

РОЛЬ КВОРУМ-СЕНСИНГ В РЕГУЛЯЦИИ ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЕНОК ХОЛЕРНЫМИ ВИБРИОНАМИ

Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт

Представлены материалы в отношении кворум-сенсинга, который является главным регулятором межклеточных коммуникаций у холерных вибрионов. Передача информации между отдельными вибрионами осуществляется посредством аутоиндукторов. Их взаимодействие с регуляторными белками способствует активации генов, участвующих в образовании биопленки холерных вибрионов, которая обеспечивает их выживание и распространение.

Журн. микробиол., 2017, № 1, С. 115—119

Ключевые слова: холерные вибрионы, биопленка, окружающая среда, факторы патогенности

S.V.Titova, L.P.Alekseeva

THE ROLE OF QUORUM-SENSING IN REGULATION OF FORMATION OF BIOFILMS BY *VIBRIO CHOLERAE*

Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control, Russia

Materials regarding quorum-sensing that is the main regulator of inter-cellular communications in *V.cholerae* are presented. Information transmission between separate vibrios is executed via autoinductors. Their interaction with regulatory proteins facilitates gene activation that take part in formation of biofilms of *V.cholerae* which ensures their survival and spread.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 115—119

Key words: *V.cholerae*, biofilm, environment, pathogenicity factors

Для сообщения между собой в окружающей среде и в организме человека холерные вибрионы также, как и другие бактерии, используют процесс кворум-сенсинга, который обеспечивает межклеточные коммуникации *V.cholerae*, регулируя экспрессию нескольких фенотипов, в том числе, формирование биопленки, продукцию факторов вирулентности, подвижность, питательные потребности в ответ на изменение плотности клеток [6, 19, 21]. Регуляция осуществляется в результате продукции малых молекул-аутоиндукторов, легко диффундирующих через клеточную стенку возбудителя и связывающихся с регуляторными белками бактерии. Аутоиндукторы осуществляют передачу информации между отдельными клетками бактерий, принадлежащих не только одному, но и разным родам и семействам [11].

Кворум-сенсинг *V.cholerae* включает внеклеточные сигнальные молекулы-аутоиндукторы CAI-1 (S-3-гидрокситридекан-4-она) и связанный с мембраной рецептор CqsS (двухкомпонентная сенсорная гистидинкиназа), которая узнает CAI-1, а фосфорилированный каскад CqsS — >LuxU — >LuxO осуществляет передачу информации, заложенной в CAI-I. Этот каскад спо-

способствует дальнейшей передаче сигналов, что влечет за собой изменение экспрессии регулятора транскрипции *NarR*. В то же время, двухкомпонентная система *VarS-VarA*, действуя на каскад $CqsS \rightarrow LuxU \rightarrow LuxO$, который располагается перед *NarR*, регулирует уровень его экспрессии. Ее влияние на кворум-сенсинг зависит от малых РНК, которые регулируют метаболизм углерода и интегрируют сенсорные сигналы о наличии питательных веществ в окружающей среде [13, 19].

Исследования, проведенные Y.Wei et al. [21], показали, что *CAI-1* ингибирует первоначальное аутофосфорилирование двухкомпонентной сенсорной гистидинкиназы (*CqsS*) и последующие этапы фосфопереноса, а фосфатазная активность *CqsS* не регулируется *CAI-1*. При связывании с *CqsS* молекула *CAI-1* вызывает конформационное изменение, приводящее к недоступности His194 в белке *CqsS* для каталитического домена *CqsS*. Установлено, что мутанты *CqsS* с измененной специфичностью узнавания лигандов эффективно регулируются соответствующими им модифицированными лигандами, что согласуется с моделью двух состояний регуляции лигандами гистидинкиназ [21].

Было также обнаружено, что две химические сигнальные системы, кворум-сенсинг и 3'5'-циклическая дигуаниловая кислота (ц-ди-ГМФ, синтезируемая дигуанилатциклазами, содержащими GGDEF домен), аутоиндукторы которых контролируют изменение в образе жизни бактерий, в частности, образования биопленок холерными вибрионами, оказывая при этом противоположное действие на этот процесс. Оказалось, что кворум-сенсинг подавляет, а ц-ди-ГМФ активирует процесс формирования биопленок. Показано, что белок *NarR* контролирует транскрипцию 14 генов, кодирующих группу белков, которые синтезируют и разрушают ц-ди-ГМФ. Видимо, холерные вибрионы получают сигналы о бактериальном сообществе с помощью внеклеточных аутоиндукторов кворум-сенсинга и внутриклеточную информацию посредством ц-ди-ГМФ для регуляции процесса формирования биопленок [9, 20].

