

9. Ivanova E.M. Toksicheskoe dejstvie medi i mehanizmy ee detoksikacii rastenijami rapsa : avtoref. dis. na soiskanie uchen. stepeni kand. biol. nauk : spec. 03.01.05 «Fiziologija i biohimija rastenij» / E.M. Ivanova. – M., 2011. – 26 s.
10. Grushko Ja.M. Vrednye neorganicheskie soedinenija v promyshlennyh stochnyh vodah / Ja.M. Grushko. – Spb. : Himija, 1979. – 161 s.
11. Manchuk V.A. Metally. Gigienicheskie aspekty ocenki i ozdorovenija okruzhajushhej sredy / V.A. Manchuk, N.A. Rjabov. – M., 1983. – S. 194–199.
12. Arhipova G.I. Vpliv nadlishkovogo vmistu vazhkih metaliv u pitnij vodi na organizm ljudini / G.I. Arhipova, T.O. Mudrak, D.V. Zavertana // Visnik Nacional'noi akademii Ukraïni. – 2010. – № 1. – S. 232–235.
13. Intensifikacija sorbcii ioniv midi drizhdzhami *Saccharomyces cerevisiae* 1968 v postijnomu magnitnomu poli / [Gorobec' S.V., Kasatkina T.P., Gorobec' O.Ju. ta in.] // Harchova promislovist'. – 2004. – № 3. – S. 107-109.
14. Kosman D.J. Transition metal ion uptake in yeasts and filamentous fungi / D.J. Kosman // Metal ions in fungi. – New York etc., 1994. – 507 p.
15. Walker M.G. Yeast physiology and biotechnology / M.G. Walker. – New York; Toronto : John Wiley and Sons, 1998. – 350 p.
16. Lozovaja O.G. Poisk biosorbentov tjazhelyh metallov sredi drozhzhej razlichnyh taksonomicheskikh grupp / O.G. Lozovaja, T.P. Kasatkina, B.C. Podgorskij // Mikrobiologichnij zhurnal. – 2004. – T. 66, № 2. – S. 92–101.
17. Lozovaja O.G. Vlijanie hroma (VI) na fiziologiju rosta i sorbcionnuju sposobnost' drozhzhej / O.G. Lozovaja, T.P. Kasatkina, B. C. Podgorskij // Mikrobiologichnij zhurnal. – 2004. – T. 66, № 3. – S. 43–50.
18. Patent na korisnu model' № 49812 Ukraïna, MPK (2009), C12Q 1/00, C12M 1/00, C12M 1/34. Sposib viznachennja intensivnosti pigmentoutvorennja u bakterij / Ril's'kij O.F., Dombrovs'kij K.O., Gorohovs'kij E.Ju., Zhilenko A.V.; zajavnik i patentovlasnik ZNU. – № u200912311; zajavl. 30.11.2009; opubl. 11.05.2010, Bjul. № 9, 2010 r.
19. Krupej K.S. Vpliv anioniv solej cinku ta midi na pigmentosintezuval'nu zdatsnist' drizhdzhovih klitin / K.S. Krupej, O.F. Ril's'kij // Visnik Zaporiz'kogo nacional'nogo universitetu : zbirnik naukovih prac'. Biologichni nauki. – Zaporizhzhja : ZNU, 2014. – № 2. – S. 218-224.
20. Karotinsintezirujushhie drozhzhi [Kvasnikov E.I., Vaskivnjuk V.G., Sudenko V.I., Grinberg T.A.]. – K. : Naukova dumka, 1980. – 171 s.
21. An atypical, pigment-producing *Metschnikowia* strain from a leukaemia patient / [Vincenzo Savini, Marijke Hendrickx, Maurizio Sisti et. al.] // Medical Mycology. – 2012. – R. 1-6.
22. Krupej K.S. Bioindikacionnye vozmozhnosti pigmentsintezirujushhijh drozhzhej roda *Rhodotorula* / K.S. Krupej // Australian Journal of Scientific Research, 2014. – Vol. III. – № 1. (5) (January-June). – R. 249-254.
23. Krupej K.S. Bioindikacija zagrjaznenija okruzhajushhej sredy tjazhelymi metallami s pomoshh'ju karotinsintezirujushhijh drozhzhej roda *Rhodotorula* [Elektronne naukovе vidannja] / K.S. Krupej, A.F. Ryl's'kij // Aktual'ni problemi biologii, ekologii ta himii. – Zaporizhzhja : ZNU. – 2015. – T. 9. – № 1. – S. 64-75. – Rezhim dostupu: http://sites.znu.edu.ua/bio-eco-chem-sci/issues/index.php?action=url/view&url_id=6693

УДК 579.234

ВПЛИВ МУТАЦІЙ У ГЕНАХ ЛІГАЗ *WAAL* НА СТРЕСОСТІЙКІСТЬ БАКТЕРІЙ *YERSINIA ENTEROCOLITICA* O:3 ТА O:8

^{1,2}Шевченко Ю.І., ¹Позур В.К., ²Скурнік М.

¹ННЦ «Інститут біології» Київський національний університет імені Тараса Шевченка
01601, Україна, Київ, вул. Володимирська, 64/13

²*Haartman Institute, University of Helsinki,
Haartmaninkatu 3 (P.O. Box 21), FIN-00014, Finland*

julia.i.shevchenko@gmail.com

Метою роботи є дослідження участі продуктів генів лігаз *waal* ліпополісахаридів (ЛПС) бактерій *Yersinia enterocolitica* у формуванні стійкості бактерій до впливу стресових факторів. Зміни структури ЛПС *waal*-нокаутних мутантів аналізували за допомогою імуноблотингу

зі специфічними до О-полісахариду та кору моноклональними антитілами. Аналіз чутливості мутантів проводили з використанням таких стресорів: поверхнево-активних речовин, антимікробних пептидів та активних форм кисню. Результати аналізу структурних особливостей ЛПС, підтверджують участь лігаз *WaaL* в синтезі О-полісахаридних ланцюгів та кору. Крім змін рівня синтезу ЛПС серед деяких мутантів ієрсиній серотипів О:3 та О:8 виявили відмінності в адаптаційному потенціалі бактерій; значне пригнічення росту спостерігали лише серед подвійних мутантів *Yersinia enterocolitica* О:3.

