

УДК 577.2

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФЛАГЕЛЛЫ

Обзор

© 2015 И.А. Остерман¹, Ю.Ю. Дихтяр¹,
А.А. Богданов^{1,2}, О.А. Донцова^{1,2}, П.В. Сергиев^{1*}

¹ Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва;
электронная почта: petya@genebee.msu.ru

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва

Поступила в редакцию 17.07.15
После доработки 23.07.15

Флагелла бактерий – это сложнейшая супрамолекулярная структура, представляющая собой одновременно и уникальную систему белкового транспорта, и молекулярную машину, осуществляющую передвижение бактериальной клетки. Каскад регуляции генов компонентов флагеллы и поэтапная сборка этой молекулярной машины тесно скоординированы и представляют собой поражающую воображение регуляторную систему. В обзоре суммированы сведения о строении, сборке и регуляции экспрессии генов флагеллы. Описаны известные в литературе регуляторные механизмы и взаимосвязи процессов регуляции экспрессии генов и сборки флагеллы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: флагелла, подвижность, бактерия, молекулярная машина, регуляция транскрипции.

Подвижность бактерий обеспечивается вращением бактериального жгутика, флагеллы [1]. У многих бактерий, например, у наиболее изученной грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* и родственной ей *Salmonella typhimurium*, служащей популярным объектом для исследования подвижности, наличие флагеллы обязательно и возможен переход между подвижными и неподвижными формами. Безжгутиковые бактерии довольно быстро (в течение десяти дней) вытесняют подвижные штаммы в перемешиваемой среде за счет экономии ресурсов, уходящих на создание и функционирование флагелл. Скорость роста флагеллярных форм бактерий на ~2% ниже таковой для неподвижных форм [2]. В то же время в условиях, когда бактерия вынуждена искать источники питательных веществ или избегать токсичных веществ, подвижность обеспечивает значительное преимущество. Вполне естественно, что экспрессия генов подвижности сложным образом регулируется практически на всех уровнях: транскрипции, трансляции и транспорта. Важно не только регулировать наличие или отсутствие флагеллы, но и строго ко-

ординировать время и уровень экспрессии генов, кодирующих компоненты этого сложного молекулярного мотора.

СТРОЕНИЕ ФЛАГЕЛЛЫ

На клетку такой бактерии, как *E. coli* или *S. typhimurium*, в среднем приходится 5–10 флагелл, расположенных в случайных местах на клеточной поверхности. Каждая из них (рис. 1) состоит из базального тела, длинной наружной нити, состоящей из белка флагеллина, и соединяющего эти две части «крюка» [3]. Флагелла приводится во вращение, а энергия для этого обеспечивается трансмембранным потенциалом [4]. Флагелла – это не только мотор, но и специализированная система транспорта, которая используется при ее самосборке [5]. Транспорт белков, составляющих внеклеточную часть флагеллы, осуществляется через центральную полость этой структуры [6]. На осуществление транспорта также расходуется энергия, запасенная в виде трансмембранного потенциала. Надо заметить, что некоторые патогенные бактерии имеют сходную с флагеллой супрамолекуляр-

* Адресат для корреспонденции.

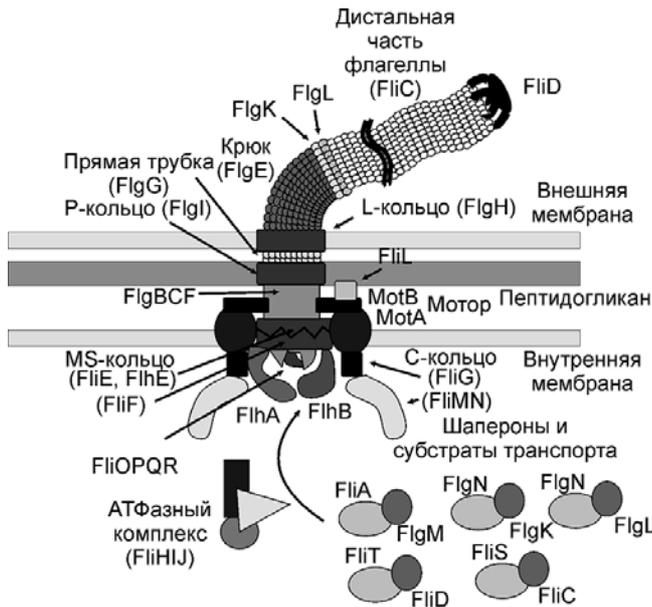


Рис. 1. Строение флагаеллы. Показаны слои внутренней и внешней мембраны, пептидогликановая клеточная стенка, С-, MS-, P- и L-кольца – «подшипники», моторные белки (MotAB), ротор (FlgBCF), прямая трубка, крюк и дистальная часть флагаеллы. Схематично представлены компоненты аппарата транспорта через флагаеллу, АТФазный комплекс, шапероны флагаеллярного транспорта и их субстраты

ную структуру, используемую не для движения, а для инъекции токсинов в клетки эпителия организма-хозяина.

Сборку и функционирование жгутика обеспечивают более чем 60 различных белков [7]. Базальная область флагаеллы наиболее сложная (рис. 1). Часть ее состоит из колец, каждое из которых закреплено в определенном слое клеточной стенки, внутренней и внешней мембранах бактериальной клетки [7]. Кольца образуют своего рода подшипники, внутри которых вращается полая трубка. С-кольцо образует «чашу» с цитоплазматической стороны, MS-кольцо пронизывает внутреннюю мембрану, P-кольцо пронизывает клеточную стенку, а L-кольцо находится в наружной мембране [8]. Моторный комплекс, расположенный в периплазме и закрепленный на внутренней мембране, вращает «вал», приводя в движение наружную полужесткую спиральную белковую нить [4, 9]. Благодаря этому бактериальная клетка способна развивать очень большую скорость – 100 мкм/с, т.е. более 50 длин клетки в секунду.

Нить флагаеллы полая на всем протяжении и представляет из себя, по сути, три аксиально соединенные трубки [2, 10]. Наружная нить бактериального жгутика состоит из флагаеллина, FliC.

В поперечном сечении флагаеллиновой трубки находятся 11 тяжей-протофиламентов, в длину же флагаелла может состоять из ~2000 слоев флагаеллина. Между нитью и базальным телом находится соединяющая их изогнутая структура, крюк (рис. 1), отчетливо видимая на электронных микрофотографиях и отличающаяся от нити жгутика по характеру расположения субъединиц [11]. Крюк представляет собой короткий сегмент правовращающейся спирали, образованный 12 кольцевыми слоями единственного белка, FlgE, организованного почти так же, как и флагаеллин в нити жгутика. Трехмерная реконструкция структуры крюков обнаружила наличие ложбинок, которые позволяют крюку свободно изгибаться, что обеспечивает функционирование крюка как гибкого сочленения для образования пучка нитей жгутиков при плавании клетки. Между крюком и флагаеллой (рис. 1) находятся два кольцевых соединительных мономерных слоя, образованные белками FlgK и FlgL [12]. Со стороны периплазмы к крюку подсоединяется прямая трубка, образованная двумя кольцевыми слоями белка FlgG [8, 10, 13].

