

На правах рукописи

Горшков Владимир Юрьевич

**МЕЖКЛЕТОЧНАЯ КОММУНИКАЦИЯ В ПОПУЛЯЦИЯХ
PESTOBACTERIUM ATROSEPTICUM SCRI1043 ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ
С РАСТЕНИЕМ-ХОЗЯИНОМ И В УСЛОВИЯХ ГОЛОДАНИЯ**

**03.00.12.- физиология и биохимия растений
03.00.07.- микробиология**

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Казань – 2009

Работа выполнена в группе молекулярной биологии Учреждения Российской академии наук Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
Гоголев Юрий Викторович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор,
Эль-Регистан Галина Ивановна

доктор биологических наук,
Минибаева Фарида Вилевна

Ведущая организация: Казанский государственный университет
им. Ульянова-Ленина

Защита состоится 24 декабря 2009 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 002.005.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Учреждении Российской академии наук Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, а/я № 30, тел/факс (843)2927347

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Казанского научного центра РАН.

Автореферат разослан «23» ноября 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А.Б. Иванова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка проблемы и ее актуальность. Формирование растительно-микробных сообществ в естественных экосистемах является сложным и динамичным процессом, в результате которого возникают различные типы взаимоотношений между макро- и микроорганизмами. Важную роль при развитии инфекционных заболеваний растений, установлении симбиотических и ассоциативных взаимоотношений играют процессы передачи информационных сигналов, обеспечивающие формирование адекватного физиологического ответа партнеров друг на друга и на условия окружающей среды. Описанию сигнальных систем бактерий и растений посвящено достаточно много теоретических и экспериментальных работ (Whitehead *et al.*, 2001; Тарчевский, 2002). Однако лишь в последние годы появились предпосылки для изучения способов и механизмов вмешательства растений и бактерий в функционирование сигнальных систем друг друга (Mathesius *et al.*, 2003; Boyer, Wisniewski-Dye, 2009).

Важную роль на различных этапах формирования растительно-микробных сообществ играют бактериальные сигнальные системы межклеточной коммуникации (McDougald *et al.*, 2007). Ярким примером таких сигнальных систем, обеспечивающих координированное действие микроорганизмов, является система кворума, или «кворум сенсинг» (Fuqua, Winans, 1994). Она позволяет микроорганизмам реализовать коллективный ответ на уровне популяции клеток, результатом чего является проявление различных признаков, в том числе, определяющих особенности взаимодействия с растениями. Функционирование системы кворума основано на синтезе и восприятии аутоиндукторов, в частности ацилгомосерин лактонов (АГЛ). АГЛ накапливаются в бактериальном микроокружении по мере увеличения плотности популяции клеток. При достижении пороговой (функционально значимой) концентрации аутоиндукторов происходит активация экспрессии гена АГЛ-синтазы, что обеспечивает лавинообразное накопление АГЛ, которое, таким образом, регулируется по принципу положительной обратной связи. Растения, в свою очередь, способны воспринимать бактериальные сигналы и адекватно на них реагировать. Более того, растения часто используют систему кворума в качестве мишени для «борьбы с фитопатогенностью» микроорганизмов (Uroz *et al.*, 2009).

В изучении взаимодействия сигнальных систем макро- и микроорганизмов сделаны лишь первые шаги. Однако становится очевидным, что функциональные перестройки этих систем в различных условиях существенным образом отражаются на процессах передачи сигнала, что в значительной степени определяет «поведение» партнеров при взаимодействии. Межклеточная коммуникация необходима также для успешного переживания фитопатогенными бактериями условий невегетационного периода, что обеспечивает сохранение микроорганизмов и начало нового жизненного цикла, сопряженного с формированием взаимоотношений с растением-хозяином. В связи с этим, исследование способов вмешательства растений в бактериальный

сигналинг, а также модуляции системы кворума внешними сигналами на ключевых этапах формирования взаимоотношений с растением-хозяином являются актуальной темой для исследования. Удобным и интересным объектом для изучения функционирования системы межклеточной коммуникации в условиях, имитирующих природные ситуации, являются системы паразит/растение-хозяин, включающие фитопатогенную бактерию *Pectobacterium atrosepticum*. Такие системы отличаются широким спектром наблюдаемых способов взаимодействия. Важным обстоятельством является то, что у *P. atrosepticum* расшифрована первичная структура генома, а индивидуальные компоненты системы кворума в значительной степени охарактеризованы.

Цель и задачи исследования. Выяснение влияния метаболитов растений на систему межклеточной коммуникации *P. atrosepticum* SCRI1043 (*Pa*), а также роли этой системы в распознавании растения-хозяина и адаптации к стрессовым условиям невегетационного периода составило цель данного исследования.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить влияние метаболитов растений (*Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum*) на экспрессию бактериальных генов системы межклеточной коммуникации и накопление ацилгомосерин лактонов (АГЛ) в культурах *Pa*.
2. Выяснить участие системы межклеточной коммуникации *Pa* в распознавании растения в качестве организма-хозяина.
3. Определить влияние метаболитов растений на продукцию факторов вирулентности *Pa*.
4. Выяснить влияние неблагоприятных для роста условий (ограничение субстрата, длительная инкубация без смены среды культивирования) на жизнеспособность, ультраструктурные и молекулярно-генетические особенности клеток *Pa*.
5. Оценить фитопатогенность клеток *Pa*, находящихся в различных физиологических состояниях.
6. Выяснить особенности функционирования системы межклеточной коммуникации *Pa* при неблагоприятных для роста условиях, имитирующих невегетационный период.

Научная новизна. Впервые продемонстрировано участие метаболитов растений, не являющихся функциональными аналогами бактериального аутоиндуктора, в активации системы межклеточной коммуникации фитопатогенных бактерий. Показано, что активация бактериальной межклеточной коммуникации в данной системе паразит/хозяин происходит в результате активации синтеза АГЛ через глобальную регуляторную систему бактерий. Выявлено, что при совместном инкубировании клеток *Pa* и тканей растений (*S. tuberosum* и *N. tabacum*) уровень экспрессии гена АГЛ-синтазы и продукции АГЛ клетками *Pa* выше, чем в культурах бактерий той же плотности, выращиваемых на полноценных питательных средах. Установлено, что усиление индукции системы кворума бактерий организмом хозяина

происходит при участии водорастворимых термостабильных метаболитов растения с молекулярной массой менее 5 кДа.

Впервые показано, что система кворума *Pa* является частью сигнальной сети, отвечающей за распознавание растения в качестве организма-хозяина. Экспрессия гена АГЛ-синтазы, синтез АГЛ, а также активность одного из ключевых факторов вирулентности – пектатлиаз, стимулируются в присутствии тканей специфического растения-хозяина в большей степени, чем неспецифического.

Впервые показан спонтанный или индуцируемый аутоиндукторами анабиоза (C_{12} -алкилоксибензолом) переход клеток *Pa* в покоящееся состояние, сопряженное с полной потерей колониеобразующей способности и вирулентности. Установлено, что покоящиеся клетки *Pa* восстанавливают пролиферативную активность и фитопатогенность после смены среды инкубирования. Показано, что переход клеток в покоящееся состояние сопряжен с изменением матричных свойств надмолекулярных комплексов ДНК (НК ДНК).

Впервые показано, что в условиях дефицита субстрата в популяциях *Pa* происходит регуляция численности клеток, поддерживающих пролиферативную активность, при участии систем межклеточной коммуникации. В голодающих культурах с различным титром инокуляции ($10^3 - 10^9$ КОЕ/мл) титр КОЕ/мл стабилизируется в диапазоне величин $10^6 - 10^7$ в течение трех суток инкубирования. Продемонстрировано, что клетки *Pa* культур ранней стационарной фазы обладают значительным пролиферативным потенциалом в условиях дефицита углерода и фосфора. Данный потенциал реализуется при низкой исходной плотности (менее 10^6 КОЕ/мл). При этом достижение максимального значения титра КОЕ сопровождается индукцией экспрессии гена АГЛ-синтазы. Увеличение численности клеток ингибируется факторами, содержащимися в культуральной жидкости голодающих культур.

Научно-практическая значимость. Полученные данные вносят существенный вклад в понимание процессов взаимодействия растений-хозяев и фитопатогенных бактерий, а также адаптации микроорганизмов к условиям невегетационного периода. Результаты работы могут служить основой для создания новых способов контроля растительных бактериозов.

Разработаны процедуры количественного анализа бактериальной ДНК, позволяющие выявлять ДНК покоящихся форм бактерий с измененными матричными свойствами НК ДНК. На этой основе предложены методы детекции *Pa* и диагностики бактериозов растений, вызываемых данным возбудителем.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Исследования проводились в соответствии с планами НИР КИББ КазНЦ РАН (номер госрегистрации 01.2.007 03823); поддержаны грантом РФФИ № 08-04-01518-а, а также грантом ведущей научной школы академика И.А. Тарчевского.

Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора.

Положения, выносимые на защиту.

