

УДК 579.852.11.017.73:577.152.34

ВЛИЯНИЕ Spo0A И AbrB БЕЛКОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ГУАНИЛСПЕЦИФИЧНЫХ РИБОНУКЛЕАЗ *BACILLUS INTERMEDIUS* И *BACILLUS PUMILUS* В РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММАХ *BACILLUS SUBTILIS*

© 2007 г. В. В. Ульянова¹, В. И. Вершинина, М. А. Харитоновна, М. Р. Шарипова

Казанский государственный университет

Поступила в редакцию 25.07.2006 г.

Гуанилспецифичные рибонуклеазы *Bacillus intermedius* и *Bacillus pumilus* активно секретируются в условиях фосфатного голодания рекомбинантными штаммами *Bacillus subtilis* как с полноценными регуляторными системами, так и штаммами, дефектными по некоторым белкам системы Spo0A-фосфопередачи. Показано, что уровень экспрессии генов рибонуклеаз в рекомбинантных штаммах с мутацией в гене *spo0A* повышается примерно в 6 раз, а в мутантах *spo0A/abrB* – в 3 раза по сравнению с нативными штаммами. Полученные результаты свидетельствуют о том, что белок Spo0A регулирует продукцию рибонуклеаз, выполняя роль репрессора, а белок AbrB является активатором экспрессии генов рибонуклеаз *B. intermedius* и *B. pumilus* в клетках *B. subtilis*.

Ключевые слова: бациллы, биназа, РНКазы Vri, регуляция биосинтеза.

Внеклеточные рибонуклеазы *B. intermedius* (биназа) и *B. pumilus* (РНКазы Vri) относят к циклизующим гуанилспецифичным рибонуклеазам, расщепляющим фосфодифирные связи в молекулах РНК, олиго- и полинуклеотидах после остатка гуанозина с образованием промежуточных нуклеозид-2'-3'-циклофосфатов и последующим их гидролизом до соответствующих рибонуклеозид-3'-фосфатов. Ферменты близки по физико-химическим и каталитическим характеристикам [1], основные закономерности их биосинтеза сходны [2]. Синтез обеих РНКаз осуществляется в условиях дефицита в среде неорганического фосфата и регулируется на уровне транскрипции в клетках *B. subtilis* белками двухкомпонентной системы трансдукции сигнала PhoP-PhoR, контролирующей экспрессию генов РНО регулона при фосфатном голодании [3, 4]. Из литературы известно, что *phoPR* оперон находится под воздействием других регуляторных механизмов (рис. 1), в частности системы Spo0A-фосфопередачи, белка AbrB и двухкомпонентной системы ResD-ResE [5]. Многокомпонентность и сложность регуляции системы фосфорилирования белка Spo0A, включающей несколько гистидин киназ и фосфатаз свидетельствует о ее решающей роли в принятии клеткой своевременного и адекватного условиям окружающей среды решения о вступлении на путь спорообразования.

Целью настоящей работы было установить роль Spo0A и AbrB белков в экспрессии PhoP-за-

висимых генов гуанилспецифичных рибонуклеаз *B. intermedius* и *B. pumilus* в клетках *B. subtilis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для работы были выбраны следующие штаммы: *B. subtilis* JH642 (*pheA1 trpC2*), обладающий полноценными регуляторными системами; полученные на его основе штаммы, мутантные по генам *spo0A* и *abrB* – *B. subtilis* JH646 (*pheA1 trpC2 spo0A12*) и *B. subtilis* R15-13 (*pheA1 trpC2 abrB23 spo0A12*), а также мутанты по KinA – *B. subtilis* MB170 (*kinA82*), и Spo0E – *B. subtilis* JH647 (*pheA1 trpC2 spo0E11*), – белкам системы Spo0A-фосфопередачи (BGSC, The Ohio State University, USA).

В работе использовали плазмиды pMZ55 и pMZ56, несущие, соответственно, полные гены биназы и РНКазы Vri, состыкованные с геном внутриклеточного ингибитора барстара, защищающего клетки *B. subtilis* от токсического действия РНКаз [3]. Плазмиды обеспечивают экспрессию генов РНКаз *B. intermedius* и *B. pumilus* в клетках *B. subtilis*.

