

УДК 579.0:570.16:570.23

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РОЛИ цАМФ И АДЕНИЛАТЦИКЛАЗ ПАТОГЕНОВ ЖИВОТНЫХ, ФИТОПАТОГЕНОВ И МУТУАЛИСТОВ РАСТЕНИЙ В КОНТРОЛЕ ИХ ВИРУЛЕНТНОСТИ

© 2016 г. Л. А. Ломоватская, А. С. Романенко, О. В. Кузакова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Сибирский институт физиологии и биохимии растений

Сибирского отделения Российской академии наук

(Иркутск, Россия)

В обзоре приведена сравнительная оценка участия цАМФ и аденилатциклаз бактериальных патогенов животных, фитопатогенов, а также мутуалистов растений в контроле и модуляции всех этапов инфекционного процесса (адгезия, формирование биопленок, регуляция активности факторов транскрипции и систем секреции).

Ключевые слова: аденилатциклазы, цАМФ, факторы вирулентности, бактериальные патогены животных, фитопатогены, мутуалисты

Внутри- и межклеточные коммуникации микроорганизмов, а также регуляция метаболизма осуществляются с помощью ряда сигнальных молекул. Гормоноподобные ацилгомосерин лактоновые аутоиндукторы, контролируют чувство кворума (QS) в грам-отрицательных бактериях, а у грамположительных бактерий используются секретлируемые пептиды (AIP). Эти соединения, диффундируя через мембраны клеток бактерий из внеклеточной среды, прямо или косвенно контролируют экспрессию генов (Jimenez et al., 2012). К другим медиаторам относятся циклические нуклеотиды, гуанозинпентафосфат и гуанозинтетрафосфат, а также ионы кальция, инозитолтрифосфат и диацилглицерол (Büttner, Bonas, 2010). Перечисленные сигнальные молекулы с помощью других компонентов сложной сигнальной сети взаимодействуют с бактериальным геномом. Это позволяет не только тонко и своевременно реагировать на изменения окружающей среды, но и контролировать и модулировать активность различных факторов вирулентности (Matsumoto et al., 2003; Ryan, 2013). цАМФ – вторичный мессенджер аденилатцик-

лазной сигнальной системы и аденилатциклаза (АЦ) – фермент, его синтезирующий, также считаются индукторами, участвующими в регуляции метаболизма и механизмах патогенности бактерий (Smith et al., 2004). Однако, несмотря на выявленные общие свойства и структуру многих факторов вирулентности патогенов животных и растений, а также симбионтов (Kereszt et al., 2011), подавляющее большинство данных о роли цАМФ и аденилатциклаз бактерий в процессах адгезии, формировании биопленок и экспрессии факторов вирулентности относится к патогенам животных, о чем написано несколько подробных обзоров (Wolfgang et al., 2003; Fulcher et al., 2010; McDonough, Rodriguez, 2012; Ono et al., 2014). В то же время о подобных механизмах взаимодействия растительных патогенов и симбионтов информация почти отсутствует. В связи с этим целью данного обзора явилась сравнительная оценка роли цАМФ и аденилатциклаз бактериальных патогенов животных, растений, а также мутуалистов в контроле и модуляции всех этапов инфекционного процесса.

К настоящему времени накапливается все больше данных, свидетельствующих о том, что стратегии вирулентности бактериальных патогенов животных и растений намного более сходны между собой, чем предполагалось ранее (Büttner, Bonas, 2003; Soto et al., 2006; Tampa-

Классы бактериальных аденилатциклаз

Класс АЦ	Патогены животных	Фитопатогены	Мутуалисты	Источник литературы
Класс I (энтеробактериальный)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Vibrio cholera</i>	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	?	Danchin, 2010
Класс II (токсический)	<i>Bacillus anthracis</i> , <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	?	?	Drum et al., 2002; Baker, Kelly, 2004
Класс III (универсальный)	<i>Corynebacterium liquefaciens</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Rhizobium meliloti</i> , <i>Sinorhizobium meliloti</i>	Shenoy, Visweswariah, 2006
Класс IV	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Yersinia pestis</i>	?	?	Danchin, 2010
Класс V	<i>Prevotella ruminicola</i>	?	?	Cotta et al., 1998
Класс VI	?	?	<i>Rhizobium etli</i> , <i>Mesorhizobium loti</i> , <i>Sinorhizobium meliloti</i>	Tellez-Sosa et al., 2002

Примечание: вопросы означают отсутствие информации.

kaki, 2014). Так, показано, что штамм PA14 *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка) в результате мутагенеза приобрел способность инфицировать не только мышей, но и арабидопсис. Авторы полагают, что у данного штамма присутствуют некие белковые факторы вирулентности, общие для патогенов животных и растений (Rahme et al., 2000; Cao et al., 2001). Еще одним подтверждением существования общих механизмов вирулентности, присущих патогенам животных и растений, являются результаты экспериментов по взаимодействию *Yersinia pseudotuberculosis* с растениями картофеля *in vitro*. Было показано, что инокуляция в район корневой системы патогенных для человека бактерий приводила к их транслокации в стебли и листья с сохранением жизнеспособности, что сопровождалось заметным ингибированием роста растений (Романенко и др., 2006). Бактериальные мутуалисты растений, например, симбиотические азотфиксаторы, на ранних этапах взаимодействия также проявляют свойства фитопатогенов, активируя ряд факторов вирулентности, что позволяет им не только проникать в растения, но и успешно подавлять их иммунитет (Kambar et al., 2009; Kereszt et al., 2011; Okazaki et al., 2013).

