

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ Rap-Phr ПЛАЗМИДЫ pBS72 ПРИРОДНЫХ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*

© 2023 г. А. С. Гуринович^{а, *}, М. А. Титок^{а, **}

^аКафедра микробиологии, биологический факультет, Белорусский государственный университет,
Минск, 220030 Республика Беларусь

*e-mail: nastia.gurinovich96@gmail.com

**e-mail: m_titok@bsu.by

Поступила в редакцию 08.04.2023 г.

После доработки 26.05.2023 г.

Принята к публикации 28.05.2023 г.

В результате проведенного исследования установлено, что сигнальная система чувства кворума Rap–Phr плазмиды pBS72 обладает функциональными особенностями. Показано филогенетическое родство фосфатазы Rap, кодируемой плазмидой pBS72, с гомологичными полипептидами RapP и RapI, детерминируемыми плазмидой pBS32 (идентичность составила 68.4%) и конъюгативным транспозоном ICEBs1 (идентичность составила 36.9%). Подобно филогенетически родственным фосфатазам исследуемый белок Rap негативно влиял на процесс споруляции. В отличие от известных сигнальных систем, выявлено влияние белков Rap–Phr на жизнеспособность плазмидо-державших донорных бактерий при конъюгационном переносе плазмиды pBS72 в изогенной системе скрещивания. При нарушении генов *rap–phr* через 3 и 4 ч скрещивания количество жизнеспособных клеток донора с мутантной плазмидой уменьшалось в 10 раз, а через 24 ч скрещивания — в 100 раз. При этом количество образующихся трансконъюгантов практически не менялось. Полученные результаты являются основой для изучения механизмов, обеспечивающих влияние внехромосомных генетических элементов на содержащих их донорных бактерий, обеспечивающих распространение pBS72-подобных плазмид в природной среде обитания.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, плазида, Rap-фосфатаза, Phr-феромон, спорообразование, конъюгационный перенос, компетентность

DOI: 10.31857/S0026365623600189, **EDN:** KXAQMP

Повсеместно распространенные бактерии *Bacillus subtilis* широко используются в биотехнологии в качестве продуцентов ферментов, антибиотиков, стимуляторов роста растений и животных (Harwood et al., 2018). Большой практический и теоретический интерес представляют хромосомные и внехромосомные генетические структуры данных микроорганизмов, определяющие их способность адаптироваться к стрессовым факторам внешней среды. В первую очередь, это генетические системы, обеспечивающие процессы клеточной дифференцировки (в частности, образование спор и биопленок) и горизонтального переноса генов посредством трансформации и конъюгации (Neiditch et al., 2017). Ключевая роль в регуляции этих процессов принадлежит феромонам, которые координируют экспрессию генов и поведение клеток при возрастании плотности бактериальной популяции с помощью механизма, известного как чувство кворума. Наиболее распространенной у бактерий *B. subtilis* является сигнальная си-

стема Rap–Phr, представленная Rap-фосфатазой и Phr-феромоном. Гены, кодирующие данные белки, как правило, образуют одну транскрипционную единицу (ген *phr* расположен за геном *rap* и частично с ним перекрывается) и имеют хромосомную и внехромосомную локализацию (Gallegos-Monterrosa et al., 2021). Основную функциональную роль в данной системе выполняют цитоплазматические Rap-фосфатазы, являющиеся негативными регуляторами многих клеточных процессов. В частности, они опосредованно подавляют процессы, определяющие компетентность (попадание чужеродной ДНК путем трансформации), образование биопленок и спор (Mirouze et al., 2013). При достижении высокой плотности бактериальной популяции регуляторная активность Rap-фосфатаз подавляется специфическими феромонами Phr. Первоначально белки Phr синтезируются в клетке в неактивной форме, экспортируются во внеклеточное пространство, расщепляются с образованием зрелых пептидов из пяти–шести аминокислот и

импортируются обратно в клетку (Neiditch et al., 2017). Связываясь с соответствующей Rap-фосфатазой, они подавляют ее функциональную активность (Gallegos-Monterrosa et al., 2021). Отличительной особенностью системы Rap–Phr бактерий рода *Bacillus* является ее избыточность. Данные белки кодируются большим числом генов (в среднем 11 копий генов *rap–phr* на геном *B. subtilis*), многие из которых обладают сходной функциональной активностью (Even-Tov et al., 2016). Например, фосфатазы RapA, B, E, H, J опосредованно инактивируют ключевой транскрипционный фактор Spo0A, влияющий на все процессы клеточной дифференцировки (компетентность, образование биопленок, “каннибализм” и спорообразование). Фосфатазы RapC, D, F, H, K негативно регулируют активность регуляторного белка ComA, необходимого для поглощения чужеродной ДНК путем трансформации. Негативная регуляция белка DegU, определяющего компетентность и образование биопленок, осуществляется фосфатазой RapG (Mirouze, Dubnau, 2013; Bendori et al., 2015; Neiditch et al., 2017). Предполагается, что такая избыточная регуляция ключевых факторов транскрипции Spo0A, ComA и DegU обеспечивает гетерогенность клеток в бактериальной популяции и, как следствие, быструю адаптацию в изменяющихся условиях внешней среды (Gallegos-Monterrosa et al., 2021). В этом плане весьма показательным является клеточный состав биопленок, формирующихся в стационарной фазе роста. Часть клеток активно синтезируют белки и экзополисахариды, образующие матрикс биопленки, другие соединяются в неподвижные цепочки. Некоторые — выделяют летальные токсины, разрушающие клетки, тем самым обеспечивая часть бактериальной популяции питательными веществами и замедляя спорообразование (“каннибализм”). И, наконец, часть клеток трансформируется в спору, защищающую их от перепада температур, высыхания, ионизирующего излучения и других стрессовых факторов (Lopez et al., 2009; Mirouze, Dubnau, 2013).

