© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 579.842.23:579.25].083.1

Е.П. Быстрицкая[1], А.М. Стенкова[1, 2], О.Ю. Портнягина[1, 2], А.В. Ракин[3], В.А. Рассказов[1], М.П. Исаева[1, 2]

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЛАВНОГО ПОРИНА *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* В УСЛОВИЯХ АНТИБИОТИКОВОГО СТРЕССА

[1]ФГБУ науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения РАН 690022, Владивосток; [2]Дальневосточный федеральный Университет, 690950, Владивосток; [3]Институт им. Макса фон Петтенкофера Университета Людвига Максимилиана, 80336, Мюнхен, Германия

Изучена экспрессия ompF-гена, кодирующего основной порин наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis*, в ответ на воздействие антибиотиков разных классов (канамицин и налидиксовая кислота) с использованием двух методологических подходов – ПЦР в режиме реального времени и репортерной флюоресцентной системы. В экспериментах показано, что воздействие обоих антибиотиков приводит к негативной регуляции ompF. При этом налидиксовая кислота вызывает сильное уменьшение экспрессии ompF, тогда как канамицин, для которого использование поринов считается альтернативным транспортным путем проникновения в клетку, лишь незначительно снижает его уровень.

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis; ompF; экспрессия гена; антибиотики; количественная ПЦР; флуоресцентная репортерная система.*

Наличие наружной мембраны (НМ) является отличительным признаком грамотрицательных бактерий. Она состоит из липополисахаридов, белков и фосфолипидов. Порины, порообразующие белки НМ, играют огромную роль в адаптации бактерий, обеспечивая контролируемую проницаемость клеточной стенки для низкомолекулярных соединений, в том числе питательных веществ, метаболитов, токсинов и антибиотиков [1, 2]. Антибиотики могут проникать в бактерию двумя путями: гидрофобные вещества способны проходить непосредственно через липидный бислой, гидрофильные – посредством поринов [3, 4]. Роль поринов в развитии антибиотикоустойчивости была доказана многочисленными исследованиями [5, 6], в ходе которых показано, что устойчивость сопровождается изменением профиля поринов, появлением различных мутаций в пориновых генах, снижением их экспрессии и даже полным «выключением».

OmpF является основным в количественном отношении порином у многих грамотрицательных бактерий. Уровень экспрессии данного белка изменяется в значительных пределах в ответ на изменения условий окружающей среды. Для некоторых энтеробактерий показано, что негативная регуляция ompF-гена, которая приводит к уменьшению числа пор в НМ, является общим механизмом повышения устойчивости к гидрофильным антибиотикам [7, 8]. В отношении грамотрицательной бактерии *Y. pseudotuberculosis*, возбудителя псевдотуберкулезной инфекции, механизмы регуляции экспрессии OmpF-порина в условиях антибиотикового стресса не изучены. Псевдотуберкулез является серьезной проблемой для Российской Федерации, поскольку на ее территории циркулируют несколько вариантов возбудителя, среди которых так называемый дальневосточный патогенный тип чаще вызывает системную инфекцию [9].

При изучении экспрессии генов использование нескольких взаимодополняющих методов обеспечивает более полное представление о функционировании гена. В последние годы хорошо зарекомендовал себя метод количественной ПЦР, позволяющий оценить уровень транскрипции гена. Однако этот метод недостаточно информативен в отношении генов, имеющих посттранскрипционную регуляцию. К таким генам относятся бактериальные порины [4]. Репортерные системы позволяют оценить экспрессию с учетом посттранскрипционной регуляции. Такие системы получают введением в бактериальные клетки репортерных генов, которые в паре с чувствительными компонентами, способными отвечать на химические или физические воздействия, переводят клеточный ответ в детектируемый сигнал [10]. В качестве репортерных генов хорошо зарекомендовали себя гены флюоресцентных белков (GFP, RFP и др.) [11]. Преимуществом использования генов флюоресцентных белков в отличие от других систем является возможность детекции их флюоресценции без дополнительных субстратов и нарушения метаболизма клеток, что важно в биомедицинских исследованиях [12].

