

ЗАЙЦЕВА ЮЛИЯ ВЛАДИМИРОВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
QUORUM SENSING СИСТЕМ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ
(НА МОДЕЛИ *SERRATIA*) И ИЗУЧЕНИЕ ИХ РОЛИ В РЕГУЛЯЦИИ
КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

Москва-2012

Работа выполнена в Лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной генетики РАН, г. Москва.

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

Хмель Инесса Александровна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор

Мионов Александр Сергеевич,
ФГУП Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, заведующий лабораторией.

доктор биологических наук,
профессор

Прозоров Александр Александрович,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
главный научный сотрудник.

Ведущая организация: Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

Защита диссертации состоится “14” марта 2013г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, ул. Губкина, дом 3. Факс: (499) 132-89-62, e-mail: aspirantura@vigg.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Автореферат разослан “21” декабря 2012г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Синельщикова Татьяна Аркадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность исследования.

В последние 10-15 лет внимание многочисленных исследователей, работающих с микроорганизмами в различных областях биологии и медицины, как в фундаментальных, так и в прикладных направлениях, было обращено на феномен, получивший название Quorum Sensing.

Quorum Sensing (QS) – это особый тип регуляции экспрессии генов бактерий, зависящей от плотности их популяции. QS системы включают низкомолекулярные сигнальные молекулы (аутоиндукторы), легко диффундирующие из клеток в среду и обратно, и рецепторные регуляторные белки, с которыми взаимодействуют сигнальные молекулы. По мере того, как популяция бактерий увеличивается и достигает критического уровня, аутоиндукторы накапливаются до необходимого порогового значения и связываются с соответствующими рецепторными белками, что приводит к резкой активации (иногда – репрессии) транскрипции определенных наборов генов. С помощью сигнальных молекул QS систем происходит межклеточная коммуникация бактерий в популяциях, обеспечивающая скоординированный ответ бактерий на изменение условий среды.

Изучение биологической значимости регуляторных систем типа QS показало, что эти системы играют ключевую роль в регуляции большого количества процессов бактериальной клетки. Они участвуют во взаимодействии многих бактерий с высшими организмами, животными и растениями, в регуляции вирулентности бактерий, формировании биопленок, регуляции экспрессии генов, связанных с синтезом различных экзоферментов, токсинов, антибиотиков и других вторичных метаболитов, конъюгации, опухолеобразовании у растений, вызванном агробактериями, споруляции у бактерий и др. Использование в последние годы методов транскриптомного и протеомного анализа показало, что QS системы функционируют как глобальные факторы регуляции, т.е. они участвуют в контроле большого количества клеточных процессов, относящихся к различным сторонам метаболизма бактерий.

Исследование QS систем регуляции, их роли в метаболизме и взаимодействии бактерий определяет совершенно новый подход к изучению поведения бактерий в природных условиях; эти исследования могут иметь огромное прикладное значение.

Тот факт, что QS может быть важнейшим фактором регуляции вирулентности бактерий, обусловил новое направление исследований, связанное с использованием QS регуляции в качестве потенциальной мишени для борьбы с инфекционными заболеваниями. В настоящее время этот подход рассматривается как новая

перспективная стратегия антимикробной терапии. В большом количестве лабораторий проводится поиск и изучение веществ, подавляющих QS.

Таким образом, изучение QS регуляции относится к числу актуальных направлений современной молекулярной биологии, генетики и микробиологии, чрезвычайно важных в фундаментальном и прикладном отношении.

Цель работы и задачи исследования.

Данная работа посвящена детальному изучению QS систем грамотрицательных бактерий на примере бактерий рода *Serratia* – исследованию общих принципов организации и экспрессии генов QS систем этих бактерий, природы сигнальных молекул этих систем, роли QS систем в регуляции ряда метаболических процессов, существенных для жизнедеятельности бактерий.

В соответствии с этим в работе были поставлены следующие задачи.

1. Исследовать гены QS систем и сигнальные молекулы, участвующие в их функционировании, у бактерий рода *Serratia*.
2. Выяснить принципы организации и особенности регуляции экспрессии генов QS систем *Serratia*.
3. Определить роль этих систем в регуляции различных клеточных процессов.
4. Исследовать действие антибактериальных веществ, производных нитрофурана, доноров NO и растительных веществ фенольной природы на образование биопленок и QS регуляцию.

Научная новизна и практическая значимость.

Результаты, полученные в работе Зайцевой Ю.В., содержат новую информацию о QS системах грамотрицательных бактерий – о генах, участвующих в функционировании QS систем, регуляции их экспрессии и роли в контроле клеточных процессов.

У исследуемого штамма *S. proteamaculans* 94 идентифицированы QS системы двух типов, использующие в качестве аутоиндукторов N-ацилгомосеринлактоны (АГЛ) и АИ-2. Впервые у бактерий рода *Serratia* был проведен точный количественный масспектрометрический анализ АГЛ.

В ходе работы были идентифицированы, клонированы и секвенированы гены двух типов QS систем *S. proteamaculans*: ген синтазы АГЛ *sprI*, ген регуляторного рецепторного белка *sprR* и ген *luxS*, кодирующий синтазу АИ-2 – сигнальную молекулу QS систем второго типа; получены мутации, инактивирующие эти гены. Было показано, что указанные гены QS систем первого типа кластеризованы, они

транскрибируются конвергентно и перекрываются в терминальных областях.

С помощью Нозерн-гибридизации впервые изучена транскрипция генов QS системы I типа в штамме *Serratia proteamaculans* дикого типа и инсерционных мутантах с нокаутированными генами *sprI* и *sprR*. Установлены тонкие механизмы регуляции транскрипции генов QS системы. Предложена модель экспрессии генов QS системы первого типа *S. proteamaculans*. Согласно этой модели, белок SprR связывается с ДНК в *spr*-боксе и репрессирует собственную транскрипцию; связывание его с АГЛ приводит к дерепрессии транскрипции; белок SprR не обязателен для синтеза АГЛ.

Проведен сравнительный протеомный анализ клеток исходного штамма и мутантов. Показано, что экспрессия более 30 белков находится под влиянием SprIR QS-системы. Эти данные свидетельствуют о глобальной роли QS системы в регуляции клеточных процессов. Впервые проведена идентификация белков *Serratia proteamaculans*, у которых наблюдаются отличия в уровне экспрессии в штамме дикого типа и мутантах. Предполагаемые функции этих белков рассмотрены в свете их клеточных функций и участия в метаболических путях.

Получены данные о роли QS систем двух типов в регуляции клеточных процессов, относящихся к различным сторонам метаболизма *S. proteamaculans* (синтез внеклеточных протеаз, хитиназ, липаз, гемолизина, жирных кислот, летучих органических соединений, образование биопленок и др.).

В ходе работы было исследовано действие различных лекарственных веществ и соединений растительного происхождения на QS и зависящий от этого типа регуляции процесс формирования биопленок. Впервые было показано, что производные нитрофурана, доноры оксида азота и фенольные соединения растительного происхождения в субингибиторных концентрациях увеличивают образование биопленок у бактерий.

Результаты работы могут найти применение в последующих фундаментальных исследованиях молекулярных механизмов коммуникации бактерий.

Полученные в работе данные могут быть использованы в дальнейшем в прикладных целях, в частности, для разработки новых подходов для борьбы с бактериальными инфекциями в медицине и сельском хозяйстве, а также в биотехнологии для получения важных для человека штаммов бактерий на основе конструкций, использующих новые принципы регуляции. Установленные закономерности влияния препаратов нитрофурановой и фенольной природы могут представлять интерес для медицинской практики при разработке рациональной антибактериальной терапии.

Апробация работы и публикации.

Результаты работы неоднократно представлены на крупных российских и международных научных конференциях и симпозиумах. В частности, материалы диссертационной работы были представлены автором на IV Международной конференции «БиоМикроМир 2011» (Торремолинос, Испания, 2011), на V съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Москва, 2009), Всероссийской конференции с международным участием «Физиология и генетика микроорганизмов в природных и экспериментальных системах» (Москва, Россия, 2009), IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, Россия, 2008), Российской школе-конференции «Генетика микроорганизмов и биотехнология» (Москва-Пушино, Россия, 2006). Диссертационная работа была апробирована на заседании ученого совета Института молекулярной генетики РАН 22 июня 2012г.

По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, в том числе 5 статей в журналах, рецензируемых ВАК и 11 работ в материалах всероссийских и международных конференций и симпозиумов.

Декларация личного участия автора.