Ключові слова: Yersinia enterocolitica, WaaL лігази, стресостійкість.

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ ЛИГАЗ WAAAL НА СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ *YERSINIA ENTEROCOLITICA* О:3 И О:8

^{1,2}Шевченко Ю.И., ¹Позур В.К., ²Скурник М.

¹ОНЦ «Институт биологии» Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, 01601, Украина, Киев, ул. Владимирская, 64/13

²Haartman Institute, University of Helsinki, Haartmaninkatu 3 (P.O. Box 21), FIN-00014, Finland
julia.i.shevchenko@gmail.com

Целью работы является исследование участия продуктов генов лигаз *waaL* липополисахаридов (ЛПС) бактерий *Yersinia enterocolitica* в формировании устойчивости бактерий к воздействию стрессовых факторов. Изменения структуры ЛПС *waaL*-нокаутных мутантов анализировали с помощью иммуноблотинга со специфическими к О-полисахариду и кору моноклональными антителами. Анализ чувствительности мутантов проводили с использованием следующих стрессоров: поверхностно-активных веществ, антимикробных пептидов и активных форм кислорода. Результаты анализа структурных особенностей ЛПС подтверждают роль лигаз *WaaL* в синтезе О-полисахаридных цепей и кора. Помимо изменений уровня синтеза ЛПС среди некоторых мутантов иєрсиний серотипов О:3 и О:8 обнаружили различия в адаптационном потенциале бактерий; значительное угнетение роста наблюдали только среди двойных мутантов *Y. enterocolitica* О 3.

Ключевые слова: Yersinia enterocolitica, WaaL лигазы, стрессоустойчивость.

THE EFFECT OF MUTATIONS IN THE WAAAL GENES INTO STRESS RESISTANCE OF *YERSINIA ENTEROCOLITICA* O:3 AND O:8

^{1,2}Shevchenko J.I., ¹Pozur V.K., ²Skurnik M.

¹ ESC Institute of Biology, Taras Shevchenko National University of Kiev 01601, Ukraine, Kyiv, Volodymyrska str., 64/13

²Haartman Institute, University of Helsinki, Haartmaninkatu 3 (P.O. Box 21), FIN-00014, Finland
julia.i.shevchenko@gmail.com

LPS is a major component of the outer membrane of Gram-negative bacteria. It is a glycolipid consisting of three structural domains: the lipid A moiety, the core and the distal O-polysaccharide (OPS) or O antigen (O-ag). The antigenic variation of OPS in *Yersinia enterocolitica* isolates is traditionally distinguished serologically. Nowadays, more than 50 serotypes are known, of which O:3, O:5, 27, O:8 and O:9 are pathogenic. In Europe, yersiniosis is the third most common bacterial zoonosis after campylobacteriosis and salmonellosis. *Y. enterocolitica* is a well known human and animal pathogen. Among humans, the pathway of *Y. enterocolitica* is associated with intestinal disease, such as enterocolitis, with inflammatory diarrhea, ileitis, mesenteric appendicitis and gastroenteritis. A diarrheal disease is sometimes followed by post-infectious reactive arthritis.

The YeO3 bacteria produce two types of LPS molecules, a single LPS molecule of YeO3 is substituted either with a hexasaccharide outer core (OC) or OPS linked to lipid A inner core (LA-IC). Likewise, the YeO8 bacteria produce LPS molecules with different length of O-chains.

Each component of the LPS molecule is specific, exhibits different biological properties and stays under separate genetic control. The LA-IC synthesis initiates in the cytoplasm and continues at the cytoplasmic leaflet of inner membrane (IM). The LA part is formed first onto which the core is built by dedicated glycosyltransferases that sequentially transfer the sugar residues from nucleotide diphosphate (NDP)-activated sugar molecules. The completed LA-core is translocated to the outer leaflet of the IM by a flipping mechanism. The synthesis of the second entity, the O-Ag takes place directly at IM where dedicated glycosyltransferases transfer sequentially the sugar residues onto the carrier lipid, undecaprenylphosphate (Und-P). Two main types of O-Ag are recognized: (i) heteropolymeric O-PS composed of oligosaccharide (OS) repeat units and synthesized by the O-unit polymerase (Wzy)-dependent pathway and (ii) homopolymeric O-PS formed of a repeating monosaccharide and synthesized by the ABC transporter-dependent pathway. In the Wzy-dependent pathway a single O-repeat unit, and in the ABC transporter-

dependent pathway a full-length homopolymeric O-PS, is synthesized on Und-P; when complete, both structures are translocated by a flipping mechanism to face the periplasmic space where, in the Wzy-dependent pathway, most Und-P-P-O-units are polymerized by Wzy with the help of chain length determinant Wzz to Und-P-P-O-PS. Finally, the Und-P-P-carried OS or O-PS is recognized by a dedicated ligase, *WaaL*, that transfers it from Und-P-P to the LA-core. The completed LPS molecules are thereafter translocated to the outer leaflet of outer membrane (OM) by a recently identified ABC transporter-dependent pathway.

The *WaaL* proteins are involved in the ligation of OC or O-Ag onto the LA-IC. *Y. enterocolitica* produces two distinct *WaaL* proteins, and mutants missing one or both of the ligases showed distinct LPS phenotypes with respect to O-ag and OC expression and the LPS ligases were named as *WaaL_{PS}* and *WaaL_{OS}*, respectively. In contrast to *Y. enterocolitica*, *Y. pestis* and *Y. pseudotuberculosis* carry only a single *waaL* gene. The situation is also the same in other bacteria such as *Escherichia coli* and *Salmonella*.

In previous studies were shown that *WaaL* ligases exhibit relaxed donor substrate specificity and can to some extent compensate lack of each other during LPS biosynthesis. It was found a tendency to lose resistance to the complement among YeO3 and YeO8 *waaL* mutants, except YeO8 double mutants, which showed full resistance to the complement activation under alternative way. LPS involved in regulation of the outer membrane penetration by detergents and antibiotics; exopolysaccharides formation prevent toxic effects of H₂O₂.

