

Вивчення регуляції експресії гена *lysC*, який кодує аспартокіназу II у *Bacillus subtilis*

Н. Ю. Мірюта*, Т. П. Перерва, Т. М. Шевченко

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
252143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

*У роботі досліджено тотальні РНК трьох видів штамів *B. subtilis* (дикого та двох мутантних), вирощених в умовах репресії та дерепресії. Вивчено розподіл транскриптів, що кодують АКІІ, у цих штамів методами дот- та блот-гібридизації. Виявлено, що лізиновий оперон відноситься до групи оперонів, у яких регуляція активності генів відбувається, скоріш за все, за участю атенуатора на рівні транскрипції.*

Одним з методів вивчення механізмів транскрипційної активності генів може бути дослідження АЕС-стійких мутантів *B. subtilis*, що мають високу активність аспартокінази II (АКІІ), порівняно з дикими штамми.

Активність АКІІ інгібували в клітинах *B. subtilis* за допомогою лізину. Наші дослідження базувалися на даних з дерепресії синтезу ферменту, яку можна було б пояснити деякими пошкодженнями у регуляторній послідовності, що фланкує область регуляторного гена, і в гіпотетичній регуляторній області, розташованій далеко від цього гена.

Серед отриманих АЕС-стійких мутантів *B. subtilis* клітини, що мають високу активність АКІІ [1], було знайдено та віддиференційовано від інших мутантів, які не мали змін у лідувчій регуляторній послідовності гена *lysC*. Дерепресія синтезу АКІІ у цих штаммах, імовірно, відбувалася внаслідок змін у додатковому регуляторному локусі або в гені, що бере участь у регуляції експресії *lysC*-гена. Порівняльний аналіз транскрипції *lysC*-гена в кількох штаммах з мутантним регуляторним геном та в штамі дикого типу зроблено також за умов репресії та дерепресії синтезу АКІІ.

У роботі використано штами *B. subtilis*, стійкі до аналогу лізину S-2-аміноетилцистеїну [1, 2]. Первинні мутанти було отримано в результаті мутагенезу *in vitro* під дією азотистої кислоти на ДНК *B. subtilis* з наступною трансформацією. Частина з них одержано за допомогою інсерційного мутагенезу, де плазміда *pHV14* інтегрувалася з хромосомою *B. subtilis* з подальшою елімінацією з хромосоми. В роботі використані штами АТ9, що є суперпродуцентом лізину [1], SH25, який має точкові пошкодження в регуляторній області [1], та прототроф SHgW. Штами вирощували в середовищі, описаному в [3], без лізину (умови дерепресії), або в присутності 100 чи 500 мкг/мл лізину (умови репресії). Сумарну РНК з досліджуваних штамів, вирощених в умовах репресії або дерепресії, виділяли за методикою фенольно-детергентної депротейнізації, розробленої

*Correspondence address.

для штамів *B. subtilis* [4], обробляли ДНКазою фірми «Sigma» (США). Далі її електрофоретично розділяли в 0,8 %-й агарозі («Sigma») з 6 М сечовиною [5], переносили на фільтри Hybond N та гібридизували з зондом, міченим ^{32}P -дЦТФ у реакції нік-трансляції. Плазміда несе *lysC*-ген і отримана від др. Паулуса з Біомедичного інституту в Бостоні (США). Питома радіоактивність зонда складала $(1-3) \cdot 10^8$ імп·хв $^{-1}$ ·мкг $^{-1}$. Гібридизацію здійснювали протягом 18 год при 42 °С у буфері 6×SSC, що містить 5× розчину Денхардта, 50 % формаміду, 100 мкг/мл тимусної ДНК. Фільтри відмивали двічі по 15 хв у 2×SSC, протягом 30 хв у 2×SSC-0,2 % DS-Na та 15 хв — у 0,1×SSC при 42 °С [6, 7]. Радіоавтографію проводили протягом 7—14 діб при 20 °С.

У цій роботі вивчено кількісний та якісний розподіл транскриптів, що кодуєть АКІІ, у трьох видів штамів (дикому та двох мутантних), вирощених в умовах репресії та дерепресії. Згідно з даними, викладеними у роботі [1], рівень експресії АКІІ у одного з цих штамів (АТ9) перевищує такий дикого типу (SHgW) приблизно у 60 разів. Як видно з рис. 1, 2, кількість РНК, що зв'язалася з зондом, який містить ген *lysC*, у штамів SH25 та АТ9 перевищує аналогічну кількість у штамі SHgW в умовах дерепресії, але тільки у 10 разів. Щодо синтезу РНК в умовах репресії гена АКІІ, то у прототрофа SHgW вона, як і слід було чекати, спостерігалася на базальному рівні, а в мутантних штамів — практично не залежала від кількості доданого лізину. Ці результати дозволяють припустити, що пошкодження у