Основная экспериментальная часть работы (идентификация и клонирование генов QS систем двух типов у штамма *S. proteamaculans* 94, получение инсерционных мутантов, анализ транскрипции этих генов, эксперименты по изучению роли QS систем в регуляции различных клеточных процессов бактерий), а также анализ и обработка результатов выполнены автором самостоятельно. Масс-спектрометрический анализ проводился совместно с сотрудниками Иерусалимского университета (Израиль), протеомные исследования проводились совместно с сотрудниками ИБМХ РАН (Москва).

Структура и объем работы.

Диссертация состоит из разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, список литературы. Работа изложена на 157 страницах машинописного текста, содержит 47 рисунков и 18 таблиц. Библиография включает 288 названий, в том числе 7 русских и 281 иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

В качестве основного, модельного объекта был выбран штамм *S. proteamaculans* 94, выделенный из испорченного в холодильной камере мясокомбината мяса. Штамм способен гидролизовать коллаген при низкой температуре, является продуцентом нескольких внеклеточных протеиназ. В рамках данной работы было уточнено таксономическое положение этого штамма с помощью секвенирования генов 16S рРНК.

1. QS система типа LuxI-LuxR у *Serratia proteamaculans* 94.

На первом этапе работы было проведено определение способности бактерий *S. proteamaculans* синтезировать сигнальные молекулы QS систем первого типа – N-ацил-гомосеринлактоны (АГЛ). При анализе с помощью различных биосенсоров и тонкослойной хроматографии (ТСХ) было обнаружено, что исследуемый штамм проявляет способность активно продуцировать несколько видов АГЛ. Однако, полученные результаты давали лишь предварительные сведения о видах АГЛ, синтезируемых *S. proteamaculans* 94.

Наиболее точным методом определения N-ацил-гомосеринлактонов в настоящее время считается метод масс-спектрометрического анализа. Впервые у бактерий рода *Serratia* был проведен точный количественный масс-спектрометрический анализ АГЛ (таблица 1).

Таблица 1

Анализ АГЛ методом жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии

АГЛ	нг/мл
N-бутаноил-гомосеринлактон, (С4-ГЛ)	12.5
N-гексаноил-гомосеринлактон, (С6-ГЛ)	41
N-(3-оксо-гексаноил)-гомосеринлактон, (3-оксо-С6-ГЛ)	2664*
N-(3-гидрокси-гексаноил)-гомосеринлактон, (3-гидрокси-С6-ГЛ)	1938*
N-(3-гидрокси-октаноил)-гомосеринлактон, (3-гидрокси-С8-ГЛ)	-
N-октаноил-гомосеринлактон, (С8-ГЛ)	25.5
N-(3-оксо-деканоил)-гомосеринлактон, (3-оксо-С10-ГЛ)	2
N-(3-оксо-додеканоил)-гомосеринлактон, (3-оксо-С12-ГЛ)	-
N-додеканоил-гомосеринлактон, (С12-ГЛ)	2
N-(3-оксо-октаноил)-гомосеринлактон, (3-оксо-С8-ГЛ)	следы

Примечание. * - концентрация слишком высока для точного определения.

Проведенный анализ АГЛ показал, что клетки *S. proteamaculans* 94 синтезируют и выделяют в культуральную жидкость в наибольшем количестве 3-оксо-С6-ГЛ и 3-гидрокси-С6-ГЛ. В существенно меньшем количестве клетки продуцируют С6-ГЛ, С8-ГЛ и С4-ГЛ. В культуре также обнаруживаются следовые количества 3-оксо-С10-ГЛ, С12-ГЛ и 3-оксо-С8-ГЛ, которые, возможно, являются производными АГЛ, синтезируемых в больших количествах. Таким образом, исследуемая нами бактерия *S. proteamaculans* продуцировала несколько видов АГЛ, сигнальных молекул QS систем первого типа.

Гены QS системы первого типа были идентифицированы, клонированы и секвенированы: *sprI*, кодирующий синтазу АГЛ, и ген *sprR*, кодирующий рецепторный белок, с которым в других QS системах связываются сигнальные молекулы АГЛ. Проведенное сравнение генов QS первого типа *S. proteamaculans* 94 с функционально близкими соответствующими генами других бактерий показало высокий уровень гомологии нуклеотидных последовательностей генов QS систем этого типа у бактерий рода *Serratia*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Hafnia*.

При анализе нуклеотидной последовательности генов QS системы первого типа *S. proteamaculans* 94 была определена организация этих генов (рис.1). Было показано, что *sprI* и *sprR* гены кластеризованы, они транскрибируются конвергентно и перекрываются в терминальных областях. Такое расположение генов QS системы обнаружено у других членов семейства *Enterobacteriaceae*, включая другие виды *Serratia*, *Erwinia*, *Pantoea* (Beck von Bodman, 1995), что отличается от классической модели QS *Vibrio fischeri*.

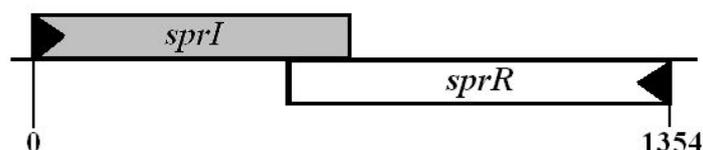


Рис. 1. Организация *sprI* и *sprR* генов у *S. proteamaculans* 94.

Стрелками обозначено направление транскрипции генов.

Длина фрагмента ДНК, который содержит гены *sprI* и *sprR*, составляет 1354 п.н.

Область перекрывания – 23 нуклеотида, эта область богата GC-основаниями (18 GC-пар из 23 п.н.). Области перекрывания генов QS систем высоко гомологичны у *Serratia*; наблюдается 100% гомология с соответствующей областью у *S. plymuthica* HRO-C48. Можно предположить, что эти перекрывающиеся районы функционально значимы для регуляции экспрессии генов QS систем, однако биологическая роль такого перекрывания генов в настоящее время не изучена.

С помощью специализированных программ (<http://molbiol-tools.ca>, **PPP - Prokaryotic Promoter Prediction**) был проведен анализ последовательности фрагмента ДНК, несущего гены первой QS системы и небольшие прилегающие к ним нетранскрибируемые области. В результате были обнаружены наиболее вероятные -10 и -35 последовательности в промоторных областях *sprI* и *sprR* генов у *S. proteamaculans* 94.

Также мы обнаружили предположительный *lux*-бокс перед геном рецепторного белка. *lux*-бокс - это сайт, с которым в других QS системах связываются регуляторные рецепторные белки LuxR-типа, палиндромная последовательность из 20 нуклеотидов. В дальнейшем мы будем называть *lux*-боксы *S. proteamaculans* *spr*-боксом (рис. 2).

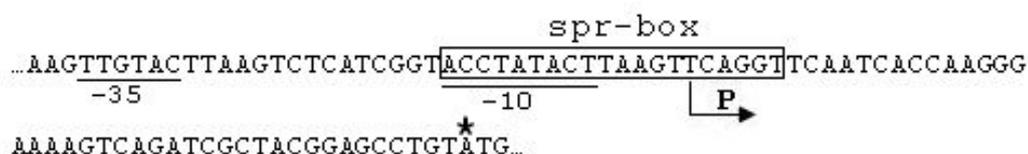


Рис.2. Промоторная область гена *sprR*.

Подчеркнутые последовательности – предположительные сайты -10 и -35, звездочкой обозначен иницирующий кодон. Выделенная последовательность – сходная с *lux*-боксом.

Интересно, что последовательность *spr*-боксы перекрывается с очень вероятным сайтом -10 в промоторе гена R белка, т.е. связывание этого белка в *spr*-боксе может ингибировать инициацию транскрипции гена *sprR*.

Для изучения роли исследуемых QS систем *S. proteamaculans* 94 в регуляции клеточных процессов были получены методом замены генов инсерционные мутанты с инактивированными генами синтазы АГЛ и рецепторного белка. На рис. 3 (А и В) показано положение встроок кассет с геном резистентности к гентамицину в генах *sprI* и *sprR*.

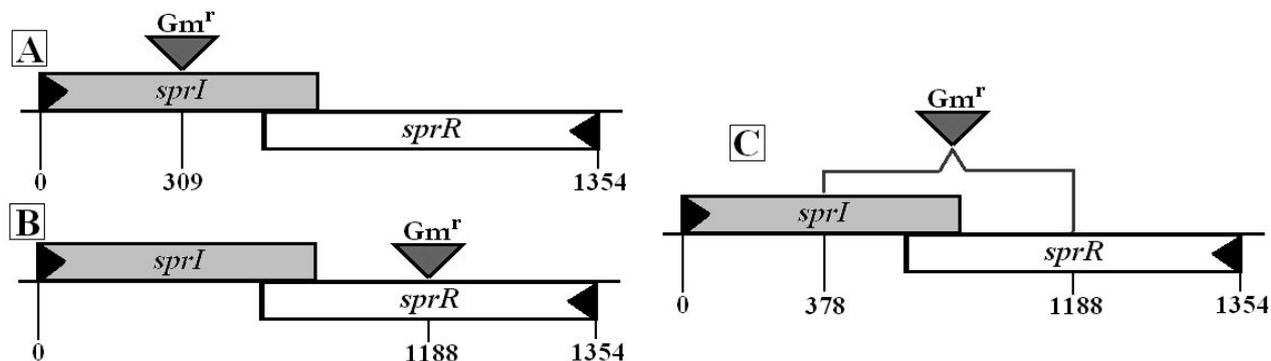


Рис. 3. Положение инсерций кассеты с геном резистентности к гентамицину в генах *sprI* и *sprR*.