Целью данной работы является определение роли регуляции экспрессии ompF-гена – главного неспецифического порина *Y. pseudotuberculosis* в формировании антибиотикорезистентного фенотипа бактерии с использованием репортерной флюоресцентной системы и ПЦР в режиме реального времени.

Материалы и методы

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) антибиотика. МИК антимикробных препаратов (канамицина и налидиксовой кислоты) определяли методом серийных двукратных разведений. Для этого бактериальную культуру штамма *Y. pseudotuberculosis* IP32953 наращивали в течение 18 ч при 28^0 С в жидкой среде LB при интенсивной аэрации (200 об/мин) с добавлением разных концентраций исследуемых антибиотиков (0–256 мкг/мл). После этого визуально определяли наименьшую концентрацию антибиотика, при которой отсутствовал бактериальный рост.

Штамм и условия культивирования. В работе был использован штамм *Y. pseudotuberculosis* IP32953. Бактериальную культуру выращивали в течение ночи в жидкой питательной среде LB при температуре 28^0 С при интенсивной аэрации (200 об/мин). Полученную суспензию клеток разбавляли в 50 раз и культивировали при 28^0 С до логарифмической фазы роста (OD_{600} 0,4–0,5), после чего инкубировали в течение 1 ч с добавлением МИК антибиотиков. Клеточный осадок собирали центрифугированием и обрабатывали RNA protect Bacteria Reagent (Qiagen) для стабилизации суммарной РНК.

ПЦР в режиме реального времени. Суммарную РНК выделяли, используя Aurum Total RNA mini KIT («Bio-Rad») в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию и качество РНК определяли с помощью электрофореза в агарозном геле и на спектрофотометре Genesys 6 (Thermo Scientific). кДНК (из 2 мкг мРНК) синтезировали с использованием набора

Таблица 1

Праймеры, используемые в работе

Название	Последовательность	Назначение праймера	Длина, п.н.
OmpF-R	ATGAATCACCACCGAACACT	Амплификация ompF	20
OmpF-F	CAAGACGGCAACGCAAC		17
16SRT-R	CTTGATTTCCCACCATTACG	Амплификация 16S rDNA	20
16SRT-F	ATTTAGCCGAGATGCTTTAG		20
OmpFBam_for	ttaggatccACGCACGCCGAGAAATGCCA	Амплификация ompF-промотора	29
OmpFBam_rev	ttaggatccAGCTGGGATTACTACTGCAA		29
OmpFHind_for	tttaagcttGTCAAACTTAACGAGGCAGTT	Амплификация ompF-терминатора	30
OmpFHind_rev	tttaagcttGGCCGATAGACAGAGTAATCT		30
pACYC-Sal_seq	ATAAGTGCGGCGACGATAGT	Секвенирование репортерных вставок	20
pACYC-EcV_seq	AGGCATAGGCTTGGTTAT		18

Примечание. Праймеры были сконструированы с помощью программ Primer Premier 5 и Vector NTI Advance 9.1.0 и синтезированы ЗАО «Евроген», Москва.

MMLV RT kit («Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. В дальнейшем образцы использовали в ПЦР в режиме реального времени с генспецифичными праймерами (табл. 1). Реакции проводили с использованием GoTaq ДНК-полимеразы («Promega», США) и флюоресцентного интеркалирующего красителя Eva Green («Biotium», США) согласно рекомендациям производителей на амплификаторе iCycler iQ5 («Bio-Rad»). Реакцию осуществляли в следующих условиях: начальная денатурация при 94°С – 8 мин; 35 циклов, включающих 15 с при 94°С, 10 с при 55°С и 20 с при 72°С. Для подтверждения уникальности обнаруженных продуктов амплификации по окончании каждой реакции анализировали кривую плавления продукта ПЦР. Для каждого образца реакцию выполняли в трех повторах.