Культивирование бактерий проводили при 30°C в колбах объемом 100 мл (соотношении объема среды к объему колбы 1 : 7) на лабораторных качалках с интенсивностью качания 200 об/мин. Засев опытных колб проводили одним объемным процентом инокулята.

Для выращивания использовали бесфосфорную синтетическую среду (БФС) следующего состава (г/л): *трис* оксиметиламинметан – 6.05; хлорид ка-

¹ Автор для корреспонденции (e-mail: vera84@inbox.ru).

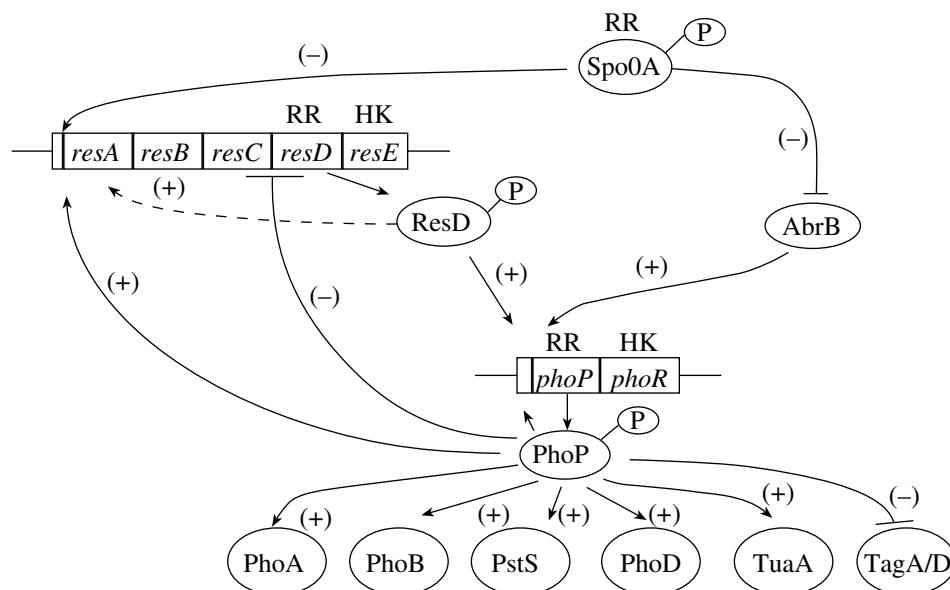


Рис. 1. Схема регуляции генов Pho регулона в условиях фосфатного голодания (приведено из работы [5]).

лия – 5.0; хлорид натрия – 1.0; сульфат аммония – 2.0; цитрат натрия – 1.0; сульфат магния – 0.2; глюкоза – 5.0; дрожжевой экстракт – 0.5. pH среды – 8.0. Содержание неорганического фосфата в среде составляло 4 мкг/мл. При выращивании рекомбинантных штаммов *B. subtilis*, несущих плазмиды рMZ55 и рMZ56, в питательную среду добавляли антибиотик канамицин в концентрации 10 мкг/мл. Контроль роста культуры проводили путем измерения оптической плотности при длине волны 590 нм (ОП₅₉₀).

Трансформацию клеток *B. subtilis* плазмидной ДНК выполняли по стандартной методике [6].

Определение стабильности плазмид в полученных рекомбинантах *B. subtilis*, проводили, как описано в работе [7]. Рассчитывали число поколений (n), сменившихся за время культивирования клеток на L-бульоне без антибиотика: $n = (\lg N_K - \lg N_0) / \lg 2$, где N_0 – исходное, а N_K – конечное количество клеток. Для количественного учета клонов, потерявших плазмиду за период культивирования на среде без антибиотика, делали высеив на L-агар с антибиотиком и без него. Рассчитывали % клеток, “излечившихся” от плазмиды.

