

Р.В.Грицай¹, І.О. Антіпов І.О.², Л.Д. Варбанець¹

¹Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна

²Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ

ІДЕНТИФІКАЦІЯ 16S РНК ТА PAGL ГЕНІВ RALSTONIA SOLANACEARUM

Проаналізовано особливості нуклеотидних послідовностей генів ліпід А деацилаз (PagL) *Ralstonia solanacearum*, представлених на сьогодні в базі даних GenBank. Підбрано праймери та проведено скринінг 12-ти штамів *Ralstonia solanacearum* на наявність в їхньому геномі гену PagL за допомогою методу ПЛР. Ідентифіковано ген в штамі 749, та показано залежність його транскрипції від зовнішніх умов культивування бактерій на основі методу ЗТ-ПЛР.

К л ю ч о в і с л о в а: ліпід А, ПЛР, ферменти ковалентної модифікації ЛПС, зворотна транскрипція.

Ліпід А – гідрофобна частина молекули ЛПС та основний компонент зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій, що обумовлює її асиметричну будову та виконання бар'єрної функції. Протягом останніх 15 років було відкрито ферменти конститутивного біосинтезу ліпиду А, клонуванням підтверджено їхні функції для ентеробактерій, та знайдено відповідні гомологи в геномі більшості фітопатогенних бактерій. Окрім того, вперше для ентеробактерій було описано існування регульованих механізмів ковалентної модифікації ліпиду А, і показано їхню роль в процесі патогенезу та адаптації до зміни умов середовища [6].

Всього відомо більше десятка генів грамнегативних бактерій, що кодують ферменти структурної модифікації як гідрофобної, так і вуглеводної частини ЛПС. Для більшості з них розкрито механізм регуляції експресії – активація транскрипції відбувається у відповідь на появу певних несприятливих факторів середовища. Так, наприклад, для бактерій кишкової групи та псевдомонад дані гени знаходяться під контролем двохкомпонентних мембранних рецепторів: PhoP/PhoQ та залежного – PmrA/PmrB. У відповідь на зменшення концентрації іонів магнію чи появи катіонних антимікробних пептидів у середовищі, сенсорна кіназа PhoP фосфорилує генний активатор PhoQ. Мутанти із дефектами в PhoP/PhoQ характеризуються послабленою вірулентністю та підвищеною чутливістю до пептидних антибіотиків [8].

Серед всіх типів модифікації ліпиду А найбільш вивченими є такі: приєднання пальмітату за допомогою ферменту PagP, деацилювання диглюкозаміну в положенні 3 (PagL), фосфорилування в положенні 1 (LpxE), приєднання L-4-N-арабінози (AmT) тощо. Нещодавно було показано існування гомологів гену PagL для цілого ряду грамнегативних бактерій, в тому числі збудника вілту рослин – *Ralstonia solanacearum*, для якого генетична основа синтезу ЛПС вивчена ще дуже фрагментарно. Показано, що на рівні амінокислотної послідовності коефіцієнт гомології для ферменту PagL між різними видами бактерій досить низький [3]. Для *Pseudomonas aeruginosa*, як і для *Salmonella typhimurium* було описано кристалічну будову ферменту – це 8-ми ланцюгова β-складчаста структура, що інтегрована в зовнішню мембрану бактерій, каталітичний центр якої містить Сер-Гіс-Глу на С-кінці поліпептиду. Клонуванням в *E. coli* підтверджено активність PagL *Bordetella bronchiseptica* та показано існування відповідного гену для деяких штамів близькоспорідненого до нього виду *R. solanacearum* [4].

Метою роботи було підібрати праймери для скринінгу 12 штамів *R. solanacearum* різного географічного походження на наявність в складі їхнього геному гену ліпід А-3-0-деацилази та вивчити вплив на регуляцію його активності деяких зовнішніх

© Р.В. Грицай, І.О. Антіпов І.О., Л.Д. Варбанець, 2013

факторів середовища.

Матеріали та методи. В роботі використовували 12 штамів *R. solanacearum* 4, 35, 526, 749, 758, 5712, 7954, 7859, 8089, 8202, TX₁, TS₃, які вирощували на картопляному агарі. Для вивчення впливу зовнішніх умов на експресію гену PagL культури бактерій вирощували на рідкому синтетичному середовищі N [9] при температурах 28 °C і 37 °C та відсутності іонів Mg²⁺, pH 7.0 та 5.8. Культивування бактерій на рослинному субстраті проводили шляхом інокуляції 1 мл суспензії бактеріальних клітин у фізрозчині диска, вирізаного із бульби картоплі, який потім поміщали у вологу камеру при 28 °C на 2 доби.

Вирівнювання нуклеотидних послідовностей проводили з використанням програми BioEdit (Ibis Biosciences).