1. Метаболиты специфичного и неспецифичного растения-хозяина (картофель и табак, соответственно) индуцируют экспрессию гена АГЛ-синтазы и синтез АГЛ у *Pa*, что свидетельствует об участии растения-хозяина в активации системы межклеточной коммуникации (кворум-сенсинг). Индуцирующий эффект при этом оказывают водорастворимые термостабильные метаболиты растений, имеющие молекулярную массу менее 5 кДа.
2. Метаболиты специфичного растения-хозяина оказывают больший эффект на индукцию синтеза АГЛ и пектатлиазную активность *Pa*, чем неспецифичного.
3. В условиях голодания клетки *Pa* способны к обратимому переходу в покоящееся состояние, сопряженное с потерей способности к образованию колоний и фитопатогенности, с изменением ультраструктуры клеток, а также матричных свойств надмолекулярных комплексов ДНК.
4. В условиях голодания бактерии *Pa* используют стратегию регуляции плотности популяции клеток, поддерживающую пролиферативную активность, при участии систем межклеточной коммуникации.

Апробация работы. Результаты работы доложены на 12-ой международной Пущинской школе-конференции «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2008); международной школе-конференции «Генетика микроорганизмов и биотехнология», (Москва – Пушино, 2008); 4-ом съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. (Новосибирск, 2008); международной конференции «Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 2008); 13-ом симпозиуме студентов и аспирантов «SymBioSE 2009, Biology: Expansion of Borders» (Казань, 2009); Всероссийской научной конференции «Физиология и генетика микроорганизмов в природных и экспериментальных системах», посвященной памяти М.В. Гусева (Москва, 2009); 34-ом международном конгрессе FEBS «Life`s Molecular Interactions» (Прага, 2009); 1-ом Европейском конгрессе по бактериальным биопленкам «Eurobiofilms 2009» (Рим, 2009); Всероссийской конференции «Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды» (Иркутск, 2009); итоговых конференциях Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН (2007, 2008).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 25 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 187 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов, списка литературы. В работе представлено 2 таблицы и 25 рисунков. Список литературы включает 294 источника; из них 261 иностранных.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе был использован штамм *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Pa*) (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043) из коллекции микроорганизмов Белорусского гос. университета (г. Минск), любезно предоставленный доц. Е.А. Николайчиком. Штамм *Escherichia coli* JLD271, а также рекомбинантные плазмиды pAL103 и pAL104 любезно предоставлены проф. И.А. Хмель (Amber, Ahmer, 2005).

Растения табака (*Nicotiana tabacum* CV «Hawana») и картофеля (*Solanum tuberosum* сорт «Невский») выращивали в стерильных условиях на среде MS (Murashige, Skoog, 1962). Семена табака, полученные из Белорусского гос. университета, стерилизовали 2% раствором гипохлорида натрия с добавлением 0,5% SDS в течение 10-15 минут. Стерильные растения картофеля, полученные из НПО «Нива Татарстана» (г. Казань), размножали черенкованием в стерильных условиях.

В экспериментах по влиянию метаболитов растений на систему кворума и продукцию факторов вирулентности *Pa* использовали измельченные (2-3 мм) побеги стерильных растений, а также их водорастворимые экстракты. Бактериальные клетки инкубировали (плотность инокуляции $(2-5) \times 10^7$) в модифицированной среде D5 (Kado, Heskett, 1970) или в среде IM (Wei *et al.*, 1992), в том числе в присутствии измельченных тканей растений табака или картофеля (1 г / 20 мл) или их экстрактов, а также с добавлением среды LB (1/10). Культуры инкубировали при 25 °С без перемешивания. Процедура приготовления экстрактов основывалась на протоколе, описанном ранее (Mo *et al.*, 1995). Измельченную растительную массу заливали деионизированной водой (1/2,5, вес/объем) и экстрагировали при 4 °С в течение 2 ч. Экстракт центрифугировали (24000 g), фильтровали через нитроцеллюлозный фильтр (0,45 мкм), подвергали ультрафильтрации через мембранный фильтр Vivaspin 20 (5000 MWCO, Millipore), лиофилизировали и растворяли в деионизированной воде.

Выделение ДНК из клеток бактерий и растений проводили методом фенольной экстракции (Маниатис с соавт., 1984) с дополнительной очисткой (Остерман, 1981; Гловер с соавт., 1988). Выделение тотальной РНК проводили при помощи набора «Yellow Solve» (Силекс, Москва). Для синтеза кДНК использовали 1,5 мкг тотальной РНК, предварительно обработанной ДНКазой (0,1 ед/мкл, Fermentas, Литва). Реакцию обратной транскрипции проводили в амплификаторе DNA Engine thermocycler (Bio-Rad, USA) в реакционной смеси, содержащей 1 мкМ случайных нуклеотидных гексамеров или 0,4 мкМ специфичных праймеров, а также 100 ед. обратной транскриптазы M-MuLV с соответствующим буфером (Силекс, Москва).

Для амплификации участков ДНК *Pa* конструировали праймеры, комплементарные фрагментам генов *expI*, *rsmB*, *rpoD*, *hrpA*, *hrpL*, *dspE* и области межгенного спейсера 16S-23S рРНК на основе последовательности генома *Pa* (NC_004547). Праймеры и флуоресцентные зонды синтезировали в НПО «Синтол» (Москва). Накопление ПЦР продуктов оценивали по эмиссии зонда TaqMan с помощью амплификатора с оптическим модулем ICycler IQ-4 (Bio-Rad).

Определение титра геномных копий *Pa* проводили относительно калибровочных кривых, построенных по результатам ПЦР РВ с ДНК *Pa* известной концентрации, принимая за одну геномную копию 5,5 фг (5064 т.п.н.) ДНК. В качестве источника мишеней для определения числа геномных копий в ПЦР РВ использовали лизаты клеточных суспензий, разведенные в 10^N -раз в буфере ТЕ. Лизис клеток проводили кипячением (10 мин) в 2%-ном растворе Triton X-100.

Для определения уровня экспрессии генов *expI*, *rsmB*, *hrpA*, *hrpL*, *dspE* использовали сравнительный метод (Pfaffi, 2001). Каждый образец анализировали в двух повторностях ПЦР; отсутствие значимых количеств геномной ДНК подтверждали, проводя ПЦР с образцами, приготовленными без этапа обратной транскрипции. Представленные данные рассчитаны по результатам четырех независимых экспериментов с повторяющимися закономерностями. На диаграммах представлены средние значения и стандартные ошибки среднего. Относительный уровень экспрессии *expI* в голодающих культурах определяли по соотношению количества копий кДНК, соответствующих транскриптам *expI* и *rpoD* (стабильно экспрессирующийся ген «домашнего хозяйства» (Sreedharan *et al.*, 2006)).

Экстрагирование АГЛ проводили этилацетатом, подкисленным ледяной уксусной кислотой из расчета 0,1 мл/л, в течение 4 часов. Фазу растворителя отделяли после центрифугирования (9000 g) и высушивали при помощи роторного испарителя (Pierson *et al.*, 1998). Осадок растворяли в деионизированной воде и использовали для биотеста. Детекцию АГЛ проводили при помощи биосенсорного штамма *E. coli* JLD271+ pAL103, согласно опубликованному протоколу (Amber, Ahmer, 2005).

Пектатлиазную активность определяли по описанной методике (Shevchik *et al.*, 1997). Удельную пектатлиазную активность выражали в мкмоль ненасыщенного продукта / мин / мг сухого веса клеток *Pa*.

Для получения покоящихся клеток *Pa* бактериальные культуры инкубировали в стеклянных флаконах при 28 °С в: 1) свежей среде LB; 2) минеральной безуглеродной среде АВ (Ordax *et al.*, 2006); 3) среде АВ с 4×10^{-4} М C_{12} -АОБ (Sigma, США). 4) среде LB с 4×10^{-4} М C_{12} -АОБ. Переход клеток в покоящееся состояние оценивали по обратимой потере ими колониеобразующей способности.

Для определения интактности мембран клеток *Pa* клеточные суспензии окрашивали красителями из набора BacLight Live/Dead (Mol. Probes, США). Препараты просматривали в конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Германия). Проводили дифференцированный учет клеток с красной (543 нм) и зеленой (488 нм) флуоресценцией.

Анализ ультраструктуры клеток *Pa* проводили на электронном микроскопе Hitachi-125 (Япония). Ультратонкие срезы получали на микротоме LKB-III. Материал фиксировали экспозицией в глутаровом альдегиде (2,5%), приготовленном на фосфатном буфере (0,1М, pH 7.2), обезвоживали ацетоном и выдерживали в 0,1% OsO_4 , приготовленном на том же буфере, с добавлением 25 мг/мл сахарозы.

Статистический анализ данных проводили с применением стандартных математических методов (расчет среднеквадратичного отклонения, сравнение средних по критерию Стьюдента). Критерий вероятности $P < 0,05$ принимали достаточным для достоверной разницы опытной и контрольной групп данных. Сравнение нескольких выборок, полученных в экспериментах, анализировали с помощью метода дисперсионного анализа (ANOVA).