Три соединенных трубчатых участка образуются последовательно, начиная с ближайшего к цитоплазме. При сборке каждый из них заканчивается своим кэпирующим белком так, чтобы дистальный конец трубки всегда был закрыт (рис. 2, а–е). Прямая трубка, состоящая из FlgG и пронизывающая пептидогликановый слой, кэпируется FlgJ, имеющим мурамидазную активность [14]. Таким образом, этот кэп служит своего рода «сверлом» клеточной стенки перед растущим концом флагаеллы (рис. 2, а). Крюк имеет собственный кэп, состоящий из белка FlgD [10] (рис. 2, в, г). В собранной флагаелле эти промежуточные кэпирующие белки отсутствуют (рис. 1). Дистальный конец зрелой флагаеллы закрыт кэпом из FliD, взаимодействующим с флагаеллином [15]. Его роль заключается в регулировании присоединения синтезированного в клетке флагаеллина на конце жгутика и защите жгутика от присоединения экзогенного флагаеллина из среды. На всех этапах сборки флагаеллы растет тот ее конец, который более всего удален от клетки, а не ближайший к клетке. Мутанты, у которых инактивирован ген *fliD*, неподвижны из-за потери флагаеллиновой нити, а сами молекулы флагаеллина у такого мутанта уходят в культуральную среду [16]. В отличие от белковых компонентов флагаеллы, транспортируемых через саму полую трубку, компоненты наружных колец транспортируются через Sec-зависимую систему транспорта [17].

С цитоплазматической стороны флагаеллы находится система отбора субстратов для транс-

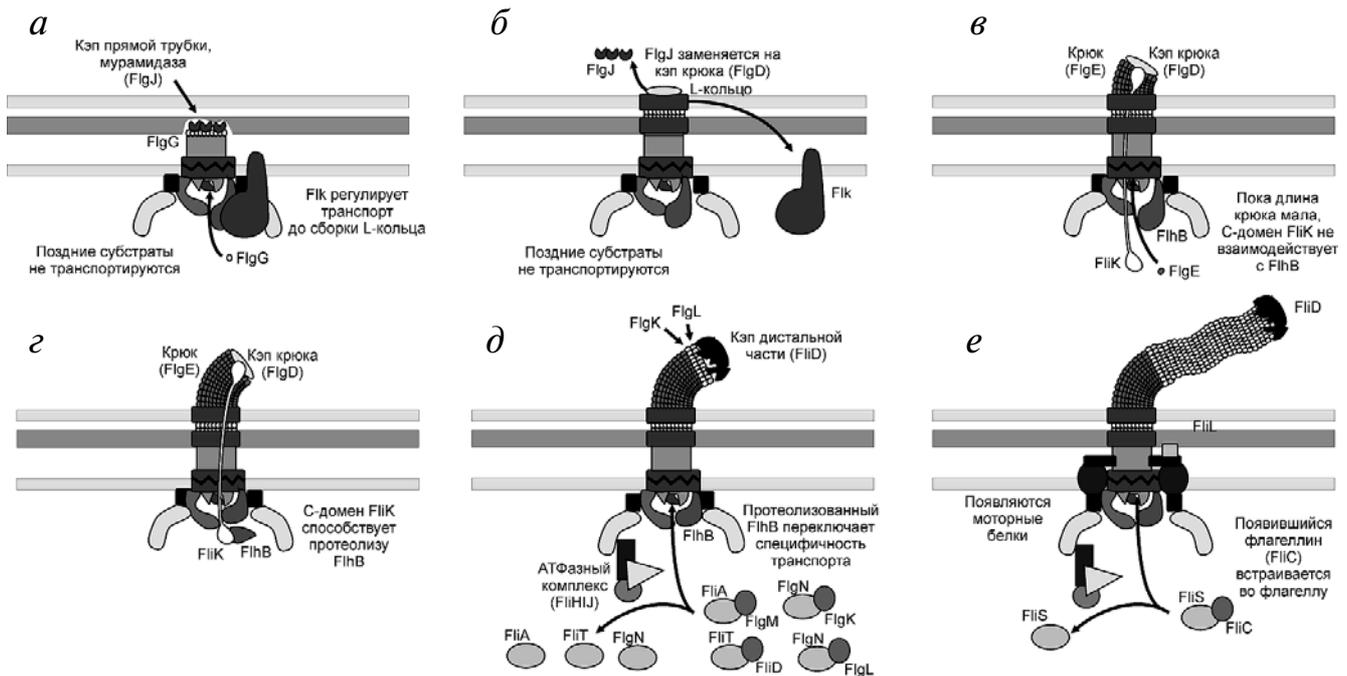


Рис. 2. Этапы сборки флагеллы. *a* – Сборка прямой трубки, гидролиз пептидогликанового слоя кэпом прямой трубки мурамидазой FigJ; *b* – переход к построению крюка, вытеснение кэпа прямой трубки белками L-кольца; *в* – построение крюка, контроль длины крюка белком FliK; *г* – активация автопротеолиза FliH белком FliK; *д* – переключение специфичности флагеллярного экспорта на поздние субстраты, экспорт белков соединения крюка и дистальной части, а также кэпа дистальной части; *е* – экспорт флагеллина и рост дистальной части флагеллы

порта, состоящая из белков FliA и FliB (рис. 1), а также АТФазный комплекс из белков FliH, FliI и FliJ [10]. Гидролиз АТФ нужен не для транспорта, а для селективной доставки субстратов транспорта к основанию флагеллы и, возможно, для их частичного разворачивания [10, 18]. Субстраты транспорта доставляются к флагелле только в виде комплекса с одним из нескольких специфичных транспортных шаперонов (рис. 1), каждый из которых участвует не только в транспорте, но и в регуляции. Транспортируемый белок, связанный с шапероном, взаимодействует с FliI-субъединицей АТФазного комплекса и так доставляется к FliM/FliN-компонентам цитоплазматического С-кольца. FliJ-компонент АТФазы взаимодействует с шаперонами без «груза» и таким образом предотвращает связывание субстратов транспорта, которые уже были доставлены к основанию полой трубки [18].

СБОРКА ФЛАГЕЛЛЫ

Сборка флагеллы происходит последовательно, начиная с цитоплазматических частей и заканчивая дистальными. Правильная последовательность сборки обеспечивается как регуля-

цией экспрессии генов компонентов флагеллы, так и посттрансляционными изменениями белковой структуры этой органеллы (рис. 2). Основная задача заключается в обеспечении строгой последовательности транспорта компонентов через внутреннюю полость флагеллы. Сначала должны транспортироваться компоненты прямой трубки FlgG, потом крюка FlgE, затем соединительных слоев FlgK и FlgL и, наконец, флагеллин FliC (рис. 2). Перед транспортом структурного компонента каждого трубчатого участка должен транспортироваться его кэп, т.е. FlgJ до FlgG, FlgD до FlgE, FliD до FliC. Регуляция транспорта с помощью конформационных и/или ковалентных изменений самой флагеллы имеет то преимущество над регуляцией экспрессии генов, что допускает одновременную координацию создания нескольких флагелл, каждая из которых находится на своей собственной стадии сборки.

