

УДК: 615.371: 578.832.1

МЕХАНИЗМЫ И РЕГУЛЯЦИЯ ФАЗОВЫХ И АНТИГЕННЫХ ВАРИАЦИЙ БАКТЕРИЙ

Колотова Т.Ю., Балута И.М., Воропай А.Ю.,
Вальчук С.И., Кучма И.Ю., Волянский А.Ю.,
Масляничук О.А.

ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им.
И.И. Мечникова АМН Украины»
Днепропетровская областная санитарно-
эпидемиологическая станция

Фазовыми вариациями называются обратимые переключения экспрессии поверхностных белков или полисахаридов, которые происходят с гораздо большей скоростью, чем средняя скорость мутаций в геноме [1]. Обычно перестройка генома, вызывающая фазовое переключение, происходит в одной из 100 или 1000 клеток, образовавшихся в течение одной генерации.

В ряде случаев более чем один ген семейства подвергается фазовым вариациям, каждый из генов при этом включается и выключается самостоятельно. Антигенными вариациями называется экспрессия различных форм одного и того же антигена. Иногда под антигенными вариациями подразумевают и фазовые, и собственно антигенные вариации [2].

Существует два механизма антигенных и фазовых вариаций -эпигенетический и генетический. Под эпигенетическими механизмами подразумеваются такие механизмы, в результате которых изменяется экспрессия генов без изменения их первичной последовательности. В результате действия генетических механизмов изменяются последовательности ДНК гена или его регуляторных элементов. В данном обзоре будут рассмотрены только генетические механизмы фазовых и антигенных вариаций, а также их регуляция.

Генетическими механизмами антигенных и фазовых вариаций являются гомологичная рекомбинация, геновая конверсия или дупликативная транспозиция, вариации количества повторов нуклеотидов размером от 1 до 7 п.н., сайт-специфическая рекомбинация, делеции и амплификации последовательностей, точечные мутации, а также инсерции и эксцизии мобильных элементов.

Примером вызываемых амплификацией вариаций являются фазовые переключения *sar* локуса *Haemophilus influenzae*. Для образования капсулы *H. influenzae* необходимы гены *sar* локуса, кодирующего ферменты биосинтеза капсулярных полисахаридов [3, 4]. Амплификация локуса происходит в результате гомологичной рекомбинации между инсерционными элементами IS1016, фланкирующими копии *sar* локуса, в результате увеличивается количество капсулярных полисахаридов [5].

При геновой конверсии, или ее еще называют дупликативной транспозицией, происходит копирование гена или его сегмента и перенос в ту позицию генома, в которой имеется экспрессирующаяся копия. Молчащая копия гена часто называется донорной, и в результате конверсии происходит ее дупликация в геноме.

Наиболее изученными бактериальными системами, которые используют геновую конверсию для образования антигенных вариаций, являются некоторые виды *Borrelia* {*Borrelia hermsii* — *vlp* и *vsp*; *Borrelia burgdorferi* — *vlsE* и *Neisseria* - *pil*) [6, 7, 8].

Vlp и *vsp* аллели *B. hermsii* собраны в 10 кластеров, содержащих от 2 до 14 генных сегментов. Каждый из *vlp* и *vsp* аллелей содержит расположенную вверх по течению гомологичную последовательность (UHS). 13 расположенных вниз по течению гомологичных последовательностей (DHS) окружают некоторые аллели вариабельных генных сегментов. Экспрессируемый сайт находится на одном из концов линейной плазмиды *lp28-1*. Большинство серотипов возникает в результате рекомбинации между UHS и DHS сайтами, в результате замещается промежуточная ДНК архивной донорной последовательностью [9].

Vls локус *B. burgdorferi* B31 локализован на линейной плазмиде *lp28-1* и состоит из экспрессирующегося сайта *vlsE*, кодирующего липопротеин *VlsE*, и из 15 неэкспрессируемых *vls* каскет, расположенных непрерывно. Неэкспрессирующиеся каскеты обладают большой гомологией с центральным районом *vlsE*, а большинство различий сосредоточены в шести вариабельных районах внутри каждой каскеты.

Предполагается, что в процессе дупликативной транспозиции последовательности молчащих каскет *vls* линейной плазмиды, или образуемой отдельной копии эписомной ДНК, или даже РНК копии осуществляют внедрение и вытесняют родительскую нить ДНК в районе *vlsE* локуса. Для процесса нужны очень короткие районы совпадения первичной последовательности. Действительно, каскетные районы *vlsE* гена и молчащих каскет фланкированы прямыми повторами размерами 17 п.н. По всей вероятности, консервативные последовательности *vlsE* и молчащих *vls* каскет необходимы для антигенных вариаций *vlsE*, а осуществляется процесс сайт-специфическая рекомбиназа. Т.е. не исключается, что механизмом антигенных вариаций является сайт-специфическая рекомбинация. Однако ген рекомбиназы в настоящее время не идентифицирован [10].

Большинство изменений последовательности *vlsE* гена *Borrelia burgdorferi* можно объяснить рекомбинацией. Однако генетические изменения, которые нельзя объяснить рекомбинацией, были найдены в 167 клонах из 1073 изученных (15 %) [10]. Таким образом, существуют независимые от матрицы изменения нуклеотидной последовательности, которые представляют собой нуклеотидные замены, увеличение или уменьшение количества повторов тринуклеотидов, инсерции или делеции до 9 п.н. Эти изменения кластеризуются в гипервариабельных районах. Скорость возникновения таких вариаций выше, чем скорость возникновения мутаций в среднем по геному. В то же время в настоящее время не ясно, являются ли гипервариабельные районы горячими точками мутагенеза или такая картина является результатом селекции.