Способность трансформантов к синтезу рибонуклеазы определяли по методу Джеффриса, выращивая клоны на чашках Петри со средой БФС, содержащей дрожжевую РНК (5 мг/мл) и канамицин [8]. О наличии РНКазной активности судили по зонам деполимеризации РНК вокруг колоний, выявляемым добавлением 1 н раствора соляной кислоты.

Рибонуклеазную активность в культуральной жидкости определяли модифицированным методом Анфинсена по количеству кислотораствори-

мых продуктов гидролиза модельного субстрата – высокополимерной дрожжевой РНК [9]. За единицу активности принимали количество РНКазы, вызывающее увеличение оптической плотности в опытных пробах по сравнению с контрольными на 1 оптическую единицу за 1 час инкубации в пересчете на 1 мл ферментного раствора – опт. ед. / (мл ч). Специфическую активность рибонуклеазы, которая является показателем продуктивности культуры в отношении синтеза фермента, рассчитывали как отношение общей активности фермента к величине биомассы.

Статистический анализ результатов проводили с использованием пакета программ Excel 2003. Рассчитывали среднее квадратичное отклонение (σ). Результаты считали достоверными при $\sigma \leq 10\%$. При расчете достоверности получаемых разностей использовали критерий Стьюдента, принимая $P \leq 0.05$ за достоверный уровень значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рекомбинантных штаммов *B. subtilis*, несущих плазмиды с генами рибонуклеаз. Для выяснения роли системы Spo0A-фосфорпередачи в регуляции экспрессии генов рибонуклеаз *B. intermedius* и *B. pumilus* нами были выбраны штаммы *B. subtilis*, мутантные по гену *spo0A*, генам киназы *kinA* и фосфатазы *spo0E*, а также двойной *spo0A/abrB* мутант. Предварительно все исходные штаммы-реципиенты были проверены на наличие внеклеточной рибонуклеазы. Показано присутствие следовых количеств секретируемой РНКазы в культуральной жидкости указанных штаммов на 24 ч культивирования, что составляет менее 1% от

Таблица 1. Сравнительный анализ рибонуклеазной активности в различных штаммах *B. subtilis*

| Штамм <i>B. subtilis</i> | Генотип | ОП ₅₉₀ | Активность РНКазы, опт. ед./мл час |
|--------------------------|-----------------------------------|-------------------|------------------------------------|
| JH642 | <i>pheAl trpC2</i> | 2.77 ± 0.05 | 140 ± 3.82 |
| JH646 | <i>pheAl trpC2 spo0A12</i> | 2.45 ± 0.03 | 128 ± 2.68 |
| R15-13 | <i>pheAl trpC2 spo0A12 abrB23</i> | 2.69 ± 0.05 | 155 ± 2.95 |
| MB170 | <i>kinA82</i> | 2.71 ± 0.02 | 73 ± 2.04 |
| JH647 | <i>pheAl trpC2 spo0E11</i> | 2.83 ± 0.03 | 94 ± 1.75 |
| JH642 pMZ-55 | <i>pheAl trpC2</i> | 1.98 ± 0.05 | 24074 ± 379 |
| JH642 pMZ-56 | <i>pheAl trpC2</i> | 1.96 ± 0.03 | 42130 ± 576 |

уровня активности штаммов *B. subtilis* JH642, несущих плазмиды pMZ55 и pMZ56 (табл. 1).

Трансформацию мутантных штаммов плазмидами pMZ55 и pMZ56, несущими полные гены рибонуклеаз *B. intermedius* и *B. pumilus*, соответственно, проводили по стандартной методике. Рекомбинанты отбирали по двум признакам: устойчивости к канамицину и наличию РНКазной активности. Для дальнейшего анализа было выбрано по 10 клонов из каждого варианта.

Одним из критериев пригодности плазмид является их стабильность в реципиентных штаммах. Плазмиды pMZ55 и pMZ56 сохраняются в рекомбинантных штаммах в течение всего срока наблюдения (табл. 2). Лишь единичные клоны (0–3%) утрачивают плазмиду через 32–36 генераций. Таким образом, исследуемые плазмиды стабильны, а полученные рекомбинантные штаммы *B. subtilis* могут быть использованы для изучения экспрессии генов биназы и РНКазы Ври.

