



# ПЛАЗМИДЫ СЕМЕЙСТВА pBS72 КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВЕКТОРНЫХ СИСТЕМ

Белорусский государственный университет, Биологический факультет, кафедра генетики, 220030 Беларусь, Минск, Пр. Независимости, 4.

Чалей В.А., Лагодич А.В., Карпиевич М.Н., Титок М.А., E-mail: LagodichAV@bsu.by

Повсеместно распространенные в природной среде обитания бактерии *Bacillus subtilis* способны утилизировать широкий спектр органических и неорганических субстратов, продуцировать во внешнюю среду биологически активные соединения (ферменты, антибиотики, стимуляторы роста растений), являются весьма востребованными объектами биотехнологических отраслей производства, и первыми кандидатурами при разработке штаммов-продуцентов. Наличие полной нуклеотидной последовательности генома этих микроорганизмов позволяет целенаправленно изменять их свойства для биотехнологического использования. Одним из подходов, обеспечивающих детальное изучение регуляции экспрессии генов и улучшение практических свойств штаммов-продуцентов, является применение для этих целей векторных молекул, несущих чужеродный генетический материал. При этом в качестве векторов, как правило, используются внехромосомные генетические элементы, наиболее перспективными из которых являются плазмиды, реплицирующиеся согласно механизму тета-типа. Однако в настоящее время у бактерий *B. subtilis* наиболее изученными являются плазмиды, реплицирующиеся в соответствии с механизмом «качающегося кольца», в то время как плазмиды тета-типа практически не описаны. Однако именно плазмиды тета-типа являются наиболее перспективными в плане создания на их основе векторов для молекулярного клонирования. Поиск и характеристика плазмид среди природных штаммов этих микроорганизмов позволяет не только исследовать закономерности распространения репликонов определенного типа, но и выявить внехромосомные генетические элементы, обладающие новыми свойствами.

Внехромосомные генетические элементы могут служить основой при конструировании векторных молекул. Векторные системы широко применяются для молекулярного клонирования в клетках грамположительных бактерий основаны на использовании RCR-плазмид. Недостатком этих векторов является структурная и сегрегационная нестабильность, которая определена самим механизмом репликации. При репликации плазмид RCR-типа могут формироваться высоко-молекулярные линейные одностебельные структуры, представленные множественными копиями плазмидного генома (the HMW-forms). Образование таких структур и наличие в составе клонированной последовательности *chi* sites (5'-GCTGGTGG-3') существенно увеличивает вероятность рекомбинации между плазмидной и хромосомной ДНК, что и ведет к структурной и сегрегационной нестабильности. В отличие от RCR-плазмид плазмиды  $\theta$ -типа не формируют HMW-структур и, следовательно, лишены указанных недостатков.

В связи с вышесказанным наиболее предпочтительными элементами являются плазмиды, реплицирующиеся по механизму  $\theta$ -типа. За исключением pLS20, плазмиды такого типа у *B. subtilis* не описаны, а данные об использовании pLS20 для конструирования векторов отсутствуют.

Настоящая работа посвящена изучению молекулярно-генетической организации плазмид  $\theta$ -типа бактерий *B. subtilis*, выделенных из различных природных источников на территории Беларуси, и их использованию при создании векторов для молекулярного клонирования в клетках грамотрицательных (*Escherichia coli*) и грамположительных (*Bacillus subtilis*) бактерий.

Использование метода щелочного лизиса с последующим электрофоретическим анализом выделенной ДНК в 20 % случаев позволило выявить внехромосомные генетические элементы размером более 90 kb в клетках природных штаммов *B. subtilis*, изолированных из различных природных источников на территории Беларуси.

С использованием вектора pMTL21C были получены мини-репликоны трех плазмид, выделенных из штаммов 19, 57 и 72, и определены их размеры (табл. 1).

Размеры полученных мини-репликонов				
Штамм	Плаزمид	Размер вставки, (kb)	Размер конструкции, (kb)	Название мини-репликона
19	pBS19	5,5	9,0	pMTLBS19
57	pBS57	2,9	6,4	pMTLBS57
72	pBS72	3,1	6,6	pMTLBS72

Полученные мини-репликоны эффективно трансформировали клетки типового штамма *B. subtilis* 168 *trpC2* и стабильно наследовались в ряду поколений (вероятность утраты составляла 4-6% на 60 генераций).

