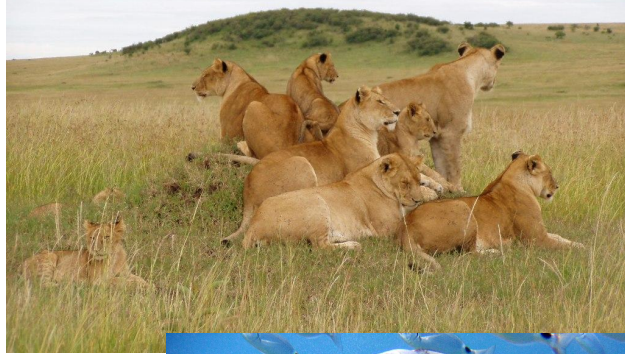


Биохимические механизмы  
регуляции численности.  
Quorum sensing и не только...

Лекция 3

Для благополучия вида нужна

**оптимальная** плотность особей и их **согласованное** поведение



- *У КАЖДОЙ СИСТЕМАТИЧЕСКОЙ ГРУППЫ ОРГАНИЗМОВ – СВОИ ХИМИЧЕСКИЕ СИГНАЛЫ регуляции плотности популяции. Иногда их может быть несколько разных, иногда это единственное соединение.*

# Определения

**Кворум сенсинг**, чувство или ощущение кворума – “наполненности” особями (термин предложен в 1994г) - восприятие бактериями изменений среды, которые наступают при достижении бактериальной культурой некоторой пороговой численности, и реакция на эти изменения. Цель «кворум-сенсинга» - стимулирование определённого группового поведения **только в том случае, когда достигается необходимая плотность особей в популяции**. В зависимости от плотности, бактерии экспрессируют разные фенотипы.

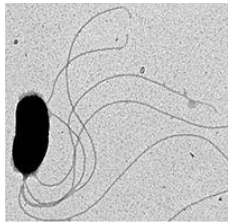
Википедия: “способность некоторых бактерий (возможно, и других микроорганизмов) общаться и координировать своё поведение за счёт секреции молекулярных сигналов”.

Кворум сенсинг (QS) в современном понимании все чаще охватывает как бактерий, так и другие организмы. Термин применяется даже для культур клеток.

# ПРИМЕРЫ QS: количество – в новое качество

- **Пример 1:** *Vibrio fischeri* (*Aliivibrio fischeri*) – морская фотосинтезирующая бактерия.

Только достаточное количество бактерий (около  $10^{11}$  клеток/мл) могут создать светящуюся приманку – светящийся орган кальмара. В меньшем количестве светиться – бессмысленный расход АТФ и жирных кислот.



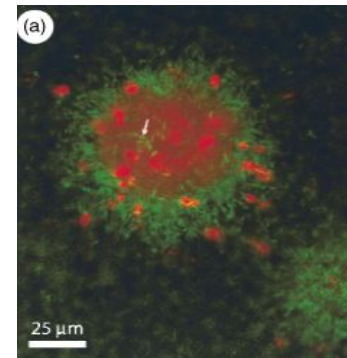
Гавайский кальмар бобтейл



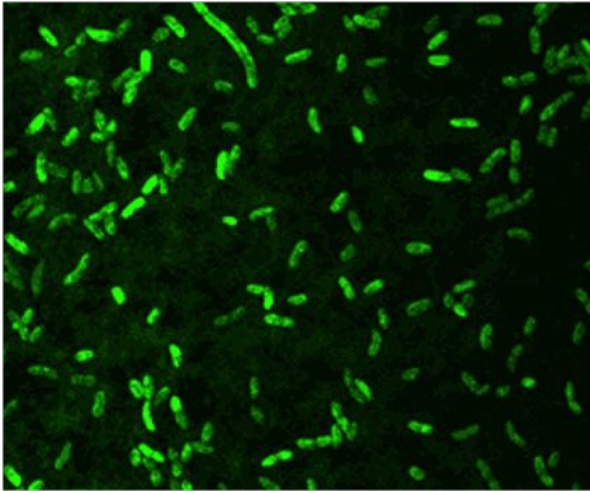
- **Пример 2:** многие бактерии-фитопатогены (*Erwinia carotovora*, *E. chrysanthemii* и др.) Сигнал QS означает: “нас достаточно много, выделяй ферменты, атакующие растение”! Пока мало, следует “прятаться”, чтобы растение не обнаружило и не подготовилось.

**Пример 3:** патоген человека *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка).

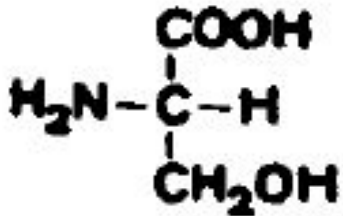
Синтезирует необходимые для вирулентности факторы – токсин А, экзоферменты (эластазы *LasA* и *LasB*, щелочную протеазу), гемолизины и поверхностно-активный рамнолипид. **Формирование биопленок** (см. рис. справа) обеспечивает **дополнительную защиту против хозяина**.



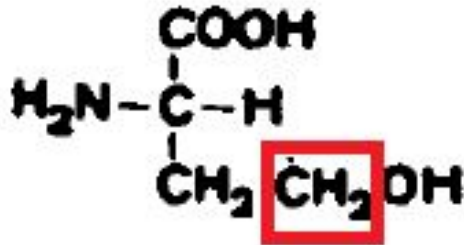
# QS гр”-” бактерий



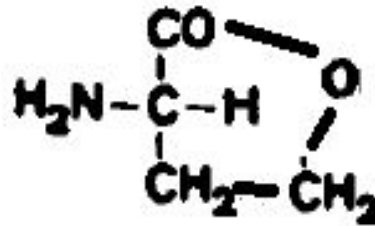
- *V. fischeri* – симбиотическая гр”-” бактерия, колонизирующая световые органы некоторых костных рыб и моллюсков.
- Её молекула QS – N-3-(оксогексаноил)-L-гомосеринлактон – один из видов **ацилгомосеринлактонов (AHL)**



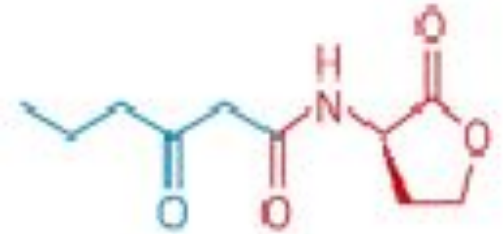
Серин



Гомосерин

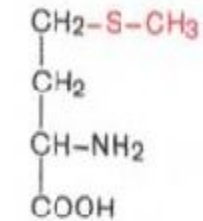


Образование цикла лактона гомосерина

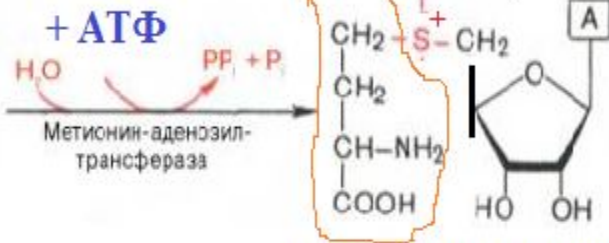


# Синтез и расщепление AHL

идет на построение AHL



Метионин



S-аденозилметионин

5'-метилтио-аденозин

ЦИК

Ацетил-КоА

Еноил-АПБ

Ацил-АПБ

AHL-синтаза  
(LuxI-белок)

