

УДК 579.852.11:577.218

СИСТЕМЫ, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ОТВЕТ БАЦИЛЛ НА ФОСФАТНОЕ ГОЛОДАНИЕ

В.В. Ульянова, В.И. Вершинина

Аннотация

Проведен анализ распространенности систем, контролирующих специфический ответ клеток на фосфатное голодание, среди 10 видов бактерий рода *Bacillus*, геномы которых полностью секвенированы. Установлено, что гены, кодирующие основные регуляторы РНО-ответа – PhoP, ResD, Spo0A и AbrB, присутствуют во всех геномах бацилл, причем их генетические контексты весьма сходны. Кроме того, эти белки имеют высокую степень гомологии с одноименными регуляторами *B. subtilis*. С использованием мутантных штаммов *B. subtilis*, показано, что ResD-, Spo0A- и AbrB-белки при фосфатном голодании регулируют экспрессию генов гуанилспецифичных рибонуклеаз *B. pumilus*, *B. intermedius* и *B. thuringiensis* подобно генам РНО-регулона *B. subtilis*. Биосинтез РНКазы *B. circulans* не подвержен влиянию ResD-, Spo0A- и AbrB-регуляторов, как и PhoP–PhoR-системы, и, вероятно осуществляется по σ^B -зависимому механизму. Тем не менее полученные данные позволяют утверждать, что регуляторные системы, подобные РНО-регулону *B. subtilis*, функционируют у представителей различных видов бацилл, то есть РНО-регулон можно рассматривать как универсальную систему, обеспечивающую ответ бактериальной клетки на дефицит экзогенного фосфата.

Ключевые слова: РНО-регулон, бациллы, гуанилспецифичные рибонуклеазы.

Введение

Бактерии обладают поразительной способностью отслеживать и реагировать на любые изменения в их окружении, приспособляя свой метаболический и физиологический потенциал для непосредственных нужд. Так, при снижении концентрации неорганического фосфата (Φ_n) в среде у *Bacillus subtilis* индуцируется фосфатный стимулон, состоящий из специфического РНО-регулона, неспецифического общестрессового σ^B -регулона и группы генов, независимых от первых двух систем [1, 2]. Однако регуляторные связи между ними до конца не ясны.

Главным событием в условиях фосфатного голодания является восприятие сигнала о лимитировании фосфата и его трансдукция. У *B. subtilis* эту функцию выполняет двухкомпонентная система PhoP–PhoR, состоящая из сенсорной гистидин-киназы и регулятора ответа [3]. Белок PhoP, фосфорилированный с помощью киназы PhoR в условиях дефицита Φ_n , непосредственно связывается со специфическими последовательностями в промоторах *pho*-генов, продукты которых участвуют в усилении поглощения фосфата и/или повышении его доступности путем извлечения из дополнительных источников, и тем самым активирует или репрессирует их транскрипцию. В настоящее время РНО-регулон *B. subtilis* насчитывает 37 генов (табл. 1).

Табл. 1

Гены РНО-регулона

Гены	Описание	Ссылка
<i>phoA</i>	Щелочная фосфатаза А	[3]
<i>phoB</i>	Щелочная фосфатаза III	[3]
<i>ydhF</i>	Липопротеин с неизвестной функцией, котранскрибируется с геном <i>phoB</i>	[2]
<i>phoD</i>	Фосфодиэстераза-щелочная фосфатаза	[4]
<i>tatAD</i>	Компоненты транспортного пути Tat для секреции PhoD	[5]
<i>glnQ</i>	ABC транспортер глутамина	[6]
<i>pstSACB₁B₂</i>	Высокоаффинная система транспорта фосфата	[7]
<i>tuaABCDEFGH</i>	Биосинтез тейхуроновой кислоты	[8]
<i>tagAB</i> и <i>tagDEF</i>	Биосинтез тейхоевых кислот, репрессируется при фосфатном голодании	[8]
<i>phoPR</i>	Регуляторные белки двухкомпонентной системы PhoP–PhoR	[9]
<i>glpQ</i>	Глицерофосфорилдиэфирфосфодиэстераза	[2]
<i>ykoL</i>	Пептид из 60 остатков с неизвестной функцией, также активируется глутаматом	[10]
<i>yhaX</i>	Функция неизвестна, возможно, регуляция косвенная	[11]
<i>yycP</i>	Неизвестный белок	[6]
<i>yttP</i>	Функция не известна	[11]
<i>yjdB</i>	Функция не известна	[6]
<i>yhbH</i>	Функция не известна	[11]
<i>ydbH</i>	Сходство с белками транспорта C4-дикарбоновых кислот	[6]
<i>resDE</i>	Регуляторные белки двухкомпонентной системы ResD–ResE, регулирующие процессы дыхания	[12]
<i>yfkN</i>	2',3'-циклическая нуклеотид 2'-фосфодиэстераза	[13]
<i>yurI</i>	Внеклеточная рибонуклеаза	[13]
<i>vpr</i>	Внеклеточная сериновая протеаза	[13]

В регуляции специфического РНО-ответа *B. subtilis*, кроме системы PhoP–PhoR, задействованы, по крайней мере, еще два пути, объединенных в регуляторную сеть, – это петля положительной обратной связи между двухкомпонентными системами PhoP–PhoR и ResD–ResE [12] и система Spo0A-фосфопередачи, осуществляющая негативный контроль *pho*-генов [1]. Основной функцией двухкомпонентной системы ResD–ResE в клетке является регуляция процессов аэробного и анаэробного дыхания [14]. Вместе с тем эта система стимулирует полную РНО индукцию, усиливая косвенным образом аутофосфорилирование PhoR киназы при фосфатном голодании в аэробных условиях [15].

Кроме того, существует параллельный путь активации PhoP–PhoR-системы, опосредованный белком переходного состояния AbrB [1]. Белок AbrB обладает плеiotропным действием: он является как позитивным, так и негативным регулятором компетентности, требуется для синтеза антибиотиков и гидролитических ферментов, образования биопленок, а также репрессирует гены, необходимые для спорообразования [16–18].