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Влияние метаболитов растений на систему межклеточной коммуникации *P. atrosepticum* SCRI1043 (*Pa*). Анализ имеющихся сведений о регуляторных цепях у *Pa* и у бактерий таксономически близких видов, позволил нам предположить, что факторы растительного происхождения могут активировать систему кворума у этого микроорганизма за счет влияния на образование ключевого аутоиндуктора межклеточного сигналинга – АГЛ. При этом активация экспрессии гена АГЛ-синтазы (*expI*) может осуществляться не только АГЛ, но и продуктами разложения пектиновых веществ растительных клеточных стенок через систему регуляции синтеза вторичных метаболитов (*RsmA/rsmB*) бактерий.

В случае справедливости данной гипотезы, в присутствии факторов растительного происхождения должно происходить увеличение уровня экспрессии бактериальных генов *rsmB* и *expI*. Действительно, в проведенных нами экспериментах добавление тканей как специфичного (картофель), так и неспецифичного (табак) растения-хозяина в культуры *Pa* приводило к индукции экспрессии этих генов (рис. 1). Вероятной причиной этого могло послужить появление дополнительного питательного субстрата (компоненты растительных тканей), что, в свою очередь, могло отразиться на численности клеток, участвующих в «кворуме». Однако при добавлении среды LB или использовании среды D5 уровень экспрессии *rsmB* и *expI* был значительно ниже, чем в присутствии растительных тканей. Кроме того, значения КОЕ/мл, определенные нами для всех вариантов опыта, существенно не различались.

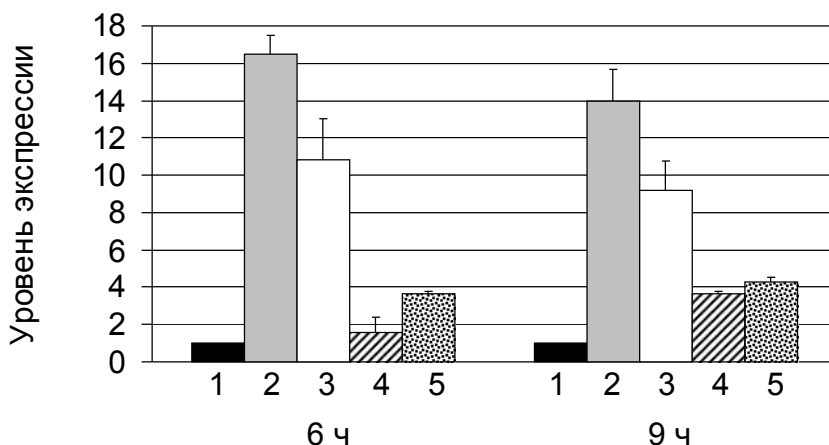


Рис. 1. Экспрессия гена *expI* *Pa* при культивировании клеток на индукционной среде IM (1), на среде IM в присутствии тканей картофеля (2) и табака (3), а также при культивировании бактерий на среде IM, обогащенной LB-бульоном (4), и синтетической среде D5 (5), Уровень экспрессии представлен в относительных единицах.

По нашему мнению, особого внимания заслуживают данные, указывающие на то, что факторы специфичного хозяина оказывали больший индуцирующий эффект на экспрессию гена АГЛ-синтазы по сравнению с факторами неспецифичного хозяина (рис. 1). Это свидетельствует о том, что роль бактериальной системы межклеточной коммуникации в растительно-микробном сигналинге более значима, чем мы предполагали в начале исследования. По всей вероятности, кроме того, что система кворума *Pa* активируется неспецифичными метаболитами растения, она также интегрирована в другие сигнальные системы, сопряженные с видовым распознаванием растения в качестве организма-хозяина и выбором стратегии, соответствующей характеру взаимодействия.

Для доказательства того, что метаболиты растений оказывают влияние на накопление бактериальных аутоиндукторов, мы оценили содержание АГЛ (продукты АГЛ-синтазы) в культуральной жидкости исследуемых культур (рис. 2). Для этого был использован АГЛ-сенсорный штамм *E. coli* JLD271 с рекомбинантной плазмидой pAL103, несущей гены люциферазной системы. Экстракты супернатантов культур *Pa*, инкубированных на среде IM не приводили к эмиссии флуоресценции АГЛ-сенсорного штамма (рис. 2А, д).

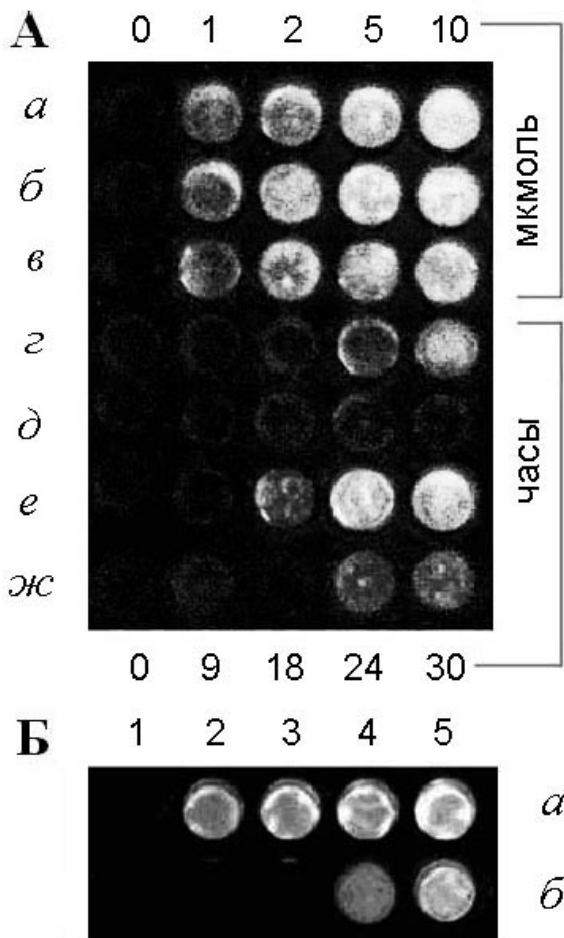


Рис. 2. Биотест на присутствие АГЛ в супернатантах культур *Pa*. Определение относительного содержания АГЛ проводили на основе анализа эмиссии флуоресценции у штамма *E. coli* JLD271, несущего репортерную плазмиду pAL103. Планшет А: лунки содержали 180 мкл культуры *E. coli* JLD271 + pAL103; в лунки в рядах а, б, в добавлена серия разведений *N*-(3-оксогексаноил)-L-гомосерин лактона; в лунки рядов б и в были также добавлены экстракты тканей картофеля и табака, соответственно; в лунки рядов г, д, е, ж добавлено 20 мкл экстрактов супернатантов культур *Pa*, инкубируемых в LB-бульоне (г); в среде IM (д); в среде IM в присутствии тканей растений картофеля (е) и табака (ж). Планшет Б: 180 мкл культуры *E. coli* JLD271 + pAL103; ряд а – серия разведений *N*-(3-оксогексаноил)-L-гомосерин лактона (0, 1, 2, 5, 10 мкмоль, соответственно). Ряд б 20 мкл экстрактов супернатантов культур *Pa*, инкубируемых 24 часа в среде IM (3, б); в среде IM в присутствии низкомолекулярной водорастворимой фракции тканей растений табака (4, б) и картофеля (5, б).

В культурах *Pa* на среде IM, обогащенной LB-бульоном, концентрация АГЛ достигала порогового уровня для активации люминесценции у АГЛ-сенсорного штамма после 24 часов инкубирования (рис. 2А, з). Максимальная индукция репортерной системы происходила при добавлении экстрактов супернатантов культур *Pa*, инкубированных в присутствии тканей картофеля (рис. 2А, е). В таких культурах концентрация АГЛ достигала достаточного уровня для активации флуоресценции уже через 18 часов. В дальнейшем происходило усиление люминесценции, достигавшей максимальной интенсивности по сравнению с другими вариантами опыта. Метаболиты табака оказывали значительно меньший эффект на индукцию синтеза АГЛ (рис. 2А, ж): экстракты супернатантов таких культур активировали репортерную систему позже и с меньшей интенсивностью, чем экстракты культур, инкубированных в присутствии тканей картофеля (рис. 2А, е).

Наблюдаемые эффекты не являются следствием описанной ранее АГЛ-мимикрии (Teplitski *et al.*, 2000; Degrassi *et al.*, 2007), поскольку экстракты растений табака и картофеля не индуцировали флуоресценцию *E. coli* JLD271 + pAL103, а также не влияли на световую продукцию биосенсоров при экзогенном внесении *N*-(3-оксогексаноил)-*L*-гомосерин лактона (рис. 2 б, в). Следовательно, побеги табака и картофеля не содержат функциональных аналогов АГЛ, выступающих в качестве аутоиндукторов системы кворума у *Pa*. Это позволяет считать, что механизм активации системы кворума *Pa* за счет метаболитов растения-хозяина определяется не АГЛ-мимикрирующими соединениями, а другими, ранее не описанными, факторами. Таким образом, индукция системы межклеточной коммуникации происходит в результате усиления синтеза бактериального аутоиндуктора (но не его функциональной аналогии) факторами растительного происхождения.

