

0719537-1

На правах рукописи

МОРОЗОВА ОЛЬГА ВЛАДИМИРОВНА

**Биосинтез внеклеточных
гуанилспецифичных рибонуклеаз
Bacillus thuringiensis и *Bacillus circulans***

03.00.07 - микробиология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

КАЗАНЬ – 2000

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов
Казанского государственного университета им В.И. Ульянова - Ленина

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
с.н.с. Л.В.Знаменская

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
проф. В.И. Чиков

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА
КФУ



0000947852

кандидат биологических наук,
С.Ю. Селивановская

Ведущая организация: Нижегородский государственный
университет, кафедра молекулярной
биологии и иммунологии

Защита диссертации состоится 7 декабря 2000 г. в _____ часов
на заседании Диссертационного Совета К 053.29.19. при Казанском
государственном университете им. В.И. Ульянова - Ленина, 420008 г.
Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского
государственного университета

Автореферат разослан 4 ноября 2000 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А.Н. Аскарова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Щелочные внеклеточные гуанилспецифичные рибонуклеазы обнаружены у многих бацилл: *B. amyloliquefaciens*, *B. intermedius*, *B. pumilus*, *B. circulans*, *B. thuringiensis*, *B. coagulans*, *B. polymyxa* и др. Детальный анализ этих ферментов выявил высокую гомологию их первичных структур, физико-химических и каталитических свойств (Лещинская и др., 1974; Лещинская, 1975; Hartley, 1997; Афанасенко и др., 1979; Струминская и др., 1992; Дементьев и др., 1993а,б,в; 1996). Изучены некоторые биологические эффекты внеклеточных рибонуклеаз: стимуляция роста про- и эукариот (Колпаков и др., 1996, 2000), мутагенные и антимутагенные свойства (Ilinskaya et al., 1995; Ivanchenko et al., 1997), антивирусное и противоопухолевое действие (Karpetsky, 1981; Youle et al., 1993; Калачева и др., 1997; Kurinenko et al., 1998). РНКазы используются в молекулярной биологии в качестве инструмента для изучения РНК, находят применение в медицине и сельском хозяйстве. Тандем генов РНКазы *B. amyloliquefaciens* – барназы и ее внутриклеточного ингибитора – барстара был использован для получения гибридных семян табака (Mariani et al., 1991, 1992) и получения устойчивого к фитофторозу картофеля (Natsoulis, Boeke, 1991). На основе ингибиторов РНКаз создаются препараты для лечения аллергии (Hatzelmann et al., 1995; Bufe et al., 1996), активаторы РНКаз применяются при терапии вирусных инфекций (Liu, Altman, 1995), разрабатываются терапевтические препараты, в том числе для воздействия на опухолевые клетки, путем создания конъюгатов РНКаз, обладающих специфичностью к определенному типу РНК (Giles et al., 1998; Robbins et al., 1998; Piccolie et al., 1999; Rybak, 1999).

Клонирование и секвенирование генов гуанилспецифичных РНКаз (Hartley, 1988; Shulga et al., 1992, 2000; Znamenskaya et al., 1995) открыло возможность изучения механизма регуляции биосинтеза ферментов на молекулярном уровне. Синтез и секреция ферментов деградации, в том числе фосфогидролаз, является одним из способов адаптации бактерий к изменяющимся условиям окружающей среды. Поэтому установление молекулярных механизмов биосинтеза ферментов различных бацилл может внести определенный вклад в понимание этой проблемы, имеющей общебиологическое значение. В связи с тем, что бациллярные ферменты имеют также практическое значение, результаты исследования регуляции их синтеза могут быть использованы в

биотехнологии, например, для повышения выхода ферментов путем клонирования генов с эффективными регуляторными элементами.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы было установление систем регуляции биосинтеза гуанилспецифичных рибонуклеаз, секретлируемых *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus circulans*, на основании изучения экспрессии клонированных генов в рекомбинантных штаммах *Bacillus subtilis*, включая дефектные по определенным сенсорно-регуляторным белкам и σ -фактору.

В работе решались следующие задачи:

1. Анализ структуры генов гуанилспецифичных рибонуклеаз *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus circulans*.
2. Изучение регуляции биосинтеза гуанилспецифичных рибонуклеаз *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus circulans* в исходных штаммах-продуцентах.
3. Получение плазмид с полными генами гуанилспецифичных рибонуклеаз *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus circulans*, обеспечивающих их синтез в клетках *B. subtilis*, и изучение экспрессии генов в рекомбинантных штаммах.
4. Выяснение возможной роли сенсорно-сигнальной системы РНО регулона, а также альтернативного σ^B -фактора в регуляции экспрессии генов рибонуклеаз.
5. Изучение молекулярного механизма действия актиномицина Д на биосинтез фосфогидролаз бацилл.

Научная новизна работы. К началу настоящей работы были изучены системы фосфатной регуляции синтеза внеклеточных гуанилспецифичных рибонуклеаз *B. intrmedius* (биназа), *B. pumilus* (РНКаза Вр) и *B. amyloliquefaciens* (барназа), выявлено два альтернативных способа регуляции их биосинтеза: активация экспрессии генов в условиях дефицита неорганического фосфата (биназа и РНКаза Вр) и независимый от последнего (барназа). В данной работе изучается биосинтез новых, гуанилспецифичных рибонуклеаз *B. thuringiensis* (РНКаза Вth) и *B. circulans* (РНКаза Вci). Установлено, что синтез обоих ферментов в исходных штаммах-продуцентах и рекомбинантных штаммах *B. subtilis* происходит в условиях фосфатного голодания, однако регуляция осуществляется разными системами. С использованием мутантных штаммов *B. subtilis* с делециями генов, кодирующих сенсорный и регуляторный белки РНО регулона, показано, что экспрессия гена гуанилспецифичной РНКазы *B. thuringiensis* регулируется на уровне транскрипции белком PhoP-PhoR двухкомпонентной системы

транскрипции сигнала
НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА
им. И. И. Лебедецкого
Вязьмского гос. университета

PhoP-PhoR. Это в

совокупности с полученными ранее данными указывает на то, что внутри рода *Bacillus* достаточно широко распространена система регуляции экспрессии генов по типу РНО регулона *B.subtilis*. В то же время подавляемый неорганическим фосфатом биосинтез РНКазы *B.circulans* не зависит от белков-регуляторов РНО регулона и альтернативного σ^B -фактора. На основании изучения биосинтеза гуанилспецифичных рибонуклеаз и фосфатаз ряда бацилл предложен механизм, объясняющий парадоксальный эффект активации синтеза некоторых ферментов актиномицином Д – ингибитором транскрипции. Выявленные в работе закономерности расширяют сведения о функционировании регуляторных систем бактериальной клетки.