Стресс, связанный с истощением Φ_n в среде, активирует также систему Spo0A-фосфопередачи, состоящую из нескольких гистидин-киназ, промежу-

точных белков Spo0F и Spo0B и регулятора транскрипции Spo0A [19]. При возрастающей концентрации фосфорилированный Spo0A-белок играет роль негативного регулятора, репрессируя гены, активные в период вегетативного роста [20]. Так, активированный Spo0A оказывает негативное влияние на РНО-регулон, репрессируя *phoPR*-оперон непосредственно, связываясь с предполагаемыми 0A-боксами в его промоторе [21], либо косвенно – через репрессию ResD–ResE и AbrB [22]. Накопление достаточного количества фосфорилированного Spo0A-белка приводит к запуску программы спорообразования [20].

B. licheniformis является вторым представителем рода *Bacillus*, для которого был описан РНО регулон [23]. Показано, что *B. licheniformis* обладает собственными стратегиями для борьбы с дефицитом фосфата. Так, в отличие от *B. subtilis*, фосфатное голодание у *B. licheniformis* не индуцирует σ^B -зависимый общестрессовый ответ. В условиях недостатка фосфата у *B. licheniformis*, кроме типичных *pho*-генов, происходит сильная индукция генов внутриклеточных и внеклеточных нуклеаз, фитаз, цитохром Р450-подобного фермента, а также некоторых других оксидаз и оксидоредуктаз [23]. Гены же, кодирующие белки основного метаболизма (биосинтеза аминокислот, метаболизма нуклеотидов и коферментов) и рибосомальные белки, репрессируются в самом начале стационарной фазы роста в условиях дефицита фосфата. В тот же период индуцируется ряд генов, вовлеченных в процесс спорообразования.

У *B. pumilus*, *B. intermedius* и *B. thuringiensis* предполагают функционирование РНО-регулонов на основании того, что индуцируемая фосфатным голоданием экспрессия генов гуанилспецифичных рибонуклеаз этих видов бацилл позитивно регулируется PhoP–PhoR-системой *B. subtilis* [24, 25]. Подобные результаты получены также для гена фитазы *B. amyloliquefaciens* – фермента, расщепляющего фосфорсодержащее соединение фитат [26]. В связи с вышесказанным, нам представлялось интересным оценить, насколько широко распространены регуляторные системы, подобные РНО-регулону *B. subtilis*, среди других видов бацилл.

Результаты исследований

Гены *phoP*, *resD*, *spo0A* и *abrB* в секвенированных геномах бацилл. На первом этапе наших исследований мы провели поиск генов *phoP*, *resD*, *spo0A* и *abrB*, кодирующих соответствующие белки-регуляторы РНО-ответа *B. subtilis*, в секвенированных геномах бацилл. Род *Bacillus* представлен обширной гетерогенной группой, насчитывающей к настоящему времени 214 адекватно описанных видов (<http://www.bacterio.cict.fr/b/bacillus.html>). К настоящему времени полностью секвенированы 17 геномов бактерий рода *Bacillus*, ограниченных 10 видами. Данные о геномах представлены на сайте Национального центра биотехнологической информации (NCBI, Bethesda, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>).

На рис. 1 и 2 изображены участки геномов бацилл, содержащие анализируемые гены. Генетический контекст генов оказался весьма сходным. Так, тандем перекрывающихся генов *phoP*–*phoR*, по-видимому, образующих оперон, как у *B. subtilis*, у большинства видов находится, с одной стороны, в окружении генов малат дегидрогеназы (*mdh*) и изоцитрат дегидрогеназы (*icd*), а с другой –