Различные сигналы, поступающие из окружающей среды, регулируют экспрессию сигналов кворум-сенсинга. При высокой плотности клеток у холерных вибрионов включается несколько путей передачи сигналов системы кворум-сенсинга, ведущих к активации основного регулятора белка *NarR*, который затем репрессирует гены регулона вирулентности, гены формирования биопленки и активирует продукцию протеаз. Идентифицирован также регулятор транскрипции *VqmA*, который активирует экспрессию гена *narR* при низкой плотности клеток. Белок *VqmA* повышает уровень транскрипции гена *narR*. При этом белок *VqmA* регулирует транскрипцию гена *narR*, непосредственно связываясь с его промотором, а экспрессия гена *vqmA* регулируется и полностью зависит от плотности клеток в среде [8].

Помимо известного регулятора кворум-сенсинга *LuxU* у бактерий, относящихся к роду *Vibrio*, был обнаружен другой важный регулятор кворум-сенсинга — *AphA*, функционирующий также при низкой плотности клеток. Результаты компьютерного анализа показали, что три гена — *ahpA*, *qrr4* и *oraR* — являются непосредственными мишенями регулятора *AphA* [17].

Молекулы, которые активируют кворум-сенсинг у холерных вибрионов, потенциально способны контролировать их патогенность. Идентифицировано 11 молекул, активирующих кворум-сенсинг холерных вибрионов: восемь из

них являются антагонистами рецепторов, а три — антагонистами LuxO, который регулирует общий каскад кворум-сенсинга [13, 14].

Поедание простейшими организмами является основным фактором гибели вибрионов в воде. В экспериментах с инфузориями *Paramecium caudatum* их взаимоотношения с холерными вибрионами характеризуются как хищник — жертва, где инфузории выступают в роли хищника [3]. В свою очередь, вибрионы используют хитиновые панцири ракообразных в качестве питательных веществ. Взаимодействие *V. cholerae* с хитином осуществляется на разных иерархических уровнях. К ним относятся метаболические и физиологические реакции клеток: хемотаксис, размножение клеток, индукция компетентности, формирование биопленок, круговорот питательных веществ [15]. При этом метаболизировать хитин могут все представители семейства *Vibrionaceae*, содержащие ген хитиназы (*chiA*) [7].

Изучены ферменты хитинолитического комплекса холерного вибриона, такие как хитиназа и N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза, играющие важную роль в сохранении, выживании, питании и формировании новых форм возбудителя в окружающей среде [1, 2].

Глобальный регулятор кворум-сенсинга *NapR* играет важную роль в обеспечении устойчивости бактерий к поеданию: индуцирует формирование биопленки, повышая уровень экспрессии полисахарида (VPS), что ускоряет переход от гладкого к ругозному морфологическому типу колоний с последующим образованием биопленки. Исследования, проведенные S. Sun et al. [8], показали, что штаммы дикого типа наиболее устойчивы к поеданию, мутанты с повышенным уровнем продукции полисахарида — менее устойчивы, но более устойчивы, чем мутанты по кворум-сенсингу. Было установлено, что кворум-сенсинг участвует в обеспечении устойчивости к поеданию преимущественно на стадии зрелой биопленки. Для формирования зрелой биопленки вибрионам необходима продукция компонентов внеклеточного матрикса, к которым относятся экзополисахарид и белки матрикса. Формирование биопленки положительно регулируется регуляторами транскрипции *VpsR* и *VpsT* и отрицательно — регулятором транскрипции системы кворум-сенсинга *NapR*, а также регуляторным комплексом — цАМФ-рецепторный белок (ЦРБ) [5, 18]. Секретия внеклеточных полимерных веществ в виде экзополисахарида (EPS) связывает бактериальные сообщества воедино. Клетки, продуцирующие EPS, обладают селективными преимуществами в сравнении со штаммами, не продуцирующим EPS [12]. Исследования этих авторов показали, что EPS-продуцирующие клетки лишены способности к распространению в новые места обитания. Следовательно, у бактерий существует выбор между преимуществом местной конкуренции и способностью к распространению.

