

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *slyA* У ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *ERWINIA AMYLOVORA*

К. Ю. ПЕСОЦКАЯ¹⁾, Д. В. СОРОКИН¹⁾, А. Л. ЛАГОНЕНКО²⁾, А. Н. ЕВТУШЕНКОВ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

²⁾Альгимед Техно, Логойский тракт, 22/1, 220090, г. Минск, Беларусь

Аннотация. Исследовано влияние соединений различной химической природы на активность промотора транскрипционного регулятора SlyA. В результате установлено, что перекись водорода и полимиксин В индуцируют экспрессию гена *slyA*. Также отмечено, что под действием белка SlyA активируется транскрипция генов *slyA*, *yhcN* и *ohrA*. Сделан вывод о том, что протестированные растительные фенольные соединения (салициловая, хлорогеновая, ванилиновая, кофейная, коричневая, парагидроксibenзойная и феруловая кислоты) в физиологических концентрациях не регулируют экспрессию гена *slyA*.

Ключевые слова: *Erwinia amylovora*; регулятор SlyA; растительные фенольные соединения; полимиксин В; перекись водорода; экспрессия генов.

THE REGULATION OF *slyA* GENE EXPRESSION IN PHYTOPATHOGENIC BACTERIA *ERWINIA AMYLOVORA*

K. Yu. PESOTSKAYA^a, D. V. SOROKIN^a, A. L. LAGONENKO^b, A. N. EVTUSHENKOV^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^bAlgimed Techno, 22/1 Lagojski Tract, Minsk 220090, Belarus

Corresponding author: K. Yu. Pesotskaya (karina345678@mail.ru)

Abstract. The work investigated the effect of compounds of different chemical nature on the activity of the promoter of the transcriptional regulator SlyA. As a result, it was found that hydrogen peroxide and polymyxin B induce *slyA* gene expression. It was also noted that the SlyA protein activates the transcription of the *slyA*, *yhcN*

Образец цитирования:

Песоцкая КЮ, Сорокин ДВ, Лагоненко АЛ, Евтушенков АН. Регуляция экспрессии гена *slyA* у фитопатогенных бактерий *Erwinia amylovora*. Экспериментальная биология и биотехнология. 2025;3:48–61.
EDN: AACPJN

For citation:

Pesotskaya KYu, Sorokin DV, Lagonenko AL, Evtushenkov AN. The regulation of *slyA* gene expression in phytopathogenic bacteria *Erwinia amylovora*. Experimental Biology and Biotechnology. 2025;3:48–61. Russian.
EDN: AACPJN

Авторы:

Карина Юрьевна Песоцкая – старший преподаватель кафедры молекулярной биологии биологического факультета.
Дмитрий Владимирович Сорокин – студент биологического факультета. Научный руководитель – К. Ю. Песоцкая.
Александр Леонидович Лагоненко – кандидат биологических наук, доцент; руководитель группы по технологии генетической и белковой инженерии.
Анатолий Николаевич Евтушенков – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры молекулярной биологии биологического факультета.

Authors:

Karina Yu. Pesotskaya, senior lecturer at the department of molecular biology, faculty of biology.
karina345678@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0004-6475-0115>
Dmitry V. Sorokin, student at the faculty of biology.
px.dima03@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0008-7045-6376>
Alexander L. Lagonenko, PhD (biology), docent; head of the genetic and protein group.
lagonenkoal@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-7939-0659>
Anatoli N. Evtushenkov, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of molecular biology, faculty of biology.
evtushenkov@bsu.by
<https://orcid.org/0000-0002-2755-6979>

and *ohrA* genes. It was concluded that the tested plant phenolic compounds (salicylic, chlorogenic, vanillic, caffeic, cinnamic, *p*-hydroxybenzoic and ferulic acids) in physiological concentrations do not regulate *slyA* gene expression.

Keywords: *Erwinia amylovora*; SlyA regulator; plant phenolic compounds; polymyxin B; hydrogen peroxide; gene expression.

Введение

Регуляция экспрессии генов прокариот главным образом осуществляется на уровне инициации транскрипции, что достигается с помощью регуляторных белков, которые связываются со специфическими последовательностями ДНК, в результате чего происходит репрессия или активация транскрипции. Важным вариантом контроля транскрипции является аутогенный контроль (саморегуляция), который может быть как негативным, так и позитивным. Регуляция собственной экспрессии (путем связывания с ДНК или РНК) обнаружена у некоторых ферментов (треонил-тРНК-синтетазы, пролиндегидрогеназы, биотин-протеин-лигазы и др.). Для многих транскрипционных регуляторов (белка cI фага λ , аргининового репрессора (ArgR), метионинового репрессора (MetJ), триптофанового репрессора (TrpR), активатора транскрипции EutR *Escherichia coli* и др.) также характерен такой тип регуляции экспрессии собственных генов [1].

Одним из семейств транскрипционных регуляторов является семейство белков MarR (*multiple antibiotic resistance regulator*). Как правило, у прокариот белки этого семейства регулируют активность генов, отвечающих за вирулентность, стрессовые реакции, формирование биопленок и выведение из бактериальной клетки широкого спектра токсичных веществ – антибиотиков, фенольных соединений, активных форм кислорода, а также бытовых моющих и дезинфицирующих средств [2; 3]. Некоторые белки, принадлежащие к семейству MarR, активируют транскрипцию генов (например, ExpG у *Sinorhizobium meliloti*, PrhN у *Ralstonia solanacearum*), однако большинство представителей этого семейства подавляют экспрессию генов (например, PecS у *Dickeya dadantii*) [4; 5]. Известно, что регулятор SlyA принимает участие в контроле вирулентности у *Enterococcus faecalis*, *Dickeya zeae*, *D. dadantii*, *Salmonella enterica*, синтеза экзополисахаридов и подвижности бактериальных клеток у *D. dadantii*, а также устойчивости клеток к окислительному стрессу у *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium [6–9]. Для бактерий *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium показана регуляция активности белка SlyA фенольными соединениями растительного происхождения (в частности, салицилатом) [10].

Бактериальный ожог плодовых культур – некротическое заболевание, поражающее различные виды растений, принадлежащие к семейству Rosaceae, включая яблоню (*Malus domestica* (Suckow) Borkh.) и грушу (*Pyrus communis* L.), которые являются основными хозяевами возбудителя болезни. С момента первого описания в конце XVIII в. бактериальный ожог распространился по всему миру и в настоящее время обнаруживается в странах Европы, Азии, Ближнего Востока, Северной Африки, а также в Новой Зеландии. Возбудителем данного заболевания является бактерия *Erwinia amylovora*, внесенная в список A2 перечня вредителей Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений (*European and Mediterranean Plant Protection Organisation*, EPPO) [11].

При воздействии на растение различных стрессовых факторов окружающей среды в его клетках накапливаются фенольные соединения. Световой стресс активирует синтез флавоноидов и фенольных кислот, температурный стресс – синтез флавоноидов, танинов и фенольных кислот, засоление – синтез полифенолов, флавоноидов, антоцианов, фенольных кислот и терпеноидов [12]. Заражение патогенами приводит к накоплению в растительных клетках фенольных соединений, подавляющих жизнедеятельность микроорганизмов, а также вызывающих развитие системной приобретенной устойчивости [12]. В различных растениях обнаруживаются разные фенольные соединения, например в яблоках содержится мирицетин, в бананах – галловая кислота (гидроксibenзойная кислота), в гранатах содержатся кверцетин и цианидин, в апельсинах – паракумаровая кислота и нарингенин, в клубнике – ванилиновая кислота и ресвератрол, в манго – феруловая кислота и апигенин, в арбузе и ананасе присутствует лютеолин [12]. В растениях семейства Rosaceae синтезируются следующие фенольные кислоты: салициловая, хлорогеновая, ванилиновая, кофейная, коричная, феруловая, галловая, синапиновая, сиреневая, гентизиновая, эллаговая и др. [13].