CH<sub>3</sub>

|

S-CH<sub>2</sub>

|

CH<sub>2</sub>

|

HO

OH

A

|

O

/ \

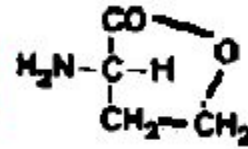
C C

| |

HO OH

+ AHL

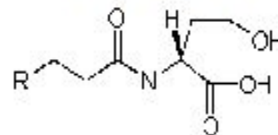
+H<sub>2</sub>O



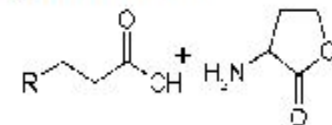
ацилаза

лактоназа,  
параоксоназа

Гидролиз  
кольца в AHL



Гидролиз амидной  
связи и образование  
лактона и соответст-  
вующих ЖК



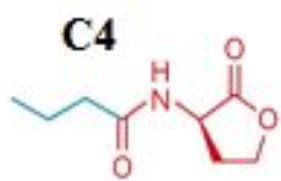
СИНТЕЗ

РАСПАД

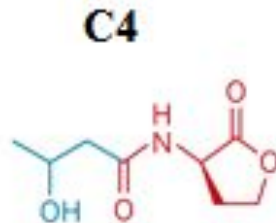
# У разных бактерий в AHL – разные боковые цепи

AHL в большинстве случаев несут в боковой цепи четное (от 4 до 14) количество атомов С.

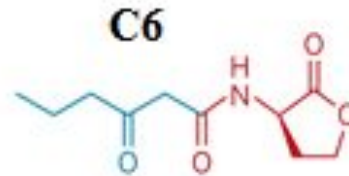
Базовая часть AHL относительно гидрофильна, боковая цепь – гидрофобна. С ростом длины цепи гидрофобность растет (проблема транспорта через мембрану).



**Pseudomonas  
aeruginosa**



**Vibrio  
harveyi**



**Vibrio fischeri**

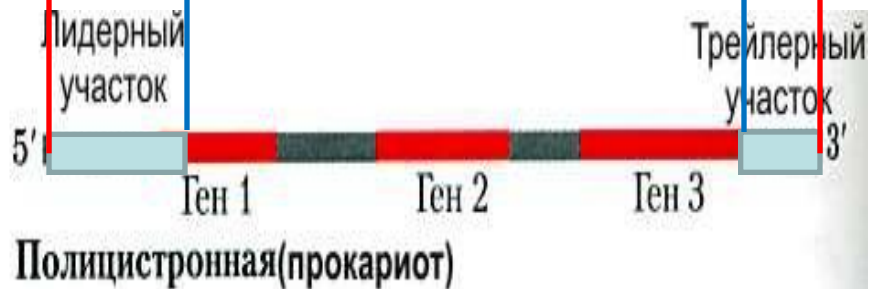
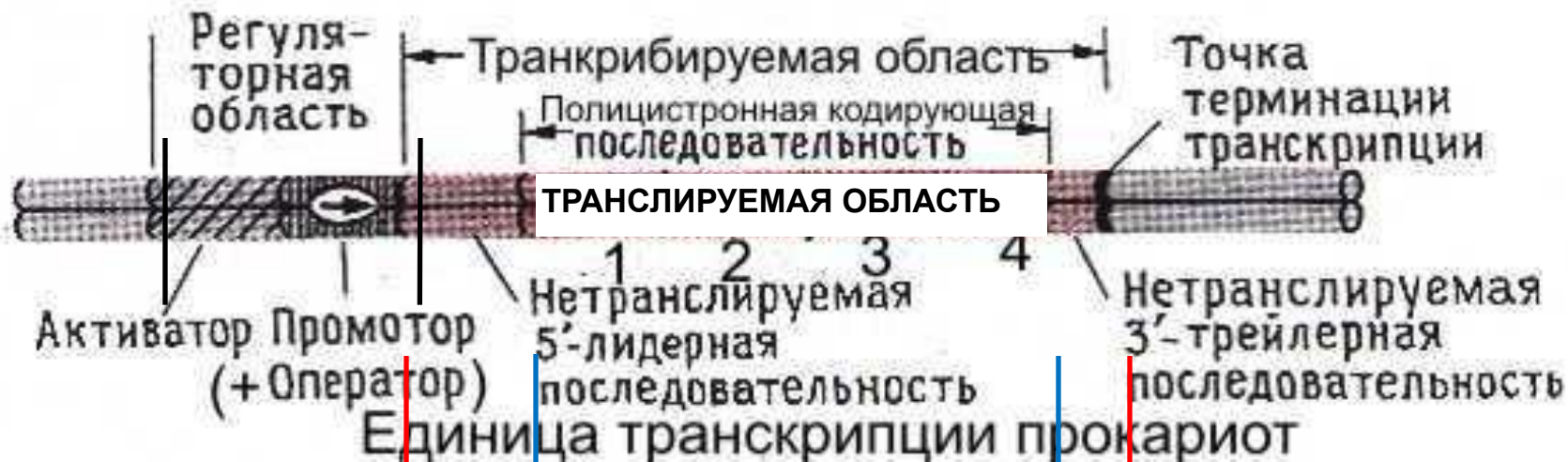


# Свойства гр<sup>-</sup>- бактерий, контролируемые через AHL

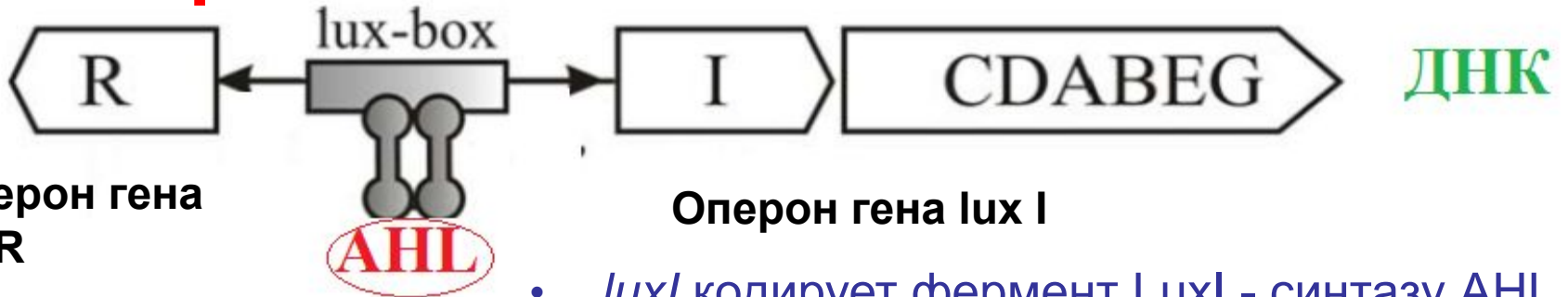
(по Boşgelmez-Tinaz G. Quorum sensing in gram-negative bacteria / G. Boşgelmez-Tinaz // Turk. J. Biol. 2003. V. 27. P. 85 – 93). ГЛ =