Попытки удалить из кластера QS генов фрагмент ДНК, содержащий части этих двух генов (рис. 3, С) оказались невыполнимыми. Делеция фрагмента ДНК, содержащего оба гена QS системы, была летальна для *S. proteamaculans*. Причина этого в настоящее время не ясна, но сам факт указывает на существенную роль QS системы *S. proteamaculans* 94 в метаболизме бактерии – ее участие в жизненно-важных для клеток процессах.

2. Изучение транскрипции генов QS системы первого типа в штамме *S. proteamaculans* 94 и мутантных штаммах.

С помощью Нозерн-гибридизации впервые изучена транскрипция генов QS системы I типа у *S. proteamaculans* в штамме дикого типа и инсерционных мутантах с нокаутированными генами *sprI* и *sprR*. Полученные результаты позволили выявить закономерности регуляции транскрипции генов QS системы I типа *S. proteamaculans*.

Результаты типичного опыта Нозерн-гибридизации представлены на рис. 4. Для стандартизации нанесения образцов на гель и в качестве контроля качества выделенной РНК проводили гибридизацию с 16S рРНК-зондом.

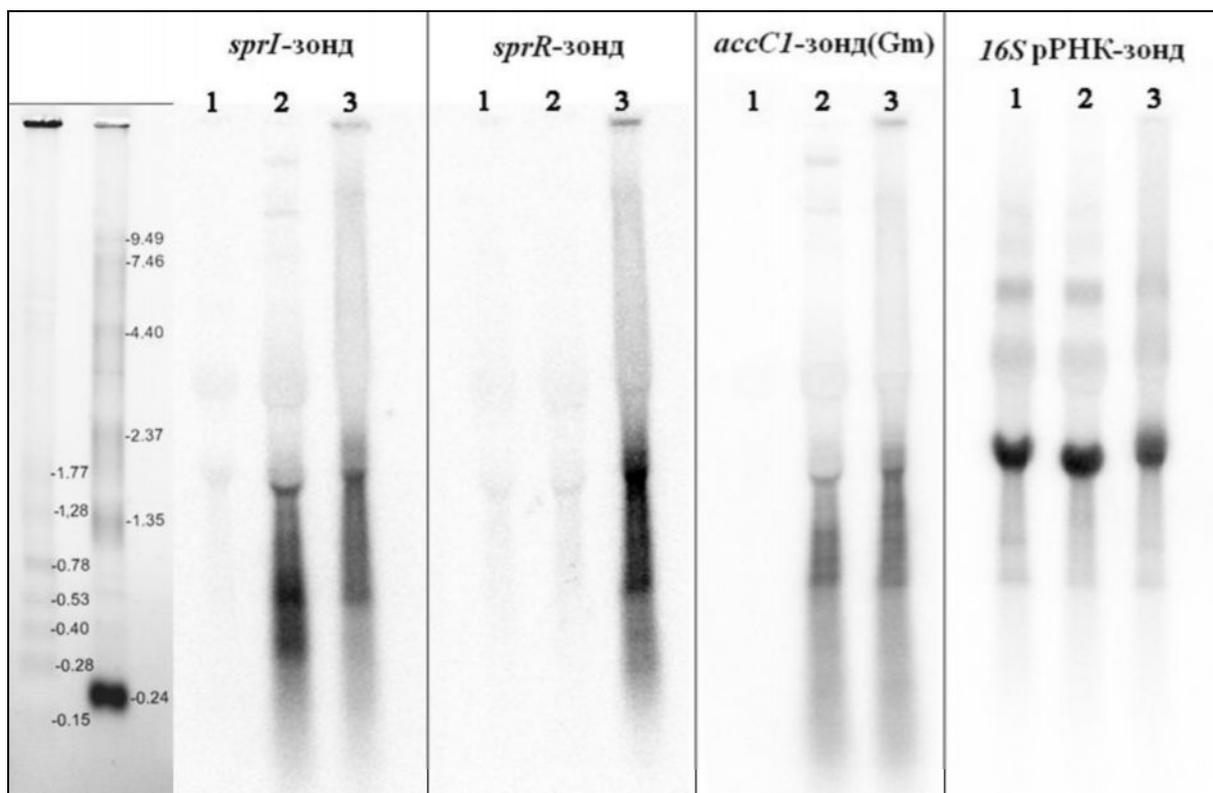


Рис. 4. Гибридизация РНК по Нозерну.

Суммарная РНК выделена из клеток: 1 - дикого типа *S. proteamaculans* 94; 2 – мутанта *S. proteamaculans sprI:Gm^r*; 3 – мутанта *S. proteamaculans sprR:Gm^r*. М- маркеры молекулярной массы. В качестве гибридизационных зондов использованы ПЦР-продукты генов *sprI*, *sprR*, *accC1(Gm)*, 16S рРНК.

Транскрипты гена *sprR* практически не обнаруживаются ни в клетках дикого типа *S. proteamaculans* 94, ни в мутантном штамме *S. proteamaculans sprI:Gm^r*. В то же время мы видим отчетливую транскрипцию с промотора гена *sprR* в мутантном штамме *S. proteamaculans sprR:Gm^r*. Эти данные согласуются с нашим предположением об ауторегуляторной функции R-белка. В штамме дикого типа и в мутантном штамме *sprI: Gm^r* экспрессируется полноценный R-белок, который может связываться с *lux*-боксом и ингибировать инициацию транскрипции собственного гена. В мутанте по *sprR*-гену полный R-белок не синтезируется, и происходит активная транскрипция части гена *sprR* с промотора этого гена.

Для нас было неожиданностью фактическое отсутствие мРНК генов *sprI* и *sprR* в клетках дикого типа *S. proteamaculans* 94. Однако, активный синтез АГЛ в клетках дикого типа и *sprR* мутанта, несомненно, свидетельствует о функционировании синтазы АГЛ и образовании мРНК *sprI* гена. Полученные данные можно объяснить нестабильностью мРНК *sprI* и *sprR* генов. Мы предполагаем, что это может быть связано с особенностями организации генов QS системы, а именно с частичным перекрыванием генов в 3'-концевых областях. Возможно, транскрипты *sprI* и *sprR* генов образуют дуплекс в области перекрывания, который распознаётся специфическими нуклеазами, что далее приводит к деградации РНК. Область перекрывания богата GC-основаниями (18 GC-пар из 23 п.н.), что может способствовать образованию прочной связи. Следует отметить, что экспрессия с промотора гена *sprI* многократно усиливается в мутантных штаммах *sprI:Gm^r* и *sprR:Gm^r*, где отсутствует полный транскрипт одного из генов и образование дуплекса невозможно. Однако, высказанное предположение, несомненно, нуждается в экспериментальной проверке.

3. QS система второго типа у *Serratia proteamaculans* 94.

Было проведено исследование синтеза сигнальных молекул QS систем второго типа (гомологи фуранозил-борат-диэфира, АИ-2) у *S. proteamaculans* 94. Для определения возможного синтеза АИ-2 мы использовали биосенсор *Vibrio harveyi* BB170, лишенный продукции этой сигнальной молекулы. Определяется индуцирующее действие АИ-2 на биолюминесценцию сенсора, которая регулируется с участием QS системы, включающей эту сигнальную молекулу. Полученные результаты приведены в таблице 2.

Из таблицы 2 видно, что добавление супернатанта *S. proteamaculans* 94 активирует биолюминесценцию тестерного штамма-биосенсора *V. harveyi* BB170, как и добавление в качестве контроля супернатанта штамма *V. harveyi* BB120 дикого типа.

Следовательно, АИ-2 присутствует в культуре исследуемого штамма *S. proteamaculans* 94.