Праймери підбирали з використанням комп'ютерних програм Oligo 7 (Molecular Biology Insights, Inc., США) та Primer-BLAST (NCBI, США). Послідовності праймерів до гену PagL: RsPagL-F: 5'-ACCAACCGCCAGAACCTGACC-3'; RsPagL-R: 5'-AAGCGATAGCCGACCTGGAAC-3'.

Для проведення ПЛР, використовували 2 мкл супернатанту прокип'яченої суспензії бактеріальних клітин (95 °C, 15 хв). Виділення РНК здійснювали за допомогою комерційних наборів Diatom RNA Prep 100, синтез кДНК проводили за допомогою наборів RT-PCR Core. Як внутрішній контроль використовували ЗТ-ПЛР із праймерами до 16S РНК *R. solanacearum*.

ПЛР проводили з використанням комерційних наборів GenePak PCR Core («Ізоген», Росія), згідно з інструкцією виробника. Програма ампліфікації була такою: початкова денатурація – 3 хв за температури 95°C; 35 циклів: 20 с за 95 °C, 30 с за 60 °C, 40 с за 72 °C; термінальна елонгація – 3 хв за 72 °C. Реакційна суміш містила 20 пМ кожної з пари праймерів.

Електрофоретичний розподіл продуктів ПЛР проводили в 1,5%-ому агарозному гелі, що містив бромистий етидій (0,5 мкг/мкл), протягом 1 години, при напрузі 3 В/см довжини гелю.

Визначення довжин ампліконів в гелі здійснювали за допомогою програми Gel-Pro Analyzer 4.5 (Media Cybernetics, Inc., США).

Результати та їх обговорення. Аналіз бази даних GenBank виявляє декілька штамів *R. solanacearum*, в яких було ідентифіковано ген PagL, що представляють різні раси та біовари. Даний ген може розміщуватись як на хромосомі, так і на мегаплазміді, однак є монокопійним. Окрім того, нуклеотидну послідовність PagL можна знайти в складі дрібних плазмід (наприклад RCFBPv3_mр, штаму CFBP2957), що може свідчити про можливість горизонтального трансферу. GC-склад нуклеотидної послідовності гену PagL (67 %) відповідає середньому значенню частки GC-основ для всього геному *R. solanacearum* [1]. Іншим підтвердженням гіпотези про тривале еволюціонування PagL *R. solanacearum* є низький рівень гомології із ліпід А-деацिलाзами інших бактерій. Пошук в базі даних білкових послідовностей за допомогою програми blastp виявив існування в складі геномів штамів *R. solanacearum* ряду гіпотетичних протеїнів, амінокислотна послідовність яких повністю ідентична такій для PagL продукту цього виду бактерій. Це підтверджує той факт, що вивчення генетичної основи ковалентної модифікації ліпиду А для такого гетерогенного виду як *R. solanacearum* є актуальним на даному етапі досліджень. Незважаючи на те, що вперше ген PagL був ідентифікований для *Salmonella* sp., в інших представників ентеробактерій його ортологів виявлено не було [6]. Окрім того, він характеризується низьким значенням GC складу (39 %), що є нижчим від загального для геному сальмонел (53 %). Це свідчить, що даний вид отримав цей ген через горизонтальний трансфер, але не від бактерій із високим значенням GC складу. Більш того, аналіз відомих на сьогодні гомологів PagL показує, що він характерний в основному для представників роду β-протеобактерій і має давнє еволюційне походження, оскільки дивергенція за амінокислотною послідовністю корелює із філогенетичними дистан-

ціями між видами.

В якості ДНК-матриці при підборі праймерів до гену *PagL* було взято консенсусну послідовність після вирівнювання генів *PagL* штамів *R. solanacearum*, в яких було підтверджено трансляцію даного гену. Вирівнювання із нуклеотидними послідовностями близькоспоріднених видів бактерій не дало змогу підібрати універсальні праймери до них внаслідок низького коефіцієнту гомології.

Підібрані нами праймери до гену *PagL* відповідають наступним критеріям: довжина продукту – 227 п.н., розрахована температура відпалу від ДНК-матриці – 63 °С, максимальна температура плавлення димерів праймерів – 12 °С.

ПЛР із 12 штамми *R. solanacearum* в мультиплексній реакції виявив присутність цільової олігонуклеотидної послідовності *PagL* лише в одному із них – шт. 749 (рис. 1). Раніше нами було продемонстровано модифікацію жирнокислотного складу ЛПС для даного штаму при підвищенні температури культивування [2]. Так, при температурі росту 37 °С спостерігалась втрата 3-гідрокситетрадеканової кислоти, при одночасному збільшенні вмісту пальмітату. Ми припускаємо, що такі зміни можуть бути пояснені активністю генів *PagL* та *PagP* відповідно. Однак для *R. solanacearum* в літературі даних про ідентифікацію відповідних генів на сьогодні немає.