Влияние Spo0A белка на экспрессию генов рибонуклеаз *B. intermedius* и *B. pumilus* в клетках *B. subtilis*. Белок Spo0A является компонентом системы трансдукции сигнала, основной функцией которой является контроль инициации спорообразования [10]. Уровень фосфорилированности Spo0A, зависящий от совместного действия киназ и фосфатаз, определяет путь развития клетки: при низких концентрациях Spo0A-P адаптация к неблагоприятным условиям осуществляется путем развития компетентности, хемотаксиса, синтеза антибиотиков и литических ферментов, при высоких концентрациях Spo0A-P запускается программа спорообразования [11]. Было показано, что Spo0A белок также вовлечен в фосфатную регуляцию, контролируя экспрессию генов *abrB* и *resD*, продукты которых необходимы для полной индукции Pho регулона [12].

Для выяснения возможной роли Spo0A белка в регуляции экспрессии генов биназы и РНКазы Ври были использованы штаммы *B. subtilis*, несущие мутации в генах *spo0A*, *kinA* и *spo0E*. Мутантные штаммы *B. subtilis* различаются по количеству фосфорилированной формы Spo0A в клетке и способности

образовывать споры. Киназа KinA является одной из основных киназ, воспринимающих сигнал, который поступает в систему Spo0A-фосфопередачи [13]. Spo0E – специфическая фосфатаза Spo0A, необходимая для возврата Spo0A-P в неактивную форму [14]. Мутация в гене *kinA* уменьшает спорообразование на 95% от уровня дикого типа [15], однако в этом штамме образуется достаточное количество фосфорилированного Spo0A для нормальной регуляции гена *abrB* [13]. Мутация *spo0E11* вызывает синтез гиперактивного белка, сводя к минимуму количество Spo0A-P в клетке и предотвращая спорообразование [16]. В штамме с мутацией в самом гене *spo0A* образование функционального регулятора ответа практически невозможно.

Установлено, что биназа и РНКазы Ври активно секретируются на БФС как рекомбинантными штаммами с полноценной системой Spo0A-фосфопередачи, так и мутантными штаммами, несущими плазмиды с генами РНКаз. Показано, что уровень

Таблица 2. Стабильность плазмид pMZ55 и pMZ56 с полными генами рибонуклеаз *B. intermedius* и *B. pumilus* в рекомбинантных штаммах *B. subtilis*

| Штамм <i>B. subtilis</i> | Количество генераций | Количество клонов, сохранивших плазмиду, % |
|--------------------------|----------------------|--|
| pMZ55 | | |
| JH642 | 35.4 | 100 |
| JH646 | 35.6 | 100 |
| R15-13 | 35.0 | 99.1 |
| MB170 | 36.2 | 98 |
| JH647 | 34.5 | 99 |
| pMZ56 | | |
| JH642 | 32.5 | 100 |
| JH646 | 33.0 | 97 |
| R15-13 | 36.0 | 98 |
| MB170 | 34.5 | 98 |
| JH647 | 35.0 | 99 |