Вторичные мессенджеры микроорганизмов, независимо от специализации последних, активно функционируют на всех этапах патогенного процесса. Эти этапы включают адге-

зию, формирование биопленок, узнавание, экспрессию факторов вирулентности и т.д.

В аденилатциклазной сигнальной системе (АЦ) стартовым ферментом является АЦ, синтезирующая цАМФ. Для поддержания необходимого уровня цАМФ у бактерий, так же как и у эукариот, имеется фосфодиэстераза, превращающая цАМФ в нециклическую форму. Кроме того, белок То1С способствует транспорту цАМФ через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий, например, *Escherichia coli* (Green et al., 2014).

В данном обзоре основной акцент будет сделан на аденилатциклазы, поскольку именно они имеют еще и самостоятельное значение как фактор вирулентности у патогенов животных (Wolfgang et al., 2003).

Классификация бактериальных АЦ

АЦ живых организмов делятся на шесть классов, значительно различающихся по первичной структуре, и включают как трансмембранные и мембраносвязанные, так и растворимые формы (Danchin, 2010). Интересно, что большая часть АЦ патогенов животных, фитопатогенов и мутуалистов входят в третий, самый обширный класс, названный универсальным, поскольку к нему относятся и АЦ млекопитающих (таблица).

Как видно из таблицы, в настоящее время остается много вопросов о принадлежности АЦ к тем или иным классам у различных видов

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РОЛИ цАМФ

бактерий, отличающихся по специализации. Интенсивное развитие биоинформатики позволяет считать, что такое положение не является окончательным и в ближайшие годы позиции с вопросительными знаками будут заполнены.

У некоторых видов бактерий АЦ представлены множественными формами, принадлежащими к различным классам, как например у *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis* и *Escherichia coli* (Casey et al., 2014). Ранее предполагалось, что такое разнообразие форм АЦ необходимо для поддержания метаболизма и вирулентности в разнообразных условиях жизни (изменение pH, голодание, температура), что особенно актуально для патогенов. Однако, по последним данным, даже в измененных условиях только половина всех форм АЦ у представителей микобактериальных видов, куда в основном входят патогены животных, транскрибируется одновременно. На этом основании авторы делают вывод, что механизм регуляции активности различных форм АЦ осуществляется, в основном, на посттрансляционном уровне (Casey et al., 2014). В связи с этим представляется, что регуляция активности АЦ происходит на уровне целых молекул, затрагивая их конформацию, и как следствие, влияет на изменение кинетических параметров. В то же время присутствие АЦ, различия в функциях которых зависят от окружающих условий, указывает на узкую специализацию микроорганизмов и существенную роль этого фермента в их адаптации к условиям обитания. Это можно проиллюстрировать на примере *Aeromonas hydrophila*, оптимум функционирования АЦ которого находится при pH 9,5 и температуре 65°C.

В отличие от патогенов животных, у *Sinorhizobium meliloti*, микросимбионта растений, транскриптомный анализ показал, что из 26 АЦ на начальных этапах симбиоза активируются только три: *cyuD1*, *cyuF4* и *SMA1591* (Ampe et al., 2003). Причем только эти АЦ у данного вида микроорганизма принадлежат к новому уникальному классу VI (Ampe et al., 2003). К сожалению, их роль в растительно-микробном взаимодействии до сих пор не ясна. Возможно, что по мере совершенствования методов секвенирования генов и биоинформатики, представители всех классов АЦ будут обнаружены у известных на данный момент прокариот, различающихся по специализации.

Регуляция и контроль активности АЦ микроорганизмов представляются весьма важным шагом в координации экспрессии генов

вирулентности. Есть несколько путей, через которые АЦ микроорганизмов непосредственно или опосредованно регулируют и контролируют их патогенность. Так, Chp (хемосенсорная система) *Pseudomonas aeruginosa* является регулятором активности одной из аденилатциклаз, CyuB, и контролирует тем самым уровень цАМФ в клетке (Fulcher et al., 2010; He, Bauer, 2014).

АЦ возбудителей болезней человека (*Bacillus anthracis*, *Bordetella pertussis*) непосредственно секретируются в клетки хозяина, где разрушают *status quo* его метаболизма путем избыточного продуцирования цАМФ. Причем активация этих АЦ (EF и CyuA, соответственно) происходит только при связывании с кальмодулином эукариота (McDonough, Rodriguez, 2012). Для фитопатогенов непосредственное участие АЦ в инфекционном процессе почти не исследовано, но по имеющимся косвенным данным можно предположить, что они также могут играть существенную роль в фитопатогенезе. Основанием для такого предположения служат результаты экспериментов по выявлению роли некоторых эффекторных белков фитопатогенов и микросимбионтов в инфицировании и вирулентности (Casper-Lindley et al., 2002; Schechter et al., 2004; 2010). Для этого была создана генетическая конструкция, представляющая собой комплекс гена *CyuA* из *Bordetella pertussis* и гена исследуемого белка, в частности, *HopPtoQ bkb* (фитобактериальный эффекторный белок из *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* или *Erwinia carotovora* sp. *atroseptica*, или ген *NopP Sinorhizobium fredii*). Исследования показали, что добавление *CyuA* в конструкцию не только позволяет транспортироваться эффекторному белку в растительную клетку, но и вызывает существенное повышение уровня цАМФ в ней, как в случае фитопатогена, так и симбионтов, поскольку *CyuA* активируется растительным кальмодулином (Casper-Lindley et al., 2002; Schechter et al., 2010). Это указывает как на сходство в строении АЦ патогенов животных и растений (возможно участие растворимой АЦ), так и на вероятную их роль в фитопатогенных и мутуалистических взаимоотношениях. Кроме того, мутуалисты растений, в частности, азотфиксирующие бактерии, используют АЦ в регуляции взаимоотношений с макропартнером, то есть с бобовым растением. Благодаря наличию дополнительных рецепторных доменов в молекулах АЦ (*CyuD1*, *CyuD2* и *CyuK*) *Sinorhizobium meliloti*, являющейся микросимбионтом для *Medicago sativa*, происходила активация этих ферментов

