

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра молекулярной биологии

ДЮБО

Юлия Владимировна

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПЛАЗМИДЫ pRA21A
PESTOBACTERIUM ATROSEPTICUM 21A

Дипломная работа

Научный руководитель:
доцент Николайчик Е.А., Ph. D.

Допущена к защите

«___» _____ 2017 г.

Зав. кафедрой молекулярной биологии

доктор биологических наук, профессор А.Н. Евтушенко

Минск, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ	2
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	4
Реферат	5
Abstract.....	6
Рэферат.....	7
ВВЕДЕНИЕ	8
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.	9
1.1. Ti-плазмиды <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	9
1.2. pРАНТ <i>Pantoea agglomerans</i>	11
1.3. p29930 <i>Yersinia enterocolitica</i>	12
1.5. Плазмиды <i>Pectobacterium</i>	15
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	16
2.1. Объекты исследований	18
2.2. Среды и растворы.	20
Среды для культивирования микроорганизмов	20
Растворы антибиотиков	21
Растворы и реагенты для щелочного лизиса	22
Растворы для электрофореза	23
2.3. Методы исследований.....	24
Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса	24
Переосаждение ДНК спиртом	26
Электрофорез в агарозном геле.....	26
Рестрикция.....	26
Лигирование	27
Электропорация	27
Приготовление электрокомпетентных клеток.....	27
Трансформация клеток с использованием хлорида кальция	28
Конъюгативный перенос плазмиды pРА21А	29
Заражение растений	31
Индукция SOS-ответа	31

Определение минимальной ингибирующей концентрации.....	32
Методы биоинформатического анализа	32
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	33
3.1. Анализ и коррекция аннотации плазмиды pPA21A	33
3.2. Маркирование плазмиды pPA21A геном гентамицинрезистентности	44
3.3. Проверка способности плазмиды pPA21A::Gm к конъюгативному переносу.....	48
3.4. Проверка влияния SOS-ответа на частоту конъюгативного переноса плазмиды pPA21A.....	49
3.5. Проверка влияния плазмиды pPA21A на вирулентность бактерий <i>P.</i> <i>atrosepticum</i>	50
Выводы	53
Список литературы	54

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

kb — тысячи нуклеотидных пар

SDS — додецилсульфат натрия

PAI — островок патогенности

YOP — секретируемые белки ерсиний (Yersinia outer protein)

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

МА — минимальный агар

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

мкг/мл – микрограмм на миллилитр

н.п. - нуклеотидные пары

ПА — питательный агар

ПБ — питательный бульон

СС4Т – система секреции 4го типа

т.н.п. –тысячи нуклеотидных пар

Реферат

Дипломная работа 58 стр., включающих 11 рис., 6 табл., 49 источников.

ПЛАЗМИДА, ФИТОПАТОГЕН, ВИРУЛЕНТНОСТЬ, ФОСФОЛИПАЗА, СИРТУИН, ГИПРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ.

Объекты исследования: плазмида pRA21A *P. atrosepticum* 21A.

Цель: провести функциональный анализ криптической плазмиды pRA21A, определить, может ли эта плазмида оказывать влияние на вирулентность бактерий.

Методы исследования: микробиологические (культивирование микроорганизмов, скрещивание, определение МИК), генетические (трансформация) и молекулярно-генетические методы (выделение ДНК, клонирование, рестрикционный анализ), физико-химические (электрофорез), инфильтрация в листья растений, биоинформатические (поиск по базам данных, сравнение последовательностей, поиск сайтов связывания регуляторных белков).

Плазмиды – внехромосомные генетические элементы бактерий, способные автономно реплицировать. Многие плазмиды имеют свое фенотипическое проявление, такие как антибиотикорезистентность, донорные свойства, синтез или деградация определенных веществ, или являются криптическими. Криптической является и плазмида pRA21A.

Получена маркированная геном устойчивости к гентамицину версия плазмиды. Для маркированной версии показано, что плазмида является конъюгативной и так же имеет фенотипическое проявление – усиление реакции гиперчувствительность, вызываемой клонами с плазмидой по сравнению с бесплазмидными вариантами.

Abstract

Diploma work 58 p., Including 11 fig., 6 tables, 49 sources.

PLASMID, PHYTOPATHOGEN, VIRULENCE, PHOSPHOLIPASE, SIRTIN, HYPERSENSITIVITY

Objects of research: *Pectobacterium atrosepticum* strain 21A plasmid pPA21A.

Objective: realize functional analysis of the cryptic plasmid pPA21A, find out if this plasmid could influence on bacteria virulence.

Methods: microbiological (cultivation of microorganisms, matting, MIC identification), genetic (transformation) and molecular genetic techniques (DNA isolation, cloning, restriction analysis, expression), physicochemical (electrophoresis), plant leaves infiltration, bioinformatics (databases search, sequence alignment, binding sites of regulatory proteins search).

Plasmids are extrachromosomal genetic elements of bacteria that can autonomously replicate. Many plasmids have their own phenotypic mark: antibiotic resistance, donor properties, synthesis or degradation of substances, or are cryptic. The plasmid pPA21A is also cryptic.

Marked with the gentamicin resistance gene version of pPA21A was obtained. For the marked version was shown that the plasmid is conjugative and also has a phenotypic mark: increase in the hypersensitivity reaction caused by clones with the plasmid compared to the plasmid-free variants.

Рэферат

Дыпломная праца 58 стар., якія ўключаюць 11 мал., 6 табл., 49 крыніц.

ПЛАЗМІДА, ФІТАПАТАГЕН, ВІРУЛЕНТНАСЦЬ, ФОСФАЛПАЗА, СІРТУІН, ГІПЕРАДЧУВАЛЬНАСЦЬ.

Аб'екты даследавання: плазміда pPA21A *P. atrosepticum* 21A.

Мэта: правесці функцыянальны аналіз крыптычнай плазміды pPA21A, вызначыць, ці можа гэтая плазміда аказваць уплыў на вірулентнасць бактэрыі.

Метады даследавання: мікрабіялагічныя (культываванне мікраарганізмаў, спарванне, вызначэнне МІК), генетычныя (трансфармацыя) і малекулярна-генетычныя метады (вылучэнне ДНК, кланаванне, рэстрыкцыйны аналіз), фізіка-хімічныя (электрафарэз), інфільтрацыя ў лісце раслін, біаінфарматычныя (пошук па базах дадзеных, параўнанне паслядоўнасцяў, пошук сайтаў звязвання рэгуляторных бялкоў).

Плазміды - внемасомныя генетычныя элементы бактэрыі, здольныя аўтаномна рэпліцыраваць. Многія плазміды маюць сваё фенатыпічныя праявы, такія як антыбіётыкарэзістэнтнасць, донарныя ўласцівасці, сінтэз або дэградацыя пэўных рэчываў, або з'яўляюцца крыптычнымі. Крыптычнай з'яўляецца і плазміда pPA21A.

Атрымана маркіраваных геном ўстойлівасці да гентаміцін версія плазміды. Для маркіраванай версіі паказана, што плазміда з'яўляецца кан'югатыўнай і гэтак жа мае фенатыпічную праяву - узмацненне рэакцыю гіперадчувальнасці, выкліканай клонамі з плазмідай у параўнанні з бесплазміднымі варыянтамі.

ВВЕДЕНИЕ

Плазмиды — внехромосомные генетические элементы бактерий, способные автономно реплицироваться. Плазмиды могут передаваться от одной клетки бактерий к другой без видовых барьеров. Многие плазмиды имеют фенотипическое проявление: антибиотикорезистентность, донорные свойства, синтез определенных метаболитов. Плазмиды, не имеющие фенотипического проявления, или фенотипическое проявление которых пока не обнаружено, называются криптическими.

Плазмиды некоторых видов бактерий обладают способностью сильно изменять их свойства, например кодируют полные биосинтетические пути, несут гены, дающие бактериям возможность трансформировать клетки хозяев.

К настоящему времени накоплено довольно много информации о плазмидах, но большая часть её касается плазмид патогенов животных (в силу их интереса для медицины и сельского хозяйства). Достаточно хорошо изучены плазмиды биodeградации (представляют интерес для биотехнологии), а также плазмиды симбиотических бактерий. Плазмиды фитопатогенных бактерий изучены в меньшей степени, и только для очень немногих из них показана связь с патогенностью.

У представителей рода *Pectobacterium* плазмиды встречаются только у некоторых штаммов, причем пока не показана связь ни одной из них с патогенностью. Тем интереснее оказалось выявление довольно крупной (32 т.н.п.) плазмиды pPA21A в геноме изолированного в Беларуси штамма *Pectobacterium atrosepticum* 21A. Это штамм является единственным среди *P. atrosepticum* в коллекции кафедры молекулярной биологии, способным индуцировать реакцию сверхчувствительности у растений табака. А поскольку при анализе генома этого штамма в хромосомной последовательности не выявлено протяженных участков, отсутствующих в хромосомах других штаммов *P. atrosepticum*, логично было предположить, что способность клеток *P. atrosepticum* 21A вызывать реакцию гиперчувствительности определяется присутствием в них плазмиды. Проверка этой гипотезы и являлась целью данной работы.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

В контексте основной цели работы ее обзорная часть рассматривает прежде всего два классических примера плазмид с хорошо охарактеризованной ролью в вирулентности несущих их фитопатогенных бактерий. Кроме того, проанализированы свойства плазмиды p29930 *Yersinia enterocolitica*, наиболее близкой к pRA21A из экспериментально исследованных, а также проводится анализ литературных данных по плазмидам пектобактерий.

1.1. Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens - широко распространенный фитопатоген из рода *Agrobacterium*, вызывающий образование корончатых галлов.

Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens* являются одними из наиболее изученных плазмид, придающих бактериям способность трансформировать клетки растений-хозяев. Именно Ti-плазмиды обуславливают вирулентность и патогенность этих бактерий.

Большинство Ti-плазмид имеют размер около 200 kb и содержат *tra*-гены, отвечающие за конъюгативный перенос этой плазмиды, *vir*-гены, локус несовместимости, оперон деградации опинов и так называемую T-ДНК [1, 2].

Молекулярной основой трансформации клеток растений является перенос и встраивание в генетический аппарат клетки растения-хозяина T-ДНК. Сама T-ДНК представляет собой фрагмент плазмиды размером около 20 kb [3]. Она несет гены синтеза фитогормонов, вызывающих разрастание и дедифференцировку тканей, а также гены синтеза опинов, используемых бактериями как источник питания. Эти гены экспрессируются не в бактерии, а в растении, когда T-ДНК попадает в его клетки. Вырезание T-ДНК и её последующий транспорт в растительные клетки кодируется генами *vir*-области самой плазмиды. Вырезание T-ДНК индуцируется ацетосерингоном. Важными для индукции T-ДНК являются гены *virA* и *virG*, при их инактивации нарушается или полностью элиминируется вирулентность бактерий [2].

Т-ДНК является основным фактором патогенности *Agrobacterium*. Она переносится в клетки растений в комплексе с белками, кодируемыми *vir*-областью: VirD1 и VirD2. Интересным является и то, что транспорт Т-ДНК аналогичен транспорту ДНК при конъюгации. Наибольшим сходством обладает процессинг ДНК перед транспортом при конъюгационном переносе IncP плазмид. Например, внесение одностороннего разрыва в ДНК, опосредованные VirD1 и VirD2 белками, сходно с реакциями в релаксозомах IncP плазмид при инициации конъюгативного переноса [2].

Перенос комплекса Т-ДНК-белок и других Vir-белков (в частности VirE2 и VirF) осуществляется с помощью системы секреции IV типа (СС4Т) , образованной белками VirD4 и 11 белками VirB [4].

Ti-плазмида также несет *tra*-гены, ответственные за конъюгативный перенос. Перенос плазмиды индуцируется опинами, выделяемыми трансформированными клетками растения-хозяина. Индукция генов, отвечающих за перенос, осуществляется через сложный каскад реакций, приводящих к экспрессии генов переноса.

Многие патогенные бактерии имеют СС4Т для обеспечения передачи ДНК при конъюгации, доставки белковых факторов патогенности в клетки хозяина. Трансформация растительных клеток с помощью Т-ДНК, по-видимому, эволюционно происходит от конъюгативного переноса ДНК системами секреции [5]. И *vir*-область Ti-плазмиды, и её *tra*-область кодируют системы секреции 4го типа [6]. Система секреции, отвечающая непосредственно за перенос Т-ДНК относится к А-типу [5].