ГОМОСЕРИНПАКТОН

Микроорганизм	Тип ацилгомосерин-лактона	Регулируемая функция
<i>Vibrio fischeri</i>	N-3- ОКСОГЕКСАНОИЛ-ГЛ 	Биолюминесценция
<i>Erwinia carotovora</i>	Оксогексаноил-ГЛ	Синтез факторов патогенности: протеаз, пектиназ, целлюлаз. Продукция карбопенема
<i>Erwinia stewartii</i>	Оксогексаноил-ГЛ	Синтез экзополисахарида
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	ОКСООКТАНОИЛ-ГК	Передача плазмид при конъюгации
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	ГИДРОКСИТЕТРАДЕКАНОИЛ-ГК	Экспрессия генов, контролирующих способность заселять ткани корней бобовых растений
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	N-БУТИРИЛ -ГЛ 	Синтез факторов патогенности: рамнолипидов, гемолизина и др.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Гексаноил-ГЛ + оксогексаноил-ГЛ	Неизвестна



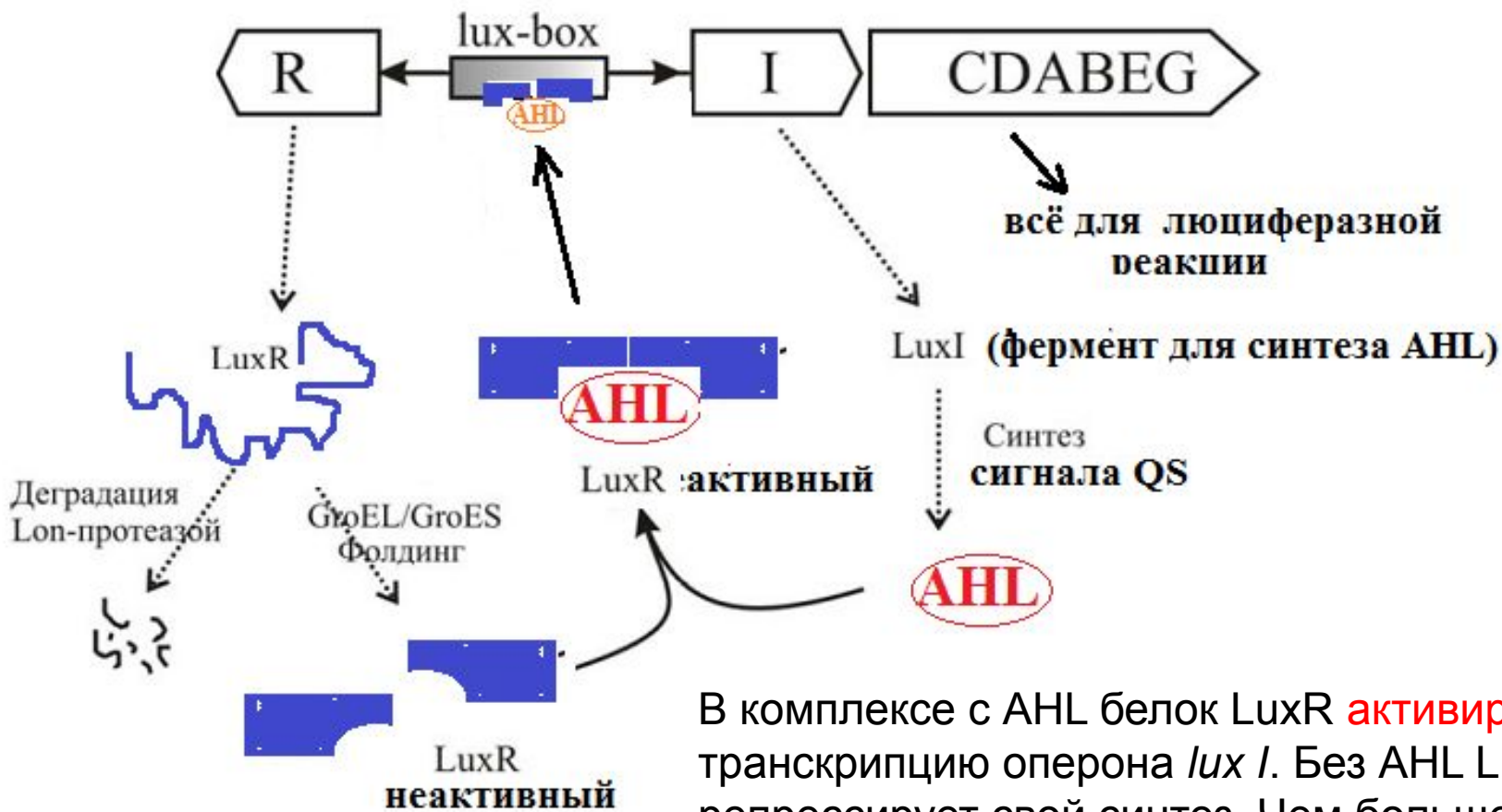
# QS-опероны *V. fischeri*: *lux ICDABEG* и *luxR*



— *luxR* кодирует белок LuxR (250 акт), транскрипционный фактор, влияющий на связывание РНК-полимеразы с ДНК.

- *luxI* кодирует фермент LuxI - синтазу AHL
- *luxA* и *luxB* кодируют субъединицы люциферазы (фермента, обеспечивающего свечение).
- *lux C, D, E* кодируют ферментативный комплекс редуктазы жирных кислот (ЖК - один из окисляемых субстратов в ходе люциферазной реакции, приводящей к испусканию кванта света)
- *lux G* кодирует редуктазу ФМН (другого субстрата, окисляемого в люциферазной реакции).

## Схема регуляции *lux*-оперона *V. fischeri*



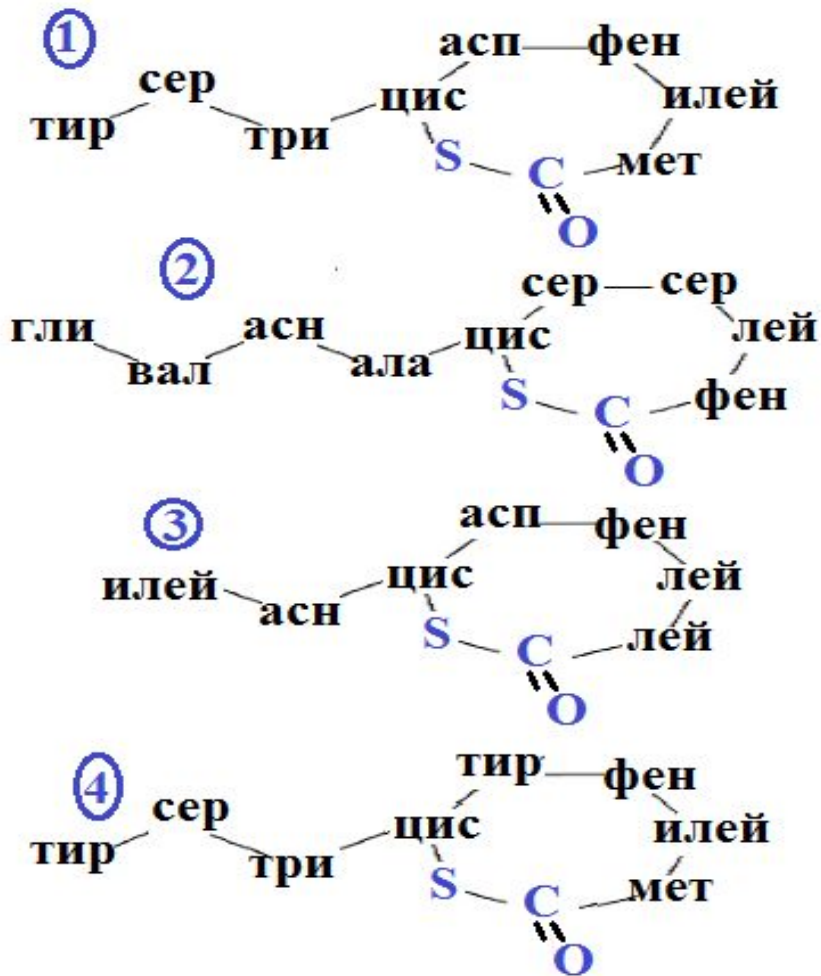
В комплексе с AHL белок LuxR **активирует** транскрипцию оперона *lux I*. Без AHL LuxR репрессирует свой синтез. Чем больше бактерий, тем больше AHL в среде и чаще его связывание с LuxR.