Гибридизация по Саузерну позволила заключить, что изучаемые плазмиды имеют сходные *rep*-области, и не принадлежат ни к одному из известных семейств плазмид грамположительных бактерий, в частности pAM $\beta$ 1, pTB19, pLS20 (плазмиды  $\theta$ -типа) и pT181, pE194, pC194 (плазмиды RCR-типа). Размер исходных плазмид, а также отсутствие

Результаты, полученные в ходе секвенирования и функционального анализа мини-реплика плазмиды тета-типа pBS72, изолированной из природного штамма *B. subtilis*, позволили изолировать их базовый репликон, пригодный для создания векторных молекул. Для его поддержания в клетках *B. subtilis* необходимо только наличие *rep*-гена и ориджина вегетативной репликации. Это послужило основанием для создания серии дуплицированных векторов на основе репликона плазмиды тета-типа pBS72 и плазмиды pMTL21C (рис. 4). В качестве базовой конструкции, обеспечивающей поддержание векторных молекул в клетках *E. coli*, использовали многокопийную плазмиду pMTL21C, несущую ColE1-репликон, ген ампициллинрезистентности (*Amp*), выражающийся в *E. coli*, и ген устойчивости к хлорамфениколу (*Cm*), экспрессирующийся в бактериях *B. subtilis*, а также полилинкер, включенный в ген *lacZ'*. Наличие полилинкера, содержащего 21 уникальный сайт, позволяет клонировать фрагменты ДНК, вызывая при этом инактивацию гена *lacZ'*, выявляемую по формированию неокрашенных колоний на селективной среде, содержащей IPTG и X-Gal. Кроме того, в составе плазмиды pMTL21C содержится несколько уникальных сайтов (в частности, AflII-сайт), которые не затрагивают ни одну из указанных выше функциональных единиц и могут быть использованы для клонирования *rep*-области плазмиды pBS72.

Путем клонирования продукта амплификации *rep*-области плазмиды pBS72 в сайт AflII вектора pMTL21C были получены конструкции pMTL7-1, pMTL7-2 и pAL1. Полученные конструкции являются векторами общего назначения и пригодны для клонирования и секвенирования генетического материала. При этом экспрессия встроенных фрагментов ДНК в составе данных векторных молекул осуществляется *in vivo* с помощью промотора, индуцируемого в клетках *E. coli* и способного обеспечить базовый уровень экспрессии в клетках *B. subtilis*.