The aim of this work is to study the *waaL* genes products participation in the formation of *Y. enterocolitica* stress resistance. Changes in the LPS structure of *waaL*-knockout mutants were analyzed by immunoblotting with monoclonal antibodies specific to O-polysaccharide and core moieties. Sensitivity assays were performed by using the following stressors: surfactants, antimicrobial peptides and reactive oxygen species. The mutants' sensitivity was evaluated by growth curves with using wild-type bacteria as a control. The analysis of LPS structure features confirmed *WaaL* ligase participation in the O-polysaccharide and outer core synthesis. Also, the differences in adaptive capacity of *waaL*-mutant of *Y. enterocolitica* O:3 and O:8 were estimated; significant growth inhibition was observed only among the double ligase mutants of *Yersinia enterocolitica* O: 3.

Key words: Yersinia enterocolitica, WaaL ligases, stress.

ВСТУП

Ліпополісахариди є основними компонентами зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій. Молекули ЛПС складаються з трьох компонентів: ліпиду А, олігосахариду кору та О-специфічних ланцюгів (О-Ag). Кожен компонент молекули ЛПС має специфічні складові, проявляє різні біологічні властивості та перебуває під окремим генетичним контролем [1]. ЛПС значною мірою визначають бар'єрну функцію клітинної оболонки, ендотоксичну активність і серологічну специфічність мікробної клітини; беруть активну участь у взаємовідносинах хазяїн-паразит [2]. Для ЛПС в межах одного виду характерна гетерогенність структурних частин, особливо О-специфічного полісахариду та корового олігосахариду. Винятку не становить гетерогенний за властивостями збудник ієрсиніозу *Yersinia enterocolitica*, етіологічна роль якого відома при апендицитах, ентеритах, гастроентеритах, захворюваннях печінки та сечовивідних шляхів. Серед інших форм ієрсиніозу відомі випадки артритів, септицемій, рідше – інфекційних ендокардитів, менінгітів, тощо [3].

Об'єктом досліджень цієї роботи є мутації в генах лігаз *waaL* бактерій *Y. enterocolitica*. Як виявилось, *Y. enterocolitica* містить три хромосомні гени: *waaL_{OS}*, *waaL_{PS}* та *waaL_{XS}*, які кодують лігази *WaaL_{OS}*, *WaaL_{PS}* та *WaaL_{XS}* відповідно [4]. У попередніх дослідженнях була показана низька субстратна специфічність лігаз та їх безпосередня участь у формуванні повноцінних молекул ЛПС [5]. Виявилось, що *waaL*-нокаутні мутанти серотипів О:3 та О:8 однаково втрачають стійкість до дії комплементу, крім подвійних мутантів серотипу О:8, які продемонстрували резистентність до дії комплементу при активації компонентів комплементу за альтернативним шляхом [6].

Відомо, що ЛПС бере участь у регуляції проникності зовнішньої мембрани для детергентів та антибіотиків, а утворення екзополісахаридів попереджає проникнення H₂O₂ в середину бактеріальних клітин [2, 8]. У відповідь на зовнішні впливи, бактерії можуть

змінювати структуру ліпиду А та модифікувати дистальні епітопи О-полісахаридів без значних перебудов в структурі ЛПС. Існує припущення, що патогенні бактерії можуть використовувати структурно-функціональні модифікації ЛПС для реалізації патогенного потенціалу в організмі господаря, і для переходу до стадії резервації для виживання при несприятливих умовах зовнішнього середовища. На експресію генів синтезу ЛПС та його властивості може впливати багато факторів зовнішнього середовища (температура, рН, склад середовища, сигнальні сполуки, тощо) [1].

У роботі досліджується вплив лігаз на формування повноцінної структури ЛПС та роль останньої в реалізації резистентності бактерій до низки стресових факторів. Аналізуючи ріст мутантних бактерій *Y. enterocolitica* визначали участь *waaL*-последовностей в формуванні стресостійкості до додецилсульфату натрію (SDS), поліміксину В та H₂O₂.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі використовували такі вірулентні штами: *Y. enterocolitica* клінічний ізолят 6471/76 (YeO3) та *Y. enterocolitica* клінічний ізолят 8081 (YeO8) з персонального музею професора Мікаеля Скурніка (Mikael Skurnik). Бактерії вирощували при кімнатній температурі в рідкому середовищі LB. Делеції генів лігаз *waaL* здійснювали з використанням векторів pSW23T & pSW29T та методу збагачення циклосерином, як було описано в попередніх роботах [4, 5]. Одиночні та подвійні мутанти вирощували з додаванням відповідних антибіотиків у таких концентраціях: канаміцин – 25-50 мкг/мл; хлорамфенікол – 20 мкг/мл.

Структурні особливості ЛПС *waaL*-нокаутних мутантів аналізували за допомогою імуноблотингу. Бактерії вирощували протягом 16-20 год. при кімнатній температурі в 5 мл середовища LB з відповідними антибіотиками. Оптичну густину суспензій доводили до одного значення (OD₆₀₀ = 1), центрифугували та ресуспендували в 100 мкл буферу для лізису (2% дезоксіхолоат натрію, 4% 2-меркаптоетанол, 10% гліцерин, 0,002% бромфеноловий синій, 1 М трис-НСІ буфер, рН 6,8). Отримані зразки кип'ятили протягом 10 хв. на водяній бані, додавали 2-4 мкл протеїнази К та продовжували інкубацію ще дві години при 55-60°C. Перед внесенням зразків в гель, їх ще раз нагрівали до 95-100°C [4]. Для виявлення О-Аг та кору ЛПС бактерій YeO3 використовували специфічні моноклональні антитіла мишей TomA6 та 2B5 відповідно. Для аналізу фенотипових особливостей ЛПС бактерій YeO8 використовували специфічні до О-ланцюгів моноклональні антитіла 1F1 [4].