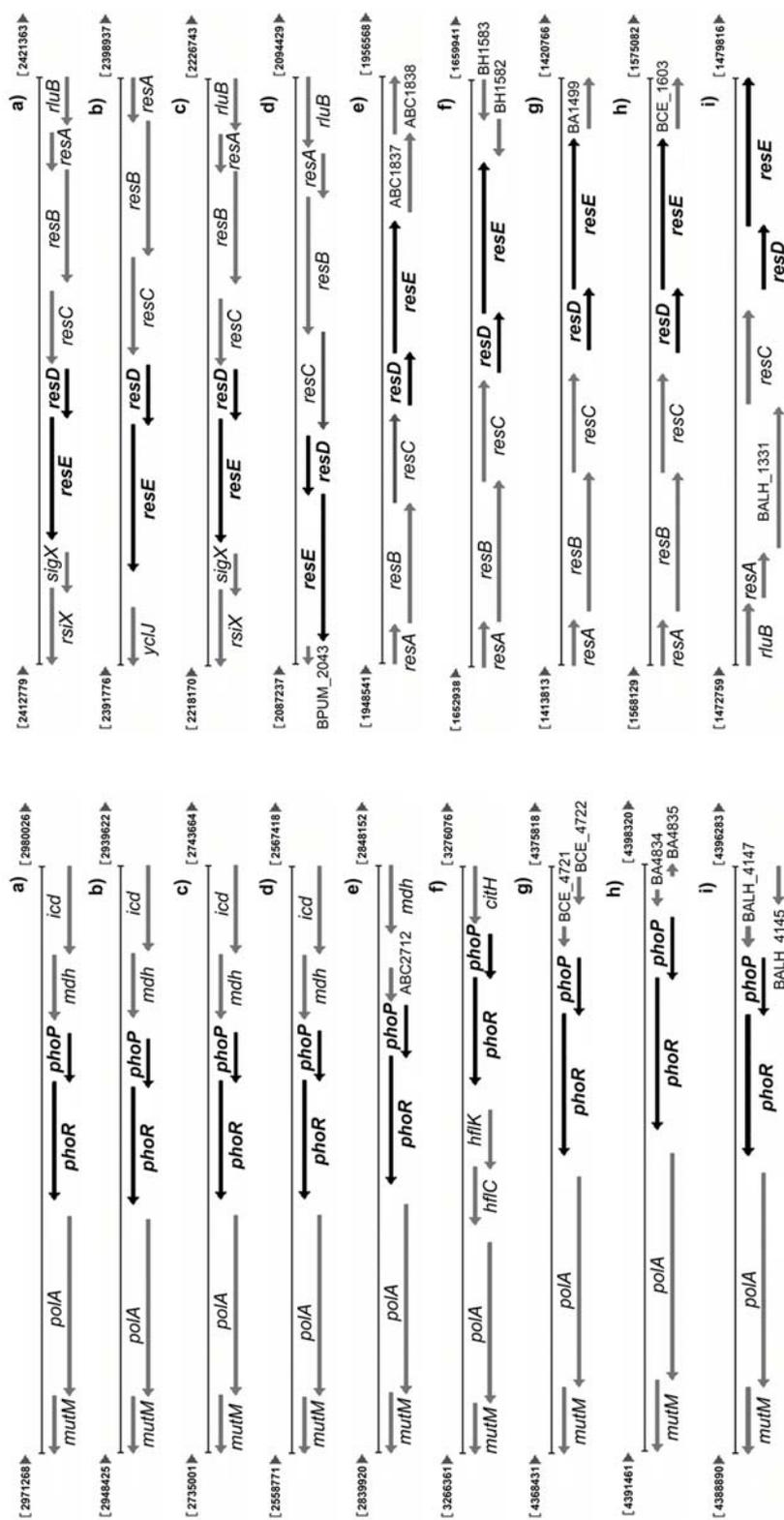


Рис. 1. Гены *phoP/phoR* (слева) и *resD/resE* (справа) в секвенированных геномах бактерий: a) *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168; b) *B. licheniformis* ATCC 14580; c) *B. amyloliquefaciens* FZB42; d) *B. pumilus* SAFR-032; e) *B. clausii* KSM-K16; f) *B. halodurans* C-125; g) *B. anthracis* str. Ames; h) *B. cereus* ATCC 10987; i) *B. thuringiensis* str. Al Nakat. На рисунке не представлен вид *B. weihenstephanensis*, так как его гены до конца не идентифицированы и носят условные названия локусов

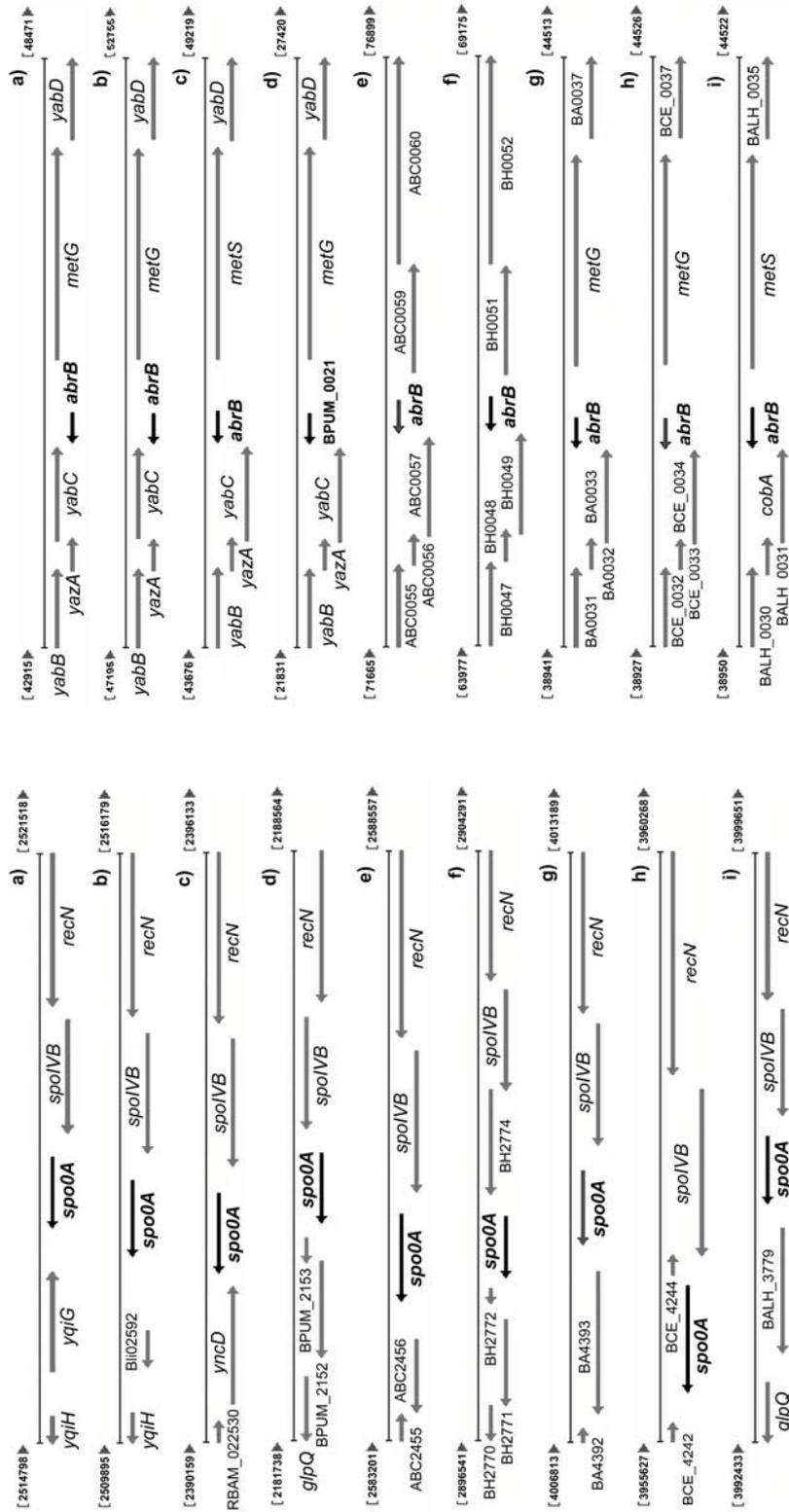


Рис. 2. Гены *spo0A* (слева) и *abrB* (справа) в секвенированных геномах бактерий: a) *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168; b) *B. amyloliquefaciens* FZB42; c) *B. pumilus* SAFR-032; d) *B. clausii* KSM-K16; e) *B. thuringiensis* str. Al Nakat; f) *B. weihenstephanensis*; g) *B. halodurans* C-125; h) *Vacillus cereus* ATCC 10987; i) *B. anthracis* str. Ames. На рисунке не представлены вид *B. weihenstephanensis*, так как его гены до конца не идентифицированы и носят условные названия локусов

Табл. 2

Гомология аминокислотных последовательностей регуляторных белков различных видов бацилл

