



На правах рукописи

БУДАРИНА Жанна Игоревна

**Ген гемолизина II *Bacillus cereus*:
клонирование, регуляция экспрессии, идентификация продукта**

03.00.15 –Генетика

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

Москва 2005

Работа выполнена в ВНТК структурно-функционального анализа генетических систем микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина Российской Академии Наук

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
Солонин А.С.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор
Азизбекян Р.Р.

доктор биологических наук,
профессор
Матвиенко Н.И.

Ведущая организация: Филиал Института
биоорганической химии им.
М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН

Защита диссертации состоится 7 июня 2005 года на заседании Диссертационного Совета Д217.013.01 в Государственном научно-исследовательском институте генетики и селекции промышленных микроорганизмов, по адресу: 117545, Москва, 1-ый Дорожный проезд, д 1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов

Автореферат разослан 7 мая 2005г

Ученый секретарь Диссертационного совета,
Кандидат биологических наук

 В.И. Щербакова

2006-4
16660

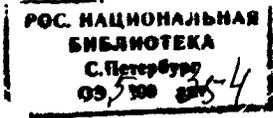
2185851

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Возникновение и эволюция патогенности микроорганизмов является одной из фундаментальных проблем современной микробиологии и медицины. Исследование молекулярных основ этого процесса - ключевой подход к решению данной проблемы. Среди многообразия токсинов и других веществ, вырабатываемых бактериями для проникновения в макроорганизм, преодоления его защитных систем и развития инфекционного процесса, немаловажная роль в патогенезе принадлежит цитолитическим токсинам, которые для многих бактерий являются основными факторами патогенности. Известно, что патогенные свойства того или иного микроорганизма в значительной мере определяются как спектром его структурных генов, кодирующих факторы патогенности, так и механизмами, обеспечивающими регуляцию этих генов. Отсюда возрастающее внимание медиков и биологов к системам, контролирующим экспрессию генов токсинов. Изучение цитолитических токсинов и выяснение путей регуляции экспрессии их генов представляется одним из перспективных направлений в исследовании молекулярных основ патогенности и вирулентности микроорганизмов.

Для проведения исследований в данном направлении интересными объектами являются представители цереусной группы микроорганизмов рода *Bacillus*. Эти бактерии широко распространены в природе и имеют ярко выраженные филогенетическое родство, морфологическое и физиолого-биохимическое сходство на фоне широкого диапазона их патогенных свойств. Так, *B. thuringiensis* является микроорганизмом, патогенным для насекомых, *B. cereus* относится к условно-патогенным, а *B. anthracis* печально известен как возбудитель сибирской язвы. Все эти микроорганизмы продуцируют ряд цитолитических белков, рассматриваемых в качестве потенциальных факторов патогенности. *B. cereus*, занимая по патогенному статусу промежуточное положение среди представителей данной группы бактерий и продуцируя широкий спектр гемолизин, может служить прекрасной моделью для изучения этих токсинов.

Еще одна причина, которая побуждает к активному исследованию токсинов, вырабатываемых *B. cereus* и его ближайшим родственником *B. thuringiensis*, - широкое распространение этих микроорганизмов в окружающей среде. *B. cereus* - один из основных бактериальных загрязнителей производимых промышленностью продуктов питания, лекарственных и косметических препаратов. *B. thuringiensis*, широко масштабно используемый в качестве инсектицидных препаратов, неконтролируемо выбрасывается в окружающую среду. Поэтому изучение отдельных токсинов, продуцируемых данными бактериями, с целью определения степени их безопасности для животных и человека является актуальной задачей.



На настоящий момент описан ряд гемолитических токсинов *B.cereus*. Это цереолизин, сфингомиелиназа, цереолизин АВ, гемолизин ВL, цереолизин-подобный гемолизин, гемолизины II, III и CytK. Однако, спектр и свойства гемолизинов, продуцируемых данным микроорганизмом, изучены далеко не полно. Это обусловлено сложностью получения индивидуальных препаратов данных белков из исходного микроорганизма. В связи с этим существование одного из них - гемолизина II – в течение долгого времени оставалось под вопросом. Были описаны некоторые его характеристики (Coolbaugh and Williams, 1978), однако сообщения о его очистке или клонировании гена отсутствовали. Высказаны предположения, что гемолитическая активность, приписываемая гемолизу II, обусловлена действием цереолизина АВ (Gilmore et al., 1988; Beecher and MacMillan, 1991). Для выяснения подобных вопросов весьма эффективным является подход, основанный на клонировании отдельных генов, кодирующих цитолизины, и изучении данных цитолизинов в гетерологичных системах.

Несмотря на то, что гемолитические токсины *B.cereus* активно изучаются, мало известно об их генетической регуляции, так же как и о регуляции других факторов патогенности этого микроорганизма. Обнаружен и описан лишь один плейотропный регулятор, PlcR, который является активатором целого ряда генов *B.cereus* и *B.thuringiensis* (Lereclus et al., 1996). Недавний анализ полных нуклеотидных последовательностей геномов *B.cereus* и *B.anthraxis* выявил в них ряд генов, потенциально контролирующих транскрипцию (Read et al., 2002). Учитывая, что вопрос о регуляции генов токсинов неразрывно связан с регуляцией патогенных свойств микроорганизмов, а также ввиду малой изученности данного вопроса для *B.cereus* весьма актуальным является изучение локусов в геноме этой бактерии, контролирующих экспрессию генов токсинов.

Цели и задачи исследования. Данная работа выполнялась в рамках исследовательского направления, имеющего целью обнаружение и идентификацию генов цитолизинов *B.cereus*, их структурно-функциональный анализ и изучение функции данных цитолизинов. Особый интерес представляло клонирование из генома *B.cereus* гемолитических детерминант, не тождественных ранее клонированным генам. Целью настоящей работы являлось клонирование генетической детерминанты гемолизина II, определение ее первичной структуры, функциональной активности в гетерологичной системе и распространение среди бактерий цереусной группы, описание особенностей регуляции экспрессии гена гемолизина II.

Для достижения указанной цели последовательно ставились следующие задачи:

1. Создать библиотеку генов *B.cereus* и отобрать гемолитические клоны
2. Идентифицировать генетическую детерминанту гемолизина II

- 3 Определить нуклеотидную последовательность клонированной генетической детерминанты *B cereus* и провести ее анализ На основании анализа выведенной аминокислотной последовательности сделать предварительное заключение о механизме действия гемолизина II
- 4 Исследовать особенности активности гемолизина II в гетерологичных системах (*E coli* и *B subtilis*)
- 5 Провести скрининг коллекции штаммов бацилл цереусной группы на наличие последовательностей ДНК, гомологичных области, содержащей ген гемолизина II, и на продукцию подобного гемолизина
- 6 Определить роль нового гена *hlyIII*, впервые обнаруженного в данной работе, в регуляции экспрессии *hlyII* и характер этой регуляции

Данная работа выполнена в ВНТК структурно-функционального анализа генетических систем микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г К Скрабина РАН

Научная новизна работы. Результаты, полученные в ходе данных исследований, носят пионерский характер Впервые клонирован ген гемолизина II *B cereus*, определена его нуклеотидная последовательность и получены данные, позволяющие причислить этот белок к группе β-складчатых олигомерных порообразующих цитолизиннов Впервые установлено, что многие штаммы *B thuringiensis* производят гемолизин, гомологичный гемолизину II *B cereus*. Впервые клонирован ген этого гемолизина *B.thuringiensis* Клонирован новый регуляторный ген *B cereus*, контролирующий транскрипцию гена гемолизина II.