Аналіз стресостійкості мутантних бактерій проводили шляхом додавання різних концентрацій SDS, H₂O₂ та поліміксину В до поживного середовища. Експерименти проводили за такою схемою: бактеріальні штами вирощували за кімнатної температури (22-25°C) протягом ночі в 5 мл рідкого поживного середовища LB із відповідними антибіотиками. Культури відмивали і вносили у свіже середовище LB, що містило відповідні антибіотики та один з стресових факторів. За допомогою автоматичної системи Bioscreen C (“Oy Growth Curves Ab Ltd”, Finland) вимірювали оптичну густину суспензій кожні 30 хв. при довжині хвилі λ=600 нм. Попередньо визначивши оптимальну концентрацію стресора в середовищі, досліди проводили в трьох повторах із трьохразовим повтором для кожного варіанту.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Одиночні та подвійні *waaL*-нокаутні мутанти вірулентних ієрсиній були успішно сконструйовані шляхом гомологічної рекомбінації [5]. Одиночні мутанти бактерій YeO3 за геном *waaL_{os}* (YeO3_*os*) не були резистентними до жодного з антибіотиків, тоді як *waaL_{os}*-нокаутні бактерії YeO8 (YeO8_*os*), володіли резистентністю до хлорамфеніколу. Одиночні мутанти за геном *waaL_{ps}* бактерій YeO3 та YeO8 (YeO3_*ps* & YeO8_*ps*) містили

ген резистентності до канаміцину. Відповідно, подвійні мутанти бактерій YeO3 (YeO3_os_ps) володіли одним селективним маркером (резистентність до хлорамфеніколу), а подвійним мутантам бактерій YeO8 (YeO8_os_ps) була притаманна резистентність до хлорамфеніколу та до канаміцину.

Для виявлення структурних змін ЛПС *waaL*-нокаутних мутантів ієрсиній використовували імуноблотинг з застосуванням різних антитіл, що пояснюється гетерогенністю ЛПС в межах виду. Дистальна частина ЛПС бактерій YeO3 представлена або O-Ag або олігосахаридом кору, що передбачає застосування двох антитіл для специфічного виявлення кожної структури [4]. Гетерогенність молекул ЛПС бактерії YeO8, в свою чергу, характеризується присутністю O-ланцюгів різної довжини, специфічне виявлення яких можливе з використанням одного антитіла специфічних до O-Ag.

Порівнюючи структуру ЛПС ієрсиній дикого типу та мутантів, можна помітити суттєві зміни в синтезі ЛПС після делецій послідовностей *waaL* (рис. 1). Пропорційне пригнічення синтезу структурних частин ЛПС спостерігається в бактерій YeO3 при делеції гену *waaL_{os}*. Суттєве зниження синтезу коротких O-ланцюгів та незначне пригнічення синтезу довгих ланцюгів спостерігається також серед *waaL_{os}* нокаутних бактерій YeO8. Судячи з результатів імуноблотингу, делеція гену *waaL_{ps}* з геному бактерій YeO3 суттєво не впливає на синтез ЛПС. Натомість, серед одиночних мутантів YeO8_ps у відповідь на видалення гену *waaL_{ps}* спостерігається помітна стимуляція утворення і довгих, і коротких O-ланцюгів. Специфічно ідентифікувати складові ЛПС серед подвійних мутантів бактерій YeO3 та YeO8 за допомогою моноклональних антитіл не вдалося, що може свідчити про їх відсутність на поверхні бактерій, або про їх структурну чи конформаційну зміну.

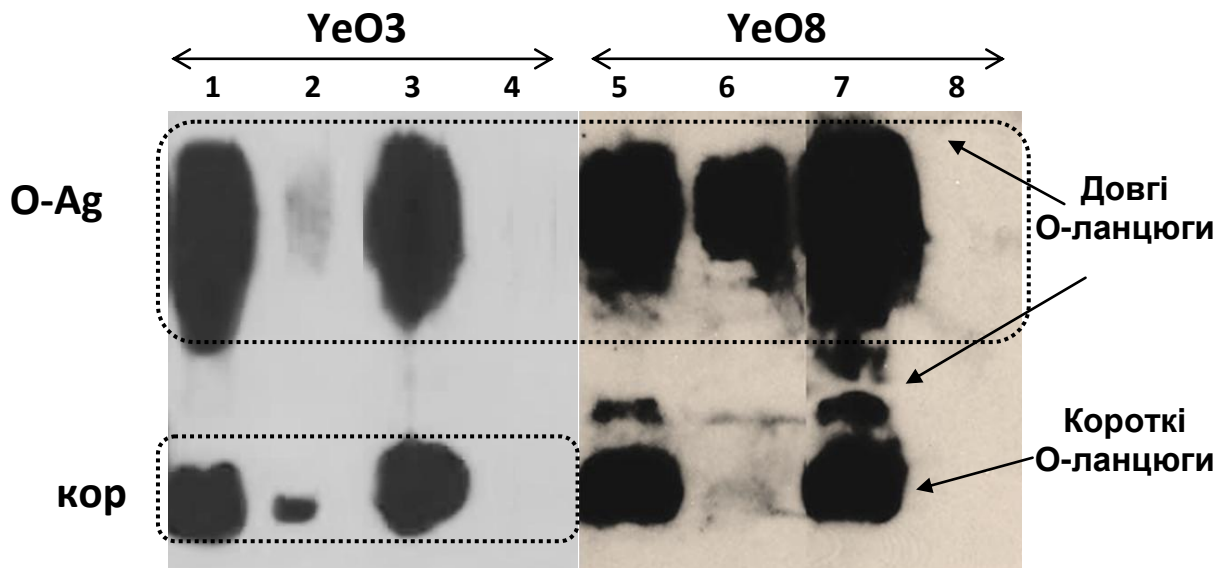


Рис. 1. Результати імуноблотингу зі специфічними моноклональними антитілами до O-Ag та кору (TomA6, 2B5 та 1F1): 1- дикий тип YeO3, 2- YeO3_os, 3- YeO3_ps, 4- YeO3_os_ps, 5- дикий тип YeO8, 6- YeO8_os, 7- YeO8_ps, 8- YeO8_os_ps

Встановлено, що біологічна активність ЛПС значною мірою детермінується структурою та молекулярною конформацією. Враховуючи роль ЛПС у захисті бактеріальних клітин від різних пошкоджуючих впливів, зроблено припущення, що одиночні та подвійні *waaL*-нокаутні мутанти ієрсиній будуть відрізнятися за стійкістю до різних стресорів. Для підтвердження цього припущення аналізували рост мутантів у середовищі з різними концентраціями SDS, поліміксину В та H₂O₂.