Наиболее хорошо изучен механизм переключения транспорта с ранних субстратов на поздние, происходящий по достижении крюком длины ~55 нм [10]. Это переключение, среди прочего, прекращает транспорт FlgE и разрешает транспорт важного регулятора, белка FlgM, и других поздних субстратов, таких как FliC [19],

и является необратимым [20]. Молекулярная основа этого переключения заключается в автопротеолизе белка FlhB (рис. 2, *з*) [10, 17, 21]. Мутанты, у которых нарушено это переключение [22, 23], синтезируют более длинные крюки, в некоторых случаях полностью лишённые внешней, флагеллиновой части флагеллы. Кроме мутаций FlhB, затрудняющих автопротеолиз, к удлинению крюка приводят мутации, инактивирующие ген *fliK* [24]. Белок FliK имеет продолговатую форму [25] и экспортируется через флагеллярную систему экспорта, как ее ранний субстрат [26]. N-домен FliK взаимодействует с белком FlgD, образующим кэп при сборке крюка (рис. 2, *в, з*). C-домен FliK взаимодействует с FlhB, стимулируя автопротеолиз последнего (рис. 2, *з*). Одна из наиболее правдоподобных моделей функционирования FliK заключается в том, что он служит своеобразной линейкой, измеряющей расстояние от кэпа, окончания крюка, до основания базального тела, FlhB (рис. 2, *в, з*). Когда C-домен FliK оказывается точно напротив FlhB, происходит автопротеолиз FlhB. В результате ранние субстраты перестают транспортироваться, а поздние – начинают (рис. 2, *д*) [10]. Этот механизм, будучи точно доказанным для регуляции длины иглы *Yersinia enterocolitica* [27], для *E. coli* и *S. typhimurium* пока только предполагается.

Система переключения специфичности флагеллярного экспорта с помощью FliK оказалась не единственной. Дело в том, что кроме успешной сборки крюка клетке необходимо также контролировать сборку внешних колец Р и L, компоненты которых экспортируются по Sec-зависимому, а не по флагеллярному механизму [17]. Если сборка этих колец нарушена, то сборка крюка начинается, но вскоре приостанавливается до окончания сборки колец [28]. Генетический анализ позволил найти еще один белок-переключатель, Flk [29–31]. Роль Flk в регуляции и локализации трансляции субстратов экспорта через флагеллу была предложена [29], а позднее поставлена под сомнение [32].

Менее изучена система переключения сборки периплазматической прямой трубки на сборку крюка [10, 17]. Прямая трубка, проходящая через пептидогликановый слой клеточной стенки, состоит всего из двух кольцевых слоев белка FlgG и взаимодействует с Р-кольцом [8]. Мутантные формы FlgG, способные к избыточной полимеризации, не могут выйти из периплазмы и образуют удлиненную прямую трубку с множеством Р-колец [10, 33]. Длина этой трубки ограничена регуляторным действием FliK, а если нарушено и функционирование FliK, то прямая трубка заполняет все пространство клетки, рас-

тягивая периплазму [10]. В норме длина прямой трубки ограничивается взаимодействием с внешним кольцом L (рис. 2, *б*), замещающим кэп прямой трубки FlgJ на кэп крюка FlgD [10].

Кроме системы регуляции сборки флагеллы, основанной на конформационных изменениях и протеолизе, функционирует система регуляции экспрессии генов, кодирующих компоненты флагеллы.

ГЕНЫ КОМПОНЕНТОВ ФЛАГЕЛЛЫ

Гены, обеспечивающие сборку и функционирование флагеллы, организованы во множество оперонов (рис. 3) [34]. Опероны бактериального жгутика образуют иерархическую систему по типу регулона, где экспрессия оперонов данного уровня определяет экспрессию оперонов нижних уровней [2]. Основной функциональный смысл этой системы регуляции заключается в том, чтобы, во-первых, «принять решение» о необходимости вообще строить флагеллы, а во-вторых, организовать экспрессию генов в соответствии с последовательностью сборки компонентов флагеллы. Входящие в регулон опероны можно условно разделить на три временных транскрипционных класса: ранние (I), средние (II) и поздние (III) (рис. 3) в зависимости от того, на каком этапе сборки бактериального жгутика включается их экспрессия. Сам процесс включает в себя позитивный и негативный контроль на всех этапах построения жгутика, начиная от транскрипции и заканчивая локализацией белков флагеллярной системы.

РЕШЕНИЕ О СБОРКЕ ФЛАГЕЛЛЫ: РЕГУЛЯЦИЯ *flhDC*-ОПЕРОНА

Сборка и функционирование флагеллы требует значительных ресурсов [2]. Бактериальной клетке необходимо, в зависимости от внешних условий, активировать или инактивировать систему построения флагеллы. Молекулярный механизм этого переключения заключается в экспрессии генов *flhD* и *flhC* (рис. 4), запускающих в дальнейшем весь флагеллярный регулон (рис. 5). Белковые продукты этих генов образуют транскрипционный фактор FlhD₄C₂ [35, 36] и только вместе могут запустить каскад экспрессии генов флагеллы. Соответствующий оперон *flhDC* относится к I классу (рис. 3). Транскрипция *flhDC* зависит от многих внешних сигналов (рис. 4) и осуществляется при помощи промотора, узнающего σ^{70} [37]. В свою очередь промоторы II класса транскрибируются при помо-