Практическая ценность работы. Подобраны оптимальные среды для биосинтеза гуанилспецифичных рибонуклеаз *B.thuringienensis* и *B.circulans*. Сконструированы плазмиды, обеспечивающие высокий уровень экспрессии генов РНКазы Vth и РНКазы Vci в штаммах *B.subtilis*. Показано, что актиномицин Д может быть использован для увеличения выхода ферментов, в регуляции активности генов которых участвуют взаимодействующие с промотором внутриклеточные белки-регуляторы.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы были доложены на VIII Европейском конгрессе по биотехнологии (Будапешт, Венгрия, 1997), XI Всероссийской конференции “Ферменты микроорганизмов” (Казань, 1998), Эйкмановской юбилейной ‘международной конференции “Infections of 21 Century” (Нидерланды, 1998), ежегодных научных конференциях Казанского университета (Казань, 1999, 2000), конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам “Ломоносов 2000” (Москва, 2000), XXXVIII международной научной студенческой конференции “Студент и научно-технический прогресс” (Новосибирск, 2000), научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КГУ “Материалы и технологии XXI века” (Казань, 2000), Международном конгрессе по биохимии и молекулярной биологии “Beyond the Genome” (Великобритания, Бирмингем, 2000).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на страницах машинописного текста; состоит из обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела экспериментальных исследований, обсуждения

результатов, выводов, списка литературы. Работа содержит 11 таблиц, 25 рисунков. Список литературы включает источники.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали штаммы: *B.thuringiensis* var. *subtoxicus* В388 и *B.circularis* ВCF247, полученные из центра “Биоинженерия” РАН; *B.amyloliquefaciens* Н2, предоставленный Р.Хартли, (Hartley, НИИ, США); *B.inetrmadius* 7Р (ВКМ); *B.pumilus* КММ 62 (ТИБОХ ДВО РАН); *B.subtilis* 168 (*trp C2*), *B.subtilis* Ж642 (*pheA1trpC2*); *B.subtilis* МН 5117 (*pheA1trpC2phoPΔEcoRI mdh::Tef*); *B.subtilis* МН5124 (*pheA1trpC2phoRΔBall::Tef*), предоставленные Ф.М.Хьюлитт (Hullett, Чикагский университет, США); *B.subtilis* ML6 (*trp C2 sig B::ΔHind III Eco RV::cat*) предоставленный М.Хеккером (Hecker, Грифсволд, Германия) и *E.coli* XLI-Blue (*recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F'proAB, lac]^ϕ ZPM15, Tn10 (tet^R)*), “Stratagene”.

Плазмиды pFM2 и pLS1, предоставленные А.А. Шульгой (центр “Биоинженерия” РАН), pBI, pBP (Znamenskaya et al., 1999), pMT415 (R.Hartley et al., 1988), pMZ39, pMZ40 (получены в работе) обеспечивают экспрессию генов РНКаз в клетках *E.coli*. Плазмиды pMZ55, pMZ56 (Znamenskaya et al. 1999), pMT420 (Nagarajan et al., 1992), pMZ58, pMZ59 (получены в работе) обеспечивают экспрессию генов РНКаз в клетках *B.subtilis*.

Культивирование бактерий проводили при 30°C, *E.coli* – 37°C в пробирках и колбах объемом 100 и 500мл на качалке с интенсивностью качания 200 об/мин. Использовали питательные среды, оптимизированные для биосинтеза РНКаз: биназы, РНКазы Вр, барназы (Знаменская и др., 1980, 1994; Znamenskaya et al., 1995), РНКазы Вth и РНКазы Вci (получены в данной работе), синтетическая бесфосфорная среда (%): трис основной – 0,65; КСl – 5,0; NaCl – 0,1; (NH₄)₂SO₄ – 0,2; цитрат Na – 1,0; с добавлением 0,5% дрожжевого экстракта, среду Спицайзена, минимальную среду Белитски (Hecker et al., 1996).

Контроль роста культуры производили путем измерения оптической плотности суспензии при длине волны 590нм (ОП₅₉₀).

Среднюю удельную скорость роста культуры (μ) за время ($t_1 - t_0$) рассчитывали по формуле: $\mu = (\ln m_1 - \ln m_0) / (t_1 - t_0)$, где m_0 - величина биомассы в начале, m_1 - в конце отрезка времени.

Среднюю удельную скорость синтеза ферментов (ϵ) рассчитывали аналогичным образом.

Рибонуклеазную активность в культуральной жидкости определяли по количеству кислоторастворимых продуктов гидролиза РНК (Anfinsen et al., 1954; Лещинская и др., 1980).

Активность щелочных фосфомоно- и фосфодиэстераз определяли по реакции гидролиза паранитрофенилфосфата и бис-паранитрофенилфосфата натрия (Несмеянова и др., 1966).

Специфическую активность ферментов рассчитывали как отношение общей активности фермента к величине биомассы.

Количество неорганического фосфата в среде определяли колориметрически по образованию фосфорно-молибденовой сини (Аринушкина, 1970).

Трансформацию клеток *B. subtilis* плазмидными ДНК проводили по (Гловер, 1988).

Трансформацию *E. coli* плазмидными ДНК проводили по стандартной методике (Маниатис и др., 1984) или с использованием ПЭГ (Kurien, Scofield, 1995).

Плазмиды выделяли щелочным методом (Birnboim, Doli, 1979), или с помощью колонки Qiagen-tip 100.

Стабильность плазмид в клетках *B. subtilis* определяли по методу (Imanaka et al., 1981).

Статистическую обработку результатов с помощью общепринятых методов (Плохинский, 1978), а также математического аппарата программы Excel. Результаты многофакторных экспериментов по подбору состава среды обрабатывали с помощью комплекса компьютерных программ "ВЮРТ" (Краснов, Знаменская, 1992).

Компьютерный поиск генов, гомологичных генам исследуемых рибонуклеаз в геноме *B. subtilis*, проводили при помощи программ blastN и tblastN (Altschul et al., 1997).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Оптимизация питательных сред для биосинтеза РНКаз *B. thuringiensis* и *B. circulans* и динамика синтеза ферментов

1. Изучение биосинтеза РНКаз Bth и Bci начали с оптимизации питательных сред путем последовательной постановки многофакторных экспериментов по

планам ВЗ и ПФЭЗ², в которых варьировали концентрации трех основных компонентов – обедненного фосфатом пептона, глюкозы и неорганического фосфата (Фн). Оптимальная среда для биосинтеза РНКазы *Bth* включает пептон (5%), глюкозу (1,1%) и минеральные компоненты (Na_2HPO_4 - 0,04; CaCl_2 - 0,01; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,03; MnSO_4 - 0,01; NaCl - 0,3), для биосинтеза РНКазы *Vci* – только обедненный неорганическим фосфатом пептон (5%) и те же минеральные компоненты.

Определение динамики роста *B.thuringiensis* и *B.circulans*, и накопления РНКаз *Bth* и *Vci* показало, что синтез обоих ферментов осуществляется в стадии замедления роста культуры при дефиците Фн в среде (рис.1,2).