Не меньший интерес представляют сигнальные системы Rap–Phr мобильных генетических элементов (плазмид, транспозонов, бактериофагов). Подобно Rap-белкам, кодируемым хромосомными генами, они подавляют компетентность и спорообразование (например, Rap60-Phr60 плазмиды pTA1060) (Boguslawski et al., 2015), образование спор и биопленок (например, RapP-PhrP плазмиды pBS32) (Bendori et al., 2015). В то же время Rap-фосфатаза, синтез которой определяется плазмидой pLS20 и транспозоном ICEBs1, обладает противоположным действием. Она опосредованно активирует конъюгационный перенос данных мобильных генетических элементов (Singh et al., 2013; Neiditch et al., 2017). Гомологичные белки, детерминированные некоторыми уме-

ренными бактериофагами бактерий рода *Bacillus*, активирует литический цикл их развития (Erez et al., 2017).

Ранее в клетках бактерий *B. subtilis* была выявлена плазида pBS72, характеризующаяся уникальной системой конъюгации, в составе которой присутствовали детерминанты, определяющие синтез белков Rap–Phr (*orf130–orf131*). Было установлено, что плазмиды, подобные pBS72, широко распространены в природной среде обитания и выявляются в клетках бактерий *B. subtilis*, выделенных из разных географических регионов. Отличительной особенностью плазмиды pBS72 являлась независимость частоты ее конъюгационного переноса от плотности бактериальной популяции (Gurinovich et al., 2022). Это обосновывает необходимость изучения роли данных внехромосомных генетических элементов в жизнедеятельности содержащих их бактерий, а также механизмов их распространения в природных популяциях. В этом плане определенный интерес представляет сигнальная система Rap–Phr.

В связи с этим, целью настоящей работы являлся молекулярно-генетический и функциональный анализ сигнальной системы Rap–Phr плазмиды pBS72 бактерий *B. subtilis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы, плазмиды и условия культивирования бактерий. В работе использовались коллекционные штаммы *B. subtilis* 168, *E. coli* TG1, *E. coli* XL1-Blue, а также плазида pMTL21C, плазида pCB16, определяющая устойчивость к тетрациклину, плазида pKS1, определяющая устойчивость к канамицину и эритромицину и маркированная геном эритромицинрезистентности плазида pBS72 (Gurinovich, Titok, 2020). Бактерии выращивали при 37°C в полноценной среде LB (Molecular Biological Methods..., 1991). Агаризованные среды содержали 1.5% агара, источником углерода служила глюкоза в концентрации 0.2%. В работе использовали коммерческие препараты антибиотиков: ампициллина — 100 мкг/мл, хлорамфеникола — 10 мкг/мл, эритромицина — 10 мкг/мл, стрептомицина — 50 мкг/мл, тетрациклина — 25 мкг/мл и канамицина — 50 мкг/мл. Изопропилтио-β-D-галактозид (IPTG) и 5-бромо-4-хлоро-3-индоил-β-D-галактопиранозид (X-Gal) производства “ThermoScientific” (EC) готовили в соответствии с рекомендациями изготовителя и использовали в концентрации 0.5 мМ и 50 мкг/мл соответственно.

Выделение и анализ ДНК. Тотальную ДНК выделяли саркозиевым методом (te Riele et al., 1986). Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора реактивов Fast-n-EasyPlasmidMini-PrepKit (“JenaBioscience”, Германия). Рестрикционный анализ проводили с использованием ферментов

производства “ThermoScientific” (ЕС), согласно рекомендациям производителя. Электрофоретический анализ ДНК осуществляли общепринятыми методами, приведенными в руководстве (Sambrook et al., 1989). Размер фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в агарозном геле, в качестве реперной ДНК использовали GeneRuler™ DNA LadderMix (“ThermoScientific”, ЕС).

Амплификация и клонирование. Для амплификации использовали Phusion HF ДНК-полимеразу (“ThermoScientific”, ЕС) и праймеры производства ОДО “Праймтех”. Реакционная смесь для ПЦР (50 мкл) содержала около 100 нг ДНК-матрицы, 0,2 ммоль/л каждого дНТФ, 0,5 мкмоль/л каждого праймера, 2,5 ед. ДНК-полимеразы и соответствующий буфер.

Для амплификации фрагмента гена *rap* плазмиды pBS72 размером 498 п.н. использовали праймеры Frap (5'-AGA GAA ATG GTT CAA TGC CAG-3') и Rrap (5'-GAA CTC AGC GAC TGA AAT GG-3') при режиме: 98°C – 30 с (1 цикл); 98°C – 10 с, 58°C – 30 с, 72°C – 15 с (25 циклов); 72°C – 3 мин (1 цикл).

Полученный продукт ПЦР очищали с помощью набора AgaroseGelExtractionKit (“JenaBioscience”, Германия). Очищенный продукт лигировали с суицидальным вектором pMTL21C, предварительно обработанным рестриктазой *Sma*I. С использованием ПЦР и рестрикционного анализа установлено, что фрагмент гена *rap* клонирован в состав вектора в ориентации 3' → 5' относительно промотора *lac*-оперона.

Введение плазмид в клетки бактерий. Трансформацию бактерий *E. coli* и *B. subtilis* осуществляли согласно методам, приведенным в работах (Sambrook et al., 1989; Molecular Biological Methods..., 1991).

Отбор плазмиды pBS72 с инактивированными генами *rap*–*phr*. Гибридной плазмидой pMTL21C с фрагментом гена *rap* трансформировали бактерии *B. subtilis* 168, содержащие плазмиду pBS72. Поскольку вектор pMTL21C не может копироваться в клетках бактерий этой таксономической группы, устойчивость к хлорамфениколу могла возникнуть за счет гомологичной рекомбинации между идентичными последовательностями гена *rap*, локализованными в плазмиде pBS72 и векторе pMTL21C. Интеграцию гибридного вектора pMTL21C, содержащего фрагмент гена *rap*, в состав плазмиды pBS72, устанавливали с помощью полимеразной цепной реакции. С использованием праймеров M13F (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTG-3') и M13R (5'-CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC-3'), отжигающихся на последовательности вектора pMTL21C, и, соответственно, праймеров Rrap-out (5'-GCT GCT CTA TCT GCC ATT TTG-3') и Frap-out (5'-GAA CTG TTG GAT GAT ACG GC-3'),

комплементарно связывающихся вне области встраивания гибридной плазмиды (соответственно, 3'-конец гена *phr* и 5'-конец гена *rap*), были получены фрагменты искомого размера 738 и 761 п.н. при режиме амплификации: 94°C – 5 мин (1 цикл); 94°C – 30 с, 52°C – 30 с, 72°C – 45 с (25 циклов); 72°C – 3 мин (1 цикл).