Практическое значение работы. Полученные результаты вносят вклад в изучение молекулярных основ патогенности *B cereus* и близких видов микроорганизмов Эти данные являются необходимым первоначальным этапом, закладывающим основу для дальнейших исследований гемолизина II: выяснения его участия в патогенезе, изучения его структурно-функциональных особенностей Обнаружение подобного токсина у *B thuringiensis*, широко применяемого как биологический инсектицид, заставляет усилить внимание к тщательному анализу используемых штаммов на предмет их безопасности для человека и животных Обнаружение нового регуляторного локуса *B cereus*, контролирующего транскрипцию гена гемолизина II, является шагом к выяснению сложных механизмов скоординированной регуляции генов, обеспечивающих патогенность этого микроорганизма

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи Результаты работы были представлены на Международной конференции, посвященной памяти акад А А Баева (Москва, 1996), на первом, втором и третьем международных семинарах “The Molecular Biology of *Bacillus cereus*, *B anthracis* and *B thuringiensis*” (Oslo, Norway, 1997), (Taos, USA, 1999) и (Nice, France, 2003) соответственно, на международных

конференциях “10th World Congress on Animal, plant and microbial toxins” (Singapore, 1991), “The 4th Symposium on Bacterial genetics and ecology” (Wageningen, Dutch, 1993), “IUBMB/SASBMB Special Meeting on The Biochemical & Molecular Basis of Disease” (Cape Town, SAR, 2001), Gordon Research Conference (Andover, USA, 2004).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 139 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы и список цитируемой литературы. Список литературы включает 264 источника. Работа содержит 24 рисунка и 2 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Клонирование и идентификация генетической детерминанты гемолизина II.

На основе вектора pUC19 создана EcoRV-клонотека генов *B.cereus* ВКМ-В771 На кровяном агаре отобраны 11 клонов, обеспечивающих гемолиз. Один из них демонстрировал фенотип, характерный для клонов, экспрессирующих гены сфингомиелиназы и цереолизина АВ – слабый лизис эритроцитов, тепло-холодовой гемолиз, лецитиназная активность (Tomita et al, 1991, Гавриленко и др., 1993). Другие 10 клонов характеризовались лучшим проявлением гемолиза при 20°C, чем при 37°C. Плазмиды из всех этих 10 клонов содержали идентичные (по результатам рестрикционного анализа) вставочные фрагменты размером ~7,2 т.п.н. На рис 1А представлена физическая карта такого фрагмента из плазмиды p701, отобранной для дальнейшей работы. Гемолитическая детерминанта локализована в пределах EcoRI-субфрагмента (2,9 т.п.н.) вставки (рис 1А). Сконструированы плазмиды pUJ1 и pUJ2, содержащие данный субфрагмент в pUC19 в разных ориентациях.

Ранее из *B.cereus* ВКМ-В164 клонированы гены цереолизина АВ (Гавриленко и др., 1993) и гемолизина III (Baida and Kuzmin, 1995). Гибридационный анализ плазмиды pUJ1 с использованием в качестве зондов этих генов, помеченных [³²P]dATP, показал, что клонированная детерминанта не гомологична указанным генам и, следовательно, кодирует гемолизин, не тождественный цереолизину АВ и гемолизину III. Учитывая способность клонированного гемолизина лизировать эритроциты человека, можно заключить, что он не является и гемолизином ВL, который характеризуется отсутствием данного признака (Beecher and MacMillan, 1990).

Идентифицировать продукт клонированного гена позволило использование функциональных тестов, предложенных Кульбахом и Вильямсом (Coolbaugh and Williams, 1978) для характеристики гемолизина II. Гемолитическая активность тестировалась в суспензии эритроцитов человека на основе спектрофотометрической регистрации высвобожденного гемоглобина (Bernheimer, 1988). В качестве препаратов клонированного

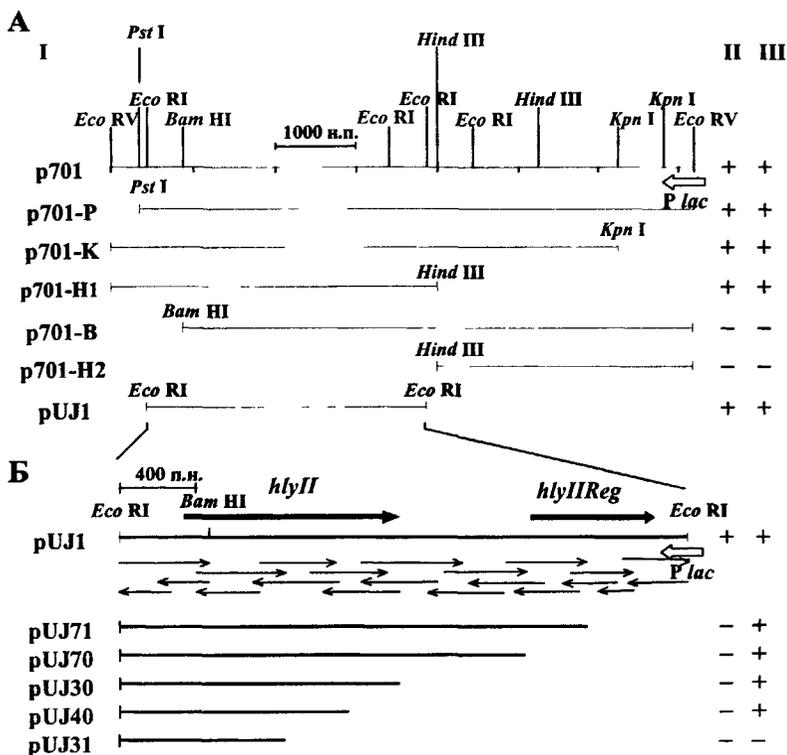


Рис. 1. Рестрикционная карта и делеционный анализ клонированного фрагмента геномной ДНК *B.cereus* VKM-B771. **А:** Физическая карта и делеционные производные исходного *EcoRV*-фрагмента **Б** Физическая карта и *EcoRI*-делеционные производные *EcoRI*-фрагмента, субклонированного в плаزمиде рUJ1/2 В колонке I указаны названия рекомбинантных плазмид. Наличие или отсутствие гемолитического фенотипа у клеток *E.coli* с этими плазмидами обозначено "+" или "-" соответственно. Регистрация фенотипа на агаризованной среде с эритроцитами человека производилась дважды: после выращивания клонов в течение ночи при 37°C (II) и по истечении 8-10-часовой их последующей инкубации при комнатной температуре (III). Контурными стрелками указано направление и локализация *lac*-промотора векторной плазмиды рUC19. На рисунке Б жирными стрелками обозначены локализация и направление генов, обнаруженных в пределах данного *EcoRI*-субфрагмента.

гемолизина использовали бесклеточные экстракты рекомбинантных клеток *E. coli*, трансформированных плазмидой рUJ2 (при экспрессии исследуемой детерминанты в *E. coli* большая часть гемолитической активности ассоциирована с клеткой). Поскольку известные

для гемолизина II свойства были получены путем сравнения со свойствами цереолизина (Coolbaugh and Williams, 1978), в тестировании участвовали также препараты цереолизина

Гемолизин, продуцируемый рекомбинантами *E. coli*, демонстрировал все характеристики, описанные для гемолизина II. Он абсолютно не ингибировался холестерином в концентрации 500 мкг/мл (для полной специфической инактивации цереолизина достаточно 50 мкг/мл холестерина, а при большей его концентрации неспецифически ингибируются многие другие гемолизины *B. cereus* (Bernheimer and Grushoff, 1967) Клонированный гемолизин демонстрировал эффект Аррениуса - утрачивал свою гемолитическую активность при умеренных температурах и восстанавливал ее после кратковременного прогрева при высоких температурах (Рис. 2) и имел относительно протяженную задержку в кинетике лизиса эритроцитов (Рис. 3).

