

хромосом разного происхождения может вызывать как негативные, так и позитивные изменения приспособленности, существенно влияя на адаптивный потенциал особей.

The state of fitness components for different mutant lines (*cn*, *vg*, *b cn vg*) *Drosophila melanogaster* upon carried out modification of the genotype are studied. It was determined that displacement of the mutant's chromosome 1 on a homologous chromosome of flies *C-S* leads to improve the separate studied parameters of fitness components for the mutants are obtained.

**ШИЛИНА Ю.В.<sup>1</sup>, ГУЩА Н.И.<sup>1</sup>, ДЯЧЕНКО А.И.<sup>1</sup>, МОЛОЖАВАЯ О.С.<sup>2</sup>, ОВСЯННИКОВА Л.Г.<sup>1</sup>, ДМИТРИЕВ А.П.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Украина, 003680, Киев, ул. Заболотного, 148, e-mail: j.shilina@gmail.com

<sup>2</sup>Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, Украина, 003022, Киев, пр. Глушкова 2

### **ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ КАК АДАПТИВНАЯ РЕАКЦИЯ У БАКТЕРИЙ**

Техногенные изменения окружающей среды вызывают множественные модификации свойств микробиоты – стимуляцию развития патогенных микроорганизмов, изменение их персистентных характеристик, приобретение ими способности поражать неспецифических хозяев [1]. В основе таких изменений лежит способность микроорганизмов к адаптации. Так, в настоящее время патогенность и ее качественную характеристику вирулентность рассматривают как функцию способности бактерий адаптироваться к организму хозяина [2].

Адаптация как процесс приспособления патогенных микроорганизмов к действию экзогенных стрессовых факторов может достигаться либо путем изменения параметров внешней среды (подавление защитных реакций хозяина, повышение доступности веществ хозяина как источников питания) либо путем изменения параметров внутренней среды (стимуляции репарационных систем патогена, экспрессии различных факторов патогенности (экзоферментов, токсинов) и др.).

В основе процессов приспособления микроорганизмов к условиям абиотической среды и организма хозяина лежит регуляция экспрессии их генов и генных комплексов. Известно, что клетки микроорганизмов могут специфически распознавать различные метаболиты хозяина, что является сигналом для активации их генов вирулентности. На экспрессию отдельных генов или их комплексов у патогенных бактерий оказывает влияние ряд факторов: температура, концентрация в среде различных органических и неорганических компонентов (различные олигосахаридные соединения, неорганические ионы  $Fe^{3+}$ ,  $Ca^{2+}$ ), осмолярность среды, pH,  $pO_2$ ,  $pCO_2$ , концентрация бактериальных клеток (регуляция через медиаторы «эффекта кворума») [3, 4]. Распознавание химических сигналов происходит благодаря наличию у бактерий специфических рецепторов, связанных с системами трансдукции сигналов для активации транскрипции генов. Считается, что физические факторы действуют на бактерии также через соответствующие рецепторы непосредственно или путем изменения химического состава среды [2].

При достижении стрессовыми факторами определенного дозового порога они могут оказывать неспецифическое повреждающее воздействие на клетки, в частности, на их ДНК. При этом разные факторы могут вызывать сходные нарушения. Клетки способны реагировать на повреждения ДНК и запускать системы их репарации.

Важным свойством неспецифических патогенов, способных поражать широкий круг хозяев и выживать во внешней среде, является высокий уровень развития их регуляторных и защитных систем. Полагают, что под факторами патогенности (вирулентности) следует подразумевать не только «специализированные» биомолекулы (например, известные факторы патогенности – ферменты, токсины) и системы микроорганизмов, определяющие реализацию патогенных свойств, но также системы и факторы, повреждение которых приводит к снижению жизнеспособности микроорганизмов (даже непатогенных) [3]. Для фитопатогенов, способных выживать во внешней среде, отмечена важная роль систем репарации ДНК, в частности, системы SOS-репарации [5].

SOS-репарация относится к глобальным регуляторным системам бактерий и одной из ее функций является репарация ДНК. Показано, что *RecA*-зависимой SOS-системе принадлежит также важная роль в проявлении патогенности у микроорганизмов. Данные литературы свидетельствуют о существовании связи патогенности с функционированием локуса *recA* у *Vibrio cholerae* (биотипы classical и El Tor), энтерогеморагенной *E. coli O157:H7* и фитопатогенных бактерий *X. campestris pv. campestris* NRRL и B1459 [6]. Индукторами SOS-системы являются такие ДНК-повреждающие агенты как митомицин С (образование сшивок ДНК-ДНК, двойных разрывов ДНК), налидиксовая кислота (ингибирует активность ДНК-гиразы, ответственной за конформацию ДНК), ионизирующее и УФ-излучение и др. К сигналам, вызывающим индукцию SOS-системы относят 1-нитевые и 2-х нитевые разрывы ДНК, одноцепочечную ДНК, изменение конформации ДНК, накопление отдельных нуклеотидов и др.

