
ИССЛЕДОВАНИЕ СОВМЕСТНОЙ РЕГУЛЯТОРНОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКА LUXR ИЗ БАКТЕРИЙ ALIIVIBRIO FISCHERI И БЕЛКА LUXR2 ИЗ ALIIVIBRIO LOGEI

Герасимова Таисия Владимировна,

Студентка 6 курса

Московского Государственного Университета имени М.В.Ломоносова отделения

“Фармация”

taya.gerasimova@yandex.ru

Аннотация

В данной статье рассматривается механизм клеточной регуляции микроорганизмов, известный как «чувство кворума» (Quorum Sensing, QS), который позволяет бактериям координировать экспрессию генов в зависимости от плотности популяции. QS-организмы выделяют аутоиндукторы (АИ), что приводит к изменению генетической активности в ответ на увеличение их численности. Этот механизм, впервые описанный в люминесцентных бактериях *Aliivibrio fischeri*, представляет значительный интерес для научного сообщества, поскольку используется некоторыми патогенными микроорганизмами и влияет на такие характеристики, как вирулентность и люминесценция.

Целью исследования является оценка совместимости мезофильного белка LuxR из *A. fischeri* и психрофильного белка LuxR2 из *A. logei* для создания цельноклеточного биосенсора, способного детектировать АИ в биологических образцах. В ходе исследования было установлено, что увеличение экспрессии luxR2 *A. logei* повышает чувствительность и скорость индукции люминесценции клеток к АИ. Комбинированное использование белков LuxR и LuxR2 демонстрировало большую эффективность, чем их отдельное применение, что может указывать на возможность формирования функциональных гетеродимеров.

Актуальность работы заключается в том, что использование светящихся бактерий может служить индикатором качества рыбы в экосистемах, таких как, в частности, Белое море, что позволит проводить мониторинг состояния водоемов и оценку влияния антропогенных факторов на морские экосистемы.

Ключевые слова: чувство кворума, аутоиндукторы, люминесценция, *Aliivibrio fischeri*, *Aliivibrio logei*, цельноклеточный биосенсор, мониторинг экосистем

INVESTIGATION OF THE JOINT REGULATORY ACTIVITY OF LUXR PROTEIN FROM THE BACTERIA ALIIVIBRIO FISCHERI AND LUXR2 PROTEIN FROM ALIIVIBRIO LOGEI

Gerasimova Taisiya Vladimirovna,

6th year student

Lomonosov Moscow State University Department of Pharmacy

taya.gerasimova@yandex.ru

ABSTRACT

This article examines the mechanism of cellular regulation of microorganisms, known as "Quorum Sensing" (QS), which allows bacteria to coordinate gene expression depending on population density. QS organisms secrete auto-inductors (AI), which leads to a change in genetic activity in response to an increase in their number. This mechanism, first described in the luminescent bacteria *Aliivibrio fischeri*, is of considerable interest to the scientific community because it is used by some pathogenic microorganisms and affects characteristics such as virulence and luminescence.

The aim of the study is to evaluate the compatibility of the mesophilic LuxR protein from *A. fischeri* and the psychrophilic LuxR2 protein from *A. logei* to create an entire cell biosensor capable of detecting AI in biological samples. During the study, it was found that an increase in the expression of luxR2 *A. logei* increases the sensitivity and rate of induction of luminescence of cells to AI. The combined use of LuxR and LuxR2 proteins demonstrated greater efficiency than their separate use, which may indicate the possibility of forming functional heterodimers.

The relevance of the work lies in the fact that the use of luminous bacteria can serve as an indicator of the quality of fish in ecosystems, such as, in particular, the White Sea, which will allow monitoring the state of reservoirs and assessing the impact of anthropogenic factors on marine ecosystems.

Keywords: quorum sensing, auto-inductors, luminescence, *Aliivibrio fischeri*, *Aliivibrio logei*, whole cell biosensor, ecosystem monitoring

Введение. «Чувство кворума» представляет собой систему межклеточного взаимодействия у бактерий, позволяющую им координировать свои действия в зависимости от плотности популяции [8]. Данный механизм основан на сигнальной коммуникации, которая запускается при достижении определенной концентрации внеклеточных сигнальных молекул, называемых аутоиндукторами [3; 5]. Повышенная плотность бактериальной популяции приводит к накоплению аутоиндукторов в окружающей среде [5]. При достижении критической концентрации аутоиндукторы связываются со специфическими рецепторами QS, что активирует или ингибирует экспрессию определенных генов. Изменение геномной активности, опосредованное QS, приводит к координации разнообразных физиологических процессов у бактерий, включая биолюминесценцию, формирование биопленок, синтез вторичных метаболитов, компетентность к трансформации ДНК и продукцию факторов вирулентности [4; 9].