неизвестным растительным сигналом, присутствующим в развивающихся клубеньках. Уровень цАМФ, синтезирующегося при этом, через ряд каскадных реакций модулировал количество клубеньков на корнях макросимбионта. Инактивация такого каскада приводила к развитию гиперклубенькового фенотипа, сопряженного с неэффективным симбиозом (Tian et al., 2012).

Роль цАМФ в контроле QS, формировании и плотности бактериальных биопленок

Известно, что в природных экосистемах бактерии в основном существуют не в виде свободно плавающих клеток, а в виде прикрепленных к субстрату сообществ – биопленок (biofilms) (Чернявский, 2013). Способность бактерий формировать биопленки сама по себе уже является существенным фактором их патогенности, и кроме того, именно в состоянии биопленок в большей степени проявляются различные факторы вирулентности.

Установлено, что на ранних этапах формирования биопленок значительная роль принадлежит цАМФ бактерий. Так, показано, что цАМФ регулирует переход обратимого прикрепления *Pseudomonas aeruginosa* к необратимому. Это связано с тем, что в бактериальном планктоне при избыточном уровне цАМФ снижается гидрофобность клеток (Ono et al., 2014), что способствует их необратимому прикреплению к субстрату. На модели *Serratia marcescens* показано, что сверхэкспрессия генов фосфодиэстеразы, приводящая к снижению уровня цАМФ, также увеличивала плотность биопленки за счет активации фимбрий I типа (Kalivoda et al., 2013). Следует заметить, что, по-видимому, существуют различия в оптимальной концентрации цАМФ для эффективного пленкообразования у патогенов, фитопатогенов и мутуалистов. По нашим данным, плотность биопленок *Pseudomonas siringae* pv. *pisi* и *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* уменьшалась при снижении внутри- и внеклеточного уровня цАМФ (Ломоватская и др., 2016).

Общие механизмы регуляции циклическим АМФ активности факторов вирулентности

Кроме непосредственного участия, АЦ бактерий косвенно влияют на инфекционный процесс, являясь источником цАМФ.

Основной функцией цАМФ в бактериальной клетке, также как и у эукариот, является регуляция экспрессии генов в изменяющихся условиях существования (Casey et al., 2014; Green et al., 2014). Изменения в уровне этого

вторичного мессенджера сопряжены с активностью транскрипционных факторов из семейства CRP (цАМФ-рецепторных белков). Другое название этих белков – CAP (catabolite gene activator protein). CRP представляют собой гомодимеры, в которых каждая субъединица выполняет специфические функции. До недавнего времени считалось, что цАМФ-зависимые CRP (CRP-cAMP) связываются с межгенными сайтами для CRP в соответствии с классической генной регуляцией, однако, позже появились данные о том, что CRP-цАМФ также связывается со многими внутригенными сайтами, где выполняет роль хромосомного организатора или ассоциированного с ядром белка NAP (Grainger et al., 2005). Интересно, что Cfp *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* является ортологом CRP *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, который, в свою очередь, гомологичен CRP *E. coli* и Vfr (регулятор факторов вирулентности) *P. aeruginosa* (Taguchi, Ichinose, 2013). Это указывает на идентичность глобальных механизмов регуляции вирулентности как у патогенов животных, так и у фитопатогенов. Классическим примером регуляции метаболизма бактерий с помощью CRP является феномен каталитической репрессии, впервые выявленный у *E. coli*. Как показали исследования, при голодании (отсутствии глюкозы в среде роста) у *E. coli* возрастал уровень цАМФ, тогда как при восстановлении нормального уровня этого углевода концентрация цАМФ сильно снижалась (Green et al., 2014). Сущность этого процесса состоит в ингибировании катаболитом транскрипции генов, детерминирующих синтез ферментов, необходимых для катаболизма лактозы или других энергетических субстратов, когда в среде присутствует глюкоза – более эффективный источник энергии. Если образование целого ряда индуцибельных ферментов зависит от этого нуклеотида, то мутанты по аденилатциклазе не смогут усваивать источники углевода и энергии, катаболизм которых обеспечивается соответствующими ферментами. Действительно, были выделены мутанты, не способные одновременно ферментировать лактозу, мальтозу, арабинозу, маннит, сорбит и другие соединения. Оказалось, что существует два класса такого рода мутантов. У одних под влиянием экзогенного цАМФ усвоение всех перечисленных сахаров восстанавливалось, у других – никакого эффекта не проявлялось. У мутантов первого класса (*Cya*) была резко снижена активность аденилатциклазы. Мутанты второго класса (*Crp*) синтезировали цАМФ в избыточном количестве, однако у них отсут-

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РОЛИ цАМФ

ствовал или был поврежден CRP, который взаимодействует с цАМФ и необходим для активации этим нуклеотидом синтеза катаболических ферментов (Lin et al., 2013). Как уже упоминалось выше, межклеточная коммуникация бактерий поддерживается с помощью различных аутоиндукторов, специфичных для грамм-положительных и грамм-отрицательных бактериальных сообществ. На примере *V. cholera* показано, что цАМФ-зависимый рецепторный белковый комплекс на посттранскрипционном уровне регулирует экспрессию специфического фермента аутоиндуктор1-синтазы (CAI-1), ответственного за синтез аутоиндуктора этих бактерий, тем самым интегрируя углеводную катаболическую репрессию и QS (Liang et al., 2008).