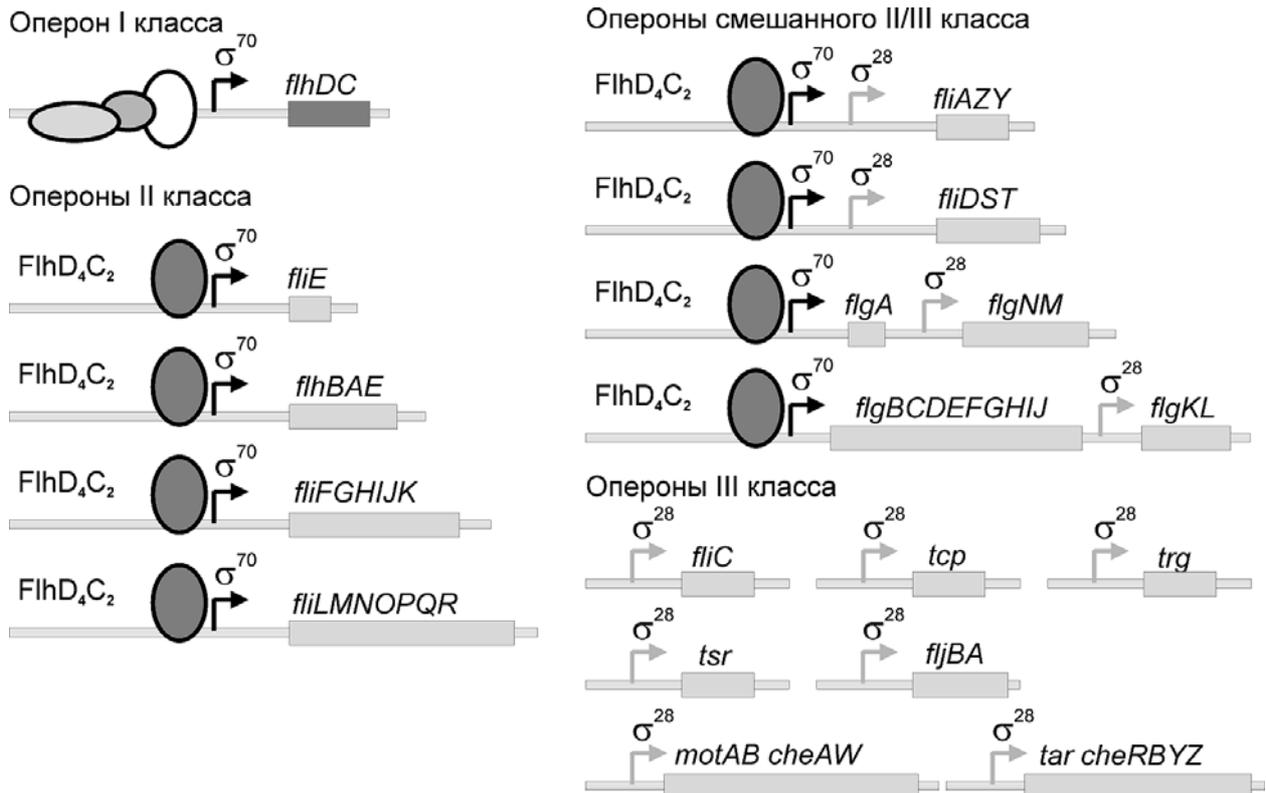


Рис. 3. Строение оперонов флагеллярного регулона. Опероны сгруппированы по классам I, II и III, соответствующим последовательности экспрессии. Стрелками показаны промоторы, узнавание которых зависит от σ^{70} и σ^{28} (подписаны). Темно-серым овалом обозначены участки связывания FlhD₄C₂

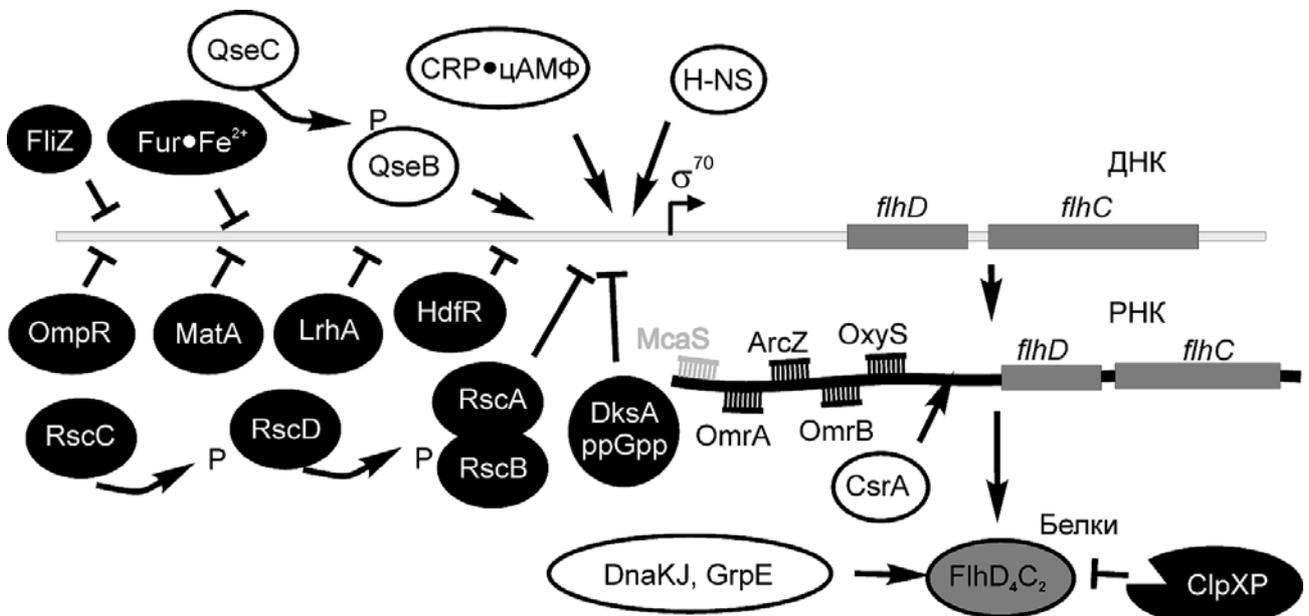


Рис. 4. Схема регуляции экспрессии оперона *flhDC*. Подписаны ДНК (регуляторная область и гены *flhD* и *flhC*), РНК (мРНК *flhDC*) и белки (белковый комплекс FlhD₄C₂). Черным показаны белки и РНК, негативно влияющие либо на экспрессию генов *flhDC*, либо на активность самих белков FlhD₄C₂. Белым или светло-серым показаны положительные регуляторы FlhD₄C₂

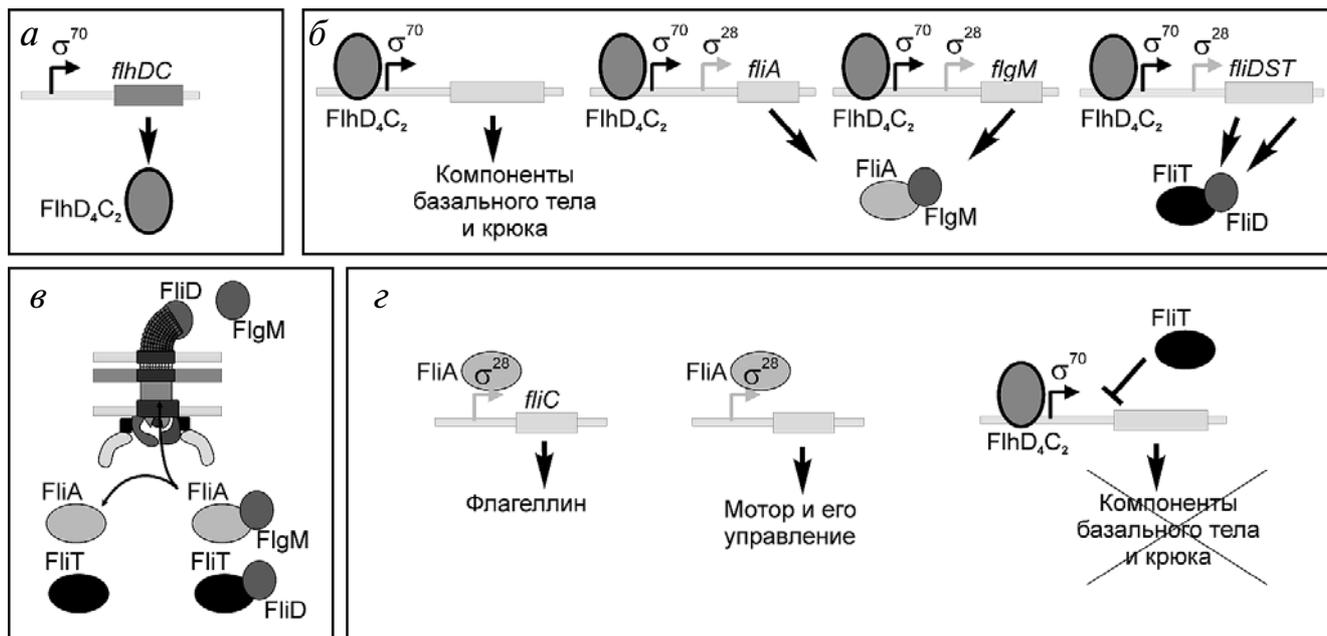


Рис. 5. Схема регуляции флагеллярного регулона. Панели *a–г* соответствуют последовательным стадиям активации регулона. *a* – Активация оперона *flhDC*; *б* – экспрессия оперонов II класса, кодирующих компоненты базального тела и крюка, а также важные регуляторные белки, σ^{28} (FliA), его ингибитор FlgM, репрессор FliT и его ингибитор FliD; *в* – переключение транспортной специфичности флагеллы при завершении формирования крюка, экспорт FlgM и FliD; *г* – экспрессия оперонов III класса, кодирующих флагеллин, компоненты мотора и хемотаксиса, ингибирование промоторов II типа белком FliT

