

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПЛАЗМИДЫ PBS72 ПРИРОДНЫХ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*

Гуринович А.С.¹, Сацункевич Н.Е.², Фомина О.В.¹, Валентович Л.Н.^{1,2},
Титок М.А.¹

¹Белорусский государственный университет, Минск,
titok@bsu.by

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

Повсеместно распространенные и хорошо изученные в генетическом отношении бактерии *B. subtilis* обладают широким метаболическим потенциалом и являются перспективными объектами биотехнологии. В клетках этих микроорганизмов, как правило, присутствуют плазмиды размером до 10 т.п.н., которые реплицируются в соответствии с механизмом «разматывающегося рулона». В настоящее время описана только одна плазида бактерий *B. subtilis* копирующаяся по механизму тета-типа (pLS20). Следует отметить, что плазмидные репликоны этого типа представляют собой кольцевые молекулы ДНК размером более 50 т.п.н., которые активно участвуют в горизонтальном переносе генов, имеют уникальные системы репликации и являются наиболее оптимальной основой для создания систем генетического анализа.

С использованием разных методов (рестрикционный анализ плазмидной ДНК, гибридизация, ПЦР-анализ тотальной ДНК, выделенной из почвы) установлено, что 20% спорообразующих бактерий, выделенных из различных природных источников на территории Беларуси, содержали идентичные плазмиды размером около 100 т.п.н. Одна из обнаруженных плазмид была обозначена как pBS72 [1, 2]. Отличительной особенностью выявленного плазмидного репликона являлась его способность передаваться путем конъюгации в изогенных системах скрещивания, а также обеспечивать конъюгационный перенос мобилизуемых плазмид (в жидкой среде, на плотной среде и в почве) [3]. Указанное свойство является весьма примечательным, поскольку обеспечивает распространение внехромосомных генетических элементов среди бактерий природных популяций.

Из трех разных штаммов, содержащих данные плазмиды, были изолированы мини-репликоны и определены их нуклеотидные последовательности [4]. Сиквенс-анализ позволил установить, что *rep*-гены, детерминируют уникальный ранее не описанный белок инициации репликации. В пределах данного белка выявлен функциональный домен, сходный с таковым белка, иницирующего копирование бактериальных хромосом грамположительных бактерий (DnaA), определяющий связывание с хеликазой. Функциональный анализ позволил установить, что копирование данной плазмиды определяется только *oriV*-сайтом и *rep*-геном, зависит от функции

белков праймосомного комплекса (DnaB и DnaI), число копий регулируется белками DnaA и PriA, а копирование запаздывающей нити ДНК осуществляется субъединицей DnaE ДНК-полимеразы III [1, 5]. Сравнительный анализ Rep-белка плазмиды pBS72 с известными, депонированными в ГенБанк NCBI, показал, что идентичные на 99% белки обнаруживаются в геномах пяти штаммов бактерий *B. subtilis* (B4071, MB378, MB415, EN11, DN12), выделенных на территории Пакистана и Нидерландов. Анализируя эти близкородственные полипептиды были выявлены некоторые закономерности. Во-первых, для генов, детерминирующих синтез этих белков, не установлена плазмидная локализация (они аннотированы в составе отдельных фрагментов генома) и данные белки отнесены к разряду гипотетических. Во-вторых, штаммы, содержащие данные детерминанты, не привязаны к специфическим природным источникам. Все штаммы отнесены к бактериям *B. subtilis* и выделены они из разных мест (кари суп, лесная и луговая почва, загрязненная нефтью почва). Следовательно, присутствие в изолированных бактериях плазмид не обеспечивает содержащим их микроорганизмам, определенных фенотипических признаков (например, деградативных свойств либо устойчивости к определенным соединениям), что создает сложности в обнаружении внехромосомных генетических элементов такого большого размера. В-третьих, подобно Rep-белку плазмиды pBS72, гомологичные полипептиды содержат три функциональных домена с одинаковой локализацией. Это НТН-домен (расположен между 88 и 141 аминокислотой), последовательность между 275 и 345 аминокислотой имеет сходство с N-концевой последовательностью белка DnaA и, наконец, между 187 и 345 аминокислотой находится последовательность сходная с белком PolC. При этом данные белки отличались от Rep-белка плазмиды pBS72 четырьмя несинонимическими заменами, три из которых в позиции 255 (T→S, треонин на серин), 310 (S→N, серин на аспарагин) и 315 (E→D, глутаминовая кислота на аспарагиновую кислоту) не должны сказываться на функциональной активности данных полипептидов. В то же время замена лизина (положительно заряженная аминокислота) на глутамин (полярная нейтральная аминокислота) в позиции 319 может иметь функциональное значение. Кроме того, белки, отличавшиеся от Rep-белка плазмиды pBS72 в большей степени (идентичность составляла 62%), выявлены в составе плазмиды pSX01705-1 размером 79 987 п.н. бактерий *B. subtilis* SX01705 (CP022288), плазмиды 1 размером 96 005 п.н. бактерий *B. licheniformis* SRCM103529 (CP035229) и в составе геномов *B. licheniformis* (штаммы YNP1-TSU и YNP1-TSU). Данные белки, как и в предыдущем случае, отнесены к разряду гипотетических. Полученные данные позволяют заключить, что репликоны, гомологичные плазмиде pBS72, широко распространены в бактериях *B. subtilis*, выделенных из различных природных источников.

