

СЕКРЕЦИЯ ХАРПИНА HrpW АППАРАТОМ СЕКРЕЦИИ III ТИПА БАКТЕРИЙ ERWINIA CAROTOVORA SUBSP. ATROSEPTICA 3-2

А.Л. Лагоненко

Научный руководитель – д.б.н., профессор *А.Н. Евтушенко*
Белорусский государственный университет

Бактерии *Erwinia carotovora subsp. atroseptica (E.c.a.)* - широко распространенные в умеренной зоне фитопатогены, вызывающие заболевание «черная ножка» у многих сортов картофеля. Наряду с большим количеством гидролитических ферментов, этот микроорганизм продуцирует особые белки патогенности – Avr и харпины. Эти белки переносятся из бактериальной клетки в растение через систему секреции III типа (ССТТ). Целью данной работы является выяснение способности белка HrpW секретироваться через ССТТ бактерий *E.c.a.*

На первом этапе нами был амплифицирован участок хромосомы *E.c.a.* размером 1,5 т.п.н. с праймерами, синтезированными под ген *hrpW* (HrpW1 и HrpW2), клонирован на мультикопийном векторе pUC18, после чего была определена его нуклеотидная последовательность, которая соответствовала гену *hrpW E.c.a.* SCRI (Blast database).

На втором этапе работы было осуществлено переклонирование *hrpW* на вектор цитоплазматической экспрессии pFLAG-CTC (Sigma) под Lac-индуцируемый промотор. В результате была получена конструкция, позволяющая экспрессировать в бактериальной клетке химерный HrpW-FLAG белок при индукции IPTG. Следует отметить, что FLAG-пептид (состоит из восьми аминокислот) пришивали с карбокси конца HrpW, оставляя неизменным N-концевой секреторный домен изучаемого белка. Затем полученной рекомбинантной плазмидой трансформировались клетки штамма дикого типа *E.c.a. 3-2*. Трансформанты выращивались в hrp-индуцирующей среде (минимальная глицериново-солевая среда с лимитом по источнику азота, pH=6,0) с целью повышения уровня экспрессии генов аппарата секреции III типа и добавлением IPTG для индукции плазмидного промотора. Белки клеток и культуральной жидкости разделяли электрофорезом по Лэмбли. Наличие HrpW в клетках и супернатанте определяли иммунологически методом вестерн-блоттинга. Для детекции белка использовали анти-FLAG M2 антитела (Sigma).

В результате проделанной работы нами было показано, что харпин HrpW секретировался из бактериальной клетки в культуральную жидкость при условии индукции системы секреции III типа. Планируется провести исследования по выявлению функции данного белка у бактерий *E.c.a.*

ВЛИЯНИЕ ГЕНА *hrpL* НА экспрессию гена *hrpJ* БАКТЕРИЯМИ *ERWINIA CAROTOVORA SUBSP. ATROSEPTICA*

Т.В. Овчинникова

Научный руководитель – к.б.н. *Е.А. Николайчик*
Белорусский государственный университет

Бактерии *Erwinia carotovora subsp atroseptica (Eca)*, как и некоторые другие фитопатогены, обладают системой секреции III типа (TTSS), служащей для направленной доставки эффекторных белков в межклеточное пространство и клетки эукариотического организма. Большинство белков, транспортируемых с помощью TTSS, способствуют колонизации растения фитопатогеном, но некоторые секретируемые белки выполняют вспомогательную функцию и их роль в развитии заболевания не совсем ясна. К последней группе секретируемых белков относится белок HrpJ.

Гены, кодирующие компоненты системы секреции III типа, обычно располагаются кластером и регулируются координировано. Экспрессия генов *hrp*-кластера, кодирующего систему секреции III типа у *Erwinia*, происходит при наличии в клетке альтернативного сигма-фактора HrpL. Белок HrpL является конечным звеном регуляторного каскада, и поскольку до сих пор

неизвестны факторы, запускающие этот каскад, то ген *hrpL* был клонирован на высококопийный вектор pUC18 и низкокопийный rJQ200 под контролем *lac*-промотора и введен в *Eca* JN42. Это было сделано, чтобы облегчить изучение отдельных компонентов системы секреции III типа, так как при обычных условиях культивирования не происходит индукции системы секреции.