щи РНК-полимеразы, содержащей σ^{70} -фактор, и активируются комплексом FliD₄C₂ [38]. Активация транскрипции происходит при взаимодействии между FliD₄C₂ и α -субъединицей РНК-полимеразы [39]. По-отдельности FliD и FliC не способны активировать транскрипцию генов регулона флагеллы [40]. Кроме генов, имеющих отношение к флагелле, FliD₄C₂ может активировать и несколько генов, не имеющих отношения к флагелле, например, *mglBAC* (перенос галактозы), гены малатдегидрогеназы и ряда ферментов, вовлеченных в процессы анаэробного катаболизма [41].

Промоторная область оперона *flhDC* занимает >200 п.н. со множеством сайтов связывания белков, регулирующих транскрипцию [37] (рис. 4). Клетки, растущие в присутствии глюкозы, не имеют жгутиков [42]. В условиях голода, вызывающего накопление цАМФ, белок-активатор катаболизма CRP активирует транскрипцию оперона *flhDC* наряду с несколькими десятками других оперонов [43]. Комплекс CRP/цАМФ взаимодействует с участком от –61 до –81 *flhDC*. Белок H-NS, также стимулирующий транскрипцию, имеет несколько участков связывания [44]. Белки системы передачи сигналов от клетки к клетке (quorum sensing), QseB и QseC, также ак-

тивируют транскрипцию оперона *flhDC* [45, 46]. Среди репрессоров транскрипции *flhDC* можно найти активатор выростов – фимбрий MatA [47]. По-видимому, флагелла и фимбрии – взаимоисключающие поверхностные структуры. Репрессируют гены *flhDC* репрессоры LrhA [48], OmpR [49], RcsCDB [50, 51], HdfR [52], DksA/ /ppGpp [53], а также Fur и IHF [37].

Кроме регуляторов транскрипции на экспрессию *flhDC* влияет большой набор малых РНК. Малые некодирующие РНК ArcZ, OmgA, OmgB, OxyS ингибируют экспрессию генов оперона *flhDC* [54], в то время как мРНК McaS [55], наоборот, активирует экспрессию генов данного оперона. РНК-связывающий белок CsrA, подавляющий трансляцию многих генов посредством связывания с мРНК, экспрессию оперона *flhDC*, наоборот, активирует, предотвращая деградацию мРНК [56]. Активность FliD₄C₂ регулируется также и на уровне стабильности этих белков [57]. Белки теплового шока положительно влияют на активность FliD₄C₂ [58].

Какой бы сложной не казалась система регуляции экспрессии *flhDC*, результатом ее работы является не плавное изменение, а переключение по принципу «все или ничего». Если экспрессия каскада флагеллярных генов запускается, это

состояние становится необратимым из-за нескольких систем положительной обратной связи.

КАСКАД ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ФЛАГЕЛЛЫ: ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ СИНТЕЗА КОМПОНЕНТОВ ФЛАГЕЛЛЫ И ВЗАИМОСВЯЗЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И СБОРКИ ФЛАГЕЛЛЫ

Появление главного транскрипционного регулятора флагеллы FlhD₄C₂, продукта экспрессии единственного оперона I группы (рис. 5, а), запускает экспрессию нескольких оперонов II группы: *flgAMN*, *flgBCDEFGHIJ*, *flhBAE*, *fliAZY*, *fliDST*, *fliE*, *fliFGHIJK* и *fliLMNOPQR* (рис. 3). На данном этапе FlhD₄C₂ активирует σ^{70} -зависимые промоторы этих оперонов. Перечисленные гены кодируют, в основном, структурные компоненты колец, базального тела и крюка, ранние субстраты флагеллярного транспорта и их шапероны.

Кроме структурных генов опероны II группы кодируют несколько регуляторных белков. Важнейшие среди них – это σ^{28} -фактор [59], кодируемый геном *fliA*, и его ингибитор FlgM [60]. Транскрипция поздних генов флагеллярного регулона, транскрибируемых с промоторов III типа, происходит с участием σ^{28} , а не σ^{70} . Экспрессия поздних генов запускается только после того, как сформируются базальное тело и крюк. На ранних стадиях сборки флагеллы σ^{28} неактивен, поскольку находится в комплексе FliA/FlgM (рис. 5, б) [61], не способном взаимодействовать с РНК-полимеразой.

FlgM – это важнейший сенсор переключения специфичности флагеллярного транспорта. Он может экспортироваться из клетки через флагеллу, но относится к поздним субстратам [62], поэтому подобная транспортировка становится возможной только после завершения формирования крюка (рис. 5, в) [63]. Этот красивый регуляторный механизм предотвращает синтез флагеллина в клетке до тех пор, пока не будет создана возможность для его экспорта и встраивания во флагеллу. После того, как в результате экспорта внутриклеточная концентрация FlgM падает, свободный σ^{28} может связать РНК-полимеразу и активировать зависимые от него промоторы флагеллярной системы III класса (рис. 3 и 5, г) *flgKL*, *fliDST*, *flgMN*, *fliC*, *tar-tap-cheRBYZ*, *motAB-cheAW*, *fliAZY* [64] и гены, отвечающие за направленность движения бактерии, систему хемотаксиса *trg* [65], *tsr* [66], *aer* [67]. Заметим, что довольно много оперонов флагеллярной системы имеют два промотора (рис. 3 и 5): один II класса, а другой III класса. Сам ген *fliA* имеет

два промотора, один из которых (III класса) активен только в присутствии самого σ^{28} . Эта система положительной обратной связи делает необратимым переключение регуляторной системы на синтез флагеллы и, возможно, влияет также на ускоренный синтез компонентов других флагелл, когда первая уже появилась.

Несколько генов имеют только промоторы III класса. Это гены моторной системы флагеллы, системы регуляции вращения мотора (хемотаксиса) и сам флагеллин (рис. 3 и 5, з). По-видимому, вращение мотора до завершения сборки флагеллы и полимеризация флагеллина внутри клетки до появления возможности его экспорта были бы крайне неблагоприятными для бактерии. Задержка в синтезе флагеллина при предварительном накоплении других поздних субстратов флагеллярного транспорта, гены которых имеют промоторы II типа, обеспечивает последним преимущество при экспорте сразу после переключения специфичности FlhV. Это весьма логично, т.к. обеспечивает экспорт белков, образующих сочленение между крюком и дистальной, флагеллиновой частью флагеллы, FlgK и FlgL, после завершения сборки крюка, но до появления флагеллина FliC [68].