Пили *Neisseria gonorrhoeae* относятся к четвертому типу и участвуют как в прикреплении бактерий к урогенитальному эпителию, так и необходимы для трансформации бактерий. Пили состоят из кодируе-

мых *pilE* геном пилинов. При антигенных вариациях у гонококков происходит изменение последовательности ДНК гена *pilE*.

Хромосома гонококков содержит несколько молчащих пилиновых локусов (*pilS*), каждый из которых состоит из 1-6 копий пилиновых генов. Каждая молчащая копия содержит две трети *pilE* гена, т.е. вариабельный и гипервариабельный районы, но не содержит промотор *pilE* гена, сайт связывания с рибосомами и большую часть константного района [11,12].

В антигенных вариациях пилина участвуют несколько цис-элементов, однако, их роль точно не установлена. К цис-элементам относится консервативный *cus'2* элемент, найденный внутри всех копий пилинового гена (размер 30 п.н.) и *Sma/Cla* повтор, локализованный на 3-х концах *pilE* и пяти *pilS* локусов.

На первом этапе происходит независимая от *RecA* белка рекомбинация в донорной хромосоме между двумя очень короткими гомологичными последовательностями *pilS* и *pilE* локусов, и в результате формируется экстрахромосомная кольцевая молекула ДНК, содержащая гибрид *pilE-pilS*, а также дополнительные последовательности ДНК. Экстрахромосомная кольцевая ДНК является донором *pilS* последовательности *pilE* гену реципиентной хромосомы. На этом этапе используется *RecA* белок и рекомбинация происходит между длинными районами гомологичных последовательностей, одна из которых фланкирует *pilE* locus, а другая — *pilE-pilS* гибрид, и между короткими гомологичными последовательностями внутри *pilE* гена и *pilE-pilS* гибрида. В результате рекомбинации происходит перенос генетической информации в одном направлении от вариабельной последовательности *pilS* к *pilE* гену и изменяется только донорная последовательность [13]. Имеющиеся на данный момент данные не исключают другие модели генной конверсии.

RecA белок *E.coli* способствует образованию мутаций, вызывающих устойчивость к антибиотикам [14]. На основании этих данных ведется поиск препаратов, ингибирующих каталитическую активность *RecA* белка. Такие ингибиторы, как предполагается, могут значительно снизить скорость возникновения устойчивости к ряду антибиотиков. В то же время деления *recA* гена снижает антигенные вариации у гонококков в 100-1000 раз [15]. Поэтому можно предположить, что применение ингибиторов *RecA* белка будет целесообразно при заражении гонококками.

Некоторые локусы содержат тандемные повторы внутри промоторов и кодирующих последовательностей. В течение репликации неправильное спаривание между дочерней и родительской цепями ДНК может происходить в районе повторов как на опережающей, так и на отстающих цепях, что приводит к потере или приобретению новых повторов в только что синтезированной ДНК [16, 17, 18].

Активность системы репарации неправильно спаренных оснований необходима для предотвращения вариаций количества копий мононуклеотидных и динуклеотидных повторов, но не тетрануклеотидных повторов, для которых нужна активность ДНК полимеразы *polI* у *H.Influenzae* [19].

Вариации количества повторов вызывают как фазовые переключения экспрессии генов и вариации степени активности промоторов, так могут изменять саму рамку считывания. Изменения активности промотора и уровня транскрипции происходит в том случае, если изменяется количество копий повторов в районе между -10 и -35 нуклеотидом, в сайте с которым связывается РЫК полимеразы. Количество нуклеотидов в этом сайте является критическим для определения уровня транскрипции, и даже изменение на один нуклеотид имеет значение.

На уровень транскрипции могут также влиять изменения количества повторов, расположенных вне промотора, влияя на присоединение регуляторных белков или стабильность молекул синтезирующейся мРНК [20, 21].

Увеличение или уменьшение количества три-нуклеотидных повторов может лежать в основе полиморфизма белков. Примером такого полиморфизма служит *AhpC* белок *E. coli*. После увеличения количества триплетов в кодирующей последовательности ферментативная функция белка изменяется, и он превращается из пероксиредоксина в дисульфидредуктазу. Интересно, что такие изменения происходят при стрессовых условиях, и в результате мутации образуется белок, дающий адаптивные преимущества при росте в стрессовых условиях, но эта вариация является обратимой [22].

Staphylococcus epidermidis синтезирует варианты полисахаридов (PIA), которые играют большую роль в формировании биопленок [23]. Причиной появления 30% PIA-отрицательных вариантов является внедрение инсерционной последовательности 256 (IS256) внутрь либо *icaA*, либо *icaC* генов и последующая инактивация генов. Однако инсерция IS256 элемента является обратимой и при удалении IS256 клетки становятся PIA позитивными.

Вызываемое транспозазой *MooV* перемещение IS492 элемента является механизмом фазовых вариаций *eps* локуса *Pseudoalteromonas atlantica*, содержащего гены синтеза экстрацеллюлярных полисахаридов [24]. Фазовые вариации экспрессии генов локуса *eps* определяют формирование биопленки бактериями и соответственно способствуют переключению стиля жизни бактерии со свободно живущего в океане на прикрепленный к твердой поверхности. Переключения on (включено)-off (выключено) происходит в результате точной эксцизии IS492 элемента из локуса, осуществляемого транспозазой *MooV*. Специфическая последовательность размером 5 п.н. обнаруживается как в районе сайта-мишени, так и в районе соединения концов IS492 элемента, когда он находится в кольцевой форме.