Роль белка – регулятора транскрипции SlyA, обнаруженного у бактерий *E. amylovora*, остается невыясненной. Именно по этой причине целью данной работы стало изучение экспрессии гена *slyA*, кодирующего регулятор семейства MarR у бактерий *E. amylovora*, а также анализ его реакции на различные потенциальные лиганды растительного происхождения.

Материалы и методы исследования

Использованные в работе штаммы бактерий, плазмиды и праймеры приведены в табл. 1 и 2. Бактерии выращивались при температуре 28 °C (*E. amylovora*) и 37 °C (*E. coli*) в полноценной питательной среде LB и синтетической минимальной среде M9 с добавлением глицерина (2 мл/л) в качестве источника углерода. Состав среды LB: пептон – 10,0 г/л; дрожжевой экстракт – 5,0 г/л; NaCl – 8,5 г/л. Состав среды M9: Na₂HPO₄ · 7H₂O – 12,8 г/л; KH₂PO₄ – 3,0 г/л; NH₄Cl – 1,0 г/л; NaCl – 0,5 г/л; MgSO₄ · 7H₂O – 0,246 г/л; CaCl₂ – 0,011 г/л [14]. Использованные в рамках исследования полноценные питательные среды стерилизовались автоклавированием при 1 атм в течение 40 мин. Синтетическая минимальная среда M9 стерилизовалась кипячением на протяжении 30 мин.

Таблица 1

Использованные в работе штаммы бактерий и плазмиды

Table 1

Bacterial strains and plasmids used in this study

Штамм или плазида	Характеристика	Источник
<i>Штаммы бактерий</i>		
<i>E. amylovora</i> E2	Штамм дикого типа, выделенный из <i>Malus</i> sp. в Беларуси в 2007 г. (код доступа в базе данных GenBank NZ_CP024970.1)	[15]
<i>E. amylovora</i> E2 Δ <i>slyA</i>	Δ <i>slyA</i> -мутант; Km ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
<i>E. amylovora</i> E2-pUA66	Штамм <i>E. amylovora</i> дикого типа, трансформированный плазмидой pUA66	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2-Ps	Штамм <i>E. amylovora</i> дикого типа, трансформированный плазмидой pUA66-P <i>slyA</i> ; Km ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2 Δ <i>slyA</i> -Ps	Δ <i>slyA</i> -мутант штамма дикого типа <i>E. amylovora</i> E2, трансформированный плазмидой pUA66-P <i>slyA</i> ; Km ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2-PsCs	Штамм <i>E. amylovora</i> дикого типа, трансформированный плазмидами pUA66-P <i>slyA</i> и pFLAG-CTC- <i>slyA</i> ; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2 Δ <i>slyA</i> -PsCs	Δ <i>slyA</i> -мутант штамма дикого типа <i>E. amylovora</i> E2, трансформированный плазмидами pUA66-P <i>slyA</i> и pFLAG-CTC- <i>slyA</i> ; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2-PsC	Штамм <i>E. amylovora</i> дикого типа, трансформированный плазмидами pUA66-P <i>slyA</i> и pFLAG-CTC; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2 Δ <i>slyA</i> -PsC	Δ <i>slyA</i> -мутант штамма дикого типа <i>E. amylovora</i> E2, трансформированный плазмидами pUA66-P <i>slyA</i> и pFLAG-CTC; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2-PyCs	Штамм <i>E. amylovora</i> дикого типа, трансформированный плазмидами pUA66-P <i>yhcn</i> и pFLAG-CTC- <i>slyA</i> ; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2 Δ <i>slyA</i> -PyCs	Δ <i>slyA</i> -мутант штамма дикого типа <i>E. amylovora</i> E2, трансформированный плазмидами pUA66-P <i>yhcn</i> и pFLAG-CTC- <i>slyA</i> ; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2-PyC	Штамм <i>E. amylovora</i> дикого типа, трансформированный плазмидами pUA66-P <i>yhcn</i> и pFLAG-CTC; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ

Окончание табл. 1
Ending of the table 1

Штамм или плаزمида	Характеристика	Источник
E2 $\Delta slyA$ -PyC	$\Delta slyA$ -мутант штамма дикого типа <i>E. amylovora</i> E2, трансформированный плазмидами pUA66-Pyhcn и pFLAG-CTC; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2-PaCs	Штамм <i>E. amylovora</i> дикого типа, трансформированный плазмидами pUA66-PohrA и pFLAG-CTC-slyA; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2 $\Delta slyA$ -PaCs	$\Delta slyA$ -мутант штамма дикого типа <i>E. amylovora</i> E2, трансформированный плазмидами pUA66-PohrA и pFLAG-CTC-slyA; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2-PaC	Штамм <i>E. amylovora</i> дикого типа, трансформированный плазмидами pUA66-PohrA и pFLAG-CTC; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
E2 $\Delta slyA$ -PaC	$\Delta slyA$ -мутант штамма дикого типа <i>E. amylovora</i> E2, трансформированный плазмидами pUA66-PohrA и pFLAG-CTC; Km ^R , Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K m _K ⁺), <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> deoR, <i>gyrA96</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
Плазмиды		
pUA66	Экспрессионный репортерный вектор; pSC101 ori, <i>gfpmut2</i> под контролем исследуемого промотора; Km ^R	[16]
pFLAG-CTC	<i>tac</i> -Промотор, fl ori, oriV _{ColE1} , <i>lacZα</i> , <i>lacI</i> , <i>bla</i> ; Ap ^R	[17]
pUA66-PslyA	Предполагаемая промоторная область гена <i>slyA</i> штамма <i>E. amylovora</i> E2 (координаты в геноме 1 802 264–1 802 661 п. н.) встроена по сайтам XhoI/BamHI в pUA66; Km ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
pUA66-Pyhcn	Предполагаемая промоторная область гена <i>yhcn</i> штамма <i>E. amylovora</i> E2 (координаты в геноме 3 419 974–3 420 505 п. н.) встроена по сайтам XhoI/BamHI в pUA66; Km ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
pUA66-PohrA	Предполагаемая промоторная область гена <i>ohrA</i> штамма <i>E. amylovora</i> E2 (координаты в геноме 3 717 724–3 717 919 п. н.) встроена по сайтам XhoI/BamHI в pUA66; Km ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
pFLAG-CTC-slyA	Открытая рамка считывания гена <i>slyA</i> штамма <i>E. amylovora</i> E2 (AD997_RS08560) встроена по сайтам HindIII/SalI в pFLAG-CTC; Ap ^R	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ

Примечание. Принятые обозначения и сокращения: Km^R и Ap^R – устойчивость к канамицину и ампициллину соответственно; п. н. – пара нуклеотидов.