Установлено, что приобретение генетического материала посредством естественной компетентности и трансформации между бактериями происходит в верхнем отделе кишечника и на поверхности хитина, где индуцируется программа осуществления трансформации — горизонтального переноса генов. Естественная компетентность способствует поглощению свободной ДНК и ее рекомбинации в бактериальном геноме. Хитин играет важную роль в развитии природной компетентности бактерий, необходимой для преобразований у некоторых видов рода *Vibrio*. Исследования, проведенные G. Suckow et al. [16], показали, что в процессе этих преобразований на уровне

поглощения ДНК холерный вибрион не различает ее как видоспецифическую структуру. Однако при этом наблюдалась положительная корреляция между кворум-сенсингом и естественной трансформацией. Показано, что именно видоспецифическая сигнальная молекула CAI-1 играет главную роль в природной компетентности, необходимой для появления вибрионов с приобретенными генами [16].

По мнению M. Lo Scudato et al. [10], несмотря на то, что хитиновые поверхности необходимы, их одних недостаточно для индукции компетентности. В процессе компетентности участвуют главные регуляторы кворум-сенсинга — TfoX и HarR, а также два дополнительных регуляторных пути — катаболитная репрессия и кворум-сенсинг. Они и являются компонентами регуляторной сети, осуществляющей регуляцию естественной компетентности. Изучение связи между индукцией хитином и кворум-сенсингом выявило, что белок HarR специфично связывается с промотором гена *qstR*, что указывает на роль белка HarR как активатора гена *qstR*, а белок QstR подавляет индуцируемую хитином активность белка TfoX, являющегося регулятором кворум-сенсинга. Можно сказать, что белок OstR необходим для экспрессии небольшой, но, тем не менее, значимой подгруппы генов компетентности [10].

В биопленках, состоящих из смешанных видов бактерий, образованных на хитиновых поверхностях, холерные вибрионы также приобретают естественную компетентность и поглощают внеклеточную ДНК. Показано, что транскрипция гена компетентности *comEA* и поглощение ДНК бактерий индуцируют CAI-1 и AG-2, а также аутоиндукторы других представителей вибрионов, образующих совместно с *V. cholerae* биопленку [4].

Таким образом, система кворум-сенсинга контролирует групповое поведение холерных вибрионов: обеспечивает формирование биопленок в кишечнике человека и в окружающей среде, создает селективное преимущество патогенным вибрионам, способствуя их распространению и естественной трансформации.

Установлено, что кворум-сенсинг — это особый вид регуляции экспрессии холерных вибрионов, зависимый от плотности популяции бактерий. Процесс кворум-сенсинга включает низкомолекулярные сигнальные молекулы, аутоиндукторы, способные диффундировать через бактериальную клеточную стенку и связываться с регуляторными белками. По мере роста популяции бактерий и достижения ими критического уровня аутоиндукторы взаимодействуют с регуляторными белками, и это приводит к активации генов, в том числе таких факторов, как вирулентность и образование биопленки. Благодаря кворум-сенсингу холерные вибрионы получают возможность координированно контролировать экспрессию генов во всем сообществе. Функциональная система кворум-сенсинга обеспечивает бактериям значительное преимущество в выживании как в организме людей, так и в окружающей среде, в частности, биопленках, образующихся как в кишечнике, так и на хитиновых поверхностях водных животных и растений, где возбудитель приобретает естественную компетентность для поглощения внеклеточной ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С. Некоторые свойства N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы холерного вибриона. Холера и патогенные для человека вибрионы. Материалы проблемной комиссии. Ростов-на-Дону, 2014, 27: 105-108.