## Имитация AHL – средство защиты

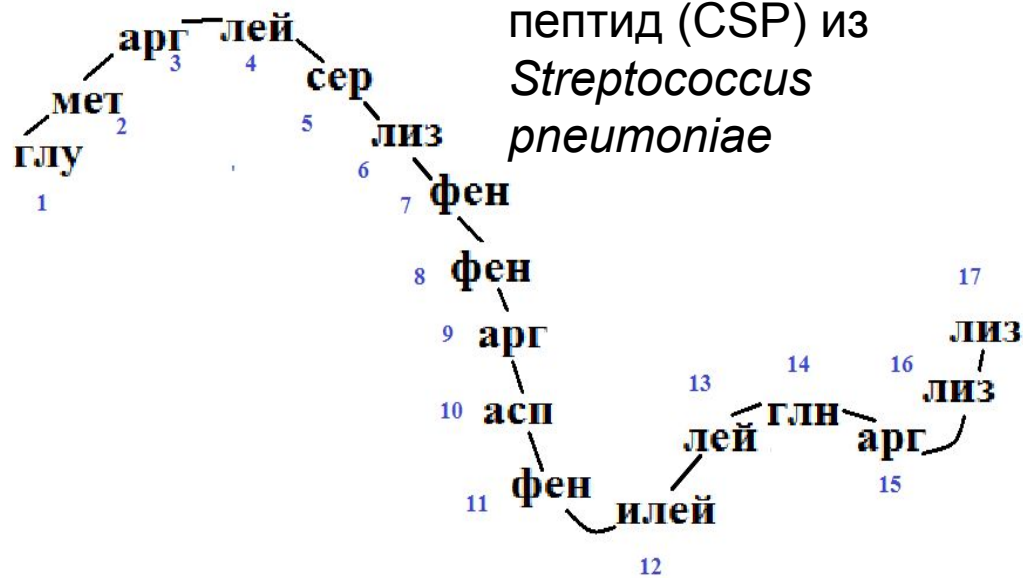
- галогенированные фураноны – близкие аналоги AHL, образуемые красной водорослью р. *Delysea*, представляют собой эффективные антимикробные агенты

# Гр”+”-бактерии: пептидные QS (АИП)

Пептиды-автоиндукторы (**АИП**) по химизму - это модифицированные олигопептиды, обычно состоящие из небольшого числа аминокислот в цепи, в кольце или в цепи + в кольце (Lazazzera, Grossman, 1998).



Пептиды-автоиндукторы разных групп *S. aureus*. Вариации – как в кольце, так и в боковой цепи.



Стимулирующий компетентность пептид (CSP) из *Streptococcus pneumoniae*

# Проблема: АИП не могут свободно перемещаться через мембрану клетки

- Решение: специальные системы транспорта + трансдукция сигнала в клетку без попадания в нее АИП из внешней среды.
- **Пример: *Staphylococcus aureus***

**Экспорт** пептида из клетки – с помощью белка AgrB.

1) с гена AgrD синтезируется AgrD – “заготовка” для АИП (46 ак-т, у других видов 40-65 ак-т).

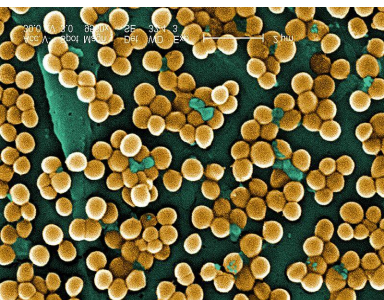
2) AgrD поступает к AgrB, с помощью которого выходит во внешнюю среду.

В процессе экспорта AgrD “дозревает”: остается лишь 8 ак-т, у других 5-34 ак-ты.

События процессинга AgrD – удаление фрагментов на N- и C-конце, ковалентная связь между C-концом и цистеином.

**Трансдукция сигнала:** рецептор с ферментативной активностью гистидиновая протеинкиназа AgrC в мембране клетки активирует фосфорилированием внутриклеточный белок.

На основании различий в АИП и его рецепторе штаммы *S. aureus* делят на группы. Олигопептиды, синтезируемые одной из групп, индуцируют патогенность в этой группе и специфически подавляют системы Agr-вирулентности в других группах.



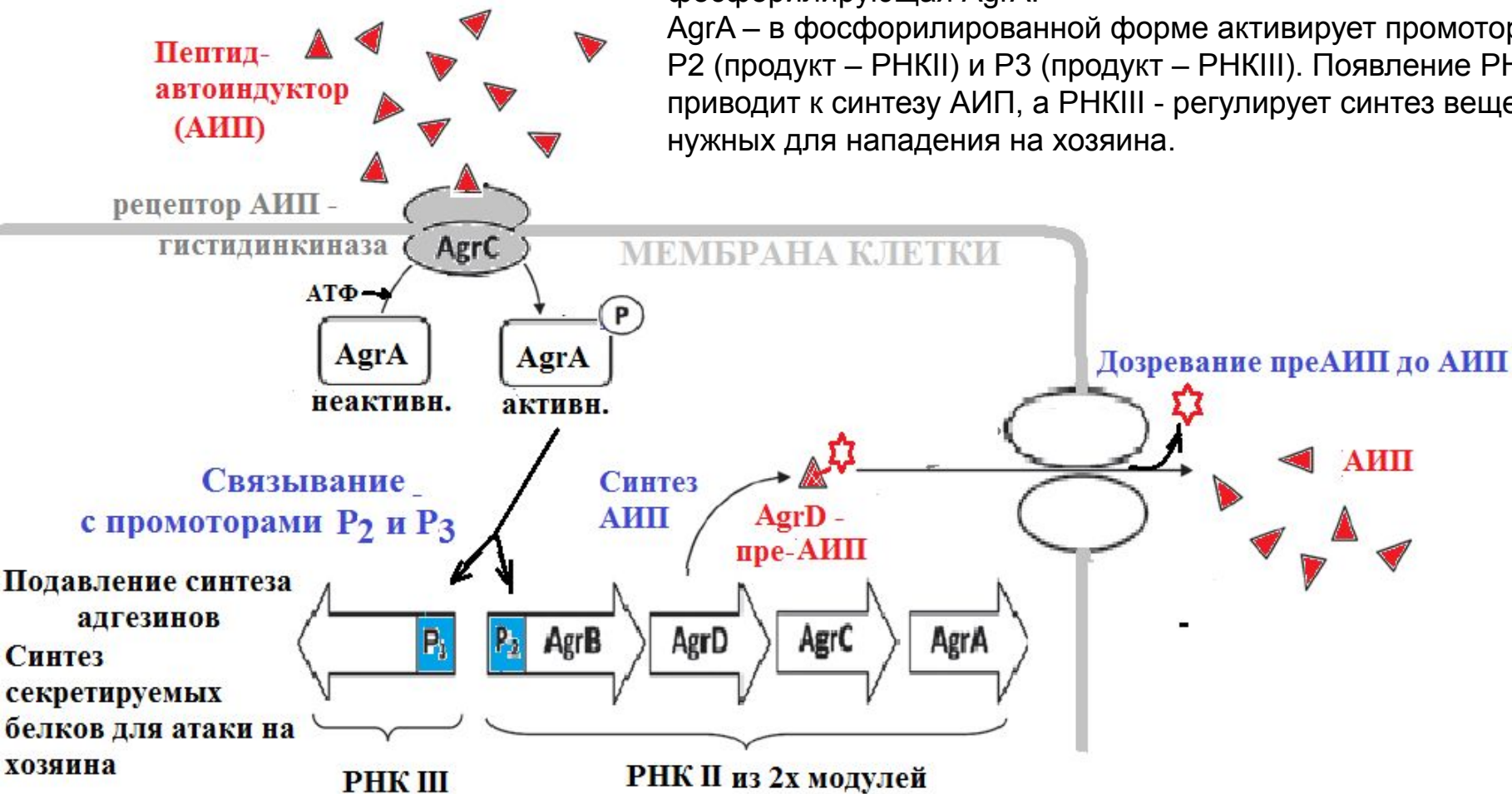
## Механизм действия системы QS у *S. aureus*