Таблица 2

Использованные в работе праймеры

Table 2

Primers used in this study

Праймер	Последовательность нуклеотидов (5'–3')	Назначение
SlyPRF	CCGCTCGAGTTTCTCCCTGAAATGTCATTAATG	Клонирование промотора гена <i>slyA</i>
SlyPRR	CGCGGATCCTGTCAACTCCTTATAATTAGCCTGC	
yhcnF	GAACCTCGAGACCTTCCGCTCCTCTGTCGCCCCGCC	Клонирование промотора гена <i>yhcn</i>
yhcnR	AGTGGATCCGCAGGCCAAAGGCCGCGATAGTGGT	

Окончание табл. 2
Ending of the table 2

Праймер	Последовательность нуклеотидов (5'–3')	Назначение
ohrAPf	GCTCGAGCGCTGAAAAGCGAGCTTGAA	Клонирование промотора гена <i>ohrA</i>
ohrAPr	ATCGGATCCACCGGTGGCTTTTGCTTTTG	
SF1cl	AGATAAGCTTTGGCTTGATAGTAAGCAGGC	Клонирование открытой рамки считывания гена <i>slyA</i>
SF2cl	AGGCGTCGACTTATGCATCCCTTCCATGC	

Геномная ДНК бактерий *E. amylovora* E2 выделялась с использованием набора Bacteria DNA Preparation – Solution Kit (*Jena Bioscience*, Германия) согласно инструкции производителя. Плазмиды выделялись из клеток бактерий с помощью метода щелочного лизиса [14].

Последовательность промотора гена *slyA* была амплифицирована посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием соответствующих праймеров с введенным на 5'-конец сайтом узнавания для рестриктазы XhoI или BamHI (см. табл. 2). Параметры амплификации: 1 цикл 94 °C, 5 мин; 30 циклов 94 °C, 30 с, 60 °C, 30 с и 72 °C, 25 с; 1 цикл 72 °C, 5 мин. В работе был использован амплификатор SureCycler-8800 (*Agilent Technologies*, США). После амплификации полученные ПЦР-продукты подвергались электрофоретическому разделению в 1 % агарозном геле. Последовательность открытой рамки считывания гена *slyA* была амплифицирована методом ПЦР с использованием соответствующих праймеров с введенным на 5'-конец сайтом узнавания для рестриктазы HindIII или SalI (см. табл. 2). Параметры амплификации: 1 цикл 94 °C, 5 мин; 30 циклов 94 °C, 30 с, 58 °C, 30 с и 72 °C, 30 с; 1 цикл 72 °C, 5 мин. После амплификации полученные ПЦР-продукты подвергались электрофоретическому разделению в 1 % агарозном геле. Последовательность промотора гена *yhcN* была амплифицирована методом ПЦР с использованием соответствующих праймеров с введенным на 5'-конец сайтом узнавания для рестриктазы XhoI или BamHI (см. табл. 2). Параметры амплификации: 1 цикл 94 °C, 5 мин; 30 циклов 94 °C, 30 с, 67 °C, 30 с и 72 °C, 35 с; 1 цикл 72 °C, 5 мин. После амплификации полученные ПЦР-продукты подвергались электрофоретическому разделению в 1 % агарозном геле. Последовательность промотора гена *ohrA* была амплифицирована методом ПЦР с использованием соответствующих праймеров с введенным на 5'-конец сайтом узнавания для рестриктазы XhoI или BamHI (см. табл. 2). Параметры амплификации: 1 цикл 94 °C, 5 мин; 30 циклов 94 °C, 30 с, 60 °C, 30 с и 72 °C, 30 с; 1 цикл 72 °C, 5 мин. После амплификации полученные ПЦР-продукты подвергались электрофоретическому разделению в 1 % агарозном геле.

Далее полученные последовательности подвергались одновременной обработке рестриктазами по методикам, рекомендованным фирмой-производителем (*Thermo Fisher Scientific*, США). Для рестрикции плазмиды pUA66 и последовательностей промоторов генов *slyA*, *yhcN* и *ohrA* применяли ферменты XhoI и BamHI. Плазмида pFLAG-CTC и последовательность открытой рамки считывания гена *slyA* рестрицировались с использованием ферментов HindIII и SalI.

Легирование последовательностей промоторов генов *slyA*, *yhcN* и *ohrA* и вектора pUA66, открытой рамки считывания гена *slyA* и вектора pFLAG-CTC проводилось с применением ДНК-лигазы бактериофага T4 (*Thermo Fisher Scientific*) согласно стандартным методикам, предложенным фирмой-производителем.

Компетентные клетки штамма *E. coli* DH5α трансформировались полученной лигазной смесью методом кальциевой трансформации, после чего высевались на агаризованную среду LB с канамицином (50 мкг/мл) или ампициллином (100 мкг/мл). Скрининг (анализ) трансформантов осуществлялся посредством ПЦР с использованием необходимых праймеров (см. табл. 2). Результаты анализа визуализировались с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле.

Компетентные клетки штаммов *E. amylovora* E2, E2 Δ*slyA*, E2-Ps, E2 Δ*slyA*-Ps трансформировались полученными рекомбинантными плазмидами методом электропорации на приборе компании *BioRad* (США), после чего высевались на агаризованную среду LB с канамицином (50 мкг/мл) или ампициллином (100 мкг/мл). Скрининг трансформантов осуществлялся методом ПЦР с использованием необходимых праймеров (см. табл. 2). Результаты анализа визуализировались с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле.

Для изучения влияния растительных фенольных соединений на активность промотора гена *slyA* были выбраны фенольные кислоты, которые согласно литературным данным синтезируются в клетках растений семейства Rosaceae, а именно салициловая, хлорогеновая, ванилиновая, кофейная, коричная, парагидроксибензойная и феруловая кислоты. Изучение влияния различных веществ на активность промотора гена *slyA* проводилось путем измерения уровня экспрессии репортерного гена *gfp*, содержащегося в плазмиде.

миде pUA66. Уровень экспрессии белка GFP определялся по флуоресценции клеток различных штаммов *E. amylovora* на приборе CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Германия), так как накопление белка GFP в клетках бактерий служит репортером скорости инициации транскрипции с исследуемой промоторной области [16]. Бактериальные культуры штаммов *E. amylovora* выращивались в минимальной среде M9 в присутствии антибиотика канамицина (50 мкг/мл), после чего суспензии клеток объемом 200 мкл вносились в лунки 96-луночного планшета (Sarstedt, Австрия). Далее к бактериальной культуре добавлялся раствор необходимого соединения в соответствующей концентрации. Уровень флуоресценции, выраженный в относительных флуоресцентных единицах (*relative fluorescence units*, RFU), рассчитывался по нижеприведенным формулам.

$$NF = \frac{RF}{Ab}, \quad (1)$$

где NF – нормализованное значение флуоресценции (*normalised fluorescence*); RF – значение флуоресценции, полученное в эксперименте (*raw fluorescence*); Ab – оптическая плотность культуры клеток при длине волны 600 нм в момент изучения флуоресценции (*absorbance*).

$$CF = NF_{\text{оп. обр}} - NF_{\text{контр. обр}}, \quad (2)$$

где CF – уровень флуоресценции (*corrected fluorescence*); $NF_{\text{оп. обр}}$ – нормализованное значение флуоресценции, полученное для исследуемого штамма *E. amylovora* (опытный образец); $NF_{\text{контр. обр}}$ – нормализованное значение флуоресценции, полученное для штамма *E. amylovora*, содержащего плазмиду pUA66 (контрольный образец) [18].