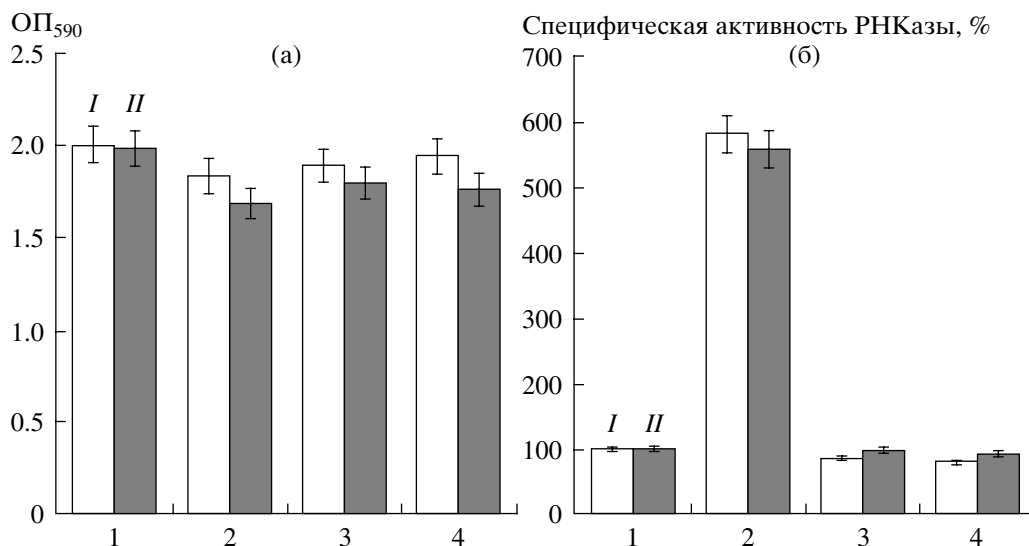


Рис. 2. Экспрессия генов рибонуклеаз *B. intermedius* (I) и *B. pumilus* (II) в рекомбинантных штаммах *B. subtilis*, дефектных по белкам системы Spo0A-фосфопередачи: 1 – *B. subtilis* JH642 (контроль), 2 – *B. subtilis* JH646 (*spo0A*), 3 – *B. subtilis* MB170 (*kinA*), 4 – *B. subtilis* JH647 (*spo0E*); а – рост рекомбинантных штаммов, б – РНКазная активность. За 100% принят уровень активности фермента в рекомбинантном штамме *B. subtilis* с полноценной системой Spo0A-фосфопередачи.

РНКазной активности выше в штаммах, дефектных по Spo0A белку: в штаммах *B. subtilis* с мутацией в гене *spo0A*, уровни специфической биназы (*B. subtilis* JH646 pMZ55) и РНКазы Vri (*B. subtilis* JH646 pMZ56) в 5.8 и 5.6 раз превышают таковые в контрольных штаммах.

Стратегия экспериментов с мутантными штаммами заключается в том, что если регуляторный белок необходим для экспрессии какого-либо гена, то его делетирование приведет к изменению уровня экспрессии контролируемого гена. В том случае, когда белок является репрессором, уровень экспрессии контролируемых им генов будет значительно выше; если же белок является активатором, то при его отсутствии произойдет прекращение экспрессии регулируемых им генов.

Мутации в гене *spo0A* приводят к гипериндукции рибонуклеаз, что указывает на то, что белок Spo0A регулирует продукцию ферментов, выполняя роль репрессора.

Специфическая активность в культуральной жидкости штаммов, несущих мутации в генах киназы *kinA* и фосфатазы *spo0E*, соответствует контролю (рис. 2), что объясняется наличием минимального количества фосфорилированного Spo0A, репрессирующего экспрессию гена *abrB*.

Влияние AbrB белка на экспрессию генов биназы и РНКазы Vri в клетках *B. subtilis*. Активированный Spo0A контролирует экспрессию одних генов, связываясь непосредственно с их промоторами, других – косвенным образом, влияя на транскрипцию регуляторных белков, в частности, белка AbrB. AbrB белок регулирует компетент-

ность, синтез антибиотиков и литических ферментов, репрессирует транскрипцию некоторых генов, необходимых для спорообразования, и является активатором Pho регулона [12, 17–19]. Для репрессии белка AbrB достаточно небольшого количества фосфорилированного Spo0A [11]. Используя штамм с мутацией в гене *spo0A* и двойной *spo0A/abrB* мутант, можно проследить оба способа функционирования Spo0A в клетке.