Штаммы <i>Bacillus</i>	Гомология (идентичность), %			
	PhoP	ResD	Spo0A	AbrB
<i>B. subtilis subsp. subtilis str.</i> 168	100 (100)	100 (100)	100 (100)	100 (100)
<i>B. licheniformis</i> ATCC 14580	90 (80)	94 (90)	96 (93)	96 (94)
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	94 (87)	96 (94)	99 (96)	98 (98)
<i>B. pumilus</i> SAFR-032	90 (82)	95 (91)	97 (89)	97 (94)
<i>B. clausii</i> KSM-K16	81 (68)	86 (75)	85 (74)	91 (82)
<i>B. halodurans</i> C-125	84 (70)	85 (73)	89 (76)	93 (80)
<i>B. anthracis str.</i> Ames	87 (73)	89 (78)	88 (81)	93 (85)
<i>B. anthracis str.</i> 'Ames Ancestor'	87 (73)	89 (78)	88 (81)	93 (85)
<i>B. anthracis str.</i> Sterne	87 (73)	89 (78)	88 (80)	93 (85)
<i>B. cereus</i> ATCC 10987	87 (73)	88 (77)	88 (81)	93 (85)
<i>B. cereus</i> E33L	87 (73)	89 (78)	88 (80)	77 (54)
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	87 (73)	89 (79)	88 (81)	93 (85)
<i>B. cereus subsp. cytotoxis</i> NVH 391-98	88 (73)	90 (79)	88 (82)	94 (86)
<i>B. thuringiensis str.</i> Al Hakam	87 (73)	88 (77)	88 (80)	93 (85)
<i>B. thuringiensis serovar konkukian str.</i> 97-27	87 (73)	89 (78)	88 (80)	93 (85)
<i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4	87 (73)	89 (79)	88 (80)	93 (84)

генов ДНК полимеразы I (*polA*) и формаидопиримидин-ДНК гликозилазы (*mutM*). Гены *resD* и *resE* у *B. subtilis* входят в состав оперона *resABCDE*, у других бацилл отмечена аналогичная организация *res*-генов. Гены *spo0A* расположены в более вариабельных локусах: после этого гена в большинстве случаев встречаются гены *spoIVB* (сериновой пептидазы) и *recN* (АТФазы, участвующей в рекомбинации и репарации), а перед ним – неидентифицированные открытые рамки считывания. За *abrB*-генами, транскрибируемыми в обратном от основного контекста направлении, чаще следует ген метионил-тРНК синтезеты (*metG* или *metS*), а перед ними, за исключением *B. halodurans* и *B. clausii*, а также группы *B. cereus*, расположены гены эндонуклеазы (*yazA*) и метилтрансферазы (*yabC*).

Гомология PhoP-, ResD-, Spo0A- и AbrB-белков бацилл. Далее с помощью компьютерной программы «Blast» (стандартные параметры) была установлена степень гомологии PhoP-, ResD-, Spo0A- и AbrB-белков бацилл с одноименными регуляторными белками *B. subtilis* (табл. 2). Показано, что аминокислотные последовательности исследуемых белков разных видов бацилл близки между собой: гомология белков PhoP с белком *B. subtilis* составила более 81%, белков ResD и Spo0A – более 85%, белков AbrB – более 77%.

Необходимо заметить, что у *B. pumilus*, а также штаммов *B. cereus* и *B. thuringiensis* было обнаружено несколько *abrB*-подобных генов. Так, например, у *B. pumilus* присутствуют два гена, которые могут быть названы гомологами *abrB B. subtilis*. Первый ген обозначен в аннотации к последовательности нуклеотидов как возможный регулятор транскрипции и назван BPUM_0021. Его генетический контекст сходен с таковым *B. subtilis* (рис. 2, d). Второй ген

расположен в другом генетическом окружении, но обозначен как регулятор транскрипции *abrB*. Белок, кодируемый VPUM_0021, идентичен AbrB *B. subtilis* на 94% (гомология – 97%), в то время как белок, кодируемый *abrB*-геном, – только на 44% (гомология – 70%). В результате, на основании подобия генетического контекста с таковым *B. subtilis* и наибольшей гомологии белков мы считаем, что именно регулятор транскрипции VPUM_0021 является AbrB-белком *B. pumilus*, а второй белок может быть его паралогом. У бактерий паралогичные факторы транскрипции обычно выполняют иные функции в клетке [27].

Таким образом, наибольшее сходство в организации генетических локусов с *B. subtilis* отмечено у *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* и *B. pumilus*. Для этих же видов характерен более высокий процент гомологии белков-регуляторов (более 90–94% для PhoP-белков, 94–96% для ResD, 96–99% для Spo0A и AbrB).

Роль ResD-, Spo0A- и AbrB-белков *B. subtilis* в регуляции биосинтеза гуанилспецифичных рибонуклеаз. Ранее было установлено, что синтез гуанилспецифичных рибонуклеаз *B. pumilus* (РНКаза Вру), *B. intermedius* (РНКаза Ви), *B. thuringiensis* (РНКаза Vth) осуществляется в условиях фосфатного голодания, а экспрессия их генов в рекомбинантных штаммах *B. subtilis* позитивно регулируется PhoP–PhoR-системой (рис. 3, а) [24, 25]. Мы попытались расширить представление о фосфатной регуляции у этих видов бацилл и показать для них справедливость схемы регуляции специфического РНО-ответа *B. subtilis*, в частности доказать участие ResD-, AbrB- и Spo0A-белков. В исследование мы также включили вид *B. circulans*, синтез гуанилспецифичной рибонуклеазы (РНКаза Vci) которого хотя и происходит при недостатке фосфата в среде, однако не зависит от PhoP–PhoR-системы (рис. 3, а).

Чтобы установить роль ResD-, Spo0A- и AbrB-белков *B. subtilis* в регуляции биосинтеза гуанилспецифичных рибонуклеаз, плазмидами, несущими гены РНКаза Vi, Вру, Vth и Vci, состыкованные с геном внутриклеточного ингибитора барстара [25, 29], были трансформированы полноценные (контроль) и мутантные по генам регуляторных белков штаммы: *B. subtilis* JH642 (*pheA1 trpC2*), *B. subtilis* LAB2506 (*trpC2 pheA1 resD::cat*), *B. subtilis* JH646 (*pheA1 trpC2 spo0A12*), *B. subtilis* R15-13 (*pheA1 trpC2 abrB23 spo0A12*). Штаммы для работы были любезно предоставлены доктором Д. Зейглером (D. Zeigler, BGSC, The Ohio State University, USA) и профессором М. Накано (M.M. Nakano, Oregon Health and Science University, Beaverton, USA). Рекомбинанты отбирали по двум признакам: устойчивости к канамицину (маркеру плазмиды) и наличию РНКазной активности. Рибонуклеазную активность в культуральной жидкости рекомбинантов определяли по кислоторастворимым продуктам гидролиза модельного субстрата – РНК [30]. 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 программы электронных таблиц. Определяли стандартное отклонение (*S*) и доверительный интервал для среднего, принимая $p = 0.05$ за достоверный уровень значимости.