Скрещивание бактерий. В качестве донорных использовали бактерии *B. subtilis* 168, содержащие маркированную геном эритромицинрезистентности плазмиду pBS72 и бактерии *B. subtilis* 168, содержащие плазмиду pBS72 с инактивированными генами *rap*–*phr*, детерминирующую устойчивость к хлорамфениколу. В качестве реципиентов использовали штамм *B. subtilis* 168 устойчивый к стрептомицину (спонтанный мутант). Культуру донора и реципиента в логарифмической фазе роста смешивали (1 : 1) и скрещивали в жидкой среде LB с аэрацией в течение 1, 2, 3, 4 или 24 ч с последующим высевом на селективные среды. Для установления переноса исходной и мутантной плазмид использовали полноценный агар, содержащий стрептомицин и, соответственно, эритромицин или хлорамфеникол. На основании трех независимых экспериментов проводили статистическую обработку данных с использованием программы Microsoft Excel. Достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента (*t*) для принятого уровня значимости ($p \leq 0.05$). Статистически достоверными считались различия между показателями при $p \leq 0.05$.

Эффективность спорообразования определяли согласно методу, описанному в работе (Gastelum et al., 2020). Для оценки эффективности спорообразования ночные культуры разводили до ОП₆₀₀ нм равной 0.1 и инкубировали в течении 48 ч. Эффективность спорообразования определяли в процентах путем соотношения количества термоустойчивых бактерий, подвергавшихся термической обработке при 80°C в течение 20 мин к общему количеству жизнеспособных бактерий. На основании трех независимых экспериментов проводили статистическую обработку данных с использованием программы Microsoft Excel. Достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента (*t*) для принятого уровня значимости ($p \leq 0.05$). Статистически достоверными считались различия между показателями при $p \leq 0.05$.

Биоинформатический анализ. Для анализа нуклеотидных последовательностей генов и детерминируемых ими полипептидов плазмиды pBS72 (регистрационный номер в ГенБанке NCBI – KX711616), плазмиды pLS20 (регистрационный номер в ГенБанке NCBI – AB615352), плазмиды pBS32 (регистрационный номер в ГенБанке NCBI – KF365913) и транспозона ICEBs1 (реги-

страционный номер в ГенБанке NCBI — NC_000964 (529505–548557) использовали программу BLASTN2.10.0 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Построение филогенетических деревьев полноразмерных аминокислотных последовательностей белков Rap и Phg осуществляли методом ближайших соседей (1000 бутстрепов) в программе MEGA7.

Аминокислотные последовательности гомологичных белков выравнивали с помощью программы ClustalOmega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/commontools/help/index.html?tool=clustalo>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было установлено, что плазмиды, подобные pBS72 выявляются в клетках бактерий рода *Bacillus*, выделенных на территории Беларуси, Пакистана, Китая, Нидерландов, Индии, США, Австралии и Южной Кореи (Gurinovich, Titok, 2020). На основании молекулярно-генетического и функционального анализа отдельных детерминант *tra*-области система конъюгации плазмиды pBS72 отнесена к новой систематической группе Mpf₅ (Gurinovich, Titok, 2022). В составе плазмиды pBS72 локализованы детерминанты, определяющие синтез белков Rap–Phg (*orf130–orf131*). Учитывая функциональную значимость сигнальной системы Rap–Phg для процессов жизнедеятельности бактерий *B. subtilis*, представлялось важным изучить роль данных белков, кодируемых плазмидой pBS72. Для этого на первом этапе был проведен филогенетический анализ данных полипептидов в сравнении с известными белками бактерий *B. subtilis*, синтез которых детерминирован генами хромосомного (типы A, B, C, D, E, F, H, I, J и K) и внехромосомного происхождения (Rap60–Phr60 плазмиды pTA1060, RapP–PhrP плазмиды pBS32, а также Rap–Phg плазмиды pLS20). В результате проведенного анализа было установлено, что сигнальные системы бактерий *B. subtilis* образуют три филогенетические группы, отличающиеся по набору, входящих в них белков (рис. 1). При этом исследуемая Rap-фосфатаза проявляла наибольшее сходство с гомологичными белками RapP (идентичность составила 68.38%) и RapI (идентичность составила 36.91%), кодируемыми, соответственно, неконъюгативной плазмидой pBS32 и транспозоном ICEBs1. Данная филогенетическая группа, включающая белки Rap только мобильных генетических элементов, не обнаруживала близкого родства с гомологичными полипептидами, кодируемыми плазмидами pTA1060 и pLS20, проявляющими сходство с гомологичными белками хромосомного происхождения (рис. 1). Следует отметить, что для белков RapP и RapI достаточно полно охарактеризованы функциональные свойства. В частности, показано, что белок RapI опосредованно активировал

конъюгационный перенос транспозона ICEBs1 и ингибировал спорообразование. Подобные эффекты наблюдали и при множественных повреждениях хромосомной ДНК, индуцирующих SOS ответ (например, после обработки клеток митомицином C), при котором белок RecA проявлял протеазную активность. В обоих случаях происходила активация протеазы ImmA, которая расщепляла репрессор ImmR, подавляющий транскрипцию генов, продукты которых необходимы для конъюгационного переноса транспозона ICEBs1, и гена *devI*, кодирующего репрессор регуляторного белка Spo0A, играющего ключевую роль в клеточной дифференцировке (Neiditch et al., 2017). Для белка RapP достаточно подробно изучено негативное влияние на формирование биопленок, а также установлена роль в подавлении спорообразования (Bendori et al., 2015).

Все известные Rap-белки бактерий *B. subtilis* имеют достаточно консервативную структуру, представленную тремя спиральными участками на N-конце аминокислотной последовательности, образующими поверхность связывания с белками Spo0F и ComA, и тетраатрикопептидными повторами (TPR) на C-конце, определяющими взаимодействие с феромоном Phg. Для белков RapF и RapH на основании функционального анализа выявлены ключевые аминокислоты, входящие в состав данных функционально значимых участков (Baker, Neiditch, 2011; Parashar et al., 2011). Однако сравнительный анализ большого числа белков Rap бактерий рода *Bacillus* позволил установить, что аминокислотные остатки, определяющие их связывание с мишенью ComA, не являются консервативными, несмотря на их способность взаимодействовать с данным регуляторным белком. Напротив, аминокислотные остатки, определяющие взаимодействие с регуляторным белком Spo0F, высоко консервативны и присутствуют в охарактеризованных белках Rap, независимо от того, обеспечивают ли они дефосфорилирование Spo0F или нет (Even-Tov et al., 2016).