Полученные результаты стандартизовали относительно уровня транскрипции гена «домашнего хозяйства» 16S rDNA. В качестве контроля определяли экспрессию ompF в штамме *Y. pseudotuberculosis* без обработки антибиотиками. Уровень экспрессии генов оценивали с помощью метода относительных измерений ΔΔCt. Расчет средних значений и стандартного отклонения, а также построение графиков осуществляли в программах Statistica 6.0 и Microsoft Excel 2010.

Получение репортерной флюоресцентной конструкции на основе низкокопийного плазмидного вектора. Репортерная кассета состояла из промоторной части *ompF*-гена, включающей всю 5`-нетранслируемую область и первые девять кодонов сигнальной последовательности OmpF, из кодирующей последовательности красного флюоресцентного белка (RFP) и из терминаторной части *ompF*-гена, содержащей его стоп-кодон (рис. 1). Сборку репортерной кассеты проводили с помощью ПЦР-амплификации. Для ompF-гена были сконструированы праймеры (см. табл. 1), позволяющие амплифицировать промоторную и терминаторную части гена. Для эффективной сборки кассеты в праймеры были введены дополнительные сайты рестрикции: в праймеры на промотор – сайт для BamHI, а в праймеры на терминатор – HindIII.

Для получения кодирующей части гена флюоресцентного белка использовали вектор pTurboRFP-B ("Евроген", Россия), который был обработан BamHI- и HindIII-рестриктазами ("Fermentas", Литва) и далее дефосфорилирован с помощью САР щелочной фосфатазы ("Fermentas", Литва). ПЦР-фрагменты регуляторных элементов гена *ompF* рестрицировали теми же эндонуклеазами, очищали от компонентов ПЦР и рестрикции и лигировали без промежуточного клонирования. Далее лигазную смесь использовали в качестве матрицы для ПЦР-амплификации репортерной кассеты с помощью прямого праймера на последовательность промотора и обратного праймера на последовательность терминатора. ПЦР-фрагменты ожидаемой длины (1300–1400 п.н.) вырезали из агарозного геля.

ПЦР-амплификацию проводили в реакционной смеси объемом 50 мкл, включающей 1· буфер для GoTaq ДНК-полимеразы, 200 мкМ дНТФ, по 50 пмоль прямого и обратного праймеров, 2,5 ед. GoTaq ДНК-полимеразы и 25–50 нг ДНК-матрицы, при следующем температурном режиме: 1) предварительная денатурация геномной ДНК при 95°С – 5 мин; 2) 30 циклов: денатурация при 94°С – 20 с, отжиг при 55–60°С – 30 с; синтез при 72°С – 1 мин 30 с; 3) достройка ПЦР-фрагментов при 72°С – 5 мин. Результаты реакции анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле.

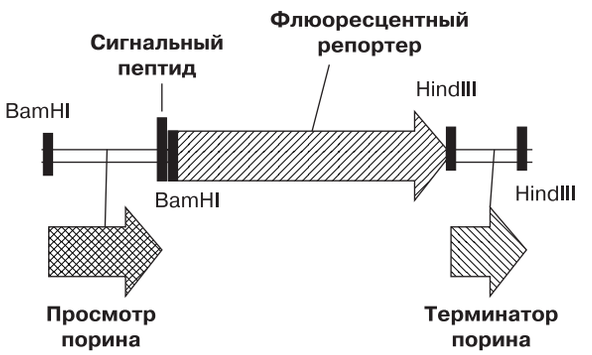


Рис. 1. Схематическое изображение репортерной флюоресцентной кассеты.

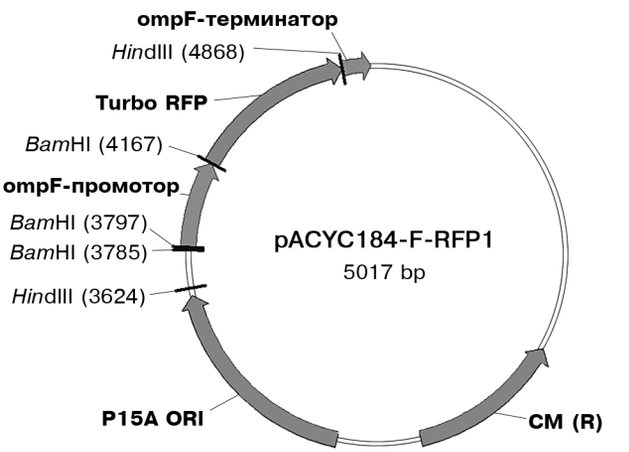


Рис. 2. Схематическое изображение репортерной флюоресцентной конструкции для *ompF* с RFP в низкокопийном векторе pACYC184.