Показано, что все исследуемые рибонуклеазы синтезируются на бесфосфорной среде как рекомбинантными штаммами с полноценными белками, так и мутантными штаммами, однако уровни их активностей различаются значимо

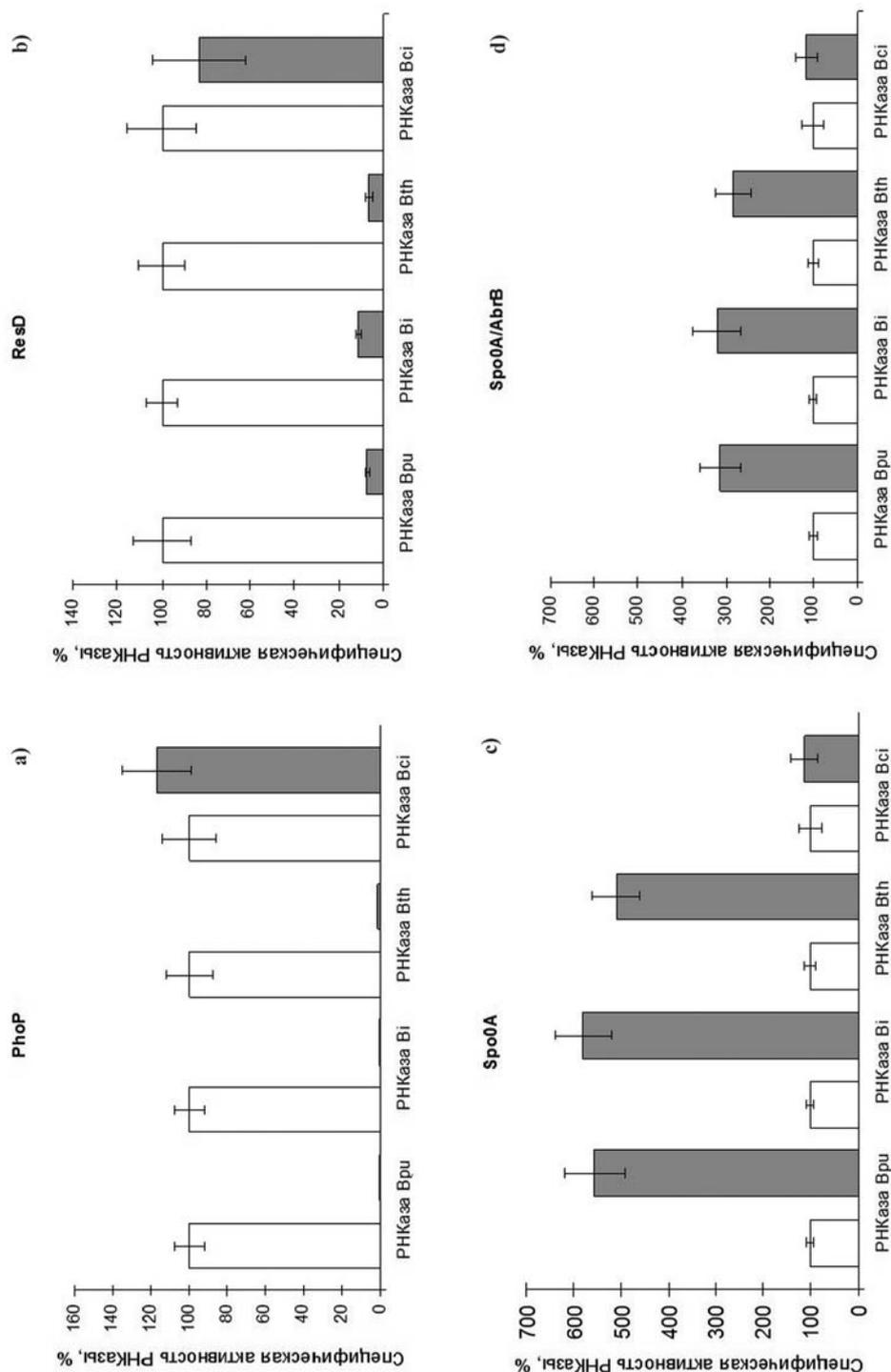


Рис. 3. Экспрессия генов рибонуклеаз *B. pumilus*, *B. intermedius*, *B. thuringiensis* и *B. circulans* в рекомбинантных штаммах *B. subtilis* с полными (белые столбики) и мутантными (черные столбики) генами *phoP*, *resD*, *spo0A*, *abrB*

(рис. 3). О позитивной роли белка ResD в регуляции экспрессии генов РНКаз Vpu, Vi и Vth свидетельствуют данные, представленные на рис. 3, *b*. В *resD*-мутантных штаммах специфическая активность рибонуклеаз была снижена на 89–93% (РНКазы Vpu), 87–90% (РНКазы Vi) и 90–95% (РНКазы Vth) по сравнению с контролем. В штаммах, дефектных по Spo0A-белку (рис. 3, *c*), уровни активностей этих РНКаз превышали контрольные значения в 5.4–5.8 раз (РНКазы Vpu), 5.5–6.0 раз (РНКазы Vi) и 4.9–5.3 раза (РНКазы Vth), а в двойных *spo0A/abrB* мутантах (рис. 3, *d*) – в 3.0–3.3 раза (РНКазы Vpu), 3.0–3.4 раза (РНКазы Vi) и 2.7–3.1 раза (РНКазы Vth). Подобные результаты говорят о том, что белок Spo0A регулирует продукцию рибонуклеаз, выполняя роль репрессора, а белок AbrB является активатором экспрессии генов рибонуклеаз Vpu, Vi и Vth. Так как в нашем случае использовались штаммы, мутантные по двум генам: и репрессора, и активатора, экспрессия генов рибонуклеаз в двойных мутантах была возможна, несмотря на недостаток активатора, однако ее уровень был снижен по сравнению с таковым в штаммах с мутацией только по *spo0A*-гену.