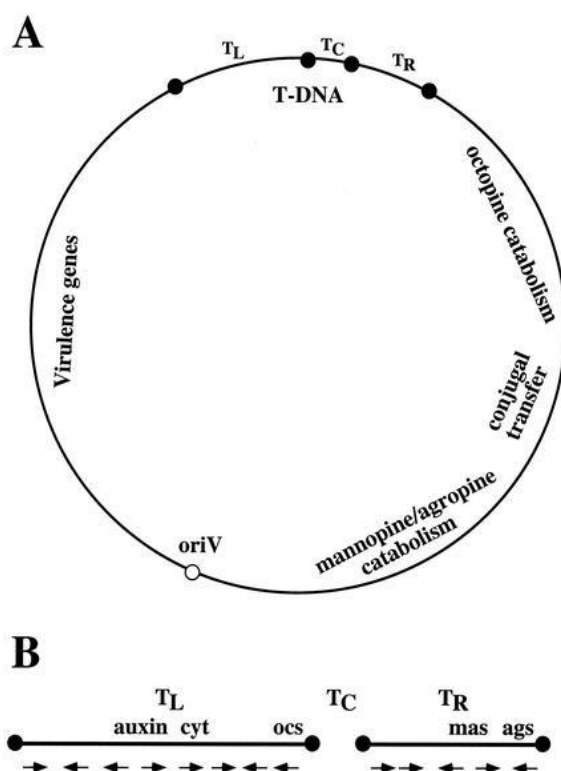


Рисунок 1. Схематическое изображение типичной Ti-плазмиды октопинового типа (А) и области Т-ДНК типичной Ti-плазмиды октопинового типа (В) [7].

Возможно участие этой системы секреции IV типа в переносе ДНК во время конъюгации. Индукция конъюгативного переноса осуществляется опинами, а не ацетосерингоном, с участием кворум-сигнала [8].

1.2. pРАНТ *Pantoea agglomerans*

Pantoea agglomerans — часто встречающийся эпифит или эндофит растений, выделен из почвы, воды, животных, но редко являющийся патогеном. Тем не менее, некоторые недавно выделенные штаммы обладают патогенностью в отношении *Gypsophila paniculata*, вызывая образование галлов. Патогенность данных штаммов связана в наличием в них плазмиды pРАНТ. Эта плазида исследована значительно хуже, чем Ti-плазмиды *Agrobacterium*, хотя *Pantoea agglomerans*, содержащие эту плазмиду, тоже вызывают образование галлов на чувствительных растениях [9].

pРАНТ_{pag} из *P. agglomerans* pv. *gypsophila* 824-1 на данный момент интенсивно исследуется. Размер плазмиды – 135 kb. В составе плазмиды

обнаруживается островок патогенности (РАI) размером 75 kb; в составе РАI – кластер генов *hrp/hrc*, кодирующих функциональную систему секреции III типа, регуляторные гены, гены эффекторов III типа и гены, кодирующие харпин [9]. Также в состав РАI входят гены биосинтеза фитогормонов – индолил-3-уксусной кислоты и цитокинина, IS-элементы [9, 10].

Плазмиды группы рРАТН относятся к плазмидам широкого круга хозяев, могут реплицироваться в *P. agglomerans* pv. *milletiae*, *P. stewartii*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 и *Xanthomonas campestris* pv. *chrysanthemi* [9].

Явным отличием механизма патогенности бактерий, содержащих рРАТН, от механизма патогенности бактерий, содержащих Ti-плазмиды, является зависимость способности формировать галлы от функционирования кластера *hrp* генов, и, в меньшей степени, от синтеза фитогормонов, которые, по видимому, не являются первичными факторами патогенности [3, 11, 12].

Для рРАТН пока не удалось подтвердить конъюгационный перенос, поэтому до сих пор остаются открытыми вопросы о том, как эта плазида попала в *Pantoea agglomerans*, и о том, как появились и эволюционировали РАI, которые, по-видимому, могли появиться у *Pantoea agglomerans* только в результате горизонтального переноса генов. Возможно, плазида рРАТН является мобилизуемой, и это объясняет её наличие в изначально эпифитных *Pantoea agglomerans*. В пользу этой точки зрения свидетельствует и то, что в составе плазмиды найден ген, кодирующий VirB4, входящий в состав системы секреции IV типа, принимающей участие в конъюгационной передаче плазмид. В то же время остальных *vir*-генов, продукты которые могли бы участвовать в передаче рРАТН, не обнаружено [9].

1.3. p29930 *Yersinia enterocolitica*

Yersinia – род грамотрицательных бактерий состоящий из 11 видов, три из которых являются патогенными.

Патогенность *Yersinia* обусловлена наличием в их клетках трех плазмид: pYV, pFra/pMT1 и pCP1/pPst/pPla.

pYV кодируют систему секреции 3-го типа, участвующую в доставке YOP (*Yersinia* outer protein), и сами YOP (факторы вирулентности данных бактерий, доставляющиеся в клетки эукариот). pYV является ключевой в патогенности *Y. pestis*. pFra/pMT1 кодирует токсины: фосфолипазу, капсулоподобный F1 антиген, а pCP1/pPst/pPla — активатор плазминогена [13].

Для данной работы своим сходством с плазмидой pRA21A из исследуемого штамма *Pectobacterium atrosepticum* 21A представляет интерес криптоическая плазида *Yersinia enterocolitica* 29930 (biotype 1A; O:7,8). Гены конъюгационного переноса этих двух плазмид совпадают на 90%. Данная плазида кодирует систему секреции IV типа, которая участвует в конъюгационном переносе этой плазмиды.

Размер плазмиды — 40,303 kb, она содержит 44 открытые рамки считывания. Среди них — гены репликации и распределения, гены участвующие в конъюгационном переносе, а так же гены, необходимые для поддержания плазмиды в клетках. Так же плазида содержит IS-элементы [14, 15].

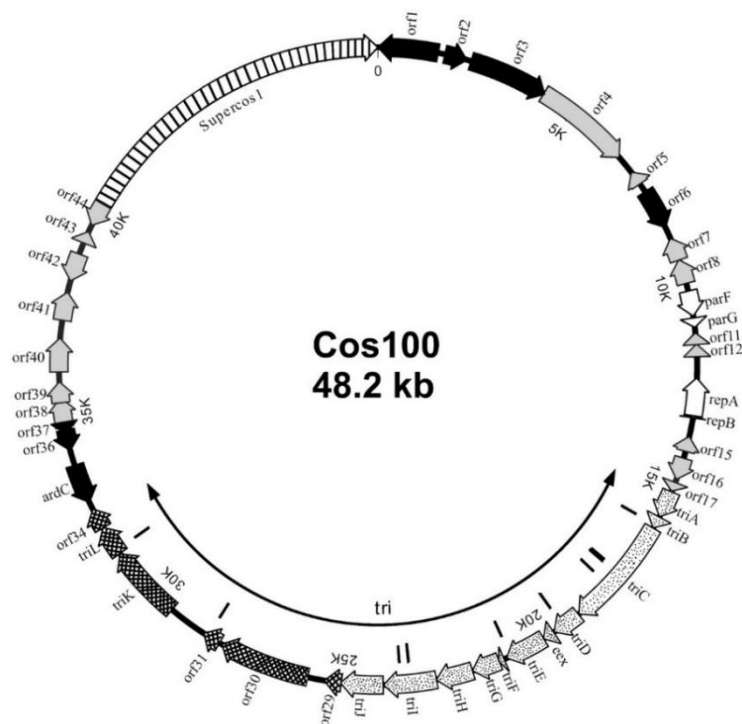


Рисунок 2. Карта вектора SuperCos со встроенной в него p29930 [15].

Крапичкой обозначены гены, отвечающие за образование пор, перекрещивающейся штриховкой отмечены гены, отвечающие за процессинг и транспорт ДНК, белым – за репликацию. Гены, функция которых предсказана с помощью компьютерного анализа, обозначены черным, гены с неизвестной функцией – серым. Вертикальной штриховкой отмечена векторная часть Cos100.

Гены конъюгативного переноса были разделены на 2 функциональных кластера — Mpf (mating pair formation) и Dtr (DNA transfer and replication).

Система Mpf является частью системы секреции IV типа. Она включает в себя 10 открытых рамок считывания, названных *tri* (transfer genes of I-complex plasmid). Предположительно, они кодируют продукты, отвечающие за биогенез пилей и формирование контакта с реципиентной клеткой. Расположение этих генов (*triA-triJ*) сходно с расположением генов функционально близкого оперона *A. tumefaciens virB*.

Вторая составляющая системы транспорта — *dtr* кластер, осуществляющий реакции процессинга ДНК (образование одноцепочечной ДНК, образование релаксосомы в процессе переноса). В него входят гены *triK* и *triL*. Их продукты гомологичны белкам MobV и MobC мобилизуемой плазмиды CloDF13. Предполагаемая функция, предсказанная на основе из сходства с MobV и MobC — релаксирование плазмиды и разрез в *nic*-сайте. MobV, возможно, играет роль и в связывании релаксосомы и транспортного аппарата.

Кроме того, в *tri*-области имеется ещё 3 открытые рамки считывания, продукты которых могут участвовать в переносе плазмиды — *orf29*, *orf30* и *orf31*. Предположения о их функциях основываются исключительно на сходстве с известными белками. Для Orf29 обнаружено сходство с фаговыми интегразами, Orf30 — топоизомеразой III типа IncP1 плазмиды, Orf31 — H-NS белками (histone-like nucleoid-structuring).

Предполагаемый *oriT* находится 367 п.н. далее от *triK* на «-» цепи, и

составляет 11 н.п.

После *triK* и *triL* были обнаружены ещё две рамки считывания, в конъюгативных плазмидах находящиеся в непосредственной близости от генов передачи. Предполагаемый продукт *orf35* — периплазматическая эндонуклеаза, расщепляющая одно- и двуцепочечные молекулы ДНК, однако её роль до сих пор остается неясной. Другая рамка считывания, *ardC*, кодирует антирестрикционную функцию систем рестрикции и модификации I типа.

Экспериментальным подтверждением функционирования системы переноса являются эксперименты со скрещиванием. Трансконъюганты при скрещивании *E. coli* и *Yersinia* были получены с частотой от 10^{-1} до 10^{-7} , как и при скрещивании между различными штаммами *Yersinia* [15].

1.5. Плазмиды *Pectobacterium*

Род *Pectobacterium* относится к семейству *Enterobacteriaceae*, характеризуется способностью вызывать различные болезни растений-хозяев: мягкие гнили, увядания, черную ножку. Хорошо изученными факторами патогенности для *Pectobacterium* являются секретируемые ферменты, расщепляющие клеточную стенку растений: протеазы, полигалактуроназы, целлюлазы и пектатлиазы [16]. Для многих факторами патогенности являются также и белки, вызывающие некроз, и токсины. Эти факторы вирулентности транспортируются в клетки растений-хозяев специализированными системами секреции, гены всех 6 известных типов которых присутствуют в геномах пектобактерий. Для актуальной в контексте настоящей работы системы секреции IV типа известны два подкласса: транспортирующий факторы вирулентности и участвующий в конъюгационном переносе генетической информации [5]. Для *P. atrosepticum* остаются неизвестны субстраты системы секреции IV типа, хотя её роль в вирулентности бактерий показана [17].

Все более-менее изученные на сегодня факторы вирулентности закодированы в хромосомах пектобактерий. Несмотря на то, что в клетках

некоторых штаммов пектобактерий могут присутствовать плазмиды, на сегодняшний день в литературе не описаны факторы вирулентности пектобактерий с плазмидной локализацией кодирующих их генов.

В геноме *Pectobacterium atrosepticum* обычно нет крупных плазмид, но мелкие могут присутствовать достаточно часто [1, 18–20].

Для *P. carotovorum*, которые являются родственными *P. atrosepticum*, плазмиды известны для многих штаммов. Большинство является криптоическими — их физиологическое проявление пока неизвестно.

Наиболее изученной плазмидой *P. carotovorum* является pCA25 и её делеционно-вставочные варианты. Они составляют наиболее распространенную группу плазмид у *P. carotovorum*. Размер pCA25 — 9,8 kb [21].

Эту плазмиду не удалось элиминировать из клеток при обработке 1% SDS при повышенной температуре или этидий бромидом, следовательно, плазида является стабильной в клетках бактерий [22].

Для всех классов плазмид показана корреляция с общим местом происхождения штаммов (рассматривались штаммы *P. carotovorum*, *P. atrosepticum* и *P. toxicum* без разделения по видам) - штаммы из Канады оказались бесплазмидными, как и белорусские (за единичными исключениями — pRA21A этой работы, например). Штаммы, несущие плазмиду 9,8 kb, происходили из России, Армении и Румынии [23].

Прослеживается также корреляция с наличием крупных плазмид и устойчивостью к фагам ZF40 c5/5, T4 и P1 [23].

Для мегаплазмид последнего размерного класса pCA16-1, pCA42-1 и pCA549-1 показаны уникальные рестрикционные карты и отсутствие одинаковых по размеру рестрикционных фрагментов [24].