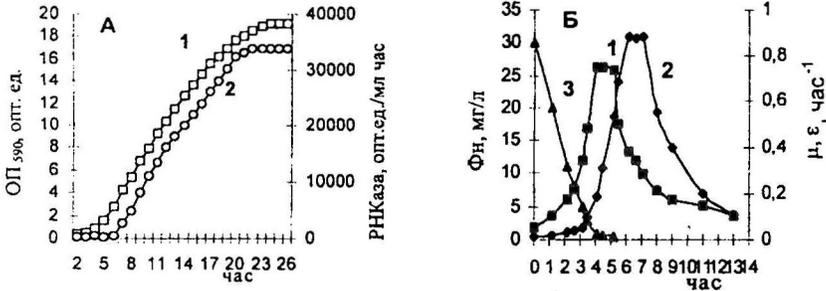


Рис. 1. А. Динамика роста и биосинтеза РНКазы *B.thuringiensis*

1 – биомасса, 2 - РНКазная активность

Б Удельная скорость роста и накопления РНКазы *B.thuringiensis*. 1 - удельная скорость роста (μ), 2 - удельная скорость накопления РНКазы (ϵ), 3 - потребление Фн

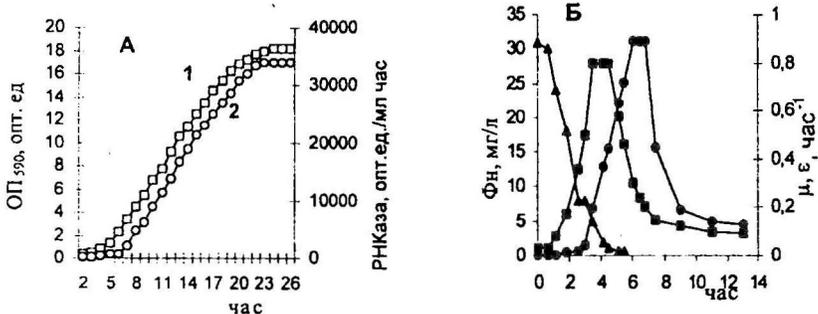


Рис. 2. А. Динамика роста и биосинтеза РНКазы *B.circulans*.

1 - Биомасса, 2 - РНКазная активность.

Б. Удельная скорость роста и накопления РНКазы *B.circulans*

1 - удельная скорость роста (μ), 2 - удельная скорость накопления РНКазы *Vci* (ϵ), 3 - потребление Фн.

2. Влияние неорганического фосфата на биосинтез гуанилспецифических РНКаз *B.thuringiensis* и *B.circulans*

Уже при подборе оптимального состава питательных сред было установлено, что присутствие Фн снижает РНКазную активность в культуральной жидкости обеих культур. При добавлении разных концентраций Фн в питательные среды, оптимальные для биосинтеза РНКаз, наблюдалось подавление биосинтеза ферментов по мере увеличения концентрации внесенного в среду Фн.

На рисунке 3 приведена сводная диаграмма, характеризующая влияние Фн на биосинтез бациллярных РНКаз, секретируемых *B.thuringiensis* (РНКазы Bth) и *B.circulans* (РНКазы Bci), в сравнении с изученными ранее РНКазами *B.intermedius* (биназы) и *B.amyloliquefaciens* (барназы).

Как видно из рисунка, общая и специфическая активность биназы, РНКазы Bth и РНКазы Bci монотонно понижаются при увеличении концентрации Фн в среде: при концентрации Фн 100мг/л специфическая активность РНКазы Bci подавлялась на 70%, РНКазы Bth – на 90%, биосинтез барназы при этих условиях не подавлялся.

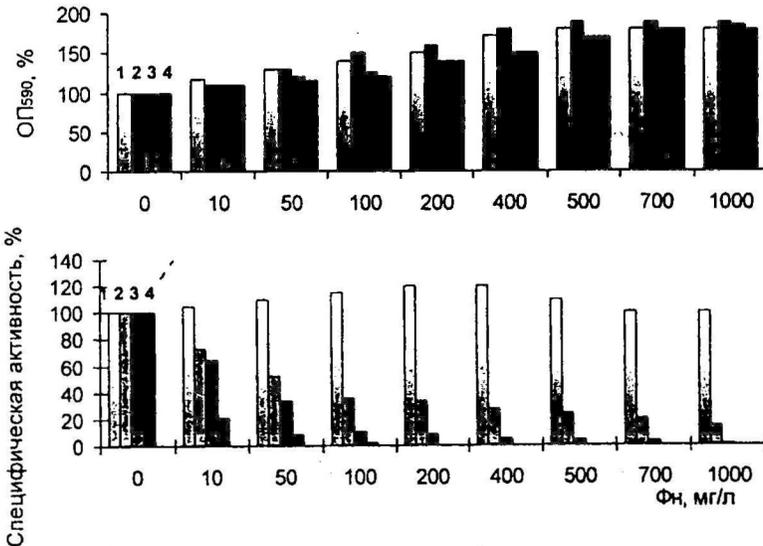


Рис. 3. Влияние Фн на рост бацилл и биосинтез ими гуанилспецифических рибонуклеаз: а - биомасса, б - специфическая активность. 1 - *B.amyloliquefaciens*, 2 - *B.circulans*, 3 - *B.thuringiensis*, 4 - *B.intermedius*.

Эти результаты были подтверждены дополнительными экспериментами, в которых внесение Фн на разных стадиях роста культур (перед посевом, в экспоненциальной фазе и фазе замедления роста) подавляло синтез РНКазы Vth и РНКазы Vci, но не барназы.

Кроме того, в экспериментах с отмытыми клетками, выращенными на обогащенной фосфором среде и перенесенными в обедненные и обогащенные Фн питательные среды, с использованием ингибитора синтеза белка -- хлорамфеникола была продемонстрирована дерепрессия синтеза РНКазы Vth и РНКазы Vci в условиях голодания по фосфору.

Таким образом, несмотря на структурную и функциональную гомологию РНКазы Vci и барназы, эти ферменты существенно различаются по механизмам регуляции биосинтеза, тогда как гомология биназы и РНКазы Vth коррелирует с одинаковыми условиями их синтеза.

Клонирование и секвенирование полных генов гуанилспецифичных РНКаз Vth и Vci позволяет исследовать молекулярные механизмы биосинтеза этих ферментов с использованием мутантных штаммов *B.subtilis*, дефектных по генам регуляторных белков, что в ряде случаев позволяет выяснить пути регуляции экспрессии генов других видов бацилл. С использованием штаммов *B.subtilis*, дефектных по белкам-регуляторам PhoP-PhoR, было установлено, что экспрессия генов гуанилспецифичных РНКаз *B.intermedius* и *B.pumilus* регулируется по типу генов РНО регулона *B.subtilis* (Znamenskaya et al., 1999).