Люминесцентные морские бактерии *Aliivibrio logei* были описаны и выделены в отдельный вид из рода *Vibrio* (в настоящее время именуемого *Aliivibrio*) в 1978 году [7]. Эти бактерии имеют незначительные отличия от близкородственного вида *A. fischeri*, однако, *A. logei* классифицируются как психрофильные организмы, способные развиваться при температуре 4°C и не проявляющие активности при 30°C. В отличие от них, *A. fischeri* являются типичными мезофилами, не функционирующими при 4°C, но активно размножающимися при 30°C. Исследования показали, что обе группы бактерий выступают симбионтами кальмаров. *A. fischeri* живут в фотофорах кальмаров рода *Euprymna*, обитающих в теплых водах Гавайских островов и западной части Тихого океана; *A. logei* же встречаются исключительно в фотофорах кальмаров рода *Sepiola*, населяющих более глубокие и холодные воды Атлантики [2]. Установлено, что *A. logei* и *A. fischeri* имеют сходные биохимические характеристики, включая декарбоксилирование лизина,

восстановление нитратов и ферментацию D-галактозы и мальтозы. Однако, они значительно отличаются от близкородственного вида *A. salmonicida*, который демонстрирует люминесценцию только при добавлении в среду субстрата для люциферазы тетрадеканала [1]. Сравнительный анализ генов 16S рРНК показал практически полную идентичность между *A. logei* и *A. salmonicida*, а также значительные различия между ними и *A. fischeri* [2].

QS впервые была выявлена у бактерий *A. fischeri*, где она регулирует экспрессию lux-оперона, ответственного за синтез люциферазы и, соответственно, биолюминесценцию. При концентрации клеток ниже 100 кл/мл свечение не происходит, но при достижении порога 10⁷ кл/мл уровень АИ возрастает, что активирует люминесценцию. Основные компоненты QS-системы включают белки LuxI и LuxR: LuxI синтезирует АИ (N-ацил-L-гомосеринлактон), а LuxR, взаимодействуя с АИ, формирует димер и связывается с lux-боксом ДНК, активируя транскрипцию lux-оперона.

Люцифераза, состоящая из α - и β -субъединиц, кодируется генами luxA и luxB, а luxC, luxD и luxE отвечают за синтез редуктазы жирных кислот, необходимой для образования алифатического альдегида, который окисляется с выделением света. *A. fischeri* и *A. logei* имеют различные lux-опероны: у первой – один ген luxR, у второй – два (luxR1 и luxR2). У *A. fischeri* гены, отвечающие за синтез АИ и люминесценцию, транскрибируются совместно, в то время как у *A. logei* – отдельно. Регуляторные белки LuxR1 и LuxR2 связываются с промоторными областями P1 и P2 в присутствии АИ [6].

Материал и методы.

Штаммы: *E. coli* MG1655 (F- lambda- ilvG- rfb-50 rph-1). Плазмиды: pVFR1 – содержит репортерные гены luxCDABE, регулируемые промотором Pr и геном luxR под промотором P1 из вектора pDEW201. pSV16 – аналогична pVFR1, но включает ген luxR2 и регуляторную область P2. pIV2 – включает ген luxR2 с собственным промотором. Среды: Luria Bertani (LB).

Методы: расев на агаризованную среду LB; засев в жидкую среду; трансформация кальциевым методом; измерение люминесценции с помощью планшетного люминометра Immunotech LM-01A. Результаты измерений люминесценции в каждой лунке в зависимости от времени анализировались с помощью программы Excel MS.

Трансформация клеток *E. coli* кальциевым методом. Клетки *E. coli* MG1655 были трансформированы плазмидами pSV16 или pVFR1, затем частично плазмидой pIV2. Полученные колонии бактерий-биосенсоров, содержащих одну или две плазмиды, были отобраны на средах с антибиотиками (ампициллин и хлорамфеникол). Далее осуществлялась характеристика полученных биосенсоров.

Результаты и обсуждение.

Характеристика биосенсоров:

MG1655 pVFR1: Биосенсор демонстрировал высокую скорость реакции: изменения люминесценции наблюдались уже через 2-3 минуты после добавления АИ. Чувствительность биосенсора составляла 1 нМ АИ. Итог: высокая скорость реакции на АИ, минимальная детектируемая концентрация 1 нМ.