Зона РНКII кодирует: 1) сигнальный модуль QS (AgrC, AgrA)  
2) белки для секреции пептида QS (AgrB, AgrD)

Зона РНКIII кодирует продукты для синтеза экзобелков и проявления вирулентности.

AgrC – рецептор пептида QS (AIP), сенсорная киназа, фосфорилирующая AgrA.

AgrA – в фосфорилированной форме активирует промоторы P2 (продукт – РНКII) и P3 (продукт – РНКIII). Появление РНКII приводит к синтезу АИП, а РНКIII – регулирует синтез веществ, нужных для нападения на хозяина.







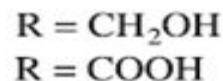
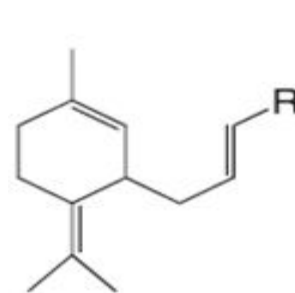
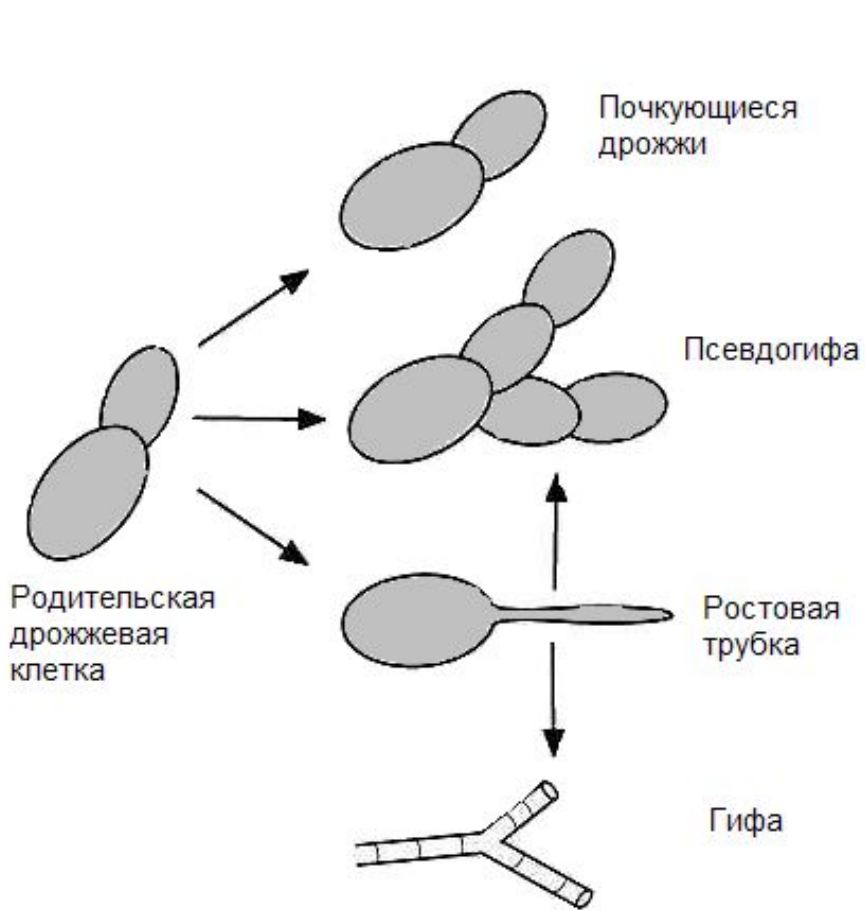
Quorum Sensing.mp4

- Кинофрагмент

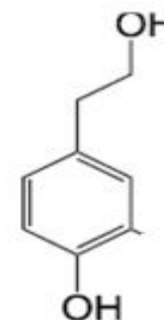
# QS-молекулы у грибов - обычно спирты (по Белозерской)

СИГНАЛ QS	Объект	Ответ
Ациклический сесквитерпеновый спирт фарнезол. Сенсоры не известны	<i>Candida albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. parapsilosis</i> и еще около 50 видов грибов	Дрожж форма Ингибирование перехода дрожжи-мицелий Ингибирование формирования биопленок, влияние на рост
Фарнезол	<i>S. cerevisiae</i>	АФК-ингибирование дыхания и ингибирование роста
Фарнезол	<i>Aspergillus nidulans</i> <i>Fusarium graminearum</i>	Влияние на рост, АФК-Апоптоз
Фарнезол	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Ингибирование сигнальных путей (CWI и PkcA), регуляция цитоскелета
Тирозол Сенсоры не известны	<i>Candida albicans</i> Мицелиальная форма	Ингибирование : 1) прорастания в жк, 2) ранних стадий формирования биопленок; 3) лаг фазы при разбавлении культуры Стимуляция формирования ростовых трубок и их удлинения
Фенилэтанол, триптофол	<i>Candida albicans</i> <i>S. cerevisiae</i>	Псевдогифальный рост диплоидов > 20 мкм