Активность РНКазы *B. circulans* во всех исследуемых мутантных штаммах была сопоставима с контролем (рис. 3, *b–d*), что указывает на отсутствие регуляции ее биосинтеза со стороны ResD-, Spo0A- и AbrB-белков.

Обсуждение результатов

Неорганический фосфат (Φ_n) – предпочтительный источник фосфора для бактерий – является одним из самых малодоступных веществ в окружающей среде, следовательно, адаптация к изменению его внеклеточной концентрации является важной биологической особенностью. У бактерий для извлечения, хранения и метаболизма Φ_n сформировались сложные регуляторные механизмы. Известно, что специфическим ответом *B. subtilis* на снижение концентрации фосфата в окружающей среде является экспрессия генов РНО-регулона, которая контролируется, по крайней мере, тремя системами трансдукции сигнала: PhoP–PhoR, ResD–ResE и системой Spo0A-фосфопередачи [1, 12]. Кроме *B. subtilis*, РНО-регулон охарактеризован также для *B. licheniformis* [23]. Однако ответ *B. licheniformis* на фосфатное голодание лишь частично сходен с таковым *B. subtilis*. Кроме того, наличие РНО-регулона предполагается у таких видов, как *B. amyloliquefaciens*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. intermedius*. У *B. anthracis*, *B. thuringiensis* и *B. cereus* описаны отдельные белки, которые могли бы участвовать в регуляции специфического РНО-ответа, а именно ResD, AbrB и Spo0A. Однако в основном их функции изучались применительно к процессу образования токсинов. Показано, что у *B. anthracis* белок AbrB, а у *B. thuringiensis* белок Spo0A являются репрессорами транскрипции генов токсинов [32, 33]. У *B. cereus* и *B. anthracis* совместную регуляцию метаболизма и токсинообразования осуществляют также гомологи двухкомпонентной системы ResD–ResE *B. subtilis* [34, 35]. Белок AbrB *B. thuringiensis* репрессирует экспрессию гена металлопротеазы [36]. В связи с этим в настоящей работе мы попытались проанализировать встречаемость среди бацилл систем, участвующих в РНО-регуляции у *B. subtilis*.

В секвенированных геномах таких видов бацилл, как *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. anthracis*, *B. cereus*,

B. thuringiensis и *B. weihenstephanensis*, нами были найдены гены, кодирующие белки PhoP, ResD, Spo0A и AbrB. В широком смысле белки, имеющие общее происхождение и выполняющие сходные функции в разных организмах, называются ортологами. Один из методов предсказания ортологичных генов в геномах бактерий основан на определении совместной встречаемости гомологичных генов [37]. Авторы исходят из наблюдения, что гомологичные гены с высокой долей вероятности будут ортологичными, если соседние с ними гены также гомологичны. Генетические контексты исследуемых нами генов оказались сходными. Кроме того, белки, кодируемые этими генами, по первичной структуре высокогомологичны регуляторам *B. subtilis*. Отмечена также следующая закономерность: наибольшее сходство аминокислотных последовательностей с таковыми *B. subtilis* наблюдается у *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus* (90–99%); отдельную группу с более низким уровнем гомологии формируют *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* и *B. weihenstephanensis* (87–93%); третью группу образуют *B. clausii* и *B. halodurans*, у которых в большинстве случаев сходство белков с регуляторами *B. subtilis* еще на несколько процентов ниже, чем у группы *B. cereus* (81–93%). Такое распределение, по-видимому, является отражением их филогенетического родства. Так, по данным Донг и Сотэ, полученным при секвенировании и выравнивании нуклеотидных последовательностей 3'-конца 16S рДНК и 16S–23S внутреннего транскрибируемого спейсера 46 видов бацилл, *B. subtilis*, *B. licheniformis* и *B. amyloliquefaciens* отнесены к VI группе, а *B. anthracis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis* – к группе X [31]. Однако вид *B. halodurans*, состоящий в группе V, более близок к группе *B. subtilis*, чем группа *B. cereus*.

Таким образом, учитывая высокий уровень гомологии исследуемых белков, можно предположить их функциональное сходство. Однако было показано, что предсказать точную функцию факторов транскрипции бактерий только по гомологии невозможно из-за быстрой дивергенции функций [28]. Связь между сохранением функций и уровнем сходства последовательностей исследовалась в работах [40, 41]. Показано, чтобы предсказать функцию ферментов с точностью 90%, идентичность аминокислотных последовательностей должна составлять от 40 до 70%. В центре нашего внимания находилась близкородственная группа – род *Bacillus*, и полное совпадение аминокислотных последовательностей белков составило не менее 54%, поэтому мы полагаем, что основные функции регуляторов сохранились у этих филогенетически близких видов. Действительно, установлено, что структурно близкие AbrB- и ResD-белки *B. anthracis* и *B. subtilis* выполняют сходные функции [32, 34, 40]. С использованием очищенных AbrB-белков из *B. subtilis* и *B. anthracis* и их ДНК-мишеней, а также синтетических последовательностей нуклеотидов была экспериментально подтверждена одинаковая ДНК-связывающая специфичность этих ортологов [41].

Учитывая тот факт, что ResD-, Spo0A- и AbrB-белки у *B. subtilis* принимают участие в регуляции экспрессии генов *pho*, мы изучили их влияние на экспрессию генов гуанилспецифичных рибонуклеаз *B. pumilus*, *B. intermedius*, *B. thuringiensis* и *B. circulans*, синтез которых также осуществляется при фосфатном голодании. Полученные нами данные показывают, что дефекты в ResD-, Spo0A- и AbrB-

белках приводят к изменению биосинтеза РНКаз Vpu, Vi и Vth рекомбинантными штаммами *B. subtilis*, что позволяет сделать вывод об их позитивной (ResD и AbrB) или негативной (Spo0A) роли. Эти результаты согласуются с данными литературы, свидетельствующими о том, что в условиях фосфатного голодания мутация в гене *resD* приводит к снижению специфической активности щелочной фосфатазы – типичного фермента РНО-регулона *B. subtilis* – на 80–90% от уровня активности в штамме дикого типа [14]. В *spo0A*-мутантных штаммах наблюдается сверхпродукция щелочной фосфатазы, а мутации в *abrB*- или *resD*-генах снижают экспрессию генов РНО-регулона в *spo0A*-мутантном штамме [14]. Как и у *B. subtilis*, белки Spo0A *B. anthracis* и *B. thuringiensis* репрессировывают ген *abrB* [32, 33]. Следовательно, экспрессия генов гуанилспецифических рибонуклеаз *B. pumilus*, *B. intermedius* и *B. thuringiensis* регулируется подобно генам РНО-регулона *B. subtilis*.

