent AHL production in the fish pathogen *Aliivibrio salmonicida* // *BMC Microbiol.* 2015. V. 15. № 1. P. 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0402-z>
5. *Manukhov I.V., Khrul'nova S.A., Baranova A., Zavilgelsky G.B.* Comparative analysis of the *lux* operons in *Aliivibrio logei* KCh1 (a Kamchatka Isolate) and *Aliivibrio salmonicida* // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. № 15. P. 3998–4001. <https://doi.org/10.1128/JB.05320-11>
6. *Devine J.H., Shadel G.S., Baldwin T.O. et al.* Identification of the operator of the *lux* regulon from the *Vibrio fischeri* strain ATCC7744 (bioluminescence/regulation/autoinduction/repression/activator) // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. P. 5688–5692.



7. *Fidopiastis P.M., Sørum H., Ruby E.G.* Cryptic luminescence in the cold-water fish pathogen *Vibrio salmonicida* // Arch. Microbiol. 1999. V. 171. № 3. P. 205–209. <https://doi.org/10.1007/s002030050700>
8. *Khrulnova S.A., Baranova A., Bazhenov S.V. et al.* Lux-operon of the marine psychrophilic bacterium *Aliivibrio logei*: A comparative analysis of the LuxR1/LuxR2 regulatory activity in *Escherichia coli* cells // Microbiology. 2016. V. 162. № 4. P. 717–724. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000253>
9. *Konopleva M.N., Khrulnova S.A., Baranova A. et al.* 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. V. 473. № 4. P. 1158–1162. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.04.032>
10. *Bazhenov S.V., Khrulnova S.A., Konopleva M.N., Manukhov I.V.* Seasonal changes in luminescent intestinal microflora of the fish inhabiting the Bering and Okhotsk seas // FEMS Microbiol. Lett. 2019. V. 366. № 4. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz040>
11. *Guyer M.S., Reed R.R., Steitz J.A., Low K.B.* Identification of a sex-factor-affinity site in *E. coli* as gamma delta // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1981. V. 45. Pt 1. P. 135–140. <https://doi.org/10.1101/sqb.1981.045.01.022>
12. *Van Dyk T.K., Rosson R.A.* *Photorhabdus luminescens* luxCDABE promoter probe vectors // Methods Mol. Biol. 1998. V. 102. P. 85–95. <https://doi.org/10.1385/0-89603-520-4:85>
13. *Хрульнова С.А., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б.* “Quorum sensing” регуляция экспрессии lux-генов и структура lux-оперона у морских бактерий *Aliivibrio logei* // Генетика. 2011. Т. 47. № 12. С. 1596–1603.
14. *Манухов И.В., Котова В.Ю., Завильгельский Г.Б.* Внутриклеточные факторы регуляции экспрессии lux-оперона *Vibrio fischeri* в клетках *Escherichia coli* // Микробиология. 2006. Т. 75. № 4. С. 525–531.
15. *Melkina O.E., Goryanin I.I., Bazhenov S.V. et al.* Comparative analysis of *Aliivibrio logei* luxR1 and luxR2 genes regulation in *Escherichia coli* cells // Arch. Microbiol. 2019. V. 201. № 10. P. 1415–1425. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01691-3>
16. *Bazhenov S., Novoyatlova U., Scheglova E. et al.* Influence of the luxR regulatory gene dosage and expression level on the sensitivity of the whole-cell biosensor to Acyl-Homoserine Lactone // Biosensors. 2021. V. 11. № 6. P. 166. <https://doi.org/10.3390/bios11060166>
17. *Colton D.M., Stabb E.V., Hagen S.J.* Modeling analysis of signal sensitivity and specificity by *Vibrio fischeri* LuxR variants // PLoS One. 2015. V. 10. № 5. P. 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126474>
18. *Antunes L.C.M., Ferreira R.B.R., Lostroh C.P., Greenberg E.P.* A mutational analysis defines *Vibrio fischeri* LuxR binding sites // J. Bacteriol. 2008. V. 190. № 13. P. 4392–4397. <https://doi.org/10.1128/JB.01443-07>
19. *Bang S.S., Baumann P., Nealson K.H.* Phenotypic characterization of *Photobacterium logei* (sp. nov.), a species related to *P. fischeri* // Curr. Microbiol. 1978. V. 1. № 5. P. 285–288. <https://doi.org/10.1007/BF02601683>
20. *Engebrecht J.A., Silverman M.* Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 13. P. 4154–4158. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.13.4154>
21. *Манухов И.В.* Структура lux-оперона и механизмы регуляции типа “quorum sensing” у морских бактерий: Дис. ... д-ра биол. наук. 2011. 151 с.

## Two-Stage Activation of Lux-Regulon Psychrophilic Marine Luminescent Bacteria *Aliivibrio logei*

S. V. Bazhenov<sup>a, \*</sup>, E. S. Scheglova<sup>a</sup>, V. V. Fomin<sup>a</sup>, G. B. Zavilgelsky<sup>b</sup>, and I. V. Manukhov<sup>a, b, \*\*</sup>

<sup>a</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow oblast, Dolgoprudny, 141701 Russia

<sup>b</sup>State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 117545 Russia

\*e-mail: bazhenov1994@gmail.com

\*\*e-mail: manukhovi@mail.ru

The lux-regulon of the psychrophilic marine luminescent bacteria *Aliivibrio logei* is controlled by the “quorum sensing” LuxI/LuxR type system. In this work, the properties of the autoinducer-dependent regulation of the promoters of *luxI* and *luxCDABEG* genes were determined both by the measurement of the rate of autoinducer (AI) synthesis and the intensity of bioluminescence of *A. logei* cells and by the reporter genes activity in the heterologous system in *Escherichia coli* cells. The reporter genes were *luxCDABEG* of *Photorhabdus luminescens* under the control of the promoters of the interest from *A. logei*. It was shown that there are differences in the AI-dependent activation of the *luxCDABEG* operon and the separately located *luxI* gene in the *A. logei* cells. The expression of *luxI* is enhanced in the presence of 3-oxo-hexanoyl-homoserine lactone at concentrations of the order of 10 nM, while the expression of *luxCDABEG* genes is enhanced at significantly higher concentrations – 1 μM and higher. This is determined both by the sequence of the binding site of the regulatory proteins lux-box2 and lux-box1 within the respective promoters and by the properties of the two proteins LuxR1 and LuxR2, which differ in their ability to bind the AI.

**Keywords:** quorum sensing, luminescence, autoinducer, regulation, *Aliivibrio logei*, luxR.