Полученную с помощью ПЦР-амплификации репортерную кассету фосфорилировали с помощью Т4-полинуклеотидкиназы («Fermentas", Литва) и клонировали в дефосфорилированный низкокопийный вектор pACYC184 по EcoRV-сайтам (рис. 2).

Флюоресцентную конструкцию на основе плазмидного вектора ввели в клетки штамма E. coli DH5alpha с помощью электропорации. Отбор рекомбинантных клонов проводили по устойчивости к хлорамфениколу. Для подтверждения приобретения клетками конструктов проводили ПЦР-скрининг колоний с использованием праймеров на промоторную и терминаторную область ompF. Клоны, в которых обнаруживали фрагменты соответствующей длины, проверяли на отсутствие мутаций секвенированием с использованием праймеров pACYC_Sal-seq и pACYC_EcV-seq. Результирующие рекомбинантные плазмиды вводили в компетентные клетки штамма *Y. pseudotuberculosis* IP32953 путем электропорации.

Флюоресцентный анализ. Флюоресценцию клеток рекомбинантного штамма и анализ активности репортерного гена оценивали с использованием спектрофлуориметра FL-600 («Bio-Tek», США). Все эксперименты проводили в двух повторах. Определяли влияние репортерной конструкции на рост рекомбинантного штамма. Установлено, что изменение интенсивности флюоресценции RFP соответствует изменению количества клеток в процессе роста бактериальной культуры.

Для измерений на спектрофлуориметре FL-600 рекомбинантный штамм *Y. pseudotuberculosis*, несущий низкокопийную плазмиду и экспрессирующий красный флюоресцентный белок RFP под контролем поринового промотора *ompF* (pACYC_F-RFP), культивировали в 25 мл среды LB при интенсивной аэрации и температуре 28°C до логарифмической стадии роста, после чего инкубировали в течение трех часов с МИК антибиотиков. Суспензию клеток (100 мкл) переносили в микропланшет и проводили измерения показателей абсорбции (OD_{600}, нм) и флюоресценции ($\lambda_{возб.}$ 530/$\lambda_{исп.}$ 590). В качестве контроля использовали рекомбинантный штамм *Y. pseudotuberculosis* IP32953, культивируемый без добавления антибиотиков.

Результаты и обсуждение

Определение чувствительности *Y. pseudotuberculosis* IP32953 к антибиотикам. Согласно единичным исследованиям природной устойчивости к антибиотикам, штаммы *Y. pseudotuberculosis*, как правило, чувствительны к аминогликозидам и хинолонам [13, 14]. В данной работе для изучения влияния антимикробных препаратов на экспрессию основного порина использовали два антибиотика: канамицин (Km), относящийся к классу аминогликозидов, и налидиксовую кислоту (NA), относящуюся к классу хинолонов. Для каждого антибиотика методом серийных разведений определяли чувствительность штамма *Y. pseudotuberculosis* IP32953 в виде МИК антибиотика, при которой наблюдали видимое ингибирование роста клеток (табл. 2). Полученные нами результаты свидетельствуют о наличии у штамма IP32953 умеренной устойчивости к обоим антибиотикам, значения МИК антибактериальных препаратов почти в 10 раз превышают таковые для штаммов *Y. pseudotuberculosis* в ранее проведенных исследованиях [14]. Существует устойчивое мнение (основанное всего на нескольких публикациях [13, 14]) о чувствительности штаммов *Y. pseudotuberculosis* к широкому спектру антибактериальных препаратов. Однако в нашем исследовании штамм IP32953 (выделенный от пациента) продемонстрировал умеренную устойчивость, по крайней мере к исследуемым антибиотикам. Это противоречие, возможно, свидетельствует о недостаточном числе исследований, проведенных в данном направлении. Понимание проблемы антибиотикоустойчивости может получить новое развитие в свете геномных и протеомных исследований штаммов *Y. pseudotuberculosis* [15–17].