3. Анализ генов гуанилспецифичных рибонуклеаз *B.thuringiensis* и *B.circulans*

Гены РНКаз Vth и Vci клонированы и секвенированы в центре "Биоинженерия РАН" (Кожаринова и др., 1994; Федорова и др., 1994). Ген РНКазы Vth является гомологом гена биназы (идентичность полных генов 83%), а ген РНКазы Vci гомологичен гену барназы (идентичность -- 92%). Участки генов, кодирующие лидерные пептиды РНКазы Vth и биназы, содержат 27 отличающихся нуклеотидов, которые вызывают 11 аминокислотных замен.

В области генов РНКазы Vci и барназы, кодирующих лидерный пептид, имеется 12 отличающихся нуклеотидов, которые обуславливают отличие лидерных пептидов по шести аминокислотам.

Промотор гена биказы (*B.intermedius* 7P, AN X53697).

-95 -85 -75 -65 -55 -45 -35 -10
TTCATCAGAAGGTTATCAGGAAAAAGCCTCATTTTAGCAAAGAACCTGTTCTTTACATTTCCTTCATGTTCGGGTGCTATAATATGAGGTA

Промотор гена РНКазы (*B.thuringiensis* var. *subtoxicus*).

TTTACGTCATCTAGAGACAGTAGGTCAAAAAGCCTCATTTTTTCCAATCTCCTGATTCTTACATTCTCTTTCATATGCCGGTGCTATAATATGAGGTA

Промотор гена *phoD* (*B.subtilis* JH642) (Eder et al, 1999)

GACCTGTTTTTAATGTTCAAGCGCTTTACAATCAGTTCACACTTCTTCACAGTCGTTTAACAATGATTTCCTATAATGGAGACGT

Промотор гена *tuaA* (*B.subtilis* JH642, Liu, Hulett, 1998)

GTAAAAGAGATTTACAACATTTATCAGAAAAACACGTAATCACACTTCTTAACATACCATTTACATCCAATTTACATCCGTCTGTAAACTGACTGGCAT

Промотор гена *resD* (*B.subtilis* JH642, Birkey et al., 1998)

TTCACATAACCTTCAAAAAAGTAGAAATGTGAAATGAACTGCAATGATATAATTGATGGA

Промотор гена барназы (*B.amyloliquefaciens* H2, AN 14442).

GGTTGGTTCAGCCGGGTTTATTTTTTCGCTAGATAAAAAGTACTATTTTTAAATCTTTCTATTCSTTTCTTTTCGTTGCTGATTACAATGAAAAGG

Промотор гена РНКзы *Vci* (*B.circulans* BCF247, AN Z29626)

GTTGGTTCATGCCGGGTTTATTTTTTCGCTGGATCAAAAGTACTATTTTTAAATCTATCTATTCSTTTCTTTTCGATGCTGATTACAATAAAAAGG

Рис. 4. Промоторы генов РНКазы *Bth* и РНКазы *Vci* в сравнении с промоторами генов биказы, барназы и генов РНО регулона *B.subtilis*. Сайты инициации синтеза мРНК подчеркнуты, ТТ(А/Т/С)АА-подобные гексануклеотиды выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Промотор гена РНКазы Bth содержит одну пару гексануклеотидов, гомологичных *rho*-боксу – последовательности, узнаваемой регуляторным белком PhoP генов РНО регулона *B.subtilis*, активируемых в условиях фосфатного голодания (Eder et al., 1999). В отличие от этого в секвенированном 5'-концевом участке гена РНКазы Vci, включающем промотор, подобных последовательностей не обнаружено (рис.4). Поскольку *rho*-боксы могут располагаться на достаточно большом расстоянии от -10 области, а клонированный фрагмент хромосомы *B.circulans* содержит большой несеквенированный участок на 5'-конце гена РНКазы Vci, который теоретически может включать подобные последовательности, мы решили проверить действие белков PhoP и PhoR, являющихся компонентами сенсорно-регуляторной системы РНО регулона *B.subtilis* на биосинтез обеих РНКаз. Для этого были сконструированы плазмиды, обеспечивающие экспрессию генов РНКаз Bth и Vci в клетках *B.subtilis*.

4. Конструирование плазмид, содержащих полные гены РНКаз Bth (pMZ58) и Vci (pMZ59) и обеспечивающих их экспрессию в *B.subtilis*

Плазмида pMZ58 получена путем лигирования плазмиды pMZ40, несущей полный ген РНКазы Bth и ген барстара под своим промотором, и вектора pUB110. Донором фрагмента хромосомы *B.thuringiensis* с геном РНКазы Bth служила плазмида pLS1. Плазмида pMZ59 получена путем встраивания фрагмента плазмиды pMZ39, несущего полный ген РНКазы Vci и ген барстара под своим промотором в вектор pUB110. Донором фрагмента хромосомы *B.circulans* с геном РНКазы Vci служила плазмида pFM2. Схема получения плазмид приведена на рисунке 5.

5. Биосинтез гуанилспецифичных РНКаз *B.thuringiensis* и *B.circulans* в рекомбинантных штаммах *B.subtilis*

Синтез ферментов в рекомбинантных штаммах *B.subtilis* осуществляется в период замедления роста культуры при исчерпании Фн. При внесении Фн в процессе роста *B.subtilis* JH642 с плазмидами pMZ58 (ген РНКазы Bth) и pMZ59 (ген РНКазы Vci) биосинтез обеих РНКаз подавляется так же, как и в исходных штаммах-продуцентах (рис.6).