Целью данной работы является рассмотрение механизмов неспецифического повышения вирулентности и агрессивности патогенных бактерий как проявления их адаптивного ответа на действие повреждающих факторов разной природы.

Данные ряда исследований свидетельствуют о возможности *RecA*-опосредованной регуляции при действии ДНК-повреждающих агентов экспрессии таких факторов патогенности, как пектинлиаза, липополисахарид и пиоцианин.

Известно, что наиболее простой способ преодолеть клеточный иммунитет – убить клетки хозяина [7]. Пектинолитические ферменты являются токсичными для растительных клеток и прямо или опосредовано вызывают их гибель [8]. Таким образом, интенсивное образование пектинолитических ферментов вызывает быструю гибель растительных клеток и препятствует развитию защитных реакций у растений.

Пектинлиаза является единственным ферментом, способным гидролизовать без предварительного воздействия других ферментов высокоэтерифицированные растительные пектины [9]. Пектинлиазу считают главным ферментом, ответственным за мацерацию тканей картофеля [10]. Патогенность дефицитных по синтезу пектинлиазы мутанты *Erwinia carotovora subsp. carotovora 71* была сниженной [11]. Установлено, что пектинлиаза образуется при действии на бактериальные клетки ДНК-повреждающих факторов. Описано стимуляция синтеза пектинлиазы у *Erwinia carotovora* при действии налидиксовой кислоты, митомицина С, УФ-излучения, у *Erwinia chrysanthemi* и *Pseudomonas marginalis* – при обработке митомицином С [12]. Нами показана возможность стимуляции пектинолитической активности *Erwinia carotovora subsp. carotovora* при действии ионизирующего излучения [13]. Все эти факторы одновременно являются индукторами SOS-ответа. Активация SOS-системы при действии митомицина С не оказывала влияния на активность других пектолитических ферментов – пектатлиаз и пектинметилэстеразы [14]. В свою очередь, активность пектинлиазы, в отличие от пектатлиаз, не реагировала на присутствие в среде пектина и его производных [14].

Синтез пектинлиазы контролируется при участии двух регуляторных генов *rdgA* и *rdgB* [11]. *RdgB* является ДНК-связывающим белком и взаимодействует с промотором

гена пектинлиазы, активируя его транскрипцию, а RdgA функционирует как репрессор rdgB. Экспрессия гена пектинлиазы запускается в результате RecA-опосредованного расщепления репрессора RdgA.

На формирование способности к сопряженной экспрессии ферментов репарации и пектинолизиса у бактерий вероятно оказало влияние присутствие в тканях растений ДНК-повреждающих агентов, которые могут выступать в качестве индукторов пектинлиаз у *Erwinia* [15].

На возможность участия SOS-системы в регуляции структуры и функции липополисахарида (ЛПС) указывают также данные о влиянии ее индуктора - налидиксовой кислоты на транскрипцию генов у *Salmonella enterica typhimurium ATCC14028* [16]. При этом наблюдалась репрессия транскрипции генов «островков патогенности», индукция генов систем эффлюкса, связанных с лекарственной полирезистентностью, липопротеинов внешней мембраны и генов, связанных с регуляцией длины цепей ЛПС. Как известно, ЛПС относится к основным компонентам внешней мембраны клеток грамотрицательных бактерий и является одним из факторов их вирулентности (эндотоксины) с выраженной плеiotропностью действия на организм хозяина. Молекулы ЛПС состоят из трех разных компонентов: липида А, ковалентного соединенного с гетерополисахаридным компонентом, представленным олигосахаридом кора и O-специфическими полисахаридными цепями.

ЛПС является иммуномодулятором и может проявлять иммуносупрессивную активность. Инъекция мышам эндотоксина *Salmonella typhi* за 1-2 дня до введения антигена (эритроцитов овцы) подавляла образование антител [17]. Подавление иммунного ответа ЛПС может быть связано с его цитотоксическим действием на лимфоциты.