Таблица 2

Минимальные ингибирующие концентрации антибиотиков для штамма *Y. pseudotuberculosis* IP32953

Антибиотик	МИК, мкг/мл
Канамицин	32
Налидиксовая кислота	64

Примечание. Праймеры были сконструированы с помощью программ Primer Premier 5 и Vector NTI Advance 9.1.0 и синтезированы ЗАО «Евроген», Москва.

Исследование экспрессии ompF-гена *Y. pseudotuberculosis* IP32953. Для определения экспрессии ompF в условиях антибиотикового стресса мы использовали два методологических подхода: 1) ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), позволяющую количественно определить уровень транскрипции *ompF*; 2) репортерную систему, в которой ген красного флюоресцентного белка находится под контролем *ompF*-промотора и позволяющую оценить экспрессию с учетом посттранскрипционной регуляции.

ОТ-ПЦР в реальном времени проводили согласно протоколу (см. "Материалы и методы"). Результаты ОТ-ПЦР по исследованию регуляции экспрессии *ompF*-гена *Y. pseudotuberculosis* IP32953 в условиях действия антибиотиков канамицина и налидиксовой кислоты представлены на рис. 3. В ходе проведения экспериментов было установлено, что относительный уровень транскрипции *ompF*-гена при воздействии Km снижается примерно в 2,5 раза, тогда как NA вызывает уменьшение транскрипции в 25 раз.

Для учета посттранскрипционной регуляции и сравнения с данными, полученными методом ОТ-

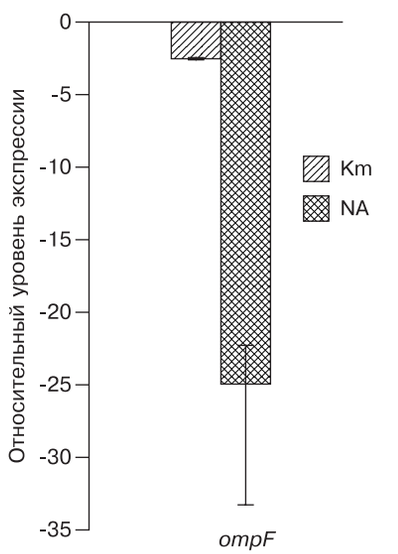
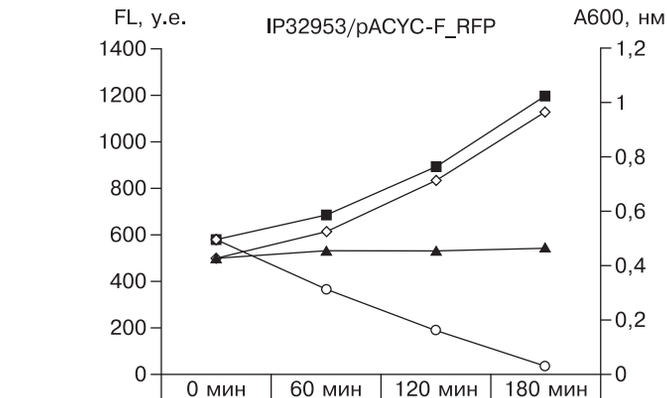
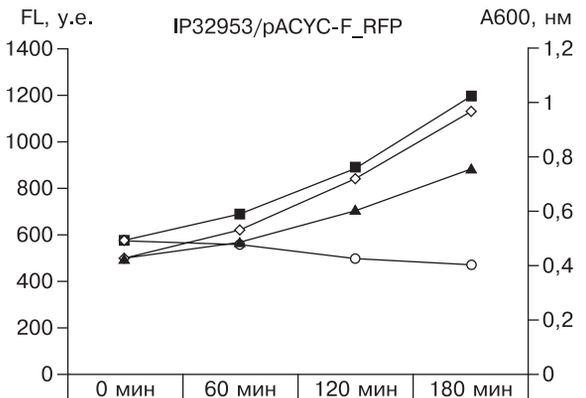


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии гена *ompF* в штамме *Y. pseudotuberculosis* IP32953 при воздействии канамицина (Km) и налидиксовой кислоты (NA).