Для рекомбинации, опосредованной сайт-специфическими рекомбиназами тирозинового и серинового семейств, необходимы короткие последовательности ДНК, узнаваемые рекомбиназами. В результате рекомбинации обычно происходят инверсии, вызывающие либо фазовые переключения, либо антигенные вариации. Это зависит от того, содержит ли инвертируемый элемент регуляторную последовательность или кодирующую последовательность. Поскольку катализируют сайт-специфическую рекомбинацию инвертазы двух семейств - тирозинового и серинового,

возникает возможность для поиска ингибиторов этих ферментов и использования их для борьбы с теми видами бактерий, которые обладают сайт-специфическими системами рекомбинации.

У *Bacteroides fragilis* посредством инверсии контролируется больше оперонов, чем у других микробов, геномы которых расшифрованы на сегодняшний день. Сайт-специфическая рекомбинация регулирует фазовые вариации множества генов *B. fragilis*, оппортунистического патогена и компонента нормальной микрофлоры прямой кишки человека, включая гены поверхностных секретируемых и регуляторных белков, а также белков рестрикции-модификации [25]. Геном *B. fragilis* содержит 30 генов, кодирующих потенциальный сайт-специфический рекомбиназы: 26 рекомбиназ тирозинового семейства, 3 рекомбиназы серинового семейства и одну Piv-подобную транспозазу-инвертазу.

Сравнение геномов *B. fragilis* с геномом *Bacteroides thetaiotaomicron* (штамм VPI 5482 (ATCC 29148)) показало отсутствие ортологических переменных промоторов и даже оперонов, которые они регулируют. У *B. thetaiotaomicron* также есть переменные системы, но они уникальны и их меньше. Таким образом, новые системы сайт-специфической рекомбинации возникают заново довольно часто в процессе эволюции по крайней мере *Bacteroides*.

Обычно считается, что генетические перестройки, вызывающие фазовые и антигенные вариации, являются случайными событиями, никак не контролируемые сигналами внешней среды. Предполагается, что стохастический характер антигенных и фазовых переключений обусловлен невозможностью достижения полезного эффекта посредством регуляции процесса. Это может быть в том случае, если требуется слишком много времени, для того чтобы выработать ответ на сигнал внешней среды или в том случае, если нет подходящего сигнала, который можно было бы распознать. Действительно, переключения, происходящие с определенной вероятностью независимо от внешней среды, позволяют небольшому количеству бактерий в популяции быть готовым немедленно ответить на неожиданное изменение внешних условий, в процессе эволюции выработался механизм геномных перестроек, локализованных в пространстве, но не локализованных во времени.

Однако, такая догма оказалась не абсолютной. И в последнее время накапливается все больше данных, свидетельствующих о том, что факторы внешней среды контролируют фазовые и антигенные вариации.

Наиболее хорошо изучена регуляция факторами внешней и внутренней среды сайт-специфической рекомбинации, вызывающей фазовые вариации экспрессии фимбрий *E. coli* [1]. Именно на этой системе получены строгие доказательства регуляции факторами внешней среды скорости и направления перестроек ДНК, вызывающих фазовые вариации.

Для проявления уропатогенных свойств *E. coli* необходимы фимбриии первого типа, которые служат для адгезии к эпителиальным клеткам. Нужны фимбриии и для колонизации тканей и инвазии в эпителиальный слой. Но, с другой стороны, фимбриии первого типа являются отличными иммуногенами, поэтому

необходимы быстрые переключения экспрессии этих генов в ответ на факторы внешней среды.

Для экспрессии фимбриии, кодируемых *fim* опероном, необходимы две независимо транскрибирующиеся единицы, одна из которых кодирует рекомбиназы *FimE* и *FimB*, а вторая – является полицистронным опероном, кодирующим структурные компоненты *FimA*, *FimF*, *FimG* и *FimH* и систему сборки пилей *FimC* и *FimD*.

Фазовые вариации экспрессии *fim* оперона вызываются инверсией 314-п.н. хромосомного района, фланкированного инвертированными повторами размером 9 п.н. который содержит *fimA* промотор. Когда инвертируемый элемент (*fimS*) находится в *on* ориентации, промотор повернут к *fim* генам и транскрипция активирована. Транскрипция инактивирована при противоположной инвертированной ориентации *fimS* элемента.

Инверсия ДНК опосредована двумя тирозиновыми сайт-специфическими рекомбиназами *FimB* и *FimE* [26, 27]. *FimB* опосредует инверсию в обоих направлениях, тогда как *FimE* опосредует инверсию преимущественно в *on-off* направлении. Частота инверсии, вызываемой *FimB* 10^{-3} - 10^{-4} , тогда как частота *FimE*-опосредованной инверсии — 10^{-1} . Поскольку активность *FimE* рекомбиназы выше, чем активность *FimB* рекомбиназы, то преимущественно переключение происходит из состояния *on* в состояние *off* при различных условиях роста бактерий. Определяется направление переключения и относительное количество двух рекомбиназ. Гены *fimB* и *fimE* транскрибируются с собственных промоторов, регулируемых транскрипционными факторами.

Давно было известно, что внешние условия способствуют фазовым вариациям. Рекомбинация *fimS* элемента регулируется температурой, осмотическим давлением, pH среды и наличием в среде разветвленных аминокислот особенно лейцина и аланина, а также N-ацетилнейраминовой кислотой (*Neu5Ac*) и N-ацетилглюкозамином (*GlcNAc*) [28-31]. Но оставалось не ясным, как влияют условия внешней среды: являются ли они факторами, регулирующими фазовые вариации, или факторами селекции?