Таблица 2

Результаты измерения интенсивности биолюминесценции у *V. harveyi* BB170 при добавлении в среду культивирования супернатантов бактерий (в мкВ/200 мкл)*

Супернатант (штамм)	Рост 3 часа	Рост 5 часов
<i>V. harveyi</i> BB120 (контроль)	4560	14120
<i>S. proteamaculans</i> 94	5700	9150

* Цифры в таблице даются за вычетом контроля – интенсивности светового потока штамма *V. harveyi* BB170, растущего в среде без добавления супернатанта исследуемого штамма. Для биосенсора *V. harveyi* BB170 интенсивность светового потока в этих условиях была равна 15 при трех часах роста и 440 при 5 часах роста.

Был идентифицирован, клонирован и секвенирован ген второй QS системы *luxS*, кодирующий синтазу АИ-2. Было показано, что этот ген высоко гомологичен генам *luxS* других видов *Serratia* и *E. coli*. Мы получили мутант с инактивированным геном *luxS*, но смогли лишь частично изучить эффект этой мутации. Однако, полученный мутантный штамм был очень нестабилен, его свойства изменялись после нескольких пассажей. Поэтому мы не смогли в полном объеме исследовать влияние мутации в гене *luxS* на свойства клеток *S. proteamaculans* 94.

4. Исследование влияния мутаций в генах *sprI*, *sprR* и *luxS* на свойства *S. proteamaculans* 94.

Нас интересовала роль QS в регуляции клеточных процессов, относящихся к различным сторонам метаболизма *S. proteamaculans* 94 (таблица 3).

С помощью биосенсоров *C. violaceum* CV026, *A. tumefaciens* NT1/pZLR4, которые позволяют идентифицировать все указанные выше АГЛ (Chernin, 2004), и ТСХ мы показали, что инактивация гена *sprI* приводила к отсутствию синтеза АГЛ. Это позволяет предположить, что *sprI* ген кодирует единственную синтазу АГЛ в штамме *S. proteamaculans* 94. Мутант *S. proteamaculans sprR:Gm^r* не отличался от исходного штамма по типу синтезируемых АГЛ и по интенсивности их синтеза. Следовательно, мутация в гене рецепторного белка *sprR* на синтез АГЛ не влияет. Инактивация *luxS* гена не влияла на синтез АГЛ, т.е. эти две QS системы, по-видимому, не взаимодействуют в регуляции синтеза АГЛ.

Таблица 3

Характеристика *S. proteamaculans* 94 и мутантных штаммов

Свойства штамма	<i>S. prot.</i> 94	<i>sprI</i> :Gm ^r	<i>sprR</i> :Gm ^r	<i>luxS</i> :Gm ^r
Синтез АГЛ	+	-	+	+
Протеазы	+	-	+	-
Хитиназы	+	-	+	-
Липазы	+	+	+	+
Гемолизин	+	+	+	+
Сворминг	-	-	-	-
Свимминг	+	-	+	-
Способность к образованию биоплёнок	+	снижена в 2 раза	+	н/о
Подавление роста грибов	+	-	+	-

Энтеробактерии рода *Serratia* являются продуцентами большого числа внеклеточных ферментов, используя их для утилизации высокомолекулярных соединений окружающей среды и в качестве факторов агрессии при инвазии и колонизации других организмов. Было исследовано влияние мутаций в генах QS системы *S. proteamaculans* 94 на синтез протеаз, липаз, хитиназ и гемолизина. Инактивация генов синтаз *splI* и *luxS* приводила к снижению экзопротеазной, хитинолитической активностей, не вызывала изменения липазной и гемолитической активностей. Мутация в гене *sprR* не оказывала заметного влияния на изученные ферментативные активности.

Была определена роль QS в контроле некоторых других процессов, ранее не изученных или мало изученных в отношении QS регуляции. В частности, мы исследовали влияние мутаций в генах QS системы на синтез летучих органических соединений (ЛОС). В рамках данной работы мы показали, что исходный штамм продуцирует ЛОС, которые подавляют рост микроорганизмов различных таксономических групп. Масс-спектрометрический анализ смеси ЛОС выявил значительное преобладание в газовой фазе диметилдисульфида. Было показано, что ЛОС *S. proteamaculans* 94 оказывают сильное ингибирующее действие на рост фитопатогенных грибов *Rhizoctonia solani* и *Helminthosporium sativum*. Мы исследовали влияние полученных мутаций в генах QS систем на синтез ЛОС, подавляющих рост фитопатогенных грибов. По данным проведенных экспериментов, мутант *sprR*:Gm^r подавляет рост мицелия гриба и обладает ингибирующим действием, сходным с действием *S. proteamaculans* 94. Это значит, что мутация не затрагивает гены, ответственные за регуляцию синтеза ЛОС. В случае мутантных штаммов

sprI:Gm^r и *luxS:Gm^r* наблюдалось значительное снижение эффекта подавления роста гриба или его отсутствие. Таким образом, QS система играет определенную роль в синтезе ЛОС у *S. proteamaculans* 94.

Было исследовано влияние QS системы на способность клеток *S. proteamaculans* 94 к двум типам миграции по поверхности среды: свормингу и свиммингу. Мы показали, что клетки исходного и мутантных штаммов не способны к миграции по поверхности среды по типу сворминга. Однако, штамм *S. proteamaculans* 94 был способен к миграции по типу свимминга, а мутанты с инактивированными генами синтаз сигнальных молекул характеризовались или резко сниженной миграцией по типу свимминга (*sprI:Gm^r*), или ее отсутствием (*luxS:Gm^r*).

Способность бактерий к миграции по поверхности среды является одним из факторов вирулентности бактерий. Такое мультиклеточное поведение вовлечено в процессы формирования биопленок и процессы колонизации и патогенеза.

Представляло интерес исследовать роль мутаций в генах *sprI* и *sprR* на регуляцию образования биопленок у *S. proteamaculans* 94 – процесс, который у ряда бактерий зависит от QS регуляции. Было показано, что мутация в гене *sprR* не оказывала влияния на уровень образования биопленок. В мутантном штамме по гену *sprI* образование биопленок снижалось вдвое по сравнению с уровнем биопленок в исходном штамме. При этом добавление экзогенного 3-оксо-С6-ГЛ (доминирующий тип АГЛ у *S. proteamaculans* 94) восстанавливало способность к формированию биопленки практически до уровня штамма дикого типа. Добавление других видов АГЛ (С4-ГЛ, С6-ГЛ) не давало подобного эффекта (рис.5).

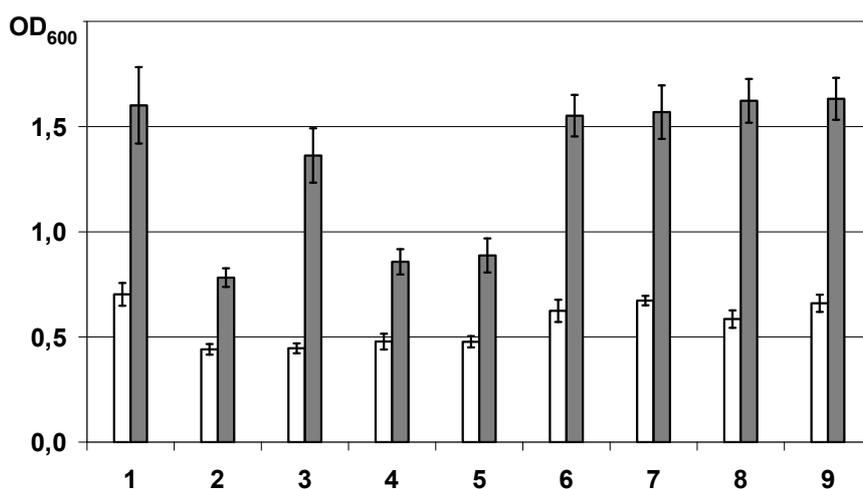


Рис. 5. Образование биопленок (серые столбики) и планктонный рост (белые столбики) *S. proteamaculans* 94 (1), мутантным штаммом *sprI:Gm^r* (2), мутантным штаммом *sprI:Gm^r* с добавлением: 3-оксо-С6-ГЛ (3), С6-ГЛ (4), С4-ГЛ (5); мутантным штаммом *sprR:Gm^r* (6), мутантным штаммом *sprR:Gm^r* с добавлением: 3-оксо-С6-ГЛ (7), С6-ГЛ (8), С4-ГЛ (9).

Полученные результаты показывают, что образование биопленок у *S. proteamaculans* 94 регулируется позитивно 3-оксо-С6-ГЛ-зависимой QS системой.