MG1655 pSV16: Биосенсор был чувствителен к АИ, но реагировал медленно. Минимальная детектируемая концентрация АИ – 10 нМ, заметное увеличение люминесценции наблюдалось только после 25 минут при 100 нМ АИ. Итог: наименьшая скорость реакции на АИ, минимальная детектируемая концентрация 10 нМ.

MG1655 pVFR1 + pIV2: Биосенсор реагировал на добавление АИ с высокой скоростью. Детектировал повышение люминесценции уже через несколько минут после добавления АИ, достигая пика более 105 относительных единиц после 80 мин. Минимальная

детектируемая концентрация АИ составляла 0,3 нМ. Итог: наивысшая скорость реакции на АИ, минимальная детектируемая концентрация 0,3 нМ.

MG1655 pSV16 + pIV2: Биосенсор быстро реагировал на добавление АИ, демонстрируя увеличение люминесценции в течение нескольких минут при концентрациях АИ от 3 до 100 нМ. Чувствительность позволяла обнаружить АИ в концентрациях до 0,3 нМ. Итог: высокая скорость реакции на АИ, минимальная детектируемая концентрация 0,3 нМ.

Результаты представлены на рис. 1

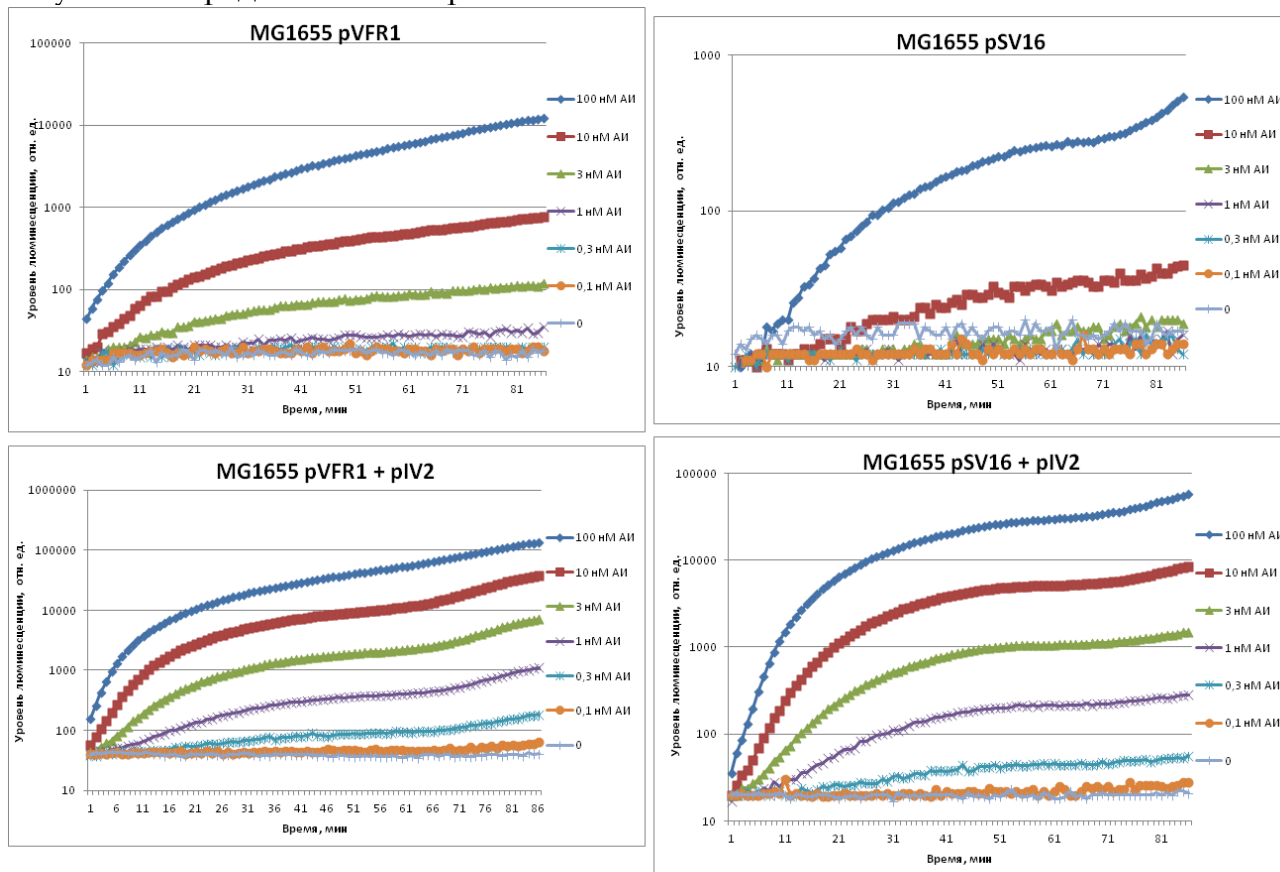


Рисунок 1 – Зависимость люминесценции биосенсоров от времени в присутствии АИ в среде

Сравнительная характеристика:

Чувствительность: pVFR1 более чувствителен, чем pSV16. Комбинация плазмид повышала чувствительность и амплитуду ответа (рис.2).

