

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ ПО ОСВОЕНИЮ
ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.ДВ.02.02 АУТОРЕГУЛЯТОРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Направление подготовки (специальность) 06.04.01 Биология

Профиль образовательной программы Микробиология

Форма обучения очно-заочная

СОДЕРЖАНИЕ

1.	Тематическое содержание дисциплины.....	3
2.	Методические рекомендации по выполнению курсовой работы (проекта)...	8
3.	Методические рекомендации по выполнению индивидуальных домашних заданий (контрольных работ)	8

1. Тематическое содержание дисциплины

1.1. Тема 1: «Бактериальные ауторегуляторы – как факторы формирования межклеточных коммуникаций микроорганизмов» .

1.1.1. Перечень и краткое содержание рассматриваемых вопросов:

1. Бактерии как мультиклеточные организмы. Ауторегуляторы, как язык, на котором микроорганизмы «разговаривают друг с другом».

Аутоиндукторы QS микроорганизмов:

а) ацилированные лактоны гомосерина, регулирующие широкий круг плотностно-зависимых коллективных процессов у грамотрицательных бактерий (*Vibrio fischeri; Vibrio harveyi, Pseudomonas aeruginosa* и др.);

б) пептиды, регулирующие конъюгативный плазмидный перенос у *Enterococcus*, развитие воздушного мицелия у *Streptomyces*, споруляцию у *Bacillus* и др;

с) аминокислоты и сходные с ними е) аминные соединения (2-гептил-3-гидрокси-4-хинолон – PQS), регулирующие агрегацию бактериальных клеток (*E. coli, Salmonella typhimurium, Myxococcus xanthus*) и формирование швермеров у *Proteus*.

Механизмы синтеза ауторегуляторов.

2. Эффект системы Quorum sensing и механизм его реализации

Кворумные регуляторные системы основаны на действии двух основных компонентов: низкомолекулярной диффузионной сигнальной молекулы, концентрация которой увеличивается в соответствии с ростом популяции, и белкового фактора транскрипции, который при взаимодействии с сигнальной молекулой активирует транскрипцию соответствующих генов

Механизмы реакций чувства кворума различаются у грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Общую схему коммуникаций грамположительных бактерий можно представить следующим образом: сначала в клетке синтезируется предшественник, который, модифицируясь, превращается в зрелый олигопептид. Последний экскретируется наружу клетки экспортёром. Молекулы олигопептида накапливаются в межклеточном пространстве по мере того, как растёт плотность бактериальных клеток. Двухкомпонентная сенсорная киназа, пронизывающая мембрану, распознает сигнал и осуществляет его передачу в клетку в процессе каскадного фосфорилирования. В клетке олигопептидная молекула взаимодействует с целевым геном (генами).

3. Особенности явления «quorum sensing» у отдельных таксономических групп бактерий. Двухкомпонентные сигнальные системы. 2 часа.

Quorum Sensing (QS) – это особый тип регуляции экспрессии генов бактерий, зависящей от плотности их популяции. QS системы включают низкомолекулярные сигнальные молекулы, названные аутоиндукторами, легко диффундирующие через клеточную стенку, и регуляторные белки, с которыми связываются аутоиндукторы (AI). По мере того, как популяция бактерий увеличивается и достигает критического уровня, AI накапливаются до необходимого порогового значения и взаимодействуют с соответствующими регуляторными белками, что приводит к резкой активации (индукции) экспрессии определенных генов у бактерий. С помощью AI осуществляется коммуникация бактерий - межклеточная передача информации между особями бактерий, принадлежащих

к одному и тому же и разным видам, родам и даже семействам; поэтому сигнальные молекулы считают «словами» в этом своеобразном «языке» бактерий. Благодаря QS регуляции бактерии получают возможность скоординировано контролировать экспрессию генов во всем сообществе. В подобном поведении бактерий проявляются черты сходства с многоклеточными организмами; бактерии используют преимущества «социального» поведения, которые не были доступны им как индивидуальным клеткам. Передача информации от клетки к клетке с использованием QS систем, которая приводит к индукции специализированных наборов генов, способствует быстрой адаптации популяций бактерий к меняющимся условиям среды и их выживанию в природных условиях.

