

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРЕДПОЛАГАЕМОЙ МЕХАНОСЕНСОРНОЙ РОЛИ ПОЛЯРНОГО ЖГУТИКА БАКТЕРИИ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* SP245

Е.И. Кацы, А.В. Шелудько, Л.П. Петрова, С.С. Евстигнеева, Ю.А. Филипьевичева, Д.И. Мокеев,
Е.М. Телешева, И.В. Борисов

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

Стимулирующие рост растений бактерии рода *Azospirillum*, используемые в сельскохозяйственных биотехнологиях, приспособлены к обитанию в разнообразных природных средах и организмах и обладают выраженной генетической и фенотипической пластичностью. Так, некоторые виды азоспирилл, включая *Azospirillum brasilense*, отвечают на вариации в плотности среды небольшими, но статистически значимыми изменениями длины клеток, характера их жгутикования (только конститутивный полярный жгутик [Fla] или Fla и индуцибельные латеральные жгутики [Laf]) и образа жизни (плавание, роение или строительство колоний и биопленок). Однако механизмы восприятия механических сигналов и выработки ответа на них у этих и других микробов мало изучены. Тем не менее, есть данные о том, что механосенсорные функции могут выполнять жгутики, первыми вступающие в контакт с микроокружением бактерий.

Цель работы – анализ роли жгутиков в механоответах модельной бактерии *A. brasilense* Sp245. Использованы методы молекулярной генетики, микробиологии, биоинформатики. Показано, что у нескольких классов инсерционных мутантов этой бактерии дефекты в жгутиковании сопровождаются снижением количества биомассы в зрелых биопленках, а комплементация мутантов соответствующими генами штамма Sp245 приводит к восстановлению жгутикования, увеличению количества накопленной биомассы в биопленках и повышению их стабильности, в том числе, в условиях гидродинамического сдвига. При этом в биопленках, сформированных на интерфейсе между плотными и жидкими средами, выявляется только Fla. Показано, что для восстановления у комплементированных мутантов штамма Sp245 способности к образованию Laf в ответ на попадание в вязкие или на плотные среды важна не только способность Fla к вращению (и, соответственно, к восприятию препятствий для этого вращения), но и правильная, полярная, локализация Fla на клетке.

Бактериальные жгутики состоят из базального тела, крюка и филамента. Базальное тело выполняет функции якоря жгутика в оболочке клетки, мотора и экспортной машины и включает несколько кольцевых белковых комплексов, стержень и систему секреции III типа. Одним из ключевых компонентов этой системы секреции является белок FlhB. В геноме штамма Sp245 (accession nos. HE577327-HE577333) есть два предполагаемых гена *flhB*, расположенные в разных репликациях. Нами установлено, что хромосомный ген *flhB1* (локус AZOBR_150177) необходим для образования и Fla, и Laf. У инсерционного *flhB1* мутанта Sp245.1063 дефекты в сборке конститутивного Fla и индуцибельных Laf и подвижности были комплементированы в результате экспрессии гена *flhB1* штамма Sp245 с векторной плазмиды pRK415. Обнаружено, что мутант Sp245.1063 потерял способность к укорочению клеток после их попадания с плотной в жидкую среду (и наоборот), а у комплементированного мутанта Sp245.1063 (pRK415-*flhB1*) эта способность к морфологическому ответу на изменения в плотности среды восстановилась. После приобретения штаммами Sp245 и Sp245.1063 конструкции pRK415–150176 с клонированным соседним с *flhB1* геном AZOBR_150176 их клетки перестали удлиняться на плотных средах. По-видимому, продукт трансляции AZOBR_150176 – предполагаемая мультисенсорная гибридная гистидинкиназа–регулятор ответа (HSHK–RR) – и белок FlhB1 важны для реализации механоответов азоспирилл. Разработаны подходы к направленному мутагенезу разных сегментов AZOBR_150176 у штамма Sp245. Анализ особенностей фенотипа целевых мутантов с дефектами в разных доменах HSHK–RR будет использован для верификации вышеназванного предположения.

Авторы благодарят к.х.н. А.М. Бурова и ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН (Саратов, Россия) за помощь в работе. Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20–04–00006–А.