В настоящее время получены убедительные доказательства регуляции факторами внешней среды направления и скорости сайт-специфической рекомбинации, вызывающей фазовые вариации экспрессии фимбрий первого типа.

При температуре, которая характерна для среды вне организма хозяина, синтез фимбрий подавлен. Увеличение вероятности переключения *off-on* происходит при температуре тела $37-41$ °C. В значительной мере различие частоты переключения при росте бактерий на различных средах зависит от *Lrp* белка (*leucine-responsive protein*) и его взаимодействия с аланином, лейцином и изолейцином плюс валином [28].

Условия внешней среды регулируют рекомбинацию посредством ряда клеточных факторов. К таким факторам относятся ДНК гиразы и регулируемая ею суперспирализация ДНК, уже упоминавшийся *Lrp* белок, IHF фактор (*integration host factor*), *RpoS* фактор, алармон *ppGpp* [32-35].

Глобальный регулятор гистоноподобный белок

H-NS контролирует фазовые вариации фимбрий первого типа как посредством регуляции экспрессии рекомбиназ, так и непосредственно, взаимодействуя с инвертированным элементом *fim* оперона [36, 37]. H-NS является репрессором *FimB* рекомбиназы. Но помимо этого локальная транскрипция инвертируемого элемента и H-NS белок создают такую ситуацию, при которой *FimB*-опосредованная off-on инверсия становится невозможной. Вероятно, в процессе транскрипции формируется нуклеопротеиновый комплекс в котором H-NS присоединяется к *fimS* инвертируемому элементу и препятствует инверсии, осуществляемой рекомбиназой *FimB*.

Lgr белок контролирует экспрессию множества генов *E. coli*, которые вовлечены в синтез, транспорт и деградацию аминокислот. Помимо этого Lgr регулирует экспрессию нескольких типов фимбрий, в том числе *fim*, *pap*, *sfa*, *daa*, *an* и *clp*. IHF фактор присоединяется к сайту II, а Lgr белок к сайтам 1 и 2 внутри инвертированного элемента и стимулируют рекомбинацию, вероятно, посредством образования изгибов ДНК, способствующих формированию синапса. Взаимодействие Lgr с третьим сайтом совместно с сайтами 1 и 2 наоборот снижает рекомбинацию [33]. Разветвленные аминокислоты (в особенности лейцин) и аланин увеличивают частоту рекомбинации, согласно современным представлениям, посредством селективного удаления Lgr белка с третьего сайта.

Транскрипция *fimA* гена подавляется при вступлении в стационарную фазу роста и для этого нужен RpoS фактор, который также контролирует частоту инверсии *fimS* элемента [34]. В клетках дикого типа, при их переходе в стационарную фазу роста, подавляется транскрипция *fimB* рекомбиназы. Репрессия снижается в клетках, дефицитных по RpoS фактору. Подавление RpoS фактором транскрипции *fimA* и *fimB* генов, соответственно, способствует переходу промотора в off состояние.

Трансдукция сигнала в бактериальных клетках, так же как и у эукариот, осуществляется посредством вторичных мессенджеров, которые называются алармонами. Вторичными мессенджерами являются небелковые молекулы, в том числе модифицированные нуклеотиды, среди которых 3',5-циклический-аденозин монофосфат (цАМФ) и гуанозин тетра- и пентафосфат ((p)ppGpp).

Алармон (p)ppGpp регулирует экспрессию фимбрий первого типа *E. coli*, увеличивая субпопуляцию клеток, экспрессирующих фимбрий, посредством повышения уровня экспрессии *fimB* рекомбиназы. Содержание (p)ppGpp повышается в клетке при голодании по аминокислотам, а также при энергетическом стрессе [35].

цАМФ является глобальным регулятором экспрессии генов. Уровень внутриклеточного цАМФ модулируется несколькими сигналами внешней среды. В клетке цАМФ связывается с рецепторным белком CRP. Димерный CRP в комплексе с цАМФ связывается с ДНК в сайтах, локализованных поблизости от промоторных районов. Комплекс CRP-цАМФ регулирует экспрессию почти 200 оперонов *E. coli*.

CRP-цАМФ играет двойную роль в регуляции образования фимбрий первого типа [38]. Во-первых,

CRP-цАМФ контролирует фазовое переключение, подавляя рекомбинацию в направлении off-on. CRP-цАМФ подавляет рекомбинацию, действуя на ДНК гиразу. Во-вторых, CRP-цАМФ увеличивает активность *fimA* промотора, когда он находится во включенном состоянии. Более того, CRP-цАМФ подавляет экспрессию другого глобального регулятора белка Lgr, который также регулирует рекомбинацию. Но суммарным эффектом действия CRP-цАМФ является репрессия рекомбинации, и в целом процент клеток, содержащих фимбрий на поверхности, снижается.

Соответственно, снижение концентрации цАМФ в результате изменений физиологических условий, например, роста на среде, содержащей глюкозу, увеличивает процент клеток в популяции, содержащей фимбрии. Зависимость образования фимбрий первого типа от содержания глюкозы в среде может объяснить, почему больные диабетом часто страдают от инфекций мочевыводящих путей. Наличие высокой концентрации глюкозы в моче может снижать уровень CRP-цАМФ в бактериальных клетках, что, соответственно, вызовет увеличение экспрессии первого типа фимбрий и повысит способность колонизировать мочевой тракт.