Как уже было сказано выше, о связи плазмид рода *Pectobacterium* ничего не известно. Однако, можно предполагать, что мегаплазмиды (в силу своего огромного размера) могут иметь отношение к вирулентности бактерий хотя бы

в силу достаточно существенного влияния на метаболизм носителей.

Завершая обзор литературы, можно сказать, что для многих бактерий плазмиды являются ключевыми факторами вирулентности и патогенности. Они кодируют факторы вирулентности: ферменты, расщепляющие клеточную стенку, белки, вызывающие некроз, Т-ДНК и другие. Кроме этого, плазмиды могут кодировать и системы доставки этих факторов в клетки растений-хозяев и кодировать не только сам факторы вирулентности, но и регуляторы, влияющие на экспрессию не только плазмидных генов, но и генов хромосомы бактерий-хозяев. Часто эти функционально связанные структур (системы секреции и их субстраты) обнаруживаются в островках патогенности.

Мобильные генетические элементы, присутствующие в плазмидах, могут способствовать интеграции в хромосому или образованию конгломератов с другими плазмидами. Таким образом, даже неконъюгативные плазмиды могут быть мобилизованы и переданы в другие клетки.

Изучение плазмид, связанных с вирулентностью и патогенностью бактерий (в том числе и объекта настоящей работы *P. atrosepaticum*), позволит понять эволюцию патогенов, возможности видообразования, превращения непатогенных штаммов и видов в патогенные или условно-патогенные и возможности их дальнейшей адаптации и приспособления к изменению условий обитания и новым растениям-хозяевам.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объекты исследований

Штаммы *E. coli* культивировались на полноценных средах при температуре 37 °С, штаммы *P. atrosepticum* культивировались на полноценных и минимальных средах при температуре 28 °С. Характеристики использованных штаммов и плазмид приведены в таблице 1.

Таблица 1. Штаммы и плазмиды, использованные в работе.

Штаммы, плазмиды	Характеристика	Происхождение
<i>Escherichia coli</i> XL-1	$F^- proAB lacI^q lacZ^- M15$ $Tn10(Tet^r)/recA1 endA1$ $gyrA96(Nal^r) thi-1 hsdR17(r^{+k})$ $supE44 relA1 lac$	Коллекция кафедры молекулярной биологии БГУ
<i>Escherichia coli</i> J62	$str^r F^- lac pro his trp$	Коллекция кафедры молекулярной биологии БГУ
<i>Pectobacterium</i> <i>atrosepticum</i> 21A	Природный изолят	Евтушенков А.Н.
<i>Pectobacterium</i> <i>atrosepticum</i> 36A	Природный изолят	Евтушенков А.Н.
<i>Pectobacterium</i> <i>atrosepticum</i> SCRI1043	Природный изолят	Scottish Crop Research Institute
pPA21A	Криптическая	Евтушенков А.Н.
pPA21A::Gm	Gm ^r	Данная работа

pJQ210 mp18	P15A ori, sacB, RP4, gtm ^r , cos, mp18 MCS	[25]
-------------	--	------

Растений табака линии *Nicotiana tabacum* Havana petit SR1 (Sm^r, TMV-s, модель дикого типа) выращивали при режиме освещения 16 часов освещения- 8 часов темноты.

2.2. Среда и растворы.

Среды для культивирования микроорганизмов

1) Полноценный питательный агар на основе бульона (ПА):

Агар-агар — 4,5 г

LB бульон — до 300 мл

Автоклавировали при 1,5 атм 1 час

2) Бульон LB

Пептон сухой — 8 г

Дрожжевой экстракт — 5 г

NaCl — 10 г

H₂O — до 1 л

Автоклавировали при 1,5 атм 1 час

3) Водный агар

Агар-агар — 6 г

H₂O — до 300 мл

Автоклавировать при 1,5 атм 1 час

4) 40% сахароза

Сахароза — 40 г

Дистиллированная вода — до 100 мл

Стерилизовали кипячением на водяной бане 30 минут

5) Солевой концентрат 4х

NH₄Cl — 20 г

Na_2SO_4 — 4 г

K_2HPO_4 — 20 г

KH_2PO_4 — 4 г

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,4 г

H_2O — до 1 литра

Автоклавировать при 1 атм 1 час

6) Физиологический раствор

NaCl — 0,85 г

H_2O — до 10 мл

Автоклавировать при 1,5 атм 1 час

7) Раствор тиаминa 34мг/мл

Тиаминa гидрохлорид — 680 мг

H_2O — до 20 мл

Стерилизовали кипячением на водяной бане 30 минут

8) Минимальный агар (на одну чашку)

Солевой концентрат 4х — 5 мл

Глюкоза 20% - 0,5 мл

Водный агар — до 20 мл

Растворы антибиотиков

9) Налидиксовая кислота 2000 мкг/мл

Налидиксовая кислота — 20000 мкг

H_2O — 10 мл

10) Гентамицин 2500 мкг/мл

Гентамицин — 25000 мкг

H₂O — 10 мл

11) Ампициллин 10000 мкг/мл

Ампициллин – 100000 мкг

H₂O — 10 мл

Растворы и реагенты для щелочного лизиса

12) 70% этанол

96% этанол — 21,9 мл

H₂O — 8,1 мл

13) 5M NaOH

NaOH — 4 г

H₂O — до 20 мл

14) TE-буфер

1 M Tris-HCl — 200 мкл

0,5 mM ЭДТА — 40 мкл

H₂O — до 20 мл

15) 3M CH₃COONa pH=5,0

CH₃COONa — 4,92 г

CH₃COOH ледяная — 1,2 мл

H₂O — до 20 мл

16) Лизирующая смесь (2 мл)

NaOH — 80 мкл

SDS 10% - 200 мкл

H₂O дистиллированная — 1,72 мл

Смесь должна быть свежеприготовленная.

Растворы для электрофореза

17) Агароза (1%):

Агароза -1 г

ТАЕ буфер (pH=8,0) – до 100 мл

Кипятили на водяной бане до полного растворения.

18) ТАЕ-буфер

ТАЕ-буфер 50x (pH=8,0) — 20мл

Бромистый этидий(10мг/мл) — 50 мкл

Дистиллированная H₂O — до 1 л

19) ТАЕ-буфер 50x

Tris-ОН — 121,1 г

ЭДТА — 9,308 г

CH₃COOH ледяная — 44,8 мл

H₂O — до 500 мл

20) Краситель для загрузки проб

40% сахароза — 5 мл

Бромфеноловый синий — несколько крупинок.

2.3. Методы исследований

Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса

Поскольку штамм *P. atrosepticum* 21А является природным изолятом, то он содержит активные внутриклеточные нуклеазы, чем отличается от специальных лабораторных штаммов (например *E. coli* XL-1 Blue). Это сильно осложняет выделение ДНК из клеток этих бактерий. Исходя из этого, была модифицирована стандартная методика щелочного лизиса, которая бы позволила получать препарат плазмидной ДНК, пригодный для рестрикционного анализа.

1) 20 мл LB-бульона в колбе инокулировать бактериальной петлей небольшой колонией. Выращивать при интенсивной аэрации в течении 14 часов до ранней стационарной фазы.

2) Культуру осадить центрифугированием при 5.000 оборотах не более 5 минут. Надосадочную жидкость полностью слить, а осадок ресуспендировать в 200 мкл ТЕ-буфера и перенести в пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.

3) Добавить 400 мкл лизирующей смеси, раствор перемешать резким опрокидыванием пробирки несколько раз.

4) Выдержать клетки в лизирующей смеси до полного лизиса, он заметен по значительному снижению мутности раствора. Нельзя держать смесь на этой стадии больше 5 минут.

5) Добавить 300 мкл охлажденного до 0 °С 3М ацетата натрия, раствор перемешать резким опрокидыванием пробирки 3-4 раза.

6) Добавить 1 мкл РНКазы А.

7) Центрифугировать при 13.000 оборотах в минуту в микроцентрифуге в течение 5-7 минут. После этого супернатант перенести в чистую пробирку и добавить к нему 600 мкл охлажденного до -20 °С изопропанола.

8) Центрифугировать при 13.000 оборотах в минуту 5 минут. Тщательно слить надосадочную жидкость, осадок подсушить и ресуспендировать в 100 мкл ТЕ-буфера.

9) Добавить 50 мкл 8М ацетата аммония, перемешать и выдержать смесь 20 минут при 0 °С.

10) Центрифугировать при максимальных оборотах 5 минут. Супернатант перенести в чистую пробирку, добавить к нему 300 мкл охлажденного до -20 °С 96% этанола, перемешать и осадить центрифугированием.

11) Супернатант слить, к осадку добавить 500 мкл охлажденного до -20°С 70% этанола. Центрифугировать при 13.000 оборотах в минуту 5 минут.

12) Осторожно слить супернатант, осадок подсушить и ресуспендировать в 70 мкл ТЕ-буфера.

13) Далее препарат обрабатывается протезой К при 37 °С в течение 30 минут (1 мкл протеазы К на 50 мкл препарата).

14) После выдержки к препарату ДНК добавить равный объем фенола, смесь встряхивать в течении 5 минут для образования однородной суспензии.

15) Центрифугировать в микроцентрифуге при 10.000 оборотах в минуту. Аккуратно отобрать водную фазу (она обычно верхняя) в чистую пробирку.

16) Добавить равный объем смеси фенол:хлороформ (1:1). Смесь встряхивать в течение 5 минут для образования однородной суспензии.

17) Центрифугировать при 10.000 оборотах в минуту 10 минут. Аккуратно отобрать водную фазу (она обычно верхняя) в чистую пробирку.

18) Добавить равный объем хлороформа, перемешать несколькими переворачиваниями пробирки.

19) Центрифугировать при 10.000 оборотах в минуту в течении 3 минут. Аккуратно отобрать водную фазу в чистую пробирку и переосадить ДНК спиртом.

Переосаждение ДНК спиртом

- 1) К раствору ДНК добавить 1/10 объема 3М ацетата натрия.
- 2) Добавить 2-2,5 объема (от общего объема раствора) охлажденного до -20 °С 96% спирта.
- 3) Центрифугировать в течение 20-30 минут при 13.000 оборотах в минуту при температуре 4 °С.
- 4) Слить надосадочную жидкость, к осадку добавить 70% этанол, равный объему препарата в 1ом пункте.
- 5) Центрифугировать 3 минуты.
- 6) Слить супернатант, осадок высушить и растворить в ТЕ-буфере.

Электрофорез в агарозном геле

- 1) Расплавить 1% агарозу, охладить до температуры 50-60 °С, залить в ванночку для геля с гребенкой.
- 2) После застывания агарозы вытащить гребенку, снять бортики и поместить гель в форезный аппарат под ТАЕ-буфер.
- 3) В ячейках планшета для иммунологических реакций подготовить образцы ДНК: смешать образцы ДНК, загрузочный краситель и воду.
- 4) Пипеткой внести образцы в лунки геля.
- 5) В одну из лунок внести ДНК-маркер для определения размеров фрагментов.
- 6) После внесения всех образцов аппарат закрыть крышкой и подключить к источнику питания. Подавать напряжение в 100 В. За ходом электрофореза следить по движению маркерного красителя.

Рестрикция

- 1) Реакции выполнялись в объемах 20 мкл. Реакции содержали соответствующий рестрикционный буфер в 1х концентрации. Рестрикционный

фермент добавлялся в зависимости от его активности и концентрации ДНК в образце. Реакции доводились до конечного объема дистиллированной водой. Приготовленные рестрикционные смеси инкубировались при температуре, рекомендуемой для конкретного фермента в течение 1 часа. Продукты реакции анализировались электрофоретически.

Лигирование

Лигирование ДНК выполнялось в конечном объеме 20 мкл. Реакции содержали 0.5-1 мкг общей ДНК, 1х лигазный буфер и T4 ДНК-лигазу. 0.5 единицы лигазы использовались для лигирования липких концов ДНК. Реакции инкубировались в течение 25 минут при комнатной температуре для липких концов. После этого результат лигирования контролировался электрофорезом. В дальнейшем препарат использовался для электропорации.

Электропорация

1) 20 мкл электрокомпетентных клеток смешать с ДНК (0,3 мкл препарата после лигирования) и перенести в предварительно охлажденную кювету для электропорации.

2) Тщательно протерев кювету для удаления воды с наружной поверхности, вставить в электропоратор и подать импульс тока с соответствующим кювете напряжением - 1700 В для 1-мм кюветы. Остальные параметры - конденсатор 25 мкф, шунтирующий резистор 200 Ом.

3) Немедленно после подачи импульса извлечь кювету из электропоратора и добавить в нее 1 мл бульона LB.

4) Инкубировать клетки при 37 °С в течение двух часов, после чего высеять соответствующие разведения на селективные среды.