Биосинтез РНКазы *B. circulans* при фосфатном голодании не подвержен влиянию ResD-, Spo0A- и AbrB-регуляторов, как и PhoP–PhoR-системы. Возможно, синтез фермента осуществляется по σ^B -зависимому механизму. Вместе с тем отсутствие регуляции со стороны этих белков еще не свидетельствует о том, что РНО-регулон у *B. circulans* не функционирует. Так например, у *B. subtilis* фитаза не является членом РНО-регулона, а у *B. licheniformis* и *B. amyloliquefaciens* она относится к ферментам, наиболее сильно индуцируемым при РНО-ответе [23, 26].

Таким образом, регуляторные системы, подобные РНО-регулону *B. subtilis*, обнаружены у представителей различных видов бацилл, что позволяет рассматривать РНО-регулон как универсальную систему, обеспечивающую ответ клетки на дефицит экзогенного фосфата.

Summary

V.V. Ulyanova, V.I. Vershinina. Systems That Control *Bacillus* Phosphate Starvation Specific Response.

Distribution analysis of systems that control phosphate starvation response was carried out among 10 *Bacillus* species with completely sequenced genomes. It was determined that genes coding for main regulators of PHO response, PhoP, ResD, Spo0A and AbrB, are present in all *Bacillus* genomes, locating in very similar genetic contexts. Moreover, these proteins share a high level of homology with the same regulators of *B. subtilis*. Using mutant *B. subtilis* strains ResD, Spo0A and AbrB proteins was shown to regulate expression of the genes for guanyl-specific ribonucleases from *B. pumilus*, *B. intermedius* and *B. thuringiensis* in a similar to *B. subtilis* PHO genes manner under phosphate starvation conditions. Biosynthesis of *B. circulans* RNase is not subject to influence of ResD, Spo0A and AbrB regulators as well as PhoP–PhoR system and it is likely to be σ^B -dependent. Nevertheless, the data obtained makes it possible to conclude that regulatory systems similar to *B. subtilis* PHO regulon function in the representatives of different *Bacillus* species, and consider PHO regulon as universal system mediating cell response to deficiency of exogenous phosphate.

Key words: PHO regulon, *Bacillus*, guanyl-specific ribonucleases.

Литература

1. Hulett F.M. The signal – transduction network for PHO regulation in *Bacillus subtilis* // Mol. Microbiol. – 1996. – V. 19, No 5. – P. 933–939.
2. Antelmann H., Scharf C., Hecker M. Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis // J. Bacteriol. – 2000. – V. 182, No 16. – P. 4478–4490.
3. Hulett F.M., Lee J.K., Shi L., Sun G., Chesnut R., Sharkova E., Duggan M.F., Kapp N. Sequential action of two-component genetic switches regulates the *pho* regulon in *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. – 1994. – V. 176, No 5. – P. 1348–1358.
4. Eder S., Shi L., Jensen K., Yamane K., Hulett F.M. A *Bacillus subtilis* secreted phosphodiesterase/alkaline phosphatase is the product of a Pho regulon gene, *phoD* // Microbiol. – 1996. – V. 142, No 8. – P. 2041–2047.
5. Jongbloed J.D., Martin U., Antelmann H., Hecker M., Tjalsma H., Venema G., Bron S., van Dij J.M., Müller J. TatC is a specificity determinant for protein secretion via the twin-arginine translocation pathway // J. Biol. Chem. – 2000. – V. 275, No 52. – P. 41350–41357.
6. Ogura M., Yamaguchi H., Yoshida K., Fujita Y., Tanaka T. DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* DegU, ComA and PhoP regulons: an approach to comprehensive analysis of *B. subtilis* two-component regulatory systems // Nucleic Acids Res. – 2001. – V. 29, No 18. – P. 3804–3813.
7. Qi Y., Kobayashi Y., Hulett F.M. The *pst* operon of *Bacillus subtilis* has a phosphate regulated promoter and is involved in phosphate transport but not in regulation of the *pho* regulon // J. Bacteriol. – 1997. – V. 179, No 8. – P. 2534–2539.
8. Liu W., Eder S., Hulett F.M. Analysis of *Bacillus subtilis* *tagAB* and *tagDEF* expression during phosphate starvation identifies a repressor role for PhoP-P // J. Bacteriol. – 1998. – V. 180, No 3. – P. 753–758.
9. Paul S., Birkey S., Liu W., Hulett F.M. Autoinduction of *Bacillus subtilis* *phoPR* operon: transcription results from enhanced transcription from $E\sigma^A$ - and $E\sigma^E$ -responsive promoters by phosphorylated PhoP // J. Bacteriol. – 2004. – V. 186, No 13. – P. 4262–4275.
10. Robichon D., Arnaud M., Gardan R., Pragai Z., O'Reilly M., Rapoport G., Debarbouille M. Expression of a new operon from *Bacillus subtilis*, *yzkB-ykoL*, under the control of the TnrA and PhoP-PhoR global regulators // J. Bacteriol. – 2000. – V. 182, No 5. – P. 1226–1231.
11. Pragai Z., Harwood C.R. Regulatory interactions between the Pho and sigma B-dependent general stress regulons of *Bacillus subtilis* // Microbiol. – 2002. – V. 148, No 5. – P. 1593–1602.
12. Birkey S.M., Liu W., Zhang X., Duggan M.F., Hulett F.M. PHO signal transduction network reveals direct transcriptional regulation of one two-component system by another two-component regulator: *B. subtilis* PhoP directly regulates production of ResD // Mol. Microbiol. – 1998. – V. 30, No 5. – P. 943–953.
13. Allenby N., O'Connor Z., Pragai N.E., Ward A.C., Wipat A., Harwood C.R. Genome-wide transcriptional analysis of the phosphate starvation stimulon of *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. – 2005. – V. 187, No 23. – P. 8063–8080.
14. Sun G., Sharkova E., Chesnut R., Birkey S., Duggan M.F., Sorokin A., Pujic P., Ehrlich S.D., Hulett F.M. Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. – 1996. – V. 178, No 5. – P. 1374–1385.
15. Schau M., Eldakak A., Hulett F.M. Terminal oxidases are essential to bypass the requirement for ResD for full Pho induction in *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. – 2004. – V. 186, No 24. – P. 8424–8432.