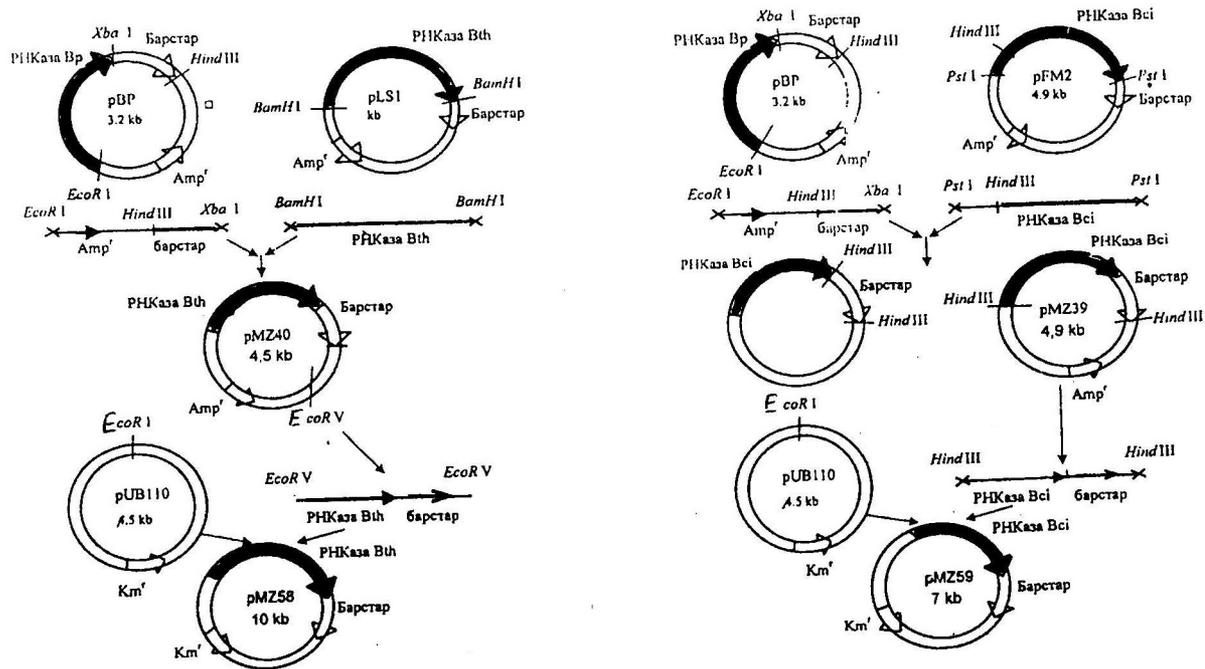


Рис. 5. Схема получения плазмид рМЗ58 и рМЗ59 с полными генами РНКаз Bth и Bci для экспрессии в клетках *B. subtilis*. Плазмиды содержат экспрессионные кассеты с полными генами РНКаз Bth и Bci и геном барстара (внутриклеточного ингибитора РНКаз) под собственным промотором.

× липкие концы, затупленные с помощью фрагмента Кленова.

Биосинтез барназы не зависит от концентрации Фн в рекомбинантных штаммах *B. subtilis*, как и в исходных штаммах *B. amyloliquefaciens*.

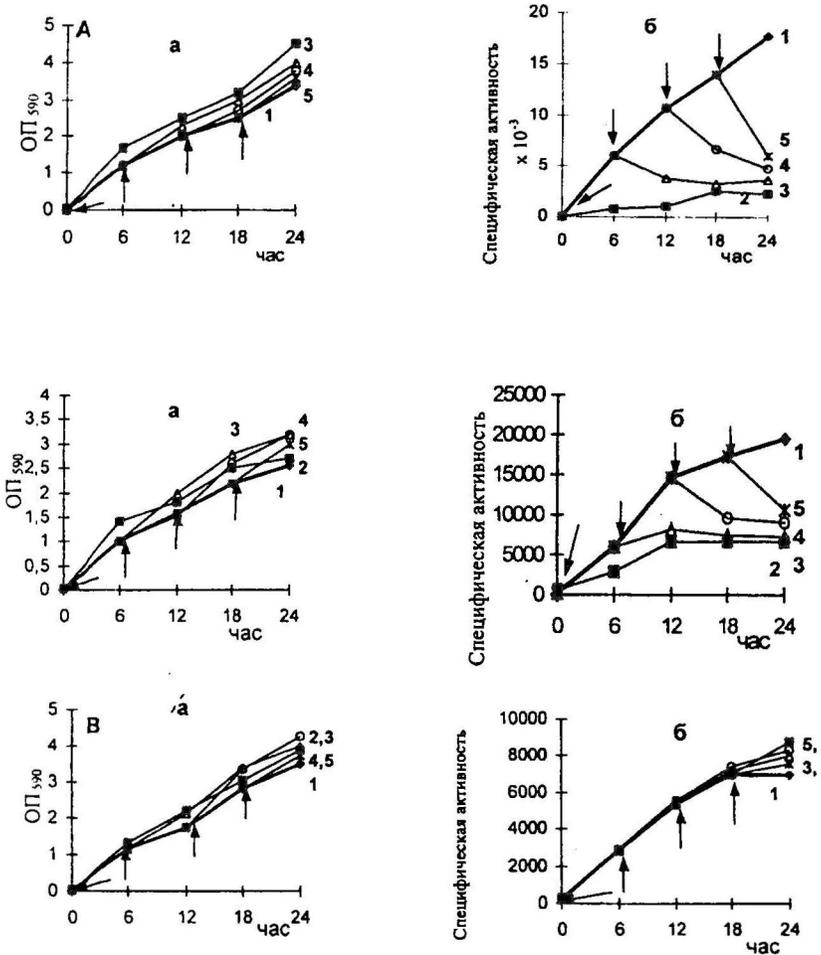


Рис. 6. Биомасса (а) *B. subtilis* JH642 с плазмидами pMZ58 (ген РНКазы Vth, А), pMZ59 (ген РНКазы Vci, Б) и pMT420 (ген РНКазы Va, В,) и специфическая активность РНКаз (б) на низкофосфатной среде при внесении Фн (100мг/л) на разных стадиях роста культуры: 1- контроль (без дополнительного Фн); 2 - Фн внесен перед посевом; 3,4,5 - Фн внесен на 6,12,18 часы роста соответственно. Время внесения указано стрелками.

6. Выяснение роли двухкомпонентной системы трансдукции сигнала PhoP-PhoR в регуляции экспрессии генов РНКазы Bth и РНКазы Vci

Чтобы выяснить, является ли экспрессия генов РНКаз Bth и Vci в рекомбинантных штаммах *B.subtilis* зависимой от белков PhoP-PhoR, штаммы *B.subtilis* с делециями гена регуляторного белка PhoP (MH5117 Δ phoP) и гена сенсорного белка – гистидин-киназы PhoR (MH5124 Δ phoR), а также контрольный штамм (JH642) были трансформированы плазмидами, несущими полные гены РНКазы Bth (pMZ58) и РНКазы Vci (pMZ59). В качестве контролей использовали трансформанты с плазмидой pMT420 (ген барназы, экспрессия которого не зависит от Фн), и плазмидой pMZ55 (ген биназы, экспрессия которого зависит от белков РНО регулона). Результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1

Экспрессия генов РНКаз Bth и Vci, биназы и барназы в рекомбинантных штаммах *Bacillus subtilis*

Штамм	Плазида	ОД ₅₉₀		Специфическая активность	
		-Фн	+Фн	-Фн	+Фн
JH 642	pMZ58 (РНКазыBth)	3±0.5	4.7±0.31	13583±1359	527±35
	pMZ55 (биназа)	4±0.3	5±0.35	3550±147	67±4
	pMZ59 (РНКазыVci)	3.7±0.47	4.3±0.4	12240±1251	5385±182
	pMT420 (барназа)	3.3±0.4	4.3±0.6	7733±425	7266±293
MH5117 (Δ pho P)	pMZ58	3±0.2	4±0.35	58±1.7	28±2.1
	pMZ55	3±0.15	3.7±0.17	42±2.1	17±3.2
	pMZ59	3.2±0.2	3.6±0.2	15555±785	5893±774
	pMT420	2.7±0.4	3.7±0.5	9086±994	7658±682
MH5124 (Δ pho R)	pMZ58	3±0.25	4±0.31	53±5.7	25±2.4
	pMZ55	3±0.2	3.7±0.3	43±4.1	17±2.3
	pMZ59	3±0.15	3.6±0.1	14777±1594	5600±343
	pMT420	2.5±0.2	3.5±0.4	8077±994	7172±682
JH642	-	2±0.15	4±0.22	60±5.6	8±1.5
JH642	pUB110	3.5±0.17	4.3±0.17	43±7.8	10±2
JH642	pC194	4±0.2	8±0.3	50±8	12±1.3

В штаммах с полноценными белками PhoP-PhoR в условиях дефицита фосфата происходил активный синтез РНКазы Bth, РНКазы Vci и биназы. Фн ингибировал биосинтез этих ферментов. В штаммах, дефектных по белкам-регуляторам РНО регулона *B.subtilis*, синтез РНКазы Bth и биназы полностью подавлялся как в присутствии, так и в отсутствии Фн.