Таким образом, посредством CRP-цАМФ экспрессия первого типа фимбрий и геномная перестройка, необходимая для такой экспрессии, регулируются внешней средой

Переключение направления рекомбинации после прикрепления клеток к эпителиальным клеткам мочевыводящих путей может быть выгодным для бактерии, поскольку иммунная система организма распознает и уничтожит содержащие фимбрии клетки в том случае, если они будут экспрессироваться достаточно долго. По-видимому, внешние условия контролируют направление и скорость рекомбинации в течение всего периода инфицирования мочевыводящих путей. Причем, улавливая сигналы внешней среды, бактерии способны прогнозировать будущие ее вызовы.

Контролируют фазовые вариации фимбрий первого типа сиаловая кислота и N-ацетил-глюкозамин (GlcNAc) [30]. N-ацетилнейраминавая кислота подавляет как экспрессию *FimB*, так и рекомбинацию. Для регуляции N-ацетилнейраминавой кислотой необходим цис-регуляторный элемент, который локализован на расстоянии 600 п.н. вверх по течению от *fimB* промотора. Этот элемент содержит районы, которые функционируют как сайленсеры, и районы, которые обладают антирепрессивной активностью.

Но и сиаловая кислота и GlcNAc высвобождаются клетками организма в ходе защиты, которая в свою очередь активируется в ответ на фимбрий первого типа. Следовательно, сиаловая кислота может являться сигналом для бактерии о том, что она находится в такой среде, в которой на нее будет действовать специфический иммунный ответ. Ответ организма хозяина, таким образом, вызывает изменения экспрессии генов и регулирует перестройку генома в ответ на селективный сигнал, т.е. не случайно по отношению к селективному сигналу. Однако следует отметить, что действует не сам селективный сигнал -иммуноглобулины, а факторы, встреча с которыми закономерно прогнозирует последующую встречу с

селективными условиями.

Регулируется рекомбинация и состоянием экспрессии других оперонов бактериальной клетки. Экспрессия пилей или фимбрий на поверхности патогенных штаммов *E. coli* зависит и от кодирующего пилонефрит ассоциированные пили рар оперона. *E. coli* экспрессирует первый тип фимбрий и Рар пили, но в данный момент экспрессируется один из двух типов фимбрий на поверхности клетки. Менее чем 10% клеток экспрессирует два типа фимбрий одновременно.

Транскрипция рар оперона контролируется метилированием специфических сайтов регуляторных последовательностей [39,40]. Причем активность метилтрансферазы и метилирование этих сайтов зависит от среды [41]. Если бактерии растут на среде, обогащенной аминокислотами, скорость метилирования увеличивается, что приводит к переключению off-on. Моча обогащена аминокислотами и увеличение экспрессии пилей, возникающее в ответ на попадание бактерий в мочу, способствует прикреплению бактерий к эпителиальным клеткам мочевого пузыря.

Выявлен механизм координации, между экспрессией первого типа фимбрий и Рар пилей. Белок РарВ транскрибируется с рар промотора рВ. РарВ и является транскрипционным регулятором генов рар. Экспрессия РарВ снижает процент клеток, экспрессирующих первый тип фимбрий. Присоединение РарВ фактора к промотору *fimA* гена подавляет вызываемую *FimB*-рекомбиназой инверсию ДНК в *fim* опероне, кодирующем первый тип фимбрий. Помимо этого РарВ увеличивает экспрессию второй рекомбиназы *FimE*, что повышает частоту переключения первого типа фимбрий с on на off [42]. Таким образом, факторы внешней среды регулируют фазовые вариации рар оперона, а рар является одним из факторов, который регулирует сайт-специфическую рекомбинацию первого типа фимбрий.

В целом, складывается противоречивая картина регуляции внешними условиями фазовых переключений первого типа фимбрий. Однако, полученные данные не оставляют сомнений в том, что, во-первых, сайт-специфическая рекомбинация *fimS* инвертируемого элемента является регулируемым процессом. Во-вторых, регулировать могут не сами селективные факторы, например, иммуноглобулины, а факторы, прогнозирующие, предупреждающие клетку о последующей встрече с селективным фактором. Или, например, наличие глюкозы в моче не является селективным фактором. Но этот фактор является сигналом о том, что бактерии находятся в такой среде, в которой экспрессия фимбрий дает селективные преимущества.

Факторы внешней среды, прогнозирующие будущую встречу с антителами, могут регулировать не только фазовые вариации, но и антигенные вариации.

PilE рекомбинация гонококков, описанная выше, происходит во время экспоненциального роста бактерий и единственным фактором, известным на сегодняшний день, который регулирует частоту рекомбинации, является наличие железа в среде [43]. Из всех тестируемых условий только снижение уровня железа в среде увеличивает частоту рекомбинации, а также увеличивает трансформацию и репарацию ДНК. Но самым интересным оказалось то, что увели-

чение частоты вариаций пилового антигена при недостатке в среде железа не является результатом селекции гонококков, способных лучше расти или более адаптированных к обедненной железом среде, а является следствием увеличения скорости рекомбинации пилоновых генов.

Согласно гипотезе авторов недостаток железа в среде служит сигналом пребывания бактерии в такой среде, в которой увеличение фенотипических изменений могут давать преимущества популяции.

Действительно, в тканях млекопитающих железо находится не в свободной форме, а связано трансферрином или лактоферрином. Поэтому регуляция рекомбинации ДНК наличием железа в среде позволяет предположить, что недостаток железа сигнализирует о проникновении бактерий в организм человека. Но нахождение бактерий в организме человека является сигналом о том, что произойдет встреча с антителами. Иными словами недостаток железа прогнозирует последующую встречу с селективным агентом, которым являются антитела. Увеличение рекомбинации, по-видимому, позволяет бактериям приспособиться к этим прогнозируемым условиям.