Несмотря на высокую специфичность взаимодействия фосфатаз Rap с белками Phg, достаточно консервативными являются домены, определяющие их связывание. Для белка RapP выявлена замена аминокислоты в одном из таких доменов (в положении 235 аспарагин заменен на треонин). В результате белок RapP утратил способность взаимодействовать с феромоном Phg и, как следствие, полностью ингибировал образование биопленок (Bendori et al., 2015).

Сравнительный анализ аминокислотной последовательности Rap белка, кодируемого плазмидой pBS72, с близкородственными (RapP и RapI) и хорошо изученными в этом отношении (RapH и RapF) выявил те же закономерности, которые были установлены при анализе большого числа

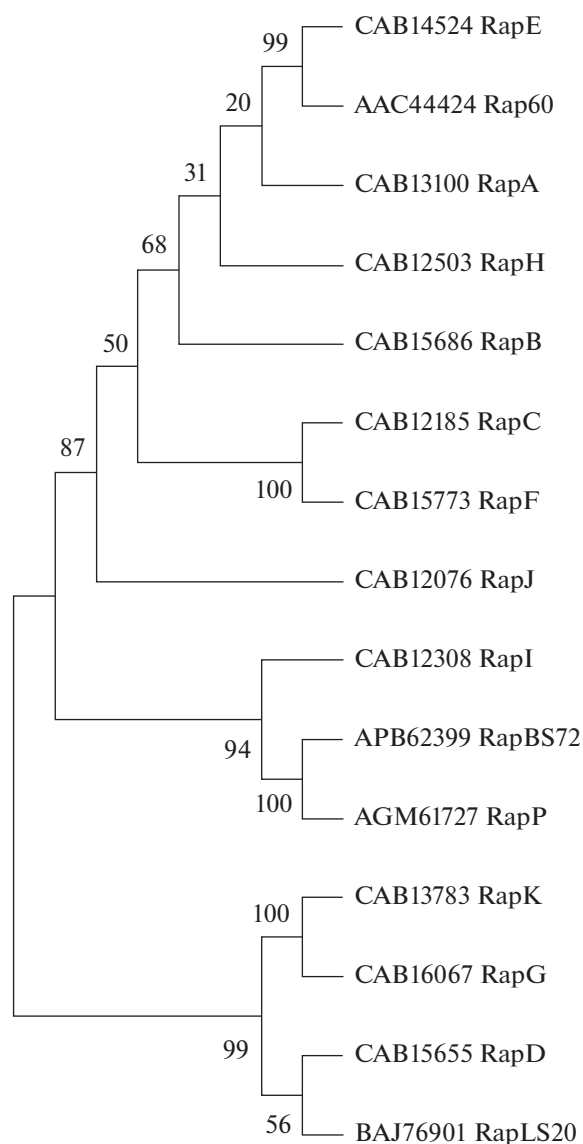


Рис. 1. Филогенетическое дерево белков Rap бактерий *B. subtilis*.

фосфатаз бактерий *B. subtilis*. Данные белки содержали ряд значимых несинонимических замен в функциональных доменах, влияющих на компетентность. В то же время аминокислотные последовательности, играющие ключевую роль в процессах спорообразования, характеризовались большим сходством и отличались отдельными функционально незначимыми заменами (Even-Tov et al., 2016). Кроме того, белок Rap, кодируемый плазмидой pBS72, не отличался от других белков по ключевым аминокислотам, входящим в участки связывания с феромоном Phr (за исключением RapP) (рис. 2).

Анализ феромона, кодируемого исследуемой плазмидой, позволил установить, что он входил в одну филогенетическую группу с белками PhrP

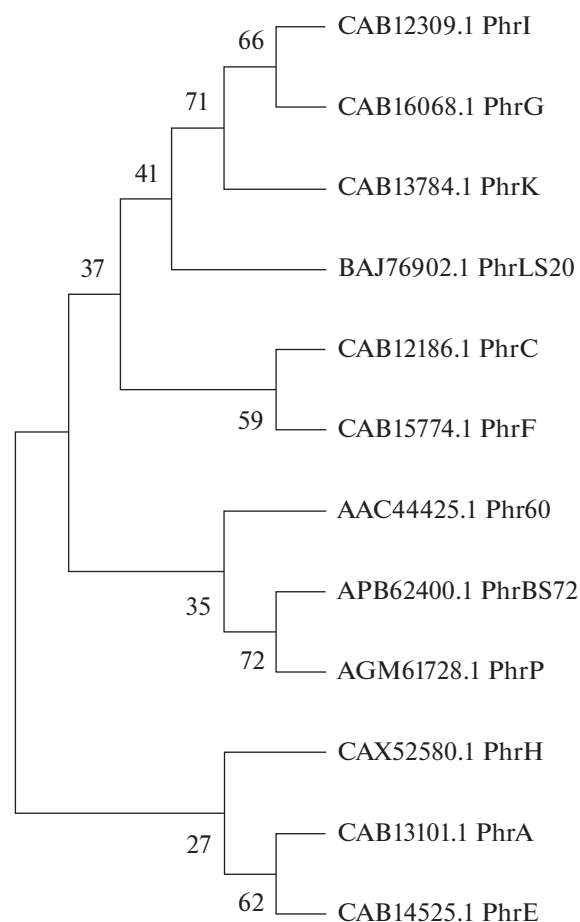


Рис. 2. Филогенетическое дерево белков Phr бактерий *B. subtilis*.

(плазмида pBS32) и Phr60 (плазмида pTA1060) и содержал, соответственно, 44 и 43% идентичных аминокислот, тогда как с белком PhrI имел лишь отдаленное филогенетическое родство (рис. 3). Следует отметить, что основная роль феромонов заключается в подавлении активности соответствующих Rap-фосфатаз за счет специфического взаимодействия (специфичность является ключевым фактором, определяющим тонкую регуляцию экспрессии генов), а функциональные свойства сигнальной системы Rap–Phr определяются Rap-белками.