Таким образом, регуляторные белки PhoP-PhoR необходимы для биосинтеза РНКазы *B.thuringiensis*. В то же время синтез РНКазы Vci и барназы в дефектных по белкам-регуляторам штаммах происходил так же, как и в штаммах с полноценной регуляторной системой. Таким образом, нами впервые установлено, что экспрессия гена гуанилспецифичной РНКазы *B.thuringiensis* в условиях недостатка экзогенного неорганического фосфата регулируется двухкомпонентной системой трандукции сигнала РНО регулона *B.subtilis*, при этом внутриклеточный белок-регулятор PhoP является позитивным регулятором (активатором) экспрессии гена, а в его отсутствии РНК-полимераза не может эффективно взаимодействовать с промотором, что приводит к прекращению процесса транскрипции. В рекомбинантных штаммах *B.subtilis* к 6 часу культивирования, когда концентрация Фн падала до 3 мг/л, происходит одновременная активация чужеродной рибонуклеазы (РНКазы Bth) и собственных фосфогидролаз – фосфомоно- и фосфодиэстеразы.

В сложной системе превращений высокомолекулярных субстратов – различных видов РНК – РНКазы предшествуют фосфатазам в реакциях отщепления фосфата, расщепляя молекулы РНК до моно- и динуклеозидфосфатов, которые в свою очередь служат субстратами для действия фосфомоноэстераз. Таким образом, РНКазы являются участниками фосфорного обмена и поэтому включены в систему фосфатной регуляции в клетках, позволяющую *B.thuringiensis* координированно регулировать синтез рибонуклеаз и фосфогидролаз.

Однако, синтез РНКазы Vci в условиях лимитирования фосфата в среде не подвергается воздействию регуляторных белков РНО регулона *B.subtilis*. В связи с этим нам представлялся интересным поиск других возможных путей регуляции биосинтеза РНКазы Vci, связанных с активацией синтеза ферментов на уровне транскрипции в неблагоприятных условиях (в частности, в условиях голодания по Фн и глюкозе).

7. Биосинтез РНКазы Vci и барназы в стрессовых условиях в мутантном по σ^B гену штамме *B.subtilis* ML6

Одним из путей адаптации *B.subtilis* к стрессовым условиям (в т.ч. фосфатному голоданию) является экспрессия генов с промоторов, активирующихся альтернативными σ -факторами, в частности σ^B (Hecker et al., 1996), при этом промоторы, обеспечивающие экспрессию одного и того же гена при различных условиях внешней среды, могут располагаться последовательно.

Для того, чтобы проверить возможность регуляции гена РНКазы Vci σ^B фактором, мы трансформировали штамм *B.subtilis* ML6($\Delta sigB$) с делецией гена *sigB* плазмидой pMZ59 (ген РНКазы Vci), для контроля использовали плазмиды pMZ58 (ген РНКазы Vth) и pMT420 (ген барназы). Обнаружено, что все три РНКазы синтезируются одинаково как в нативных, так и в мутантных штаммах, т.е. регуляция биосинтеза всех трех РНКаз не зависит от σ^B -фактора.

Вполне вероятно, что активация синтеза РНКазы Vci может быть обусловлена другими регуляторными системами *B.subtilis*, как известными, так и еще не расшифрованными. Возможно, клетки *B.circulans* могут иметь собственную, отличающуюся от *B.subtilis*, регуляторную систему экспрессии определенных генов, в частности гена РНКазы. В то же время различия в регуляции экспрессии генов РНКаз Vci и барназы могут быть связаны с процессом секреции.

Внеклеточные ферменты *Bacillus* синтезируются в клетке первоначально в виде препроэнзимов (Simonen, Palva, 1993). Барназа синтезируется в виде препробарназы, содержащей N-концевой 26-аминокислотный сигнальный пептид. После удаления сигнального пептида пробарназа, содержащая на N-конце пропептид из 13 аминокислотных остатков, выделяется во внешнюю среду, где претерпевает процессинг под воздействием сериновых протеаз в 2 этапа: сначала отщепляется пропептид I, состоящий из 9 аминокислотных остатков, затем пропептид II из 4 аминокислотных остатков (Paddon et al., 1989). Изучение секреции барназы в рекомбинантных штаммах *B.subtilis*, показало, что ее сигнальный пептид направляет секрецию чужеродного белка – щелочной фосфатазы эффективнее, чем собственного белка – пробарназы (Nagarajan et al., 1992). Низкий уровень секреции собственного белка и стабильность в клетке предшественника барназы в комплексе с барстаром позволили заключить, что секреция барназы происходит посттранскрипционно (Chen, Nagarajan, 1993). Вероятно, наличие внутриклеточного ингибитора

барназы в клетках *B.amyloliquefaciens* также связано с низкой эффективностью секреции фермента и, как следствие достаточно длительным его пребыванием внутри клетки в активной форме. Интересно, что поиски специфического внутриклеточного ингибитора биназы и РНКазы Вр не привели к обнаружению стабильного белка (Шарипова и др., 1988; Банникова, Варламов, 1994; Hartley, Chernokalskaya, неопубликованные данные). Известно также, что секреция названных ферментов *B.intermedius* и *B.pumilus* идет достаточно эффективно.

При очистке РНКазы Вси было выделено две формы фермента (Дементьев и др., 1993в) – зрелый и профермент с 10 дополнительными аминокислотами. Это дает основание предположить, что разница в регуляции экспрессии генов барназы и РНКазы Вси может быть обусловлена не только отличиями промоторных областей этих генов, но и различиями в способах их секреции.

7. Влияние актиномицина Д на биосинтез гуанилспецифичных РНКаз и щелочных фосфатаз

Ранее было установлено, что накопление биназы и РНКазы Вр активируется малыми дозами ингибитора транскрипции актиномицина Д (АД), в то же время биосинтез барназы подавляется этим антибиотиком (Знаменская и др., 1984, 1994; Габдрахманова и др., 1997). Мы установили, что внесение АД в период активации синтеза ферментов при замедлении удельной скорости роста культур, вызывало увеличение биосинтеза РНКазы Вth в 5 раз, а биосинтеза РНКазы Вси в 2,5 раза (рис.7А). Биосинтез биназы и РНКазы Вр активировался в 8-9 раз.