Роль QS систем в регуляции процессов взаимодействия патогенных бактерий с эукариотическим организмом – хозяином.

4. Quorum Sensing системы у бактерий и молекулярные механизмы их действия QS системы грамотрицательных бактерий LuxI-LuxR типа.

У грамотрицательных бактерий лучше всего изучены QS системы, функционирующие с участием аутоиндуktorов N-ацил-гомосеринлактононов (AHL, или AI-1). AHL включают гомосеринлактонное кольцо и боковые ацильные группы. Описано более 40 AHL, отличающихся длиной ацильных цепей в молекуле. Специфичность действия AHL определяется количеством ацильных групп (от C4 до C16) и присутствием некоторых дополнительных группировок. AHL, содержащие короткие ацильные цепи, свободно диффундируют через клеточные мембрany; AHL с длинными ацильными цепями для выхода из клеток нуждаются в активном транспорте. AHL взаимодействуют с регуляторными белками, гомологичными LuxR белку *Vibrio fischeri*, которые составляют семью LuxR – подобных белков. Молекулы этих белков содержат два домена, определяющие связывание белка с AHL и с ДНК. При присоединении AHL изменяется конформация LuxR-подобного белка, в результате чего он может связываться с ДНК и функционировать как активатор транскрипции.

В биосинтезе AHL у нескольких изученных в этом отношении бактерий участвует S-аденозил метионин (SAM) (образование гомосеринлактонного кольца) и белок ACP, переносчик ацильных групп.

QS системы, функционирующие с участием AHL, обнаружены у большого количества грамотрицательных бактерий, включающих роды *Agrobacterium*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Hafnia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodobacter*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Vibrio*, *Yersinia* и т. д. Среди них – бактерии, являющиеся патогенными и фитопатогенными.

5. Обнаружение ауторегуляторных факторов в культуре клеток грамположительных и грамотрицательных факторов бактерий с помощью FVB.

Алкилоксибензолы (АОБ) – природные соединения, синтезируемые микроорганизмами различных таксономических групп. АОБ представлены смесью гомологов и различаются гидрофобностью и полярностью молекулы. Их главная биологическая роль – регуляция обменных процессов клетки: в зависимости от структуры гомолога и его концентраций они могут стимулировать процессы прорастания покоящихся форм или напротив ингибировать метаболическую активность и индуцировать переход клеток в состояние покоя.

Одним из возможных методов определения продукции АОБ микроорганизмами

является добавление реагента FastBlueBBBase непосредственно к супернатанту с последующим фотометрическим исследованием продукта реакции.

В качестве эталонных были использованы аналоги природных АОБ – растворы метилалкилоксибензола (C_1 -АОБ), гексилалкилоксибензола (C_6 -АОБ) в концентрациях: 1×10^{-4} М; 5×10^{-4} М; 1×10^{-3} М.

5. Изучение явления «quorum sensing» на примере *Chromobacterium violaceum* и биолюминесценции *Escherichia coli*.

Явление QS основано на действии низкомолекулярных сигнальных молекул различной природы, аутоиндуktörов (АИ), способных накапливаться в культуре микроорганизмов при их высокой плотности. С помощью АИ осуществляется коммуникация бактерий – передача информации между клетками, принадлежащими к одному и тому же или к разным видам, родам и даже семействам. Благодаря QS регуляции бактерии получают возможность координированно контролировать экспрессию генов во всем сообществе. Передача информации от клетки к клетке с использованием систем QS приводит к индукции специализированных наборов генов, что способствует быстрой адаптации популяций бактерий к меняющимся условиям и их выживанию в среде обитания.