Поскольку биоинформатический анализ не позволяет в полной мере судить о функциональной значимости белков, было изучено влияние мутации в генах *rap–phr* плазмиды pBS72 на эффективность спорообразования, конъюгационный перенос и компетентность, т.е. способность воспринимать чужеродную ДНК.

В результате установлено, что при наличии исходной плазмиды pBS72 в клетках бактерий *B. subtilis* эффективность спорообразования снижалась в 4 раза. Присутствие в клетках мутантного плазмиды

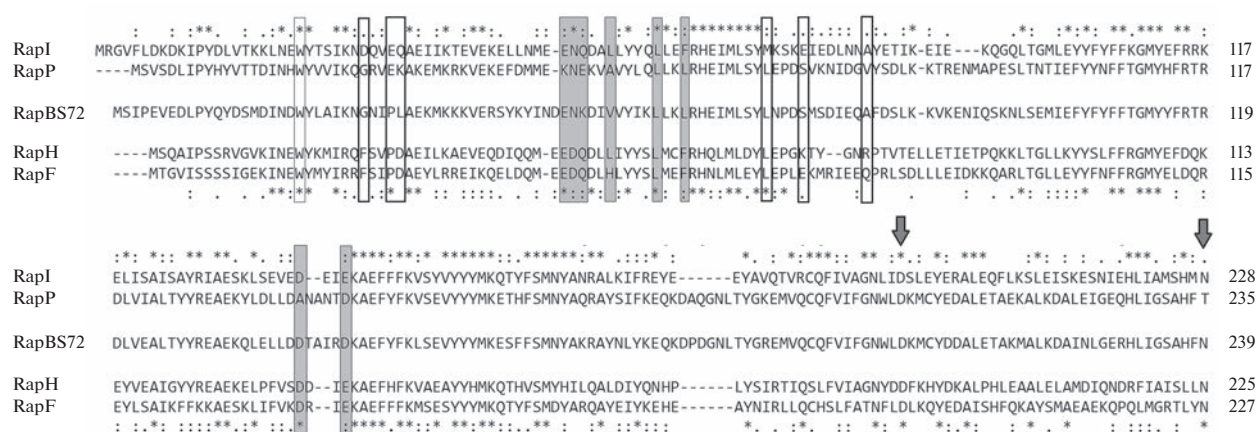


Рис. 3. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей Rap-фосфатаз плазмид pBS32 (RapP), pBS72 (RapBS72), транспозона ICEBs1 (RapI) и хромосомных белков RapH и RapF бактерий *B. subtilis* 168. Рамками выделены консервативный остаток триптофана (W) и каталитические центры, определяющие взаимодействие с белком ComA. Серым цветом обозначены каталитические центры, участвующие в дефосфорилировании SpoOF. Стрелками обозначены аминокислоты — места связывания с феромоном Phr; “*” — функционально значимые несинонимические замены; “:” — функционально незначимые замены. Функционально значимые аминокислоты указаны согласно данным, приведенным в работах (Baker, Neiditch, 2011; Parashar et al., 2011).

мидного репликона не приводила к полному восстановлению спорообразования, однако эффективность этого процесса увеличивалась в 2 раза (рис. 4). Полученные данные позволяют предполагать, что процесс подавления спорообразования в присутствии плазмиды pBS72 обеспечивается продуктами других генетических детерминант, входящих в ее состав.

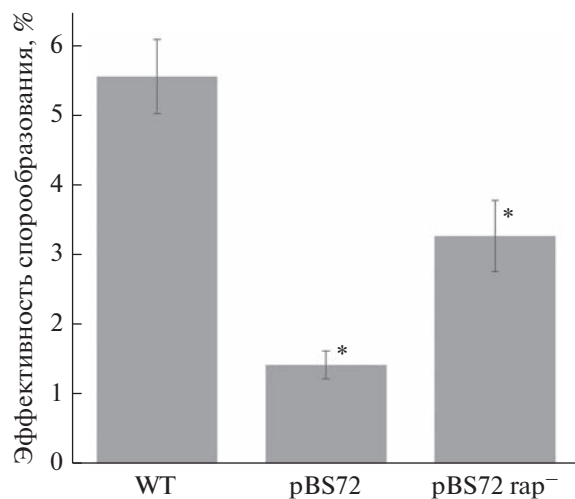


Рис. 4. Эффективность спорообразования бесплазмидных бактерий *B. subtilis* 168(WT) и содержащих исходную (pBS72) и мутантную (pBS72 rap⁻) плазмиду pBS72. “*” — Отличия между бесплазмидным штаммом и вариантом содержащим исходную или мутантную плазмиду статистически достоверны ($p = 0.017$ и $p = 0.002$ соответственно).

Показано, что мутация в генах *rap-phr* не влияла на способность плазмидсодержащих бактерий воспринимать чужеродную ДНК (использовали плазмиду pBC16, выделенную из клеток *B. subtilis* 168, и плазмиду pKS1, выделенную из клеток *E. coli* TG1) (табл. 1). Следовательно, отсутствие компетентности обусловлено детерминантами, не связанными с продуктами генов *rap-phr*. Необходимо отметить, что для изученных крупных плазмид *B. subtilis* (pBS32 и pLS20) характерно присутствие генов, не связанных с системой *rap-phr*, ингибирующих компетентность и, следовательно, препятствующих попаданию чужеродной ДНК в клетки путем трансформации (Singh et al., 2012; Burton, Kearns, 2020). Репрессоры компетентности достаточно широко распространены среди бактерий группы *Bacillus* и, помимо внехромосомной, имеют хромосомную локализацию (Burton, Kearns, 2020).