В результате полногеномного секвенирования плазмиды pBS72 было установлено, что ее размер составляет 102 254 п.н. В состав плазмиды входят 142 открытые рамки считывания, из них 49 кодируют белки с известными свойствами и 93 определяют синтез гипотетических полипептидов с неизвестной функциональной активностью. Около $\frac{1}{4}$ всего генома представлено генами, детерминирующими синтез белков, участвующих в конъюгационном переносе (orf 21–orf 57). Среди белков, определяющих процесс конъюгации, только 13 из 36 проявляют гомологию с известными белками. При этом сходство составляет 72% (orf 57), 90% (orf 54), 93% (orf 53), 96% (orf 28), 99% (orf 24, orf 33, orf 42, orf 46, orf 49) и 100% (orf 21, orf 25, orf 26, orf 31). Все остальные белки являются гипотетическими, функция которых не определена.

Содержание ГЦ-пар плазмиды составляло 35%, что отличается от ГЦ-состава хромосомы бактерий-хозяев (содержания ГЦ-пар у бактерий *B. subtilis* составляет 43-45%). В геноме плазмиды выявлены детерминанты (orf 60 и orf 132), определяющие синтез белков фагового происхождения (сходны с белками фагов PM1 и phi3T).

Сравнительный анализ белков, кодируемых открытыми рамками считывания, позволил их условно разделить на 4 группы. Первую группу составили регуляторные белки (в частности, транскрипционные факторы, Rap-белок). Данные белки отличались высокой гомологией с белками бактерий *B. subtilis*. Определенный интерес представляет ген, кодирующий Rap-белок и присутствующий в составе многих криптоических внехромосомных генетических элементов грамположительных бактерий. Данный полипептид является полифункциональным и принимает участие в процессах спорообразования, формирования биоплёнок и компетентности, а также синтезе вторичных метаболитов [6]. Однако для Rap-белка было обнаружено только 68% сходство аминокислотной последовательности с гомологичными белками *B. halotolerans* и *B. licheniformis*.

Вторая группа представлена трансмембранными белками (всего восемь белков), в которые входили гистидин-киназа и регулятор ответа. Для них выявлена разная степень гомологии с белками бактерий рода *Bacillus*. В большинстве случаев гомология составила от 97% до 100%, кроме белков, кодирующихся orf 6 и orf 131, гомология которых с известными не превышала 57% и 51% соответственно.