Интересно, что у второго исследованного нами вида *Serratia* – *S. plymuthica* (штамм HRO-C48) - инактивация гена синтазы АГЛ *splI* вызывала увеличение уровня образованных биопленок в 2 – 2,5 раза, а введение в клетки этого мутанта плазмиды с клонированными генами *splI/splR* снижало формирование биопленок до нормального уровня. Полученные результаты показывают, что формирование биопленок у *S. plymuthica* регулируется негативно SplIR QS системой. У другого штамма этого вида, *S. plymuthica* IC1270, QS система SplIR также оказывала негативное влияние на образование биопленок. Введение в клетки *S. plymuthica* IC1270 рекомбинантной плазмиды, несущей клонированные гены *splI/splR* из *S. plymuthica* HRO-C48, приводило к снижению вдвое формирования биопленок. Эти данные показывают, что QS-регуляция формирования биопленок у рода *Serratia* может быть видо-специфичной.

Успешное формирование биопленок связано со способностью бактерий к адгезии и агрегации. Мутация в гене QS системы *sprI* приводила к изменению характера роста клеток *S. proteamaculans* 94 в жидкой среде в стеклянных пробирках. Для штаммов дикого типа и мутанта по гену *sprR* характерно образование многоклеточных агрегатов, формирование осадка и хлопьев на стенках пробирки, а для мутанта по гену *sprI* характерен диффузный планктонный рост с равномерным помутнением культуральной среды. Резко менялась способность клеток адсорбироваться на поверхности стекла. По-видимому, происходило явное изменение структуры оболочек клеток.

В связи с этим, мы исследовали состав жирных кислот, многие из которых входят в состав мембран бактерий, у *S. proteamaculans* 94 и мутантных штаммов. Методом хромато-масс-спектрометрии был исследован состав жирных кислот у штамма *S. proteamaculans* 94 дикого типа и мутантных штаммов *sprI*:Gm^r и *sprR*:Gm^r. Результаты анализа представлены в таблице 4.

Сравнительный анализ показал значительные изменения состава жирных кислот мутантных штаммов по сравнению со штаммом дикого типа: содержание некоторых ЖК изменялось более чем на порядок, существенно изменилось соотношение насыщенных и ненасыщенных ЖК. Так, соотношение насыщенных и ненасыщенных ЖК в исследуемых образцах составило: 55 и 45% для дикого типа, 62 и 38% для мутанта *sprI*:Gm^r, 69 и 31% для *sprR*:Gm^r.

Соотношение насыщенных и ненасыщенных ЖК в составе ЛПС влияет на физические свойства мембран бактерий. Зависимость текучести мембран от степени

ненасыщенности жирных кислот мембранных липидов – хорошо изученный феномен, показанный на клетках бактерий (Cybulski et al., 2002; Sinensky et al., 1974). Фазовое состояние жидкокристаллической структуры липидного бислоя мембраны, степень ее текучести оказывают весьма существенное влияние на вязко-эластические свойства клеток, их способность к деформации, на активность мембранно-связанных ферментов, на проницаемость мембран. Повышенное содержание ненасыщенных ЖК в составе мембран *Serratia proteamaculans* 94 может служить основной стратегией адаптации к действию пониженных температур. Возможно, этим объясняется высокий адаптивный потенциал этих бактерий к низким температурам, благодаря которому они широко распространены в различных климатических зонах.

Таблица 4

Состав жирных кислот *Serratia proteamaculans* (данные хромато-масс-спектрометрии)

№	R.T.*	Кислота	Содержание ЖК, % от суммы площадей всех пиков		
			1	2	3
1	6.983	додекановая	0,478	0,851	0,90
2	9.495	9-тетрадеценовая	0	0,186	0,40
3	9.578	11-тетрадеценовая	0	0,298	0,57
4	9.873	тетрадекановая	2,72	4,881	5,52
5	10.120	2-гидрокси-додекановая	0	0,182	0,67
6	11.305	пентадекановая	0,569	0,579	1,30
7	12.379	7-гексадеценовая	0,392	0	0
8	12.449	9-гексадеценовая	3,349	27,558	20,68
9	12.797	гексадекановая	37,208	34,562	36,13
10	12.839	3-гидрокси-тетрадекановая	0,608	6,345	8,80
11	13.570	изо-гептадекановая	0,203	0	0
12	13.694	антеизо-гептадекановая	0,299	0	0
13	13.764	гептадеценовая	0,178	0	0
14	13.888	циклопропан-гептадекановая	0,238	5,475	10,20
15	14.071	гептадекановая	0,804	3,375	1,86
16	15.144	9-октадеценовая	33,222	9,415	8,18
17	15.186	11-октадеценовая	4,561	0,275	0,44
18	15.427	октадекановая	10,991	5,089	3,41
19	16.170	октадекадиеновая, конъюгированная	1,246	0,49	0,94
20	17.556	9-эйкозеновая	1,506	0,264	0
21	17.597	11-эйкозеновая	0,917	0	0
22	17.845	эйкозановая	0,511	0,175	0
		Сумма	100,00	100,00	100,00

* - R.T. retention time - хроматографическое время удерживания веществ в колонке;

1 – дикий тип *S. proteamaculans* 94; 2 – мутант *S. proteamaculans sprI:Gm^r*;

3 – мутант *S. proteamaculans sprR:Gm^r*.

По сравнению со штаммом *S. proteamaculans* 94 дикого типа, жирнокислотный состав мутантных штаммов характеризовался меньшей ненасыщенностью, что свидетельствует о более плотной упаковке ЛПС на клеточной поверхности. Возможно, это один из механизмов адаптации клеток в неблагоприятных условиях окружающей среды, позволяющий повысить толерантность мембран к стрессовым факторам.

Следует отметить, что состав жирных кислот клеток бактерий - устойчивая генетическая черта, которая сохраняется во многих поколениях бактерий. Следовательно, столь значительные отличия в составе ЖК мутантных штаммов также подтверждают глобальную роль QS в метаболизме *S. proteamaculans*.

5. Сравнение протеомных карт клеточных культур *S. proteamaculans* 94 и мутантов *sprI:Gm^r* и *sprR:Gm^r*.

Для характеристики полученных мутантов использовали метод протеомного анализа синтезируемых ими белков, сравнительно с белками исходного штамма. Растворимые белки из клеток *S. proteamaculans* 94 и двух мутантов (*sprI:Gm^r* и *sprR:Gm^r*) были проанализированы путем разделения на двумерных гелях (2-Д гелях); в первом направлении – по суммарному заряду белков в диапазоне pI 4-7, во втором направлении – по относительной молекулярной массе в районе 75–10 kDa. Более чем 600 белковых пятен выявилось на каждом из 2-Д гелей, среди которых 30 белковых пятен отличались существенными количественными изменениями между бактериями дикого типа и мутантами (в 1,5 и более раза), что было выявлено с помощью компьютерной программы Melanie III (GeneBio, Switzerland).

В случае мутанта *S. proteamaculans sprI:Gm^r* экспрессия 20 белков изменялась по сравнению со штаммом дикого типа (в 1,5 и более раза): синтез 11 белков был индуцирован или их экспрессия значительно усиливалась, синтез 9 белков был репрессирован или их экспрессия была снижена (таблица 5А).

В случае мутанта *S. proteamaculans sprR:Gm^r* экспрессия 14 белков изменялась по сравнению со штаммом дикого типа (в 1,5 и более раза): синтез двух белков был индуцирован или их экспрессия значительно усиливалась, синтез 12 белков был репрессирован или их экспрессия была сниженной (таблица 5В).

В рамках данной работы впервые была проведена идентификация белков *S. proteamaculans*, у которых наблюдаются отличия в уровне экспрессии в штамме дикого типа и мутантах. В итоге удалось успешно идентифицировать 8 белков. Результаты идентификации суммированы в таблице 6.

Таблица 5

Номера белковых пятен, демонстрирующих статистически достоверные отличия, и их относительные интенсивности

№	%V		№	%V	
	<i>S. prot. 94</i>	<i>sprI:Gm^r</i>		<i>S. prot. 94</i>	<i>sprR:Gm^r</i>
175	0.15±0.00	0.09±0.02	64	0.03±0.00	0
187	0.37±0.01	0.23±0.02	131	0.11±0.01	0.06±0.00
195	1.00±0.11	0.36±0.17	142	0.41±0.06	0.18±0.02
232	0.15±0.01	0.08±0.00	187	0.37±0.01	0.15±0.05
304	0.06±0.00	0	190	0.31±0.00	0.06±0.01
477	0.59±0.07	1.05±0.07	195	1.00±0.11	0.09±0.02
487	0.14±0.01	0.24±0.02	237	0.08±0.01	0
495	0.46±0.08	0.69±0.02	376	0.06±0.00	0
524	0.14±0.00	0.22±0.01	391	0.04±0.01	0
540	0.31±0.08	0.69±0.06	406	0.20±0.01	0.09±0.01
546	0.07±0.01	0.17±0.01	408	0.14±0.03	0
560	0.11±0.03	0	447	0.03±0.01	0.94±0.16
595	0.15±0.01	0.43±0.01	596	0	1.77±0.41
596	0	1.97±0.11	635	0.04±0.01	0
610	0.11±0.00	0.23±0.02			
617	0.26±0.01	0.54±0.04			
619	0.30±0.05	1.16±0.27			
621	0.31±0.02	0.08±0.02			
631	0.14±0.03	0			
642	0.61±0.07	0.05±0.07			

Жирным шрифтом выделены белки, которые удалось идентифицировать.
Значение 0 соответствует отсутствию пятна в данных координатах на геле.