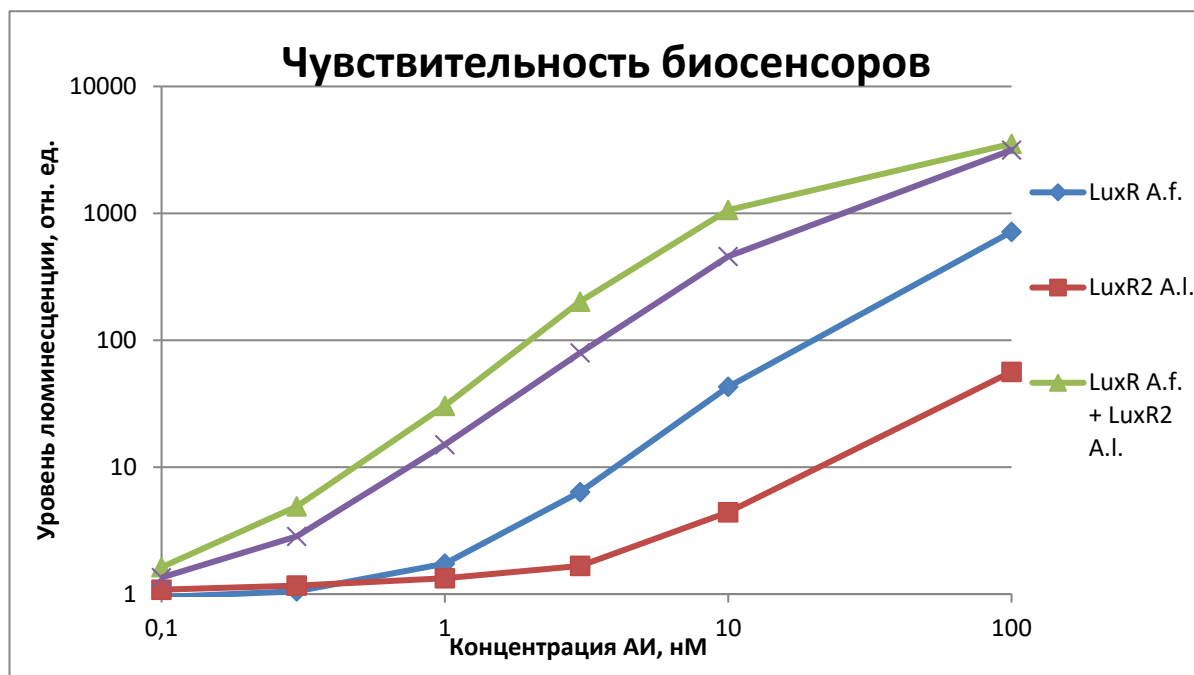


Рисунок 2 – Зависимость люминесценции биосенсоров, содержащих белки LuxR A. fischeri, LuxR2 A. logei, а также их комбинации, от концентрации АИ, измеренная через 90 минут после добавления АИ

Скорость: комбинация плазмид увеличивала скорость индукции люминесценции по сравнению с отдельными плазмидами (рис. 3).