Изучение регуляции транскрипции генов *slyA*, *yhcn* и *ohrA* проводилось путем измерения уровня экспрессии репортерного гена *gfp*. Уровень экспрессии белка GFP определялся по флуоресценции клеток различных штаммов *E. amylovora* на приборе CLARIOstar Plus. Бактериальные культуры штаммов *E. amylovora* выращивались в минимальной среде M9 в присутствии 0,01 ммоль/л изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид и соответствующих антибиотиков до оптической плотности 0,2–0,3 при длине волны 600 нм, после чего суспензии клеток объемом 200 мкл вносились в лунки 96-луночного планшета (Sarstedt). Уровень флуоресценции, выраженный в относительных флуоресцентных единицах (RFU), рассчитывался по формулам (1) и (2).

Статистическая обработка результатов проводилась в программе *GraphPad Prism* (версия 8). Для проверки отклонения от нормального распределения применялся обладающий наибольшей мощностью тест Шапиро – Уилка. При выявлении нормального распределения для оценки достоверности различий при сравнении значений двух выборок использовался *t*-критерий Стьюдента для независимых выборок в модификации Уэлча (сравнение средних величин без какого-либо предположения о равенстве дисперсий), а для оценки достоверности различий при сравнении значений трех и более выборок применялись критерии Брауна – Форсайта и Уэлча. При выявлении распределения, отличного от нормального, для оценки достоверности различий при сравнении значений двух выборок использовался *U*-критерий Манна – Уитни. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Каждый эксперимент проводился в восьми биологических повторах.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследования авторы попытались изучить влияние уровня экспрессии гена *slyA* на активность собственного промотора. С этой целью была проанализирована активность промотора гена *slyA* в штаммах *E. amylovora* дикого типа и мутантных штаммах при наличии и отсутствии в клетках плазмиды, комплементирующей мутацию гена *slyA*. Для постановки данного эксперимента использовались следующие производные штамма *E. amylovora* E2: E2-PsC (штамм дикого типа с плазмидами pUA66-Ps*slyA* и pFLAG-CTC), E2-PsCs (штамм дикого типа с плазмидой pUA66-Ps*slyA* и плазмидой pFLAG-CTC-*slyA*, комплементирующей мутацию гена *slyA*), Δ*slyA*-PsC (делеционный мутант по гену *slyA* с плазмидами pUA66-Ps*slyA* и pFLAG-CTC) и Δ*slyA*-PsCs (делеционный мутант по гену *slyA* с плазмидой pUA66-Ps*slyA* и плазмидой pFLAG-CTC-*slyA*, комплементирующей мутацию гена *slyA*).

Как видно из рис. 1, спустя 24 ч инкубации уровень экспрессии промотора гена *slyA* у клеток делеционного мутанта Δ*slyA*-PsC был в 1,8 раза ниже, чем у клеток штамма E2-PsC. Замена «пустой» векторной плазмиды pFLAG-CTC штамма E2-PsC на рекомбинантную плазмиду с копией гена *slyA* (pFLAG-CTC-*slyA*; штамм E2-PsCs) повысила исследуемую промоторную активность в 1,4 раза. Эти данные свидетельствуют об активаторной роли белка SlyA в отношении промотора собственного гена.

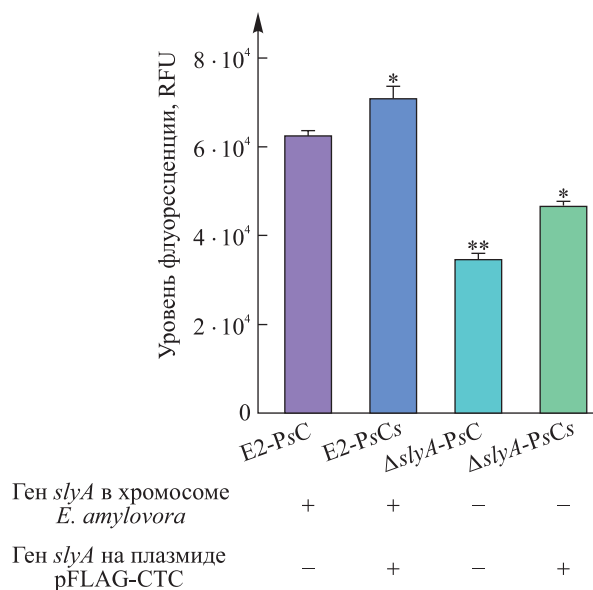


Рис. 1. Влияние уровня экспрессии гена *slyA* на активность собственного промотора у разных штаммов бактерий *E. amylovora*. Знаком * отмечены достоверные различия в уровне флуоресценции при $p \leq 0,01$, знаком ** – при $p \leq 0,0001$ (критерии Брауна – Форсайта и Уэлча). Различия в уровне флуоресценции были выявлены путем сравнения среднего значения каждой выборки со средним значением контрольной выборки (штамм E2-PsC). Планки погрешностей отражают величину стандартной ошибки

Fig. 1. The effect of *slyA* gene expression on *slyA* gene promoter activity in different strains of *E. amylovora*.

Sign * indicates significant differences in relative fluorescence units at $p \leq 0.01$, sign ** indicates significant differences at $p \leq 0.0001$ (Brown – Forsythe and Welch ANOVA tests).

Differences in relative fluorescence units were identified by comparing the mean value of each sample with the mean value of the control sample (strain E2-PsC).

Error bars represent the standard error of mean

Известно, что белки семейства MarR могут связывать различные лиганды, чаще всего это приводит к ослаблению взаимодействия регулятора с ДНК и дерепрессии (или деактивации) транскрипции. В отсутствие лиганда белок-регулятор связывается с ДНК, тем самым подавляя либо активируя экспрессию генов [3]. Установлено, что к числу таких лигандов принадлежат фенольные соединения (например, салицилат), ионы металлов, активные формы кислорода и др. [10]. Белок SlyA, так же как и другие белки семейства MarR, подвержен аллостерическому ингибированию ароматическими молекулами, которые имеют небольшой размер [19]. В работе [20] было показано, что молекулы салицилата способны ингибировать связывание регулятора SlyA с ДНК *in vitro* у бактерий *S. enterica*. С учетом этого факта представляется интересным изучить влияние салициловой кислоты, а также других растительных фенольных соединений на транскрипционную регуляцию экспрессии гена *slyA* у бактерий *E. amylovora*. Для постановки данного эксперимента клетки штамма *E. amylovora* E2 были трансформированы векторной конструкцией pUA66-PslyA. В результате удалось установить, что салициловая кислота в концентрации 2,5 ммоль/л вызывает увеличение активности промотора гена *slyA* в 1,3 раза, а в концентрации 5,0 ммоль/л – в 1,4 раза по сравнению с контролем (рис. 2, а). В то же время другие протестированные фенольные кислоты обуславливают снижение изучаемой промоторной активности. Так, при культивировании клеток с ванилиновой кислотой (2,5 ммоль/л) активность промотора гена *slyA* снизилась в 1,2 раза по сравнению с контролем (рис. 2, б), при культивировании с парагидроксибензойной кислотой (2,5 ммоль/л) и феруловой кислотой (2,5 ммоль/л) она уменьшилась в 1,4 раза (рис. 2, в и г), а при культивировании с хлорогеновой кислотой (2,5 ммоль/л) – в 1,2 раза (рис. 2, д). Кофейная кислота в концентрации 2,5 ммоль/л не вызывает изменений в активности промотора гена *slyA*, однако при увеличении концентрации до 5,0 ммоль/л обуславливает снижение экспрессии репортера в 1,2 раза по сравнению с контрольными значениями (рис. 2, е). Добавление к среде культивирования коричной кислоты в концентрации 2,5 ммоль/л не приводит к достоверным различиям между контрольными и опытными значениями (рис. 2, ж).