16. Phillips Z.E., Strauch M.A. *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression // Cell. Mol. Life Sci. – 2002. – V. 59, No 3. – P. 392–402.
17. Hamon M.A., Stanley N.R., Britton R.A., Grossman A.D., Lazazzera B.A. Identification of AbrB-regulated genes involved in biofilm formation by *Bacillus subtilis* // Mol. Microbiol. – 2004. – V. 52, No 3. – P. 847–860.
18. Hahn J., Roggiani M., Dubnau D. The major role of Spo0A in genetic competence is to downregulate *abrB*, an essential competence gene // J. Bacteriol. – 1995. – V. 177, No 12. – P. 3601–3605.
19. Burbulys D., Trach K.A., Hoch J.A. Initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay // Cell. – 1991. – V. 64, No 3. – P. 545–552.
20. Fujita M., González-Pastor J.E., Losick R. High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. – 2005. – V. 187, No 4. – P. 1357–1368.
21. Prágai Z., Allenby N.E., O'Connor N., Dubrac S., Rapoport G., Msadek T., Harwood C.R. Transcriptional regulation of the *phoPR* operon in *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. – 2004. – V. 186, No 4. – P. 1182–1190.
22. Sun G., Birkey S.M., Hulett F.M. Three two-component signal-transduction systems interact for Pho regulation in *Bacillus subtilis* // Mol. Microbiol. – 1996. – V. 19, No 5. – P. 942–948.
23. Hoi L.T., Voigt B., Jergen B., Ehrenreich A., Gottschalk G., Evers S., Feesche J., Maurer K., Hecker M., Schweder T. The phosphate-starvation response of *Bacillus licheniformis* // Proteomics. – 2006. – V. 6, No 12. – P. 3582–3601.
24. Znamenskaya L.V., Vershinina O.A., Vershinina V.I., Leshchinskaya I.B., Hartley R.W. Expression of the genes for guanil-specific ribonucleases from *Bacillus intermedius* and *Bacillus pumilus* is regulated by the two-component signal-transduction system PhoP-PhoR in *Bacillus subtilis* // FEMS Microbiol. Lett. – 1999. – V. 173, No 1. – P. 217–222.
25. Морозова О.В., Вершинина О.А., Вершинина В.И., Лецинская И.Б., Знаменская Л.В. Регуляция биосинтеза внеклеточных фосфогидролаз у бацилл // Мол. генетика, микробиол., вирусол. – 2001. – № 2. – С. 13–17.
26. Makarewicz O., Dubrac S., Msadek T., Borriss R. Dual role of the PhoP-P response regulator: *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 phytase gene transcription is directed by positive and negative interactions with the *phyC* promoter // J. Bacteriol. – 2006. – V. 188, No 19. – P. 6953–6965.
27. Gelfand M.S. Evolution of transcriptional regulatory networks in microbial genomes // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2006. – V. 16, No 3. – P. 420–429.
28. Price M.N., Dehal P.S., Arkin A.P. Orthologous transcription factors in bacteria have different functions and regulate different genes // PLoS Comput. Biol. – 2007. – V. 3, No 9. – Art. e175.
29. 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, No 1–2. – P. 16–18.
30. Anfinsen C.B., Redfield R.R., Choate W.I., Page J., Carrol W.R. Studies of gross structure, cross-linkage and terminal sequences in ribonuclease // J. Biol. Chem. – 1957. – V. 207, No 1. – P. 201–210.
31. Dong X., Cote J.C. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2003. – V. 53, No 3. – P. 695–704.
32. Chun J., Bae K.S. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences // Antonie van Leeuwenhoek. – 2000. – V. 78, No 2. – P. 123–127.

33. Gatson J.W., Benz B.F., Chandrasekaran C., Satomi M., Venkateswaran K., Hart M.E. *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2006. – V. 56, No 7. – P. 1475–1484.
34. Saile E., Koehler T.M. Control of anthrax toxin gene expression by the transition state regulator *abrB* // J. Bacteriol. – 2002. – V. 184, No 2. – P. 370–380.
35. Poncet S., Dervyn E., Klier A., Rapoport G. Spo0A represses transcription of the *cry* toxin genes in *Bacillus thuringiensis* // Microbiol. – 1997. – V. 143, No 8. – P. 2743–2751.
36. Vetter S.M., Schlievert P.M. The two-component system *Bacillus* respiratory response A and B (BrrA-BrrB) is a virulence factor regulator in *Bacillus anthracis* // Biochem. – 2007. – V. 46, No 25. – P. 7343–7352.
37. Duport C., Zigha A., Rosenfeld E., Schmitt P. Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the Redox-sensitive ResDE signal transduction system // J. Bacteriol. – 2006. – V. 188, No 18. – P. 6640–6651.
38. Grandvalet C., Gominet M., Lereclus D. Identification of genes involved in the activation of the *Bacillus thuringiensis inhA* metalloprotease gene at the onset of sporulation // Microbiol. – 2001. – V. 147, No 7. – P. 1805–1813.
39. Wu H., Mao F., Olman V., Xu Y. Accurate prediction of orthologous gene groups in microbes // Proc. IEEE Comput. Syst. Bioinform. Conf. – 2005. – P. 73–79.
40. Rost B. Enzyme function less conserved than anticipated // J. Mol. Biol. – 2002. – V. 318, No 2. – P. 595–608.
41. Tian W., Skolnick J. How well is enzyme function and conserved as a function of pairwise sequence identity? // J. Mol. Biol. – 2003. – V. 333, No 4. – P. 863–882.
42. Baillie L., Moir A., Manchee R. The expression of the protective antigen of *Bacillus anthracis* in *Bacillus subtilis* // J. Appl. Microbiol. – 1998. – V. 64, No 2. – P. 741–746.
43. Strauch M.A., Ballar P., Rowshan A.J., Zoller K.L. The DNA-binding specificity of the *Bacillus anthracis* AbrB protein // Microbiol. – 2005. – V. 151, No 6. – P. 1751–1759.

Поступила в редакцию
21.02.08

Ульянова Вера Владимировна – аспирант кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: ulyanova_vera@mail.ru

Вершинина Валентина Ивановна – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: Valentina.Vershinina@ksu.ru