Для виявлення впливу поверхнево-активних речовин на ріст *waaL*-мутантів обох серотипів, до ростового середовища LB додавали різні концентрації SDS (0,1% – 10%) і порівнювали криві росту бактерій. За рахунок тривалої інкубації бактерій із детергентом, у період стаціонарної фази росту формувалась в більшій чи меншій мірі виражена резистентність. Експериментально було встановлено, що присутність 0,1% SDS у ростовому середовищі є оптимальною концентрацією для аналізу росту бактерій.

Серед мутантів бактерій YeO3 найбільш чутливими до присутності детергента в ростовому середовищі виявились подвійні мутанти YeO3_os_ps (рис. 2). Одиночні мутанти YeO3 (YeO3_os та YeO3_ps) продемонстрували ріст на рівні дикого типу, більше того, бактерії YeO3_ps YeO8_ps адаптувались до середовища швидше ніж бактерії дикого типу. На відміну від подвійних мутантів бактерій YeO3, мутанти YeO8_os_ps виявились не чутливими до SDS в заданій концентрації. Для дикого типу YeO8 та для одиночних мутантів YeO8_ps характерна коротка стаціонарна фаза з наступним відмиранням клітин. Серед одиночних мутантів YeO8_os спостерігали резистентність до SDS подібну до такої серед подвійних мутантів YeO8_os_ps.

Зміни, які відбуваються на поверхні зовнішньої мембрани, зокрема структурні зміни молекул ЛПС, здатні істотно впливати на ріст ієрсиній у присутності поверхнево-активних речовин. Безпосередню участь лігаз у формуванні бактеріальної резистентності чітко можна помітити лише у випадку інгібування росту подвійних мутантів YeO3_os_ps.

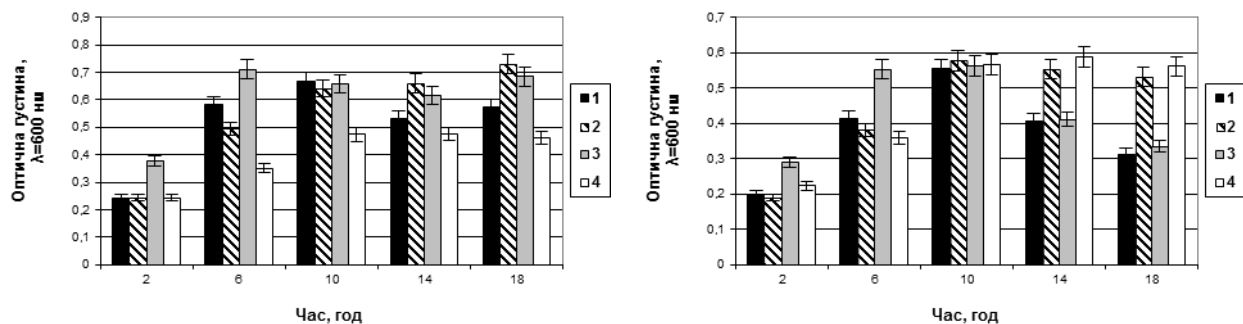


Рис. 2. Ріст *waaL*-мутантів YeO3 (зліва) та YeO8 (справа) в середовищі LB + 0,1% SDS: 1-дикий тип, 2-Ye_os, 3-Ye_ps, 4-Ye_os_ps.

Для досліджень впливу антимікробних пептидів на бактеріальний ріст, було обрано поліміксин В з кінцевою концентрацією 1 мкг/мл. Як відомо, поліміксин В є одним з природних антимікробних пептидів людини, який призводить до порушень проникності зовнішньої мембрани чутливих грамнегативних бактерій. Механізм дії полягає у зв'язуванні позитивно-заряджених аміногруп циклічних пептидів з негативно-зарядженими групами ЛПС шляхом електростатичних взаємодій (у сайтах зв'язування іонів кальцію і магнію). Пептиди взаємодіють із зовнішніми полісахаридними ланцюгами і конкурентно витісняють двовалентні катіони, які частково нейтралізують негативний заряд ЛПС [12]. Результатом є дестабілізація частини жирних кислот зовнішньої мембрани, порушення цілісності цитоплазматичної мембрани із наступним вивільненням вмісту клітини та інгібуванням клітинного дихання.

Отримані результати свідчать про відносну резистентність одиночних мутантів YeO3_os & YeO3_ps та дикого типу до присутності в ростовому середовищі поліміксина В у заданій концентрації (рис. 3). Проте було помічено суттєве інгібування подвійних мутантів YeO3_os_ps у період із логарифмічної фази до початку стаціонарної фази росту бактеріальної культури. Серед *waaL*-мутантів бактерій YeO8 не виявлено помітної чутливості до присутності антимікробних пептидів у поживному середовищі (рис. 3).

Криві росту як одиночних мутантів YeO8_os & YeO8_ps, так і подвійних YeO8_os_ps, подібні до дикого типу.

Відомо, що деякі антимікробні пептиди активні проти одних бактеріальних штамів але неактивні проти інших, така вибіркова дія пояснюється різноманітністю структури ЛПС [12-14]. Виявлені різні рівні чутливості до деяких антибактеріальних пептидів залежно від довжини полісахаридних ланцюгів ЛПС, величини і місцезоташування заряду, кількості ЛПС, архітекtonіки мембрани та присутності/відсутності O-полісахаридних ланцюгів [12, 15-17]. Серед грамнегативних бактерій повноцінний O-Ag є одним з основних елементів захисту бактеріальної клітини від пошкоджуючого впливу антимікробних пептидів, що підтверджують результати багаточисельних досліджень [18-22].