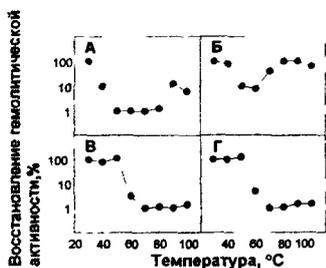


Рис. 2. Влияние температуры прединкубации на степень восстановления гемолитической активности гемолизина, кодируемого клонированным фрагментом ДНК *B. cereus* (А, Б), и цереолизина (В, Г). В качестве препаратов клонированного гемолизина использовали супернатант из экстрактов разрушенных клеток *E. coli* Z85 (pUJ2) (А) и концентрат супернатанта культуральной жидкости *B. subtilis* MC5 (pMJ2) (Б). В качестве препаратов цереолизина использовали концентрат супернатанта культуральной жидкости *B. cereus* ВКМ-

В164 (В) и гомогенный цереолизин, выделенный из этого штамма (Г). Исследуемые образцы с исходными активностями гемолизиннов ~ 150 ГЕ/мл, прединкубировали в течение 5 мин при указанных температурах, охлаждали во льду и в каждом измеряли остаточную гемолитическую активность. О степени восстановления активности после прогрева судили, сравнивая остаточную активность с исходной

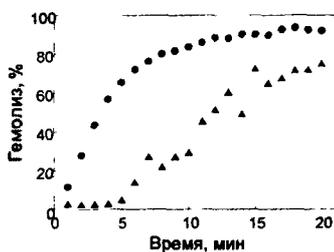


Рис. 3. Сравнение кинетик лизиса эритроцитов человека очищенным препаратом цереолизина (●) и гемолизином, продуцируемым рекомбинантными клетками *E. coli* Z85(pUJ2), (▲). К 0,5%-ной суспензии эритроцитов человека добавляли препараты гемолизиннов до концентрации около 1,5 ГЕ/мл. Реакцию проводили при 37°C, отбирая каждую минуту пробы для спектрофотометрического определения степени гемолиза

Это позволяет сделать вывод, что клонированный фрагмент ДНК содержит генетическую детерминанту гемолизина II *B. cereus*. Таким образом, впервые доказано существование гемолизина II как нового гемолитического фактора *B. cereus*, отличного от цереолизина АВ, гемолизиннов ВI, I (цереолизин) и III

Для экспрессии данной генетической детерминанты в *B subtilis* исследуемый *EcoRI*-фрагмент ДНК был клонирован в составе челночного вектора рМК4-19 (плазмида рМЈ2) и введен в клетки *B subtilis* МС5. В полученном рекомбинантном штамме гемолизин продуцировался в конце логарифмической фазы роста и секретировался в внеклеточную среду. Уровни гемолитической активности, тестируемой в рекомбинантных штаммах *E coli* и *B subtilis*, были сопоставимы. Концентрат культуральной жидкости *B subtilis* МС5 (рМЈ2) участвовал в проведении функциональных тестов для идентификации гемолизина II наряду с препаратами из кишечной палочки. В обоих случаях гемолизин вел себя аналогичным образом, исключая более высокую его термостабильность при экспрессии в *B subtilis* (сравнить рис 2А и 2Б).

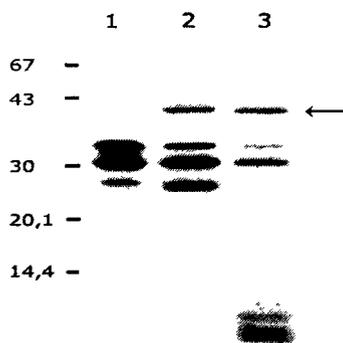


Рис. 4. Профили белков, кодируемых рекомбинантными плазмидами, содержащими ген гемолизина II. Радиоавтограф меченых ³⁵S-метионином белков, продуцируемых мини-клетками *E. coli* P678-54 с плазмидами рUC19 (1), рUJ1 (2) и рTH3 (3), после электрофоретического разделения в градиентном ДСН-ПААГ (9-20%). Цифрами указаны молекулярные массы маркерных белков. Стрелкой отмечена полоса, принадлежащая гемолизину II.

Использование мини-клеток *E coli* (Stoker et al, 1984), содержащих плазмиду рUJ1, позволило идентифицировать гемолизин II как полипептид с молекулярной массой ~42кДа (рис 4, дорожки 1 и 2)

2. Анализ нуклеотидной последовательности гена *hlyII*

Для локализации гена гемолизина в пределах клонированного фрагмента ДНК с помощью экзонуклеазы III был получен набор однонаправленных делеций с правого фланга *EcoRI*-фрагмента (рис 1Б). Минимальный фрагмент ДНК, обеспечивающий рекомбинантным *E coli* гемолитический фенотип, имел длину около 1,2 т п н (плазмида рUJ40). Однако клетки с этой плазмидой демонстрировали очень слабый, едва регистрируемый на кровяном агаре гемолиз. Клетки, содержащие плазмиду рUJ30 с вставкой около 1,4 т п н, при 20°C имели фенотип, сравнимый с фенотипом, который обеспечивается рUJ1 с исходным 2,9 т п н фрагментом. Таким образом, ген гемолизина II можно локализовать в области этих 1,4 т п н.

Была определена нуклеотидная последовательность исходного *EcoRI*-фрагмента (номер в GenBank U94743 и AY212780).

EcoRI

1 GAATTCTATAATTTTTTTGTATTTTTTTAAACAAGAATTTTAAATATATATTTAAATT
 -10 SspI +1

60 CTTGTTTAAATCGTTATTC **TTTAAATTTAAATTTGATAATAGTTATCAGTAAAGAAGA**

120 GATGGAATTAGCAAATCAAGTGTGATAGTTATTGGCATAAAGATTAATAAAATTTCTAC
 AluI

180 ATTGTAACGTTATAAATSTATCTCTAGTATTGACAGCTAAAAATAATACGTTTATATCTT
 SD M K K A K G I A K S

240 TTAATGTTTAAAGAAAGGAGTGGCTGTCTGTATGAAAAAAGCAAAGGGAATAGCTAAAAGT
 11 V A V A S V I M S G S L G L Q A T S A F

300 GTTCCCGTAGCTCCGGTTATAATGTCTGGATCACTTGGTTTACAAGCAACATCTGCATTT
 31 A ↓ D

360 GCAGAT.....структурная часть гена *hlyII*.....

Рис. 5. Нуклеотидная последовательность участка клонированного EcoRI-фрагмента ДНК *B. cereus* ВКМ-В771, содержащего регуляторную область гена гемолизина II. Промоторная -10 область выделена черным. Крупным жирным шрифтом показан стартовый нуклеотид транскрипции гена, определенный экспериментально. Инвертированный повтор, являющийся оператором *hlyII*, отмечен встречными стрелками. Предполагаемая последовательность Шайна-Дальгарно (SD) обозначена жирным шрифтом. Начало выведенной аминокислотной последовательности обозначено однобуквенным кодом над соответствующим участком нуклеотидной последовательности. Вертикальной стрелкой отмечен предполагаемый сайт расщепления сигнальной пептидазой. Стартовый кодон подчеркнут двойной линией. Обозначены некоторые сайты эндонуклеаз рестрикции, использованные в работе.