Кроме FlgM, ингибитора σ^{28} , в регуляции флагеллярного регулона важную роль играет еще один белок – ингибитор FliT (рис. 4). Штаммы с делецией *fliT* делают примерно в 2 раза больше жгутиков, чем бактерии дикого типа [69]. FliT репрессирует транскрипцию с FlhD₄C₂-зависимых промоторов II класса [70]. До сборки крюка FliT связан с белком FliD и неактивен как репрессор транскрипции [71]. FliD – поздний субстрат флагеллярного экспорта, и поэтому после формирования крюка и автопротеолиза FlhV он покидает клетку и образует кэп флагеллы. Таким образом, в клетке накапливается свободный FliT и ингибирует транскрипцию промоторов II класса, активность которых теперь, после полного завершения сборки крюка и базального тела, уже не нужна [10].

Стоит отметить, что FliT служит шапероном флагеллярного экспорта для FliD [72], так же как FliA для FlgM [73]. Видно, как тесно взаимосвязаны транспортные и регуляторные активности этих пар факторов. Еще один шаперон флагеллярного экспорта FlgN отвечает за транспорт белков FlgK и FlgL [72], соединяющих крюк и дистальную часть флагеллы (рис. 1). Мутации гена *flgN* приводят к пониженной подвижности и наличию только одного или двух жгутиков на клетку, в отличие от нормальных клеток, обладающих 5–10 жгутиками [74]. Дальнейшее исследование позволило установить, что штаммы с мутацией в *flgN* имеют нормаль-

ное количество структур крюк–базальное тело, но только некоторые из них несут прикрепленную нить. Этот фенотип связан с тем, что FlgN необходим для экспорта FlgK и FlgL. Помимо обеспечения транспорта FlgN также выполняет функцию регулятора, как и транспортные шапероны FliA и FliT. Этот белок стимулирует трансляцию мРНК *flgM*, полученную при помощи промотора III класса [75].

Участие в регуляции трансляции постулируется для сенсора сборки Р- и L-колец, регулятора экспорта Flk [29]. Инактивация *flk* на фоне дефекта сборки Р- и L-колец снижает уровень FlgM, не снижая его транскрипцию. На этом основано предположение о том, что Flk стимулирует трансляцию. Позже эта идея была поставлена под сомнение и предположено, что инактивация Flk вызывает избыточный экспорт FlgM и его деградацию в периплазме [32].

В научной литературе имеются сведения о регуляции трансляции мРНК флагеллина. Мутации шпильки, находящейся на 5'-конце не-транслируемой области мРНК *fliC*, достаточно далеко от участка связывания рибосом, подавляют трансляцию этой мРНК [76]. Поиск супрессоров выявил несколько компенсаторных мутаций как в 5'-нетранслируемой области мРНК флагеллина, так и в начале его кодирующей области [77]. Предположительно, начало кодирующей области *fliC* может образовывать РНК-дуплекс с 5'-нетранслируемой областью, образуя сложную вторичную структуру. Среди мутаций, способствующих трансляции мутант-

ных форм мРНК *fliC*, была найдена мутация, приводящая к укорочению FlgM. Дополнительный мутационный анализ позволил предположить у FlgM активность, регулируемую трансляцию *fliC* и не связанную с ингибированием FliA [77].

Изучение сборки флагеллы и регуляции экспрессии ее генов позволило выявить интересный молекулярный механизм. В этом механизме самосборка сложнейшего молекулярного мотора точно координируется конформационными переходами его структуры. Эти переключения, в свою очередь, управляют сложной иерархической системой экспрессии генов. Удивительно, что несколько белков флагеллы имеют множественные функции. Структурные компоненты флагеллы регулируют активность белков – факторов транскрипции, а последние, в свою очередь, необходимы для экспорта первых через флагеллу.

Изучение флагеллы еще не закончено. Недостаточно изучена регуляция трансляции мРНК компонентов флагеллярной системы. Далеко от совершенства наше понимание того, как происходит регуляция числа флагелл, и как влияют друг на друга флагеллы, находящиеся на разных этапах сборки. Наконец, практически неизвестны механизмы демонтажа флагеллы при изменении внешних условий.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-14-00072) и РНФ (гранты 13-04-40211-Н, 14-04-01061, 13-04-00836-а, 15-34-20139).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Patrick, J.E., and Kearns, D.B. (2012) Swarming motility and the control of master regulators of flagellar biosynthesis, *Mol. Microbiol.*, **83**, 14–23.
- Macnab, R.M. (1996) *Escherichia coli and Salmonella* (Neidhardt, F.C., Curtiss, R.I., Ingraham, J.L., Lin, C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., and Umberger, H.E., eds), Am. Soc. Microbiol. Press, Washington, D.C., pp. 123–145.
- Chen, S., Beeby, M., Murphy, G.E., Leadbetter, J.R., Hendrixson, D.R., Briegel, A., Li, Z., Shi, J., Tocheva, E.I., Müller, A., Dobro, M.J., and Jensen, G.J. (2011) Structural diversity of bacterial flagellar motors, *EMBO J.*, **30**, 2972–2981.
- Blair, D.F., and Berg, H.C. (1990) The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor, *Cell*, **60**, 439–449.
- Iino, T. (1969) Polarity of flagellar growth in salmonella, *J. Gen. Microbiol.*, **56**, 227–239.
- Jones, C.J., and Aizawa, S. (1991) The bacterial flagellum and flagellar motor: structure, assembly and function, *Adv. Microb. Physiol.*, **32**, 109–172.
- Метлина А.Л. (2001) Жгутики прокариот как система биологической подвижности, *Успехи биол. химии*, **41**, 229–282.
- Blair, D.F. (2006) Fine structure of a fine machine, *J. Bacteriol.*, **188**, 7033–7035.
- Berg, H.C. (2003) The rotary motor of bacterial flagella, *Annu. Rev. Biochem.*, **72**, 19–54.
- Chevance, F.F., and Hughes, K.T. (2008) Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine, *Nat. Rev. Microbiol.*, **6**, 455–465.
- Samatey, F.A., Matsunami, H., Imada, K., Nagashima, S., Shaikh, T.R., Thomas, D.R., Chen, J.Z., Derosier, D.J., Kitao, A., and Namba, K. (2004) Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism, *Nature*, **431**, 1062–1068.
- Ikeda, T., Asakura, S., and Kamiya, R. (1989) Total reconstruction of *Salmonella* flagellar filaments from hook and purified flagellin and hook-associated proteins *in vitro*, *J. Mol. Biol.*, **209**, 109–114.
- Jones, C.J., Macnab, R.M., Okino, H., and Aizawa, S. (1990) Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*, *J. Mol. Biol.*, **212**, 377–387.
- Hirano, T., Minamino, T., and Macnab, R.M. (2001) The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella* FlgJ, a flagellum-specific muramidase, *J. Mol. Biol.*, **312**, 359–369.