М 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 К-

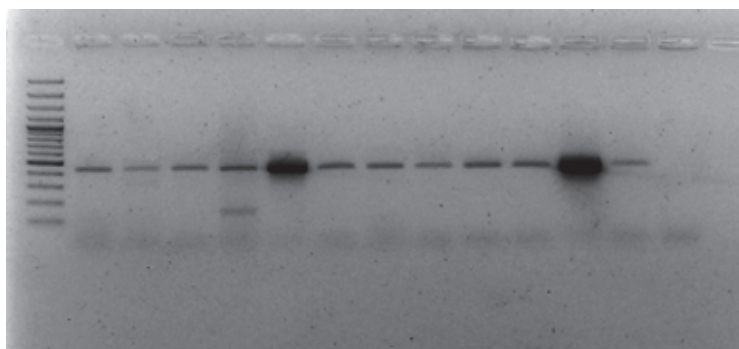


Рис. 1. Мультиплексна ПЛР із праймерами до 16S РНК та *PagL* генів *R. solanacearum*. 1- 4, 2-35, 3-526, 4-749, 5-758, 6-5712, 7-7859, 8-7954, 9-8089, 10-8202, 11-ТХ₁, 12- ТS₃, К- негативний контроль (вода), М-маркер молекулярної маси O'Gene Ruler 100 bp (Fermentas).

З метою з'ясування ролі ідентифікованого нами гену в процесі ковалентної модифікації ліпиду А, провели реєстрацію його активності за допомогою ПЛР зі зворотною транскрипцією. З літературних даних відомо, що активація *PagL S. typhimurium* відбувається при зниженні концентрації іонів магнію в середовищі <100 мкМ та рН < 5,8 [7]. В механізмі регуляції активності гену бере участь двокомпонентний мембранний рецептор PhoP/Q, гомологів якого в геномі *R. solanacearum* не виявлено. Тож залишаються не зрозумілими фізіологічний стан та біологічне значення гену та його продукту для життєдіяльності збудника бурої бактеріальної гнилі картоплі.

З метою розкриття цих питань, нами здійснено ідентифікацію транскрипції гену *PagL R. solanacearum*, культури яких вирощували на рідкому та твердому середовищах за різних умов, а також отримали із мацерованої тканини зараженої рослини.

Результати проведеної ЗТ-ПЛР *R. solanacearum* 749, єдиним із проаналізованих нами штамів в складі якого ідентифіковано ген *PagL*, наведені на рис. 2. Із представлених даних видно, що продукт ампліфікації візуалізується тільки в двох зразках – отриманих із бактерій, вирощених на картопляному агарі та з ексудату зараженої бульби картоплі. Звідси можна зробити висновки, що в активації роботи ліпід А-3-О-деацилази бере участь певний компонент або їх сукупність, що міститься в

складі рослин картоплі, а отже відщеплення 3-гідроксиміристату може мати певне значення в процесі патогенезу. Ці хімічні фактори мають вірогідніше небілкову природу, оскільки вони перенесли автоклавування в процесі приготування картопляного агару.

Той факт, що підвищення температури культивування призводило до зникнення 3-гідроксиміристинової кислоти зі складу ліпиду *A. R. solanacearum*, проте не викликало активації транскрипції *PagL*, можна пояснити тим, що або існують інші механізми відщеплення даної жирної кислоти, або рівень активності гену *PagL*, індукований високою температурою, нижчий порогу чутливості використовуваних нами для ідентифікації методів.

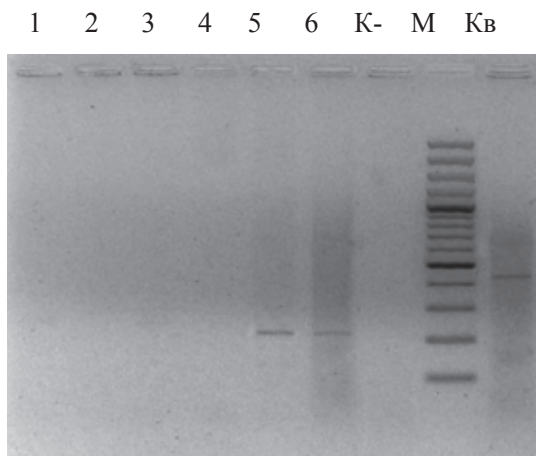


Рис. 2. ЗТ-ПЛР РНК виділеної із бактерій *R. solanacearum* 749 культивованих за різних умов з праймерами до генів *PagL* та 16S РНК. 1 – нормальні умови; 2 – відсутність магнію; 3 – рН 5,8; 4 – 37 °С; 5 – ексудат інфікованої рослини; 6 – бактерії, вирощені на картопляному агарі; К- – негативний контроль (вода); М – маркер молекулярної ваги (O'Gene Ruler 100 bp (Fermentas)); Кв – внутрішній контроль (праймери до 16 S РНК).