Абсолютно неожиданными оказались результаты, полученные при анализе конъюгационного переноса исходной и мутантной плазмиды pBS72 между бактериями *B. subtilis* 168. Для скрещивания в качестве донорных использовали штаммы *B. subtilis* 168, содержащие исходную плазмиду и вариант плазмиды с мутацией в генах *rap-phr*. В качестве реципиентов использовали спонтанный стрептомицинрезистентный вариант бактерий *B. subtilis* 168. Скрещиваемые бактерии в логарифмической фазе, содержащие примерно одинаковое количество жизнеспособных клеток, смешивали (1 : 1) и через определенные промежутки времени высевали на селективные среды для определения количества клеток донора, реципиента и транс-конъюгантов. Как видно из данных, приведенных

Таблица 1. Частота трансформации плазмид в бактерии *B. subtilis* 168

Трансформируемый штамм	Частота трансформации плазмиды	
	pBC16	pKS1
<i>B. subtilis</i> 168 без плазмиды	2.4×10^3	2.1×10^2
<i>B. subtilis</i> 168, содержащие исходную pBS72	—	—
<i>B. subtilis</i> 168, содержащие мутантную pBS72	—	—

Примечание. “—” — отсутствие трансформантов. Частоту трансформации определяли в пересчете на 1 мкг плазмидной ДНК.

Таблица 2. Частота переноса исходной и мутантной плазмиды pBS72 между бактериями *B. subtilis* 168

Время, ч	Исходная плазида pBS72			Мутантная плазида pBS72		
	количество жизнеспособных клеток, КОЕ/мл			количество жизнеспособных клеток, КОЕ/мл		
	донор	реципиент	трансконъюганты**	донор	реципиент	трансконъюганты**
1	$(3.1 \pm 0.01) \times 10^6$	$(3.5 \pm 2.1) \times 10^8$	$(9.7 \pm 1.1) \times 10^4$	$(6.1 \pm 5.34) \times 10^5$	$(3.8 \pm 1.0) \times 10^8$	$(4.1 \pm 1.7) \times 10^4$
2	$(7.8 \pm 0.8) \times 10^6$	$(4.8 \pm 3.3) \times 10^8$	$(9.3 \pm 3.5) \times 10^4$	$(5.4 \pm 4.7) \times 10^6$	$(4.9 \pm 0.5) \times 10^8$	$(3.8 \pm 0.9) \times 10^4$
3	$(1.5 \pm 0.6) \times 10^{7*}$	$(3.3 \pm 2.1) \times 10^8$	$(9.9 \pm 0.6) \times 10^4$	$(1.2 \pm 0.27) \times 10^{6*}$	$(5.8 \pm 3.6) \times 10^8$	$(2.5 \pm 0.4) \times 10^4$
4	$(6.8 \pm 0.3) \times 10^{6*}$	$(6.2 \pm 3.9) \times 10^8$	$(5.5 \pm 7.5) \times 10^4$	$(4.1 \pm 3.3) \times 10^{5*}$	$(2.1 \pm 1.8) \times 10^9$	$(2.5 \pm 3.1) \times 10^4$
24	$(2.0 \pm 1.4) \times 10^{6*}$	$(4.3 \pm 4.4) \times 10^8$	$(1.0 \pm 1.3) \times 10^4$	$(1.6 \pm 1.4) \times 10^{4*}$	$(6.6 \pm 5.9) \times 10^8$	$(3.1 \pm 2.3) \times 10^4$

* Различия между жизнеспособностью клеток доноров, содержащих исходную и мутантную плазмиду, через 3, 4 и 24 ч статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

** Различия между количеством клеток трансконъюгантов, образующихся при переносе исходной и мутантной плазмиды, статистически не достоверны. Представленные результаты получены на основании трех независимых экспериментов.

в табл. 2, с течением времени количество клеток донора с исходной плазмидой не изменялось. В то же время через 3 и 4 ч скрещивания количество жизнеспособных клеток донора с мутантной плазмидой уменьшалось в 10 раз, а через 24 ч скрещивания — в 100 раз (различия статистически достоверны, $p < 0.05$). При этом количество образующихся трансконъюгантов практически не изменялось (различия статистически не достоверны). Следует отметить, что культивирование донорных бактерий, содержащих исходную или мутантную плазмиду, в аналогичных условиях в отсутствии штамма реципиента не влияло на их жизнеспособность и стабильность наследования внехромосомных генетических элементов (количество жизнеспособных клеток не изменялось, и плазмиды наследовались с частотой 100%). Следовательно, при скрещивании бактерий *B. subtilis* 168 наличие в клетках донора плазмиды pBS72 с нарушенной системой Rap—Phg приводило к их гибели, которая достоверно увеличивалась через 24 ч. Следует отметить, что только для двух конъюгативных мобильных генетических элементов *B. subtilis* (конъюгативный транспозон ICEBs1 и конъюгативная плазида pLS20) охарактеризованы сигнальные системы чувства кворума Rap—Phg, которые отличались между собой функциональной активностью. Rap-белок, кодируемый плазмидой pLS20, активировал ее конъюгационный перенос в логарифмической фазе роста за счет непосред-

ственного связывания белка репрессора Rco и не влиял на образование спор (Singh et al., 2013). В то же время фосфатаза RapI, кодируемая транспозоном ICEBs1, выполняла двойную функцию. Она опосредованно активировала перенос ICEBs1 (активировала протеазу ImmA, расщепляющую репрессор конъюгационного переноса ImmR) во время стационарной фазы роста и одновременно ингибировала характерную для этой стадии инициацию процесса спорообразования (Neiditch et al., 2017). При этом влияния сигнальной системы Rap—Phg данных конъюгативных мобильных элементов на жизнеспособность содержащих их бактерий не отмечено.