# Диморфные грибы: спирты как переключатели



Фарнезол и фарнезоловая кислота

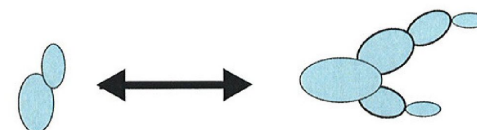


Тирозол

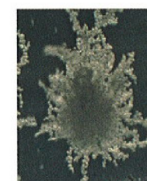
*S. cerevisiae*, *C. albicans*



yeast form



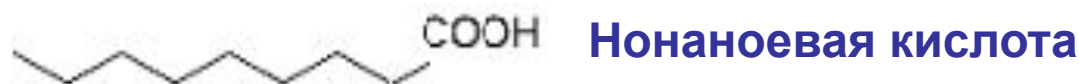
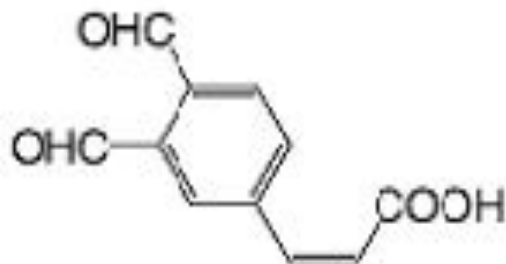
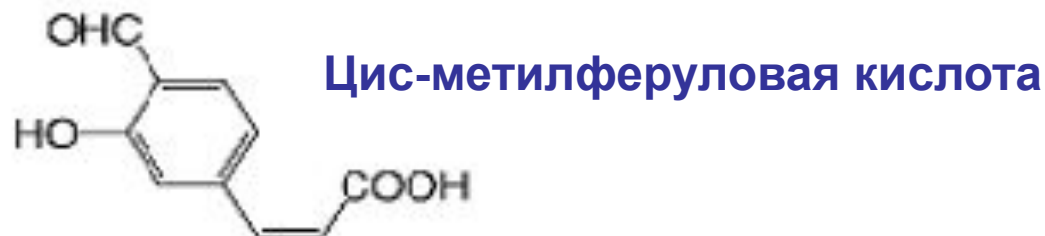
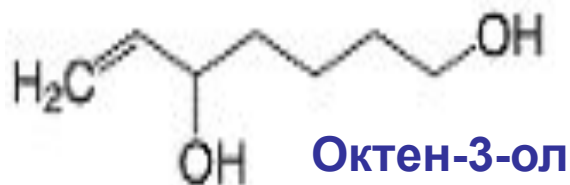
filamentous form



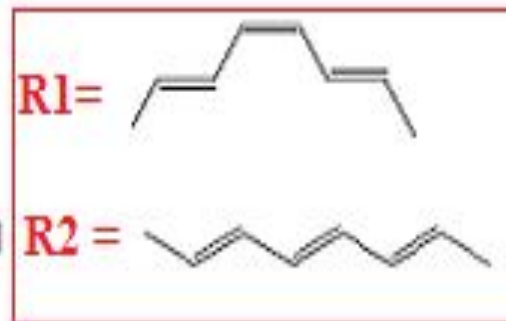
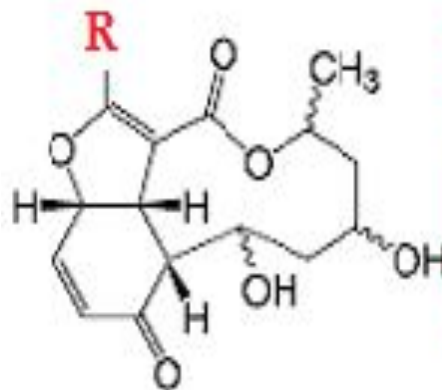
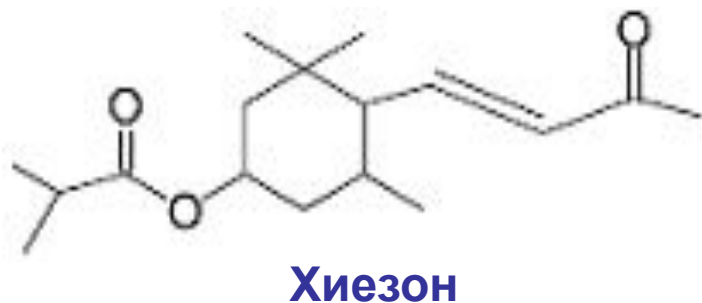
R. Prusty Rao . адаптировано по  
Gimeno *et. al.* *Cell* (1992) 68:1077-90

# Спирты, но не только...

Авторегуляторные сигналы, ингибирующие прорастание спор



**Цис-метил-3,4-диметокси-циннамовая кислота**

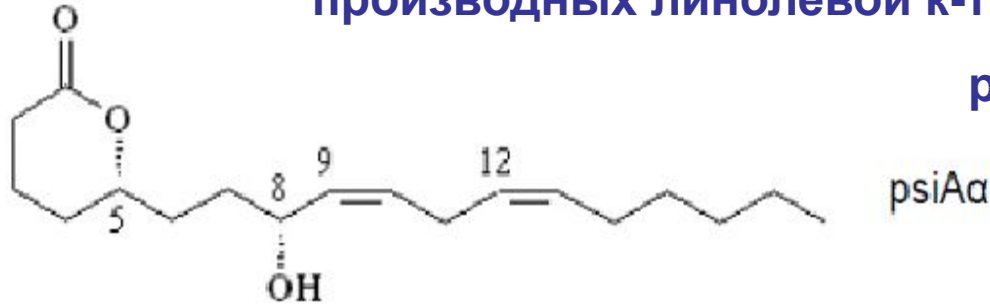


**Коллетофрагароны А и В (имеют R1 или R2 соответственно)**

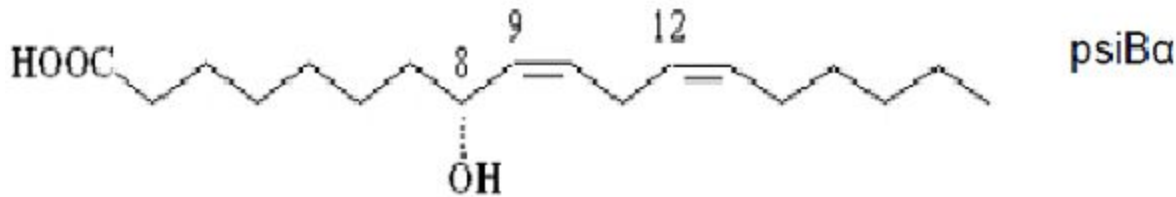
# Оксилипины участвуют в кворум сенсинге?