Обработка растений ЛПС из разных бактерий предотвращала развитие реакции гиперчувствительности, индуцированной другими элиситорами, подавляла экспрессию ферментов биосинтеза элиситоров (фенилаланинаммонийлиазы, изофлавоноредуктазы), стимулировала образование салициловой кислоты у растений-хозяев и нехозяев, в ряде случаев индуцировала окислительный взрыв у клеток растений, формирование кальциевого сигнала, изменения в процессах фосфорилирования белков [18]. Дефекты ЛПС у представителей видов *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, обуславливали частичную или полную потерю вирулентности [19]. Супрессорный эффект ЛПС проявлялся в отношении всех клеточных процессов, связанных с формированием ответной реакции растений на элиситоры, что указывает на раннюю интерференцию действия ЛПС с процессами сигнальной трансдукции или взаимодействия с базовыми элементами путей сигнальной трансдукции, ответственных за активацию защитных генов [18]. Известно, что ингибирование процессов, связанных с самими ранними сигнальными каскадами при индукции защитных реакций используется многими патогенами в качестве эффективного механизма супрессии.

На возможность RecA-опосредованной регуляции структуры и функции ЛПС указывают также данные об участии SOS-системы в регуляции такого распространенного у грамотрицательных бактерий явления как диссоциация. Данное явление заключается в одновременном существовании в естественных популяциях бактерий одного вида трех фенотипических вариантов (S-, R- и M-форм), которые спонтанно переходят друг в друга. Этот переход связан с блокировкой определенных этапов биосинтеза ЛПС. В клетках S-форм ЛПС включает полный набор структурных элементов, тогда как у R-форм синтезируется ЛПС, в котором отсутствуют O-специфические цепи и/или часть кора. Фенотипическое переключение у возбудителя коричневой пятнистости шампиньона *Pseudomonas tolaasii* от 116S- к 116R-форме обусловлена обратимой 661-bp дубликацией киназного домена регуляторного локуса pheN и является RecA-зависимым процессом [20].

У энтеропатогенных *E. coli* и *S. flexneri* большая плаزمида вирулентности pINV способна к обратимой интеграции-эксцизии с разной точностью при участии гесА-зависимых механизмов. Известно, что гены инвазивности *inv* у шигелл играют определенную роль в экспрессии биологической активности ЛПС, обратимо активируя ЛПС, который при этом проявляет иммуносупрессивную активность [21].

Установлено, что обработка неактивного ЛПС-содержащего фильтрата культуры R-формы бактерий редокс-системой приводит к появлению иммуносупрессивной активности, которая проявлялась ЛПС в S-форме. Этот процесс активации ЛПС в результате химической редокс-обработки (с использованием 0,1 М 2-меркаптоэтанола) сходен с активацией бактериального ЛПС в организме хозяина и имеет обратимый характер [22]. Нами также показано влияние окислительно-восстановительной обработки препаратов ЛПС разных бактерий на их токсичность по отношению к растениям табака [23].

Можно предположить, что некоторые патогенные бактерии могут использовать структурно-функциональные модификации ЛПС как для реализации патогенного потенциала в организме чувствительного хозяина, так и для перехода к стадии резервации для выживания в устойчивых организмах животных и растений и во внешней среде.

Об участии SOS-системы в регуляции экспрессии пиоцианина свидетельствуют данные о возможности индукции его синтеза налидиксовой кислотой [24]. Пиоцианин (1-гидрокси-5-метилфеназин) является пигментом из группы феназинов, синтезируемых бактериями *Pseudomonas aeruginosa* и другими флуоресцирующими видами *Pseudomonas*. Его относят к факторам вирулентности *P. aeruginosa*. Пиоцианин вызывает разные патологические эффекты у про- и эукариотических организмов, что указывает на существование эволюционно консервативных физиологических мишеней его действия [25]. Показано, что пиоцианин подавляет пролиферацию лимфоцитов [26]. Пролиферация лимфоцитов в ответ на антиген обычно является проявлением клеточного иммунитета. Ингибирование пролиферации лимфоцитов и, соответственно, клеточно-опосредованного иммунитета способствует становлению и прогрессии инфекции, вызванной *P. aeruginosa* [26]. Синтез пиоцианина и других феназинов *P. aeruginosa* необходим для развития симптомов заболевания у растений и гибели нематоды *Caenorhabditis elegans* [27]. Его цитотоксическое действие обусловлено образованием активных форм кислорода ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ).