В настоящей работе изучалось изменение экспрессии белка HrpJ под влиянием различных доз гена *hrpL*. Для этого в клетки *Eca* вводили низкокопийный и высококопийный векторы, содержащие клонированный ген *hrpL* под контролем *lac*-промотора, культивирование проводилось в условиях с индукцией ИПТГ и без индукции. Из полученных штаммов была выделена фракция клеточного белка, которая затем исследовалась на содержание белка HrpJ путем вестерн-блоттинга (использовались полученные ранее антитела к HrpJ). Было показано, что в штаммах, содержащих вектор с *hrpL*, наблюдается увеличение экспрессии белка HrpJ в 25-35 раз, причем достоверной разницы между количеством белка в случае вектора с высокой копийностью и низкой копийностью не было. Также наблюдалось незначительное различие в индуцированных ИПТГ и неиндуцированных штаммах. Из этих данных можно сделать вывод о том, что *lac*-промотор обеспечивает достаточно высокую экспрессию гена *hrpL* даже без индуктора, а введение дополнительных копий *hrpL* дальнейшего усиления экспрессии находящихся под его контролем генов не вызывает.

В ходе последующих экспериментов со штаммами *Eca* с повышенной экспрессией TTSS планируется изучить влияние различных условий культивирования на экспрессию и локализацию белка HrpJ у бактерий *Eca*.

ПОЛУЧЕНИЕ ДВОЙНОГО МУТАНТА *ERWINIA CAROTOVORA* SUBSP. *ATROSEPTICA* ПО ГЕНАМ *PELW* И *KDGR*

С.А. Скобляков

Научный руководитель – к.б.н. А.Г. Песнякевич
Белорусский государственный университет

Дефектные по синтезу внутриклеточной пектацетилазы PelW возбудители черной ножки картофеля *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Eca*) характеризуются сниженным уровнем продукции основных факторов патогенности и вирулентности – ферментов пекто-, целлюло- и протеолитического комплексов. С целью выяснения причин этого плейотропного эффекта проведено направленное получение мутации в *kdgR*-гене, кодирующем общий негативный регулятор продукции факторов патогенности и вирулентности. Для этого осуществлена трансформация бактерий *E.coli* BW19851 ДНК плазмиды pKDGR4, несущей инактивированный вставкой кассеты антибиотикорезистентности «омега» ген *kdgR*_{*Eca*}. Отобранные по наличию гентамицинрезистентности трансформанты были использованы в качестве доноров в конъюгационных скрещиваниях с бактериями *Eca* JN5084, в хромосоме которых ген *pelW* инактивирован inserцией транспозона mini-Tn5 хуIE. Полученные в результате скрещивания трансконъюганты *Eca* JN5084 pKDGR4 высевали на среду с сахарозой (5%) и стрептомицином (10 мкг/мл) и далее сформировавшиеся на такой среде клоны проверяли на резистентность к гентамицину. ДНК одного из отобранных гентамицинчувствительных клонов была использована для проведения ПЦР в присутствии праймеров, определяющих амплификацию нуклеотидной последовательности гена *kdgR*_{*Eca*}. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР показал наличие вставки в пределах анализируемого гена, что служит подтверждением на молекулярном уровне замены интактного гена *kdgR*_{*Eca*} на мутированный.

Фенотипическим подтверждением наличия мутации именно в гене *kdgR*_{*Eca*} являются данные по активности беспромоторного репортёрного гена хуIE, экспрессирующегося с промотора гена *pelW*. В клетках полученного двойного мутанта количество катехол-2,3-диоксигеназы в 17 раз превышает таковое в клетках *Eca* JN5084, что свидетельствует о снятии репрессии с гена *Eca* JN5084, а, следовательно, об отсутствии белка-репрессора KdgR.

В настоящее время проводится сравнительный анализ продукции факторов патогенности