15. Imada, K., Vonderviszt, F., Furukawa, Y., Oosawa, K., and Namba, K. (1998) Assembly characteristics of flagellar cap protein HAP2 of *Salmonella*: decamer and pentamer in the pH-sensitive equilibrium, *J. Mol. Biol.*, **277**, 883–891.
16. Ikeda, T., Kamiya, R., and Yamaguchi, S. (1983) Excretion of flagellin by a short-flagella mutant of *Salmonella typhimurium*, *J. Bacteriol.*, **153**, 506–510.
17. Ferris, H.U., and Minamino, T. (2006) Flipping the switch: bringing order to flagellar assembly, *Trends Microbiol.*, **14**, 519–526.
18. Akeda, Y., and Galan, J.E. (2005) Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion, *Nature*, **437**, 911–915.
19. Hirano, T., Minamino, T., Namba, K., and Macnab, R.M. (2003) Substrate specificity classes and the recognition signal for *Salmonella* type III flagellar export, *J. Bacteriol.*, **185**, 2485–2492.
20. Minamino, T., Doi, H., and Kutsukake, K. (1999) Substrate specificity switching of the flagellum-specific export apparatus during flagellar morphogenesis in *Salmonella typhimurium*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1301–1303.
21. Minamino, T., and Macnab, R.M. (2000) Domain structure of *Salmonella* FlhB, a flagellar export component responsible for substrate specificity switching, *J. Bacteriol.*, **182**, 4906–4914.
22. Fraser, G.M., Hirano, T., Ferris, H.U., Devgan, L.L., Kihara, M., and Macnab, R.M. (2003) Substrate specificity of type III flagellar protein export in *Salmonella* is controlled by subdomain interactions in FlhB, *Mol. Microbiol.*, **48**, 1043–1057.
23. Patterson-Delafield, J., Martinez, R.J., Stocker, B.A., and Yamaguchi, S. (1973) A new *fla* gene in *Salmonella typhimurium* – *flaR* – and its mutant phenotype-superhooks, *Arch. Microbiol.*, **90**, 107–120.
24. Hirano, T., Yamaguchi, S., Oosawa, K., and Aizawa, S. (1994) Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*, *J. Bacteriol.*, **176**, 5439–5449.
25. Minamino, T., Saijo-Hamano, Y., Furukawa, Y., Gonzalez-Pedrajo, B., Macnab, R.M., and Namba, K. (2004) Domain organization and function of *Salmonella* FliK, a flagellar hook-length control protein, *J. Mol. Biol.*, **341**, 491–502.
26. Minamino, T., Gonzalez-Pedrajo, B., Yamaguchi, K., Aizawa, S.I., and Macnab, R.M. (1999) FliK, the protein responsible for flagellar hook length control in *Salmonella*, is exported during hook assembly, *Mol. Microbiol.*, **34**, 295–304.
27. Journet, L., Agrain, C., Broz, P., and Cornelis, G.R. (2003) The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler, *Science*, **302**, 1757–1760.
28. Kubori, T., Shimamoto, N., Yamaguchi, S., Namba, K., and Aizawa, S. (1992) Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*, *J. Mol. Biol.*, **226**, 433–446.
29. Karlinsey, J.E., Tsui, H.C., Winkler, M.E., and Hughes, K.T. (1998) Flk couples flgM translation to flagellar ring assembly in *Salmonella typhimurium*, *J. Bacteriol.*, **180**, 5384–5397.
30. Karlinsey, J.E., Pease, A.J., Winkler, M.E., Bailey, J.L., and Hughes, K.T. (1997) The *flk* gene of *Salmonella typhimurium* couples flagellar P- and L-ring assembly to flagellar morphogenesis, *J. Bacteriol.*, **179**, 2389–2400.
31. Kutsukake, K. (1997) Hook-length control of the export-switching machinery involves a double-locked gate in *Salmonella typhimurium* flagellar morphogenesis, *J. Bacteriol.*, **179**, 1268–1273.
32. Aldridge, P., Karlinsey, J.E., Becker, E., Chevance, F.F., and Hughes, K.T. (2006) Flk prevents premature secretion of the anti-sigma factor FlgM into the periplasm, *Mol. Microbiol.*, **60**, 630–643.
33. Chevance, F.F., Takahashi, N., Karlinsey, J.E., Gnerer, J., Hirano, T., Samudrala, R., Aizawa, S., and Hughes, K.T. (2007) The mechanism of outer membrane penetration by the eubacterial flagellum and implications for spirochete evolution, *Genes Dev.*, **21**, 2326–2335.
34. Komeda, Y., Kutsukake, K., and Iino, T. (1980) Definition of additional flagellar genes in *Escherichia coli* K12, *Genetics*, **94**, 277–290.
35. Kutsukake, K., Ohya, Y., and Iino, T. (1990) Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*, *J. Bacteriol.*, **172**, 741–747.
36. Wang, S., Fleming, R.T., Westbrook, E.M., Matsumura, P., and McKay, D.B. (2006) Structure of the *Escherichia coli* FlhDC complex, a prokaryotic heteromeric regulator of transcription, *J. Mol. Biol.*, **355**, 798–808.
37. Keseler, I.M., Collado-Vides, J., Santos-Zavaleta, A., Peralta-Gil, M., Gama-Castro, S., Muniz-Rascado, L., Bonavides-Martinez, C., Paley, S., Krummenacker, M., Altman, T., Kaipa, P., Spaulding, A., Pacheco, J., Latendresse, M., Fulcher, C., Sarker, M., Shearer, A.G., Mackie, A., Paulsen, I., Gunsalus, R.P., and Karp, P.D. (2011) EcoCyc: a comprehensive database of *Escherichia coli* biology, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 583–590.
38. Chilcott, G.S., and Hughes, K.T. (2000) Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and *Escherichia coli*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 694–708.
39. Liu, X., Fujita, N., Ishihama, A., and Matsumura, P. (1995) The C-terminal region of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase is required for transcriptional activation of the flagellar level II operons by the FlhD/FlhC complex, *J. Bacteriol.*, **177**, 5186–5188.
40. Liu, X., and Matsumura, P. (1994) The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons, *J. Bacteriol.*, **176**, 7345–7351.
41. Pruss, B.M., Liu, X., Hendrickson, W., and Matsumura, P. (2001) FlhD/FlhC-regulated promoters analyzed by gene array and *lacZ* gene fusions, *FEMS Microbiol. Lett.*, **197**, 91–97.
42. Adler, J., and Templeton, B. (1967) The effect of environmental conditions on the motility of *Escherichia coli*, *J. Gen. Microbiol.*, **46**, 175–184.
43. de Crombrughe, B., Busby, S., and Buc, H. (1984) Cyclic AMP receptor protein: role in transcription activation, *Science*, **224**, 831–838.
44. Soutourina, O., Kolb, A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Rimsky, S., Danchin, A., and Bertin, P. (1999) Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the flhDC master operon, *J. Bacteriol.*, **181**, 7500–7508.
45. Sperandio, V., Torres, A.G., Giron, J.A., and Kaper, J.B. (2001) Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *J. Bacteriol.*, **183**, 5187–5197.
46. Sperandio, V., Torres, A.G., and Kaper, J.B. (2002) Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*, *Mol. Microbiol.*, **43**, 809–821.
47. Lehti, T.A., Bauchart, P., Dobrindt, U., Korhonen, T.K., and Westerlund-Wikstrom, B. (2012) The fimbriae activator MatA switches off motility in *Escherichia coli* by repression of the flagellar master operon flhDC, *Microbiology*, **158**, 1444–1455.
48. Lehnen, D., Blumer, C., Polen, T., Wackwitz, B., Wendisch, V.F., and Uden, G. (2002) LrhA as a new tran-