2. Мишанькин Б.Н., Шиманюк Н.Я., Водопьянов С.О. Изучение хитинолитического комплекса холерного вибриона сероварианта O139. Биотехнология. 2010, 1: 32-40.
3. Титова С.В. Взаимоотношения холерных вибрионов с представителями планктона водоемов средних широт в условиях эксперимента: Автореф. дис. канд. мед. наук. Ростов-на-Дону, 2000.
4. Antonova E.S., Hammer B.K. Quorum-sensing autoinducer molecules produced by members of a multispecies biofilm promote horizontal gene transfer to *Vibrio cholera*. FEMS Microbiol. Lett. 2011, 322(1): 68-76.
5. Fong J.C., Yildiz F.H. Interplay between cAMP-CRP and c-di-GMP signaling in *Vibrio cholerae* biofilm formation. J. Bacteriol. 2008, 190 (20): 6646-6659.
6. Hammer B.K., Bassler B.L. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholera*. Mol. Microbiol. 2003, 50 (1): 101-104.
7. Hunt D.E., Gevers D., Vahora N.M. et al. Conservation of the chitin utilization pathway in the Vibrionaceae. Appl. Environ. Microbiol. 2008, 74 (1): 44-51.
8. Liu X., Beyhan S., Lim B. et al. Identification and characterization of a phosphodiesterase that inversely regulates motility and biofilm formation in *Vibrio cholera*. J. Bacteriol. 2010, 192 (18): 4541-4552.
9. Liu Z., Hsiao A., Joelsson A., Zhu J. The transcriptional regulator VqmA increases expression of the quorum-sensing activator HapR in *Vibrio cholera*. J. Bacteriol. 2006, 188 (7): 2446-2453.
10. Lo Scudato M., Blokesch M. A transcriptional regulator linking quorum sensing and chitin induction to render *Vibrio cholerae* naturally transformable. Nucleic Acids Res. 2013; 41(6): 3644-3658.
11. Miller J., Miller M.C., Nielsen A.T. et al. vpsA- and luxO-independent biofilms of *Vibrio cholera*. FEMS Microbiol. Lett. 2007, 275 (2): 199-206.
12. Nadell C.D., Bassler B.L. A fitness trade-off between local competition and dispersal in *Vibrio cholera* biofilms. PNAS USA. 2011, 108 (34): 14181-14185.
13. Ng W.L., Perez L., Cong J. et al. Broad spectrum pro-quorum-sensing molecules as inhibitors of virulence in vibrios. PLoS Pathog. 2012, 8 (6): e1002767.
14. Perez L.J., Ng W.L., Marano P. et al. Role of the CAI-1 fatty acid tail in the *Vibrio cholerae* quorum sensing response. J. Med. Chem. 2012, 55 (22): 9669-9681.
15. Pruzzo C., Vezzulli L., Colwell R.R. Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin. Environ. Microbiol. 2008, 10 (6): 1400-1410.
16. Suckow G., Seitz P., Blokesch M. Quorum sensing contributes to natural transformation of *Vibrio cholerae* in a species-specific manner. J. Bacteriol. 2011, 193 (18): 4914-4924.
17. Sun F., Zhang Y., Wang L. et al. Molecular characterization of direct target genes and cis-acting consensus recognized by quorum-sensing regulator AphA in *Vibrio parahaemolyticus*. PLoS One. 2012, 7 (9): 44210.
18. Sun S., Kjelleberg S., McDougald D. Relative contributions of *Vibrio* polysaccharide and quorum sensing to the resistance of *Vibrio cholerae* to predation by heterotrophic protists. PLoS One. 2013, 8 (2): e56338.
19. Tsou A.M., Liu Z., Cai T. et al. The VarS/VarA two-component system modulates the activity of the *Vibrio cholerae* quorum-sensing transcriptional regulator HapR. Microbiology. 2011, 157 (Pt 6): 1620-1628.
20. Waters C.M., Lu W., Rabinowitz J.D. et al. Quorum sensing control biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic Di-GMP levels and repression of vpsT. J. Bacteriol. 2008, 190 (7): 2527-2536.
21. Wei Y., Ng W.L., Cong J. et al. Ligand and antagonist driven regulation of the *Vibrio cholerae* quorum-sensing receptor CqsS. Mol. Microbiol. 2012, 83 (6): 1095-1108.

Поступила 04.08.16

Контактная информация: Алексеева Людмила Павловна, д.б.н.,
344002, Ростов-на-Дону, ул. Горького, 117/40, р.т. (863)240-27-03