Поиск потенциальных кодирующих участков в данной последовательности выявил две протяженные открытые рамки считывания. Первая начинается в позиции 252 и заканчивается терминирующим кодоном ТАА в положении 1506. Вторая ОРС располагается с 1916 по 2519 п.н. Исходя из результатов делеционного картирования, гену гемолизина II (*hlyII*) принадлежит первая ОРС. Потенциальные иницирующие кодоны в этой рамке расположены в позициях 258, 270, 321, 435. Однако только перед кодоном АТГ(270) на расстоянии 11 п.н. находится предполагаемый сайт связывания с рибосомой – GAAGGAG, указывая на то, что трансляция, по всей вероятности, начинается с этого АТГ. Таким образом, кодирующая часть гена *hlyII* состоит из 1236 нуклеотидов. Точка начала транскрипции и соответственно – промотор для гена гемолизина были определены методом удлинения праймера. Использовалась РНК, выделенная из клеток *E. coli*, содержащих плазмиду с геном *hlyII*. Выявлен единственный продукт реакции элонгации, которому соответствует транскрипт, начинающийся на расстоянии 174 основания перед иницирующим АТГ гена гемолизина II (рис 5 и 6). Этой стартовой точке предшествует протяженный промоторный -10-бокс TGTGTTTAAAT (рис 5), последовательность которого хорошо согласуется с консенсусной (Gaal et al, 2001). Делеция *EcoRI-SspI*, удаляющая этот участок, приводила к отсутствию продукта реакции элонгации (рис 6), что подтверждает его роль в транскрипции гена гемолизина II. Не было выявлено -35-элемента промоторной

области, который, как показано (Barne et al , 1997), не требуется для активности промоторов данного класса. На участке ДНК за стоп-кодоном гена (1594-1618 нуклеотиды) располагается потенциальный терминатор транскрипции - совершенный палиндром, способный образовывать шпильчатую структуру с свободной энергией $-13,3$ ккал/моль (программа "HAIRPIN", "PC/Gene"). Перед *hlyII* (26 – 69 нуклеотиды) находится еще один совершенный инвертированный повтор, который способен формировать шпильку с $\Delta G -27,8$ ккал/моль и, как показано ниже, является оператором гена.

Таким образом, анализ нуклеотидной последовательности выявил наличие всех функциональных элементов экспрессирующегося гена: открытой рамки считывания длиной 1236 нуклеотидов, инициаторного и терминаторного кодонов, сигналов инициации и терминации транскрипции и сайта связывания рибосомы. Из этих данных, а также из находящихся в полном соответствии с ними результатов функционального анализа клонированного *EcoRI*-фрагмента ДНК следует, что данный фрагмент содержит ген (*hlyII*), способный экспрессироваться в клетках *B. subtilis* и *E. coli* со своего собственного промотора и обеспечивающий хозяйским клеткам гемолитический фенотип. Ген гемолизина II, очевидно, является индивидуальной единицей транскрипции.

GATC 1 2



Рис. 6. Определение стартовой точки транскрипции гена *hlyII*. Для реакции удлинения праймера использовалась тотальная РНК, выделенная из рекомбинантных клеток *E. coli* с плазмидой pUJ1, содержащей интактный ген *hlyII* (1), и с ее производной, p Δ SspI, несущей делецию *EcoRI-SspI* (90 нуклеотидов с левого фланга *EcoRI* фрагмента) (2). В качестве праймера использован олигонуклеотид, комплементарный последовательности начала *hlyII*. Представлен радиоавтограф 6% денатурирующего геля, в котором разделены продукты реакции элонгации и продукты секвенирующей реакции, проведенной с тем же праймером и плазмидой pUJ1 в качестве матрицы.

По данным анализа нуклеотидной последовательности гемолизина II состоит из 412 аминокислотных остатков и имеет молекулярный вес 45,6 кДа. В аминокислотной последовательности гемолизина, выведенной из последовательности нуклеотидов, в N-концевой области выявлены структуры, характерные для сигнального пептида (Scott and Silhavy, 1982) (Рис. 5). Так, аминокислотные остатки в положении 10-31 образуют потенциальный трансмембранный гидрофобный домен. Ему предшествует область, обогащенная положительно заряженными аминокислотными остатками (4 остатка лизина). Предполагаемый сайт расщепления расположен между 31 и 32 аминокислотными остатками. Молекулярная масса предполагаемого зрелого гемолизина равна 42,3 кДа, что хорошо

согласуется с результатами миниклеточного, анализа (рис 4) Очевидно, гемолизин II, являясь секреторным белком, синтезируется в форме предшественника, имеющего сигнальный пептид из 31 аминокислотного остатка, который в ходе процессинга отщепляется сигнальной пептидазой с образованием зрелого белка.

Анализ выведенной аминокислотной последовательности гемолизина II продемонстрировал нетождественность этого гемолизина другим известным бактериальным цитолитическим факторам, подтвердив наш вывод о том, что этот белок является "самостоятельным" гемолизином *B.cereus*, который кодируется собственным геном, отличным от клонированных на сегодняшний день Таким образом, окончательно опровергаются выдвигавшиеся ранее гипотезы, рассматривающие гемолизин II как протеолитический фрагмент цереолизина (Fossum, 1963) или отождествляющие активность, приписываемую этому гемолизину, с активностью сфингомиелиназы и/или лецитиназы (Gilmore et al., 1989; Bowman et al, 1971).

HlyII	-	KGTVENLQGG-----	VYNSFKT	MKONIKNSIKV	EP	41																																											
Alpha HL	A	DINKTGTDTIGSNTTV	T--GDLV	KENGMHKKV	FDK	46																																											
HlyII	YAD	IAIVT	SNIDAKYTINGGY	N	KV	YHTEALITSGD	88																																										
Alpha HL	NHN	LLVIR	KTIAGQYRVYSEEGANKS	A	FKVQLQEDNE	94																																											
HlyII	S	FHKAA	V	MTSAKV	EVG	ILG	S	KVGVN	KGNADAS	ITGS	136																																						
Alpha HL	V	ISDYR	R	SIDTKEYM	T	TF	GFN	N	TG---	DTGKIGGL	GAN	139																																					
HlyII	F	AWKESVS	D	V	V	V	TH	LN	G	QSFNFP	I	N	F	184																																			
Alpha HL	V	SIGHTLKV	P	F	I	E	SP	V	G	I	NNMVN	Q	P	187																																			
HlyII	T	F	S	S	YNEGTN	V	SKDTPVA	TGY	N	VVA	A	231																																					
Alpha HL	P	V	T	NGSMKAAD	E	DPNKASS	LSS	DFAT	M	235																																							
HlyII	K	T	S	--DLK	ITNR	I	S	N	I	E	V	S	K	W	N	T	YNEFFTNN	277																															
Alpha HL	R	K	A	K	QQT	N	I	D	V	I	E	V	R	D	Q	H	T	S	T	K	W	T	R	S	S	E	R	283																					
HlyII	I	K	N	H	Q	V	T	L	D	N	Q	K	A	P	E	E	Q	M	I	G	I	N	N	V	N	Q	L	N	K	G	K	G	L	S	F	S	M	N	G	N	Q	L	K	A	324				
Alpha HL	I	E	K	E	E	M	T	N	329																																								
HlyII	T	S	S	N	A	G	Y	G	I	S	Y	E	D	K	N	W	G	I	F	V	N	G	E	K	V	Y	T	F	N	E	K	T	T	V	G	N	I	S	N	D	I	N	K	L	N	I	K	G	372
HlyII	P	Y	I	E	I	K	K	381																																									

Рис. 7. Сравнение аминокислотных последовательностей гемолизина II *B.cereus* (HlyII) и α -токсина *S.aureus* (Alpha; номер в GenBank - X01645). Дана последовательность предполагаемого зрелого HlyII (без сигнального пептида - 31 N-концевого аминокислотного остатка) Выравнивание выполнено с помощью программы FASTA Идентичные аминокислотные остатки выделены черным цветом, подобные - серым. Пунктирами обозначены пробелы, вставленные в последовательности для улучшения выравнивания

Была обнаружена значительная гомология между гемолизином II и α -токсином *Staphylococcus aureus* (31,2% идентичности) (рис 7) α -Токсин - это гемолизин, продуцируемый большинством патогенных штаммов *S aureus* Он лизирует все типы клеток