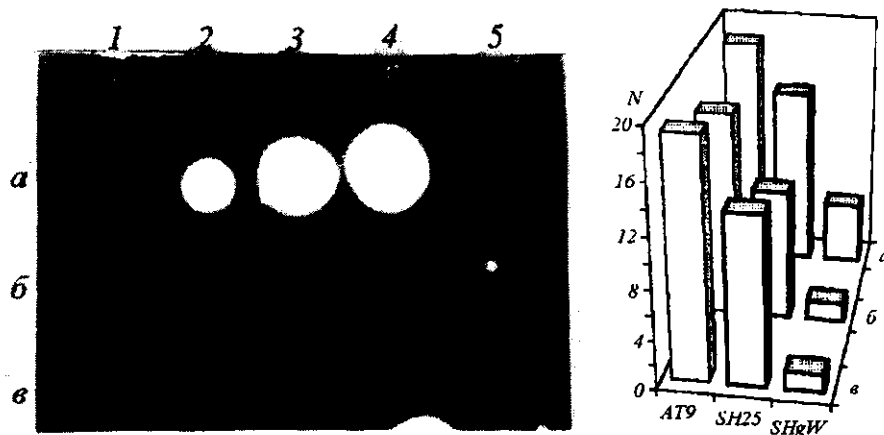
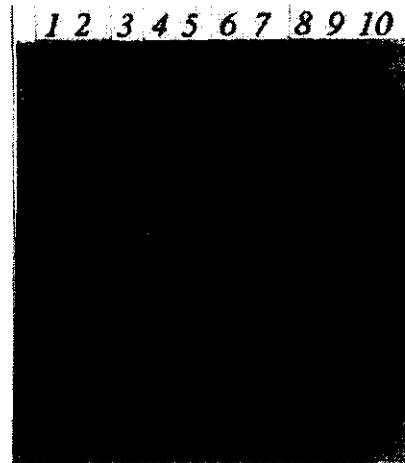


Рис. 1. Гібридизація ^{32}P -міченої плазміди, що несе ген *lysC*, з РНК різних штамів *B. subtilis*, вирощених в умовах репресії та дерепресії: а, 2 — з ДНК плазміди *pPS* (що містить ген *lysC*), дві копії на геном бактерії (позитивний контроль); а, 3 — з ДНК плазміди *pPS*, п'ять копій на геном бактерії (позитивний контроль); а, 4 — з ДНК плазміди *pPS*, 10 копій на геном бактерії (позитивний контроль); б, 1 — з РНК штама АТ9 (20 мкг) без додавання лізину (дерепресія); б, 2 — з РНК штама АТ9 (20 мкг) з додаванням 100 мкг/мл лізину (репресія); б, 3 — з РНК штама АТ9 (20 мкг) з додаванням 500 мкг/мл лізину (репресія); б, 4 — з РНК штама SH25 (20 мкг) без додавання лізину (дерепресія); б, 5 — з РНК штама SH25 (20 мкг) з додаванням 100 мкг/мл лізину (репресія); в, 1 — з РНК штама SH25 (20 мкг) з додаванням 500 мкг/мл лізину (репресія); в, 2 — з РНК штама SHgW (20 мкг) без додавання лізину (дерепресія); в, 3 — з РНК штама SHgW (20 мкг) з додаванням 100 мкг/мл лізину (репресія); в, 4 — з РНК штама SHgW (20 мкг) з додаванням 500 мкг/мл лізину (репресія); в, 5 — з тимусною ДНК (20 мкг) (негативний контроль)

Рис. 2. Діаграма розподілу кількості транскриптів, що кодуєть АКІІ, в умовах репресії та дерепресії для різних досліджуваних штамів (N — величина, пропорційна до площі під відповідними піками денситограми): а — без додавання лізину (дерепресія); б — з додаванням 100 мкг/мл і в — 500 мкг/мл лізину (репресія)