Тем не менее, известно, что сигнальные системы Rap—Phg, кодируемые хромосомными генами, влияют на функциональную активность транскрипционного фактора SpoOA (изменяют количество фосфорилированного SpoOA~P в клетке), который при определенных концентрациях активирует процессы образования компетентных клеток, биопленок, синтез токсинов (“каннибализм”) и спорообразование. При этом “каннибализм”, сопровождающийся гибелью клеток в бактериальной популяции, рассматривается как механизм, предотвращающий или задерживающий спорообразование (Gonzalez-Pastor et al., 2003). Выявленный эффект гибели донорных клеток, содержащих плазмиду pBS72 с нару-

шенными генами *rap—phr*, возможно также связан с процессом, подавляющим образование спор. Поскольку в присутствии исходной плазмиды спорообразование подавляется и лишь частично восстанавливается при нарушении генов *rap—phr*, логично предположить, что отсутствие спор является необходимым условием для конъюгационного переноса плазмиды pBS72, и, следовательно, в ее геноме присутствуют генетические детерминанты, определяющие синтез белков, предотвращающих их образование. Следует отметить, что гибель клеток наблюдали для бактерий, содержащих неконъюгативную плазмиду pBS32 (содержит филогенетически близкую плазмиде pBS72 систему RapP—PhrP), после обработки интеркалирующими красителями, повреждающими данный внехромосомный генетический элемент. Гибель клеток происходила за счет усиления экспрессии плазмидных генов, кодирующих токсины (Parashar et al., 2013). При конъюгационном переносе плазмиды pBS72 в область *oriT* вносится однонитевой разрыв, с последующим переносом вытесняемого 5'-конца молекулы в реципиентную клетку. Этот процесс, безусловно, влияет на структуру плазмидной ДНК и, возможно, активирует систему, приводящую к гибели содержащих ее бактерий в отсутствие функционально активной сигнальной системы Rap—Phr (через 24 ч скрещивания число жизнеспособных клеток донора снижалось в 100 раз). При этом количество клеток трансконъюгантов, образующихся в скрещиваниях с использованием в качестве донора бактерий, содержащих исходный и мутантный варианты плазмиды pBS72, не изменялось (табл. 2). Следовательно, конъюгационная система плазмиды pBS72, в отличие от известных (транспозон ICEBs1 и плазида pLS20), не подвержена позитивной регуляции Rap-фосфатазой. Тем не менее, сигнальная система Rap—Phr играет важную роль в горизонтальном переносе плазмиды pBS72 за счет подавления спорообразования и поддержания жизнеспособности бактерий доноров при ее конъюгационном переносе. Последнее свойство является уникальным, и для его объяснения необходимы дополнительные исследования.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что, подобно филогенетически родственным белкам RapP (идентичность составила 68.4%) и RapI (идентичность составила 36.9%), кодируемым, соответственно, плазмидой pBS32 и конъюгативным транспозоном ICEBs1, исследуемая Rap-фосфатаза негативно влияла на процесс споруляции. В отличие от известных сигнальных систем, выявлено влияние продуктов генов *rap—phr* на жизнеспособность плазмидсодержащих донорных бактерий при конъюгационном переносе плазмиды pBS72 в изогенной системе скрещивания. При нарушении генов *rap—phr* через 3 и 4 ч скрещивания количество жизнеспособных

клеток донора с мутантной плазмидой уменьшалось в 10 раз, а через 24 ч скрещивания — в 100 раз. При этом количество образующихся трансконъюгантов практически не менялось. Полученные результаты являются основой для изучения механизмов, обеспечивающих влияние внехромосомных генетических элементов на содержащих их донорных бактерий, обеспечивающих распространение pBS72-подобных плазмид в природной среде обитания.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнялась при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б21-142) и Государственной программы научных исследований (НИР № 3.6.2).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гуринович А.С., Титок М.А. Молекулярно-генетический и функциональный анализ плазмиды pBS72 природных бактерий *Bacillus subtilis* // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 646—657.
<https://doi.org/10.31857/S0026365620060063>
- Gurinovich A.S., Titok M.A. Molecular genetic and functional analysis of the pBS72 plasmid from *Bacillus subtilis* environmental isolates // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 660—669.
<https://doi.org/10.1134/S0026261720060065>
- Гуринович А.С., Титок М.А. Молекулярно-генетический и функциональный анализ системы конъюгации плазмиды pBS72 природных бактерий *Bacillus subtilis* // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 451—465.
<https://doi.org/10.31857/S0026365622300188>
- Gurinovich A.S., Titok M.A. Molecular genetic and functional analysis of the conjugation system of the pBS72 plasmid from *Bacillus subtilis* environmental isolates // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. № 4. P. 395—408.
<https://doi.org/10.1134/S002626172230018X>
- Baker M.D., Neiditch M.B. Structural basis of response regulator inhibition by a bacterial anti-activator protein // PLoS Biol. 2011. V. 9. Art. e1001226.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001226>
- Beauregard P.B., Chai Y., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 1621—1630.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1218984110>