Образование антигенных вариаций *vlsE* начинается на 4 день заражения и продолжается в течение курса инфекции. Попытки индуцировать рекомбинацию *vlsE ex vivo* оказались неуспешными [44]. Антигенные вариации *vlsE* гена не удается обнаружить при культивировании *in vitro* в течение от 28 до 84 дней или в течение культивирования в организме переносчика инфекции, а также при трансплантации бактерий в камеру для диализа в организм хозяина.

Однако вариации легко обнаруживаются уже на ранних стадиях инфекции млекопитающих как у нормальных иммунокомпетентных животных, так и у животных с иммунодефицитами (SCID) [10]. Обнаружение антигенных вариантов *vlsE* гена *in vivo*, но не *in vitro* нельзя объяснить селекцией антителами соответствующих вариантов потому, что антигенные вариации обнаружены у SCID мышей, несмотря на отсутствие селективного давления [44]. Действительно, несколько замедленное, но все же активное замещение родительских вариантов новыми вариантами у иммунодефицитных мышей позволяет предположить, что не только селекция антителами является причиной обогащения популяции клеток антигенными вариантами.

На основании этих данных предположили, что неизвестная сигнальная система индуцирует рекомбинацию [10].

Альтернативное предположение, согласно которому ингибитор рекомбинации инактивируется во время инфекции мышей представляется маловероятным, поскольку рекомбинация отсутствует у *E. coli*, трансформированной ДНК, содержащей *vlsE* локус и прилежащие молчащие кассеты [10]

Вероятно, факторы, прогнозирующие будущее столкновение с антителами, стимулируют рекомбинацию. Так, вполне вероятно активация рекомбинации при попадании инфекции в организм хозяина и столкновении бактерий с факторами неспецифической защиты.

В целом, имеющиеся на данный момент экспериментальные данные позволяют рассматривать ге-

номные изменения, вызывающие фазовые и антигенные вариации, как запрограммированные перестройки, локализованные в пространстве, а ряд из них и во времени. Изучение ферментативного аппарата геномных перестроек открывает перспективы для создания новых препаратов, ингибирующих активность этих ферментов и, таким образом предотвращающих вариации. По всей видимости в результате изучения факторов внешней среды и сигнальных путей, модулирующих фазовые и антигенные вариации, появится возможность вмешиваться в эти процессы. Например, блокируя необходимые сигнальные пути, можно будет понижать скорость антигенных вариаций или направление фазовых переключений.

Список литературы

1. Van der Woude M.W., Baumber A.J. Phase and antigenic variation in bacteria // *Clin Microbiol Rev* - 2004. - V.17. - P. 581-611.
2. Deitch K. W., Lukehart S. A., Stringer J. R. Common strategies for antigenic variation by bacterial, fungal and protozoan pathogens // *Nat. Rev. Microbiol.* -2009.--V7. -P.493-503.
3. Kroll J. S. 1992. The genetics of encapsulation in *Haemophilus influenzae* // *J. Infect. Dis.*- 1992.—V.165. - P.S93-S96.
4. Hoiseith S. K., Corn P. G., Anders J. Amplification status of capsule genes in *Haemophilus influenzae* type b clinical isolates// *J. Infect. Dis.*—1992. - V. 165. -P.S114.
5. Kroll J. S., Loynds B. M., Moxon. E. R. The *Haemophilus influenzae* capsulation gene cluster: a compound transposon // *Mol. Microbiol.*— 1991. --V.5. - P.1549-1560.
6. Barbour A. G., Hayes S. F. Biology of *Borrelia* species // *Microbiol. Rev.* -1986.—V.50. -P.381-400.
7. Koomey M. Bacterial pathogenesis: a variation on variation in Lyme Disease // *Curr. Biol.* - 1997. - V.7. - P.R538-R540.
8. Seifert H. S. Questions about gonococcal pilus phase- and antigenic variation // *Mol. Microbiol.* --1996.-V.2L-P.433-440.
9. Dai Q., Restrepo B.I., Porcella S.F., Raffel S.J., Schwan T.G., Barbour A.G. Antigenic variation by *Borrelia hermsii* occurs through recombination between extragenic repetitive elements on linear plasmids // *Mol. Microbiol.* — 2006. —V. 60. - P. 1329-1343.
10. Coutte L, Botkin D.J., Gao L., Norris SJ. Detailed Analysis of Sequence Changes Occurring during *vlsE* Antigenic Variation in the Mouse Model of *Borrelia burgdorferi* Infection // *PLoS. Pathog.* - 2009.—V. 5. N.2:- e1000293.-doi:10.1371.
11. Haas R., Meyer T. F. The repertoire of silent pilus genes in *Neisseria gonorrhoeae*: evidence for gene conversion//*Cell.* — 1986. - V.44. - P. 107-115.
12. Segal E., Hagblom P., Seifert H. S., So M. Antigenic variation of gonococcal pilus involves assembly of separated silent gene segments// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— 1986.-V. 83.-P.2177-2181.
13. Howell-Adams B., Wainwright L. A., Seifert H. S. The size and position of heterologous insertions in a silent locus differentially affect pilin recombination in *Neisseria gonorrhoeae*//*Mol. Microbiol.* - 1996. - V.22. - P.509-522.
14. Cirz R. T., Chin J. K., Andes D. R., Crecy-Lagard V. D., Craig W. A., Romesberg. F. E. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance // *PLoS Biol.*- 2005.—V.3. - e176.
15. Koomey M., Gotschlich E. C., Robbins K., S. Bergstrom S., Swanson J. Effects of *recA* mutations on pilus antigenic variation and phase transitions in *Neisseria gonorrhoeae* //*Genetics.*- 1987. -V. 117.-P.391-398.
16. Levinson G., Gutman G. A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution // *Mol. Biol. Evol.*—1987. - V.4. - P.203-221.
17. van Belkum A., Scherer S., van Alphen L.s Verbrugh H. Short sequence DNA repeats in prokaryotic genomes // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 1998. - V.62. -P.275-293.
18. van Belkum A., van Leeuwen W., Scherer S., Verbrugh H. Occurrence and structure-function relationship of pentameric short sequence repeats in microbial genomes // *Res. Microbiol.* - 1999. - V.i50. - P.617-626.
19. Bayliss C. D., van de Ven T., Moxon. E. R. Mutations in *poll* but not *mutSLH* destabilize *Haemophilus influenzae* tetranucleotide repeats // *EMBO J.*-2002. — V.21.-P.1465-1476.
20. Martin P., van de Ven T M. N., Jeffries A. C, Hood D. W., Moxon E. R. Experimentally revised repertoire of putative contingency loci in *Neisseria meningitidis* strain MC58: evidence for a novel mechanism of phase variation // *Mol. Microbiol.* - 2003. —V.50. - P.245-257.
21. Willems R., Paul A., van der Heide H. G., ter Avest A. R., Mooi F. R. Fimbrial phase variation in *Bordetella pertussis*: a novel mechanism for transcriptional regulation // *EMBO J.*—1990—V. 9. - P.2803-2809.
22. Ritz D., Lim J., Reynolds C. M, Poole L. B., Beckwith J. Conversion of a peroxiredoxin into a disulfide reductase by a triplet repeat expansion // *Science.* -2001 -V..294.-P.158-160.
23. Ziebuhr W, W., Krimmer V., Rachid, S. Lossner, I. Gotz F., Hacker J. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: Evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256 // *Mol Microbiol.* - 1999.-V.32.-P.345-356.
24. Perkins-Balding D., Duval-Valentin G., Glasgow A. C. Excision of IS492 requires flanking target sequences and results in circle formation in *Pseudoalteromonas atlantica*//*J. Bacteriol.* - 1999.— V.181. - P.4937-4948.
25. Cerdeno-Tarraga A.M., Patrick S., Crossman L.C., Blakely G., Abratt V., Lennard N., Poxton I., Duerden B., Harris B., Quail M.A., Barron A., Clark L., Corton C, Doggett J., Holden M.T., Larke N., Line A., Lord A., Norbertczak H., Ormond D., Price C, Rabbinowitsch E., Woodward I, Barrell B., Parkhill J. B. *fragilis* Genome Control Variable Gene Expression // *Science* - 2005. — V.307. ~ P. 1463-1465.
26. Klemm P. Two regulatory *fim* genes, *fimB* and *fimE*, control the phase variation of type 1