Соответственно для различных по специализации и условиям обитания видов бактерий необходим индивидуальный, строго определенный уровень цАМФ для активации CRP. Так, возбудитель туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* способен проявлять свою вирулентность только при уровне внутриклеточного цАМФ не ниже 4 мМ, поскольку чувствительность CRP к цАМФ у этого возбудителя очень низкая. В то же время почвенная непатогенная бактерия *Pseudomonas putida* синтезирует цАМФ в сверхнизких концентрациях, которые ниже порога определения. Однако CRP этой бактерии обладает очень высоким родством к цАМФ, что обуславливает возможность негативной регуляции экспрессии генов этим нуклеотидом. *E. coli* занимает промежуточное положение, ее CRP обладает средней по уровню степенью родства к цАМФ. Следует заметить, что CRP всех трех бактерий, выполняя одинаковую функцию, отличаются по первичной структуре: у CRP *Mycobacterium tuberculosis* только 32% аминокислотных остатков идентичны CRP *E. coli*, причем совпадают четыре из шести цАМФ-активных аминокислотных остатков в сенсорном домене. Однако гомология у *Pseudomonas putida* с *E. coli* выше и составляет уже 63% аминокислотных остатков и имеет соответствие пяти из шести цАМФ-активных остатков (Green et al., 2014). Возникает вопрос: с чем связаны столь сильные различия в концентрации внутриклеточного цАМФ и уровне родства CRP к цАМФ? Предполагается, что немаловажная роль в этом принадлежит аденилатциклазам и фосфодиэстеразам этих видов бактерий. У *Mycobacterium tuberculosis* имеется не менее 16 АЦ и только одна фосфодиэстераза с очень низким уровнем активности. Полагают, что такое количество АЦ свя-

зано с особенностями условий жизни этой бактерии в организме эукариот, где АЦ выполняют роль сенсоров и факторов вирулентности, и, таким образом, играют весьма существенную роль в регуляции метаболизма *Mycobacterium tuberculosis*. *E. coli* существенно отличается по условиям жизни и специализации, также как и *Pseudomonas putida*, которая вообще не относится к патогенам и обитает в наиболее стабильных условиях. Соответственно, у каждой из них имеется всего одна АЦ, а также одна фосфодиэстераза (Casey et al., 2014; Green et al., 2014). Вполне возможно, что специализация бактерий, а именно паразитизм, усложняют их сигналинг.

Кроме транскрипционных факторов CRP к сигнальной сети, регулируемой аденилатциклазной системой, относятся ранее упомянутые глобальные регуляторы факторов вирулентности Vfr (virulence factor regulator) (Serate et al., 2011). Через Vfr, в частности, осуществляется регуляция движения, продукция токсина пиоцианина, а также регуляция чувства кворума (QS) и репрессии биосинтеза флагеллярных белков у патогенов животных (Wolfgang et al., 2003; Smith et al., 2004; McDonough, Rodriguez, 2012). У фитопатогенов (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) под контролем аналогичного регулятора Vfr находятся гены, кодирующие элементы систем секреции III и IV типов (харпины и пили, а также жгутики, соответственно) (Taguchi, Ichinose, 2013).

Контроль цАМФ факторов вирулентности у фитопатогенных бактерий

В продолжение темы катаболической репрессии необходимо рассмотреть контроль системами межклеточной коммуникации активности факторов вирулентности, присущих только фитопатогенам. К ним относятся ферменты, разрушающие клеточные стенки растений, пектиназы и целлюлазы. Представителями таких бактерий являются *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Dickeya dadantii*, *Erwinia chrysanthemi* и другие (Nasser et al., 1997; Reverchon et al., 1997; Liu et al., 1999). Многими исследователями показано, что механизм регуляции активности пектиназ заключается в активации транскрипции генов *pelC*, *pelE*, *pelD*, *kdgTP₁* и *oglP₂* через связывание цАМФ-Crp с их промоторами и в дальнейшем связывании с участком РНК-полимеразы. Только для гена *PecA* цАМФ-Crp является негативным регулятором (Nasser et al., 1997). Антагонистом цАМФ-Crp является KdgR – белок-репрессор генов, кодирующих пектолитические фермен-