Для первичной характеристики метаболита(ов) растений, обладающих способностью активировать синтез АГЛ *Pa*, нами были приготовлены и фракционированы экстракты неинфицированных растений табака и картофеля. Основываясь на опубликованных данных (Stachel *et al.*, 1985; Schulte, Bonas, 1992), в первую очередь внимание было уделено низкомолекулярной водорастворимой фракции. Добавление этой фракции в культуры *Pa* приводило к индукции синтеза АГЛ в той же степени, что и добавление исходного количества ткани растений с учетом разбавления препарата (1 г ткани/20 мл) (рис. 2 А, Б). При этом низкомолекулярные соединения из водорастворимой фракции растений табака приводили к меньшей индукции синтеза АГЛ, чем таковые картофеля. Нагревание растительных экстрактов (100 °С, 10 мин) не влияло на их индуцирующую способность в отношении системы кворума *Pa*. Таким образом, полученные данные указывают на то, что в тканях табака и картофеля содержатся водорастворимые, термостабильные соединения размером менее 5 кДа, влияющие на систему межклеточной коммуникации *Pa*. Природа и/или содержание этих соединений, по-видимому, различаются у данных видов растений, что приводит к неодинаковой

степени активации бактериальной системы кворума при различных по характеру взаимодействиях в системе патоген/растение-хозяин. По всей вероятности, активное вмешательство растительного организма в передачу сигнала у фитоассоциированных бактерий во многом обеспечивает пластичность и разнообразие процессов становления растительно-микробных ассоциаций.

2.2. Влияние метаболитов растений на пектатлиазную активность *Pa*.

Транскрипция большинства генов детерминант патогенности (экстраклеточные ферменты, компоненты системы секреции третьего типа) у *Pa* контролируется кворум-сенсорной системой (Liu *et al.*, 2008). Обнаруженная нами различная степень влияния метаболитов растений картофеля и табака на систему кворума *Pa* могла способствовать, по нашему мнению, дифференцированной продукции факторов вирулентности в отношении специфичного и неспецифичного растения-хозяина. Действительно, в присутствии растительных тканей в культурах *Pa* наблюдали высокий уровень пектатлиазной активности; причем метаболиты специфичного растения-хозяина оказывали более значительный эффект: пектатлиазная активность была в 3 раза выше ($P=0,005$), чем в присутствии тканей неспецифичного хозяина (данные приведены в диссертации). В культурах *Pa*, не содержащих растительных тканей, а также в образцах растительных тканей, инкубированных в стерильных условиях, пектатлиазная активность не детектировалась. Полученные данные подтверждают, что активация системы кворума влияет на пектатлиазную активность (Pirhonen *et al.*, 1993). При этом различная степень активации пектолитических ферментов фитопатогенных бактерий при наличии метаболитов специфичного и неспецифичного растения хозяина до настоящего времени не была продемонстрирована. Ранее были выявлены факторы растительного происхождения, которые активируют продукцию пектатлиаз по независимой от системы кворума регуляторной цепи (Liu *et al.*, 1999); однако эти факторы не являются видоспецифичными. В нашей работе уровень пектатлиазной активности зависел от видовой специфичности хозяина и соответствовал степени активации системы межклеточной коммуникации. По всей вероятности, более существенная индукция пектатлиазной активности в культурах *Pa* в присутствии тканей специфичного растения-хозяина, чем неспецифичного, связана именно с большей степенью активации системы кворума.

2.3. Влияние метаболитов растений на экспрессию генов системы секреции третьего типа *Pa*.

На ранних этапах взаимодействия с растением-хозяином у многих фитопатогенных бактерий происходит активация системы секреции третьего типа (ССТТ). Этот фактор вирулентности необходим для транспортировки бактериальных эффекторных белков в клетку растения. Функционирование ССТТ оказывает влияние на сигнальные системы растений, а ее активация зависит от сигнальных систем бактерий, что является наглядным примером интерференции сигнальных систем макро- и микроорганизма.

В наших экспериментах относительный уровень экспрессии генов структурного и регуляторного компонентов (*hrpA* (рис. 3А) и *hrpL*, соответственно) был выше в присутствии тканей как специфичного, так и неспецифичного растения-хозяина, чем в вариантах без растительных тканей. При этом индукция экспрессии этих генов происходила на начальных этапах культивирования (6 ч); через 9 ч уровень экспрессии снижался (рис. 3А). Экспрессия гена эффекторного компонента ССТТ – белка DspE – также активировалась на начальных этапах культивирования *Pa* в присутствии тканей неспецифичного хозяина (рис. 3Б). Однако метаболиты специфичного растения-хозяина оказывали ингибирующее действие на экспрессию гена *dspE*. Важно отметить, что в присутствии тканей специфичного хозяина наблюдали высокое содержание АГЛ (рис. 2 А, Б) и индукцию экспрессии гена АГЛ-синтазы (рис. 1). Несмотря на это, экспрессия кворум-зависимого гена *dspE* репрессировалась (рис. 3Б).

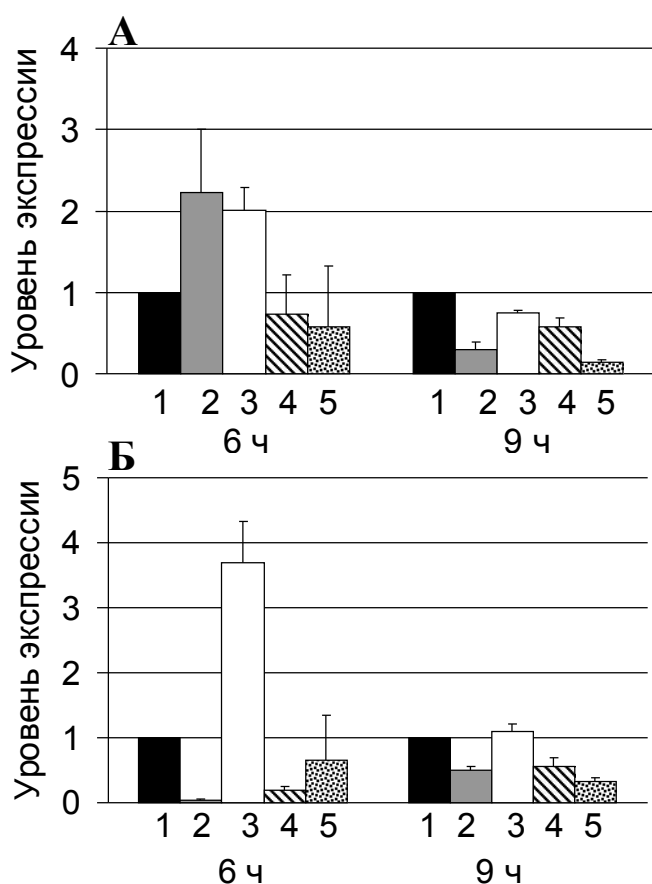


Рис. 3. Экспрессия генов *hrpA* (А) и *dspE* (Б) *Pa* при культивировании клеток на индукционной среде ИМ (1), на среде ИМ в присутствии тканей картофеля (2) и табака (3), а также при культивировании бактерий на среде ИМ, обогащенной LB-бульоном (4), и синтетической среде D5 (5). Уровень экспрессии представлен в относительных единицах.

Таким образом, нами продемонстрировано, что экспрессия кворум-зависимых генов системы секреции третьего типа может регулироваться дифференцированно при наличии факторов специфичного растения-хозяина.

По нашему мнению, избирательный контроль синтеза различных компонентов ССТТ позволяет приурочить экспрессию отдельных детерминант патогенности к определенным этапам взаимодействия с растением-хозяином. Продукция и транспортировка многих эффекторных белков ССТТ происходит на начальных этапах взаимодействия бактерий с растениями. В свою очередь, наблюдаемое нами высокое содержание АГЛ в культурах *Pa*, инкубируемых в присутствии тканей картофеля, может сигнализировать бактериям о высокой плотности их популяции, характерной для более поздних стадий инфекционного процесса, и способствовать изменению спектра белков, секретируемых через

ССТТ. Дифференцированная экспрессия отдельных генов белков ССТТ в случае взаимодействия *Pa* и специфичного растения-хозяина, вероятно, способствует развитию типичного инфекционного процесса.

2.4. Адаптивные реакции *Pa* в условиях, имитирующих невегетационный период. Одним из ключевых этапов растительно-микробных взаимодействий является подготовка макро- и микроорганизма к условиям невегетационного периода. Успешная реализация стратегии переживания стрессовых условий фитоассоциированными бактериями благоприятствует сохранению резерва их популяций, а также способствует сохранению устойчивых растительно-микробных ассоциаций в естественных экосистемах. В связи с этим, выяснение способов и механизмов переживания неблагоприятных условий неспорообразующими бактериями необходимо для понимания механизмов формирования растительно-микробных сообществ.

Адаптивные реакции прокариот, как правило, изучаются при высокой концентрации клеток. Однако в естественных условиях микроорганизмы могут быть подвержены стрессовому воздействию при различной плотности популяции, в том числе, при недостаточной для «кворума» численности клеток. В наших экспериментах мы моделировали условия невегетационного периода, создавая стресс, вызванный голоданием по углероду и затруднением оттока метаболитов. При этом клетки инкубировали в статических условиях при различной плотности популяции (10^3 - 10^9 КОЕ/мл). При этом, независимо от исходного титра инокуляции, концентрация пролиферативно активных клеток стабилизировалась в диапазоне 10^6 – 10^7 КОЕ/мл в течение двух-трех суток инкубации (рис. 4).