Строение оксилипинов  $\psi$ -факторов - гидроксиглицированных производных линолевой к-ты ( $\alpha$ ) из *Aspergillus spp.*

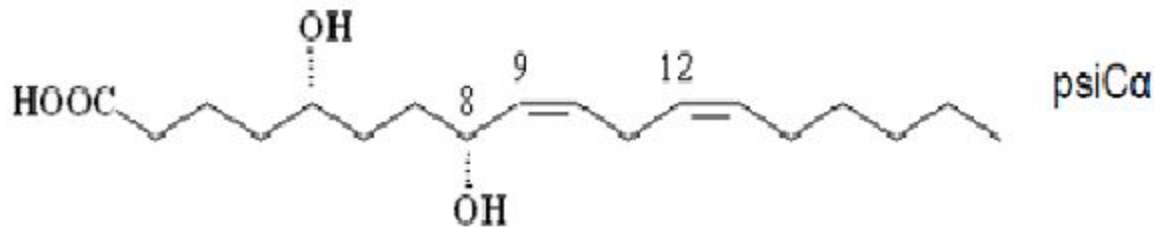
$\psi$ - от: **precocious sexual inducers**



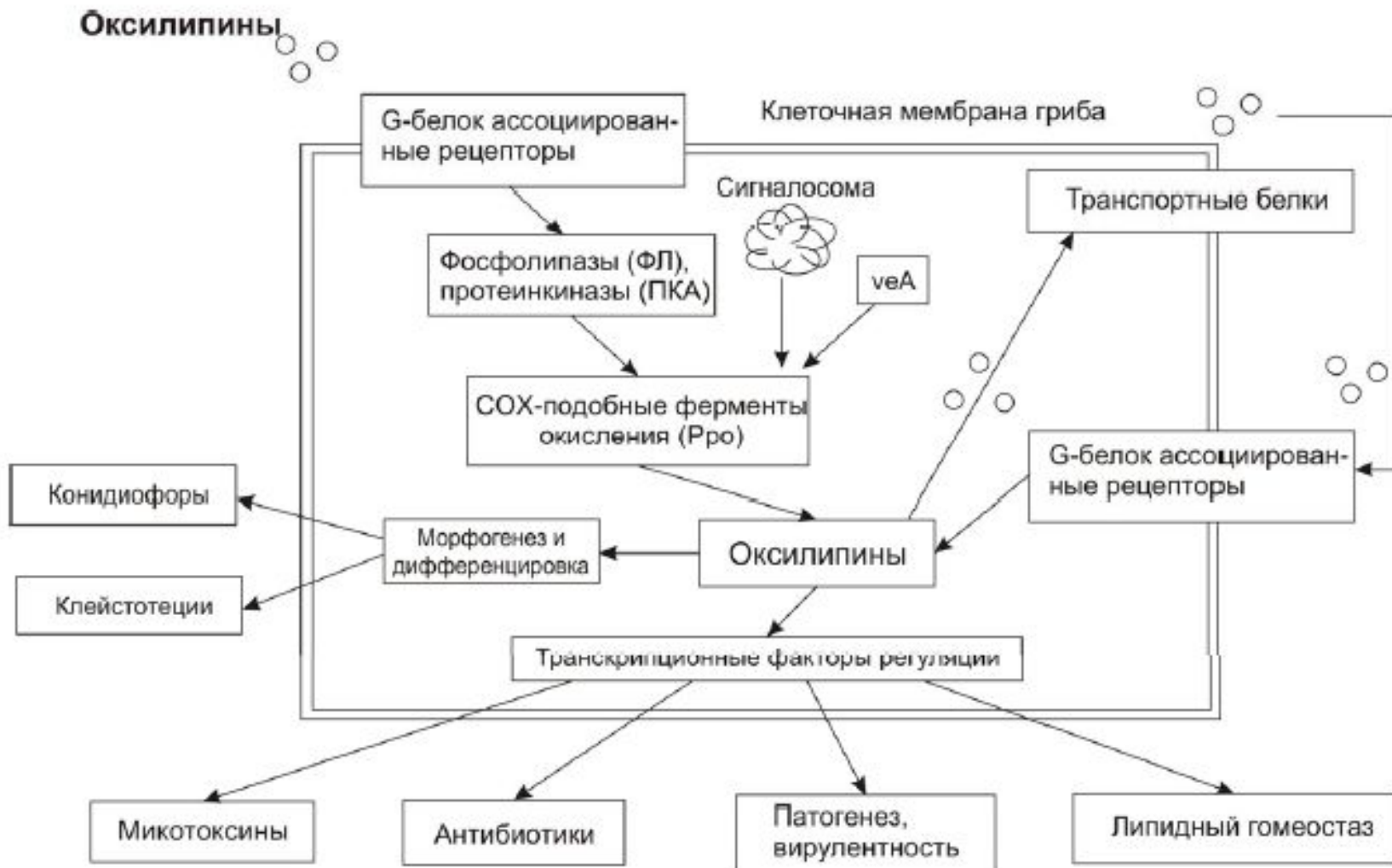
- стимулятор образования спор  
бесполого размножения