В третью группу включены белки (всего 6 белков), предположительно выполняющие защитную функцию. Эта группа представлена метилтрансферазами (orf 58, orf 72, orf 84), белком теплового шока Hsp40 (orf 59) и белками UmuC и UmuD SOS-репарации (orf 132 и orf 133). При этом одна из генетических детерминант (orf 58), кодирующая ДНК-метилтрансферазу (Dcm), характеризовалась более высоким содержанием Г/Ц-оснований (43%), а ее аминокислотная последовательность имела сходство с

гомологичными белками не только бактерий *Bacillus subtilis* (99%), но и с таковыми бактерий *Bacillus velezensis* (80%) и *Bacillus licheniformis* (78%). Наибольшее сходство нуклеотидные последовательности генов (orf 132 и orf 133), кодирующих белки SOS-репарации, проявляют с генами *Bacillus* sp. DM2 (CP030937), *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 (FN597644) и *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* D12-5 (CP014858) (81–97%), а аминокислотные последовательности данных белков наиболее сходны с таковыми бактерий *Bacillus halotolerans* и *Bacillus* sp. DM2 (95–97%).

В четвертую группу включены белки, предположительно обладающие ферментативной активностью. Кроме того, в эту группу отнесена orf 94 (координаты 71 355–71 425), определяющая синтез транспортной РНК цистеина.

На основе мини-репликона плазмиды pBS72 сконструирован вектор для молекулярного клонирования в клетках *B. subtilis* [7], а также создана серия векторных молекул, содержащих промоторы генов, обеспечивающие экспрессию гена *lacZ* в присутствии антибиотиков, подавляющих синтез клеточной стенки (PuruA, PliA_H), ДНК (P_{yorB}), РНК (P_{yvg}) и белков (P_{yheI}). Показана возможность использования созданной молекулярно-генетической тест-системы для скрининга природных бактерий, продуцирующих антибиотики с определенным механизмом действия (нарушающих синтез клеточной стенки, ДНК, РНК и белков) [8].

Литература

1. Titok M.A. *Bacillus subtilis* soil isolates: plasmid replicon analysis and construction of a new theta-replicating vector / M.A. Titok [et al.] // *Plasmid*. – 2003. – Vol. 49, № 1. – С. 53–62.
2. Гуринович А.С. Распространение плазмиды тета-типа pBS72 в клетках природных бактерий *Bacillus subtilis* / А.С. Гуринович, Н.А. Сацункевич, М.А. Титок. // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: тез. докл. XI Междунар. науч. конф., Минск, 3-6 июня. 2019 г.* / Институт микробиологии НАН Беларуси; отв. за вып.: А. В. Сидоренко. – Минск, 2019.
3. Poluektova E.U. Plasmid transfer in bacilli by a self-transmissible plasmid p19 from a *Bacillus subtilis* soil strain. / E.U. Poluektova [et al.] // *Plasmid*. – 2004. – Vol. 52. – P. 212–217.
4. Характеристика систем репликации плазмид природных штаммов *Bacillus subtilis* / А.В. Лагодич [и др.] // *Мол. Биол.* – 2004. – Т. 38, № 3. – С. 437–441.
5. The replicative polymerases PolC and DnaE are required for theta replication of the *Bacillus subtilis* plasmid pBS72 / M.A. Titok [et al.] // *Microbiology*. – 2006. – Vol. 152, № 5. – P. 1471–1478.
6. A plasmid-born Rap-Phr system regulates surfactin production, sporulation and genetic competence in the heterologous host, *Bacillus subtilis* ОКВ105 / Yang Y [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2015. – V. 99, № 17. – P. 7241–7252. doi: 10.1007/s00253-015-6604-3.

7. А.с. 7537 МПК: C12N15/63 Челночный вектор для молекулярного клонирования в бактериях *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* (варианты) и способ его конструирования / А.В. Лагодич, М.А. Титок (РБ). – № А20030886 заявлено 19.09.2003.

8. Создание тест-системы для обнаружения антибиотиков в окружающей среде / Н. Е. Сацункевич, М. С. Угляница, М. А. Титок // Сб. научн. трудов «Микробные технологии: фундаментальные и прикладные аспекты». – 2015. – Т.7. – С. 80–91.