млекопитающих, олигомеризуясь в гептамеры, встраивающиеся в клеточные мембраны с образованием гидрофильных пор (Song et al., 1996)

На сегодняшний день α -токсин *S. aureus* весьма хорошо изучен описана его пространственная структура, установлена роль многих отдельных аминокислотных остатков в процессах связывания токсина с мембраной, его олигомеризации и порообразования (Song et al., 1996; Gouaux, 1998; Krasilnikov et al., 2000). Гомология с α -токсином выявляется на протяжении 317 N-концевых аминокислот HlyII, тогда как предполагаемый продукт трансляции hlyII на 94 аминокислоты длиннее, чем α -токсин (рис 7) В ходе делеционного анализа было показано, что эти 94 аминокислотных остатка не являются необходимыми для гемолитической функции гемолизина II (плазмида pUJ40, рис 1Б), хотя их делетирование вызывает заметное снижение уровня гемолиза

Данный факт нашел подтверждение в работе Майлса (Miles et al., 2002), исследовавшего свойства гемолизина II, полученного в сопряженной системе транскрипции и трансляции in vitro Роль этих “дополнительных” аминокислотных остатков еще предстоит выяснить Участки гомологии гемолизина II с α -токсином располагаются равномерно по длине белковых молекул Однако в пространственной структуре последнего эти участки преимущественно группируются в составе домена, который образует наружную гидрофильную часть поры, выступающую из клеточной мембраны, и, вероятно, являются существенными для формирования этого домена. Сравнительное выравнивание трехмерной структуры гемолизина II по структуре α -токсина *S. aureus* (“Spawiewer”) указывает на сходство пространственных укладок этих двух белков Исходя из результатов данного выравнивания, гемолизин II формирует в клеточной мембране поры, состоящие из семи молекул белка, - также, как и в случае с α -токсином. Это экспериментально подкреплено Майлсом (Miles et al., 2002), показавшим, что гемолизин II образует в мембранах эукариотических клеток гомогептамерные, селективные для анионов поры, подтверждая его структурную и функциональную гомологию с α -токсином *S. aureus*. Принимая во внимание имеющуюся гомологию, интересно отметить, что для гемолизина II показаны некоторые свойства, описанные и для α -токсина Так, оба этих белка проявляют выраженный эффект Аррениуса, демонстрируют сходную температурную зависимость (20°C - более оптимальная температура для обоих гемолизинов, чем 37°C) и обладают повышенной специфичностью к кроличьим эритроцитам по сравнению с эритроцитами человека

Помимо α -токсина гомологию с HlyII продемонстрировали γ -гемолизин и лейкоцидины *S. aureus*, β -токсин *Clostridium perfringens* и цитотоксин CytK *B. cereus* (28-37% идентичности) Все эти токсины принадлежат к семейству β -складчатых олигомерных порообразующих цитолизинов, а α -токсин рассматривается как прототип семейства

(Gouaux, 1998, Menestrina et al., 2001) Исходя из обнаруженной гомологии и структурно-функциональных характеристик, гемолизин II причислен к данному семейству цитолизинов

3. Распространение гемолизина II среди бактерий цереусной группы.

Геномные ДНК ряда штаммов *B. cereus*, *B. thuringiensis* (представляющих различные подвиды) и *B. anthracis* были протестированы на наличие последовательностей, гомологичных *EcoRI*-фрагменту ДНК *B. cereus* ВКМ-В771, содержащему ген гемолизина II. Тотальные ДНК исследуемых микроорганизмов гидролизировались рестриктазой *EcoRV*, полученные фрагменты разделялись в 0,8% агарозном геле, переносились на нитроцеллюлозные фильтры и гибридизовались с указанным фрагментом, меченным ^{32}P . Оказалось, что лишь 4 из 16 проверенных штаммов *B. cereus* содержат фрагменты ДНК, демонстрирующие гомологию с указанным зондом. В то же время из 14 тестируемых представителей *B. thuringiensis* гомологию с фрагментом, содержащим ген *hlyII*, проявляют 13 штаммов (т. е. подавляющее большинство) (рис. 8). Исползованные в работе ДНК двух

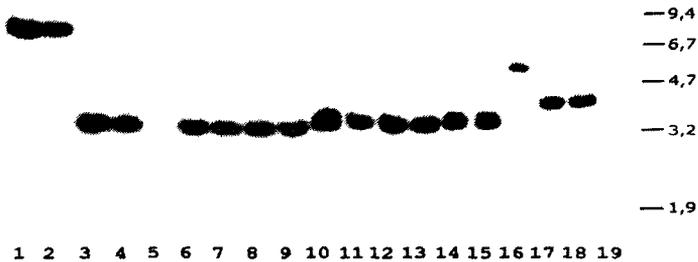


Рис. 8. Гибридизационный анализ геномных ДНК различных штаммов *B. cereus* и *B. thuringiensis* на наличие последовательностей, гомологичных фрагменту ДНК *B. cereus* ВКМ-В771, включающему в себя ген гемолизина II. В качестве зонда использован ^{32}P -меченый *EcoRI*-фрагмент (2,9 тпн) из плазмиды pUJ1. Дорожки 1-5: *B. cereus* ВКМ-В771 (1), ВКМ-В504 (2); ВКМ-В366 (3), ВКМ-В370 (4) и ВКМ-В164 (5), дорожки 6-19: *B. thuringiensis* ВКМ-В83 (6); ВКМ-В84 (7), ВКМ-В85 (8), ВКМ-В440 (9), ВКМ-В441 (10), ВКМ-В444 (11), ВКМ-В446 (12), ВКМ-В387 (13), ВКМ-В1555 (14), ВКМ-В1557 (15), ВКМ-В162 (16), ВКМ-В443 (17), ВКМ-В447 (18), ВКМ-В796 (19). Представлены преимущественно штаммы, давшие положительный ответ при гибридизации с указанным зондом.

штаммов *B. anthracis* (СТИ и вакцины Ценковского) дали при тестировании положительный ответ. Отсутствие гибридизации с использованным зондом позволяет сделать вывод о неспособности штаммов производить гемолизин II. Однако, положительный ответ при подобном тестировании не может интерпретироваться однозначно, поскольку ДНК зонда содержит не только интересующий нас ген, но и дополнительные участки. Кроме того,

присутствие в геноме гомологичной функциональному гену последовательности ДНК не означает наличие самого функционального гена

Поэтому использованные в гибридизационных экспериментах 16 штаммов *B. cereus* и 14 штаммов *B. thuringiensis* были исследованы также и на способность продуцировать гемолизин II. Штаммы выращивали в оптимальных для продукции гемолизинов условиях: в сердечно-мозговом бульоне (3,7%) при 28°C с интенсивной аэрацией. В культуральных жидкостях измерялась общая гемолитическая активность и активность, остающаяся после их инкубации с холестерином (0,2 мг/мл). Последнюю мы рассматривали как активность гемолизина II, поскольку холестерин ингибирует SH-токсины цереолизин (Coolbaugh and Williams, 1978) и туринголизин (Pendleton et al, 1973), вносящие основной вклад в суммарную гемолитическую активность *B. cereus* и *B. thuringiensis* (Bernheimer and Grushoff, 1967). При используемой концентрации холестерина происходило неспецифическое подавление и других гемолизинов. По характеру влияния холестерина на активность продуцируемых гемолизинов было выявлено два типа штаммов. Микроорганизмы первого типа вырабатывали только гемолизины, активность которых полностью ингибировалась холестерином (рис 9А и С). Штаммы второй группы помимо этих белков продуцировали гемолизин, активность которого холестерином не подавлялась (рис 9В и Д) – это, очевидно, гемолизин II, характерной особенностью которого является нечувствительность к холестерину. Среди микроорганизмов, вырабатывающих этот гемолизин, лишь 4 принадлежали к виду *B. cereus* и 13 – к *B. thuringiensis*. Ими оказались те же самые штаммы, которые давали положительный ответ в экспериментах по гибридизации с ДНК-зондом,