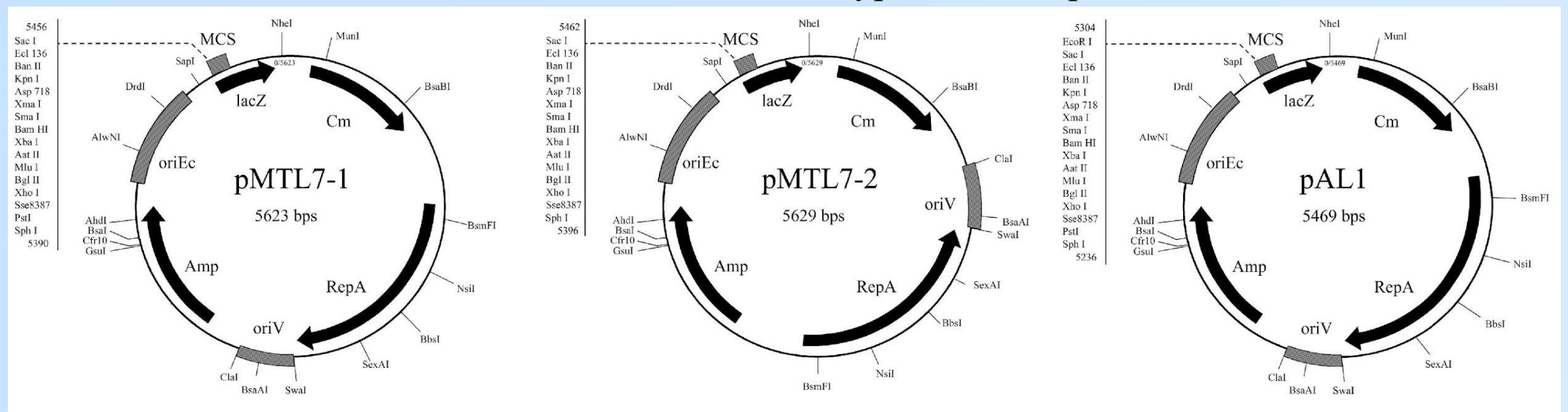


Рис. 4. Молекулярно-генетическая организация векторов общего назначения. На рисунке указана локализация сайтов рестрикции и детерминант: oriE – ColE1-репликон, обеспечивает наследование в клетках *E. coli*; oriV и Rep – *rep*-область плазмиды pBS72, обеспечивает наследование репликона в клетках *B. subtilis*; MCS – полилинкер размером 78 bp, несущий 16 сайтов, пригодных для молекулярного клонирования, фланкирован праймерами M13/pUC, расположен в N-терминальной последовательности гена *lacZ'*; маркеры устойчивости к ампициллину (*Amp*) и хлорамфениколу (*Cm*), выражающиеся в бактериях *E. coli* и *B. subtilis*, соответственно.

фракции одностебельной ДНК при репликации мини-репликонов pMTLBS19, pMTLBS57 и pMTLBS72, позволили предположить уникальность организации их репликативного аппарата и принадлежность к новому, еще не описанному семейству плазмид тета-типа. Мини-репликоны наследуются в клетках штамма *B. subtilis* *polA*, что говорит о независимости их репликации от функции ДНК-полимеразы I, что исключает их сходство с внехромосомными генетическими элементами, инициация репликации которых зависит от функции данного фермента, в частности, с широко распространенными среди грамположительных бактерий плазмидами тета-типа семейства pAM $\beta$ 1.

Выяснение молекулярно-генетической организации *rep*-областей изучаемых плазмид осуществлялось путем секвенирования и функционального анализа делеционных и инсерционных изменений внутри клонированных мини-репликонов.

В пределах секвенированных последовательностей обнаружено несколько открытых рамок считывания. Анализ первичной структуры белков, предположительно детерминируемых *orf*-2 и *orf*-3, не позволил выявить гомологии с известными. Однако достоверное сходство было обнаружено для полипептида, детерминируемого неполной открытой рамкой считывания *orf*-4 с C-терминальной областью бактериальных белков из семейства PgaA/Soj, обеспечивающих распределение дочерних молекул ДНК в процессе клеточного деления. Кроме того, для фрагмента полипептида, кодируемого открытой рамкой считывания *orf*-1, установлена гомология с N-терминальной последовательностью белка DnaA некоторых грамположительных и грамотрицательных бактерий, участвующего в инициации репликации хромосомы (рис. 2).

Достоверное сходство было обнаружено для полипептида, детерминируемого неполной открытой рамкой считывания *orf*-4 с C-терминальной областью бактериальных белков из семейства PgaA/Soj, обеспечивающих распределение дочерних молекул ДНК в процессе клеточного деления. Кроме того, для фрагмента полипептида, кодируемого открытой рамкой считывания *orf*-1, установлена гомология с N-терминальной последовательностью белка DnaA некоторых грамположительных и грамотрицательных бактерий, участвующего в инициации репликации хромосомы (рис. 2).

В пределах секвенированных последовательностей обнаружено несколько открытых рамок считывания. Анализ первичной структуры белков, предположительно детерминируемых *orf*-2 и *orf*-3, не позволил выявить гомологии с известными. Однако достоверное сходство было обнаружено для полипептида, детерминируемого неполной открытой рамкой считывания *orf*-4 с C-терминальной областью бактериальных белков из семейства PgaA/Soj, обеспечивающих распределение дочерних молекул ДНК в процессе клеточного деления. Кроме того, для фрагмента полипептида, кодируемого открытой рамкой считывания *orf*-1, установлена гомология с N-терминальной последовательностью белка DnaA некоторых грамположительных и грамотрицательных бактерий, участвующего в инициации репликации хромосомы (рис. 2).