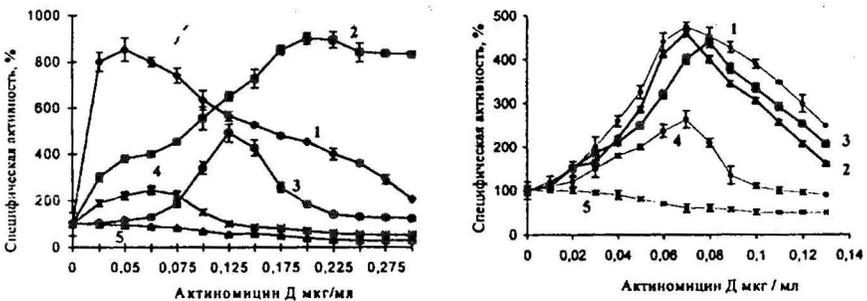


Рис. 7. Влияние актиномицина Д на биосинтез РНКаз 1. - *B.intermedius*, 2. - *B.pumilus*, 3. - *B.thuringiensis*, 4. - *B.circulans* и 5. - *B.amyloliquefaciens* исходными (А) и рекомбинантными штаммами *B.subtilis* JH642 (Б) с плазмидами: рМЗ55 (биназа), рМЗ56 (РНКазыВр), рМЗ58 (РНКазыВth), рМЗ59 (РНКазыВси) и рМТ420 (барназа).

Исследование влияния АД на синтез этих же РНКаз в рекомбинантных штаммах *B. subtilis* JH642, показало, что синтез биназы, РНКазы *Vp*, РНКазы *Vth* и РНКазы *Vci* активировался в 4-5 раз. Биосинтез барназы в рекомбинантном штамме *B. subtilis* подавлялся АД так же, как и в нативном (рис.7Б). Механизм действия АД заключается во взаимодействии молекулы антибиотика с комплексом инициации транскрипции в участке расплетения нитей ДНК (на границе одно- и двухцепочечной ДНК), при этом АД иммобилизует этот комплекс, интеркалируя между основаниями и препятствуя элонгации цепей РНК (Sobell, 1985). Поскольку АД стимулирует активируемый в условиях лимитации неорганического фосфата синтез бациллярных РНКаз, причем эффект АД проявляется только в условиях активного синтеза, мы предположили, что в этом процессе может быть задействован внутриклеточный белок-регулятор. Экспрессия генов биназы, РНКазы *Vp* и РНКазы *Vth* регулируется посредством белка-регулятора *PhoP*, и вполне возможно, что в процессе активации синтеза этих РНКаз актиномицином Д тоже участвует белок *PhoP*. одно- и двухцепочечной ДНК), при этом АД иммобилизует этот комплекс, интеркалируя между основаниями и препятствуя элонгации цепей РНК (Sobell, 1985).

Поскольку АД стимулирует активируемый в условиях лимитации неорганического фосфата синтез бациллярных РНКаз, причем эффект АД проявляется только в условиях активного синтеза, мы предположили, что в этом процессе может быть задействован внутриклеточный белок-регулятор. Экспрессия генов биназы, РНКазы *Vp* и РНКазы *Vth* регулируется посредством белка-регулятора *PhoP*, и вполне возможно, что в процессе активации синтеза этих РНКаз актиномицином Д тоже участвует белок *PhoP*.

Чтобы подтвердить это предположение, мы исследовали влияние АД на биосинтез щелочной внеклеточной фосфомоноэстеразы *B. subtilis* JH642, поскольку доказано непосредственное взаимодействие белка-регулятора *PhoP* с промотором гена *phoA* (Liu, Hullet, 1997). Параллельно исследовали влияние актиномицина Д на биосинтез щелочных фосфатаз *B. intermedius*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. thuringiensis* и *B. circulans*. Ранее было установлено, что щелочные фосфатазы *B. intermedius*, *B. pumilus* и *B. amyloliquefaciens* подавляются Фн (Знаменская и др., 1986, 1994). В результате было установлено, что АД вызывает увеличение синтеза этих ферментов у всех изучаемых бацилл, включая *B. amyloliquefaciens*, не менее чем в 3 раза (рис.8).

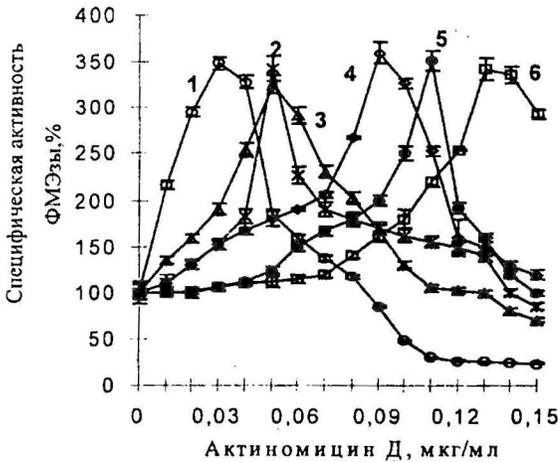


Рис. 8. Влияние актиномицина Д на биосинтез ФМЭз *B. thuringiensis* var. *subtoxicus* B388 (1), *B. amyloliquefaciens* H2 (2), *B. subtilis* JH642 (3), *B. intermedius* 7P (4), *B. pumilus* KMM62 (5), *B. circulans* BCF247(6).

Вероятно, в транскрипционном комплексе, образуемом РНК-полимеразой с промоторами генов РНКаз и фосфатаз, белок PhoP в период активации синтеза защищает открытый комплекс от проникновения в него молекул ингибитора транскрипции, связываясь с сайтами узнавания (*pho*-боксами). Транскрипционный комплекс, обеспечивающий экспрессию гена барназы, по видимому не взаимодействует с белком PhoP, поэтому синтез барназы не активируется АД, как и синтез многих других, в частности структурных, белков клетки.

В то же время биосинтез РНКазы *Vci* активируется АД, хотя и в меньшей степени, чем биосинтез других РНКаз. Синтез фермента не регулируется системой PhoP-PhoR, тем не менее на основании индуцируемой природы его синтеза можно предположить, что существует какая-то иная система регуляции экспрессии гена гуанилспецифичной РНКазы *B. circulans*, который защищает транскрипционный комплекс от проникновения актиномицина Д.

Рибонуклеазы не единственные ферменты, синтез которых усиливается малыми дозами АД. Актиномицин Д стимулирует синтез левансахаразы грибом *Gluconobacter oхudans* (Элисашвили, 1982).