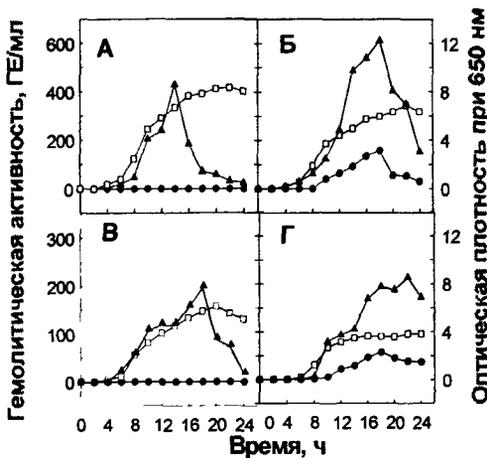


Рис. 9. Продукция внеклеточных гемолизинов различными штаммами *B. cereus* и *B. thuringiensis* (▲) – общая гемолитическая активность в культуральной жидкости; (●) – остаточная гемолитическая активность в культуральной жидкости после ее инкубации с холестерином, (□) – оптическая плотность культуры. В качестве примеров штаммов, различающихся по характеру влияния холестерина на активность продуцируемых ими гемолизинов, представлены *B. cereus* ВКМ-В164 (А) и *B. cereus* ВКМ-В771 (Б), *B. thuringiensis* ВКМ-В796 (В) и *B. thuringiensis* ВКМ-В1555 (Г)

содержащим ген гемолизина II (рис 8) Эта корреляция дает основания заключить следующее Во-первых, использованный в данной работе метод идентификации гемолизина II в культуральных жидкостях *B cereus* и *B thuringiensis* является правомерным Во-вторых, области ДНК в геномах тестируемых штаммов, демонстрирующие гомологию с использованным гибридизационным зондом, содержат функциональный ген, который кодирует активный гемолизин II

Десять из проверенных штаммов *B thuringiensis* имеют в своем геноме *EcoRV*-фрагмент ДНК размером около 3,5 т п н, который гибридизуется с ДНК-зондом, содержащим ген гемолизина II *B cereus* (дорожки 6-15 на рис 8) Данный фрагмент ДНК *B thuringiensis* B1555 был клонирован в составе pUC19 в клетках *E coli* (плазмида рТНЗ). Показано, что он кодирует гемолизин, аналогичный по свойствам гемолизины II из *B.cereus* B771 Например, он также проявляет эффект Аррениуса, имеет характерную для гемолизина II *B cereus* кинетику лизиса эритроцитов и идентичен с последним по электрофоретической подвижности (рис 4) Это является убедительным аргументом в пользу широкого распространения гемолизина II среди представителей *B thuringiensis* Что касается *B anthracis*, то опубликованные недавно данные о первичной структуре геномов двух сибиреязвенных штаммов (Read et al , 2002, 2004) подтвердили наличие в нем нуклеотидной последовательности, гомологичной гену *hlyII B cereus* Однако, у *B anthracis* выявлены в этом гене четыре нуклеотидные замены, приводящие к сдвигу рамки считывания, возможно, делая ген нефункциональным.

Несмотря на то, что биологическую роль гемолизина II еще предстоит выяснить, представленные нами данные, а также многочисленные исследования, касающиеся потенциальной патогенности *B thuringiensis* для млекопитающих (Akiyama et al., 1984; Osawa et al , 1984, Jackson et al , 1995; Damgaard, 1995), указывают на то, что штаммы данного вида, используемые как биологические инсектициды, следует серьезно исследовать с точки зрения их возможной опасности для человека и животных В интересах экологической безопасности этому вопросу следует уделить серьезное внимание

4. Регуляция экспрессии гена гемолизина II *B.cereus*.

В пределах *EcoRI*-фрагмента ДНК размером 2904 п н, содержащего ген *hlyII B cereus*, выявлено наличие еще одной ОПС, протяженностью 201 кодон, которая располагается за геном гемолизина Иницирующий кодон ATG находится в позиции 1916, терминирующий TGA - в позиции 2519 Перед иницирующим кодоном на расстоянии 8 нуклеотидов располагается последовательность GAGG – предполагаемый сайт связывания с рибосомой Новой ОПС предшествует потенциально способная к иницированию транскрипции AT-богатая область с каноническими -10 и -35 промоторными боксами На участке ДНК за стоп-кодоном выявлен совершенный инвертированный повтор - предполагаемый р-

независимый терминатор транскрипции нового гена Подобный терминатор также и предшествует данной ОРС, очевидно, терминируя транскрипцию *hlyII* Таким образом, новый ген, названный нами *hlyIIR*, видимо, может экспрессироваться независимо от *hlyII* Направление транскрипции обоих генов одинаковое

Сравнение аминокислотной последовательности предполагаемого белка HlyIIR с последовательностями белков, имеющимися в базах данных, выявило его сходство с рядом олигомерных ДНК-связывающих бактериальных регуляторов транскрипции семейства TetR/ActR Уровень общей гомологии HlyIIR с этими белками составляет 26-29%. Однако, на участке с 12 по 58 аминокислоту HlyIIR проявляет высокую идентичность и подобие до 80% с N-концевыми районами указанных регуляторов, содержащими консервативный “спираль-поворот-спираль” ДНК-связывающий мотив Согласно результатам предсказания пространственной укладки HlyIIR, он на участке 30-48 аминокислотный остаток с высокой степенью вероятности способен образовывать классическую “спираль-поворот-спираль” структуру. Таким образом, анализ предсказываемой первичной и пространственной структуры гипотетического белкового продукта гена *hlyIIR*, указывает на то, что этот белок является регулятором транскрипции

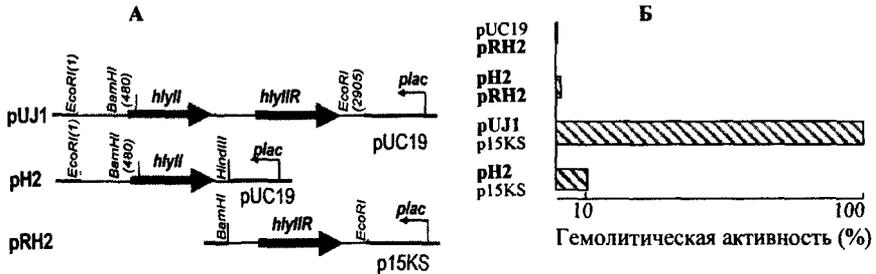


Рис. 10. Влияние гена *hlyIIR* на гемолитическую активность, обеспечиваемую экспрессией *hlyII*. А Схемы рекомбинантных плазмид, использованных в эксперименте Б Результаты количественной оценки суммарной гемолитической активности в штаммах *E. coli* с указанными рекомбинантными плазмидами Штаммы выращивались в условиях, оптимальных для продукции гемолизина в жидкой среде LB с аэрацией при 22°C до начала стационарной фазы роста

В ходе функционального картирования *EcoRI*-фрагмента ДНК с геном гемолизина II было обнаружено: концевые делеции, не затрагивающие ген гемолизина, но нарушающие *hlyIIR*, приводят к заметному (при определенных условиях) ослаблению гемолитического фенотипа рекомбинантных клеток *E. coli* (рис 1Б) Для исследования влияния гена *hlyIIR* на экспрессию *hlyII* были созданы плазмиды, содержащие каждый из этих двух генов по отдельности (рис 10А), и протестирована гемолитическая активность рекомбинантных

клонов *E. coli* (рис 10Б). Оказалось, что плазида рН2 с геном одного гемолизина (без предполагаемого регулятора) обеспечивает клеткам гемолитическую активность, на порядок меньшую, чем при наличии обоих генов в составе единого фрагмента ДНК (рUJ1). Таким образом, демонстрируется позитивное влияние *hlyIIR* на экспрессию гена гемолизина II. Сам *hlyIIR* (плазида рRH2) не обеспечивает клеткам *E. coli* способность лизировать эритроциты.