ты. Оба специфических белка конкурируют за один и тот же участок ДНК при связывании с целевым геном (Nasser et al., 1997). Кроме того, KdgR конкурирует и с РНК-полимеразой за участки связывания ДНК. Интересно, что репрессивный эффект KdgR устраняется в результате его связывания с 2-кето-3-дезоксиглюконатом (КДГ), продуктом расщепления клеточной стенки растения-хозяина (Liu et al., 1999). При этом конформация KdgR меняется и, в результате, репрессия целевых генов снимается. Активность KdgR косвенно также зависит от концентрации цАМФ, поскольку именно этот вторичный мессенджер, как уже обсуждалось выше, активирует гены пектиназы, от которых зависит синтез КДГ (Liu et al., 1999). Гомологи KdgR представлены в *Erwinia carotovora* susp. *carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, а также *Escherichia coli*, а ортологи этого гена имеются у *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Интересно что, в первой группе фитопатогенных бактерий этот белок-репрессор наряду с ферментами, деградирующими клеточную стенку, ингибирует активность генов *hrp*, отвечающих за реакцию сверхчувствительности в растениях устойчивых сортов. В то же время у *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ортолог гена *kdgR* репрессирует только активность генов *hrp* (Lu et al., 2011). Очень близким по структуре к KdgR является белок регулятор экзоферментов RexZ – репрессор пектинового катаболического пути, который также регулируется комплексом цАМФ-Сrp и найден пока только у членов семейства *Erwinia* (Thomson et al., 1999). Таким образом, у растительных патогенов, в соответствии с их специализацией, имеются некоторые дополнительные компоненты глобальной регуляторной сети, управляющей вирулентностью через аденилатциклазную сигнальную систему.

Роль цАМФ в контроле вирулентности симбиотических азотфиксаторов (мутуалистов растений)

Азотфиксирующие бактерии, представляющие несколько классов симбиотических микроорганизмов, на ранних этапах взаимодействия проявляют свойства фитопатогенов, для чего они используют ряд факторов вирулентности (Soto et al., 2006; Тамракаки, 2014). Нуклеотидциклазы играют существенную роль не только в регуляции механизмов их вирулентности, но и в других процессах, включая ранние стадии инфицирования, а также формирование и количество клубеньков (Ampe et al., 2003). Как известно, на ранних этапах инфицирования существенная роль принадлежит экзополисахара-

ридам (ЭПС) микроорганизмов (Lin et al., 2013). Кроме защитных и адгезивных функций, ЭПС выполняют и роль сигнальных молекул, необходимых при установлении контакта с растением-хозяином. В регуляции синтеза ЭПС принимает участие цАМФ. Дефицитные по активности АЦ штаммы *Rhizobium meliloti* отличались повышенным уровнем синтеза ЭПС, что негативно отражалось на эффективности симбиотической азотфиксации (Bianchini et al., 1993). У *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* этот вторичный мессенджер активирует транскрипционный фактор RosR, который, в свою очередь, позитивно регулирует активность гена *psaA*, кодирующего глюкозил-изопренилфосфаттрансферазу, участвующую в синтезе ЭПС (Janczarek, Skorupska, 2009; Janczarek, Urbanik-Sypniewska, 2013). Данный транскрипционный фактор имеет несколько цАМФ-Сrp связывающих сайтов в промоторах P₁ и P₂. Таким образом, активность RosR зависит от уровня цАМФ в клетке (Janczarek, Skorupska, 2009; Janczarek, Urbanik-Sypniewska, 2013).

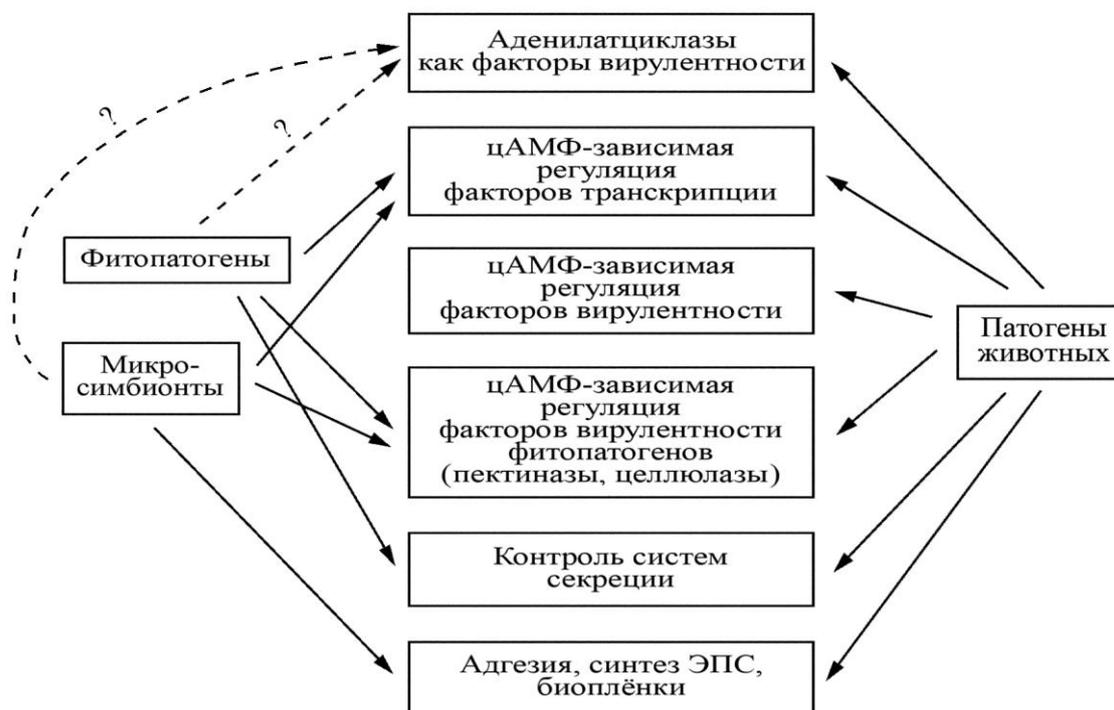
В остальном же информация о роли цАМФ и АЦ микроорганизмов в регуляции симбиотических взаимоотношений с растениями весьма ограничена. Есть сведения, что штамм *Rhizobium meliloti* с «выключенной» АЦ был не способен формировать клубеньки (Bianchini et al., 1993). В то же время у *S. meliloti* с помощью инсерции Tn5 было показано, что не все присутствующие АЦ в одинаковой степени контролируют симбиотическое взаимодействие. Предполагается, что ведущая роль в этом процессе принадлежит АЦ Cya3, каталитический домен которой обладает сходством с соответствующим доменом некоторых грамположительных бактерий (Sharipov et al., 1999).