Показано, что уровень биназы и РНКазы Vri в рекомбинантных штаммах, дефектных по регуляторным белкам *Spo0A* и *AbrB*, как и в одиночных *spo0A* мутантах, выше, чем в нативных штаммах. Однако, существуют количественные различия в активности этих ферментов между штаммами *B. subtilis*, дефектными по генам *spo0A* и *abrB*, и штаммами *B. subtilis*, мутантными только по *spo0A* гену. В двойных *spo0A/abrB* мутантных штаммах уровень экспрессии биназы и РНКазы *B. pumilus* составляет 319% и 313% соответственно, тогда как в штаммах с мутацией по *spo0A* гену – 579% и 556% (по сравнению с таковой в исходном штамме). Таким образом, роль белка AbrB противоположна роли Spo0A, т.е. AbrB является активатором генов биназы и РНКазы Vri. Так как в нашем случае использовались штаммы, мутантные по двум генам – и репрессора, и активатора, экспрессия генов рибонуклеаз была возможна, но ее уровень был снижен в 1.8 раза по сравнению с таковой в штаммах с мутацией по *spo0A* гену.

Тот факт, что экспрессия генов рибонуклеаз *B. intermedius* и *B. pumilus* в двойных мутантных

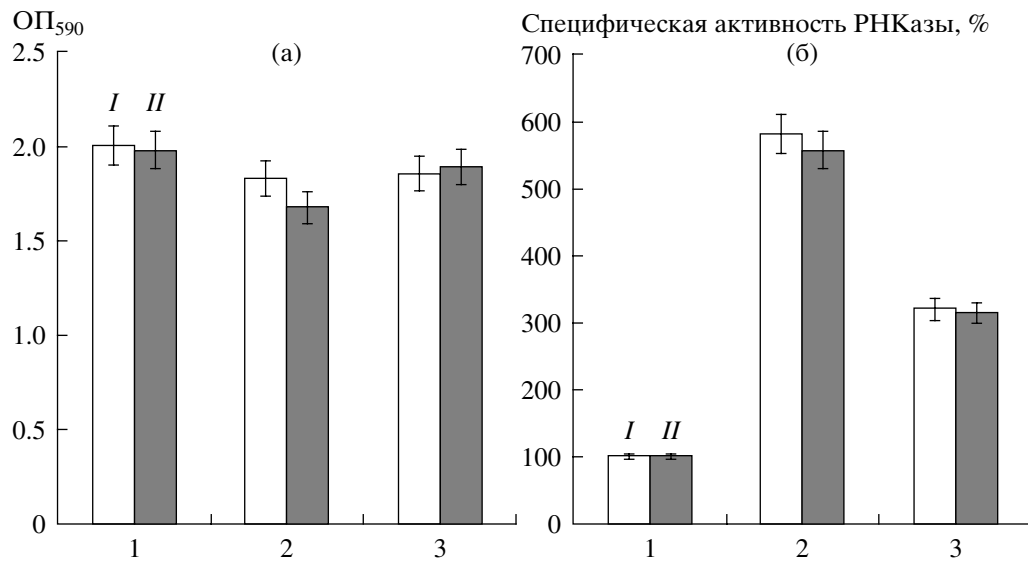


Рис. 3. Экспрессия генов рибонуклеаз *B. intermedius* (I) и *B. pumilus* (II) в рекомбинантных штаммах *B. subtilis*, дефектных по Spo0A и AbrB белкам: 1 – *B. subtilis* JH642 (контроль), 2 – *B. subtilis* JH646 (*spo0A*), 3 – *B. subtilis* R15-13 (*spo0A/abrB*); а – рост рекомбинантных штаммов, б – РНКазная активность. За 100% принят уровень активности фермента в рекомбинантном штамме *B. subtilis* с полноценными регуляторными белками.