Таким образом, накопленные к настоящему времени результаты исследований свидетельствуют, что у ряда бактерий возможна стимуляция экспрессии факторов патогенности в ответ на ДНК-повреждающее действие различных стрессоров. Для факторов вирулентности, регулируемых таким способом, характерны неспецифическая цитотоксичность и супрессивное действие на защитные системы хозяина, независимо от его таксономического положения. Ввиду этого существует потенциальная опасность преодоления такими патогенами существующих видовых барьеров и появления новых заболеваний, что особенно вероятно при комбинированном действии различных стрессовых факторов и в экологически неблагоприятных условиях.

#### **Литература**

1. Крыленков В.А., Власов Д.Ю. Санитарно-эпидемиологические последствия антропогенной модификации микроорганизмов в урбанизированной среде обитания человека // Инфстрой. – 2004. - № 4 (16). - С. 22-34.
2. Домарадский И.В. Вирулентность бактерий как функция адаптации // Журн. микробиол.- 1997.- № 4.- С. 16-20.
3. Анисимов А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 1. // Молекул. генетика. – 2002. – № 3. – С. 3-23.

4. *Mekalanos J.J.* Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. // *J. Bacteriol.* - 1992. - 174. - P. 1-7.
5. *Kim J.J., Sundin G.W.* Regulation of the *rulAB* mutagenic DNA repair operon of *Pseudomonas syringae* by UV-B (290 to 320 nanometers) radiation and analysis of *rulAB*-mediated mutability in vitro and in planta // *J. Bacteriol.* - 2000. - 182, № 21. - P. 6137-6144.
6. *Шиліна Ю.В., Гуца М.І., Дмитрієв О.П., Кутлахмедов Ю.О., Моложова О.С., Домбровська І.В.* Проблема модифікації патогенності мікроорганізмів в антропогенно змінених екосистемах // *Агроекол. журн.* - 2006. - № 2. - С. 48-58.
7. *Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Двавахия В.Г., Багирова С.Ф.* Общая и молекулярная фитопатология. - М.: Изд-во общества фитопатологов, 2001. - 302 с.
8. *Basham, H.G., Bateman D.F.* Killing of plant cells by pectic enzymes: the lack of direct injurious interaction between pectic enzymes or their soluble reaction products and plant cells. // *Phytopathology.* - 1975. - 65. - P.141-153.
9. *Alana A., Alkorta I., Dominguez J.B., Llana M.J, Serra J.L.* Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1990. - 56. - P. 3755-3759.
10. *van den Broek L.A. M., den Aantrekker E. D., Voragen A.G.J., Beldman G., Vincken J.-P.* Pectin Lyase is a Key Enzyme in the Maceration of Potato Tuber // *J. Sci. Food Agric.* - 1997. - 75. - P. 167-172.
11. *Liu Y., Cui Y., Mukherjee A., Chatterjee A.K.* Activation of the *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectin lyase structural gene *pnlA*: a role for *rdgB*. // *Microbiology.* - 1997. - 143. - P. 705-712.
12. *Sone H., Sugiura J., Itoh Y., Izaki K., Takahashi H.* Production and Properties of Pectin Lyase in *Pseudomonas marginalis* Induced by Mitomycin C // *Agric. Bio. Chem.* - 1988. - 52 (12). - P. 3205-3207.
13. *Шиліна Ю.В., Міхєєв О.М., Гуца М.І.* Дія гострого гамма-опромінення на аресивність та виживання бактерій *Erwinia carotovora* // *Науковий вісник УжНУ. Серія: Біологія.* -2001.- Випуск № 10. - С. 150-152.
14. *Hugouvieux-Cotte-Patiat N., Dominguez H., Robert-Baudou J.* Environmental Conditions Affect Transcription of the Pectinase Genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937 // *J. Bact.* - 1992. - Vol. 174, N 23. - P. 7807-7818.
15. *Tsuyumu S., Funakubo T., Hori K. et al.* . Presence of DNA Damaging Agents in Plants as the Possible Inducers of Pectin Lyases of Soft-Rot *Erwinia* // *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.* - Vol. 51, N 3. - P. 294-302.
16. *Dowd S.E., Killinger-Mann K., Blanton J., San Francisco M., Brashears M.* Positive Adaptive State: Microarray Evaluation of Gene Expression in *Salmonella enterica* Typhimurium Exposed to Nalidixic Acid // *Foodborne Pathogens and Disease.* - 2007. - 4(2). - P. 187-200.
17. *Schwab J.H.* Suppression of the Immune Response by Microorganisms // *Bact. Rew.* - 1975. - Vol. 39, N 2. - P. 121-143.
18. *Tellström V., Usadel B., Thimm O., Stitt M., Kuster H., Niehaus K.* The Lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* Suppresses Defense-Associated Gene Expression in Cell Cultures of the Host Plant *Medicago truncatula* // *Plant Physiology/* - 2007. - Vol. 143. - P. 825-837.
19. *Kingsley M.T., Gabriel D.W., Marlow G.C., Roberts P.D.* The *opsX* Locus of *Xanthomonas campestris* Affects Host Range and Biosynthesis of Lipopolysaccharide and Extracellular Polysaccharide // *J. Bact.* - 1993. Vol. 175, N 18. - P. 5839-5850.
20. *Sinha H., Pain A., Johnstone K.* Analysis of the Role of *recA* in Phenotypic Switching of *Pseudomonas tolaasii* // *J. Bact.* - 2000. - Vol. 182, N 22. - P. 6532-6535.
21. *Шиліна Ю.В., Моложова О.С.* Модифікації ліпополісахаридів як один із способів адаптації клітин патогенних бактерій та їх популяцій до дії біотичних та абіотичних факторів середовища // *Цитологія і генетика.* - 2004. - № 2. - С. 65-80.