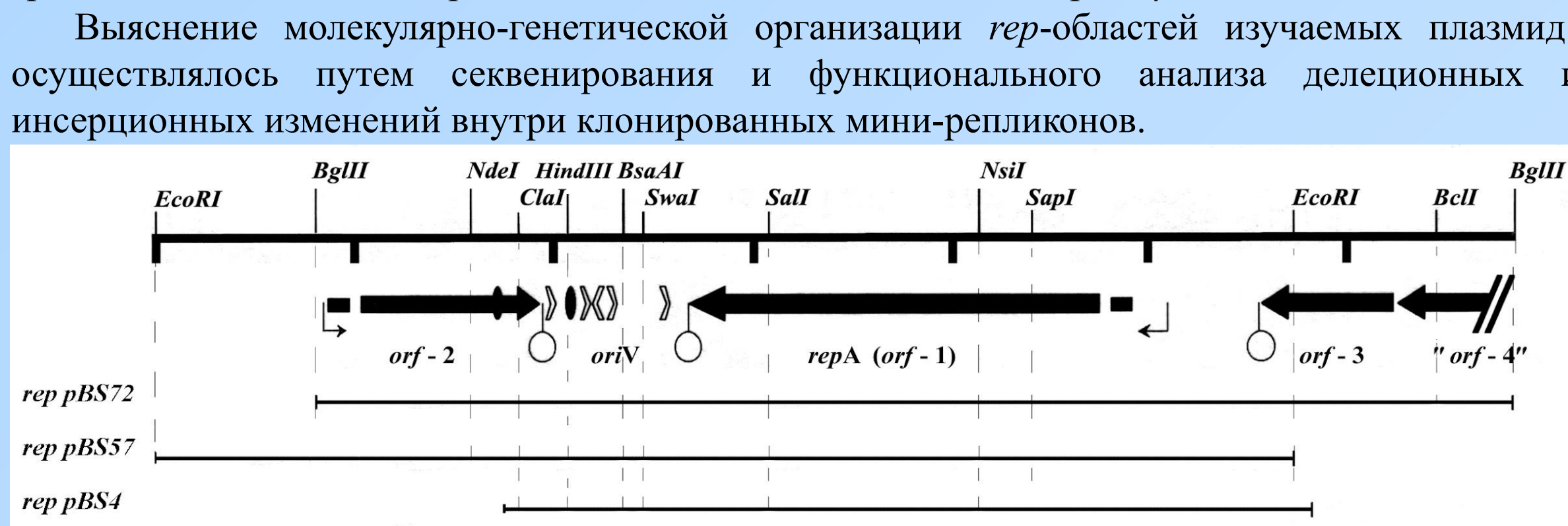


Рис. 1. Организация мини-репликонов плазмид pBS72 (3081 bp), pBS57 (2892 bp) и pBS4 (2076 bp). Обозначения:  $\square$  – промотор,  $\blacksquare$  – последовательность Шайн-Дальгарно,  $\circ$  – терминатор;  $\rightarrow$  – правая,  $\leftarrow$  – левая ориентация; DnaA связывающие последовательности (O). Открытые рамки считывания (*orf*-1-4) детерминируют синтез полипептидов, состоящих из 344, 168, 113, 87 аминокислотных остатков, соответственно. Для репликации плазмид необходим ген *repA* и область, содержащая в своем составе ориджин вегетативной репликации – *oriV*.

В пределах секвенированных последовательностей обнаружено несколько открытых рамок считывания. Анализ первичной структуры белков, предположительно детерминируемых *orf*-2 и *orf*-3, не позволил выявить гомологии с известными. Однако достоверное сходство было обнаружено для полипептида, детерминируемого неполной открытой рамкой считывания *orf*-4 с C-терминальной областью бактериальных белков из семейства PgaA/Soj, обеспечивающих распределение дочерних молекул ДНК в процессе клеточного деления. Кроме того, для фрагмента полипептида, кодируемого открытой рамкой считывания *orf*-1, установлена гомология с N-терминальной последовательностью белка DnaA некоторых грамположительных и грамотрицательных бактерий, участвующего в инициации репликации хромосомы (рис. 2).