- scriptional key regulator of flagella, motility and chemotaxis genes in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, **45**, 521–532.
49. Shin, S., and Park, C. (1995) Modulation of flagellar expression in *Escherichia coli* by acetyl phosphate and the osmoregulator OmpR, *J. Bacteriol.*, **177**, 4696–4702.
 50. Francez-Charlot, A., Laugel, B., Van Gemert, A., Dubarry, N., Wiorowski, F., Castanie-Cornet, M.P., Gutierrez, C., and Cam, K. (2003) RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the flhDC operon in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, **49**, 823–832.
 51. Gottesman, S., Trisler, P., and Torres-Cabassa, A. (1985) Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes, *J. Bacteriol.*, **162**, 1111–1119.
 52. Lee, C., and Park, C. (2013) Mutations upregulating the flhDC operon of *Escherichia coli* K-12, *J. Microbiol.*, **51**, 140–144.
 53. Lemke, J.J., Durfee, T., and Gourse, R.L. (2009) DksA and ppGpp directly regulate transcription of the *Escherichia coli* flagellar cascade, *Mol. Microbiol.*, **74**, 1368–1379.
 54. De Lay, N., and Gottesman, S. (2012) A complex network of small non-coding RNAs regulate motility in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, **86**, 524–538.
 55. Thomason, M.K., Fontaine, F., De Lay, N., and Storz, G. (2012) A small RNA that regulates motility and biofilm formation in response to changes in nutrient availability in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, **84**, 17–35.
 56. Yakhnin, A.V., Baker, C.S., Vákulskas, C.A., Yakhnin, H., Berezin, I., Romeo, T., and Babinzke, P. (2013) CsrA activates flhDC expression by protecting flhDC mRNA from RNase E-mediated cleavage, *Mol. Microbiol.*, **87**, 851–866.
 57. Kitagawa, R., Takaya, A., and Yamamoto, T. (2011) Dual regulatory pathways of flagellar gene expression by ClpXP protease in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, *Microbiology*, **157**, 3094–3103.
 58. Shi, W., Zhou, Y., Wild, J., Adler, J., and Gross, C.A. (1992) DnaK, DnaJ, and GrpE are required for flagellum synthesis in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **174**, 6256–6263.
 59. Arnosti, D.N., and Chamberlin, M.J. (1989) Secondary y factor controls transcription of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 830–834.
 60. Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H., and Lino, T. (1992) A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*: an anti-sigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific sigma factor, σ^F , *Mol. Microbiol.*, **6**, 3149–3157.
 61. Sorenson, M.K., Ray, S.S., and Darst, S.A. (2004) Crystal structure of the flagellar sigma/anti-sigma complex σ^{28} /FlgM reveals an intact sigma factor in an inactive conformation, *Mol. Cell*, **14**, 127–138.
 62. Kutsukake, K. (1994) Excretion of the anti-sigma factor through a flagellar substructure couples flagellar gene expression with flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*, *Mol. Gen. Genet.*, **243**, 605–612.
 63. Hughes, K.T., Gillen, K.L., Semon, M.J., and Karlinsey, J.E. (1993) Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator, *Science*, **262**, 1277–1280.
 64. Zaslaver, A., Mayo, A.E., Rosenberg, R., Bashkin, P., Sberro, H., Tsalyuk, M., Surette, M.G., and Alon, U. (2004) Just-in-time transcription program in metabolic pathways, *Nat. Genet.*, **36**, 486–491.
 65. Hollands, K., Lee, D.J., Lloyd, G.S., and Busby, S.J. (2010) Activation of σ^{28} -dependent transcription in *Escherichia coli* by the cyclic AMP receptor protein requires an unusual promoter organization, *Mol. Microbiol.*, **75**, 1098–1111.
 66. Kundu, T.K., Kusano, S., and Ishihama, A. (1997) Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase sigmaF holoenzyme involved in transcription of flagellar and chemotaxis genes, *J. Bacteriol.*, **179**, 4264–4269.
 67. Zhao, K., Liu, M., and Burgess, R.R. (2007) Adaptation in bacterial flagellar and motility systems: from regulon members to «foraging»-like behavior in *E. coli*, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 4441–4452.
 68. Brutinel, E.D., and Yahr, T.L. (2008) Control of gene expression by type III secretory activity, *Curr. Opin. Microbiol.*, **11**, 128–133.
 69. Kutsukake, K., Ikebe, T., and Yamamoto, S. (1999) Two novel regulatory genes, *fliT* and *fliZ*, in the flagellar regulon of *Salmonella*, *Genes Genet. Syst.*, **74**, 287–292.
 70. Aldridge, C., Poonchareon, K., Saini, S., Ewen, T., Soloyva, A., Rao, C.V., Imada, K., Minamino, T., and Aldridge, P.D. (2010) The interaction dynamics of a negative feedback loop regulates flagellar number in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Mol. Microbiol.*, **78**, 1416–1430.
 71. Yamamoto, S., and Kutsukake, K. (2006) FliT acts as an anti-FlhD2C2 factor in the transcriptional control of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, *J. Bacteriol.*, **188**, 6703–6708.
 72. Bennett, J.C., Thomas, J., Fraser, G.M., and Hughes, C. (2001) Substrate complexes and domain organization of the *Salmonella* flagellar export chaperones FlgN and FliT, *Mol. Microbiol.*, **39**, 781–791.
 73. Aldridge, P.D., Karlinsey, J.E., Aldridge, C., Birchall, C., Thompson, D., Yagasaki, J., and Hughes, K.T. (2006) The flagellar-specific transcription factor, σ^{28} , is the type III secretion chaperone for the flagellar-specific anti- σ^{28} factor FlgM, *Genes Dev.*, **20**, 2315–2326.
 74. Kutsukake, K., Okada, T., Yokoseki, T., and Iino, T. (1994) Sequence analysis of the *flgA* gene and its adjacent region in *Salmonella typhimurium*, and identification of another flagellar gene, *flgN*, *Gene*, **143**, 49–54.
 75. Karlinsey, J.E., Lonner, J., Brown, K.L., and Hughes, K.T. (2000) Translation/secretion coupling by type III secretion systems, *Cell*, **102**, 487–497.
 76. Aldridge, P., Gnerer, J., Karlinsey, J.E., and Hughes, K.T. (2006) Transcriptional and translational control of the *Salmonella fliC* gene, *J. Bacteriol.*, **188**, 4487–4496.
 77. Rosu, V., Chevance, F.F., Karlinsey, J.E., Hirano, T., and Hughes, K.T. (2006) Translation inhibition of the *Salmonella fliC* gene by the fliC 5' untranslated region, fliC coding sequences, and FlgM, *J. Bacteriol.*, **188**, 4497–4507.

**REGULATION OF FLAGELLAR GENE
EXPRESSION IN BACTERIA****I. A. Osterman¹, Yu. Yu. Dihtyar¹, A. A. Bogdanov¹,
O. A. Dontsova^{1,2}, P. V. Sergiev^{1*}**¹ *M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry,
Moscow 119991, Russia; E-mail: petya@genebee.msu.ru*² *A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia*

Received July 17, 2015

Revision received July 23, 2015

The bacterial flagellum is a supramolecular machine of extreme complexity that combines a specific protein transport system and function of bacterial locomotion. The cascade of gene expression coding for flagellar components deeply interacts with the flagella assembly process, making this process an interesting example of molecular orchestration. This review summarizes available data regarding flagella structure, assembly, and gene expression control. Regulatory mechanisms and checkpoints linking gene expression and flagella assembly are described.

Key words: flagella, motility, bacteria, molecular machine, transcriptional control