Поскольку плазмиды рН2 и рRH2 созданы на основе совместимых репликонов рUC19 и р15KS соответственно, была протестирована гемолитическая активность клеток, несущих обе эти плазмиды. Показано, что наличие генов гемолизина и регулятора на отдельных плаزمиде приводит к десятикратному падению гемолитической активности по сравнению с клетками, где присутствует только плазида с одним *hlyII*. Этот эксперимент свидетельствует, что *hlyIIR* способен оказывать и негативное влияние на проявление гена гемолизина II.

Примеры, когда один и тот же регулятор способен быть и активатором, и репрессором, в зависимости от присутствия кофакторов, от его концентрации или от других обстоятельств, описаны для ряда белков-регуляторов транскрипции (Heinrichs and Poole, 1996; Rasmussen et al., 1996). Вероятно, что условием, определяющим, какой именно эффект (позитивный или негативный) проявляет *hlyIIR*, выступает концентрация этого регулятора в клетке. Классический пример – репрессор ффага λ , имеющий множественные сайты связывания на ДНК и характеризующийся кооперативным связыванием. В зависимости от концентрации репрессора в клетке он занимает тот или иной операторный участок, что и определяет его позитивный или негативный эффект (Ptashne et al., 1976).

Опираясь на сходство *HlyIIR* с ДНК-связывающими регуляторами транскрипции семейства TetR/AcrR, предположено, что этот белок влияет на экспрессию гена гемолизина II на транскрипционном уровне. Для проверки данного предположения исследовалось влияние *hlyIIR* на экспрессию репортерного гена, считываемого с промоторной области *hlyII*. Была сконструирована плазида рFH1Lac, в которой ген β -галактозидазы *lacZ*, лишенный своего промотора, слит с регуляторной областью *hlyII*, лежащей перед геном (рис 11А).

Тестировалось влияние совместимой плазмиды, несущей *hlyIIR*, на уровень β -галактозидазной активности в клетках с рFH1Lac (рис 11Б). Показано, что плазида, содержащая репортерный ген, в клетках *E. coli* обеспечивает заметный уровень активности β -галактозидазы. Однако, введение в эти клетки еще и плазмиды с *hlyIIR* (рRH2) приводит к десятикратному падению данной активности. Таким образом подтверждается, что *HlyIIR* осуществляет свой контроль (по крайней мере – негативный) на уровне транскрипции, через взаимодействие с регуляторной областью гена гемолизина II.

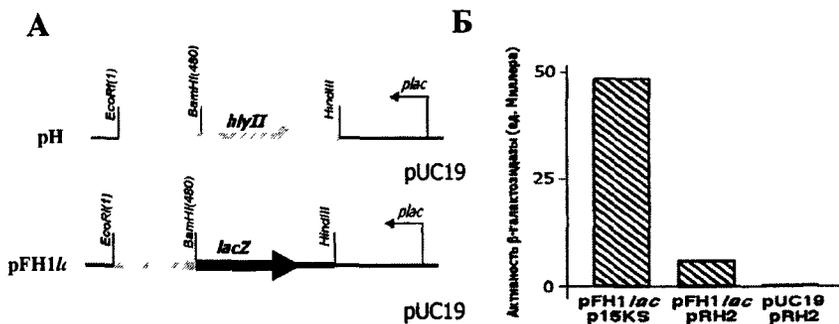


Рис. 11. Влияние гена *hlyIIR* на экспрессию гена β-галактозидазы под контролем промоторной области *hlyII*. А: Схема плазмиды pFH1Lac, содержащей ген β-галактозидазы без собственного промотора (жирная черная стрелка), слитый с регуляторной областью и N-концевой частью гена *hlyII* (обозначены серым цветом) Б: Результаты количественной оценки β-галактозидазной активности в экстрактах рекомбинантных клеток *E. coli*, несущих указанные плазмиды

Был выделен и очищен белковый продукт гена *hlyIIR*. Для этого структурная часть гена клонирована в специализированной векторной системе pQE30 (Qiagen, Hilden, GERMANY), позволяющей получать высокий уровень синтеза белков с присоединенной N-концевой последовательностью из 6 остатков гистидина

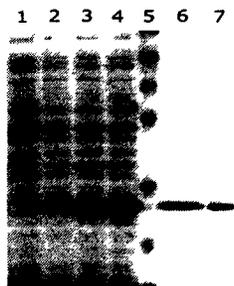


Рис. 12. Продукция и очистка рекомбинантного белка N6HisHlyIIR. 7% ДСН-ПААГ электрофорез белков, продуцируемых клетками *E. coli* M15(pRep4, pRHHis) без индукции (дорожка 1), через 1, 3, 5 часов после индукции ИПТГ (дорожки 2-4), белка N6HisHlyIIR после высаливания сульфатом аммония (6) и после снятия с Ni-NTA колонки (7). Дорожка 5- смесь маркерных белков с молекулярными массами 14, 20, 31, 46, 64 и 82 kDa.

При индукции ИПТГ в клетках *E. coli*, содержащих полученную плазмиду pRHHis, наблюдалась повышенная экспрессия единственного белка с Мм около 25 kDa (рис 12). Это значение молекулярной массы хорошо коррелирует с соответствующей величиной, рассчитанной на основе нуклеотидной последовательности гена *hlyIIR*. Рекомбинантный His₆-маркированный белок HlyIIR был очищен из клеточного экстракта до гомогенного состояния в две стадии: осаждение 60% сульфатом аммония и хроматография на колонке с Ni-NTA (Qiagen, Hilden, GERMANY) (рис 16). Очищенный препарат белка использовался в дальнейших экспериментах по связыванию с ДНК.

Участки ДНК из регуляторной области гена *hlyII*, с которыми связывается белок NlyIIR, выявлялись в экспериментах по задержке в геле (рис 13) Показано, что белок образует комплекс с фрагментом размером 480 пн, включающим в себя регуляторную область гена гемолизина II (*EcoRI-BamHI* фрагмент плазмиды pH2) В пределах этих 480 пн выявлен субфрагмент длиной 220 пн (*EcoRI-AluI*), с которым специфически связывается NlyIIR (рис 13А, Б)

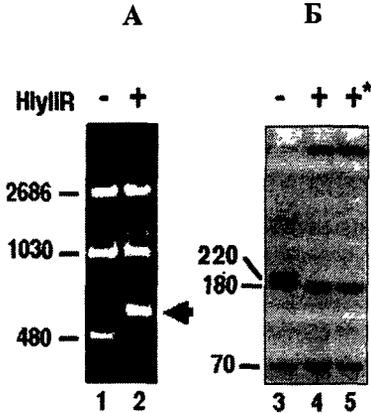


Рис. 13. Электрофоретическая подвижность фрагментов ДНК, содержащих регуляторную область *hlyII*, и их комплексов с N6HisNlyIIR.