В обоих мутантах был отмечен повышенный уровень экспрессии белков, связанных с устойчивостью штаммов к антибиотикам: аминогликозид-(3)-N-ацетилтрансферазы (устойчивость к гентамицину) и бета-лактамазы. В мутантах *sprI:Gm^r* и *sprR:Gm^r* наблюдались изменения в синтезе существенно важных для метаболизма бактерий белков. Например, мы наблюдали значительное снижение экспрессии белка ФМН-редуктазы у обоих мутантов. У мутантного штамма *sprI:Gm^r* наблюдалась усиленная экспрессия белков, участвующих в защите клеток от окислительного стресса: тиоредоксина 2, тиоредоксин-зависимой тиолпероксидазы, белка теплового шока GrpE. У мутантного штамма *sprR:Gm^r* наблюдалось резкое снижение уровня экспрессии двух субъединиц белка сукцинил-КоА-синтетазы.

Таблица 6

Белки, идентифицированные в *S. proteamaculans* 94

№	Название белка	М.м./pI	Номер в базе данных NCBI
Цикл трикарбоновых кислот			
406	Сукцинил-СоА-синтетаза а-субъединица	29.8/5.9	157369513
190	Сукцинил-СоА-синтетаза б-субъединица	41.3/5.3	157369512
Окислительно-восстановительные реакции			
195	ФМН-редуктаза	26.2/5.0	157368508
Белки общего ответа на стресс			
540	Белок теплового шока GrpE	21.4/4.9	157371919
Защита от окислительного стресса			
619	Тиоредоксин 2	15.6/4.9	157371981
617	Тиоредоксин-зависимая тиолпероксидаза	17.3/5.0	157371748
Устойчивость к антибиотикам			
596	Аминогликозид-(3)-N-ацетилтрансфераза	19.4/5.8	239721
447	Бета-лактамаза	31.7/5.7	46129905

Предполагаемые функции этих белков подробно рассмотрены в экспериментальной части диссертации в свете их участия в метаболических путях. ФМН-редуктаза является одним из компонентов дыхательной цепи бактерий. Тиоредоксин 2 и тиоредоксин-зависимая тиолпероксидаза являются важными редокс-активными белками, которые поддерживают внутриклеточный окислительно-восстановительный потенциал. Белок теплового шока GrpE входит в состав системы шаперона Hsp70, которая способствует правильному фолдингу белков. Сукцинил-КоА-синтетаза - один из ключевых ферментов цикла лимонной кислоты, катализирующий обратимую реакцию образования свободного сукцината.

Таким образом, все идентифицированные белки являются компонентами важных метаболических путей и процессов, что свидетельствует о включении QS систем в глобальные регуляторные сети. К сожалению, небольшое количество идентифицированных белков и отсутствие информации о подобных исследованиях в литературе не позволяет нам получить достаточно полное представление о роли QS систем в регуляции метаболизма этих бактерий. Однако, полученные данные формируют основу для последующих исследований.

6. Влияние нитрофуранов, доноров NO и фенольных соединений растительного происхождения на образование биопленок и QS системы бактерий.

В последние годы активно проводится изучение взаимодействия различных химических соединений с QS регуляцией. Т.к. QS системы участвуют в регуляции вирулентности бактерий, в настоящее время развивается новое направление исследований, связанное с поиском и изучением веществ, ингибирующих QS регуляцию, с целью разработки новых препаратов для борьбы с бактериальными инфекциями. Особое внимание должно быть обращено на изучение действия лекарственных препаратов, используемых в медицинской практике, на QS регуляцию и зависимую от нее экспрессию генов патогенных бактерий, определяющих синтез факторов патогенности.

Одним из факторов патогенности бактерий является их способность образовывать биопленки – процесс, зависимый от QS регуляции. Бактериальные клетки в составе биопленок чрезвычайно устойчивы к действию антибиотиков и других лекарственных препаратов, а также к иммунному ответу организма хозяина. Скрининг веществ, действие которых может предотвратить образование биопленок, является очень важной задачей. В этой части работы было проведено изучение действия ряда антибактериальных препаратов на образование биопленок и QS регуляцию у нескольких бактерий.

Мы исследовали влияние антибактериальных препаратов нитрофурановой серии (рис. 6) на процесс формирования биопленок.

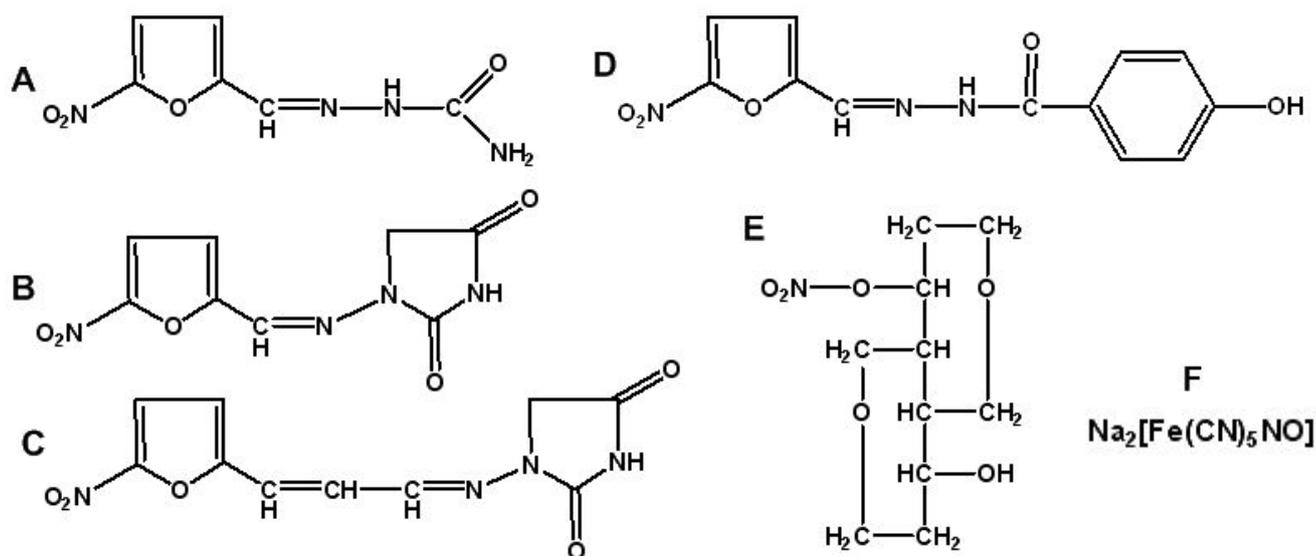


Рис. 6. Нитрофураны и доноры NO.

А – фурацилин, В – нитрофурантоин, С – фурагин, D – нифуроксазид,
Е – изосорбид мононитрат, F – нитропруссид натрия.

Нитрофураны имеют широкий спектр антимикробного действия, они активны в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, грибов и простейших. Нитрофураны являются про-лекарствами, т.е. они становятся токсичными для микроорганизмов в результате модификаций, осуществляемых специфическими ферментами. Показано, что антибактериальная активность нитрофуранов зависит от восстановительного метаболизма нитрогруппы и связана с образованием оксида азота и его производных. В связи с этим мы также исследовали действие двух известных доноров NO (рис.6, E, F).

Было изучено влияние фурацилина, фурагина, нитрофурантоина, нифуроксазида, нитропруссиды натрия и изосорбид мононитрата на формирование биопленок двух патогенных бактерий, *P. aeruginosa* PAO1 и *V. sepioserasia* 370. Было показано, что нитрофураны и доноры NO стимулируют образование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *V. sepioserasia* 370 в пределах субингибиторных концентраций (рис. 7). При дальнейшем повышении концентраций этих соединений формирование биопленок снижалось.