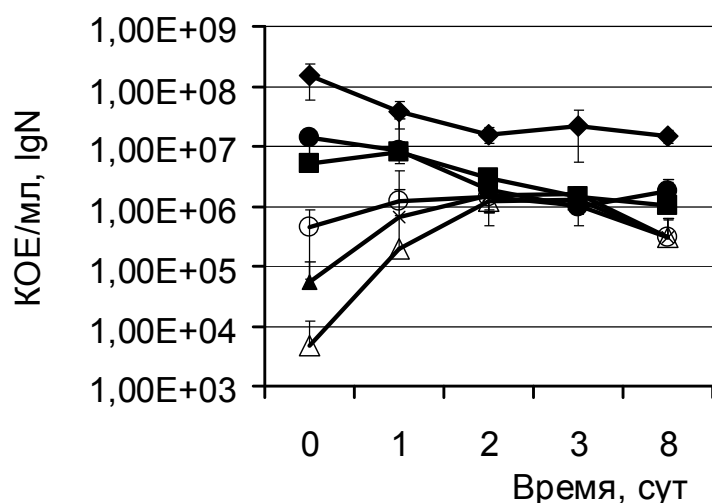


Рис. 4. Динамика численности КОЕ/мл в культурах *Pa*, инкубированных в минеральной безуглеродной среде АВ при различной плотности инокуляции: 5×10^8 (◆), 4×10^7 (●), 5×10^6 (■), 5×10^5 (○), 6×10^4 (▲), 6×10^3 (Δ) КОЕ/мл.

Наблюдаемые процессы корректировки численности популяции *Pa* в условиях голодания предполагают возможность плотностно-зависимой регуляции. Мы предположили, что увеличение численности клеток при отсутствии субстрата и низкой исходной численности связано с необходимостью запуска системы межклеточной коммуникации, во многом определяющей способность к адаптации у бактерий. В связи с этим, мы оценили динамику экспрессии гена АГЛ-синтазы в

процессе голодания при разной исходной численности клеток. При высокой плотности популяции в течение суток происходило увеличение относительного уровня экспрессии гена *expI* в три раза; затем происходило снижение уровня экспрессии (рис. 5). При низкой плотности инокуляции клеток (6×10^3 КОЕ/мл), относительный уровень экспрессии этого гена в ходе увеличения титра клеток оставался на базовом уровне. Через двое суток культуры достигали максимальной плотности клеток (10^6 КОЕ/мл) и к третьим суткам инкубирования переходили в стационарную фазу роста. При этом происходило увеличение уровня экспрессии гена *expI* в 3 и 6 раз через двое и трое суток, соответственно. Это свидетельствует о сопряженности стабилизации численности популяции и индукции системы кворума.

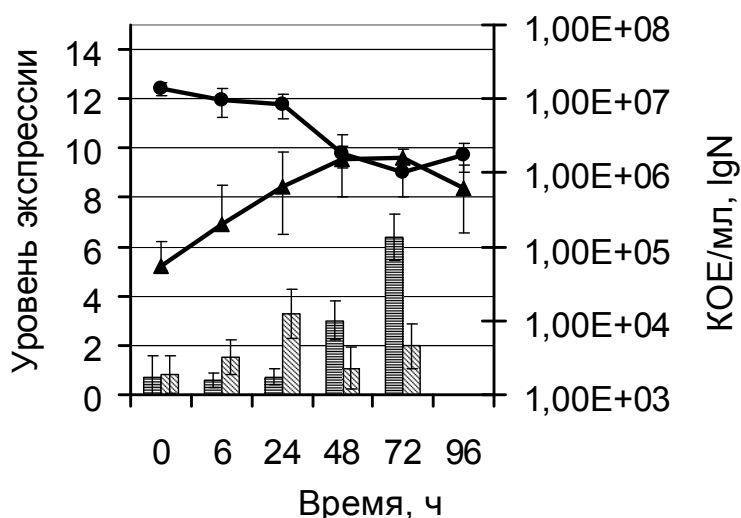


Рис. 5. Уровень экспрессии гена АГЛ-синтазы *expI* в клетках *P. atrosepticum* SCRI1043 (столбцы) и динамика численности КОЕ/мл в культурах *P. atrosepticum* SCRI1043 (линии), инкубированных в минеральной безуглеродной среде АВ с исходной плотностью 3×10^7 (▨)(●) и 6×10^3 (■)(▲) КОЕ/мл.

Экстракты супернатантов культур *Pa*, инкубируемых на безуглеродной среде при низкой исходной плотности популяции ($8,5 \times 10^2$ КОЕ/мл), после увеличения численности клеток и достижения плотности популяции 10^6 КОЕ/мл индуцировали биолюминесценцию АГЛ-сенсорного штамма (рис. 6). Вероятно, накопление АГЛ может служить сигналом для прекращения процессов клеточного деления и переходу в состояние покоя. Достижение максимального значения титра КОЕ совпадало по времени с накоплением АГЛ в супернатантах таких культур. При этом концентрация АГЛ была достаточна лишь для слабой индукции флуоресценции у *E.coli* JLD271 + pAL103 (рис. 6). Однако эта концентрация аутоиндуктора воспринималась голодающими клетками *Pa*, о чем свидетельствует индукция экспрессии гена АГЛ-синтазы (рис. 5).

При высокой плотности инокуляции в голодающих культурах *Pa* концентрация АГЛ значительно превышала таковую у культур с низкой плотностью (рис. 6). При этом происходило резкое снижение титра культивируемых клеток (рис. 4). Возможно, АГЛ позволяют клеткам регулировать плотность популяции в зависимости от внешних условий и, в частности, доступности субстрата. Однако экзогенное внесение АГЛ в голодающие при низком титре клеток культуры *Pa* не оказывало влияния на пролиферативную активность бактерий в исследуемых условиях (рис. 7). Это

свидетельствует о наличии дополнительных, помимо АГЛ, факторов позволяющих бактериям оценивать численность своей популяции.

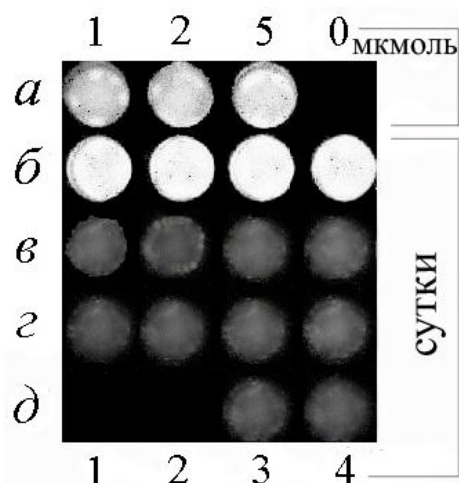


Рис. 6. Биотест на присутствие АГЛ в супернатантах голодающих культур *Pa.* Лунки в планшете содержали 180 мкл культуры *E. coli* JLD271 + pAL103 с добавлением 20 мкл экстрактов супернатантов культур *Pa.*, инкубируемых в среде АВ при различных титрах инокуляции: $1,2 \times 10^{10}$ (б); $2,0 \times 10^6$ (в); $2,8 \times 10^4$ (г) $8,5 \times 10^2$ (д). Лунки в ряду (а) содержали серию разведений *N*-(3-оксогексаноил)-*L*-гомосерин лактона.

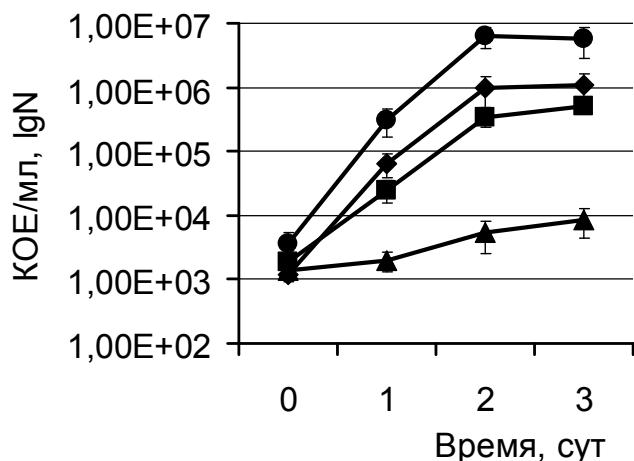


Рис. 7. Динамика численности КОЕ/мл в культурах *Pa.*, инкубированных в минеральной безуглеродной среде АВ (◆), среде АВ с добавлением 50 мкМ *N*-(3-оксогексаноил)-*L*-гомосерин лактона (■), кондиционированных средах от культуры с исходной плотностью 5×10^8 (●) и 6×10^3 (▲) КОЕ/мл.