Физиологическая роль рассмотренных фенольных соединений вызывает сомнение, так как оказываемый ими эффект проявляется при высоких внутриклеточных концентрациях. По этой причине на следующем этапе исследования изучался уровень активности промотора гена *slyA* при культивировании клеток с растительными фенольными соединениями в концентрации 0,6 ммоль/л. В итоге было обнаружено, что ни одна используемая кислота достоверно не изменила уровень активности исследуемого промотора (рис. 3).

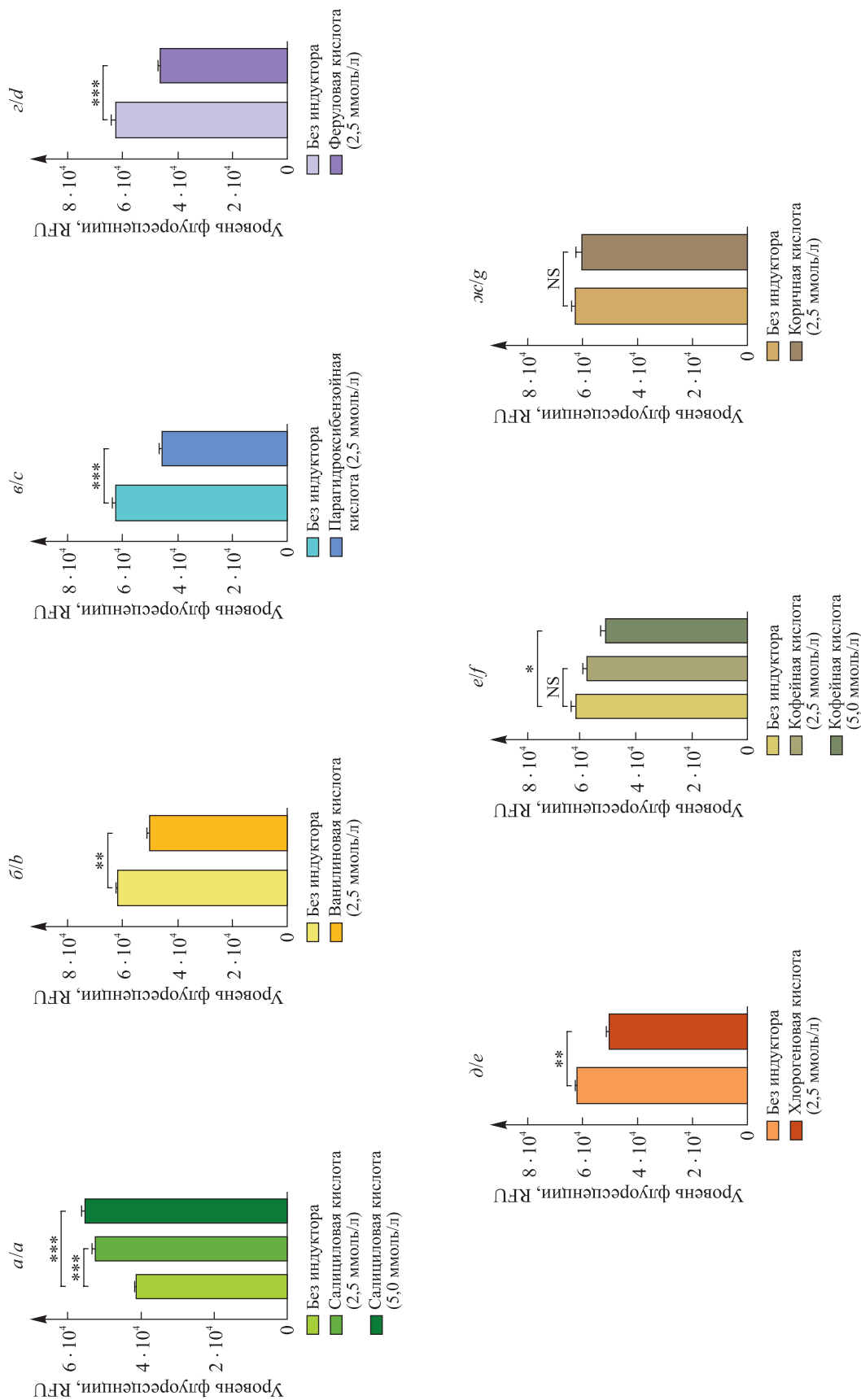


Рис. 2. Влияние растительных фенольных соединений (салициловой (а), ванилиновой (б), парагидроксibenзойной (в), феруловой (г), хлорогеновой (д), кофейной (е) и коричной (ж) кислот) в концентрации 2,5 и 5,0 ммоль/л (для салициловой и кофейной кислот) на активность промотора гена *shyA*. Знаком * отмечены достоверные различия в уровне флуоресценции при $p \leq 0,01$, знаком ** – при $p \leq 0,001$, знаком *** – при $p \leq 0,0001$. Обозначение «NS» указывает на отсутствие достоверных различий (*t*-критерий Стьюдента в модификации Уэлча). Планки погрешностей отражают величину стандартной ошибки

chlorogenic (e), caffeic (f) and cinnamic (g) acids) at a concentration of 2.5 and 5.0 mmol/L (for salicylic and caffeic acids) on the activity of the *shyA* gene promoter. Sign * indicates significant differences in relative fluorescence units at $p \leq 0.01$, sign ** indicates significant differences at $p \leq 0.001$, sign *** indicates significant differences at $p \leq 0.0001$. The notation «NS» indicates the absence of significant differences (unpaired *t*-test with Welch's correction). Error bars represent the standard error of mean