В данной работе исследована регуляция биосинтеза новых внеклеточных гуанилспецифичных рибонуклеаз из *B.thuringiensis* и *B.circulans* и показано, что регуляция их биосинтеза одним и тем же экзогенным эффектором – неорганическим фосфатом среды – осуществляется различными путями. Регуляция биосинтеза РНКазы *B.thuringiensis* осуществляется, вероятно, по типу активации генов РНО регулона *B.subtilis* через систему двухкомпонентных белков трансдукции сигнала, аналогичных белкам PhoP-PhoR. Это уже третья гуанилспецифичная рибонуклеаза, наряду с аналогичными ферментами, секретлируемыми *B.intermedius* и *B.pumilus*, для которой показана возможность подобной регуляции. При этом *pho*-бокс *B.thuringiensis* состоит лишь из одной пары консенсусных гексануклеотидов. Промотор гена *resD* *B.subtilis* также содержит одну пару гексануклеотидов, но расположенную более дистально относительно -10 области. Таким образом, результаты работы расширяют представление как об организации активных структур промотора и функционировании системы РНО регулона, так и о масштабе распространения этой системы среди различных бацилл.

На основании установленного механизма регуляции биосинтеза гуанилспецифичных РНКаз по типу РНО регулона *B.subtilis* предложен механизм, объясняющий активацию актиномицином Д биосинтеза гуанилспецифичных рибонуклеаз и щелочных фосфатаз бацилл.

В то же время регуляция биосинтеза гуанилспецифичной РНКазы *B.circulans*, также подавляемого неорганическим фосфатом среды, происходит по иному механизму, отличному как от регуляции, осуществляемой двухкомпонентной системой белков PhoP-PhoR, так и от активации альтернативным σ^B -фактором. Вероятно ген РНКазы *B.circulans* может быть отнесен к группе малоизученным *psi* генов (phosphate starvation inducible genes), экспрессия которых регулируется другими путями. Возможно также, что разница в биосинтезе двух гомологичных белков – барназы, секретлируемой *B.amyloliquefaciens*, и РНКазы Vci, секретлируемой *B.circulans* – может быть обусловлена различиями в секреции этих генов.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что синтез гуанилспецифичных рибонуклеаз *Bacillus thuringiensis* (РНКазы Bth) и *Bacillus circulans* (РНКазы Vci) в исходных штаммах-продуцентах и рекомбинантных штаммах *Bacillus subtilis*

осуществляется в период замедления роста при дефиците неорганического фосфата в среде.

2. Получены плазмиды, содержащие полные гены РНКаз Vth и Vci, обеспечивающие эффективную экспрессию генов данных ферментов в клетках *B.subtilis*.

3. При изучении синтеза РНКазы Vth в рекомбинантном штамме *Bacillus subtilis* установлена его регуляция посредством белков двухкомпонентной системы сигнальной трансдукции PhoP-PhoR, что обусловлено наличием в промоторе гена РНКазы Vth гексануклеотидных последовательностей TTCATA и TTTACA, гомологичных *pho*-боксов генов РНО регулона *Bacillus subtilis*.

4. Показано, что негативно регулируемый экзогенным фосфатом биосинтез РНКазы Vci не зависит от наиболее часто встречающихся типов регуляции экспрессии генов, активируемых в условиях фосфатного голодания, а именно – белков РНО регулона PhoP-PhoR и альтернативного σ^B -фактора РНК-полимеразы.

5. Установлено, что ингибитор транскрипции – актиномицин Д активирует биосинтез гуанилспецифичных рибонуклеаз Vth и Vci. На основании анализа влияния актиномицина Д на биосинтез широкого спектра гуанилспецифичных рибонуклеаз и фосфомоноэстераз бацилл предложена гипотеза, объясняющая механизм его активирующего действия, в соответствии с которым эффект обусловлен экранирующим действием белка-регулятора, препятствующего интеркаляции антибиотика.

Публикации по теме диссертации

1. Znamenskaya L., Vershinina V., Morozova O., Vershinina O., Leshchinskaya I., Hartley R. Expression of the genes for ribonucleases from *Bacillus* in native and recombinant strains /8th European Congress on Biotechnology, Budapest, 17-21 August, 1997. - p.159.

2. Морозова О.В., Вершинина В.И., Гнеденков П.Л., Краснов С.И., Знаменская Л.В. Оптимизация условий биосинтеза внеклеточной гуанилспецифичной рибонуклеазы *Bacillus thuringiensis* /Сборник статей XI Всероссийской конференции «Ферменты микроорганизмов», Казань, 1998. - с.35-41.

3. Znamenskaya L.V., Morozova O.V., Kuchmina E.Yu. Actinomycin D. Mechanism of stimulation of *Bacillus* ribonucleases biosynthesis /Eijkman

Centennial on infections of the 21st century, the Hague, the Netherlands, 13-17 December, 1998. - p. 27.

4. Морозова О.В., Курбанова Й.А. Внеклеточная гуанилспецифичная рибонуклеаза *Bacillus circulans* /Материалы конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам "Ломоносов 2000", Москва, 12-15 апреля, 2000. -с.47.

5. Морозова О.В. Внеклеточная гуаниспецифичная рибонуклеаза *Bacillus thuringiensis* /Материалы XXXVIII международной научной студенческой конференции "Студент и научно-технический прогресс", Новосибирск, 11-13 апреля, 2000. - с.87-88.

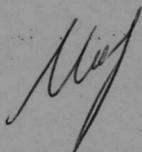
6. Морозова О.В., Знаменская Л.В. Биосинтез гуанилспецифичных рибонуклеаз *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus circulans* /Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КГУ "Материалы и технологии XXI века", Казань, 20-21 октября, 2000. -с. 66-67.

7. Vershinina O.A., Morozova O.V., Vershinina V.I., Znamenskaya L.V., Leshcinskaya I.B. Expression of *B.intermedius*, *B.pumilus* and *B.thuringiensis* phosphate-starvation inducible genes for ribonucleases in *B.subtilis* /18th Int. Cong. of Biochem. and Mol. Biol. "Beyond the Genome" 16-20 July, Birmingham, UK. 2000. -p.226

8. Знаменская Л.В., Морозова О.В., Вершинина В.И., Краснов С.И., Шульга А.А., Лещинская И.Б. Биосинтез внеклеточной гуанилспецифичной рибонуклеазы из *Bacillus circulans* //Микробиология. - 1998. - т.67. - №5. - с.619-625.

9. Шульга А.А., Знаменская Л.В., Морозова О.В., Лещинская И.Б., Кирпичников М.П. Рибонуклеаза из *Bacillus thuringiensis* var. *subtoxicus*. Структура гена и регуляция биосинтеза //Биоорганическая химия. - 2000. - т.26 - № 9. - 673-679.

10. Морозова О.В., Вершинина О.А., Вершинина В.И., Лещинская И.Б., Знаменская Л.В. Регуляция биосинтеза внеклеточных фосфогидролаз у бацилл //Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 2000 (в печати).



2-00

Соискатель

Формат 60x84 1/16 Объем 1,38 печ. л. Тираж 100 экз.

ИОФХ им. А.Е. Арбузова КНЦ РАН

420088 Казань, Арбузова, 8