В качестве контроля использовали экспрессию *ompF* в штамме *Y. pseudotuberculosis* IP32953, культивируемом без антибиотиков. Столбцы отражают результаты измерений трех повторов с учетом стандартного отклонения.



	0 мин	60 мин	120 мин	180 мин
FLNA-	578	690	893	1195
FLNA+	578	371	194	43
A600 NA-	0,43	0,53	0,72	0,97
A600 NA+	0,43	0,46	0,46	0,47



	0 мин	60 мин	120 мин	180 мин
FLKm-	578	690	893	1195
FLKm+	578	558	498	475
A600 Km-	0,43	0,53	0,72	0,97
A600 Km+	0,43	0,49	0,61	0,76

Рис. 4. Влияние антибиотиков на рост клеточной культуры рекомбинантного штамма *Y. pseudotuberculosis* IP32953/pACYC-F_RFP.
По оси ординат – флюоресценция (FL) и абсорбция (A600), по оси абсцисс – время инкубации. NA-, Km- – культивирование штамма без антибиотиков, NA+ – культивирование штамма с МИК налидиксовой кисолоты, Km+ – культивирование штамма с МИК канамицина.

ПЦР в режиме реального времени, мы сконструировали репортерную плазмиду на основе низкокопийного вектора pACYC184 (см. "Материалы и методы"). Результаты эксперимента, показывающие изменения интенсивности флюоресценции штамма IP32953/pACYC_F-RFP при инкубации с Km или NA, представлены на рис. 4. Полученные данные согласуются с результатами ОТ-ПЦР в режиме реального времени, указывая на негативную регуляцию OmpF порина в ответ на действие антибиотиков в общем, и демонстрируя значительное уменьшение экспрессии в ответ на действие NA, в частности.

В отношении антибактериальных препаратов аминогликозидного ряда, к которым относится Km, мнения о механизме прохождения антибиотика через НМ расходятся. В исследованиях мутантных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* описано прохождение аминогликозидов непосредственно через липидный бислой мембраны при взаимодействии с липополисахаридами [18–20]. Этот механизм согласуется с поликатионной природой аминогликозидов, которые содержат от 3 до 5 положительных зарядов. Другой транспортный путь, исследованный на *E. coli*, предполагает прохождение аминогликозидов через поры НМ [21, 22]. Это предположение основывается на данных о наличии в OmpF-порине сайта связывания с поликатионными соединениями, включая Km [23]. Однако в некоторых исследованиях с использованием мутантных штаммов энтеробактерий, дефицитных по ompF порину, не обнаружено значительного изменения в чувствительности этих штаммов к аминогликозидам. Предполагается, что порины могут использоваться антибиотиками аминогликозидного ряда в качестве альтернативного транспортного пути [23–26].

В отличие от молекулы канамицина молекула налидиксовой кислоты в 2 раза меньше и обладает гидрофобными свойствами. Штаммы, устойчивые к NA, встречаются у представителей многих родов *Enterobacteriaceae*, в том числе и у иерсиний [27, 28]. Во многих исследованиях наблюдали более очевидную связь между чувствительностью штамма к антибиотику (NA) и уровнем экспрессии поринов [29, 30]. Так, в мутантных штаммах *E. coli*, дефицитных по *ompF*-гену, наблюдали значительное увеличение МИК к NA по сравнению с диким штаммом [29].