fimbriae in *Escherichia coli* //EMBO J. -- 1986. - V. 5. - P.1389-1393.

27. McClain M. S., Blomfield I. C., Eisenstein B. I. Roles of *fimB* and *fimE* in site-specific DNA inversion associated with phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. -- 1991.— V.173. -P.5308-5314.

28. Gaily D.L., Rucker T.J., Blomfield I.C. The leucine-responsive regulatory protein binds to the *fim* switch to control phase variation of type 1 fimbrial expression in *Escherichia coli* K-12 // J. Bacteriol. - 1994. - V. 176 - P. 5665-5672.

29. Schwan WR, Lee JL, Lenard FA, Matthews BT, Beck MT. Osmolarity and pH Growth Conditions Regulate *fim* Gene Transcription and Type 1 Pilus Expression in Uropathogenic *Escherichia coli* //Infect. Immun. -2002. - V. 70. -P. 1391 -402.

30. El-Labany S., Sohanpal B.K., Lahooti M., Akerman R.,Blomfield, I.C. Distant cis-active sequences and sialic acid control the expression of *fimB* in *Escherichia coli* K-12 // Mol Microbiol. - 2003. - V. 49. - P. 1109-1118.

31. Sohanpal B.K., El-Labany S., Lahooti M, Plumbridge J.A., Blomfield I.C. Integrated regulatory responses of *fimB* to N-acetylneuraminic (sialic) acid and GlcNAc in *Escherichia coli* K-12 // Proc Natl Acad Sci USA. - 2004.—V. 101: --P. 16322-16327.

32. Roesch P. L., Blomfield I, C. Leucine alters the interaction of the leucine-responsive regulatory protein (Lrp) with the *fim* switch to stimulate site-specific recombination in *Escherichia coli* // Mol. Microbiol. — 1998. - V.27. - P.751-761.

33. Lahooti M, Roesch PL, Blomfield IC Modulation of the Sensitivity of *FimB* Recombination to Branched-Chain Amino Acids and Alanine in *Escherichia coli* K-12 // J. Bacteriol. - 2005. - V.187. - P.6273-6280.

34. Dove S.L., Smith S.G.J., Dorman C.J. Control of *Escherichia coli* type 1 fimbrial gene expression in stationary phase: a negative role for *RpoS* // Mol. Gen. Genet. -1997.-V. 254.-P. 13-20.

35. Aberg A., Shingler V., Balsalobre C. (p)ppGpp regulates type 1 fimbriation of *Escherichia coli* by modulating the expression of the site-specific recombinase *FimB* // Mol. Microbiol. - 2006. - V. 60. - P 1520-1533.