Приготовление электрокомпетентных клеток

1) Ночную культуру, выращенную без аэрации, разбавить в 20 раз свежим

бульоном. Выращивать с интенсивной аэрацией до оптической плотности 0,6 при длине волны 600 нм.

2) Культуру охладить на льду и осадить при 7.000 об/мин 10 минут. Центрифугу следует предварительно охладить до 4 °С и поддерживать эту температуру.

3) Не меньше 4 раз отмывать культуру охлажденной до 4°С дистиллированной водой, каждый раз уменьшая объем воды в 2 раза. Культуру все время держать охлажденной, на льду, режим центрифугирования использовать, что и в пункте 2.

4) Ресуспендировать клетки в 1 мл 1% глицерина (охлажденного до 4 °С) и снова осадить.

5) Осадок ресуспендировать в объеме 10% глицерина (охлажденного до 4 °С), равном объему осадка.

6) Полученную сметанообразную суспензию разделить по аликвотам и заморозить. Хранить в низкотемпературном морозильнике.

Трансформация клеток с использованием хлорида кальция

1) Развести ночную культуру выбранного штамма *E. coli* в 25 раз свежим питательным бульоном и инкубировать при 37°С с аэрацией до OD600 в пределах 0.35-0.4.

2) Культуру охладить на льду, перенести в центрифужные пробирки объемом 1.5 мл и центрифугировать при 6000 оборотах в минуту в течение 2 минут при 4°С. Супернатант удалить, а бактериальный осадок ресуспендировать в 700 мкл 0.1М CaCl₂, охлажденного на льду.

3) Клетки центрифугировать при 7000 оборотах в минуту в течении 2 минут. Осадок растворить в 100 мкл ледяного раствора CaCl₂.

4) Выдержать клетки на льду 15-20 минут.

5) Добавить ДНК (обычно 1-100 нг в объеме до 10 мкл), содержимое пробирки перемешать, выдержать на льду 15-20 минут.

6) Перенести пробирки на 2 минуты в водяную баню при температуре 42 °С, а затем немедленно перенести пробирки на лед на 1 минуту для остановки теплового шока.

7) Добавить 1 мл питательного бульона, инкубировать при температуре 37 °С для экспрессии плазмидных генов антибиотикорезистентности (0.5-1 час перед высевом на среды с ампициллином и тетрациклином, 1.5-2 часа с канамицином, стрептомицином, гентамицином).

8) Высеять необходимое количество клеток на содержащие соответствующий антибиотик чашки.

Конъюгативный перенос плазмиды pPA21A

1) Ночную культуру объемом 1,5 мл осадить при 6.000 об/мин 4 минуты.

2) Осадок ресуспендировать в 100 мкл бульона. Нанести по 50 мкл суспензий донора, реципиента, и смеси двух штаммов на стерильные нитроцеллюлозные фильтры, разложенные на чашке Петри с питательным агаром.

3) Инкубировать при 28°C сутки (для скрещивания *E. coli* XL-1 Blue с плазмидой pPA21A::Gm и *P. atrosepticum* 36A) или 37°C (при переносе между штаммами *E. coli*).

4) Сделать смыв с фильтра в 2 мл физиологического раствора.

Приготовить разведения:

Для донора: -1 и -3

Для реципиента: -1 и -3

Для смеси: -1, -3, -5 и -6

1) Высеять по 50 мкл приготовленных разведений на селективные среды в соответствии с таблицей 2 или таблицей 3.

Таблица 2. Схема рассева скрещивания *E. coli* с плазмидой pPA21A::Gm и *P. atrosepticum* на селективные среды.

Среды\Разведения	D-1	D-3	R-1	R-3	X-1	X-3	X-5	X-6
ПА, Gm 2 ед							15	17
МА							16	18
МА, Gm 1 ед	1	3	5	7	9	11	13	
МА, Gm 2 ед	2	4	6	8	10	12	14	

Таблица 3. Схема рассева скрещивания между штаммами *E. coli* на селективные среды.

Среды\Разведения	D-1	D-3	R-1	R-3	X-1	X-3	X-5	X-6
ПА, Gm 4 ед							15	17
ПА, Sm 100 ед							16	18
ПА, Gm 2 ед, Sm 100 ед	1	3	5	7	9	11	13	
ПА, Gm 4 ед, Sm 100 ед	2	4	6	8	10	12	14	

В таблицах, соответственно:

D-1, D-3 – соответствующие разведения смывов донора

R-1, R-3 – соответствующие разведения смывов реципиента

X-1, X-3, X-5, X-6 – соответствующие разведения смывов скрещивания

1-8 — проверка спонтанных мутаций у донорного и реципиентного штамма

9-14 — подсчет трансконъюгантов

15, 17 — подсчет доноров и трансконъюгантов

16, 18 — подсчет реципиентов и трансконъюгантов

б) а) Для скрещивания *E. coli* с плазмидой pPA21A::Gm и *P. atrosepcticum*: чашки инкубировать при 28 °С (кроме ПА, Gm 2 ед - инкубировать при 37 °С) в течении двух суток. После подсчитать выросшие колонии.

б) Для скрещивания между штаммами *E. coli* : чашки инкубировать при 37 °С в течении одних суток. После подсчитать выросшие колонии.

Подсчет частот переноса плазмид производился следующим образом: среднее количество колоний трансконъюгантов, приведенное к общей степени, деленное на среднее количество колоний донора, приведенное к той же степени.

Заражение растений

В листья табака инокулировать суспензию клеток бактерий в физиологическом растворе через прокол листовой пластины. Растения выставить на свет.

Оценку реакции проводили через дней в соответствии с представленной на рисунке 3 шкалой.

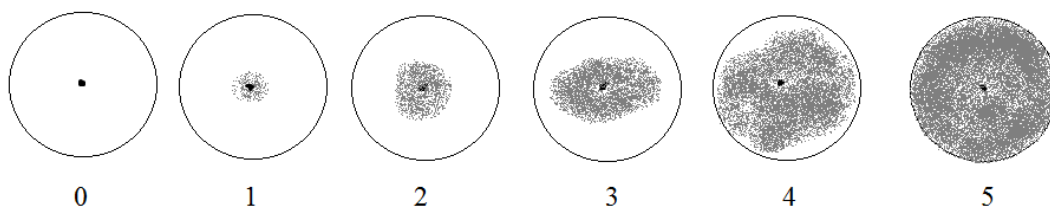


Рисунок 3. Шкала для оценки результатов заражения. Серым цветом показана область гибели клеток в месте инфильтрации, черной точкой – место укола. Цифрами указаны баллы для учета подобных результатов.

Индукция SOS-ответа

Для индукции SOS-ответа донорного штамма его инкубировали в питательном бульоне с митомицином (концентрация 1 ед/мл) в течении двух часов при аэрации.

Определение минимальной ингибирующей концентрации

Определение минимальной ингибирующей концентрации производилось на полноценном питательном агаре. Шаг разведений антибиотика для гентамицина составлял 2, для митомицина – 1.

Бактерии рассеивались штрихом по поверхности плотной среды до изолированных колоний.

Ингибирование роста оценивалось по отсутствию либо наличию роста на протяжении всего штриха.

Методы биоинформатического анализа

В работе использовались следующие программные пакеты:

Пакет программ BLAST [26], в частности blastn и blastp. Поиск производился по базам данных GenBank, Swissprot и CDD [27–29].

Для выравнивания нуклеотидных последовательностей использовался пакет Progressive Mauve (версия snapshot_2015-02-13 build 0) [30].

Коррекция аннотации проведена с помощью геномного браузера SigmID (2.0.0 build 234) [31]. Также с помощью этой программы проводился поиск сайтов связываний регуляторов.

Для составления рестрикционных карт плазмид использована программа SQ (версия 2.0.0 beta 1 сборка 344) [32].

Поиск сигналов экспорта белков осуществлялся с помощью Effective DB [33].

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Анализ и коррекция аннотации плазмиды pPA21A

Штаммы *P. atrosepticum* редко несут плазмиды, особенно крупные, так что исследуемая плазида pPA21A размером 32444 н.п. является уникальной в своем роде. Кроме того, штамм 21A вызывает у растений табака реакцию гиперчувствительности, в отличие от близкого ему бесплазмидного штамма SCRI1043 (сходство нуклеотидной последовательности хромосом порядка 98%). Поэтому логично было предположить, что именно плазида ответственна за подобное свойство штамма 21A. Проверка этой гипотезы являлась основной целью настоящей работы.

Присутствующая в базе данных последовательность pPA21A аннотирована с использованием автоматического конвейера Prokka [34] и является малоинформативной. Во избежание ошибок при дальнейших манипуляциях с плазмидой в начале работы был выполнен тщательный анализ аннотации плазмиды с коррекцией ошибок и неточностей.

Для планирования дальнейшей работы был проведен поиск сходных нуклеотидных последовательностей в базе данных GenBank с помощью программы Nucleotide BLAST [26]. В результате было обнаружено сходство с плазмидой p29930 *Yersinia enterocolitica* и плазмидоподобным элементом в хромосоме штамма *P. atrosepticum* [17]. Обнаруженные сходные с pPA21A последовательности сравнивали друг с другом с помощью программы Mauve [30]. На рисунке 4 представлены результаты выравнивания плазмид pPA21A, p29930 и плазмидоподобного элемента, интегрированного в хромосому штамма SCRI1043 *P. atrosepticum* (хромосомные координаты 1857204 – 1877617).

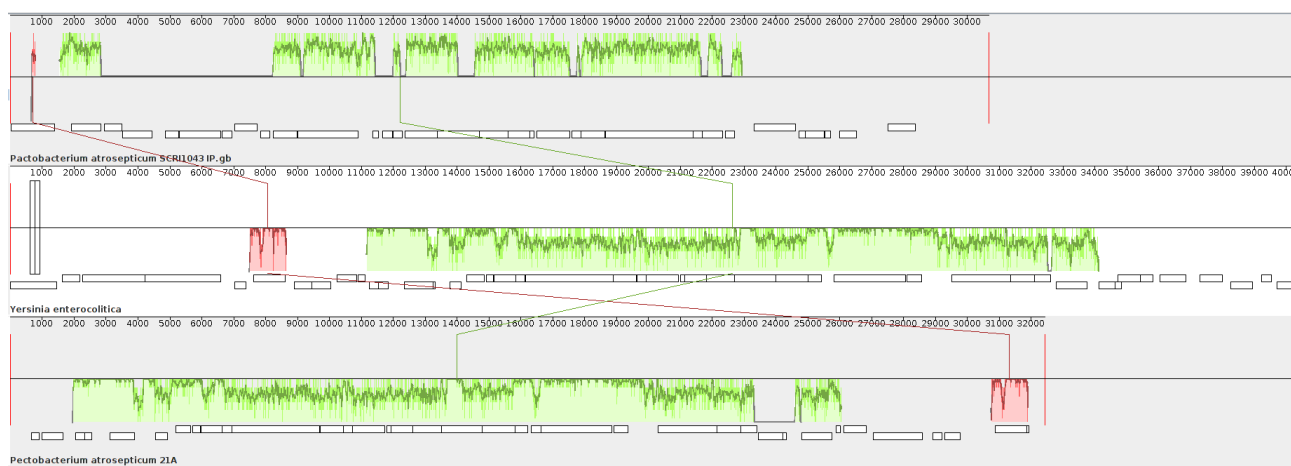


Рисунок 4. Результат проведения сравнительного анализа плазмидоподобного элемента хромосомы *P. atrosepticum* SCRI1043, плазмиды p29930 *Yersinia enterocolitica* и плазмиды pPA21A *Pectobacterium atrosepticum* 21A.

Как можно видеть на рисунке, сходство генов, кодирующих систему секреции IV типа плазмиды у pPA21A, p29930 и плазмидоподобного элемента в хромосоме *P. atrosepticum* SCRI1043 прослеживается достаточно четко (зеленый цвет на рисунке). Кроме того, у плазмид pPA21A и p29930 имеется еще один участок сходства – ген *res* pPA21A и неохарактеризованный белок *orf6* p29930 (красный цвет на рисунке), отсутствующий в хромосоме *P. atrosepticum* SCRI1043 [17].

Для планирования дальнейшей работы был проведен сравнительный анализ предполагаемых продуктов генов плазмиды. Для этого использовалась программа Sigmoid [31]. Предполагаемые белки сравнивались с белковыми последовательностями, имеющимися в базах данных UniProt, SwissProt и CDD.

По итогам анализа составлена отредактированная аннотация. Сравнение исходной и исправленной аннотации представлено в таблице 4 и обсуждается ниже.

Таблица 4. Сравнение исходной и исправленной аннотации плазмиды pPA21A.