- стимуляторы полового процесса



# Предполагаемая роль оксипинов у грибов

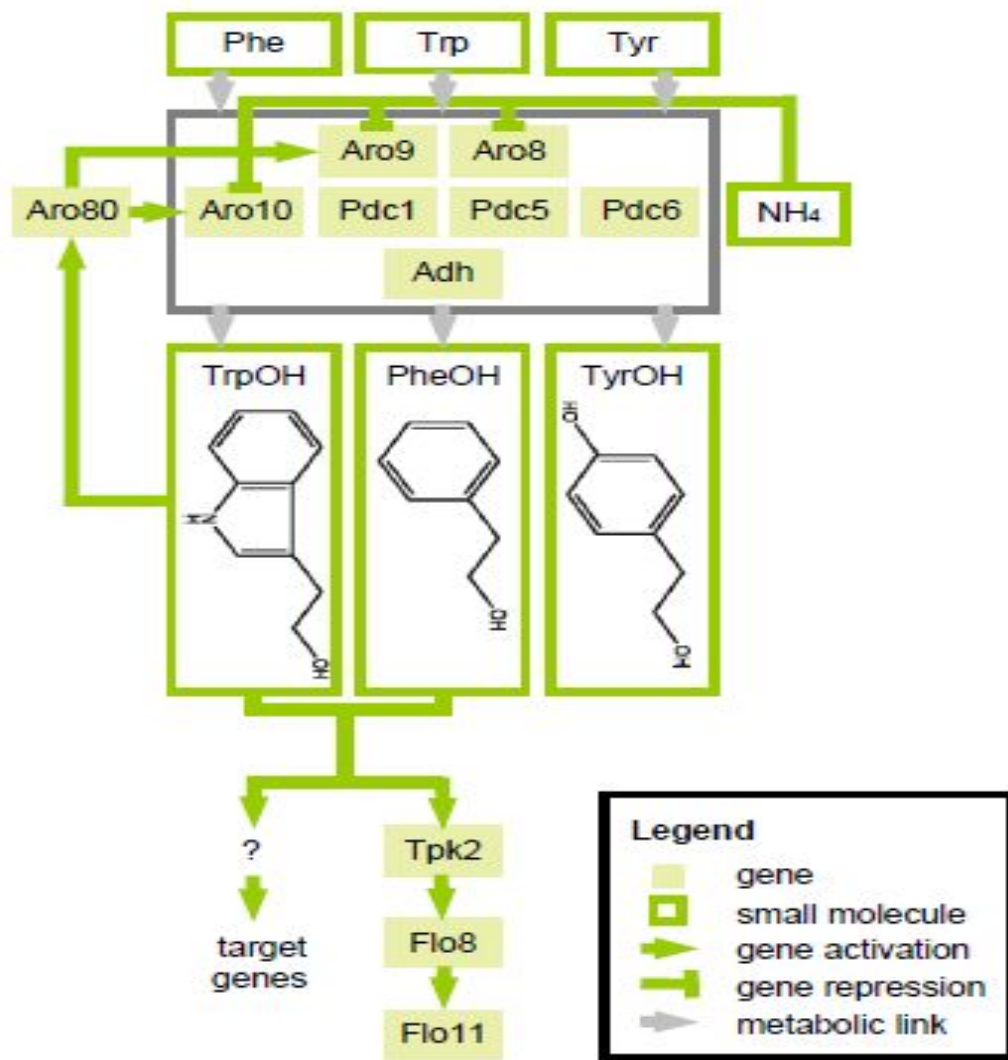


# Синтез QS-спиртов

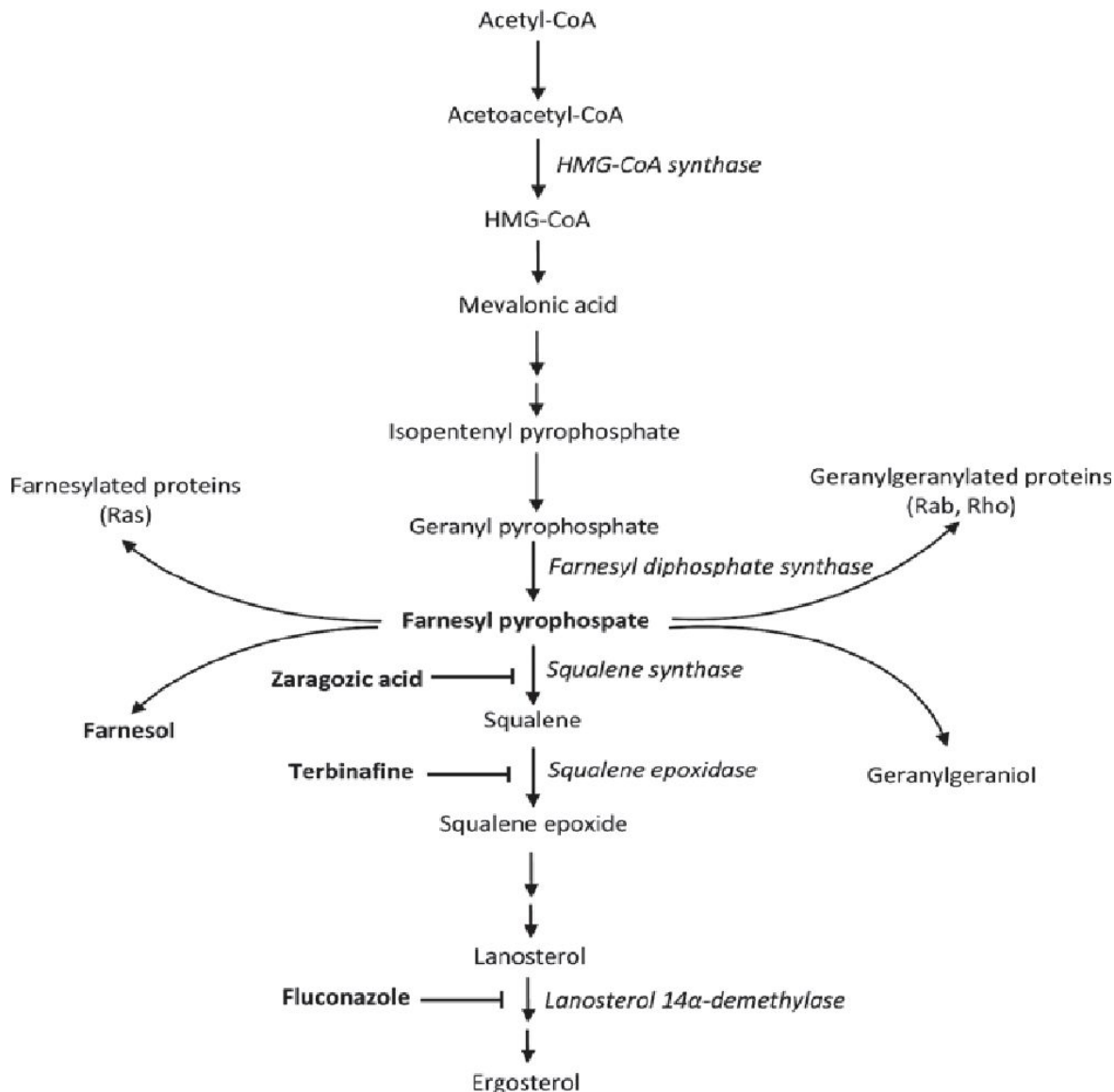
Известно много генов и белков системы QS дрожжей, основанной на разных ароматических спиртах.

**Ароматические аминотрансферазы** (Aro8, Aro9 и Aro10) синтезируют триптофол (TrpOH) из триптофана, **пируватдекарбоксилазы** (Pdc1, Pdc5, Pdc6) – тирозол (TyrOH) из тирозина, **алкогольдегидрогеназы** (Adh) - фенилэтанол (PheOH) из фенилаланина. **Транскрипционный фактор** Aro80 регулирует синтез аминотрансфераз Aro9 и Aro10, а активность этого фактора регулирует сам триптофан.

TrpOH и PheOH изменяют уровень экспрессии примерно 200 других целевых генов, но пути, каким способом они это делают, изучены мало.



# Синтез QS-спиртов (продолжение): **фарнезол** синтезируется по пути синтеза эргостерола (дополнит мат-л)



Фунгицидные вещества, ингибирующие синтез эргостерола, действуют **после** стадии образования фарнезола, тем самым приводя к усилению его накопления.



# Социобиология дрожжей?

- D. M. WLOCH-SALAMON Sociobiology of the budding yeast //J. Biosci. 38(4), November 2013, 1–12, Indian Academy of Sciences - <http://www.ias.ac.in/jbiosci>
- P. ALBUQUERQUE, A. CASADEVALL Quorum sensing in fungi – a review // Medical Mycology. 2012, 50, P. 337–345

# QS-системы высших эукариот

- Растения - ???????

Коопероны – самосохраняющиеся кооперативные (имеющие целостность) системы – устойчивые структурно-функциональные комплексы, выступающие как единое целое в некотором диапазоне внешних условий

- Животные – много систем регуляции.

Прямая простая регуляция: Мучной хрущак – этилквинон (этилхинон) (ингибирование роста и развития личинок, каннибализм).

# Химический сигнал - ...- поведение – регуляция плотности особей

- Пример: мышевидные грызуны (по: Шилова С.А, Шилов И.А., 1997)



# Литература

- Смольская С.В., Песнякевич А.Г. МЕХАНИЗМЫ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ У ПРОКАРИОТ – в интернете
- Хохлов, А. С. НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИКРОБНЫЕ АУТОРЕГУЛЯТОРЫ. Москва : Наука, 1988. 269 с.
- Weber W, Fussenegger M. Design of synthetic mammalian quorum-sensing systems // *Methods Mol Biol.*, 2011; V. 692. P. 235-249.
- Про сельдь - Nicholas C. Makris, Purnima Ratilal, Srinivasan Jagannathan, Zheng Gong, Mark Andrews, Ioannis Bertatos, Olav Rune Godø, Redwood W. Nero, J. Michael Jech. Critical Population Density Triggers Rapid Formation of Vast Oceanic Fish Shoals // *Science*. 2009. V. 323. P. 1734–1737.
- Tao Long, Kimberly C. Tu, Yufang Wang, Pankaj Mehta, N. P. Ong, Bonnie L. Bassler, Ned S. Wingreen. Quantifying the Integration of Quorum-Sensing Signals with Single-Cell Resolution // *PLoS Biology*. 2009. V. 7(3). P. e1000068.

# Приложение