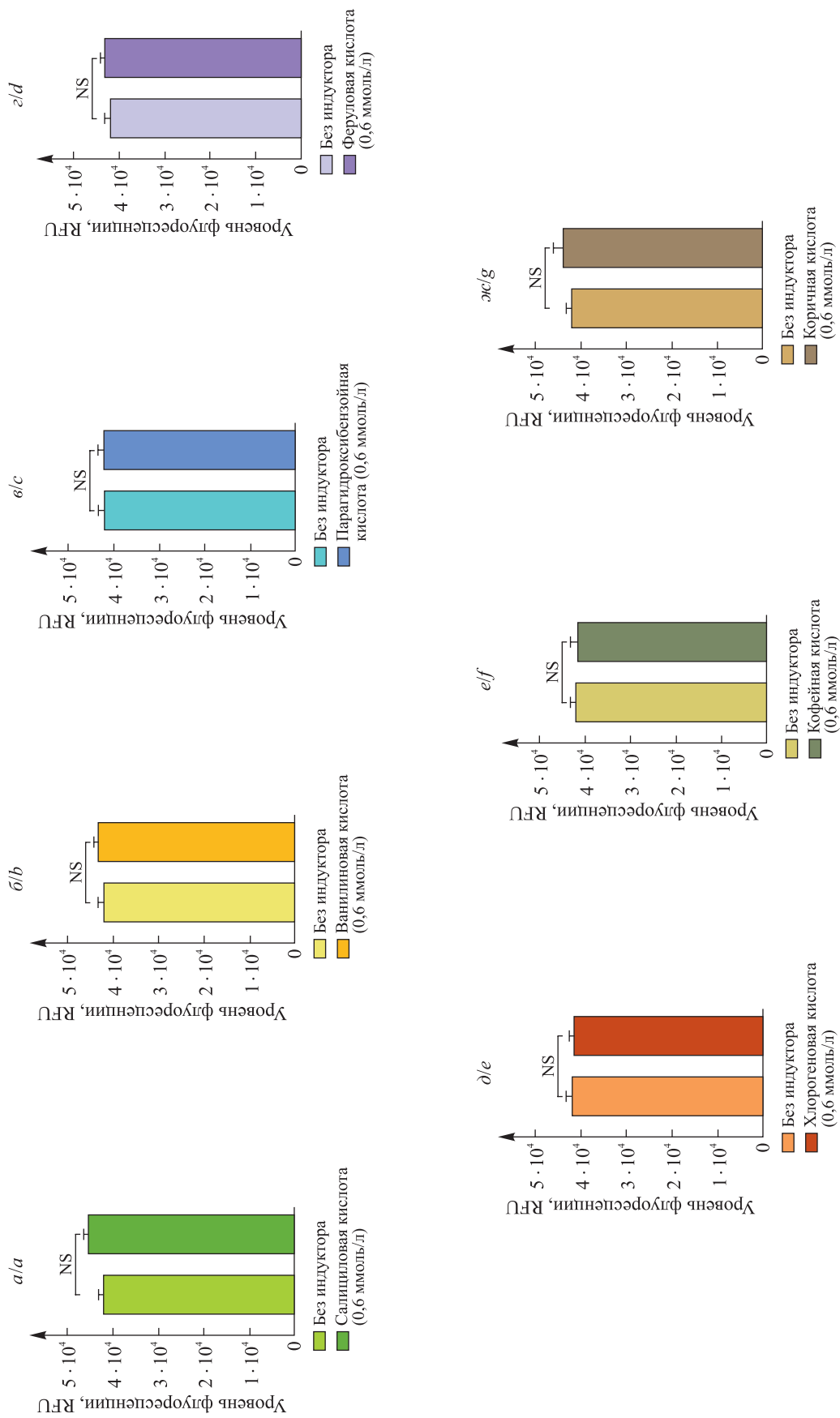


Рис. 3. Влияние растительных фенольных соединений (салициловой (а), ванилиновой (б), парагидроксibenзойной (в), феруловой (г), хлорогеновой (д), кофейной (е) и коричной (ж) кислот) в концентрации 0,6 ммоль/л на активность промотора гена *syA*. Обозначение «NS» указывает на отсутствие достоверных различий (*t*-критерий Стьюдента в модификации Уэлча).

Плнки погрешностей отражают величину стандартной ошибки

Fig. 3. The effect of plant phenolic compounds (salicylic (a), vanillic (b), *p*-hydroxybenzoic (c), ferulic (d), chlorogenic (e), caffeic (f) and cinnamic (g) acids) at a concentration of 0.6 mmol/L on the activity of the *syA* gene promoter. The notation «NS» indicates the absence of significant differences (unpaired *t*-test with Welch's correction). Error bars represent the standard error of mean

На основании полученных результатов можно допустить, что ни одно из рассмотренных в рамках настоящей работы растительных фенольных соединений не является природным лигандом для белка SlyA, однако для подтверждения данного предположения необходимо проведение дальнейших исследований.

Известно, что бактерии (например, *S. enterica*, *D. dadantii*), имеющие делецию гена *slyA*, характеризуются повышенной чувствительностью к антибиотику полимиксину В [7; 9]. Ранее нами было показано, что выживаемость клеток штамма *E. amylovora*, мутантного по гену *slyA*, в присутствии полимиксина В в концентрации 5 мкг/мл снижается в 3 раза по сравнению с выживаемостью клеток штамма дикого типа [21]. Именно по этой причине на следующем этапе исследования в качестве вещества, потенциально вовлеченного в регуляцию транскрипции гена *slyA*, был выбран полимиксин В. Полученные результаты свидетельствуют, что данный антибиотик в концентрации 1 мкг/мл вызывает увеличение промоторной активности гена *slyA* в 1,2 раза (рис. 4).

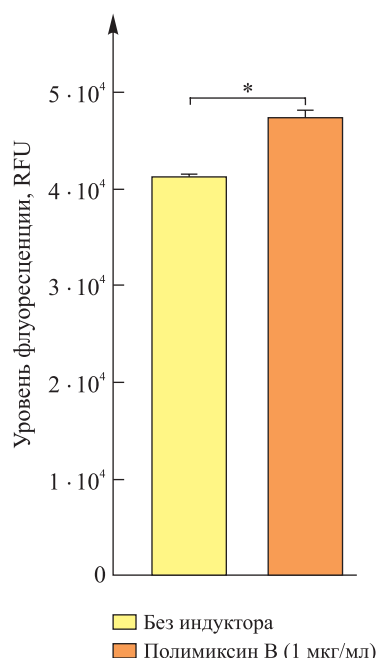


Рис. 4. Влияние полимиксина В на активность промотора гена *slyA*.
Знаком * отмечены достоверные различия в уровне флуоресценции при $p \leq 0,001$ (*U*-критерий Манна – Уитни).

Плankи погрешностей отражают величину стандартной ошибки

Fig. 4. The effect of polymyxin B on the activity of the *slyA* gene promoter.

Sign * indicates significant differences in relative fluorescence units at $p \leq 0.001$ (Mann – Whitney *U*-test).

Error bars represent the standard error of mean

В качестве соединения, предположительно также вовлеченного в регуляцию экспрессии гена *slyA*, была протестирована перекись водорода в концентрации 1; 2 и 5 ммоль/л. Известно, что белок SlyA принимает участие в регуляции экспрессии генов, отвечающих за устойчивость к окислительному стрессу у бактерий *S. enterica* [22] и *D. dadantii* [7]. В ходе изучения выживаемости клеток бактерий *E. amylovora* при добавлении к среде культивирования перекиси водорода было выявлено, что перекись водорода в концентрации 25 ммоль/л вызывает снижение выживаемости клеток делеционного мутанта в 2 раза по сравнению с выживаемостью клеток штамма дикого типа, а в концентрациях 50 и 100 ммоль/л обуславливает прекращение роста клеток мутантного штамма [21]. Согласно результатам настоящего исследования активность промотора гена *slyA* в присутствии перекиси водорода в концентрации 1; 2 и 5 ммоль/л увеличивается в 1,2; 1,4 и 1,7 раза соответственно (рис. 5), что позволяет предположить участие перекиси водорода в регуляции транскрипции гена *slyA* у бактерий *E. amylovora*.

С учетом вышеизложенных данных, а также данных о сниженной выживаемости клеток мутантного штамма E2 $\Delta slyA$ в присутствии перекиси водорода и сниженной продукции каталазы клетками

данного штамма нами изучено влияние белка SlyA на активность промоторов генов, кодирующих пероксидазу YhcN и органическую гидропероксидредуктазу OhrA, которая отвечает за снижение содержания в бактериальных клетках гидроперекисей жирных кислот (образуются в результате перекисного окисления липидов) и пероксинитрита, являющихся сильными окислителями и играющих важную роль в системе взаимодействия патоген – хозяин [21; 23]. Наличие предполагаемых сайтов связывания регулятора SlyA перед последовательностями генов *yhcN* и *ohrA* выявлено с использованием программы *SigmoID* [24]. Результаты проведенного эксперимента показали, что активность промотора гена гидропероксидредуктазы OhrA в клетках делеционного мутанта по гену *slyA* с «пустой» векторной плазмидой pFLAG-CTC (штамм $\Delta slyA$ -PaC) была в 49 раз ниже его активности в клетках делеционного мутанта с рекомбинантной плазмидой с копией гена *slyA* (pFLAG-CTC-*slyA*; штамм $\Delta slyA$ -PaCs). Наличие в клетках штамма $\Delta slyA$ -PaCs указанного рекомбинантного вектора способствовало восстановлению активности изучаемого промотора до первоначального уровня (относительно экспрессии промотора гена *ohrA* в клетках штамма E2-PaC) (рис. 6). Самая низкая промоторная активность гена пероксидазы YhcN была зарегистрирована в клетках делеционного мутанта по гену *slyA* с векторной плазмидой pFLAG-CTC (штамм $\Delta slyA$ -PyC). Замена данной плазмиды на рекомбинантную плазмиду с копией гена *slyA* (pFLAG-CTC-*slyA*) увеличила активность исследуемого промотора в клетках делеционного мутанта (штамм $\Delta slyA$ -PyCs) в 4,2 раза, что привело к частичному восстановлению экспрессии промотора гена *yhcN* до первоначальных значений (относительно экспрессии промотора данного гена в клетках штамма E2-PyC) (рис. 7).