Figure 2: Sequence analysis of the C-terminal region of *RepA* (pBS72) with N-terminal domain of the *DnaA* protein of some Gram-positive and Gram-negative bacteria: 1 – *DnaA B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 (the level of identity, similarity and the E-value are 35%, 63%, and  $1 \times 10^5$ , respectively); 2 – *DnaA B. licheniformis* DSM13; 3 – *DnaA B. anthracis*; 4 – *B. thuringiensis* serovar *konkukian* str. 97-27; 5 – *B. cereus* E33L; 6 – *DnaA B. clausii* KSM-K16; 7 – *DnaA Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus* ATCC 15305; 8 – *DnaA Staphylococcus haemolyticus* JCS1435; 9 – *DnaA Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; 10 – *DnaA Methylobacillus flagellatus* KT1; 11 – *DnaA Haemophilus parvus*; 12 – *DnaA Vibrio parvulus*; 13 – *DnaA Vibrio fischeri* ES114; 14 – *DnaA Pseudomonas fluorescens* Pf-5; 15 – *DnaA Pseudomonas aeruginosa* PAO1; 16 – *DnaA Oceanobacillus ihayensis*; 17 – *DnaA B. halodurans* C-125 (the level of identity, similarity and the E-value are 42%, 64%, and  $9 \times 10^6$ , respectively); 18 – *DnaA Prochlorococcus marinus* str. MIT 9312; 19 – *DnaA Desulfotolacium hafniense* DCB-2; 20 – *DnaA Geobacillus kaustophilus* HTA426; 21 – *DnaA Trichodesmium erythraeum* IMS101; 22 – *DnaA Nostoc* sp. PCC 7120; 23 – *DnaA Anabaena variabilis* ATCC 29413.

Нами было показано, что ориентация клонированной *rep*-области не оказывает влияния на способность плазмиды наследоваться в клетках *E. coli* и *B. subtilis*. В следующей серии экспериментов было установлено, что эффективность трансформации клеток *E. coli* и *B. subtilis* препаратами плазмидной ДНК составляет  $10^6$  и  $10^5$  клеток на  $1 \mu\text{g}$  ДНК, соответственно.

Созданный вектор в равной степени пригоден для клонирования в системах *E. coli* и *B. subtilis*. При этом число плазмидных копий в реципиентных бактериях *E. coli* соответствует ColE1-репликону, а в бактериях *B. subtilis* – репликону pBS72 (5-6 копий). Полученный вектор характеризуется высокой емкостью (до 10 kb) и выраженной структурной и сегрегационной стабильностью в клетках бактериальных хозяев *E. coli* и *B. subtilis*. Для созданной конструкции известна полная нуклеотидная последовательность ДНК, что позволяет осуществлять с ней различного рода манипуляции, в том числе создавать новые векторные молекулы (например, векторы специального назначения), что и было предпринято в дальнейшем.

Варианты с измененным числом копий могут служить основой для конструирования векторных систем, а также для изучения тонких механизмов репликации и сегрегации. Для изменения числа копий мини-реплика плазмиды pBS72, детерминирующей устойчивость к хлорамфениколу в концентрации 5 мкг/мл использовали химический мутагенез *in vitro* (гидроксиламин). Мутантные конструкции были отобраны путем прямой селекции трансформантов *B. subtilis* 168 *trpC2* на средах с повышенной концентрацией хлорамфеникола (50 мкг/мл). Мутационные изменения, приводящие к увеличению числа копий плазмидного репликона, были картированы путем секвенирования. На основании анализа электрофоретам было установлено увеличение отношения фракций плазмидной ДНК к хромосомной от 2 до 10 раз по сравнению с исходным вариантом, что свидетельствовало об увеличении числа копий исследуемых мутантов.

Мутации были выявлены в области *dnaA*-бокса, *oriV*-сайте и *repA*-гене. В последовательности *dnaA*-бокса, примыкающего к сайту *oriV*, обнаружены три точечные делеционные мутации, причем одна из них, присутствовала во всех проанализированных вариантах. В области *oriV* достаточно часто обнаруживались замена аденина на гуанин в последовательности инвертированного повтора (обнаружена у пяти из семи проанализированных мутантов). В пределах *repA*-гена выявлены трансверсии и транзиции, приводящие к изменению в области домена полипептидной цепи *RepA*, предположительно обладающего ДНК-связывающей активностью, а также транзиции в области характерной для домена с АТФ-азной активностью.