В данном исследовании впервые предпринята попытка определить уровень экспрессии OmpF-порина *Y. pseudotuberculosis* в условиях антибиотикового стресса с использованием двух разных взаимодополняющих подходов – ОТ-ПЦР в режиме реального времени и репортерной системы. Полученные данные согласуются и органично дополняют имеющиеся представления о влиянии антибиотиков на экспрессию главных поринов энтеробактерий. Дальнейшие исследования предполагают расширение спектра генов поринов и антибактериальных препаратов для получения более целостной картины глобальной регуляции поринов при формировании антибиотикорезистентного фенотипа бактерии.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 11-08-00978-а; Министерства образования и науки РФ, соглашение № 14.132.21.1326 и программы Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология", № 12-I-П6-10.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Alphen W.V., Boxtel R.V., Selm N.V., Lugtenberg B.* Pores in the outer membrane of Escherichia coli K12. Involvement of proteins b and c in the permeation of cephaloridine and ampicillin. FEMS Microbiol. Lett. 1978; 3: 103–6.
2. *Nikaido H.* Porins and specific channels of bacterial outer membranes. Mol. Microbiol. 1992; 6(4): 435–42.
3. *Nikaido H.* Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. J. Biol. Chem. 1994; 269: 3905–8.
4. *Nikaido H.* Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003; 67: 593–656.
5. *Davin-Regli A., Bolla J.M., James C.E., Lavigne J.P., Chevalier J., Garnotel E.* et al. Membrane permeability and regulation of drug influx and efflux in enterobacterial pathogens. Curr. Drug Targets. 2008; 9: 750–9.
6. *Pagès J.M., James C.E., Winterhalter M.* The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 2008; 6: 893–903.