	Координаты	Аннотация из GenBank		Исправленная аннотация	
		Ген	Продукт	Ген	Продукт
1	904 - 659	GZ59_46210	Hypothetical protein	<i>orf_2</i>	Hypothetical protein
2	1640 - 987	GZ59_46220	ATPase MipZ	<i>mipZ</i>	ATPase MipZ
3	2322 - 2038	GZ59_46230	Plasmid stabilization system	<i>parE</i>	Toxin of type II toxin-antitoxin system
4	2557 - 2315	GZ59_46240	Putative addiction module antidote protein, CopG/Arc/MetJ family	<i>parD</i>	Antitoxin, toxin-antitoxin type II system
5	3894 - 3130	<i>repA</i>	Replication initiation protein	<i>repA</i>	Replication initiation protein, IncFII family
5a	4184 - 4062	GZ59_46260	PK-repBA; regulatory region of repA gene	GZ59_46260	RNA, PK-repBA; regulatory region of repA gene

6	4914 - 4555	GZ59_46270	Transcriptional regulator	<i>tcr</i>	Transcriptional regulator, XRE-family
7	5188 - 5643	<i>rfaH_2</i>	Transcriptional activator	<i>rfaH_2</i>	Transcriptional activator
8	5723 - 5947	GZ59_46290	Hypothetical protein	<i>orf_9</i>	Hypothetical protein
9	5968 - 6636	<i>virB1</i>	Putative conjugal transfer protein	<i>virB1</i>	Putative conjugal transfer protein VirB1
10	6646 - 6939	<i>virB2</i>	Major pilus subunit of type IV secretion complex (VirB2)	<i>virB2</i>	Major pilus subunit of type IV secretion complex VirB2
11	6949 - 9696	<i>virB4</i>	Putative conjugal transfer protein	<i>virB4</i>	Putative conjugal transfer protein VirB4
12	9708 - 10430	<i>virB5</i>	Putative conjugal transfer protein	<i>virB5</i>	Putative conjugal transfer protein VirB5
13	10445 - 10735	GZ59_46340	Hypothetical protein	<i>eex</i>	Entry exclusion protein
14	10732 - 11733	<i>virB6</i>	Putative conjugal transfer protein	<i>virB6</i>	Putative conjugal transfer protein VirB6
15	11803 - 11940	<i>virB7</i>	TriF protein	<i>virB7</i>	VirB7 protein
16	11933 - 12616	<i>virB8</i>	Putative conjugal transfer protein	<i>virB8</i>	Putative conjugal transfer protein VirB8

17	12616 - 13512	<i>virB9</i>	Putative conjugal transfer protein	<i>virB9</i>	Putative conjugal transfer protein VirB9
18	13509 - 14789	<i>virB10</i>	Putative conjugal transfer protein	<i>virB10</i>	Putative conjugal transfer protein VirB10
19	14800 - 15828	<i>virB11</i>	Putative conjugal transfer protein	<i>virB11</i>	Putative conjugal transfer protein VirB11
20	15815 - 16219	GZ59_46410	Hypothetical protein	<i>cag12</i>	Cag pathogenicity island protein Cag12
21	16323 - 16628	<i>kikA</i>	Putative plasmid conjugation protein	<i>kikA</i>	Putative plasmid conjugation protein KikA
22	16631 - 18853	<i>topB_3</i>	DNA topoisomerase III	<i>traE/ topB_3</i>	DNA topoisomerase III
23	18915 - 19358	<i>hns2_2</i>	DNA-binding protein Hns	<i>hns</i>	DNA-binding protein HN-S family
24	20308 - 22143	GZ59_46450	Mobilization protein	<i>mobB</i>	Coupling protein MobB
25	22153 - 22899	<i>mobC</i>	Mobilization protein	<i>mobC</i>	Putative relaxase MobC
26	22892 - 23413	<i>pld</i>	Phospholipase D precursor	<i>pld</i>	Phospholipase D precursor
27	24213 - 23458	GZ59_46480	Hypothetical protein	<i>orf_28</i>	Predicted transcriptional regulator

28	24337 - 24215	GZ59_46490	Hypothetical protein	<i>orf_29</i>	Hypothetical protein
29	25751 - 24801	<i>ardC_1</i>	Antirestriction protein	<i>ardC_1</i>	Antirestriction protein
30	25899 - 26012	GZ59_46510	Hypothetical protein	<i>orf_31</i>	Hypothetical protein
31	26122 - 26841	GZ59_46520	Hypothetical protein	<i>orf_32</i>	Hypothetical protein
32	28600 - 27044	GZ59_46530	Hypothetical protein	<i>sir2</i>	SIR2-like protein
33	29203 - 28910	<i>ardC_2</i>	Antirestriction protein	<i>ardC_2</i>	Antirestriction protein
34	29785 - 29300	GZ59_46550	Hypothetical protein	<i>toxN</i>	Endoribonuclease toxin, plasmid stabilization system ToxN
34a	30303 - 29834	-	-	<i>toxI</i>	Antitoxin RNA to ToxN, plasmid stabilization system
35	30879 - 31856	GZ59_46560	Resolvase	<i>res</i>	Resolvase
36	31840 - 31935	GZ59_46570	Hypothetical protein	<i>orf_37</i>	Hypothetical protein
37	31937 - 659	-	-	<i>end</i>	Restriction endonuclease type II

В ходе анализа выяснилось, что плазмида имеет *vir*-область, весьма сходную с таковой плазмиды *Y. enterocolitica* p29930 (раздел 1.4). Идентичность областей плазмид pPA21A и p29930 составляет 70%. Эта область имеет в своем составе 12 генов (*virB1-virB11* и *eex*, координаты кластера 5968 — 15828). Гомология между белками *vir*-области pPA21A и *tri*-области p29930 *Y. enterocolitica* достаточно высока. Сходны между собой как сами белки, так и порядок расположения на плазмидах. Кроме того, продукты генов *vir*-области сходны с таковыми системы секреции IV типа Ti-плазмид *A. tumefaciens* (исходя из этого и предположения о влиянии плазмиды pPA21A на вирулентность было решено назвать гены именно *vir*, а не *tra*, не смотря на сходство последовательностей pPA21A и p29930). Также имеется сходство между 6 рамкой считывания плазмиды p29930 и 35 рамкой считывания плазмиды pPA21A, кодирующую потенциальную резолвазу.

Наличие в pPA21A полной системы секреции IV типа позволяет предположить её участие или в секреции факторов вирулентности, или в конъюгационном процессе.

Далее на плазмиде pPA21A располагаются 4 гена: Cag-подобного белка (*cag12*, 15815 — 16219), который в аннотации GenBank не охарактеризован, KikA (*kikA*, 16323 — 16628), топоизомеразы TopB (*topB*, 16631 — 18853) и H-NS-подобного белка (H-NS, 18915 — 19358). На плазмиде p29930 имеются рамки считывания, сходные с рамками считывания KikA, топоизомеразой Top3 и H-NS-подобным белком (вся область, вместе с *vir*-кластером выделена зеленым цветом на рисунке 4).

Особый интерес представляет H-NS-подобный белок в связи с тем, что многие плазмиды, влияющие на патогенность бактерий [15], кодируют белки, ассоциированные с нуклеоидом бактерий, или их гомологи [35].

Для H-NS-подобных белков показано связывание ДНК в АТ-богатых участках. Они являются глобальными транскрипционными регуляторами, которые могут влиять на экспрессию генов как плазмиды, так и хромосомы

хозяина. Также показано, что плазмиды, кодирующие Н-NS-подобные регуляторы, при перемещении в клетку нового хозяина влияют на метаболизм хозяина меньше, чем плазмиды, не кодирующие подобные регуляторы. Возможно, эти плазмидные регуляторы участвуют в регуляции генов, ответственных за конъюгативный перенос плазмиды [36, 37].

Далее на исследуемой плазмиде располагаются гены *mobB* (в аннотации GenBank не охарактеризован; 20308 — 22143) и *mobC* (22153 — 22899), а на p29930 - *triK* и *triL*. Их продукты сходны с белками MobB и MobC, которые участвуют в конъюгативном переносе ДНК [38, 39], хотя и не относятся к системе секреции IV типа.

На исследуемой плазмиде pPA21A обнаружена рамка считывания (*pld*, 22892 — 23413), продукт которой схож с фосфолипазой D. Подобной рамки считывания на плазмиде p29930 не обнаружено. Этот белок весьма интересен, так как он может быть связан с реакцией гиперчувствительности (гибель клеток в месте введения патогена) [40]. Предполагается, что участие фосфолипазы D в реакции растений на контакт с патогеном может быть связано с тем, что реакция гиперчувствительности у резуховидки Таля на белки *Pseudomonas syringae* AvrRpm1 и AvrRpt2 индуцируется фосфатидной кислотой. При прямом введении фосфатидной кислоты в листья индуцируется защитная реакция растения и возникает проявление гиперчувствительности [41, 42].

Первый пик концентрации фосфатидной кислоты в клетке связан с падением концентрации фосфатидилинозитола в клетке и предположительно связан с фосфолипазой C вместе с диацилглицерол киназой. Второй пик концентрации фосфатидной кислоты выше и связан с активностью фосфолипазы D, которая высвобождает ее из структурных липидов (таких как фосфотидилхолин и фосфотидилэтаноламин). Инактивация фосфолипаз уменьшает накопление фосфатидной кислоты в клетке и приводит к снижению степени проявления реакции гиперчувствительности [42].

Разрушение клеточных липидов связано с множеством биотических и

абиотических стрессов, как, например, засуха, засоление, низкие температуры и дефицит питательных веществ, что приводит к накоплению продуктов их распада, одним из которых является фосфатидная кислота, а также растворимые инозитолфосфаты. Кроме того, показано, что фосфолипазы участвуют в регуляции роста и развития растений. Фосфатидная кислота рассматривается как мощный вторичный посредник во внутриклеточной сигнализации у растений [40, 43, 44]. Исходя из этого, на данный момент фосфолипаза D считается важным для сигнализации ферментом. Тем не менее, у некоторых растений она играет более значимую функцию как катаболический фермент, нежели сигнальный [44].

Возможно, кодируемая плазмидой pPA21A фосфолипаза D проявляет себя как один из факторов запуска реакции гиперчувствительности в листьях *Nicotiana tabacum*, что в ходе дальнейшей работы и будет проверено. Об этом может косвенно свидетельствовать и то, что эта фосфолипаза имеет в своем составе сигнал системы секреции II типа, что говорит о возможности ее секреции за пределы бактериальной клетки.

После *triK* и *triL* на плазмиде p29930 были обнаружены ещё две рамки считывания, в конъюгативных плаزمидеях находящиеся в непосредственной близости от генов конъюгативного переноса. Предполагаемый продукт *orf34* — периплазматическая эндонуклеаза, расщепляющая одно- и двуцепочечные молекулы ДНК, однако её роль до сих пор остается неясной. Другая рамка считывания, *ardC* плазмиды p29930, кодирует антирестрикционную функцию систем рестрикции и модификации I типа. На плазмиде pPA21A обнаружена, после сходных с *triK* и *triL* рамок, рамка считывания, предположительно кодирующая один из двух Ard-белков плазмиды, ArdC_1 (25751 — 24801), а до нее — две предполагаемых *orf_28* и *orf_29* (24213 — 23458 и 24337 — 24215 соответственно), для которых не удалось обнаружить сходных белков в базах данных (зеленый цвет на рисунке 4).

Также сходством обладают участки этих плазмид, предположительно

кодирующие резолвазу (*res* плазмиды pPA21A, 20879 — 31856) и неохарактеризованный белок (*orf6* p29930) (красный цвет на рисунке 4).

Далее будут описаны области, для которых свойство с плазмидой p29930 не обнаружено.

После рамки, кодирующей ArdC_1 (25751 — 24801), находятся три предполагаемые открытые рамки считывания (*orf_31* и *orf-32*; 25899 — 26012 и 26122 — 26841 соответственно), для которых не удалось найти сходных охарактеризованных белков в базах данных.

Следующая рамка считывания *sir2* (28600 – 27044) кодирует сиртуин-подобный белок. Данный белок сходен с сиртуинами класса II, главным образом присутствующими в цитоплазме. Однако они также могут транспортироваться в ядро [45]. Сиртуины обнаружены и у представителей семейства пасленовые – томатах, картошке и табаке [46–49]. Функция сиртуинов в растениях все еще плохо изучена, хотя, являясь деацетилазами гистонов, они участвуют в глобальной регуляции транскрипции. Кроме того, сиртуины участвуют в развитии реакции гиперчувствительности и клеточной смерти у растений [49].

После располагается вторая рамка считывания, кодирующая еще один белок антирестрикции, ArdC_2 (*ardC_2*; 29203 — 28910). Далее располагается рамка считывания, предположительно кодирующая один из белков системы поддержания плазмиды в клетке — токсин ToxN (*toxN*, 29785 — 29300; не охарактеризован в GenBank). После расположен ген, кодирующий РНК-антитоксин, ToxI (30303 – 29834). Следующая за ней рамка предположительно кодирует резолвазу (*res*, 30879 – 31856).