36. O'Gara J.P., Dorman C.J. Effects of local transcription and H-NS on inversion of the *fim* switch of *Escherichia coli*. Mol Microbiol // - 2000. - V. 36. - V. 457-466.

37. Donato G. M., Lelivelt M. J., Kawula T. H. Promoterspecific repression of *fimB* expression by the *Escherichia coli* nucleoid-associated protein H-NS // J. Bacteriol. -- 1997. -V.179. -P. 6618-6625.

38. Muller C.M., Aberg A., Straseviciene J., Emody L, Uhlin BE, et al. Type 1 Fimbriae, a Colonization Factor of Uropathogenic *Escherichia coli*, Are Controlled by the Metabolic Sensor CRP-cAMP // PLoS Pathog. - 2009. - V.5. - N.2. -el 000303.

39. Blyn L. B., Braaten B. A., Low, D. A. Regulation of *pap* pilin phase variation by a mechanism involving differential *dam* methylation states // EMBO J. — 1990. — V. 9.-P.4045-4054.

40. Hernday A., Krabbe M., Braaten B., Low

D. Selfperpetuating epigenetic pili switches in bacteria // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002. - V.99. -- Suppl. 4. - P. 16470-16476.

41. Peterson S. N., Reich N. O. Competitive Lrp and Dam assembly at the *pap* regulator) region: implications for mechanisms of epigenetic regulation // J. Mol. Biol.—2008. - V. 383. -P. 92-105.

42. Xia Y., Gaily D., Forsman-Semb K., Uhlin B.E. (2000) Regulatory cross-talk between adhesin operons in *Escherichia coli*: inhibition of type 1 fimbriae expression by the *PapB* protein // EMBO J. - 2000. - V. 19. - P. 1450-1457.

43. Serkin C. D., Seifert H. S. Iron availability regulates DNA recombination in *Neisseria gonorrhoeae* //Molecular Microbiology. - 2000. - V. 37. —P. 1075-1086

44. Zhang J.R., Norris S.J. Kinetics and in vivo induction of genetic variation of *vlsE* in *Borrelia burgdorferi* // Infect. Immun. - 1998. - V. 66. - P. 3689-3697.

УДК: 615.371: 578.832.1

МЕХАНІЗМИ ТА РЕГУЛЯЦІЯ ФАЗОВИХ , АНТИГЕННИХ ВАРІАЦІЙ БАКТЕРІЙ Колотова Т.Ю., Балуга І.М., Воропай А.Ю., Вальчук С.І., Кучма І.Ю., Волянський А.Ю., Масляничук О.А.

Означено генетичні механізми та регуляція фазових і антигенних варіацій прокаріот. Надано припущення, що на основі вивчення ферментів, каталізуючих перебудови геному, які обумовлюють фазові та антигенні варіації, можливо створювати нові препарати, інгібуючі ферменти та запобігаючи виникненню слідуєчих антигенних варіантів або фазових переключень.. В той час як за традицією прийнято гадати, що процеси генетичних перебудов є випадковими, в статті ретельно розглянуто експериментальні докази регуляції факторами навколишнього середовища фазових та антигенних варіацій. Ряд умов довкілля, контролюючих перебудови ДНК, одночасно є факторами, прогнозуючими зіткнення бактерій з селективними агентами.

Ключові слова: фазові варіації, антигенні варіації, бактерії, перебудови геному, рекомбінація, фактори навколишнього середовища, регуляція

УДК: 615.371: 578.832.1

МЕХАНИЗМЫ И РЕГУЛЯЦИЯ ФАЗОВЫХ И АНТИГЕННЫХ ВАРИАЦИЙ БАКТЕРИЙ Колотова Т.Ю., Балуга И.М., Воропай А.Ю., Вальчук С.И., Кучма И.Ю., Волянский А.Ю., Масляничук О.А.

В статье рассматриваются генетические механизмы и регуляция фазовых и антигенных вариаций прокариот. Предполагается, что на основании изучения ферментов, катализирующих перестройки генома, которые лежат в основе фазовых и антигенных вариаций, можно создавать новые препараты, ингибирующие ферменты и предотвращающие возникновение новых антигенных вариантов или фазовые переключения. В то время как традиционно принято полагать, что процессы генетических перестроек являются случайными, в статье подробно рассмотрены эксперименталь-

ные доказательства регуляции факторами внешней среды фазовых и антигенных вариаций. Более того, некоторые условия внешней среды, контролирующие генетические вариации, являются факторами, прогнозирующими столкновение бактерий с селективными агентами.

Ключевые слова: фазовые вариации, антигенные вариации, бактерии, перестройки генома, рекомбинация, факторы внешней среда, регуляция.

UDC 615.371: 578.832.1

MECHANISMS AND REGULATION OF THE PHASE AND ANTIGENIC VARIATIONS OF BACTERIA

Kolotova T.Yu., Baluta I.M., Voropay A.Yu., Val'chuk S.I., Kuchma I.Yu., Volyanskiy A.Yu., Maslyanchuk O.A.

This article discusses genetic mechanisms and regulation of the phase and antigenic variations of prokaryotes. It is anticipated that studying enzymes catalyzing genome rearrangements, which underlie phase and antigenic variation, gives opportunity to create new drugs inhibiting the enzymes catalytic activity and preventing the emergence of new antigen or phase switching. While traditionally it has been believed that genetic rearrangements are random, article summaries experimental evidence, which prove regulation of the phase and antigenic variations by the environmental conditions. Moreover some conditions of the external environment, controlling genetic variation, are factors that predict the future collision of the bacterial cells with selective agents.

Key words: phase variation, antigenic variations, bacteria, genome rearrangement, recombination, environmental conditions, regulation.