Заключение

Несмотря на существенные различия в систематике и специализации бактериальных патогенов, фитопатогенов и микросимбионтов, анализ литературы показывает, что все упомянутые типы микроорганизмов обладают набором факторов вирулентности, не только схожих между собой по типам и способам воздействия, но и по их контролю компонентами аденилатциклазной сигнальной системы.

По имеющимся на данный момент сведениям, у всех типов микроорганизмов присутствуют общие механизмы регуляции активности факторов вирулентности вторичным мессенджером цАМФ. В то же время у фитопатогенов и симбионтов, принципиально отличаю-

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РОЛИ цАМФ



Участие аденилатциклазной сигнальной системы бактерий разных видов и специализации в контроле и регуляции их факторов вирулентности.

щихся по образу жизни, имеются специфические механизмы, подконтрольные цАМФ и аденилатциклазам, позволяющие, в том числе, быстро преодолевать механические защитные барьеры растений (рисунок).

На сегодняшний день степень изученности этих вопросов неодинакова. Лучше всего исследованы механизмы контроля факторов вирулентности патогенов человека и животных, как например *Pseudomonas aeruginosa* или *Mycobacterium tuberculosis*. Это легко объяснить, так как они представляют непосредственную угрозу жизни и здоровью человека. Однако ухудшение глобальной экологической ситуации в мире и интенсивное распространение фитопатогенов требует более пристального изучения механизмов контроля их факторов вирулентности. На этом фоне мутуалистические бактерии, в частности, микросимбионты растений, также представляют весьма существенный интерес, поскольку, с одной стороны, проявляют черты фитопатогенов на ранних этапах взаимодействия с растениями, и с другой стороны, обладают собственными уникаль-

ными метаболическими путями, позволяющими регулировать эффективность симбиоза.

ЛИТЕРАТУРА

- Ломоватская Л.А., Макарова Л.Е., Кузакова О.В., Романенко А.С., Гончарова А.М. Влияние N-фенил-2-нафтиламина на активность компонентов аденилатциклазной сигнальной системы и на вирулентность бактериальных фитопатогенов и мутуалистов растений // Прикл. биохимия микробиология. – 2016. – Т. 52, № 3. – в печати.
- Романенко А.С., Маркова Ю.А., Климов В.Т., Чеснокова М.В., Духанина А.В., Иванова Л.К., Сяляев Р.К. Взаимоотношения растений с энтеробактериями, патогенными для человека // Докл. АН [Россия]. – 2006. – Т. 411, №3. – С. 424-426.
- Чернявский А.И. Бактериальные биопленки и инфекции // Annals Mechnikov Institute. – 2013. – № 1. – С. 86-90.
- Ampe F., Kiss E., Sabourdy F., Batut J. Transcriptome analysis of *Sinorhizobium meliloti* during symbiosis // Genome Biol. – 2003. – V. 4. – P. 1-15.