Рис. 3. Аналіз транскриптів, що кодують АКІІ, за допомогою блотінгу. РНК штамів АТ9, SH25, SHgW електрофоретично розділяли в 0,8 %-й агарозі з 6 М сечовиною, переносили на фільтр Hybond N та гібридизували з 32 P-ДНК плазміди *pPS*, що містить *lysC*-ген. Показані радіоавтографи цих фільтрів. РНК наносили за схемою: 1 — з РНК штама АТ9 (20 мкг) з додаванням 500 мкг/мл лізину (репресія); 2 — з РНК штама АТ9 (20 мкг) з додаванням 100 мкг/мл лізину (репресія); 3 — з РНК штама АТ9 (20 мкг) без додавання лізину (дерепресія); 4 — з РНК штама SH25 (20 мкг) з додаванням 500 мкг/мл лізину (репресія); 5 — з РНК штама SH25 (20 мкг) з додаванням 100 мкг/мл лізину (репресія); 6 — з РНК штама SH25 (20 мкг) без додавання лізину (дерепресія); 7 — з РНК штама SHgW (20 мкг) з додаванням 500 мкг/мл лізину (репресія); 8 — з РНК штама SHgW (20 мкг) з додаванням 100 мкг/мл лізину (репресія); 9 — з РНК штама SHgW (20 мкг) без додавання лізину (дерепресія); 10 — плазміда *pPS*



геномі досліджуваних штамів знаходяться в районі атенюатора лізинового оперону [8, 9]. З аналізу транскриптів, які кодують АКІІ (рис. 3), випливає, що в тотальній РНК штама АТ9, вирощеного в умовах репресії, переважають транскрипти розміром 1,6—2,3 тис. п. н., тоді як у дерепресованому стані — транскрипти, що перевищують 2,6 тис. п. н. (маркери на рисунку не наведені).

На підставі отриманих даних можна зробити попередній висновок стосовно того, що лізиновий оперон відноситься до групи оперонів, у яких регуляція активності генів відбувається, скоріш за все, за участю атенюатора на рівні транскрипції (8—10-кратне підвищення рівня транскрипції та незалежність його від умов репресії — дерепресії [9]). Разом з тим розбіжність між 10-кратним підвищенням рівня синтезу мРНК та описаним раніше 60-кратним зростанням рівня синтезу АКІІ [1] свідчить про участь інших механізмів у регуляції синтезу лізину.

Робота підтримана Міжнародним Науковим Фондом (Україна, грант N K19100).

Н. Ю. Мирюта, Т. П. Перерва, Т. Н. Шевченко

Изучение регуляции экспрессии гена *lysC*, кодирующего аспартокиназу II у *Bacillus subtilis*

Резюме

*В работе исследованы тотальные РНК трех видов штаммов *B. subtilis* (дикого и двух мутантных), выращенных в условиях репрессии и дерепрессии. Изучено распределение транскриптов, кодирующих АКІІ, у этих штаммов методами дот- и блот-гибридизации. Выяснено, что лизиновый оперон относится к группе оперонов, у которых регуляция активности генов осуществляется, скорее всего, с участием аттенюатора на уровне транскрипции.*

N. Yu. Miryuta, T. P. Pererva, T. N. Shevtchenko

Regulation of expression of *lysC* gene coding *Bacillus subtilis* aspartokinase II

Summary

The total RNA from three B. subtilis strains has been analysed. The wild and two mutant strains were grown under the repression and derepression conditions AKII transcripts distribution has been investigated by dot- and blot-hybridization. The lysin operon has been shown to belong to the operon group, the gene activity of which seems to be regulated by the transcription attenuator.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Lu Y., Shevtchenko T. N., Paulus H. Fine-structure mapping of cis-acting control sites in the *lysC* operon of *Bacillus subtilis* // FEMS Microbiol. Lett.—1992.—92.—P. 23—28.
2. Shevtchenko T. N., Timashova H. O., Aleksieva Z. M. Mutants of *Bacillus subtilis* resistant to S-(2-aminoethyl)-L-cysteine // Генетика.—1989.—25, N 11.—P. 1937—1945.
3. Spizizen J. Transformation of biochemically deficient strain of *Bac. subtilis* by deoxyribonuclease // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1958.—44.—P. 1072.
4. Cryczan T. J., Grandi G., Hahn J., Dubnau D. Conformational alteration of mRNA structure and the posttranscriptional regulation of erythromycin-induced drug resistance // Nucl. Acids Res.—1980.—8, N 24.—P. 6081—6072.
5. Новое в клонировании ДНК. Методы.—М.: Мир, 1989.—367 с.
6. Манятис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—479 с.
7. Lehrach H., Diamod D., Wozney J. M., Boedtker H. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination // Biochemistry.—1977.—16, N 21.—P. 4743—4751.
8. Chen N. Y., Jiang S. Q., Klein D. A., Paulus H. Organization and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* diaminopimelate operon, a cluster of genes encoding the first three enzymes of diaminopimelate synthesis and dipicolinate synthase // J. Biol. Chem.—1993.—268.—P. 9448—9465.
9. Льюин Б. Гены.—М.: Мир, 1987.—544 с.