Висновки. Таким чином, нами підібрані праймери та умови ПЛР для ідентифікації гену ліпид А-3-гідроксиміристиноілтрансферази, проаналізовано секвеновані послідовності ліпид А деацилаз *R. solanacearum*, вивчено транскрипцію гену *PagL* за різних умов культивування бактерій.

Штами *R. solanacearum* були одержані нами із ICMP (749, 758, 5712, 7954, 7859, 8089, 8202), від Н.В. Житкевич (4, 35, 526), від В.О. Іваниці (ТХ₁, ТS₃).

Р.В. Грицай¹, И.А. Антипов², Л.Д. Варбанец¹

¹Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

²Національний університет біоресурсів і природопользовання України, Київ

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ 16S РНК И PAGL RALSTONIA SOLANACEARUM

Резюме

Проанализированы особенности нуклеотидных последовательностей генов липид А деацилаз (*PagL*) *R. solanacearum*, представленных на сегодня в базе данных GenBank. Подобранные праймеры и проведен скрининг 12-ти штаммов *R. solanacearum* на наличие в их геноме гена *PagL* с помощью метода ПЦР. Идентифицирован ген в штамме 749, и показана зависимость его транскрипции от внешних условий культивирования бактерий с помощью метода ОТ-ПЦР.

К л ю ч е в ы е с л о в а: липид А, ПЛР, ферменты ковалентной модификации ЛПС, обратная транскрипция.

IDENTIFICATION OF 16S RNA AND PAGL GENES OF RALSTONIA SOLANACEARUM

S u m m a r y

Features of nucleic acids sequences of genes of lipid A deacylases of *R. solanacearum*, which are presented in GenBank database, were analyzed. Primers to this gene were selected, and using them 12 strains of *R. solanacearum* were analyzed for the presence of this gene in their genome by means of PCR method. PagL gene was identified in strain 749, and dependence of its transcription on some environmental conditions was established.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: lipid A, PCR, enzymes of covalent modification of LPS, back transcription.

The author's address: Gritsay R.V., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Варбанец Л.Д., Здоровенко Г.М., Кнурель Ю.А. Методы исследования эндотоксинов. – Киев: Наук. думка, 2006. – 237 с.
2. Грицай П. В., Броварська О. С., Варбанець Л. Д. Вплив температури культивування на склад ліпополісахаридів *Ralstonia solanacearum* // Мікробіол. журн. – 2011. – **73**, № 4. – С. 24–29.
3. Geurtsen J., Steeghs L., Hove J.T., van der Ley P., Tommassen J. Dissemination of lipid A deacylases (pagL) among gram-negative bacteria: identification of active-site histidine and serine residues // J. Biol. Chem. – 2005. – **280**. – P. 8248–8259.
4. MacArthur I., Jones J.W., Goodlett D.R., Ernst R.K., Preston A. Role of pagL and lpxO in *Bordetella bronchiseptica* lipid A biosynthesis // J. Bacteriol. – 2011. – **193**. – P. 4726–4735.
5. Perez J.C., Groisman E.A. Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of *Salmonella enterica* // Mol. Microbiol. – 2007. – **63**. – P. 283–293.
6. Raetz C.R., Reynolds C.M., Trent M.S., Bishop R.E. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria // Annu. Rev. Biochem. – 2007. – **76**. – P. 295–329.
7. Remenant B., Coupat-Goutaland B., Guidot A., Cellier G., Wicker E., Allen C., Fegan M., Pruvost O., Elbaz M., Calteau A., Salvignol G., Mornico D., Mangenot S., Barbe V., Médigue C., Prior P. Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence // BMC Genomics. – 2010. – **11**. – P. 379–395.
8. Richards S.M., Strandberg K.L., Conroy M., Gunn J.S. Cationic antimicrobial peptides serve as activation signals for the *Salmonella typhimurium* PhoPQ and PmrAB regulons in vitro and in vivo // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2012. – **2**. – P. 1–10.
9. Trent M.S., Pabich W., Raetz C.R., Miller S.I. A PhoP/PhoQ-induced Lipase (PagL) that catalyzes 3-O-deacylation of lipid A precursors in membranes of *Salmonella typhimurium* // J. Biol. Chem. – 2001. – **276**. – P. 9083–9092.

Отримано 15.10.2012