- Baker D.A., Kelly J.M. Structure, function and evolution of microbial adenylyl and guanylylcyclases // *Mol. Microbiol.* – 2006. – V. 52. – P. 1229-1242.
- Bianchini G.M., Carricart V.C., Flawia M.M., Sanchez-Rivas Bonarek C. Isolation of adenylate cyclase mutants from *Rhizobium meliloti* deficient in nodulation // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 1993. – V. 9. – P. 168-173.
- Büttner D., Bonas U. Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria // *Plant Biol.* – 2003. – V. 6. – P. 312-319.
- Büttner D., Bonas U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors // *Microbiol.* – 2010. – V. 34. – P. 107-133.
- Cao H., Baldini R.L., Rahme, L.G. Common mechanisms for pathogens of plants and animals // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2001. – V. 39. – P. 259-284.
- Casey S., Ford M., Gazdik M. The role of transcriptional regulation in maintaining the availability of mycobacterial adenylate cyclases. // *Peer J.* – 2014. – V. 298. P. 1-13.
- Casper-Lindley C., Dahlbeck D., Clark E.T., Staskawicz B.J. Direct biochemical evidence for type III secretion-dependent translocation of the AvrBs2 effector protein into plant cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – V. 99. – P. 8336–8341.
- Cotta M.A., Whitehead T.R., Wheeler M.B. Identification of a novel adenylate cyclase in the ruminal anaerobe, *Prevotella ruminicola* D31d // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1998. – V. 164 – P. 257-260.
- Danchin A. Adenylyl cyclases and guanylylcyclases: role and classification // URL: http://www.normalesup.org/adanchin/science/adenylyl_cyclases.html. 2010.
- Drum C.L., Yan S.Z., Bard J., Shen Y.Q., Lu, D., Soelaiman S., Grabarek Z., Bohm A., Tang W.J. Structural basis for the activation of anthrax adenylyl cyclase exotoxin by calmodulin // *Nature.* – 2002. – V. 415. – P. 396-402.
- Fulcher N.B., Holliday P.M., Klem E., Cann M.J., Wolfgang M.C. The *Pseudomonas aeruginosa* Chp chemosensory system regulates intracellular cAMP levels by modulating adenylate cyclase activity // *Mol. Microbiol.* – 2010. – V.76 – P. 889-904.
- Grainger D.C., Hurd D., Harrison M., Holdstock J., Busby S.J. Studies of the distribution of *Escherichia coli* cAMP receptor protein and RNA polymerase along the *E. coli* chromosome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – V. 102. – P.17693-17698.
- Green J., Stapleton M.R., Smith L. J., Artymiuk P.J., Kahramanoglou C., Hunt D.M., Buxton R.S. Cyclic-AMP and bacterial cyclic-AMP receptor proteins revisited: adaptation for different ecological niches // *Microbiol.* – 2014. – V. 18. – P. 1–7.
- He K., Bauer C.E. Chemosensory signaling systems that control bacterial survival // *Trends Microbiol.* – 2014. – V. 22. – P. 389-398.
- Janczarek M., Skorupska A. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* gene expression is regulated by catabolic repression // *Microbiol. Lett.* – 2009. – V. 291 – P. 119-125.
- Janczarek M., Urbanik-Sypniewska T. Expression of the *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *pspA* gene, involved in exopolysaccharide synthesis, is regulated by *RosR*, phosphate, and the carbon source // *J. Bacteriol.* – 2013. – V. 195. – P. 3412-23.
- Jimenez P.N., Koch G., Thompson J.A., Xavier K.B., Cool R.H., Quaxb W.J. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2012. – V. 76. – P. 46-65.
- Kalivoda E., Brothers K., Stella M., Schmitt M., Shanks R. Bacterial cyclic AMP-phosphodiesterase activity coordinates biofilm formation // *PLoS One* – 2013. – V. 8. – P. 1-11.
- Kambar K., Ardisson S., Kobayashi H., Saa, M.M., Schumpp O., Broughton W. J., Deakin W.J. Rhizobia utilize pathogen-like effector proteins during symbiosis // *Mol. Microbiol.* – 2009. – V. 71. – P. 92-106.
- Kereszt A., Mergaert P., Maróti G., Kondorosi E. Innate immunity effectors and virulence factors in symbiosis // *Microbiol.* – 2011. – V. 14. – P. 76-81.
- Liang W., Syed Zafar Sultana S.Z., Anisia J. Silva A., Jorge A. Benitez J. Cyclic AMP post-transcriptionally regulates the biosynthesis of a major bacterial autoinducer to modulate the cell density required to activate quorum sensing // *FEBS Lett.* – 2008. – V. 582. – P. 3744-3750.
- Lin C.T., Chen Y.C., Jinn T.R., Wu C.C., Hong Y.M., Wu W.H. Role of the cAMP-dependent carbon catabolite repression in capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumonia* // *PloS One* – 2013. – P. 11-14.
- Liu Y., Jiang G., Cui Y., Mukherjee A., Ma W.L., Chatterjee A.K. *kdgR_{Ecc}* negatively regulates genes for pectinases, cellulase, protease, harpin_{Ecc}, and a global RNA regulator in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* // *J. Bacteriol.* – 1999. – V. 181. – P. 2411-2421.
- Lu Y., Rashidul I.M., Hirata H., Tsuyumu S. KdgR, an ICIR family transcriptional regulator, inhibits virulence mainly by repression of *hrp* genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* // *J. Bacteriol.* – 2011. – V. 193 – P. 6674-6682.
- Matsumoto H., Muroi H., Umehara M., Yoshitake Y., Tsuyum, S. Peh production, flagellum synthesis, and virulence reduced in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by mutation in a homologue of *cytR* // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 2003. – V.16. – P.389-397.
- McDonough K.A., Rodriguez A. The myriad roles of cyclic AMP in microbial pathogens: from signal to