22. Борисова Е.В., Бондаренко В.М., Борисов В.А. Иммуносупрессивное действие различных фракций липополисахарида *Salmonella typhimurium* // Журн. микробиол. - 1997. - № 5. - С. 120-123.
23. Моложжава О.С., Шиліна Ю.В. Фітотоксичність модифікованих ліполісахаридів бактерій // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія. – 2007. – Вип. 2 (11). – С. 76-82.
24. <http://fr.wikipedia.org>
25. Ran H., Hassett D.J., Lau G.W. Human targets of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2003. – Vol. 100, N 24. – P. 14315–14320.
26. Sorensen R.U., Klinger J.D., Cash H.A., Chase P.A., Dearborn D.G. In vitro inhibition of lymphocyte proliferation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments. // Infect. Immun. - 1983. – 41. – P. 321-330.
27. Mavrodi, D.V., Bonsall R.F., Delaney S.M., Soule M. J., Phillips G., Thomashow L.S. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // J. Bacteriol. - 2001. – 183. – P. 6454–6465.

### **Резюме.**

В огляді розглянуто механізми експресії факторів патогенності з точки зору адаптивної відповіді бактерій та роль SOS-системи репарації в цих процесах. В якості прикладів наведені механізми експресії таких факторів вірулентності, як пектинліаза, ліпополісахарид та піоціанін.

В обзоре рассмотрены механизмы экспрессии факторов патогенности с точки зрения адаптивного ответа бактерий и роль SOS-системы репарации в этих процессах. В качестве примеров приведены механизмы экспрессии таких факторов вирулентности, как пектинлиаза, липополисахарид и пиоцианин.

The mechanisms of pathogenicity factors expression are considered from the point of view the adaptive answer of bacteria and role of SOS-repair system in these processes. For examples the mechanisms of expression of such factors of virulence, as pectinlyase, lipopolysaccharide and pyocyanine are examined.

**ЩЕРБАКОВА О.В., МОГИЛЯК І.І., МАТІЙЦІВ Н.П., МАКСИМІВ Д.В.,  
ЧЕРНИК Я.І.**

*Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна e-mail: oksana\_kysla@yahoo.com*

### **ЗМІНИ У ТКАНИНІ МОЗКУ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНОГО МУТАНТА 4.14 DROSOPHILA MELANOGASTER В НОРМІ ТА ЗА УМОВ ГІПЕРОКСІЇ**

На даний час відомо багато захворювань нервової системи людини, які пов'язані з ураженням структур головного мозку. Існує чимало гіпотез щодо виникнення кожного конкретного захворювання, однак жодна з них остаточно не пояснює ні етіології, ні патогенезу розвитку нейродегенерації. Подібні процеси описані в багатьох тварин. Дослідження на модельних об'єктах, таких як *Drosophila melanogaster*, дають можливість виявити генетичні і молекулярні механізми виникнення дегенерацій, а також сприяють пошуку фармакологічних засобів, спрямованих на усунення причин їх розвитку. Метою роботи було дослідити вплив гіпероксії на розвиток і природу нейродегенеративних процесів у мутанта з ураженням тканини мозку 4.14. *D.melanogaster*.