Для выявления предполагаемых факторов межклеточной коммуникации культуральные жидкости опытных культур были протестированы на присутствие в них компонентов, ингибирующих увеличение численности популяции бактерий на безуглеродной среде. Для этого клетки тестируемых культур были удалены фильтрованием через нитроцеллюлозные фильтры ($d=0,2$ мкм). После инокуляции кондиционированных сред, полученных от культур низкой исходной плотности клеток (10^4 КОЕ/мл) после трех суток инкубирования, увеличения численности клеток не происходило (рис. 7). Напротив, супернатанты голодающих культур с титром инокуляции 10^8 КОЕ/мл не влияли на пролиферацию бактерий в условиях дефицита субстрата (рис. 7). Таким образом, голодание клеток *Pa.* при различной плотности популяции предусматривает различные стратегии их поведения и опосредовано не одинаковым фоном сигнальных экстраклеточных метаболитов. Сигналы, продуцируемые культурами с высокой плотностью популяции, не могут компенсировать действие факторов, останавливающих процесс увеличения численности популяции на безуглеродной среде в культурах с исходно низкой плотностью бактериальных клеток.

2.5. Покоящиеся формы *Pa*. После достижения пороговой для индукции системы кворума численности или при высокой исходной плотности популяции и длительной инкубации клеток *Pa* в статических условиях на полноценной или безуглеродной среде происходил их переход в покоящееся состояние (рис. 8). При этом клетки утрачивали способность образовывать колонии на твердых питательных средах. Потеря колониобразующей способности клетками *Pa* значительно ускорялась при добавлении в среду 4×10^{-4} М аутоиндуктора анабиоза алкилоксибензола (C_{12} -АОБ) (рис. 9). АОБ синтезируются микроорганизмами в ответ на стресс, способствуя переходу клеток в состояние покоя, а сходные с АОБ соединения образуются в растениях, что, по-видимому, позволяет им влиять на физиологические процессы ассоциированных микроорганизмов (Kozubek, Tuman, 1999)

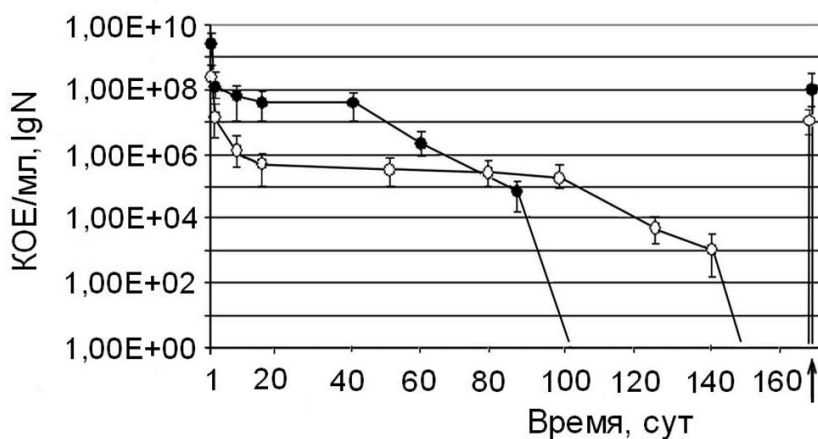


Рис. 8. Динамика численности колониобразующих клеток (титра КОЕ/мл) в культурах *Pa*, длительно инкубированных в минеральной среде АВ (○) и LB-бульоне (●). Стрелкой указано время проведения процедуры «оживления».

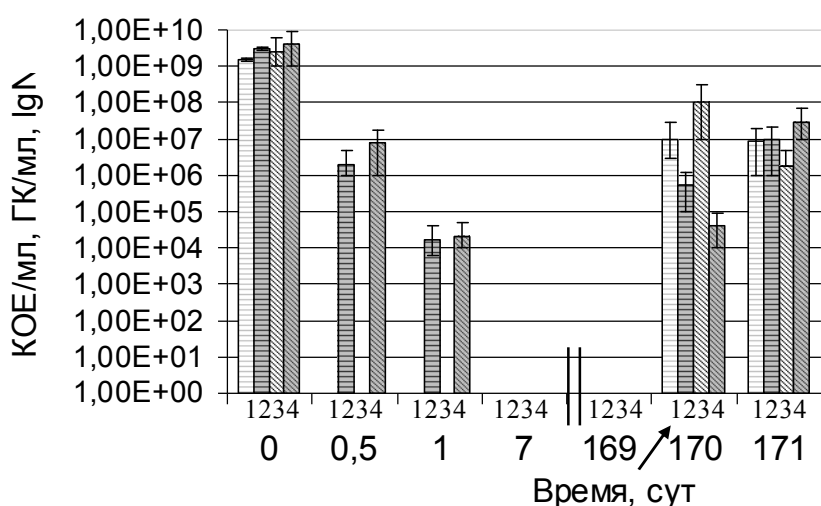


Рис. 9. Динамика численности клеток, выявляемая по титрам КОЕ (1; 3) и геномных копий (2; 4), в культурах *Pa*, инкубированных в присутствии C_{12} -АОБ в концентрации 4×10^{-4} М в минеральной среде АВ (1; 2) или LB-бульоне (3; 4). Стрелкой указано время проведения процедуры «оживления».

Невыявляемость клеток *Pa* при помощи микробиологических высевов может свидетельствовать либо об их гибели, либо о переходе в покоящееся состояние. Важным аргументом в пользу жизнеспособности клеток является сохранение ими интактности мембран, что было подтверждено при помощи витального окрашивания клеток *Pa* красителями BacLight™ Bacterial Viability (Invitrogen).

Ультраструктура некультивируемых и вегетативных клеток различалась. Вегетативные клетки характеризовались палочковидной формой, размером $0,7 \times 2,0$ мкм, хорошо выявляемыми наружной и цитоплазматической мембранами, электронно-плотной цитоплазмой с мелкогранулярной текстурой, в которой нуклеоид распределен равномерно (рис. 10 А).

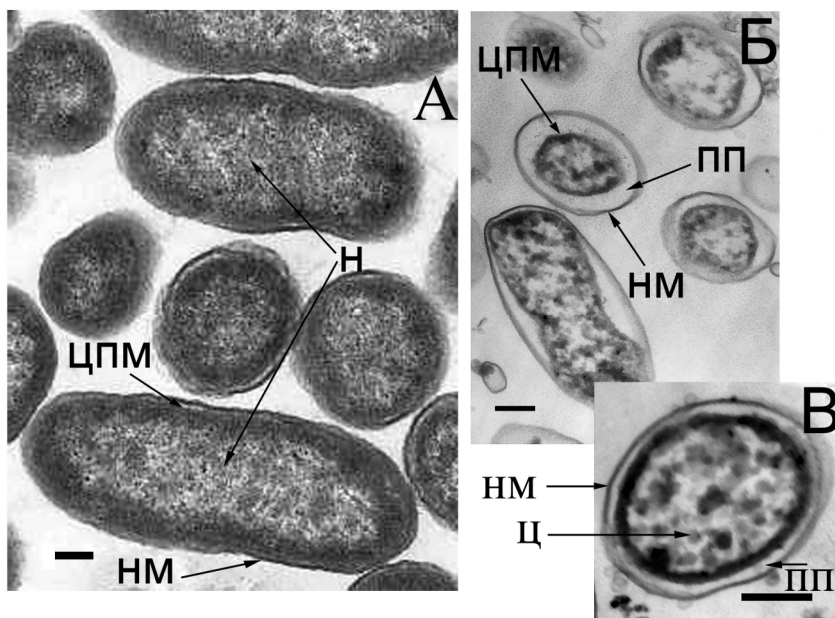


Рис. 10. Микрографии срезов клеток *Pa*: А – вегетативные клетки; Б, В – клетки, инкубированные на безуглеродной среде АВ в течение 150 суток; НМ – наружная мембрана; ПП – периплазматическое пространство; ЦПМ – цитоплазматическая мембрана; Ц – цитоплазма; Н – нуклеоид. Масштабная метка – 200 нм.

В голодающих культурах большинство клеток обладало сферической формой диаметром меньше $0,7$ мкм, выявляемым электронно-плотным наружным и нижележащим обширным электронно-прозрачным слоями клеточной оболочки, цитоплазмой с крупногранулярной текстурой, в которой нуклеоид плохо выявлялся (рис. 10 Б, В). Для части клеток характерны признаки плазмолиза (рис. 10 Б), что, по-видимому, связано с их дегидратацией.

Переход клеток *Pa* в некультивируемое состояние обратим. Воспроизводимый эффект на восстановление колониеобразующей способности (от $0,5\%$ до 10% от исходного титра КОЕ) оказывала отмывка клеток в свежей минеральной среде АВ (рис. 8, 9). При этом увеличение титра КОЕ происходило за счет восстановления способности некультивируемых форм к образованию колоний, а не размножения некой части клеток, поскольку: 1) использовали суспензии с нулевым титром КОЕ, не содержащие культивируемых клеток; 2) процедура «оживления» краткосрочна (30 мин.); 3) для отмывки клеток использовали безуглеродную среду. Следует отметить, что подобранные нами условия, способствующие обратимому переходу *Pa* в некультивируемое состояние, имитируют возможные ситуации в естественных условиях обитания этих фитопатогенных бактерий.

Неэффективность микробиологических высевов для выявления некультивируемых клеток *Pa*, обусловила целесообразность проведения количественного ПЦР-анализа. Для суспензий *Pa*, инкубированных в LB-бульоне или голодной среде АВ с добавлением 4×10^{-4} М C_{12} -АОБ, снижение титра КОЕ сопровождалось уменьшением

титра выявляемых геномных копий (ГК) (рис. 9). После 7 суток инкубирования в лизатах таких клеток нам не удавалось выявить целевую ДНК при помощи ПЦР, хотя сам по себе C_{12} -АОБ не влиял на эффективность реакции.