штаммах *B. subtilis* (*spo0A/abrB*) сохраняется на 60% от уровня экспрессии этих генов в мутантах по *spo0A* гену, свидетельствует о наличии параллельного пути регуляции генов РНКаз. Учитывая данные литературы, с высокой долей вероятности можно предположить, что этот путь контролируется ResD-ResE системой.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦНТП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники” (Госконтракты 02.434.11.3020 и 02.512.11.2050), АВЦП “Развитие научного потенциала высшей школы” (РНП.2.1.1.1005), а также гранта РФФИ 05-04-48182.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Струминская Н.К., Ивайловский В.Л., Дементьев А.А., Моисеев Г.П., Федосов Ю.А., Яковлев Г.И. Внеклеточная рибонуклеаза из *Bacillus pumilus* // Биологические науки. 1992. № 2. С. 41–44.
- Znamenskaya L.V., Gabdrakhmanova L.A., Chernokalskaya E.B., Leshchinskaya I.B., Hartley R.W. Phosphate regulation of biosynthesis of extracellular RNases of endospore-forming bacteria // FEBS Lett. 1995. V. 375. P. 16–18.
- Знаменская Л.В., Вершинина О.А., Вершинина В.И., Краснов С.И., Костров С.В., Акимкина Т.В., Лещинская И.Б., Хартли Р.В. Экспрессия генов гуанилспецифичных рибонуклеаз *Bacillus intermedius* и *Bacillus pumilus* регулируется двухкомпонентной системой трансдукции сигнала РНО регулона *Bacillus subtilis* // Микробиология. 1999. Т. 68. № 3. С. 304–311.
- Вершинина О.А., Знаменская Л.В. Pho регулоны бактерий // Микробиология. 2002. Т. 71. № 5. С. 581–595.
- Birkey S.M., Wei L., Zhang X., Duggan M., Hulett F.M. PHO signal transduction network reveals direct transcriptional regulation of one two-component system by another two-component regulator: *Bacillus subtilis* PhoP directly regulates production of ResD // Mol. Microbiol. 1998. V. 30. P. 943–953.
- Клонирование ДНК. Методы / Под ред. Гловера Д. М.: Мир, 1988. 538 с.
- Imanaka T., Fujii M., Aiba S. Isolation and characterization of antibiotic resistance plasmids from thermophilic bacilli and construction of deletion plasmids // J. Bacteriol. 1981. V. 146. № 3. P. 1091–1097.
- Jeffris G.D., Holtman W.F., Guse D. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids // J. Bacteriol. 1957. V. 73. P. 61–79.
- Anfinsen C.B., Redfield R.R., Choate W.I., Carroll W.R. Studies of gross structure, cross-linkage and terminal sequences in ribonuclease // J. Biol. Chem. 1957. V. 207. P. 201–210.
- Burbulys D., Trach K.A., Hoch J.A. Initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay // Cell. 1991. V. 64. P. 545–552.
- Fujita M., Gonzalez-Pastor J.E., Losick R. High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. 2005. V. 187. № 4. P. 1357–1368.
- Hulett F.M. The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis* // Mol. Microbiol. 1996. V. 19. P. 933–939.
- Trach K.A., Hoch J.A. Multisensory activation of the phosphorelay initiating sporulation in *Bacillus subtilis*: identification and sequence of the protein kinase of the alternate pathway // Mol. Microbiol. 1993. V. 8. P. 69–79.

14. *Perego M.* A new family of aspartyl-phosphate phosphatases targeting the sporulation transcription factor Spo0A of *Bacillus subtilis* // *J. Mol. Microbiol.* 2001. V. 42. P. 133–144.
15. *Perego M., Cole S.P., Burbulys D., Trach K., Hoch J.A.* Characterization of the gene for a protein kinase which phosphorylates the sporulation-regulatory proteins Spo0A and Spo0F of *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* 1989. V. 171. № 11. P. 6187–6196.
16. *Perego M., Hoch J.A.* Negative regulation of *Bacillus subtilis* sporulation by the Spo0E gene product// *J. Bacteriol.* 1991. V. 173. № 8. P. 2514–2520.
17. *Strauch M.A., Hoch J.A.* Transition-state regulators: Sentinels of *Bacillus subtilis* post-exponential gene expression // *Mol. Microbiol.* 1993. V. 7. P. 337–342.
18. *Phillips Z.V., Strauch M.A.* *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression // *CMLS Cell Mol. Life Sci.* 2002. V. 59. P. 392–402.
19. *Hamoen L.W., Kausche D., Marahiel M.A., van Sinderen D., Venema G., Serror P.* The *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB binds to the 35 promoter region of *comK* // *FEMS Microbiol. Lett.* 2003. V. 218. № 2. P. 299–304.

ВЛИЯНИЕ