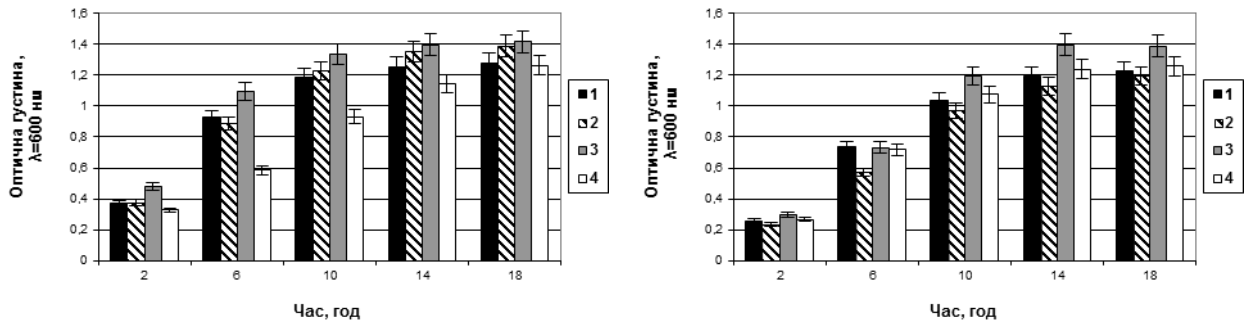


Рис. 3. Ріст *waaL*-мутантів YeO3 (зліва) та YeO8 (справа) в середовищі LB + поліміксин В: 1-дикий тип, 2- Ye_os, 3-Ye_ps, 4-Ye_os_ps.

Для дослідження чутливості вірулентних бактерій *Y. enterocolitica* до активних форм кисню в ростове середовище вносили 0,1 мМ H_2O_2 та аналізували ріст *waaL*-мутантів. Ріст одиночних мутантів YeO3_os та YeO3_ps, як і в попередніх експериментах, були близькими до дикого типу (рис. 4). Проте ріст подвійних мутантів YeO3_os_ps був значно пригніченим. Що стосується серотипу O:8, то мутанти YeO8_os та YeO8_os_ps продемонстрували ріст культур близький до дикого типу (рис. 4). Проте було виявлено суттєве інгібування росту одиночних мутантів YeO8_ps на рівні стаціонарної фази. Бактеріальну резистентність до активних форм кисню пов'язують з утворенням екзополісахаридів, які попереджають їх проникнення в середину бактеріальних клітин [8]. Можна припустити, що видалення гена *waaL_{PS}* з геному бактерій YeO8 призводить до певних порушень процесу утворення екзополісахаридів в період стаціонарної фази росту культури. Попередньо, роль ЛПС була продемонстрована на прикладі *waaL* мутантів фітопатогенних бактерій *Erwinia amylovora* та *Pseudomonas aeruginosa*. Автори досліджень пов'язують підвищення чутливості мутантів до перексиду водню зі зниженням вірулентності збудників [24].

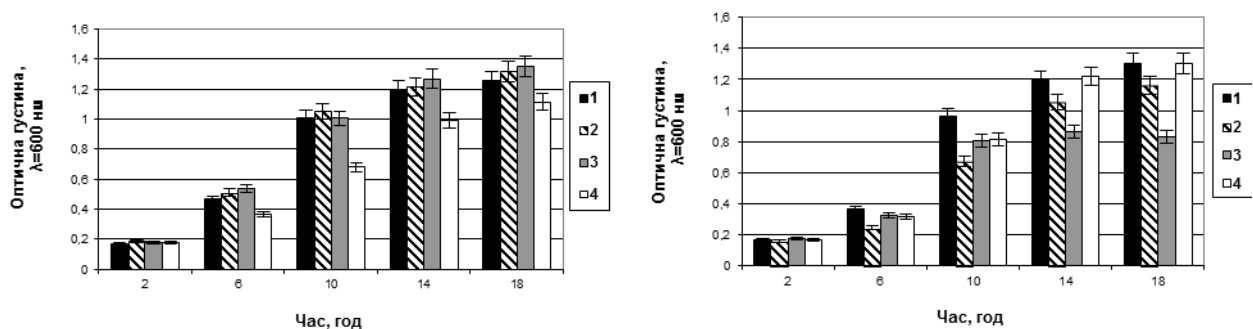


Рис. 4. Ріст *waaL*-мутантів YeO3 (зліва) та YeO8 (справа) в середовищі в середовищі LB + перексид водню: 1-дикий тип, 2- Ye_os, 3-Ye_ps, 4-Ye_os_ps.

WaaL лігази вважаються ефективною мішенню дії для антимікробних пептидів, тому важливим є дослідження впливу делецій генів лігаз на вірулентність збудника; його здатність до адгезії, інвазії, колонізації епітелію та синтезу ентеротоксину. Одним із перспективних напрямків подальших досліджень є дослідження структурних особливостей *WaaL* лігаз та їхніх каталітичних центрів.

ВИСНОВКИ

1. Підтверджено безпосередню участь продуктів генів лігаз *waaL* у синтезі повноцінних молекул ЛПС на бактеріальній поверхні. Мутанти YeO3_{os} та YeO8_{os} найбільше відрізняються від бактерій дикого типу за структурою ЛПС, що свідчить про особливу роль *waaLOS* лігаз у лігуванні структурних частин ЛПС.
2. Проаналізовано вплив таких стресових факторів на ріст *waaL* мутантів бактерій *Y. enterocolitica*: SDS, поліміксин В та H₂O₂. Виявлено значне пригнічення росту подвійних мутантів YeO3_{os}_ps в середовищі зі стресовими агентами.
3. Стійкість подвійних мутантів YeO8 до вищеперерахованих стресових факторів та чутливість подвійних мутантів YeO3 може бути пов'язана з серотиповою відмінністю структури ЛПС.