При отмывке покоящихся клеток от среды инкубирования, наряду с восстановлением колониеобразующей способности, становилось возможным детектировать их ДНК при помощи ПЦР (рис. 9). Для выявления природы ингибитора(ов) ПЦР, накапливающегося в голодающих клетках, мы использовали последовательную многостадийную очистку ДНК в лизатах клеток *Pa*. Было показано, что неэффективность количественного выявления покоящихся клеток при помощи ДНК-диагностики связана с наличием в голодающих клетках низкомолекулярных ингибиторов ПЦР, частично удаляемых при помощи диализа и нейтрализующихся при понижении их концентрации. Кроме того, способность ДНК к амплификации определялась белковым фактором(ами) (предположительно, связанным с ДНК), инактивируемым обработкой протеиназой К, а также соединениями, экстрагируемыми органическими растворителями (фенол/хлороформ). Эти соединения, по-видимому, способствуют изменению матричных свойств надмолекулярных комплексов ДНК и приводят к значительным изменениям в транскрипции генов в условиях невегетационного периода.

2.6. Фитопатогенность клеток *Pa*, находящихся в различных физиологических состояниях. Вопрос о вирулентности покоящихся форм микроорганизмов остается открытым. Микроорганизмы могут сохранять вирулентность в покоящемся состоянии (Baffone *et al.*, 2006), полностью терять вирулентность (Maalej *et al.*, 2004), сохранять способность к реверсии в вегетативные формы в организме хозяина, не вызывая симптомов заболевания (Du *et al.*, 2007b), либо требовать факторов растения-хозяина для возобновления пролиферативной активности и проявления вирулентности (Grey, Steck, 2001). Вегетативные клетки *Pa* проявляли вирулентность в отношении растения-хозяина (табак) и приводили к его гибели в течение 2–7 дней в зависимости от инфекционной нагрузки (более $1,7 \times 10^4$ клеток). Покоящиеся формы *Pa* были авирулентны в отношении табака. Микробиологические высевы из растений, инфицированных покоящимися формами, не выявляли бактериальных колоний, что свидетельствовало об отсутствии реверсии покоящихся форм в вегетативные клетки *in planta*. Отсутствие симптомов заболевания не было связано со сниженной инфекционной нагрузкой: обнаруживаемая численность клеток при их «оживлении» превышала достаточную для развития инфекции в случае вегетативных клеток. «Оживленные» клетки вызывали симптомы заболевания у 10% инфицированных растений. При этом зона некроза была ограничена. Вирулентность «оживленных» клеток полностью восстанавливалась после их пассирования на полноценной питательной среде. Таким образом, обратимый переход в состояние покоя, связанный с изменением ультраструктурных и молекулярно-генетических особенностей клеток *Pa*, сопряжен с

потерей вирулентности в отношении растения-хозяина (табак). Однако при этом сохраняется патогенный потенциал, который реализуется при реверсии клеток в вегетативные формы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в нашей работе результаты демонстрируют более широкий, чем считалось ранее, спектр влияния метаболитов растения-хозяина на межклеточную коммуникацию микроорганизмов. Бактериальная система кворума изначально рассматривалась как относительно автономная, способствующая проявлению различных фенотипов в зависимости от плотности популяции. Однако на нее могут оказывать воздействие также эндогенные и экзогенные сигналы, в том числе, возникающие независимо от плотности популяции. Так, растения могут влиять на поведение ассоциированных с ними бактерий, синтезируя функциональные аналоги сигналов межклеточной коммуникации; такой феномен получил название АГЛ-мимикрии (Uroz *et al.*, 2009). В наших исследованиях обнаружено, что воздействие растений на сигнальные системы прокариот может осуществляться не только путем АГЛ-мимикрии, но и за счет активации синтеза бактериального аутоиндуктора метаболитами макроорганизма. Природа и/или содержание этих метаболитов, по-видимому, различается у разных видов растений, вследствие чего система кворума может служить одним из участников процесса распознавания растения в качестве организма хозяина. Различная степень ее активации может приводить к дифференцированной регуляции продукции факторов вирулентности в отношении специфичного и неспецифичного растения-хозяина. Таким образом, особенности функционирования системы кворума могут отражать характер взаимодействия в системе патоген/растение-хозяин и служить критерием при характеристике взаимоотношений между макро- и микроорганизмом.

Полученные нами результаты расширяют представление о способах переживания невегетационного периода фитоассоциированными бактериями, что обеспечивает сохранение устойчивых растительно-микробных сообществ. Важным этапом при этом является оптимизация плотности популяции клеток при участии системы межклеточной коммуникации.

Обобщая полученные нами результаты и имеющиеся в литературе сведения, мы предлагаем следующую гипотетическую схему функционирования системы межклеточной коммуникации в различных условиях существования микроорганизмов (рис. 11). В стандартных условиях лабораторных культур в отсутствие экзогенных сигналов осуществляется «классическая» схема регуляции по принципу кворума, при которой ее активация определяется плотностью популяции. При стрессе может происходить активация системы кворума при более низкой плотности популяции за счет стресс-специфичных метаболитов и/или изменения компетентности клеток.

На ранних стадиях взаимодействия с растением-хозяином за счет факторов макроорганизма может происходить частичная индукция бактериальной системы кворума (1), которая способствует запуску микробной системы секреции третьего типа (2), репрессирующей защитные реакции растения-хозяина (3), и обеспечивает умеренную продукцию экзоферментов (2*) для получения бактериями ростового субстрата (3*). При достижении высокой плотности популяции (4) наступает острая стадия инфекции, при которой дополнительно активируется система кворума по классическому механизму за счет выработки АГЛ возрастающим количеством клеток (5); происходит «выключение» аппарата секреции третьего типа (6), утратившего эффективность к этому времени, и осуществляется полноценная продукция экзоферментов (7), приводящая к гибели растения.

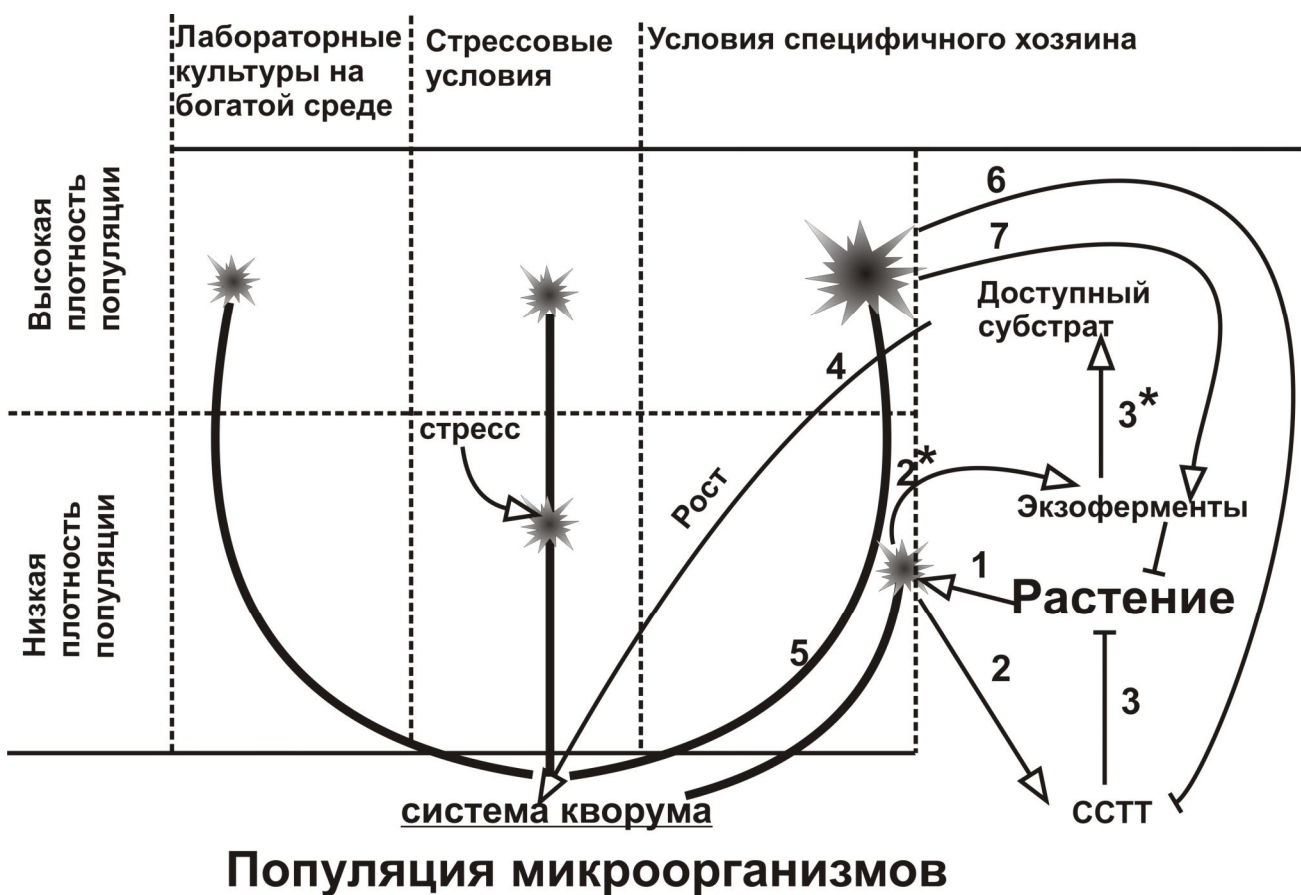


Рис. 11. Гипотетическая схема активации системы кворума в зависимости от условий обитания микроорганизмов. Пояснения к рисунку даны в тексте.