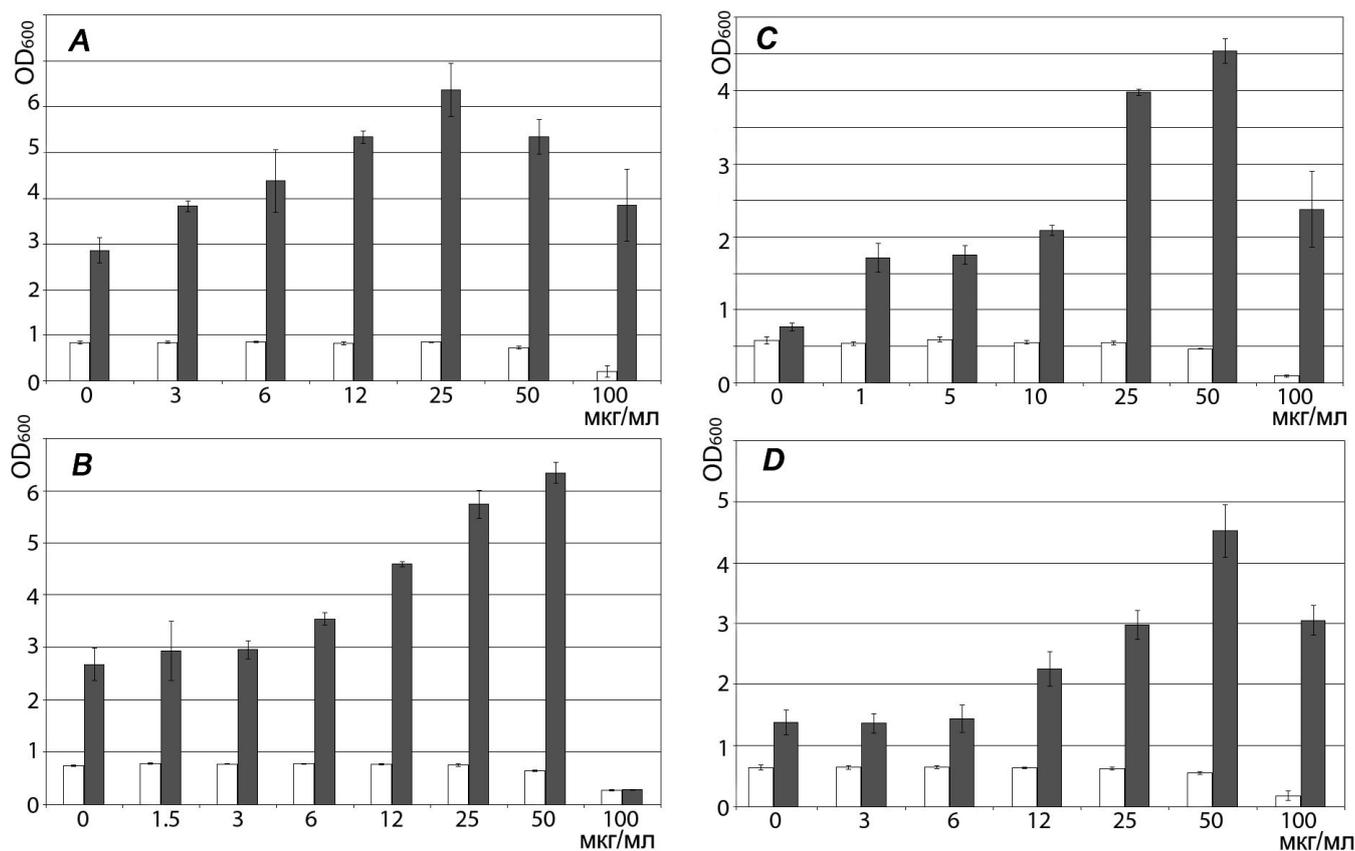


Рис. 7. Влияние фурацилина (А), нитрофурантоина (В), нитропруссиды натрия (С) и изосорбид мононитрата (D) на формирование биопленок *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Белые столбцы – планктонный рост, серые – биопленки.

Стимулирующее действие исследуемых соединений на образование биопленок могло быть вызвано повышенным функционированием в этих условиях QS систем тестируемых бактерий. Чтобы определить, связаны ли наблюдаемые эффекты непосредственно со специфическим действием исследованных веществ на QS системы, мы использовали биосенсоры, любезно присланные нами Dr. B. Ahmer (Lindsay A., Ahmer B. M., 2005). Эти биосенсоры представляют набор изогенных штаммов *E. coli*, у которых отсутствует ген *sdiA* (кодирующий белок SdiA, гомолог белка LuxR) и содержатся или не содержатся гены, кодирующие различные рецепторные белки LuxR типа, что позволяет определить зависимость эмиссии света от этих рецепторных белков. Было показано, что в присутствии нитрофуранов и нитропруссиды натрия происходила активация биолюминесценции указанных биосенсоров, однако, она была независимой от присутствия или отсутствия в репортерных плазидах генов, кодирующих рецепторные белки типа LuxR. Таким образом, исследованные вещества не влияли специфически на QS системы.

При использовании АГЛ-биосенсора *C. violaceum* CV026 (McClellan et al., 1997) мы не обнаружили в присутствии нитрофуранов и NO-доноров синтеза пурпурно-фиолетового пигмента виолацеина, который, как известно, индуцируется АГЛ. Было показано также, что исследованные вещества в присутствии АГЛ не ингибировали функционирование QS регуляции *C. violaceum* CV026.

Другой группой испытанных нами веществ были фенольные соединения растительного происхождения. Фенолы широко распространены в растительном царстве. Обнаружено их регулирующее действие на ряд физиологических и биохимических процессов в растениях, они важны для защиты растений от фитопатогенных бактерий.

Мы исследовали действие 8 фенольных соединений растительного происхождения (рис. 8) на способность *P. aeruginosa* PAO1 и *Agrobacterium tumefaciens* C58 формировать биопленки. *A. tumefaciens* C58 - известный патоген растений, вызывающий образование опухолей (корончатых галлов) у двудольных растений. *P. aeruginosa*, известный как оппортунистический патоген человека, способен также существовать в почве, колонизировать корни растений, формировать биопленки и вызвать гибель растения. В работе принимал участие аспирант В.А. Плюта.

Было показано, что эти соединения могут иметь двойное влияние на формирование биопленок – стимулирующее или подавляющее, в зависимости от концентрации. При концентрациях, не подавляющих или слабо подавляющих рост бактерий, все исследованные соединения стимулировали формирование биопленок

P. aeruginosa PAO1 и *A. tumefaciens* C58. При более высоких концентрациях формирование биопленок было подавлено.

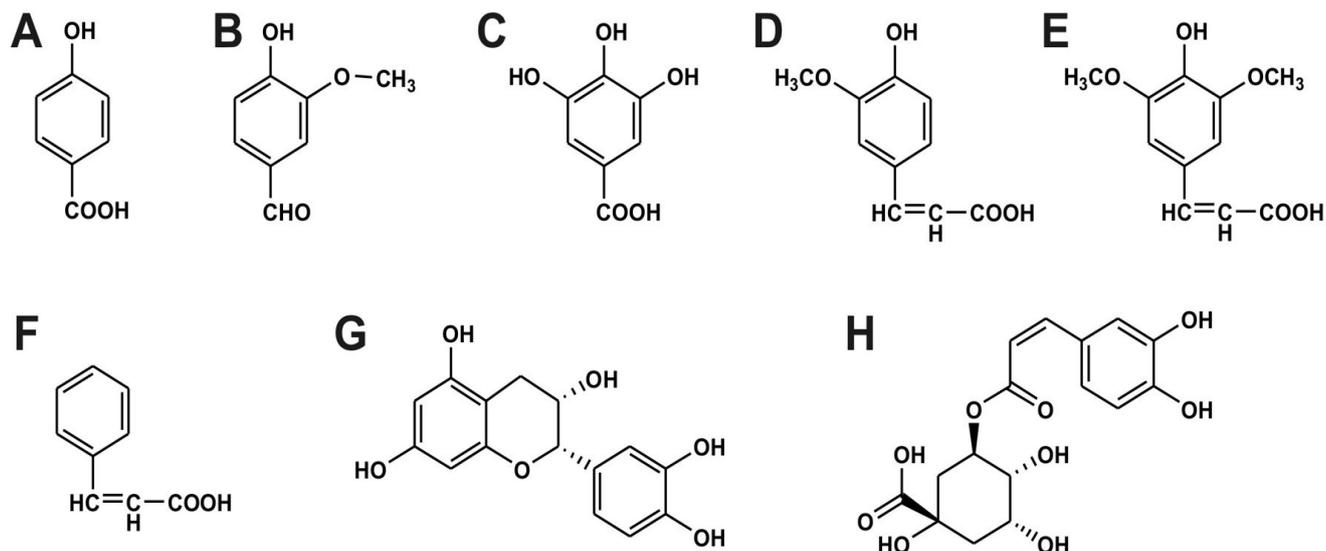


Рис. 8. Фенольные соединения.

А – оксибензойная кислота, В – ванилин, С – галловая кислота, D – феруловая кислота, Е – синаповая кислота, F – коричная кислота, G – эпикатехин, H – хлорогеновая кислота.