7. *Quinn J.P., Dubek E.S., Divinceuzo C.A., Lucks D.A., Lerner S.*A. Emergence of resistance to imipenem during therapy for Pseudomonas aeruginosa infections. J. Infect. Dis. 1986; 154: 289-94.
8. *Tzouvelekis L.S., Tzelepi E., Kaufmann H.E., Mentis A.F.* Nucleotide sequence of a plasmid-mediated cephalosporinase gene (blaLAT-1) found in Klebsiella pneumoniae. J. Med. Microbiol. 1994; 40: 403–7.
9. *Fukushima H., Matsuda Y., Seki R., Tsubokura M., Takeda N., Shubin F.N.* et al. Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen Yersinia pseudotuberculosis-derived mitogen, and the high-pathogenicity island among Yersinia pseudotuberculosis strains. J. Clin. Microbiol. 2001; 39(10): 3541–7.
10. *Biran I., Rissin D., Ron E., Walt D.* Optical imaging fiber-based live bacterial cell array biosensor. Anal. Biochem. 2003; 315(1): 106–13.
11. *Roberto F., Barnes J., Bruhn D.* Evaluation of a GFP reporter gene construct for environmental arsenic detection. Talanta. 2002; 58(1): 181–8.
12. *Sagi E., Hever N., Rosen R., Bartolome A., Premkumar J., Ulber R.* et al. Fluorescence and bioluminescence reporter functions in genetically modified bacterial sensor strains. Sens. Actuators. B. Chem. 2003; 90: 2–8.
13. *Soriano F., Vega J.* The susceptibility of Yersinia to eleven antimicrobials. J. Antimicrob. Chemother. 1982; 10: 543–7.
14. *Martins C.H., Bauab T.M., Falcao D.P.* Characteristics of Yersinia pseudotuberculosis isolated from animals in Brazil. J. Appl. Microbiol. 1998; 85: 703–7.
15. *Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E.* Yersinia pestis, the cause of plague, is a recently emerged clone of Yersinia pseudotuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999; 96: 14043–8.
16. *Chain P.S.G., Carniel E., Larimer F.W., Lamerdin J., Stoutland P.O., Regala W.M.* et al. Insights into the evolution of Yersinia pestis through whole-genome comparison with Yersinia pseudotuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004; 101(38): 13826–31.
17. *Eppinger M., Rosovitz M.J., Fricke W.F., Rasko D.A., Kokorina G., Fayolle C.* et al. The complete genome sequence of Yersinia pseudotuberculosis IP31758, the causative agent of Far East scarlet-like fever. PLoS Genetics. 2007; 3(8): 1508–23.
18. *Hancock R.E.W., Raffle V.J., Nicas T.I.* Involvement of the outer membrane in gentamicin and streptomycin uptake and killing in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother. 1981; 19: 777–85.
19. *Nicas T.I., Hancock R.E.W.* Outer membrane protein H1 of Pseudomonas aeruginosa: involvement in adaptive and mutational resistance to ethylenediaminetetraacetate, polymyxin B, and gentamicin. J. Bacteriol. 1980; 143: 872–8.
20. *Hancock R.E.W., Farmer S.W., Li Z., Poole K.* Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and OmpF porin of Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother. 1991; 35(7): 1309–14.
21. *Nakae R., Nakae T.* Diffusion of aminoglycoside antibiotics across the outer membrane of Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother. 1982; 22: 554–9.
22. *Agafitei O., Kim E.J., Maguire T., Sheridan J.* The role of Escherichia coli porins OmpC and OmpF in antibiotic cross resistance induced by subinhibitory concentrations of kanamycin. J. Exp. Microbiol. Immunol. 2010; 14: 34–9.
23. *Kobayashi Y., Nakae T.* The mechanism of ion selectivity of OmpF-porin pores of Escherichia coli. Eur. J. Biochem. 1985; 151: 231–6.
24. *Sanders C.C., Sanders W.E., Richard Jr., Goering V., Werner V.* Selection of multiple antibiotic resistance by quinolones, beta-lactams, and aminoglycosides with special reference to cross-resistance between unrelated drug classes. Antimicrob. Agents Chemother. 1984; 26(6): 797–801.
25. *Mortimer P.G.S., Piddock L.J.V.* The accumulation of five antibacterial agents in porin-deficient mutants of Escherichia coli. J. Antimicrob. Chemother. 1993; 32: 195–213.
26. *Esfahani A.G., Keogh J., Mosley T., Shahablou S.* Role of OmpF and OmpC in kanamycin-induced resistance to kanamycin and transient cross-resistance to ampicillin in Escherichia coli K12. J. Exp. Microbiol. Immunol. 2010; 14: 28–33.
27. *Navia M.M., Ruiz J., Ribera A., de Anta M.T.J., Vila J.* Analysis of the mechanisms of quinolone resistance in clinical isolates of Citrobacter freundii. J. Antimicrob. Chemother. 1999; 44(6): 743–8.
28. *Sanchez-Cespedes J., Navia M.M., Martínez R., Orden B., Millan R., Ruiz J., Vila J.* Clonal dissemination of Yersinia enterocolitica strains with various susceptibilities to nalidixic acid. J. Clin. Microbiol. 2003; 41(4): 1769–71.
29. *Friedman S.M., Hossain M., Hasson T.H., Kawamura A.* Gene expression profiling of intrinsic thermotolerance in Escherichia coli. Curr. Microbiol. 2006; 52(1): 50–4.
30. *Lin X., Li H., Wang C., Peng X.* Proteomic analysis of nalidixic acid resistance in Escherichia coli: identification and functional characterization of OM proteins. J. Proteome Res. 2008; 7: 2399–405.

Поступила 17.12.13

REGULATION OF YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS MAJOR PORIN EXPRESSION IN RESPONSE TO ANTIBIOTIC STRESS

E. P. Bystritskaya[1], A. M. Stenkova[1,2], O. Y. Portnyagina[1,2], A. V. Rakin[3], V. A. Rasskazov[1], M. P. Isaeva[1,2]

[1]Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia; [2]Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia; [3]Max von Pettenkofer Institute for Hygiene and Clinical Microbiology, Ludwig Maximilian University, Munich, Germany

The OmpF porin gene expression in Yersinia pseudotuberculosis in response to antibiotics of two different classes (kanamycin and nalidixic acid) was analyzed using quantitative PCR and a fluorescence reporter system. Both antibiotics downregulated the expression of the ompF gene. The nalidixic acid significantly reduced ompF expression, while kanamycin, for which porins are considered to be an alternative transport route, only slightly reduced the ompF level.

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis, ompF, gene expression, antibiotics, quantitative RT-PCR, fluorescent reporter system*