Все известные системы QS работают на основании трех основных принципов. Во-первых, члены сообщества производят сигнальные молекулы – аутоин-дукторы (АИ). При низкой плотности клеток АИ диффундируют на большое расстояние и, следовательно, присутствуют в концентрациях ниже порога их обнаружения клетками. При высокой плотности бактериальной популяции, совместное производство сигнальных молекул приводит к локализации высокой концентрации АИ в межклеточном пространстве, что позволяет клеткам их обнаруживать и запускать процессы, контролируемые системой QS. Во-вторых, АИ обнаруживаются специфическими рецепторами, которые располагаются в цитоплазме или в мемbrane клетки, и прямо или опосредованно через систему внутриклеточной сигнализации запускают процессы транскрипции ранее молчавших целевых генов. В-третьих, кроме активации экспрессии целевых генов, АИ способны запускать процесс собственного синтеза. Эта опережающая аутоиндукционная петля, предположительно способствует скоординированной активности популяции.

Системы Quorum Sensing могут быть подразделены на несколько типов: 1) QS системы грамотрицательных бактерий первого (LuxI-LuxR) типа, в качестве аутоиндуktörа использующие различные по структуре ацилированные гомосерин лактоны (АГЛ); 2) QS системы, использующие аутоиндуktör 2-го типа (АИ-2); 3) прочие QS системы грамотрицательных бактерий, использующие аутоиндуktör 3-го типа (АИ-3) и гормоны эпинефрин/норэпинефрин; 4) системы QS грамположительных микроорганизмов, преимущественно использующие аутоиндуktörы олигопептидной природы.

1.2. Тема 2: «Сигнальные системы микроорганизмов» .

1.2.1 Перечень и краткое содержание рассматриваемых вопросов:

1. Сигнальные системы грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Основу системы QS составляют сигнальные молекулы. Это вещества обладают различной химической структурой и физико-химическими свойствами. Сигнальных молекул, которые используются в системе QS у микроорганизмов относятся к следующим группам соединений:

1. Аминокислоты – ацилированные гомосерин лактоны грамотрицательных бактерий
2. Пептиды – линейные и циклические сигнальные пептиды грамположительных бактерий
3. Гетероциклические соединения – 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолон *P. aeruginosa*, сигнальные фураноны, γ -бутиrolактон бактерий рода *Streptomyces*.
4. Алифатические соединения – фарнезол *Candida albicans*.

У грамотрицательных бактерий наиболее распространенной группой сигнальных молекул являются **ацилированные гомосерин лактоны (АГЛ)**.

Сигнальные молекулы грамположительных бактерий представлены **сигнальными пептидами**. Сигнальные пептиды в зависимости от вида микроорганизмов могут находиться в линейной или циклической форме (обычно в виде пептид-тиолактона). К циклическим сигнальным пептидам относятся, например **AgrD1** и **AgrD2** *Staphylococcus aureus*.

Алифатические сигнальные молекулы в основном распространены среди низших эукариот. Характерным примером такой сигнальной молекулы является **фарнезол** *Candida albicans*. Фарнезол представляет полиненасыщенныйmonoатомный спирт, имеющий во 2,6 и 10 положении метильные заместители.

2. Перспективы применения ауторегуляторных факторов бактерий в условиях биотехнологических производств.

Современная биотехнология опирается на достижения естествознания, техники, технологии, биохимии, микробиологии, молекулярной биологии, генетики. Биологические методы используются в борьбе с загрязнением окружающей среды и вредителями растительных и животных организмов. К достижениям биотехнологии можно также отнести применение иммобилизованных ферментов, получение синтетических вакцин, использование клеточной технологии в племенном деле.

Широкое распространение получили гибридомы и продуцируемые ими моноклональные антитела, используемые в качестве диагностических и лечебных препаратов.

Бактерии, грибы, водоросли, лишайники, вирусы, простейшие в жизни людей играют значительную роль. С давних времен люди использовали их в процессах хлебопечения, приготовления вина и пива, в различных производствах. В настоящее время в связи с проблемами получения ценных белковых веществ, увеличения плодородия почв, очищения окружающей среды от загрязнителей, получения биопрепаратов и другими целями и задачами диапазон изучения и использования микроорганизмов значительно расширился. Микроорганизмы помогают людям в производстве эффективных питательных белковых веществ и биологического газа. Их используют при применении биотехнических методов очистки воздуха и сточных вод, при использовании биологических методов уничтожения сельскохозяйственных вредителей, при получении лечебных препаратов, при уничтожении утильсыря.