✱ - активация системы кворума

Согласно данной схеме, функционирование системы кворума описывается не только в качественных показателях («индукция/репрессия»), но и в количественных, которые зависят от ряда факторов, в том числе, от присутствия растения-хозяина. При этом подразумевается, что количественная характеристика сигнальной активности системы кворума объясняется тем, что, помимо АГЛ, играющих ключевую роль в ее

запуске, существуют иные факторы регуляции системы межклеточной коммуникации. Эти факторы могут обладать аддитивным эффектом и/или определять восприимчивость клеток к различным концентрациям АГЛ.

Полученные в этой работе результаты расширяют представление о роли системы межклеточной коммуникации у фитопатогенных бактерий и могут служить основой для дальнейшего изучения молекулярных аспектов регуляции системы кворума. Возможность модуляции системы межклеточной коммуникации «неклассическим» способом (факторы хозяина и стресс) способствует ее большей пластичности, обеспечивающей более детальную корректировку поведения микроорганизмов на различных этапах формирования растительно-микробных взаимоотношений в природных экосистемах. Это, в свою очередь, является одним из факторов, обеспечивающих широкое разнообразие типов и характеров взаимодействия между бактериями и растениями.

ВЫВОДЫ:

1. Впервые показана активация бактериальной системы межклеточной коммуникации в результате индукции синтеза бактериального аутоиндуктора (АГЛ) факторами растительного происхождения. Активация системы кворума *P. atrosepticum* SCRI1043 происходит при участии водорастворимых термостабильных метаболитов растений (*Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum*) с молекулярной массой менее 5 кДа.
2. Впервые показано, что система кворума *P. atrosepticum* SCRI1043 является частью сигнальной сети, отвечающей за распознавание растения в качестве организма-хозяина. Водорастворимые термостабильные низкомолекулярные (менее 5 кДа) метаболиты специфического растения-хозяина (*S. tuberosum*) приводят к большей индукции синтеза АГЛ и пектатлиазной активности, чем неспецифического (*N. tabacum*).
3. Определены особенности экспрессии генов компонентов системы секреции третьего типа *P. atrosepticum* SCRI1043 под влиянием метаболитов специфического и неспецифического растений-хозяев. Показано, что экспрессия генов кластера *hrp* может регулироваться дифференцированно. Максимальный уровень экспрессии генов *hrpA* и *hrpL* приходится на начальные этапы взаимодействия с тканями растений-хозяев.
4. Впервые показан спонтанный или индуцируемый аутоиндуктором анабиоза C₁₂-алкилоксибензолом переход клеток *P. atrosepticum* SCRI1043 в покоящееся состояние, сопряженное с потерей колониеобразующей способности и изменением ультраструктуры. Покоящиеся клетки *P. atrosepticum* SCRI1043 восстанавливают пролиферативную активность после смены среды инкубирования.
5. Установлено, что переход клеток *P. atrosepticum* SCRI1043 в покоящееся состояние сопряжен с изменением матричных свойств надмолекулярных комплексов

ДНК, что приводит к затруднению ее детекции при помощи ПЦР. Восстановление способности ДНК к амплификации в ходе ПЦР происходит при реверсии клеток в вегетативные формы, а также достигается путем очистки ДНК покоящихся клеток.

6. Показано, что покоящиеся клетки *P. atrosepticum* SCRI1043 авирулентны в отношении *N. tabacum*. Клетки с восстановленной пролиферативной активностью обладают сниженной фитопатогенностью. Восстановление вирулентности происходит после пассирования «оживленных» клеток на богатой питательной среде.

7. Впервые показано, что при неблагоприятных для роста условиях, имитирующих невегетационный период, в популяциях *P. atrosepticum* SCRI1043 происходит регуляция концентрации клеток, обладающих пролиферативной активностью. При этом оптимизация плотности популяции осуществляется при участии межклеточной коммуникации.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Регуляция экспрессии генов межклеточной коммуникации бактерий метаболитами растений / **В.Ю. Горшков**, О.Е. Петрова, Н.Е. Мухаметшина, Ю.В. Гоголев // Материалы конференции / Пущинского НЦ РАН. – Москва–Пушино, 2008. – С. 131–132.
2. Регуляция экспрессии генов межклеточной коммуникации бактерий метаболитами растений / **В.Ю. Горшков**, О.Е. Петрова, Н.Е. Мухаметшина, Ю.В. Гоголев // Материалы конференции / Научная книга. –Саратов, 2008. – С. 64.
3. Ультраструктура некультивируемых клеток *Erwinia carotovora* и их вирулентность / А.Г. Даминова, **В.Ю. Горшков**, О.Е. Петрова, Н.Е. и др. // Сб. тезисов / Пущинского НЦ РАН. – Пушино, 2008. – С. 262.
4. Сверхэкспрессия *hrp*-генов *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica*, индуцируемая растениями *Solanum tuberosum* / Ю.В. Гоголев, **В.Ю. Горшков**, Н.Е. Мухаметшина, О.Е. Петрова // Сб. трудов / Арта. – Новосибирск, 2008. – С. 181.
5. Ультраструктурные и молекулярно-генетические изменения в клетках *Erwinia carotovora* при переходе в «некультивируемое» состояние / Ю.В. Гоголев, **В.Ю. Горшков**, О.Е. Петрова, и др. // Материалы конференции / Издательский центр БГУ. – Минск, 2008. – С. 11–13.
6. Plant-dependent regulation of quorum sensing system and virulence factors production in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* / **V. Gorshkov**, O. Petrova, N. Mukhametshina, Y. Gogolev // Abstracts / Wiley Blackwell, FEBS. – Prague, 2009. – V. 276. – P. 278.
7. Cross cell density-dependent communication during the initial stages of response to stress in *Erwinia carotovora* / **V.Y. Gorshkov**, O.E. Petrova, A.G. Daminova, I.Sh. Khusainov, Y.V. Gogolev // Abstracts / Rome, 2009. – P.48.

8. Участие растения-хозяина в регуляции кворум-сенсинга *Erwinia carotovora* / **В.Ю. Горшков**, Н.Е. Мухаметшина, О.Е. Петрова, Н.Б. Тарасова, Ю.В. Гоголев // Бюллетень Московского общества испытателей природы / МАКС Пресс. – Москва, 2009. – Т. 114, №2, приложение 1. – С. 43–45.
9. Образование покоящихся форм *Erwinia carotovora* / Ю.В. Гоголев, **В.Ю. Горшков**, О.Е.Петрова, Н.Е. Мухаметшина, А.Г. Даминова, М.В. Агеева // Бюллетень Московского общества испытателей природы. / МАКС Пресс. – Москва, 2009. – Т. 114, №2, приложение 1. – С.164–166.
10. Система межклеточной коммуникации при формировании адаптивного ответа на ранних этапах голодания фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora* / И.Ш. Хусаинов, **В.Ю. Горшков**, О.Е. Петрова, А.Г. Даминова, Ю.В. Сорокина, Ю.В. Гоголев // Материалы конференции / НЦ РВХ ВСНЦ СЦ РАМН, Иркутск. – 2009. – С. 511–514.
11. Диагностика различных физиологических форм *Erwinia carotovora* / А.Г. Даминова, **В.Ю. Горшков**, О.Е. Петрова, М.В. Агеева, Н.Е. Мухаметшина, Ю.В. Гоголев // Сб. тезисов / Пушкинского НЦ РАН. – Пушкино, 2009. – С. 198.
12. Выявление и характеристика некультивируемых форм энтеробактерий *Erwinia carotovora* в длительно инкубируемых культурах / Ю.В. Гоголев, **В.Ю. Горшков**, О.Е.Петрова, Н.Е. Мухаметшина, М.В. Агеева // С-ИНФО, Лтд. – Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунологии. – 2009. – Т. 4. – С. 77–80.
13. Образование «некультивируемых» покоящихся форм фитопатогенной энтеробактерии *Erwinia carotovora* / **В.Ю Горшков**, О.Е. Петрова, Н.Е. Мухаметшина, М.В. Агеева, А.Л. Мулюкин, Ю.В. Гоголев // МАИК, Микробиология. – 2009. – Т. 78, №5. – С. 647–655.
14. Система межклеточной коммуникации энтеробактерии *Erwinia carotovora* при формировании адаптивного ответа к условиям неблагоприятным для роста / **В.Ю. Горшков**, О.Е. Петрова, А.Г. Даминова, Ю.В. Гоголев // МАИК, Доклады Академии наук. – 2009. – Т. 430, №2, в печати.