До *vir*-области располагается рамка, пересекающая нулевой нуклеотид и предположительно кодирующая рестрикционную эндонуклеазу (*end*, 31937 - 659).

Далее располагается рамка считывания, предположительно кодирующая шаперонин (*orf_2*, 904 - 659), а следом — MipZ (*mipZ*, 1640 - 987). Возможно, АТФаза MipZ снабжает энергией систему секреции IV типа, кодируемую *vir*-

областью.

Следом за ними располагаются гены *parE1* (2322 — 2038) и *parD1* (2557 — 2315), продукты которых сходны с белками токсин-антитоксин системы поддержания плазмиды.

Следующая рамка считывания кодирует белок, сходный с репликативным белком RepA (*repA*, 3894 — 2130).

До *vir*-области, следом за *repA*, располагается ген *tcr* (4917 — 4555). Его предполагаемый продукт — транскрипционный регулятор НТН-типа.

Следующая рамка считывания кодирует RfaH_2 (*rfaH_2*, 5188 — 5643) - белок, предотвращающий терминацию транскрипции. Последняя рамка считывания перед *vir*-кластером, *orf_9* (5723 — 5947), не охарактеризована.

Следует упомянуть, что у продуктов рамок считывания *virB2*, *virB5*, *virB7*, *virB9*, *cag12*, *kikA* и *pld* обнаружены сигнальные пептиды, которые, возможно, определяют их транспорт наружу клетки (*pld*), или сборку системы секреции 4-го типа (белки *vir*-области).

Так же были обнаружены сайты связывания регуляторных белков LexA (5078 – 5097 и 30791 – 30810) и FNR (1903 – 1924 и 24445 – 24466).

На основании проделанного анализа была построена карта плазмиды pPA21A (рисунок 5).

Таким образом, можно выделить несколько отличительных черт исследуемой плазмиды:

- плазида pPA21A является низкокопийной и имеет как минимум две системы поддержания в клетке (*parE* – *parD*, *toxN* – *toxI*);
- возможно, она конъюгативна, так как имеет гены системы секреции IV типа;
- кодирует рестрицирующую эндонуклеазу и белки анти-рестрикции;
- кодирует потенциальные факторы вирулентности (HN-S-подобный белок, фосфолипаза D и сиртуин-подобный белок).

На основе результатов проведенного анализа в ходе дальнейшего

экспериментального анализа планировалось выяснить:

- является плазмида конъюгативной;
- влияет ли связывание регулятора LexA со своим сайтом перед *vir*-кластером на частоту конъюгативного переноса;
- действительно ли плазмида pRA21A может влиять на вирулентность штамма *P. atrosepticum* 21A и усиливать фенотипическое проявления реакции гиперчувствительности у растений табака при контакте с несущими ее бактериями.

3.2. Маркирование плазмиды pRA21A геном гентамицинрезистентности

Для маркирования плазмиды pRA21A был выбран ген устойчивости к гентамицину. Наличие этого гена в плазмиде позволяет проводить прямой отбор клеток, несущих рекомбинантную плазмиду. Выбранный ген антибиотикорезистентности в плазмиде pJQ210mp18 (рисунок 5), использованной как донор, фланкирован двумя сайтами рестрикции для фермента KpnI. Данный фермент в исследуемой плазмиде pRA21A имеет только один сайт рестрикции в области, не входящей ни в одну рамку считывания. Другие же единичные сайты затрагивают рамки считывания, что может изменить свойства рекомбинантной плазмиды (рисунок 6).

Для последующего отбора клеток, несущих рекомбинантную плазмиду, было проведено определение МИК гентамицина для бесплазмидных штаммов (таблица 5).

В дальнейших экспериментах использовались концентрации гентамицина, в 2-4 раза превышающие МИК для бесплазмидных штаммов.

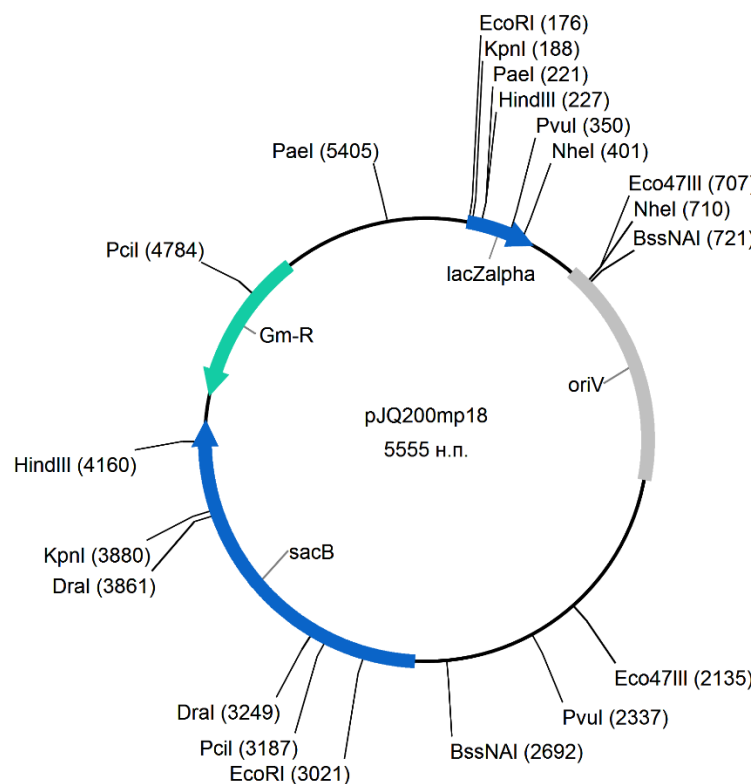


Рисунок 5. Карта pJQ200mp18.

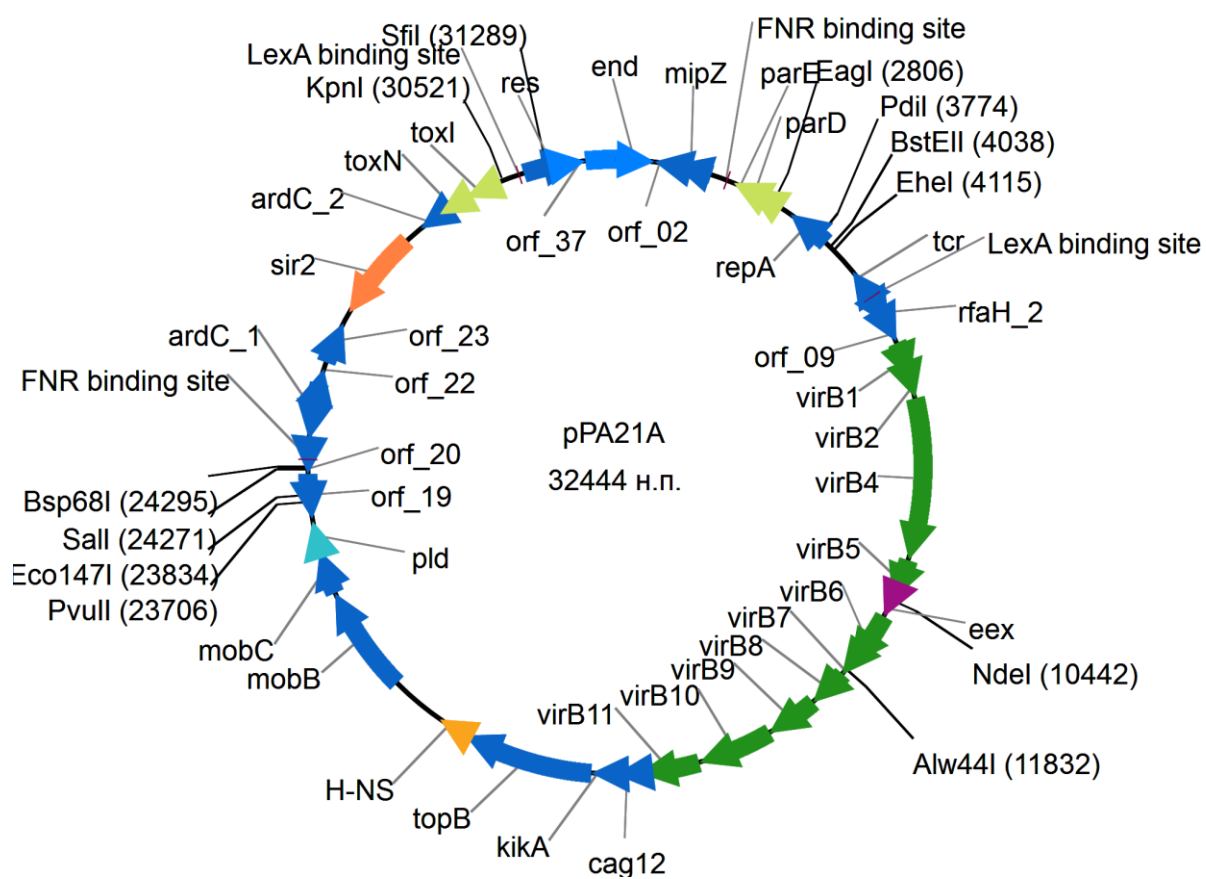


Рисунок 6. Карта плазмиды pPA21A.

Таблица 5. Минимальные ингибирующие концентрации гентамицина для разных штаммов бактерий.

Штамм	Концентрация антибиотика, мкг/мл
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	1
<i>E. coli</i> HB101	1
<i>E. coli</i> J62	2
<i>P. atrosepticum</i> 36A	0,5
<i>P. atrosepticum</i> SCRI1043	2

Препаратом, полученным после лигирования, были трансформированы клетки *E. coli* XL-1 Blue. Для отбора трансформированных клеток производился высев на селективную среду. Для проявления свойств резистентности к гентамицину до высева на ПА с гентамицином трансформированные клетки инкубировались 2 часа в ПБ.

После трансформации были получены колонии трансформантов, которые содержат рекомбинантную плазмиду.

Минимальной ингибирующей концентрацией для полученных клонов является 5 мкг/мл гентамицина (определялось высевам на чашки с различной концентрацией антибиотика).

Плазмидную ДНК выделяли по модифицированной методике щелочного лизиса, описанной в пункте 2.3, с помощью которой ДНК выделяется в достаточном количестве и пригодна к рестрикционному анализу.

Плазмидная ДНК, выделенная из гентамицинрезистентных клонов, была подвергнута рестрикционному анализу, в результате которого присутствие рекомбинантной плазмиды было подтверждено (рисунок 8). Использовались ферменты Alw44I и BamHI. Предполагаемые размеры фрагментов указаны в таблице 6, карта рекомбинантной плазмиды с обозначенными сайтами рестрикции приведена на рисунке 7.

Таблица 6. Ожидаемый размер фрагментов при рестрикции плазмиды pPA21A::Gm.

Интактная плазида pPA21A		Рекомбинантная плазида pPA21A::Gm	
BamHI + Alw44I	BamHI	BamHI + Alw44I	BamHI
16433	25574	15127	27437
9141		9141	
6870	6870	6870	6870
		3169	

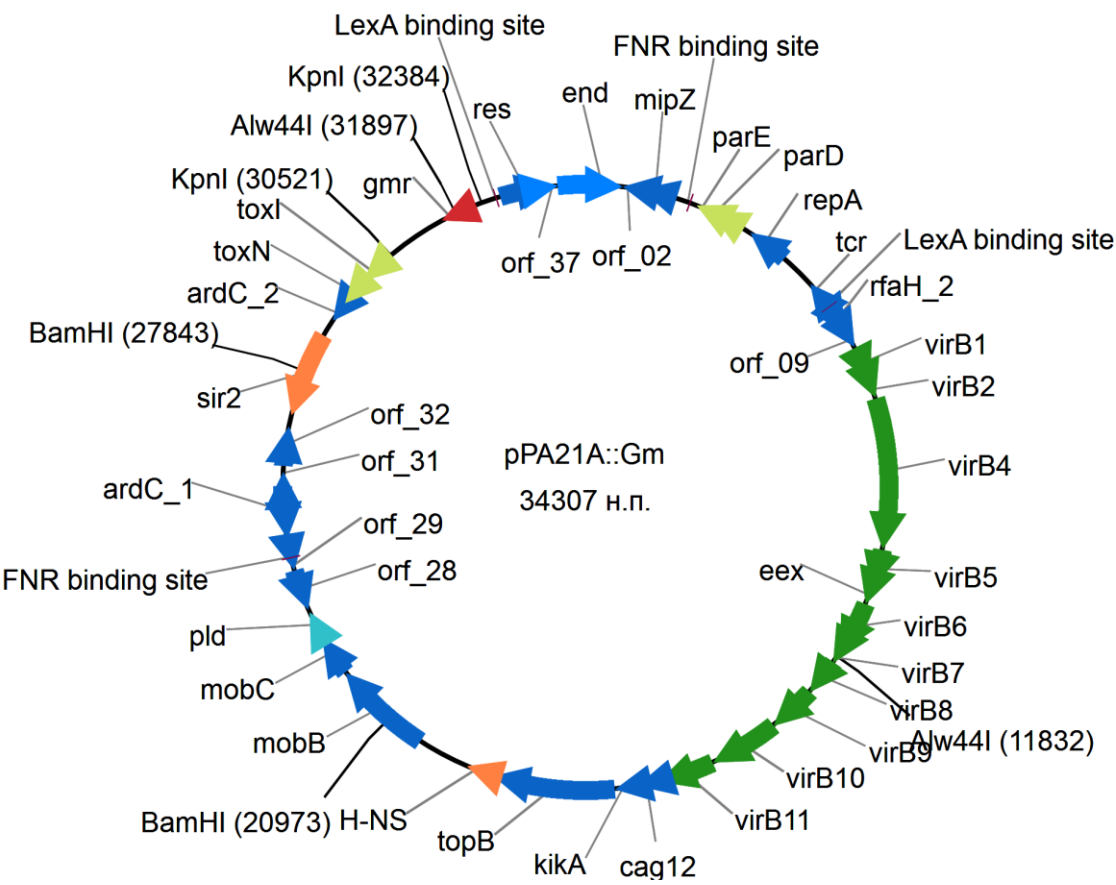


Рисунок 7. Карта рекомбинантной плазмиды pPA21A::Gm.