3. Влияние АОБ на устойчивость белков к повышенной температуре.

Температура является одним из важнейших факторов, действующих в природных экосистемах и контролирующих многие стороны физиологии прокариот. Стандартные

события “теплового шока” включают нарушение третичной структуры ферментных белков, резкое понижение их катализитической активности, блокаду метаболических путей и, как следствие, остановку роста или гибель бактериальной клетки. Важная роль в защите клетки от температурного фактора традиционно отводится обширной группе белков теплового шока (БТШ), неферментным белкам – молекулярным шаперонам и шаперонинам.

Другой механизм терморезистентности связан со способностью бактерий синтезировать так называемые “химические шапероны” – низкомолекулярные соединения, образующие комплексы с биомакромолекулами за счет слабых взаимодействий, неспецифических к структуре биополимера, стабилизирующие их пространственную структуру и способствующие рассеиванию энергии повреждения. При этом, наряду с глицерином, бетаином, трегалозой и многоатомными спиртами, свойства химических шаперонов обнаруживаются у алкилоксибензолов (АОБ) – низко молекулярных ауторегуляторных факторов бактерий и дрожжей, контролирующих их переход в гипометаболическое и анабиотическое состояние с одновременным приобретением клетками высокой устойчивости к экстремальным воздействиям.

4. Влияние АОБ на устойчивость белков к УФ-облучению.

Денатурирующим фактором, в отношении которого ранее были показаны протекторные эффекты АОБ, является УФ-облучение. Механизм его повреждающего действия на белковые молекулы связан с поглощением квантов света в УФ-области остатками ароматических аминокислот с последующим развитием процессов фотолиза и денатурации белков.

Инкубация антител с короткоцепочечными С7-АОБ и С9-АОБ не приводила к существенному изменению их функциональности, но сопровождалась достоверным ростом УФ-резистентности образующихся комплексов.

В результате взаимодействия антител с длинноцепочечными гидрофобными С12-АОБ и С18-АОБ наблюдалось выраженное нелинейное дозозависимое изменение их способности к связыванию с соответствующими антигенами

5. Влияние АОБ на структуру ДНК методом инфракрасной спектроскопии.

Конформация ДНК определяет биологическую активность этой макромолекулы *in vivo*. В вегетативных клетках ДНК, как правило, находится в В-форме, в эндоспорах бацилл, при развитии в них покоящегося состояния, она переходит в А-конформацию, характеризующуюся повышенной устойчивостью к ряду повреждающих воздействий.

Основной фактор, определяющий к какому типу должна относиться конформация ДНК – это активность воды. В присутствии некоторых неэлектролитов ДНК может сохраняться в В-конформации при значениях активности воды, значительно меньших «критического», при котором происходит В-А-переход. Значение активности воды для конформационного состояния молекул ДНК определяется, по-видимому, тем, что вода выступает как полярный растворитель.

Метилрезирцин (автоундуктор), является полиолом, имеющим две близкорасположенные ОН-группы и за счет этого способен замещать молекул воды в ближайшем окружении ДНК, предотвращая тем самым В-А переход при снижении значений относительной влажности.

Выявленный эффект гексилрезорцина заключается в стимуляции В-А перехода

только при низких значениях активности воды. Стимуляция перехода может быть обусловлена формированием вокруг молекул ДНК мицеллоподобныхnanoструктур из взаимодействующих между собой молекул гексилрезорцина.

Контрольные вопросы: 1. Охарактеризовать ИК-спектрометрию. 2. Дать характеристику метилрезорцина и гексилрезорцина – как микробных ауторегуляторов. 3. Охарактеризовать влияние АОБ на структуру ДНК, оцененную с помощью ИК-спектрометрии.

2. Методические рекомендации по выполнению курсовой работы (проекта)
Не предусмотрено РП

3. Методические рекомендации по выполнению индивидуальных домашних заданий (контрольных работ)
Не предусмотрено РП