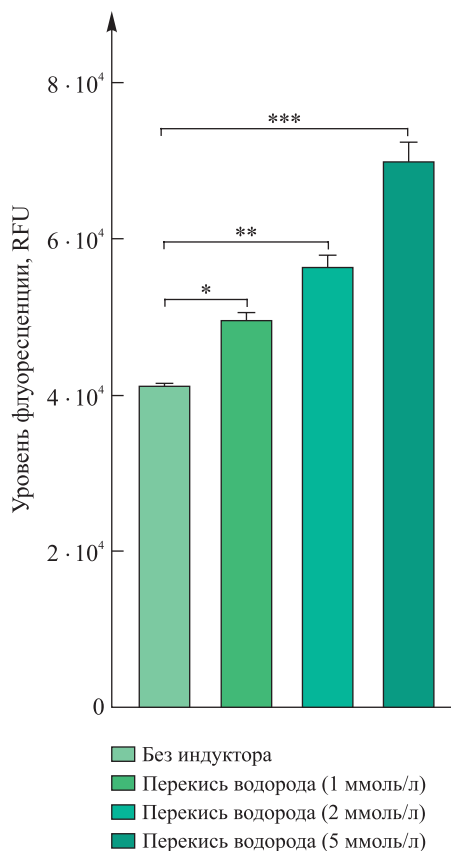


Рис. 5. Влияние перекиси водорода в концентрации 1; 2 и 5 ммоль/л на активность промотора гена *slyA*. Знаком * отмечены достоверные различия в уровне флуоресценции при $p \leq 0,01$, знаком ** – при $p \leq 0,001$, знаком *** – при $p \leq 0,0001$ (*t*-критерий Стьюдента в модификации Уэлча).

Плankи погрешностей отражают величину стандартной ошибки

Fig. 5. The effect of hydrogen peroxide at a concentrations of 1; 2 and 5 mmol/L on the activity of the *slyA* gene promoter. Sign * indicates significant differences in relative fluorescence units at $p \leq 0.01$, sign ** indicates significant differences at $p \leq 0.001$, sign *** indicates significant differences at $p \leq 0.0001$ (unpaired *t*-test with Welch's correction). Error bars represent the standard error of mean

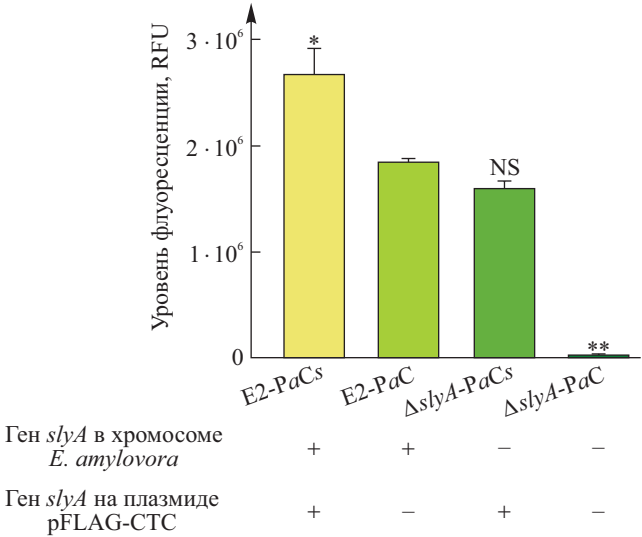


Рис. 6. Влияние экспрессии гена *slyA* на активность промотора гена *ohrA* у разных штаммов бактерий *E. amylovora*. Знаком * отмечены достоверные различия в уровне флуоресценции при $p \leq 0,01$, знаком ** – при $p \leq 0,0001$. Обозначение «NS» указывает на отсутствие достоверных различий (критерии Брауна – Форсайта и Уэлча). Различия в уровне флуоресценции были выявлены путем сравнения среднего значения каждой выборки со средним значением контрольной выборки (штамм E2-PaC). Планки погрешностей отражают величину стандартной ошибки

Fig. 6. The effect of *slyA* gene expression on *ohrA* gene promoter activity in different strains of *E. amylovora*. Sign * indicates significant differences in relative fluorescence units at $p \leq 0.01$, sign ** indicates significant differences at $p \leq 0.0001$. The notation «NS» indicates the absence of significant differences (Brown – Forsythe and Welch ANOVA tests). Differences in relative fluorescence units were identified by comparing the mean value of each sample with the mean value of the control sample (strain E2-PaC). Error bars represent the standard error of mean

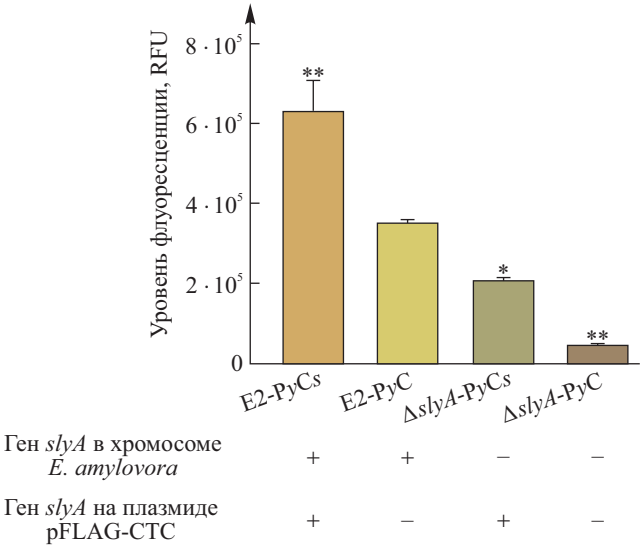


Рис. 7. Влияние экспрессии гена *slyA* на активность промотора гена *yhcN* у разных штаммов бактерий *E. amylovora*. Знаком * отмечены достоверные различия в уровне флуоресценции при $p \leq 0,01$, знаком ** – при $p \leq 0,001$ (критерий Брауна – Форсайта и Уэлча). Различия в уровне флуоресценции были выявлены путем сравнения среднего значения каждой выборки со средним значением контрольной выборки (штамм E2-PyC). Планки погрешностей отражают величину стандартной ошибки

Fig. 7. The effect of *slyA* gene expression on *yhcN* gene promoter activity in different strains of *E. amylovora*. Sign * indicates significant differences in relative fluorescence units at $p \leq 0.01$, sign ** indicates significant differences at $p \leq 0.001$ (Brown – Forsythe and Welch ANOVA tests). Differences in relative fluorescence units were identified by comparing the mean value of each sample with the mean value of the control sample (strain E2-PyC). Error bars represent the standard error of mean

Таким образом, описанные выше результаты свидетельствуют в пользу предположения о том, что белок SlyA положительно регулирует экспрессию генов *yhcN* и *ohrA*, продукты которых, по-видимому, вовлечены в устойчивость клеток бактерий *E. amylovora* к окислительному стрессу.