На электрофореграмме рестрикции плазмиды pPA21A::Gm

эндонуклеазами *Vam*HI и *Alw*44I видна дополнительная полоска размером чуть больше 3 kb, которая отсутствует при рестрикции интактной плазмиды *pRA21A* (рисунок 7). Таким образом, рекомбинантная плазмида получена и может дальше использоваться в работе.

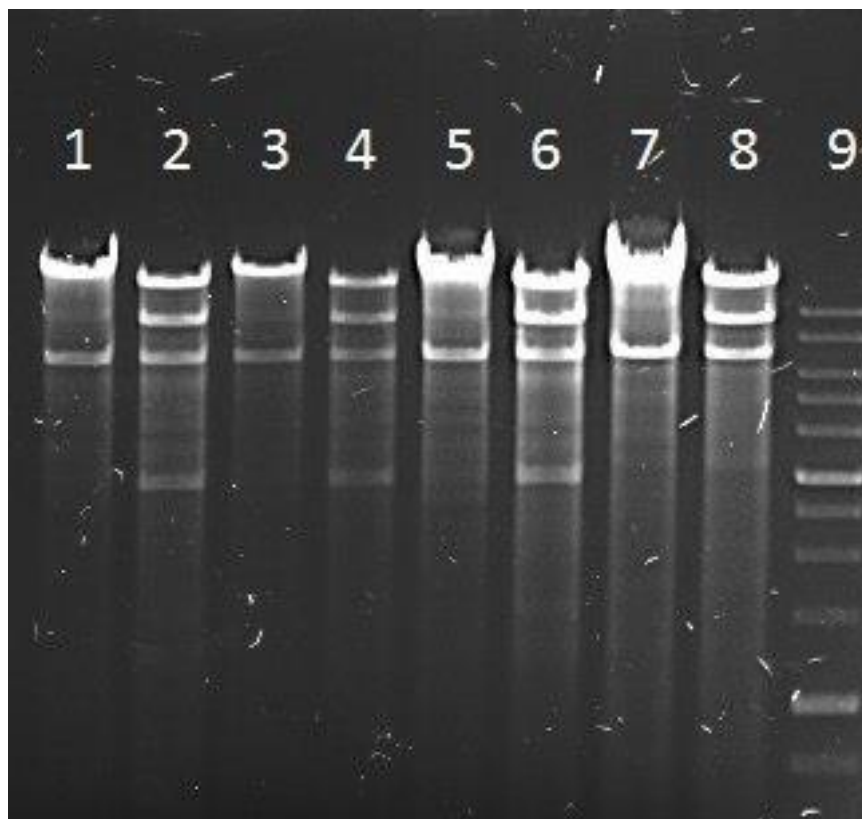


Рисунок 8. Электрофореграмма продуктов рестрикции рекомбинантной плазмиды *pRA21A::Gm* (клоны № 6, 8 и 10 — на дорожках 1-2, 3-4 и 5-6 соответственно) и интактной плазмиды *pRA21A* (дорожки 7-8) эндонуклеазами *Vam*HI (дорожки 1, 3, 5 и 7) и *Alw*44I + *Vam*HI (дорожки 2, 4, 6 и 8). Дорожка 9 - ДНК-маркер молекулярного веса (GeneRuler 1 kb DNA Ladder #SMO311/2/3).

3.3. Проверка способности плазмиды *pRA21A::Gm* к конъюгативному переносу

Для проверки способности *pRA21A::Gm* к конъюгативному переносу были проведены межродовое скрещивание между *E. coli* XL-1 Blue с плазмидой *pRA21A::Gm* и *P. atrosepticum* 36A и внутривидовое между *E. coli* XL-1 Blue с

плазмидой pPA21A::Gm и *E. coli* HB101. Частота переноса в внутривидовом скрещивании составила $2,1 \cdot 10^{-4}$ на клетку донора, частота переноса в межродовом скрещивании составила $6,5 \cdot 10^{-5}$ на клетку донора.

3.4. Проверка влияния SOS-ответа на частоту конъюгативного переноса плазмиды pPA21A.

Поскольку в ходе биоинформатического анализа плазмиды были обнаружены сайты связывания регулятора SOS-ответа LexA перед *vir*-кластером, было решено проверить, влияет ли индукция SOS-ответа на частоту конъюгативного переноса плазмиды.

Для этого плазида с помощью конъюгации была передана в *resA*⁺ штамм *E. coli* J62, в котором можно было осуществить индукцию SOS-ответа с помощью митомицина C. Необходимая концентрация индуктора была подобрана следующим образом. Сначала была определена МИК митомицина C, составившая 5 мкг/мл, после чего клетки инкубировались в присутствии серии разведений более низких концентраций митомицина C, а наличие SOS-ответа регистрировалось по формированию филаментов. Минимальной концентрацией, при которой начинали формироваться филаменты, оказалась 0,5 мкг/мл, но при 1 мкг/мл филаментирование было более выражено (рисунок 9) при полном сохранении жизнеспособности клеток, поэтому в дальнейших экспериментах использовалась концентрация 1 мкг/мл.

Частота переноса в контрольном скрещивании составила $3,7 \cdot 10^{-4}$ а при индукции SOS-ответа у донора – $2,8 \cdot 10^{-3}$ (средние частоты по двум скрещиваниям, на клетку донора), что подтверждает влияние SOS-ответа на частоту передачи.

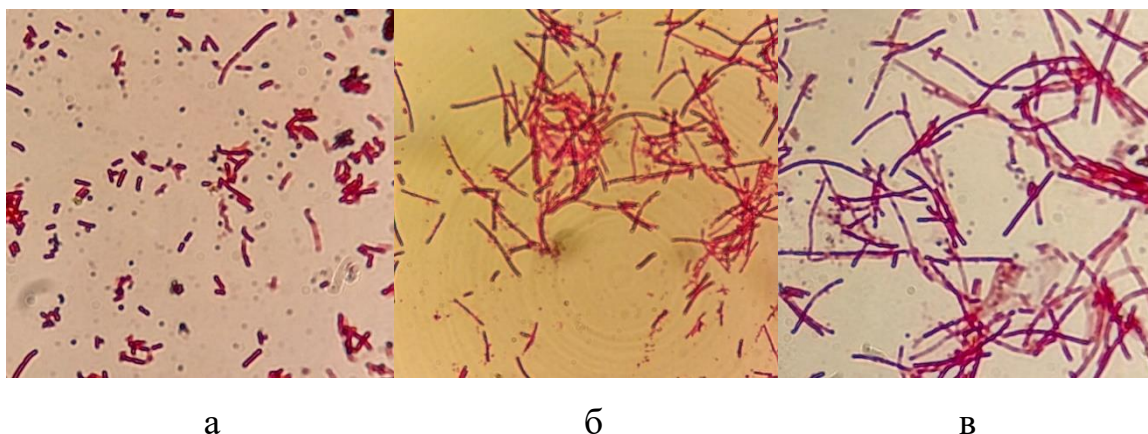


Рисунок 9. Клетки *E. coli* J62 после двух часов инкубации с интенсивной аэрацией в питательном бульоне: а) без обработки митомицином (контроль); б) с 0,5 мкг/мл митомицина; в) с 1 мкг/мл митомицина.

3.5. Проверка влияния плазмиды pPA21A на вирулентность бактерий *P. atrosepticum*.

Для проверки влияния исследуемой плазмиды на вирулентность несущих ее бактерий были использованы трансконъюганты штамма *P. atrosepticum* SCRI1043, получившие плазмиду pPA21A::Gm из клеток *E. coli* XL-1 (pPA21A::Gm).

Плотности суспензий бактерий для инокуляции в листья растений табака *Nicotiana tabacum* линии Havana petit SR1 были приведены к $OD_{600} = 6$ (суспензии с меньше плотностью не индуцировали реакцию гиперчувствительности у этих растений).

На рисунке 10 – фотография типичного фенотипического проявления реакции. Полученные результаты обобщены на рисунке 11 (число повторностей 6 для каждого из штаммов).



Рисунок 10. Результаты заражения табака *P. atrosepticum*
 1 – Бесплазмидный штамм SCRI1043; 2, 3 – Клоны SCRI1043,
 содержащие pPA21A::Gm; 4, 5 – Клоны 21A.

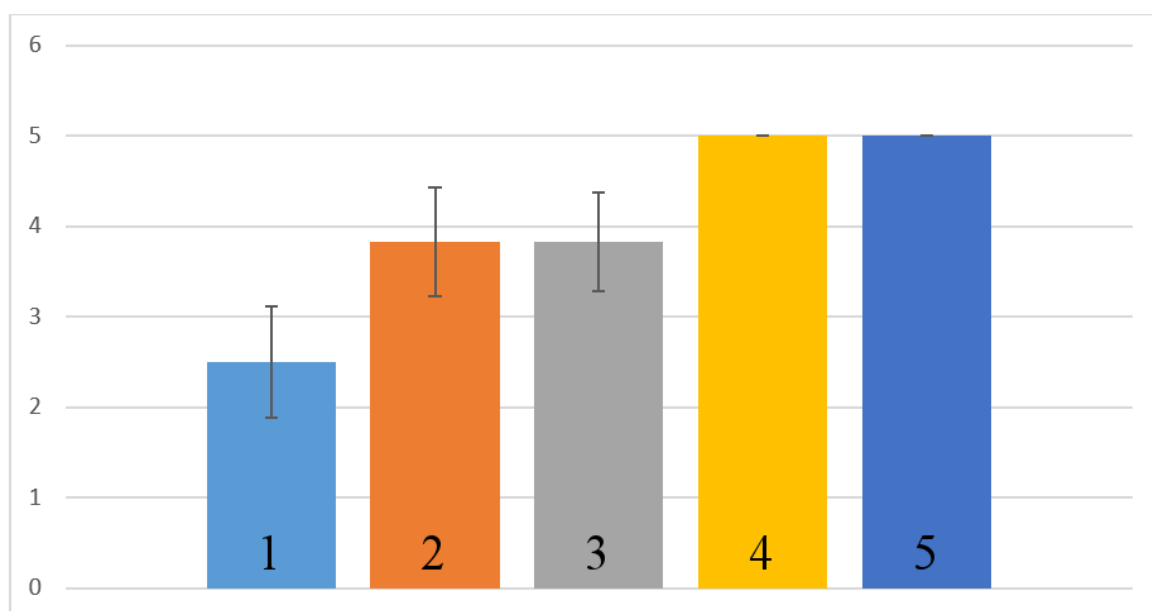


Рисунок 11. Результаты заражения табака *Nicotiana tabacum* штаммами
P. atrosepticum.

1 – Бесплазмидный штамм SCRI1043; 2, 3 – Клоны SCRI1043,
 содержащие pPA21A::Gm; 4, 5 – Клоны 21A.

Исходя из полученных результатов можно сказать, что плазмида pPA21A действительно оказывает влияние на вирулентность штамма *P. atrosepticum* 21A, так как штамм *P. atrosepticum* SCRI1043, содержащий эту плазмиду,

вызывает более выраженную реакцию гиперчувствительности, чем не содержащие плазмиду варианты.