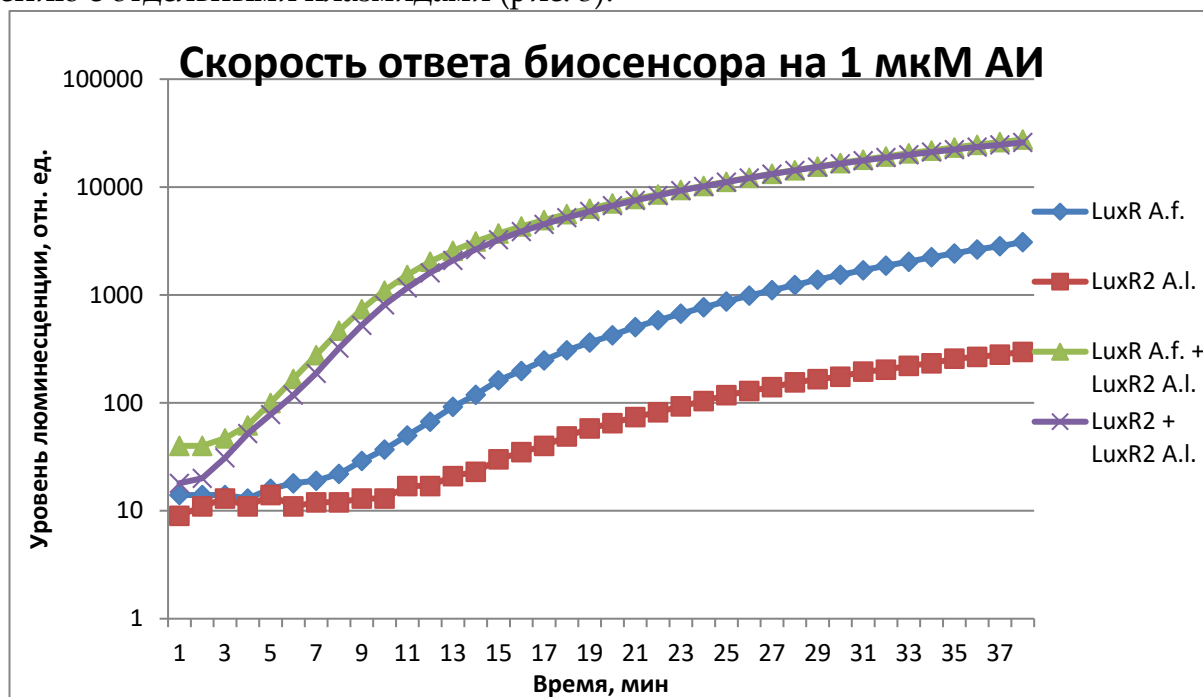


Рисунок 3 – Зависимость люминесценции биосенсоров, содержащих белки LuxR A. fischeri, LuxR2 A. logei, а также их комбинации, от времени при добавлении АИ в концентрации 1 мкМ

Заключение. В рамках исследования была оценена эффективность применения комбинаций мезофильных и психрофильных белков из семейства LuxR для детекции аутоиндукторов первого типа на биосенсорах, включающих как мезофильные, так и психрофильные белки, а также их различные сочетания (мезофильный с психрофильным или психрофильный с психрофильным). Сравнительный анализ всех разработанных биосенсоров позволил сделать следующие выводы:

1. Увеличение экспрессии регуляторного гена luxR2 *A. logei* способствует повышению чувствительности и скорости индукции люминесценции клеток в ответ на присутствие аутоиндукторов в среде.

2. Комбинация мезофильного белка luxR *A. fischeri* и психрофильного белка luxR2 *A. logei* демонстрирует более высокую чувствительность и скорость реакции цельноклеточного биосенсора по сравнению с индивидуальным использованием каждого из этих генов, что может свидетельствовать о способности белков LuxR и LuxR2 формировать функциональные гетеродимеры.

Список литературы:

1. Fidopiastis P. M., Sørum H., Ruby E. G. Cryptic luminescence in the cold-water fish pathogen *Vibrio salmonicida* // Archives of microbiology. – 1999. – Т. 171. – С. 205-209.
2. Fidopiastis P. M., Von Boletzky S., Ruby E. G. A new niche for *Vibrio logei*, the predominant light organ symbiont of squids in the genus *Sepiola* // Journal of Bacteriology. – 1998. – Т. 180. – №. 1. – С. 59-64.
3. Jayaraman A., Wood T. K. Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease // Annu. Rev. Biomed. Eng. – 2008. – Т. 10. – №. 1. – С. 145-167.
4. Ng W. L., Bassler B. L. Bacterial quorum-sensing network architectures // Annual review of genetics. – 2009. – Т. 43. – №. 1. – С. 197-222.
5. Papenfort K., Bassler B. L. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria // Nature Reviews Microbiology. – 2016. – Т. 14. – №. 9. – С. 576-588.
6. Stabb E. V. et al. Quorum signaling and symbiosis in the marine luminous bacterium *Vibrio fischeri* // Chemical communication among bacteria. – 2008. – С. 233-250.
7. Urbanczyk H. et al. Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2007. – Т. 57. – №. 12. – С. 2823-2829.
8. Waters C. M., Bassler B. L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 2005. – Т. 21. – №. 1. – С. 319-346.
9. Yi L. et al. Research progress of bacterial quorum sensing receptors: Classification, structure, function and characteristics // Science of the Total Environment. – 2021. – Т. 763. – С. 143031.