Заключение

В настоящем исследовании установлено, что растительные фенольные соединения оказывают влияние на активность промотора гена *slyA* только в высоких концентрациях, т. е. указанный результат не подтверждает предположение о функционировании данных веществ в качестве лигандов для белка SlyA. В то же время полимиксин В и перекись водорода значимо увеличивают активность исследуемого промотора. Кроме того, отмечено, что белок SlyA активирует экспрессию промоторов генов *yhcN* и *ohrA*, продукты которых обеспечивают устойчивость клеток бактерий *E. amylovora* к окислительному стрессу, причем степень этой активации возрастает в присутствии полимиксина В и перекиси водорода. В совокупности полученные результаты с высокой вероятностью позволяют предполагать, что транскрипционный регулятор SlyA фитопатогенной бактерии *E. amylovora* участвует в ее адаптации к активным формам кислорода и антимикробным пептидам, продуцируемым растением-хозяином для защиты от патогена.

Библиографические ссылки

1. Maloy S, Stewart V. Autogenous regulation of gene expression. *Journal of Bacteriology*. 1993;175(2):307–316. DOI: 10.1128/jb.175.2.307-316.1993.
2. Deochand DK, Grove A. MarR family transcription factors: dynamic variations on a common scaffold. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2017;52(6):595–613. DOI: 10.1080/10409238.2017.1344612.
3. Ellison DW, Miller VL. Regulation of virulence by members of the MarR/SlyA family. *Current Opinion in Microbiology*. 2006;9(2):153–159. DOI: 10.1016/j.mib.2006.02.003.
4. Mhedbi-Hajri N, Malfatti P, Pédrón J, Gaubert S, Reverchon S, Van Gijsegem F. PecS is an important player in the regulatory network governing the coordinated expression of virulence genes during the interaction between *Dickeya dadantii* 3937 and plants. *Environmental Microbiology*. 2011;13(11):2901–2914. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02566.x.
5. Wilkinson SP, Grove A. Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. *Current Issues in Molecular Biology*. 2006;8(1):51–62.
6. Zhou J-N, Zhang H-B, Lv M-F, Chen Y-F, Liao L-S, Cheng Y-Y, et al. SlyA regulates phytotoxin production and virulence in *Dickeya zeae* EC1. *Molecular Plant Pathology*. 2016;17(9):1398–1408. DOI: 10.1111/mpp.12376.
7. Haque MM, Kabir MS, Aini LQ, Hirata H, Tsuyumu S. SlyA, a MarR family transcriptional regulator, is essential for virulence in *Dickeya dadantii* 3937. *Journal of Bacteriology*. 2009;191(17):5409–5418. DOI: 10.1128/jb.00240-09.
8. Michaux C, Sanguinetti M, Reffuveille F, Auffray Y, Posteraro B, Gilmore MS, et al. SlyA is a transcriptional regulator involved in the virulence of *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity*. 2011;79(7):2638–2645. DOI: 10.1128/IAI.01132-10.
9. Navarre WW, Halsey TA, Walthers D, Frye J, McClelland M, Potter JL, et al. Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. *Molecular Microbiology*. 2005;56(2):492–508. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04553.x.
10. Will WR, Brzovic P, Le Trong I, Stenkamp RE, Lawrenz MB, Karlinsey JE, et al. The evolution of SlyA/RovA transcription factors from repressors to countersilencers in Enterobacteriaceae. *mBio*. 2019;10(2):e00009-19. DOI: 10.1128/mBio.00009-19.
11. Pedroncelli A, Puopolo G. This tree is on fire: a review on the ecology of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight disease. *Journal of Plant Pathology*. 2024;106(3):823–837. DOI: 10.1007/s42161-023-01397-y.
12. Badria FA, editor. *Phenolic compounds – chemistry, synthesis, diversity, non-conventional industrial, pharmaceutical and therapeutic applications*. London: IntechOpen; 2022. XX, 433 p. (Blumenberg M, editor. IntechOpen series. Biochemistry; volume 26). DOI: 10.5772/intechopen.94825.
13. Ogah O, Watkins CS, Ubi BE, Oraguzie NC. Phenolic compounds in Rosaceae fruit and nut crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014;62(39):9369–9386. DOI: 10.1021/jf501574q.
14. Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 3 volumes.
15. Lagonenko AL, Komardina VS, Nikolaichik YA, Evtushenkov AN. First report of *Erwinia amylovora* fire blight in Belarus. *Journal of Phytopathology*. 2008;156(10):638–640. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2008.01420.x.
16. Zaslaver A, Bren A, Ronen M, Itzkovitz S, Kikoin I, Shavit S, et al. A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nature Methods*. 2006;3(8):623–628. DOI: 10.1038/nmeth895.
17. Hopp TP, Prickett KS, Price VL, Libby RT, March CJ, Cerretti DP, et al. A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Nature Bio/Technology*. 1988;6(10):1204–1210. DOI: 10.1038/nbt1088-1204.
18. Martinez-Vaz BM, Makarevitch I, Stensland S. Studying gene expression: database searches and promoter fusions to investigate transcriptional regulation in bacteria. *Journal of Microbiology & Biology Education*. 2010;11(1):42–49. DOI: 10.1128/jmbe.v11.i1.101.
19. Dolan KT, Duguid EM, He C. Crystal structures of SlyA protein, a master virulence regulator of *Salmonella*, in free and DNA-bound states. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(25):22178–22185. DOI: 10.1074/jbc.M111.245258.
20. Hao Z, Lou H, Zhu R, Zhu J, Zhang D, Zhao BS, et al. The multiple antibiotic resistance regulator MarR is a copper sensor in *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology*. 2014;10(1):21–28. DOI: 10.1038/nchembio.1380.

21. Песоцкая КЮ, Лагоненко АЛ, Евтушенков АН. Транскрипционный фактор SlyA регулирует продукцию факторов вирулентности и устойчивость к окислительному стрессу у фитопатогенных бактерий *Erwinia amylovora*. *Молекулярная и прикладная генетика*. 2025;38:111–122. EDN: EJNXJI.
22. Cabezas CE, Briones AC, Aguirre C, Pardo-Esté C, Castro-Severyn J, Salinas CR, et al. The transcription factor SlyA from *Salmonella* Typhimurium regulates genes in response to hydrogen peroxide and sodium hypochlorite. *Research in Microbiology*. 2018;169(6):263–278. DOI: 10.1016/j.resmic.2018.04.003.
23. Meireles DA, da Silva Neto JF, Domingos RM, Alegria TGP, Santos LCM, Netto LES. Ohr – OhrR, a neglected and highly efficient antioxidant system: structure, catalysis, phylogeny, regulation, and physiological roles. *Free Radical Biology and Medicine*. 2022;185:6–24. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.04.001.
24. Nikolaichik Y, Damienikan AU. Sigmoid: a user-friendly tool for improving bacterial genome annotation through analysis of transcription control signals. *PeerJ*. 2016;4:e2056. DOI: 10.7717/peerj.2056.

Получена 13.01.2025 / исправлена 19.06.2025 / принята 07.07.2025.
Received 13.01.2025 / revised 19.06.2025 / accepted 07.07.2025.