ПОДЯКИ

Ця робота виконана завдяки грантам від Центру міжнародної мобільності (СІМО), Фінляндія ТМ-12-8286.

ЛІТЕРАТУРА

1. Шиліна Ю.В. Модифікації ліпополісахаридів як один із способів адаптації клітин патогенних бактерій та їх популяцій до дії біотичних та абіотичних факторів середовища / Ю.В. Шиліна, О.С. Моложава // Цитология и генетика. – 2004. – Т. 38, № 2. – С. 65-80.
2. Структура і біологічна активність бактеріальних біополімерів / За ред. В.К. Позура. – К. : ВПЦ «Київський унів-т», 2003. – 305 с.
3. Иерсиниозы / Ющук Н.Д., Ценева Г.Я., Кареткина Г.Н., Бродов Г.Н. – М. : Медицина, 2003. – 208 с.
4. Identification of three oligo-/polysaccharide-specific ligases in *Yersinia enterocolitica* / [Pinta E., Li Zh., Batzilla J. et al.] // Molecular Microbiology. – 2012. – Vol. 83(1). – 125–136.
5. Shevchenko J. I. The effect of *waaL* genes deletion from *Yersinia enterocolitica* O:3 genome on bacteria LPS' phenotype / J. I. Shevchenko, V.K. Pozur, M. Skurnik // Biopolymers and Cell. – 2014. – Vol. 30, № 6. – P. 443–447.
6. Shevchenko J.I. Role of *Waal* ligases in serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotypes O:3 and O:8 / J.I. Shevchenko, V.K. Pozur, M. Skurnik // Microbiology & Biotechnology. – 2014. – Vol. 27, № 3. – P.6–14.
7. Модифікація УФ-В опроміненням властивостей фітопатогенних бактерій *Pectobacterium (Erwinia) carotovora* / Шиліна Ю.В., Гуца М.І., Мороз Ю.І., Моложава О.С. // Наукові праці, серія «Техногенна безпека». – 2012. – Т. 187 (175). – С. 68-71.
8. Коць С.Я. Биологическая фиксация азота: бобово-ризобиальный симбиоз / Коць С.Я., Моргун В.В., Патика В.Ф. – К., 2010. – С. 208 с.
9. Вплив хронічного гамма-опромінення на фіто токсичність та експресію факторів патогенності в бактерій *Pseudomonas aeruginosa* / Шиліна Ю.В., Гуца М.І., Мороз Ю.І., Моложава О.С. // Наукові праці, серія «Техногенна безпека». – 2013. – Т. 187 (175). – С. 68-71.

10. Common virulence factor for bacterial pathogenicity in plants and animals / [Rahme L.G., Stevens E., Wolfort S.F. et al.] // *Science*. – 1995. – Vol. 268. – P. 1899-1902.
11. Rajagopal S. Mechanism of detergent resistance in *Escherichia coli* and related bacteria: ETD collection for University of Nebraska / Rajagopal S. – Lincoln, 2003. – Paper AAI3085740.
12. Hancock R. E. W. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment / R. E. W. Hancock, D. P. Speert // *Drug Resist. Updat.* – 2000. – Vol. 3. – P. 247-255.
13. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability/ H. Nikaido, M.Vaara // *Microbiol Rev.* – 1985. – Vol. 49(1). – P.1–32.
14. Rosenfeld Y. Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: role in bacterial resistance and prevention of sepsis / Y. Rosenfeld, Y. Shai. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* – 2006. – Vol. 1758 (9). – P.1513–1522.
15. Allende D. Lipopolysaccharides in bacterial membranes act like cholesterol in eukaryotic plasma membranes in providing protection against melittin-induced bilayer lysis / D. Allende, T. J. McIntosh // *Biochemistry.* – 2003. – Vol. 42. – P. 1101–1108.
16. Biophysical characterization of the endotoxin inactivation by NK-2, an antimicrobial peptide derived from mammalian NK-Lysin. *Antimicrob* / J. Andrä, M.H.J. Koch, R. Bartels, K. Brandenburg // *Agents Chemother.* – 2004. – Vol. 48. – P. 1593-1599.
17. Rana F.R. Interaction between the animal peptide, magainin 2 and *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharides / F.R. Rana, J. Bazyk // *FEBS Lett.* – 1991. – Vol. 293. – P. 11-15.
18. Skurnik M. The biosynthesis and biological role of lipopolysaccharide O-antigens of pathogenic *Yersiniae* / M. Skurnik, J.A. Bengoechea // *Carbohydr Res.* – 2003. – Vol. 338. – P. 2521–2529.
19. Truncation of the lipopolysaccharide outer core affects susceptibility to antimicrobial peptides and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 / [Ramjeet M., Deslandes V., Michael F. et al] // *J Biol Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 39104–39114.
20. Optimization of virulence functions through glucosylation of *Shigella* LPS / [West N.P., Sansonetti P., Mounier J. et al.] // *Science.* – 2005. – Vol. 307. – P. 1313–1317.
21. A complete lipopolysaccharide inner core oligosaccharide is required for resistance of *Burkholderia cenocepacia* to antimicrobial peptides and bacterial survival in vivo / [Loutet S.A., Flanagan R.S., Kooi C. et al] // *J Bacteriol.* – 2006. – Vol. 188. – P. 2073–2080.
22. The biosynthesis and biological role of 6-deoxyheptose in the lipopolysaccharide O-antigen of *Yersinia pseudotuberculosis* / Ho N., Kondakova A.N., Knirel Y.A., Creuzenet C. // *Mol Microbiol.* – 2008. – Vol. 68. – P. 424–447.
23. Прооксиданти и антиоксиданти / [Мельникова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др.] // *Окислительный стресс.* – М. : Слово, 2006. – 553 с.
24. Effect of a *waaL* mutation on lipopolysaccharide composition, oxidative stress survival, and virulence in *Erwinia amylovora* / Berry M.C., McGhee G.C., Zhao Y., Sundin G.W. // *FEMS Microbiol Lett.* – 2009. – Vol. 291. – P. 80–87.