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РОЛИ цАМФ

- sword // *Nature Rev. Microbiol.* – 2012. – V. 10. – P. 27-38.
- Nasser W., Robert-Baudouy J., Reverchon S. Antagonistic effect of CRP and KdGR in the transcription control of the *Erwinia chrysanthemi* pectinolysis genes // *Mol. Microbiol.* – 1997. – V. 26. – P. 1071–1082.
- Okazaki S., Kaneko T., Sato S., Saeki K. Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – V. 110. – P. 17131-17136.
- Ono K., Oka R., Toyofuku M., Sakaguchi A., Hamada M., Yoshida S., Nomura N. cAMP signaling affects irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // *Microbes Environ.* – 2014. – V. 29. – P. 104-106.
- Rahme L.G., Ausubel F.M., Cao H., Drenkard E., Goumnerov B.C., Lau G.W., Mahajan-Miklos S., Plotnikova J., Tan M.W. Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – V. 97. – P. 8815-8821.
- Reverchon S., Expert D., Robert-Baudouy J., Nasser W. The cyclic AMP receptor protein is the main activator of pectinolysis genes in *Erwinia chrysanthemi* // *J. Bacteriol.* – 1997. – V. 179. – P. 3500-3508.
- Ryan R. Cyclic di-GMP signaling and the regulation of bacterial virulence // *Microbiol.* – 2013. – V. 159. – P. 1286-1297.
- Schechter L.M., Roberts K.A., Jamir Y., Alfano J.R., Collmer A. *Pseudomonas syringae* type III secretion system targeting signals and novel effectors studied with a Cya translocation reporter // *Bacteriol.* – 2004. – V. 186. – P. 543-555.
- Schechter L.M., Guenther J., Olcay E.A., Jang S., Krishnan H.B. Translocation of NopP by *Sinorhizobium fredii* USDA257 into *Vigna unguiculata* root nodules. // *Appl. Env. Microbiol.* – 2010. – V. 76. – P. 3758-3761.
- Serate J., Roberts G.P., Berg O., Youn H. Ligand responses of Vfr, the virulence factor regulator from *Pseudomonas aeruginosa* // *J. Bacteriol.* – 2011. – V. 193. – P. 4859-4868.
- Sharypov L.A., Yurgel S.N., Keller M., Simarov B.V., Pühler A., Becker A. The *eff-482* locus of *Sinorhizobium meliloti* CXM1-105 that influences symbiotic effectiveness consists of three genes encoding an endoglycanase, a transcriptional regulator and an adenylate cyclase // *Mol. Gen. Genet.* – 1999. – V. 261. – P. 1032-1044.
- Shenoy A.R., Visweswariah S.S. Mycobacterial adenylate cyclases: biochemical diversity and structural plasticity // *FEBS Lett.* – 2006. – V. 580. – P. 3344-3352.
- Smith R.S., Wolfgang M.C., Lory S. An adenylate cyclase-controlled signaling network regulates *Pseudomonas aeruginosa* virulence in a mouse model of acute pneumonia // *Infect. Immunol.* – 2004. – V. 72. – P. 1677-1684.
- Soto M., Sanjuan J., Olivares J. Rhizobial and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons // *Microbiol.* – 2006. – V. 152. – P. 3167-3174.
- Taguchi F., Ichinose Y. Virulence factor regulator (Vfr) controls virulence-associated phenotypes in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 by a quorum sensing-independent mechanism // *Mol. Plant Pathol.* – 2013. – V. 14. – P. 279-292.
- Tampakaki A. Commonalities and differences of T3SSs in rhizobia and plant pathogenic bacteria // *Front. Plant Sci.* – 2014. – V. 27. – P. 1-19.
- Téllez-Sosa J., Soberón N., Vega-Segura A., Torres-Márquez M.E., Cevallos M.A. The *Rhizobium etlicya* C product: characterization of a novel adenylate cyclase class // *J. Bacteriol.* – 2002. – V. 184. – P. 3560-3568.
- Thomson N.R., Nasser W., McGowan S., Sebahia M., Salmond G.P.C. *Erwinia carotovora* has two KdGR-like proteins belonging to the IcIR family of transcriptional regulators: identification and characterization of the RexZ activator and the KdGR repressor of pathogenesis // *Microbiol.* – 1999. – V. 145. – P. 1531-1545.
- Tian C.F., Garnerone A.-M., Mathieu-Demazière C., Masson-Boivin C., Batut J. Plant-activated bacterial receptor adenylate cyclases modulate epidermal infection in the *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago* symbiosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – V. 109. – P. 6751-6756.
- Wolfgang M.C., Lee V.T., Gilmore M. E, Lory S. Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway // *Dev. Cell* – 2003. – V. 4. – P. 253-263.

Поступила в редакцию
15.02.2016 г.

**COMPARATIVE EVALUATION OF ROLE OF cAMP AND ADENYLATE
CYCLASES OF ANIMAL PATHOGENS, PHYTOPATHOGENS, AND PLANT
MUTUALISTS IN CONTROL OF THEIR VIRULENCE**

L. A. Lomovatskaya, A. S. Romanenko, O. V. Kuzakova

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry
Siberian Division of the Russian Academy of Sciences
(Irkutsk, Russia)
e-mail: LidaL@sifibr.irk.ru*

The review provides a comparative assessment of the participation of cAMP and adenylate cyclases of animal and plant bacterial pathogens as well as mutualists in control and modulation of all stages of the infection process (adhesion, biofilms formation, transcription regulation factors and secretion systems).

Key words: *adenyl cyclases, cAMP, virulens factors, bacterial animal pathogens
phytopathogens, mutualists*

**ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА РОЛІ цАМФ
І АДЕНИЛАТЦИКЛАЗ ПАТОГЕНІВ ТВАРИН, ФІТОПАТОГЕНІВ
І МУТУАЛІСТІВ РОСЛИН У КОНТРОЛІ ЇХ ВІРУЛЕНТНОСТІ**

Л. А. Ломоватська, А. С. Романенко, О. В. Кузакова

*Федеральна державна бюджетна установа науки
Сибірський інститут фізіології і біохімії рослин
Сибірського відділення Російської академії наук
(Іркутськ, Росія)
e-mail: LidaL@sifibr.irk.ru*

В огляді наведено порівняльну оцінку участі цАМФ і аденилатциклази бактеріальних патогенів тварин, фітопатогенів, а також мутуалістів рослин в контролі і модуляції всіх етапів інфекційного процесу (адгезія, формування біоплівки, регуляція активності факторів транскрипції і систем секреції).

Ключові слова: *аденилатциклази, цАМФ, фактори вірулентності, бактеріальні патогени
тварин, фітопатогени, мутуалісти*