Выводы

1) Сравнительный функциональный анализ генов плазмиды на основе сходства их предполагаемых продуктов с ранее аннотированными белковыми последовательностями показал наличие генов, которые могут влиять на вирулентные свойства пектобактерий: *vir*-кластера, *pld*, *sir2* и гена H-NS-подобного белка.

2) Клонирование фрагмента с геном резистентности к гентамицину в исследуемую плазмиду pPA21A позволяет отбирать трансформированные клетки на селективной среде, минимальная ингибирующая концентрация для трансформантов — 5 мкг/мл гентамицина, в то время как для бесплазмидных штаммов она не превышает 2 мкг/мл.

3) Плазида pPA21A::Gm способна к конъюгативному переносу с частотой от $6,5 \cdot 10^{-5}$ до $2,1 \cdot 10^{-4}$.

4) Индукция SOS-ответа увеличивает частоту конъюгативного переноса плазмиды.

5) Плазида pPA21A связана с вирулентностью несущих ее бактерий. Она усиливает фенотипическое проявление реакции гиперчувствительности у несущих ее клонов по сравнению с бесплазмидными вариантами того же штамма *P. atrosepticum*.

Список литературы

1. Smits, T.H. et al. Complete genome sequence of the fire blight pathogen *Erwinia pyrifoliae* DSM 12163T and comparative genomic insights into plant pathogenicity / T.H. Smits et al. // BMC Genomics. – 2010. – Vol. 11, № 1. – P. 2.
2. Scheiffele, P., Pansegrau, W., Lanka, E. Initiation of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA Processing: purified proteins VirD1 AND VirD2 catalyze site- and strand-specific cleavage of superhelical T-border DNA in vitro / P. Scheiffele, W. Pansegrau, E. Lanka // Journal of Biological Chemistry. – 1995. – Vol. 270, № 3. – P. 1269–1276.
3. Barker, R.F. et al. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955 / R.F. Barker et al. // Plant Molecular Biology. – 1983. – Vol. 2, № 6. – P. 335–350.
4. Vergunst, A.C. VirB/D4-Dependent Protein Translocation from *Agrobacterium* into Plant Cells / A.C. Vergunst // Science. – 2000. – Vol. 290, № 5493. – P. 979–982.
5. Wallden, K., Rivera-Calzada, A., Waksman, G. Microreview: Type IV secretion systems: versatility and diversity in function: Diversity and versatility of the type IV secretion system / K. Wallden, A. Rivera-Calzada, G. Waksman // Cellular Microbiology. – 2010. – Vol. 12, № 9. – P. 1203–1212.
6. Gordon, J.E., Christie, P.J. The *Agrobacterium* Ti Plasmids / J.E. Gordon, P.J. Christie // Microbiology Spectrum. – 2014. – Vol. 2, № 6.
7. Gelvin, S.B. *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool / S.B. Gelvin // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2003. – Vol. 67, № 1. – P. 16–37.
8. Wetzel, M.E. et al. Quorum-Dependent Mannopine-Inducible Conjugative Transfer of an *Agrobacterium* Opine-Catabolic Plasmid / M.E. Wetzel et al. //

- Journal of Bacteriology. – 2014. – Vol. 196, № 5. – P. 1031–1044.
9. Weinthal, D.M. et al. Distribution and Replication of the Pathogenicity Plasmid pPATH in Diverse Populations of the Gall-Forming Bacterium *Pantoea agglomerans* / D.M. Weinthal et al. // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – Vol. 73, № 23. – P. 7552–7561.
 10. Guo, M. et al. The Presence of Diverse IS Elements and an *avrPphD* Homologue That Acts as a Virulence Factor on the Pathogenicity Plasmid of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* / M. Guo et al. // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2002. – Vol. 15, № 7. – P. 709–716.
 11. Suzuki, K. et al. Complete nucleotide sequence of a plant tumor-inducing Ti plasmid / K. Suzuki et al. // Gene. – 2000. – Vol. 242, № 1–2. – P. 331–336.
 12. Nizan, R. et al. The Presence of *hrp* Genes on the Pathogenicity-Associated Plasmid of the Tumorigenic Bacterium *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* / R. Nizan et al. // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 1997. – Vol. 10, № 5. – P. 677–682.
 13. Bhaduri, S., Smith, J.L. Virulence Plasmid pYV-Associated Expression of Phenotypic Virulent Determinants in Pathogenic *Yersinia* Species: A Convenient Method for Monitoring the Presence of pYV under Culture Conditions and Its Application for Isolation/Detection of *Yersinia pestis* in Food / S. Bhaduri, J.L. Smith // Journal of Pathogens. – 2011. – Vol. 2011, – P. 1–9.
 14. *Yersinia enterocolitica* partial cryptic plasmid p29930 - Nucleotide - NCBI [Электронный ресурс].- 2015. - Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AJ519722>. - Дата доступа: 07.04.2015.
 15. Strauch, E. A cryptic plasmid of *Yersinia enterocolitica* encodes a conjugative transfer system related to the regions of CloDF13 Mob and IncX Pil / E. Strauch // Microbiology. – 2003. – Vol. 149, № 10. – P. 2829–2845.
 16. Nykyri, J. et al. Revised Phylogeny and Novel Horizontally Acquired Virulence Determinants of the Model Soft Rot Phytopathogen *Pectobacterium wasabiae* SCC3193 / J. Nykyri et al. // PLoS Pathogens. / ed. by Tyler B. – 2012. – Vol. 8,

- № 11. – P. E1003013.
17. Bell, K.S. et al. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors / K.S. Bell et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – Vol. 101, № 30. – P. 11105–11110.
 18. *Pectobacterium atrosepticum* CFBP 6276 plasmid pL1Pa6276, complete sequ - Nucleotide - NCBI [Электронный ресурс].- 2015. - Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/490108158>. - Дата доступа: 16.04.2015.
 19. *Pectobacterium atrosepticum* CFBP 6276 plasmid pL2Pa6276, complete sequ - Nucleotide - NCBI [Электронный ресурс].- 2015. - Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/490108157>. - Дата доступа: 16.04.2015.
 20. *Pectobacterium atrosepticum* strain SCRI1039 plasmid pECA1039, complete - Nucleotide - NCBI [Электронный ресурс].- 2015. - Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/FJ176937.1>. - Дата доступа: 10.04.2015.
 21. Сергеева, Ж.Ю., Товкач, Ф.И. Рестрикционное картирование внехромосомного элемента pCA25 *Erwinia carotovora* / Ж.Ю. Сергеева, Ф.И. Товкач // – 2009. –.
 22. Горб, Т.Е. et al. Структурная стабильность ДНК транспозонных производных плазмиды pCA25 / Т.Е. Горб et al. // *Мікробіологічний журнал*. – 2011. – № 73, № 2. – P. 53–57.
 23. Сергеева, Ж.Ю., Товкач, Ф.И. Распространение внехромосомных кольцевых ДНК у *Erwinia carotovora* / Ж.Ю. Сергеева, Ф.И. Товкач // *Доповіді Національної академії наук України*. – 2008. – № 12. – P. 149–153.
 24. Сергеева, Ж.Ю., Товкач, Ф.И. Сравнительный рестрикционный анализ ДНК мегаплазмид и бактериофагов *Erwinia cerotovora* / Ж.Ю. Сергеева, Ф.И. Товкач // – 2009. –.
 25. Quandt, J., Hynes, M.F. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria / J. Quandt, M.F. Hynes // *Gene*. – 1993. – Vol. 127, № 1. – P. 15–21.

26. Altschul, S.F. et al. Basic local alignment search tool / S.F. Altschul et al. // Journal of Molecular Biology. – 1990. – Vol. 215, № 3. – P. 403–410.
27. Bairoch, A., Apweiler, R. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000 / A. Bairoch, R. Apweiler // Nucleic Acids Research. – 2000. – Vol. 28, № 1. – P. 45–48.
28. Marchler-Bauer, A. et al. CDD: NCBI's conserved domain database / A. Marchler-Bauer et al. // Nucleic Acids Research. – 2015. – Vol. 43, № D1. – P. D222–D226.
29. Benson, D.A. et al. GenBank / D.A. Benson et al. // Nucleic Acids Research. – 2013. – Vol. 41, № D1. – P. D36–D42.
30. Darling, A.C.E. Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements / A.C.E. Darling // Genome Research. – 2004. – Vol. 14, № 7. – P. 1394–1403.
31. Nikolaichik, Y., Damienikan, A.U. Sigmoid: a user-friendly tool for improving bacterial genome annotation through analysis of transcription control signals / Y. Nikolaichik, A.U. Damienikan // PeerJ. – 2016. – Vol. 4, – P. E2056.
32. Николайчик, Е.А., Валентович, Л.Н. SQ - компьютерная программа для редактирования и анализа биологических последовательностей / Е.А. Николайчик, Л.Н. Валентович // Труды БГУ. – 2010. – Vol. 5, № 1. – P. 154–162.
33. Eichinger, V. et al. EffectiveDB—updates and novel features for a better annotation of bacterial secreted proteins and Type III, IV, VI secretion systems / V. Eichinger et al. // Nucleic Acids Research. – 2016. – Vol. 44, № D1. – P. D669–D674.
34. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation / T. Seemann // Bioinformatics. – 2014. – Vol. 30, № 14. – P. 2068–2069.
35. Takeda, T. et al. Distribution of Genes Encoding Nucleoid-Associated Protein Homologs in Plasmids / T. Takeda et al. // International Journal of Evolutionary Biology. – 2011. – Vol. 2011, – P. 1–30.

36. Doyle, M. et al. An H-NS-like Stealth Protein Aids Horizontal DNA Transmission in Bacteria / M. Doyle et al. // Science. – 2007. – Vol. 315, № 5809. – P. 251–252.
37. Yun, C.-S. et al. Pmr, a Histone-Like Protein H1 (H-NS) Family Protein Encoded by the IncP-7 Plasmid pCAR1, Is a Key Global Regulator That Alters Host Function / C.-S. Yun et al. // Journal of Bacteriology. – 2010. – Vol. 192, № 18. – P. 4720–4731.
38. Meyer, R. Functional Organization of MobB, a Small Protein Required for Efficient Conjugal Transfer of Plasmid R1162 / R. Meyer // Journal of Bacteriology. – 2011. – Vol. 193, № 15. – P. 3904–3911.
39. Zhang, S., Meyer, R. The relaxosome protein MobC promotes conjugal plasmid mobilization by extending DNA strand separation to the nick site at the origin of transfer / S. Zhang, R. Meyer // Molecular Microbiology. – 1997. – Vol. 25, № 3. – P. 509–516.
40. Wang, X. Plant phospholipases / X. Wang // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. – 2001. – Vol. 52, № 1. – P. 211–231.
41. Park, J. Phosphatidic Acid Induces Leaf Cell Death in Arabidopsis by Activating the Rho-Related Small G Protein GTPase-Mediated Pathway of Reactive Oxygen Species Generation / J. Park // Plant Physiology. – 2004. – Vol. 134, № 1. – P. 129–136.
42. Andersson, M.X. et al. Phospholipase-dependent signalling during the AvrRpm1- and AvrRpt2-induced disease resistance responses in *Arabidopsis thaliana* / M.X. Andersson et al. // The Plant Journal. – 2006. – Vol. 47, № 6. – P. 947–959.
43. Li, M., Hong, Y., Wang, X. Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants / M. Li, Y. Hong, X. Wang // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2009. – Vol. 1791, № 9. – P. 927–935.
44. Meijer, H.J.G, Munnik, T. Phospholipid-based signaling in plants / H.J.G Meijer, T. Munnik // Annual Review of Plant Biology. – 2003. – Vol. 54, № 1. – P. 265–

306.

45. Kupis, W. et al. The role of sirtuins in cellular homeostasis / W. Kupis et al. // Journal of Physiology and Biochemistry. – 2016. – Vol. 72, № 3. – P. 371–380.
46. Zhao, L. et al. Identification and characterization of histone deacetylases in tomato (*Solanum lycopersicum*) / L. Zhao et al. // Frontiers in Plant Science. – 2015. – Vol. 5,.
47. Lagacé, M. et al. Fertilization induces strong accumulation of a histone deacetylase (HD2) and of other chromatin-remodeling proteins in restricted areas of the ovules / M. Lagacé et al. // Plant Molecular Biology. – 2003. – Vol. 53, № 6. – P. 759–769.
48. Aiese Cigliano, R. et al. Genome-wide analysis of histone modifiers in tomato: gaining an insight into their developmental roles / R. Aiese Cigliano et al. // BMC Genomics. – 2013. – Vol. 14, № 1. – P. 57.
49. Bourque, S. et al. Type-2 histone deacetylases as new regulators of elicitor-induced cell death in plants / S. Bourque et al. // New Phytologist. – 2011. – Vol. 192, № 1. – P. 127–139.