А Электрофорез в 1%-ном агарозном геле фрагментов ДНК плазмиды pH2, расщепленной *EcoRI*, *HindIII* и *BamHI*, до (1) и после инкубации с регуляторным белком (2)

Б Радиоавтограф 6%-го ПААГ после разделения в нем $\gamma^{32}P$ -меченых фрагментов ДНК - продуктов гидролиза 480 пн *BamHI* - *EcoRI* фрагмента плазмиды pH2 эндонуклеазой *AluI* (дорожка 3 - без добавления NlyIIR, 4 и 5 - после инкубации с NlyIIR) Для контроля на специфичность связывания была проведена реакция связывания в присутствии избыточных количеств линейной ДНК pUC19 Стрелками указано положение комплексов ДНК-NlyIIR

Для более точной локализации участка связывания ДНК с NlyIIR проведены эксперименты по расщеплению ДНКазой I комплексов N6HisNlyIIR-ДНК (рис 14) Установлено, что в пределах указанного субфрагмента (220 пн) белок специфически защищает от расщепления ДНКазой I область ДНК протяженностью около 50 пн (20-72 нуклеотиды от левого фланга *EcoRI*-фрагмента) Эта область соответствует совершенному инвертированному повтору размером 22 пн (рис 5). Поскольку для многих транскрипционных регуляторов показано, что именно инвертированные повторы являются их сайтами-мишенями (Соловьев, 1988), можно заключить: указанный 44-нуклеотидный палиндром, центр которого располагается за 48 пн перед точкой начала транскрипции гена гемолизина II, функционирует как операторный участок, узнаваемый белком NlyIIR Расположение участка связывания этого белка относительно промоторной области гена гемолизина позволяет предположить, что регулятор NlyIIR осуществляет свое негативное воздействие на транскрипцию *hlyII*, создавая при связывании с оператором стерическое препятствие для РНК-полимеразы Однако, по предварительным данным, NlyIIR может затруднять процесс превращения закрытого промоторного комплекса в каталитически активный открытый комплекс через белок-белковое взаимодействие с РНК-полимеразой

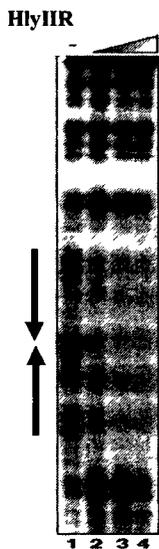


Рис. 14. Фут-принт комплекса N6HisNlyIIR с промоторной областью *hlyII* с использованием ДНКазы I. Амплифицированный меченый P³² фрагмент плазмиды pU1 (1-375 н.п. EcoRI-вставки), содержащий промоторно-операторную зону *hlyII*, инкубировался с белком NlyIIR (возрастающие концентрации) в присутствии неспецифической ДНК и обрабатывался ДНКазой I. Электрофорез проводился в 6% денатурирующем ПААГ. Стрелками указано положение 44-пн палиндрома перед промотором *hlyII*.

Учитывая локализацию генов *hlyII*, и регуляторного белка, их однонаправленность, способность NlyIIR осуществлять позитивный и негативный контроль экспрессии гена *hlyII*, можно предположить влияние продукта гена NlyIIR на эффективность и собственной экспрессии. По нашим предварительным данным при низких концентрациях регулятора он связывается с дистальным по отношению к промотору участком операторной области и выступает в роли активатора транскрипции гена гемолизина II и, возможно, - *hlyIIR*. По мере накопления NlyIIR он заполняет остальную часть оператора и репрессирует транскрипцию гена *hlyII* и видимо, собственного гена. Вероятно, когда *B cereus* находится вне макроорганизма не требуется высокий синтез гемолизина, и данный авторегуляторный механизм направлен на поддержание некоторого невысокого стационарного уровня экспрессии *hlyII*. Однако в определенных ситуациях (например, в ходе инфекционного процесса) для бактерии целесообразно резкое увеличение продукции гемолизина. Следовательно, должен существовать некий дополнительный механизм или фактор позволяющий снимать репрессию с гена *hlyII*. Выяснение данного вопроса, как и дальнейшая проверка предложенной схемы регуляции гена гемолизина II, есть предмет текущих исследований.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружен и впервые клонирован ген гемолизина II *Bacillus cereus*, определена его нуклеотидная последовательность и на основании анализа аминокислотной последовательности, выведенной из первичной структуры его гена, гемолизин II причислен к семейству β -складчатых порообразующих олигомерных цитолизинов
2. Установлено, что способность продуцировать гемолизин II является штаммоспецифичным свойством *B. cereus* и *B. thuringiensis*
3. Идентифицирован и клонирован новый ген *B. cereus* – *hlyIII*. Установлено, что экспрессия гена гемолизина II *B. cereus* контролируется белковым продуктом *hlyIII*, который взаимодействует с операторным участком, лежащим перед геном гемолизина II.
4. Показано, что HlyIII способен выступать как в роли позитивного, так и негативного регулятора экспрессии гена гемолизина II.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1 Синева М А , Бударина Ж И , Гавриленко И В , Томашевский А Ю , Кузьмин Н П 1993 Доказательство существования гемолизина II *Bacillus cereus* клонирование генетической детерминанты гемолизина II *Молекулярная биология*, т 27, в 6, с 1218-1229.
- 2 Budarina, Z I, Sinev, M.A., Mayorov, S G, Tomashevski, A.Y, Shmelev, I V, Kuzmin, N P 1994 Hemolysin II is more characteristic of *Bacillus thuringiensis* than *Bacillus cereus* *Archives of Microbiology*, v 161, p 252-257
- 3 Baida, G, Budarina, Z I, Kuzmin, N P, Solonin, A.S. 1999 Complete nucleotide sequence and molecular characterization of hemolysin II gene from *Bacillus cereus* *FEMS Microbiology Letters*, v 180, p 7-14
- 4 Budarina, Z I, Nikitin, D.V, Zenkin, N., Zakharova, M, Semenova, E, Shlyapnikov, M G, Rodikova, E A, Masyukova, S, Ogarkov, O, Baida, G E, Solonin, A.S, Severinov, K 2004 A new *Bacillus cereus* DNA-binding protein, HlyIIR, negatively regulates expression of *B.cereus* haemolysin II *Microbiology*, v 150, p. 3691-3701
- 5 Kuzmin, N.P., Gavrilenko, I V, Budarina, Z I, Tomashevski, A Y, Sinev, M A 1991 Molecular cloning of hemolysin II genetic determinant from *Bacillus cereus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* cells Abstracts of 10th World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins, Singapore, November 3-8, 1991, p 344
- 6 Budarina, Z I, Baida, G., Kuzmin, N P Hemolysin II from *Bacillus cereus* Abstracts of the 1st International Workshop on the Molecular Biology of *Bacillus cereus*, *B anthracis* and *B. thuringiensis*, Oslo, May 23-25, 1997, p 11
- 7 Budarina, Z I, Nikitin, D.V, Baida, G E., Solonin, A S HlyIIR_{reg}, a regulator of hemolysinII gene from *Bacillus cereus*. Abstracts of the 2nd International Workshop on the Molecular Biology of *Bacillus cereus*, *B. anthracis* and *B. thuringiensis*, Taos, New Mexico, August 11-13, 1999, p. 7.
- 8 Nikitin, D V, Budarina, Z.I, Rodikova, E A, Solonin, A S DNA binding properties of a new hemolysine II regulatory protein from *B. cereus* *Proceedings of the First IUBMB/SASBMB Special Meeting on Biochemical and Molecular Basis of Disease*, Cape Town, November 18-25, 2001, p. 132.
- 9 Solonin, S A, Nikitin, D V, Budarina, Z.I, Rodikova, E A., Ogarkov, O, Severinov, K HlyIIR is negative transcriptional regulator of hemolysin II expression Abstracts of the 5th International Conference on Anthrax and 3rd International Workshop on the Molecular Biology of *Bacillus cereus*, *B. anthracis* and *B. thuringiensis*, Nice, March 30 – April 3, 2003, p 58

№ - 883 2

РНБ Русский фонд

2006-4

16660

Принято к исполнению 06/04/2005
Исполнено 07/04/2005

Заказ № 745
Тираж: 100 экз

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900
Москва, Балаклавский пр-т, 20-2-93
(095) 747-64-70
(095) 318-40-68
www.autoreferat.ru