При изучении действия растительных фенолов на биосенсоры, указанные выше, не было выявлено их специфического эффекта на экспрессию репортерного *lux*-оперона с промотора генов синтаз соответствующих АГЛ. Эти соединения не вызывали синтеза пурпурно-фиолетового пигмента виолацеина в АГЛ-биосенсоре *C. violaceum* CV026. Таким образом, данные соединения не активировали QS систему биосенсора CV026. Было показано также, что исследованные вещества в присутствии АГЛ не ингибировали функционирование QS регуляции биосенсоров на основе *lux*-репортерных плазмид и биосенсора *C. violaceum* CV026.

Механизм стимуляции формирования биопленок при действии субингибиторных концентраций антибактериальных соединений в настоящее время не изучен. Мы показали, что исследуемые соединения нитрофурановой и фенольной природы не могут замещать АГЛ и взаимодействовать с рецепторными белками LuxR типа. Однако, образование биопленки представляет собой сложный многоступенчатый процесс, и описанные эффекты исследуемых веществ могут быть результатом их влияния на различные стороны метаболизма бактерий. Например, действие фенолов на формирование биопленок может быть обусловлено, по крайней мере частично, их общей характеристикой - антиоксидантной активностью. Однако, необходимы дальнейшие исследования механизмов данного явления.

ВЫВОДЫ.

1. У штамма *S. proteamaculans* 94 идентифицированы Quorum Sensing (QS) системы двух типов, использующие в качестве аутоиндукторов ацилгомосеринлактоны (АГЛ) и АИ-2.

2. Штамм *S. proteamaculans* 94 продуцирует 2 основных типа АГЛ (N-3-оксогексаноил-гомосеринлактон и N-3-гидрокси-гексаноил-гомосеринлактон), а также несколько минорных типов АГЛ (N-гексаноил-гомосеринлактон, N-октаноил-гомосеринлактон и N-бутаноил-гомосеринлактон).

3. Клонированы и секвенированы гены QS системы I типа: ген синтазы АГЛ *sprI* и ген рецепторного регуляторного белка *sprR*. Эти гены транскрибируются с противоположных цепей ДНК навстречу друг другу и частично перекрываются в 3'-концевых областях. В промоторной области гена *sprR* обнаружен *spr*-бокс, гомологичный *lux*-боксы *Vibrio fischeri*.

4. Результаты анализа транскрипции генов *sprI* и *sprR* в клетках исходного штамма и полученных инсерционных мутантов с нокаутированными генами *sprI* и *sprR* позволяют предположить, что белок R является ауторегулятором и репрессирует собственную транскрипцию; связывание его с АГЛ приводит к дерепрессии транскрипции.

5. Сравнительный протеомный анализ клеток исходного штамма и мутантов показал, что экспрессия более 30 белков находится под влиянием SprIR QS-системы.

6. Обнаружена продукция сигнальной молекулы АИ-2 у штамма *S. proteamaculans* 94. Клонирован и секвенирован ген синтазы АИ-2 QS системы II типа *luxS*.

7. Обе QS системы участвуют в регуляции различных клеточных процессов бактерий рода *Serratia* (синтез ферментов, жирных кислот, летучих соединений, образование биопленок и др.).

8. Производные нитрофурана и доноры оксида азота в субингибиторных концентрациях стимулируют образование биопленок у бактерий. Фенольные соединения растительного происхождения в концентрациях, не подавляющих или слабо подавляющих рост бактерий, также оказывали стимулирующее действие на формирование биопленок. Указанные вещества не активировали экспрессию генов синтаз АГЛ в биосенсорах.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

- 1.* Хмель И.А., Белик А.С., Зайцева Ю.В., Данилова Н.Н. Quorum Sensing и коммуникация бактерий // Вестник МГУ, сер. 16, Биол. 2008 №1, с.28-35.
- 2.* Zaitseva J., Granik V., Belik A., Koksharova O., Khmel I. Effect of nitrofurans and NO generators on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Burkholderia cepacia* 370 // Research in Microbiology. 2009, v. 160, 353-357.
- 3.* Зайцева Ю.В., Белик А.С., Плюта В.А., Лобакова Е.С., Хмель И.А. Действие растительных веществ фенольной природы на образование биопленок и Quorum Sensing системы регуляции у бактерий // Бюлл. Моск. Общества испытателей природы, Отдел Биологический, т. 114, в. 2, приложение 1. 2009, с. 47-48.
- 4.* Зайцева Ю.В., Граник В.Г., Белик А.С., Кокшарова О.А., Хмель И.А. Активация биолюминесценции сенсорных штаммов *Escherichia coli*, используемых для определения N-ацил-гомосеринлактонов, в присутствии нитрофуранов и доноров NO// Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 2010 №2, с.24-28.
- 5.* Зайцева Ю.В., Волошина П. В., Лиу Х., Овадис М.И., Берг Г. , Чернин Л.С., Хмель И.А. Участие глобальных регуляторов GrrS, RpoS и Quorum Sensing системы SplIR в регуляции формирования биопленок у *Serratia plymuthica* // Генетика, 2010, т. 46, с. 616-621.
6. Зайцева Ю.В., Громова Т.Ю., Хмель И.А. Quorum Sensing системы регуляции у *Serratia proteamaculans*. В Сб. «Генетика микроорганизмов и биотехнология». Межд. Школа-конф., Москва-Пушино, 2006, с. 95.
7. Зайцева Ю.В., Данилова Н.Н. Взаимодействие Quorum Sensing систем регуляции бактерий с фенольными соединениями растительного происхождения. Тезисы докладов XX зимней Межд. Молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва 11-15 февраля 2008 г., с. 88.
8. Зайцева Ю.В., Белик А.С., Демидюк И.В., Хмель И.А. Quorum Sensing системы у *Serratia plymuthica* и *Serratia proteamaculans*. IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. С междунар. участием. Новосибирск, 11-15 мая 2008 г., с. 160, N 264.
9. Зайцева Ю.В., Лобакова Е.С., Загоскина Н.В., Хмель И.А. Влияние фенольных соединений растительного происхождения на Quorum Sensing системы регуляции бактерий и образование биопленок. IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. С междунар. участием. Новосибирск, 11-15 мая 2008 г., с. 161, N 265.

10. Хмель И.А., Зайцева Ю.В., Белик А.С., Липасова В.А., Данилова Н.Н. Новая стратегия антибактериальной терапии: разработка лекарственных средств, подавляющих вирулентность бактерий. Материалы симпозиума «Фундаментальные науки новым лекарствам. Результаты фундаментальных и прикладных исследований для создания новых лекарственных средств». Москва, 9-11 июня 2008 г., стр. 221.

11. Зайцева Ю.В., Белик А.С., Хмель И.А. Действие препаратов нитрофуранового ряда на Quorum Sensing и формирование биопленок у грамотрицательных бактерий. Российская школа - конференция «Генетика микроорганизмов и биотехнология» (посвящённая 40-летию института ГосНИИгенетика), Москва – Пущино, 20-24 октября 2008 г.

12. И.А. Хмель, М.А. Веселова, Ю.В. Зайцева, А.С. Белик, В.А. Липасова. Quorum Sensing регуляция у грамотрицательных бактерий. Тезисы V Съезда ВОГИС, 2009, Москва, с. 55.

13. Зайцева Ю.В., Загоскина Н.В., Хмель И.А. Субингибиторные концентрации ванилина и эпикатехина стимулируют формирование биопленок *Pseudomonas aeruginosa* и *Agrobacterium tumefaciens*. VII Междунар. Симп. по фенольным соединениям: фундаментальные и прикладные аспекты. Материалы докладов. 2009, Москва, с. 93.

14. Зайцева Ю.В., Хмель И.А. Действие препаратов нитрофуранового ряда и доноров NO на формирование биопленок у грамотрицательных бактерий и Quorum Sensing биосенсоры. Тезисы Междунар. науч. конф. по биоорг. химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвящ. 75-летию со дня рожд. Акад. Ю.А. Овчинникова. Москва, 2009, с. 210-211.

15. Зайцева Ю.В., Липасова В.А., Хмель И.А. Quorum Sensing системы двух типов у *Serratia proteamaculans*. Тезисы Междунар. науч. конф. по биоорг. химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвящ. 75-летию со дня рожд. Акад. Ю.А. Овчинникова. Москва, 2009, с. 208-209.

16. J.V. Zaytseva, I.A.Khmel. Quorum Sensing systems of *Serratia proteamaculans* 94. IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. «BioMicroWorld2011» Torremolinos, Malaga, Spain 14-16 September 2011, p. 535.

* - статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК.