

Лавина А.М., Хакимова Л.Р., Матниязов Р.Т., Вершинина З.Р., Баймиев Ал.Х.
Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук,
Республика Башкортостан, г. Уфа, Россия
E-mail: owlwoman@mail.ru

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПО ГЕНАМ *pssA* И *rosR* РИЗОБИАЛЬНЫХ ШТАММОВ, МЕЧЕННЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ БЕЛКОМ GFP

Установление специфических симбиотических отношений между ризобиями и бобовыми растениями представляет собой сложный процесс, требующий обмена сигнальными молекулами-посредниками между обоими партнерами. Выделяемые корнями бобовых растений флавоноиды индуцируют у ризобий экспрессию генов клубенькообразования – Nod-факторов. Синтез Nod-факторов необходим, но недостаточен для морфогенеза эффективных фиксирующих азот клубеньков. Так как не менее важным фактором при формировании клубеньков является синтез ризобактериями экзополисахаридов (ЭПС), которые играют решающую роль в симбиотических взаимодействиях клубеньковых бактерий с бобовыми растениями. Кроме того в свободноживущих клетках ризобий ЭПС отвечают за прикрепление к абиотическим и биотическим поверхностям и за формирование биопленок, обеспечивающих адаптацию бактерий к изменяющимся условиям окружающей среды. В настоящее время формирование биопленок ризобиями и взаимосвязь этого процесса с эффективным клубенькообразованием интенсивно изучается. Особого внимания заслуживают ген *rosR*, который кодирует транскрипционный регулятор, участвующий в биосинтезе ЭПС, а также ген *pssA*, ответственный за инициацию процесса биосинтеза ЭПС в ризобиях.

Для исследования генов, ответственных за синтез ЭПС, в рамках их воздействия на формирование биопленок ризобиями, в частности в искусственных симбиотических системах, где большую роль играет колонизация корней растений, необходима визуализация взаимодействия азотфиксирующих бактерий с корнями растений. В виду этого целью данной работы являлось получение рекомбинантных по генам *pssA* и *rosR* ризобияльных штаммов, меченных флуоресцентным белком GFP. Для этого была получена генно-инженерная конструкция, содержащая ген флуоресцентного белка GFP, который служит для визуализации взаимодействия ризобий с корнями растений. Было проведено клонирование генов *pssA* и *rosR* в плазмиду pJB658GFP, трансформация данной конструкцией ризобий и микроскопическое исследование полученных рекомбинантных штаммов.

Показано, что рекомбинантные ризобияльные штаммы с дополнительной копией гена *pssA* или *rosR* характеризуются большим ослизнением клеточных стенок, по сравнению с дикими штаммами, что указывает на их большую выработку экзополисахаридов и, как следствие, указывает на повышение конкурентоспособности штаммов.

Ключевые слова: *R. leguminosarum*, ризобии, экзополисахариды (ЭПС), *pssA*, *rosR*, биопленка.

Rhizobium leguminosarum – это граммотрицательные почвенные бактерии, способные фиксировать азот. Ризобии могут существовать и как свободно живущие микроорганизмы, и как азотфиксирующие симбионты внутри клубеньков растения-хозяина. Установление специфических симбиотических отношений между ризобиями и бобовыми растениями представляет собой сложный процесс, требующий обмена сигнальными молекулами-посредниками между обоими партнерами. Выделяемые корнями бобовых растений флавоноиды индуцируют у ризобий экспрессию генов клубенькообразования (*nod*, *nodI* и *nodJ*). В результате ризобии синтезируют специфические сигнальные молекулы – липохитоолигосахариды, называемые Nod факторами [1]. Nod факторы отвечают за

формирования клубеньков, то есть новой специализированной структуры, в которой происходит фиксация азота [2], [3].

Nod факторы играют важную роль в формировании клубеньков, однако, для формирования эффективных фиксирующих азот клубеньков необходимо участие генов, вовлеченных в формирование бактериальной клеточной поверхности, таких как гены, ответственные за синтез экзополисахаридов (*exo/pss* гены), липополисахаридов (*lps* гены), капсулярных полисахаридов или К-антигенов и β -1,2(1,3)-глюканов (*ndv* гены) [4]. Мутации по этим генам нарушают инфекционный процесс в различной степени.

Ризобактерии синтезируют большое количество кислых внеклеточных полисахаридов

(ЭПС), так как они играют решающую роль в симбиотических взаимодействиях клубеньковых бактерий с бобовыми растениями [5]. Так синтез ЭПС ризобиями, которые образуют клубеньки недетерминированного типа (например, *Trifolium*, *Pisum*, *Vicia* и *Medicago*), необходим для скручивания корневых волосков, правильного формирования инфекционных нитей, дифференцировки бактериоидов и эффективного клубенькообразования [6]. Экзополисахарид-дефицитные мутанты *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* индуцируют образование небольших, клубеньков на растениях клевера, которые неэффективны при фиксации азота [7].

Биосинтез ЭПС у ризобий, происходит в 3 этапа: синтез повторяющихся олигосахаридных звеньев, их модификация и полимеризация, а также транслокация на поверхность клетки. ЭПС синтезированный *R. leguminosarum*, представляет собой полимер, состоящий из октасахаридных повторяющихся единиц, содержащих D-глюкозу, D-глюкуроновую кислоту и D-галактозу в молярном соотношении 5:2:1. Этот октасахарид модифицируется двумя остатками ацетата пировиноградной кислоты, O-ацетильными и гидроксипутаноильными группами [6]. Сборка повторяющихся звеньев инициируются путем переноса глюкозо-1-фосфата с UDP-глюкозы на носитель C₅₅-изопренилфосфата (IP), который расположен на внутренней мембране. Эта стадия синтеза ЭПС обеспечивается глюкозил-IP-трансферазой, кодируемой консервативным геном *pssA*. Ген *pssA* не связан с другими генами синтеза ЭПС и представлен отдельной открытой рамкой считывания [8].

Регуляция биосинтеза ЭПС важна для выполнения биологических функций этого полимера в симбиозе. Однако все еще мало известно о регуляции экспрессии генов *pss* в ответ на сигналы окружающей среды. Один из таких регуляторных генов *rosR*, который кодирует транскрипционный регулятор, участвующий в биосинтезе ЭПС. Мутация в гене *rosR* в *R. leguminosarum* bv. *trifolii* приводит к 3-кратному уменьшению синтеза ЭПС и образованию клубеньков у клевера, неспособных фиксировать атмосферный азот, тогда

как множественные копии этого гена вызвали 2-кратное увеличение синтеза этого полимера [9]. *RosR* представляет собой белок массой 15,7 кДа. С-конец белка представлен мотивом цинкового пальца типа C₂H₂, который связывается с последовательностью в 22-п.н., называемой *RosR box*. Было показано, что *RosR* распознает и связывается с мотивом *RosR box*, расположенным до *rosR* и, в следствие, отрицательно регулирует транскрипцию гена. На экспрессию *rosR* влияют такие факторы окружающей среды, как источники углерода, фосфатов и флавоноиды. Те же внешние факторы влияют на уровень производства ЭПС в *R. leguminosarum* [10].

В свободноживущих клетках ризобий ЭПС выполняют несколько другие функции, такие как сбор питательных веществ, защита от воздействия окружающей среды, прикрепление к абиотическим и биотическим поверхностям и формирование биопленок, обеспечивающих адаптацию бактерий к изменяющимся условиям окружающей среды [7].

Прикрепление почвенных бактерий к растительным клеткам является одним из самых ранних этапов взаимодействия симбионтов в сложном специфическом инфекционном процессе, необходимом для растительно-микробных взаимодействий. Первой фазой прикрепления является обратимое и неспецифическое связывание, в котором участвуют ризобияльные экзополисахариды. Такое прикрепление представляет собой начальный этап формирования ризобиями биопленок на корнях растений [11].

В настоящее время формирование биопленок ризобиями и взаимосвязь этого процесса с эффективным клубенькообразованием интенсивно изучается [12]. Для исследования генов, ответственных за синтез экзополисахаридов, в рамках их воздействия на формирование биопленок ризобиями, в частности в искусственных симбиотических системах, где большую роль играет колонизация корней растений, необходима визуализация взаимодействия азотфиксирующих бактерий с корнями растений. В виду этого **целью** данной работы являлось получение рекомбинантных по генам *pssA* и *rosR* ризобияльных штаммов, меченных флуоресцентным белком GFP.

Материалы и методы

Объекты и материалы исследования

В экспериментах по клонированию применяли плазмидные векторы pJN105TurboGFP, pAL-2T, pJB658, а также штамм *Escherichia coli* NEB 10. В опытах трансформации ризобияльных штаммов использовали дикие штаммы *R. leguminosarum* VCr7 и штамм *R. leguminosarum* VSy3 из коллекции штаммов бактерий ИБГ УНЦ РАН.

Молекулярно-биологические манипуляции

Выделение высокомолекулярной бактериальной ДНК проводили по методу Грэхэма с некоторыми модификациями. Выделение плазмидной ДНК, анализ рекомбинантных клонов, клонирование амплифицированной ДНК в плазмидные векторы, расщепление ДНК рестрикционными эндонуклеазами и лигирование, подготовку компетентных клеток и их трансформацию плазмидной ДНК, электрофорез фрагментов ДНК и их элюцию из легкоплавкой агарозы проводили по лабораторному руководству Сэмбрука и соавт. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием стандартных наборов для амплификации ДНК «ДНК-технология» (Россия) в приборе Терцик МС2 («ДНК-технология», Россия). Определение нуклеотидных последовательностей ДНК выполняли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 310 («Applied Biosystems», США), используя наборы для секвенирования «Big Dye Terminator v. 3.0». Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью

пакета компьютерных программ Lasergene («DNASTAR, Inc.», США).

Результаты и обсуждение

Для визуализации взаимодействия ризобий с корнями растений, нами была получена генно-инженерная конструкция с зеленым флуоресцентным белком GFP. Так целевой ген GFP был амплифицирован из вектора pJN105TurboGFP, который ранее был получен в нашей лаборатории [13]. Для того чтобы обеспечить конститутивную экспрессию зеленого флуоресцентного белка, данный ген был амплифицирован вместе с промотором фага T5 при помощи специфичных праймеров, содержащих сайт рестрикции *HindIII*. Далее амплифицированную последовательность ДНК клонировали в промежуточный вектор pAL-2T. Затем из плазмиды pAL-2T с помощью рестриктазы *HindIII* была вырезана последовательность ДНК, содержащая конститутивный промотор фага T5 и ген GFP. После этого последовательность ДНК была клонирована в вектор pJB658 по сайту рестрикции *HindIII* (рис. 1). Так был получен штамм *E. coli* + pJB658GFP, меченный флуоресцентным белком GFP (рис. 2).

Данный вектор использовался для создания плазмидных конструкций с генами *pssA* и *rosR*, которые ответственны за синтез экзополисахаридов. Для этого гены *pssA* и *rosR* были амплифицированы, с помощью специфичных праймеров с сайтами рестрикции *NdeI*, фланкирующих структурную часть генов. Данные, полученные при секвенировании исследуемых последовательностей, подтвердили их идентич-

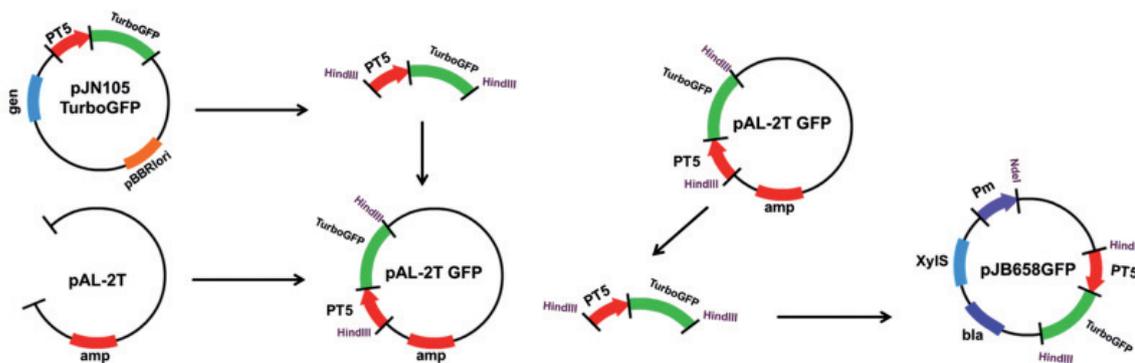


Рисунок 1 – Схема создания генно-инженерной конструкции pJB658GFP

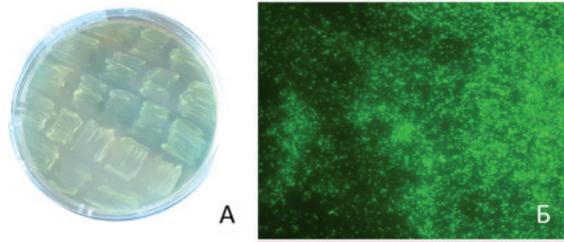


Рисунок 2 – А – Изображение штамма *E. coli* + pJB658GFP на чашке Петри, Б – Изображение штамма *E. coli* + pJB658GFP, полученное с помощью флуоресцентного микроскопа.

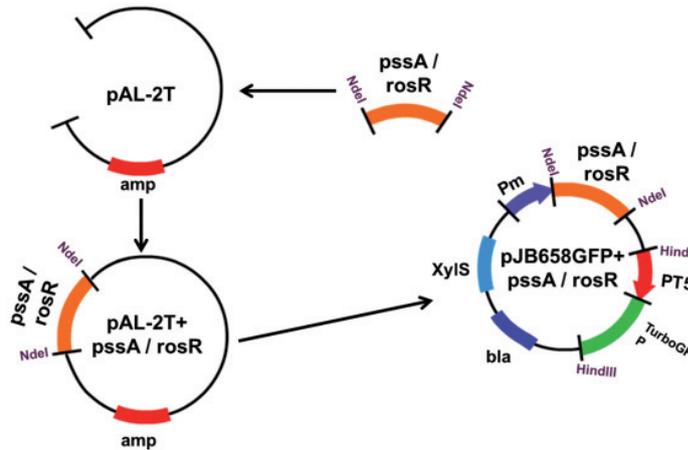


Рисунок 3 – Схема создания конструкций с геном GFP и генами *pssA* или *rosR*

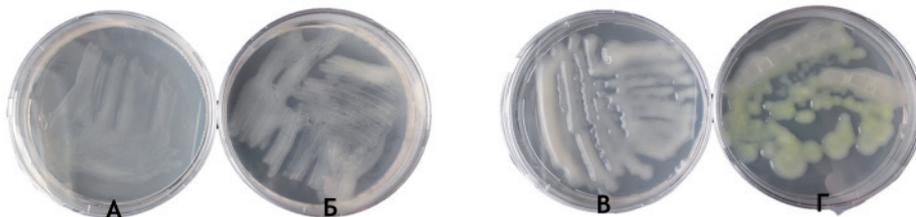


Рисунок 4 – А - *R. leguminosarum* VCr7; Б - *R. leguminosarum* VCr7 + pJB658GFP *pssA*; В - *R. leguminosarum* VSy3; Г - *R. leguminosarum* VSy3 + pJB658GFP *rosR*.

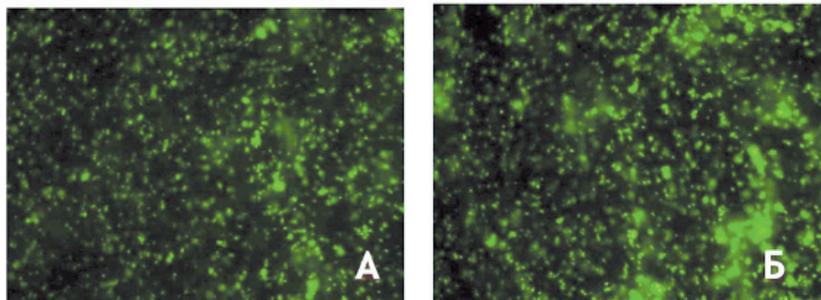


Рисунок 5 – Изображения ризобактерий, меченых GFP, полученные с применением флуоресцентного микроскопа:
А - *R. leguminosarum* VCr7 + pJB658GFP_ *pssA*,
Б - *R. leguminosarum* VSy3 + pJB658GFP_ *rosR*.

ность с последовательностями, представленными в GenBank. Так гены *pssA* и *rosR* были клонированы в промежуточный вектор pAL-2T, а затем в вектор pJB658GFP под индуцибельным промотором Pm (рис. 3).

Далее данными конструкциями были трансформированы ризобийные штаммы. Так были получены штамм *R. leguminosarum* VCr7 pJB658GFP+pssA и штамм *R. leguminosarum* VSy3 pJB658GFP+rosR (рис. 4).

Флуоресцентное свечение трансформированных штаммов было проанализировано с помощью флуоресцентного микроскопа (рис. 5).

Согласно литературным данным ризобийная клеточная поверхность покрыта капсулой, состоящей главным образом из ЭПС. Ризобактерии синтезируют большое количество ЭПС, необходимых для установления симбиотических отношений с бобовыми растениями, питания, защиты от вредных факторов окружающей среды, формирования биопленок [12]. Чем больше ризобии синтезируют ЭПС, тем выше их конкурентоспособность по сравнению с другими штаммами. Полученные в данной работе рекомбинантные штаммы ризобий характеризуются большей выработкой ЭПС по сравнению с дикими штаммами, что выража-

ется наибольшим ослизнением азотфиксирующих бактерий.

Заключение

Таким образом, были получены штамм *Rhizobium leguminosarum* VCr7 pJB658GFP + pssA и штамм *R. leguminosarum* VSy3 pJB658GFP + rosR, которые характеризуются большей выработкой экзополисахаридов, что выражается наибольшим ослизнением азотфиксирующих бактерий.

Таким образом, была получена генно-инженерная конструкция с зеленым флуоресцентным белком GFP, который необходим для визуализации взаимодействия ризобий с корнями растений, а также исследуемыми генами, участвующими в биосинтезе экзополисахаридов (*pssA/rosR*). С помощью данной конструкции были получены штаммы *R. leguminosarum* VCr7 + pJB658GFP_pssA и *R. leguminosarum* VSy3 + pJB658GFP_rosR. Показано, что рекомбинантные ризобийные штаммы с дополнительной копией гена *pssA/rosR* характеризуются большим ослизнением клеточных стенок, по сравнению с дикими штаммами, что указывает на их большую выработку экзополисахаридов и, как следствие, указывает на повышение конкурентоспособности штаммов.

04.10.2017

Исследования выполнялись с привлечением приборного парка ЦКП «Биомика» Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН в рамках госзадания по теме № АААА-А16-116020350028-4 при финансовой поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований (гранты РФФИ № 16-04-00902А; №16-34-01076 мол_а; №17-44-020201р_а)

Список литературы:

1. Geurts, R. Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection / R. Geurts, E. Fedorova, T. Bisseling // *Current opinion in plant biology*. – 2005. – Vol. 8. – No. 4. – P. 346-352.
2. Spaink, H.P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria / H.P. Spaink // *Annual Reviews in Microbiology*. – 2000. – Vol. 54. – No. 1. – P. 257-288.
3. Gage, D.J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes / D.J. Gage // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2004. – Vol. 68. – No. 2. – P. 280-300.
4. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions / A. Skorupska [et al] // *Microbial cell factories*. – 2006. – Vol. 5. – No. 1. – P. 7.
5. Cheng, H.P. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti* / H.P. Cheng, G.C. Walker // *Journal of bacteriology*. – 1998. – Vol. 180. – No. 19. – P. 5183-5191.
6. Downie, J.A. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots / J.A. Downie // *FEMS microbiology reviews*. – 2010. – Vol. 34. – No. 2. – P. 150-170.
7. Janczarek, M. Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia / M. Janczarek // *International journal of molecular sciences*. – 2011. – Vol. 12. – No. 11. – P. 7898-7933.
8. Mutation in the *pssB-pssA* intergenic region of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* affects the surface polysaccharides synthesis and nitrogen fixation ability / M. Janczarek [et al] // *Journal of plant physiology*. – 2001. – Vol. 158. – No. 12. – P. 1565-1574.
9. Janczarek, M. The *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* RosR: transcriptional regulator involved in exopolysaccharide production / M. Janczarek, A. Skorupska // *Molecular plant-microbe interactions*. – 2007. – Vol. 20. – No. 7. – P. 867-881.

10. Janczarek, M. Modulation of *rosR* expression and exopolysaccharide production in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* by phosphate and clover root exudates // M. Janczarek, A. Skorupska // International journal of molecular sciences. – 2011. – Vol. 12. – No. 6. – P. 4132-4155.
11. Rinaudi, L.V. An integrated view of biofilm formation in rhizobia / L.V. Rinaudi, W. Giordano // FEMS microbiology letters. – 2010. – Vol. 304. – No. 1. – P. 1-11.
12. Цыганова, А. В. Роль поверхностных компонентов ризобий в симбиотических взаимодействиях с бобовыми растениями / А.В. Цыганова, В.Е. Цыганов // Успехи современной биологии. – 2012. – Т. 132. – №. 2. – С. 211-222.
13. Получение флуоресцентно меченых штаммов клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых для их детекции *in vivo* и *in vitro* / Ан.Х. Баймиев, Р.С. Ямиданов, Р.Т. Матниязов [и др.] // Молекулярная биология. - 2011. - Т. 45. - № 6. - С. 984-991.

Сведения об авторах:

Лавина Анна Михайловна, аспирант лаборатории молекулярной биологии
и нанобиотехнологии Института биохимии и генетики УНЦ РАН

450054, г. Уфа, пр-т Октября, 71; тел.: (347) 235-60-88; факс: (347) 235-61-00, e-mail: owlwoman@mail.ru

Хакимова Лилия Ралисовна, м.н.с. лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологии
Института биохимии и генетики УНЦ РАН

450054, г. Уфа, пр-т Октября, 71; тел.: (347) 235-60-88; факс: (347) 235-61-00, e-mail: lili-nigmatullina@bk.ru

Матниязов Рустам Тахирович, н.с. лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологии
Института биохимии и генетики УНЦ РАН; кандидат биологических наук

450054, г. Уфа, пр-т Октября, 71; тел.: (347) 235-60-88; факс: (347) 235-61-00, e-mail: rmat@mail.ru

Вершинина Зилья Рифовна, н.с. лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологии
Института биохимии и генетики УНЦ РАН; кандидат биологических наук

450054, г. Уфа, пр. Октября, 71; тел.: (347) 235-60-88; факс: (347) 235-61-00, e-mail: zilyaver@mail.ru

Баймиев Алексей Ханифович, заведующий лаборатории молекулярной биологии
и нанобиотехнологии Института биохимии и генетики УНЦ РАН; доктор биологических наук
450054, г. Уфа, пр-т Октября, 71; тел.: (347) 235-60-88; факс: (347) 235-61-00, e-mail: baymiev@mail.ru