- Belas R.* When the swimming gets tough, the tough form a biofilm // *Mol. Microbiol.* 2013. V. 90. P. 1–5.
<https://doi.org/10.1111/mmi.12354>
- Bendori S.O., Pollak S., Hizi D., Eldar A.* The RapP–PhrP quorum-sensing system of *Bacillus subtilis* strain NCIB3610 affects biofilm formation through multiple targets, due to an atypical signal-insensitive allele of RapP // *J. Bacteriol.* 2015. V. 197. P. 592–602.
<https://doi.org/10.1128/JB.02382-14>
- Boguslawski K.M., Hill P.A., Griffith K.L.* Novel mechanisms of controlling the activities of the transcription factors Spo0A and ComA by the plasmid-encoded quorum sensing regulators Rap60–Phr60 in *Bacillus subtilis* // *Mol. Microbiol.* 2015. V. 96. P. 325–348.
<https://doi.org/10.1111/mmi.12939>
- Branda S.S., Chu F., Kearns D.B., Losick R., Kolter R.* A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix // *Mol. Microbiol.* 2006. V. 59. P. 1229–1238.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05020x>
- Bullock W.O., Fernandez J.M., Short J.M.* XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection // *BioTechniques*. 1987. V. 5. P. 376–378.
- Burton A.T., Kearns D.B.* The large pBS32/pLS32 plasmid of ancestral *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* 2020. V. 202. Art. e00290–20.
<https://doi.org/10.1128/JB.00290-20>
- Comella N., Grossman A.D.* Conservation of genes and processes controlled by the quorum response in bacteria: characterization of genes controlled by the quorum-sensing transcription factor ComA in *Bacillus subtilis* // *Mol. Microbiol.* 2005. V. 57. P. 1159–1174.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04749x>
- Erez Z., Steinberger-Levy I., Shamir M., Doron S., Stokar-Avihail A., Peleg Y., Melamed S., Leavitt A., Savidor A., Albeck S., Amitai G., Sorek R.* Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions // *Nature*. 2017. V. 541. P. 488–493.
<https://doi.org/10.1038/nature21049>
- Even-Tov E., Bendori S.O., Pollak S., Eldar A.* Transient duplication dependent divergence and horizontal transfer underlie the evolutionary dynamics of bacterial cell–cell signaling // *PLoS Biol.* 2016. V. 14. Art. e2000330.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000330>
- Gallegos-Monterrosa R., Christensen M.N., Barchewitz T., Koppenhofer S., Priyadarshini B., Balint B., Maroti G., Kempen P.J., Dragos A., Kovacs A.T.* Impact of Rap–Phr system abundance on adaptation of *Bacillus subtilis* // *Commun. Biol.* 2021. V. 4. P. 468.
<https://doi.org/10.1038/s42003-021-01983-9>
- Gastelum G., de la Torre M., Rocha J.* Rap protein paralogs of *Bacillus thuringiensis*: a multifunctional and redundant regulatory repertoire for the control of collective functions // *J. Bacteriol.* 2020. V. 202. Art. e00747–19.
<https://doi.org/10.1128/JB.00747-19>
- Gonzalez-Pastor J.E., Hobbs E.C., Losick R.* Cannibalism by sporulating bacteria // *Science (New York, N.Y.)*. 2003. V. 301. P. 510–513.
<https://doi.org/10.1126/science.1086462>
- Harwood C.R., Mouillon J.M., Pohl S., Arnau J.* Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group // *FEMS Microbiol. Rev.* 2018. V. 42. P. 721–738.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuy028>
- Lopez D., Vlamakis H., Losick R., Kolter R.* Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis* // *Mol. Microbiol.* 2009. V. 74. P. 609–618.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06882.x>
- Mirouze N., Dubnau D.* Chance and necessity in *Bacillus subtilis* development // *Microbiol. Spectrum*. 2013. V. 1. Art. TBS-0004-2012.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspectrum.TBS-0004-2012>
- Molecular Biological Methods for Bacillus* / Eds. Harwood C.R., Cutting S.M. N.Y.: Chichester, 1991. P. 75–174.
- Neiditch M.B., Capodagli G.C., Prehna G., Federle M.J.* Genetic and structural analyses of RRNPP intercellular peptide signaling of gram-positive bacteria // *Annu. Rev. Genet.* 2017. V. 51. P. 311–333.
<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120116-023507>
- Parashar V., Konkol M.A., Kearns D.B., Neiditch M.B.* A plasmid-encoded phosphatase regulates *Bacillus subtilis* biofilm architecture, sporulation, and genetic competence // *J. Bacteriol.* 2013. V. 195. P. 2437–2448.
<https://doi.org/10.1128/JB.02030-12>
- Parashar V., Mirouze N., Dubnau D.A., Neiditch M.B.* Structural basis of response regulator dephosphorylation by Rap phosphatases // *PLoS Biol.* 2011. V. 9. Art. e1000589.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000589>
- Rosch T.C., Golman W., Hucklesby L., Gonzalez-Pastor J.E., Graumann P.L.* The presence of conjugative plasmid pLS20 affects global transcription of its *Bacillus subtilis* host and confers beneficial stress resistance to cells // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. P. 1349–1358.
<https://doi.org/10.1128/AEM.03154-13>
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. / Eds. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. N.Y., Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 468 p.
- Serra C.R., Earl A.M., Barbosa T.M., Kolter R., Henriques A.O.* Sporulation during growth in a gut isolate of *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* 2014. V. 196. P. 4184–4196.
<https://doi.org/10.1128/JB.01993-14>
- Singh P.K., Ramachandran G., Duran-Alcalde L., Alonso C., Wu L.J., Meijer W.J.* Inhibition of *Bacillus subtilis* natural competence by a native, conjugative plasmid-encoded *comK* repressor protein // *Environ. Microbiol.* 2012. V. 14. P. 2812–2825.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02819x>
- Singh P.K., Ramachandran G., Ramos-Ruiz R., Peiro-Pastor R., Abia D., Wu L.J., Meijer W.J.* Mobility of the native *Bacillus subtilis* conjugative plasmid pLS20 is regulated by intercellular signaling // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. Art. e1003892.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003892>
- te Riele H., Michel B., Ehrlich S.D.* Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986. V. 83. P. 2541–2545.
<https://doi.org/10.1073/pnas.83.8.2541>
- Verhamme D.T., Kiley T.B., Stanley-Wall N.R.* DegU co-ordinates multicellular behaviour exhibited by *Bacillus subtilis* // *Mol. Microbiol.* 2007. V. 65. P. 554–568.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05810x>

Molecular Genetic and Functional Analysis of the Rap-Phr Signal System of the Plasmid pBS72 of *Bacillus subtilis* Isolates

A. S. Gurinovich^{1, *} and M. A. Titok^{1, **}

¹Department of Microbiology, Belarusian State University, Minsk, 220030 Belarus

*e-mail: nastia.gurinovich96@gmail.com

**e-mail: m_titok@bsu.by

Received April 8, 2023; revised May 26, 2023; accepted May 28, 2023

Abstract—The functional characteristics of the Rap-Phr quorum sensing signal system of the plasmid pBS72 were investigated. Phylogenetic relationship was revealed between Rap phosphatase coded by the plasmid pBS72 and the homologous polypeptides RapP and RapI determined by the plasmid pBS32 (68.4% identity) and the ICEBs1 conjugative transposon (36.9% identity). Similar to the phylogenetically related phosphatases, the studied Rap protein had a negative effect on sporulation. Unlike the known signal systems, Rap-Phr proteins were found to affect the viability of plasmid-bearing donor bacteria in the course of conjugative transfer of the plasmid pBS72 in the isogenic system. Impaired *rap-phr* genes resulted in a 10-fold decrease in the number of viable donor cells with the mutant plasmid after 3 and 4 h, and in a 100-fold decrease after 24 h. The number of formed transconjugants remained almost the same. Our results provide the basis for investigation of the mechanisms responsible for the effect of extrachromosomal genetic elements on the donor bacteria, providing for the propagation of the pBS72-like plasmids in natural environments.

Keywords: *B. subtilis*, plasmid, Rap phosphatase, Phr pheromone, sporulation, conjugative transfer, competence