REFERENCES

1. Shilina Ju.V. Modifikacii lipopolisaharidiv jak odin iz sposobiv adaptacii klitin patogennih bakterij ta ih populjacij do dii biotichnih ta abiotichnih faktoriv seredovishha / Ju.V. Shilina, O.S. Molozhava // *Citologija i genetika.* – 2004. – Т. 38, № 2. – S. 65-80.
2. Struktura i biologichna aktivnist' bakterial'nih biopolimeriv / Za red. V.K.Pozura. – K. : VPC «Kiivs'kij univ-t», 2003. – 305 s.

3. Iersiniozy / Jushhuk N. D., Ceneva G. Ja., Karetkina G. N., Brodov G. N. – M. : Medicina, 2003. – 208 s.
4. Identification of three oligo-/polysaccharide-specific ligases in *Yersinia enterocolitica* / [Pinta E., Li Zh., Batzilla J. et al.] // *Molecular Microbiology*. – 2012. – Vol. 83(1). – 125–136.
5. Shevchenko J. I. The effect of *waaL* genes deletion from *Yersinia enterocolitica* O:3 genome on bacteria LPS' phenotype / J. I. Shevchenko, V. K. Pozur, M. Skurnik // *Biopolymers and Cell*. – 2014. – Vol. 30, № 6. – P. 443–447.
6. Shevchenko J.I. Role of *Waal* ligases in serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotypes O:3 and O:8 / J.I. Shevchenko, V.K. Pozur, M. Skurnik // *Microbiology & Biotechnology*. – 2014. – Vol. 27, № 3. – P. 6–14.
7. Modifikacija UF-V oprominennjam vlastivostej fitopatogenih bakterij *Pectobacterium* (*Erwinia*) *carotovora* / Shilina Ju.V., Gushha M.I., Moroz Ju.I., Molozhava O.S. // *Naukovi praci, serija «Tehnogenna bezpeka»*. – 2012. – T. 187 (175). – S. 68-71.
8. Koc' S.Ja. Biologicheskaja fiksacija azota: bobovo-rizobial'nyj simbioz / Koc' S.Ja., Morgun V.V., Patika V.F. – K., 2010. – 208 s.
9. Vpliv hronichnogo gamma-oprominennja na fito toksichnist' ta ekspresiju faktoriv patogenosti v bakterij *Pseudomonas aeruginosa* / Shilina Ju.V., Gushha M.I., Moroz Ju.I., Molozhava O.S. // *Naukovi praci, serija «Tehnogenna bezpeka»*. – 2013. – T. 187 (175). – S. 68-71.
10. Common virulence factor for bacterial pathogenicity in plants and animals / [Rahme L.G., Stevens E., Wolfort S.F. et al.] // *Science*. – 1995. – Vol. 268. – P. 1899-1902.
11. Rajagopal S. Mechanism of detergent resistance in *Escherichia coli* and related bacteria: ETD collection for University of Nebraska / Rajagopal S. – Lincoln, 2003. – Paper AAI3085740.
12. Hancock R. E. W. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment / R. E. W. Hancock, D. P. Speert // *Drug Resist. Updat.* – 2000. – Vol. 3. – P. 247-255.
13. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability/ H. Nikaido, M.Vaara // *Microbiol Rev.* – 1985. – Vol. 49(1). – R.1–32.
14. Rosenfeld Y. Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: role in bacterial resistance and prevention of sepsis / Y. Rosenfeld, Y. Shai. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. – 2006. – Vol. 1758 (9). – R.1513–1522.
15. Allende D. Lipopolysaccharides in bacterial membranes act like cholesterol in eukaryotic plasma membranes in providing protection against melittin-induced bilayer lysis / D. Allende, T. J. McIntosh // *Biochemistry*. – 2003. – Vol. 42. – R. 1101–1108.
16. Biophysical characterization of the endotoxin inactivation by NK-2, an antimicrobial peptide derived from mammalian NK-Lysin. *Antimicrob* / J. Andrä, M.H.J. Koch, R. Bartels, K. Brandenburg // *Agents Chemother.* – 2004. – Vol. 48. – R. 1593-1599.
17. Rana F.R. Interaction between the animal peptide, magainin 2 and *Salmonella typhimurium* liposaccharides / F.R. Rana, J. Bazyk // *FEBS Lett.* – 1991. – Vol. 293. – R. 11-15.
18. Skurnik M. The biosynthesis and biological role of lipopolysaccharide O-antigens of pathogenic *Yersiniae* / M. Skurnik, J.A. Bengoechea // *Carbohydr Res.* – 2003. – Vol. 338. – R. 2521–2529.
19. Truncation of the lipopolysaccharide outer core affects susceptibility to antimicrobial peptides and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 / [Ramjeet M., Deslandes V., Michael F. et al] // *J Biol Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 39104–39114.
20. Optimization of virulence functions through glucosylation of *Shigella* LPS / [West N.P., Sansonetti P., Mounier J. et al.] // *Science*. – 2005. – Vol. 307. – R. 1313–1317.
21. A complete lipopolysaccharide inner core oligosaccharide is required for resistance of *Burkholderia cenocepacia* to antimicrobial peptides and bacterial survival in vivo / [Loutet S.A., Flannagan R.S., Kooi C. et al] // *J Bacteriol.* – 2006. – Vol. 188. – R. 2073–2080.
22. The biosynthesis and biological role of 6-deoxyheptose in the lipopolysaccharide O-antigen of *Yersinia pseudotuberculosis* / Ho N., Kondakova A.N., Knirel Y.A., Creuzenet C. // *Mol Microbiol.* – 2008. – Vol. 68. – R. 424–447.
23. Prooksidanty i antioksidanty / [Mel'nikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K. i dr.] // *Okislitel'nyj stress*. – M. : Slovo, 2006. – 553 s.
24. Effect of a *waaL* mutation on lipopolysaccharide composition, oxidative stress survival, and virulence in *Erwinia amylovora* / Berry M.C., McGhee G.C., Zhao Y., Sundin G.W. // *FEMS Microbiol Lett.* – 2009. – Vol. 291. – R. 80–87.