Подобно исходному мини-репликону плазмиды pBS72 все исследованные мутантные варианты характеризовались стабильностью наследования в клетках типового штамма *B. subtilis* 168 *trpC2* и утрачивались с частотой более 90% из бактерий *B. subtilis* L1432, несущих мутацию гена *dnaB19*. Исключение составил вариант, содержащий транзицию в области инвертированного повтора *oriV* сайта и делецию последовательности *dnaA*-бокса (стабильность наследования увеличилась в 10 раз). Исходя из возможных функций белка *DnaB*, можно предположить, что изменение в области инициации репликации приводит не только к изменению числа копий, но также влияет на процессы распределения дочерних молекул плазмидной ДНК в процессе деления.

Обсуждая выявленную гомологию белка, детерминируемого открытой рамкой считывания 1, с *DnaA*-белком хромосомного происхождения, хотелось бы отметить следующее. Для инициации репликации бактериальной хромосомы (в частности *E. coli*) на первом этапе происходит олигомеризация белка *DnaA*, который затем взаимодействует с областью *oriC*, обеспечивая локальное расплетение двунитевой ДНК в данном участке, тем самым обуславливая присоединение геликазы. Эти процессы определяются N-терминальной последовательностью *DnaA*-белка. Возможно, что сходство организации первичной структуры C-терминальной последовательности *RepA*-белка с N-терминальной последовательностью *DnaA*-белка позволяет белку *RepA* выполнять аналогичные функции при инициации репликации плазмиды. Для остальной части белка, кодируемого *orf*-1, гомологии с известными белками из банка данных выявлено не было, однако было показано, что в области между 111 и 132 аминокислотными остатками локализована ДНК-связывающая последовательность (HTN-сайт). Приведенные факты свидетельствуют в пользу того, что полипептиды, подобных обнаруженному, ранее описано не было. На этом основании можно предположить, что продукт, детерминируемый открытой рамкой считывания *orf*-1, является новым *Rep*-белком, стимулирующим инициацию репликации плазмиды pBS72.

Последовательность протяженностью в 370 п.н., располагающаяся между открытыми рамками считывания 1 и 2, включает типичный *DnaA*-связывающий сайт (TTA TCC ACA), а также четыре прямых и один инвертированных повторы, имеющие сходные нуклеотидные последовательности (ATT AAA T(T/A) TT (A/G) A(T/C)), которые могут являться потенциальными сайтами связывания с белком, иницирующим репликацию. Кроме того, у 3'-конца второй открытой рамки считывания *orf*-2 расположен еще один типичный *DnaA*-связывающий сайт. Выявленные закономерности позволяют предполагать, что анализируемая область представляет собой сайт начала вегетативной репликации (*oriV*) плазмиды pBS72 (рис. 1).

Отсутствие гомологии с охарактеризованными плазмиды RCR-типа и тета-типа позволяет заключить, что клонированный репликон представляет собой новый класс репликонов. Результаты полимеразной цепной реакции *rep*-областей плазмид размером более 90 kb с последующим рестрикционным и секвенс-анализом продуктов амплификации позволили продемонстрировать сходство их организации и отнести данные внехромосомные генетические элементы к новой систематической группе, включающей как минимум десять представителей, выявленных среди природных штаммов бактерий *B. subtilis*, выделенных на территории Беларуси.

Результаты функционального анализа *rep*-области плазмиды pBS72 бактерий *B. subtilis* бактерий *B. subtilis*. Делеционные (варианты pMAT2 – pMAT11) и инсерционные (варианты pMAT12 – pMAT14) мутанты были изолированы в бактериях *E. coli* и проанализированы на способность реплицироваться в бактериях *B. subtilis*: “+” – трансформирующая активность и стабильность наследования соответствует исходному варианту (вариант pMTLBS72); “+/–” – трансформирующая активность и стабильность наследования на порядок ниже чем у исходного варианта; “–” – мутантные плазмиды не трансформируют бактерии *B. subtilis*, ■ – места инсерций. Минимальный репликон плазмиды pBS72 соответствует варианту pMAT11.

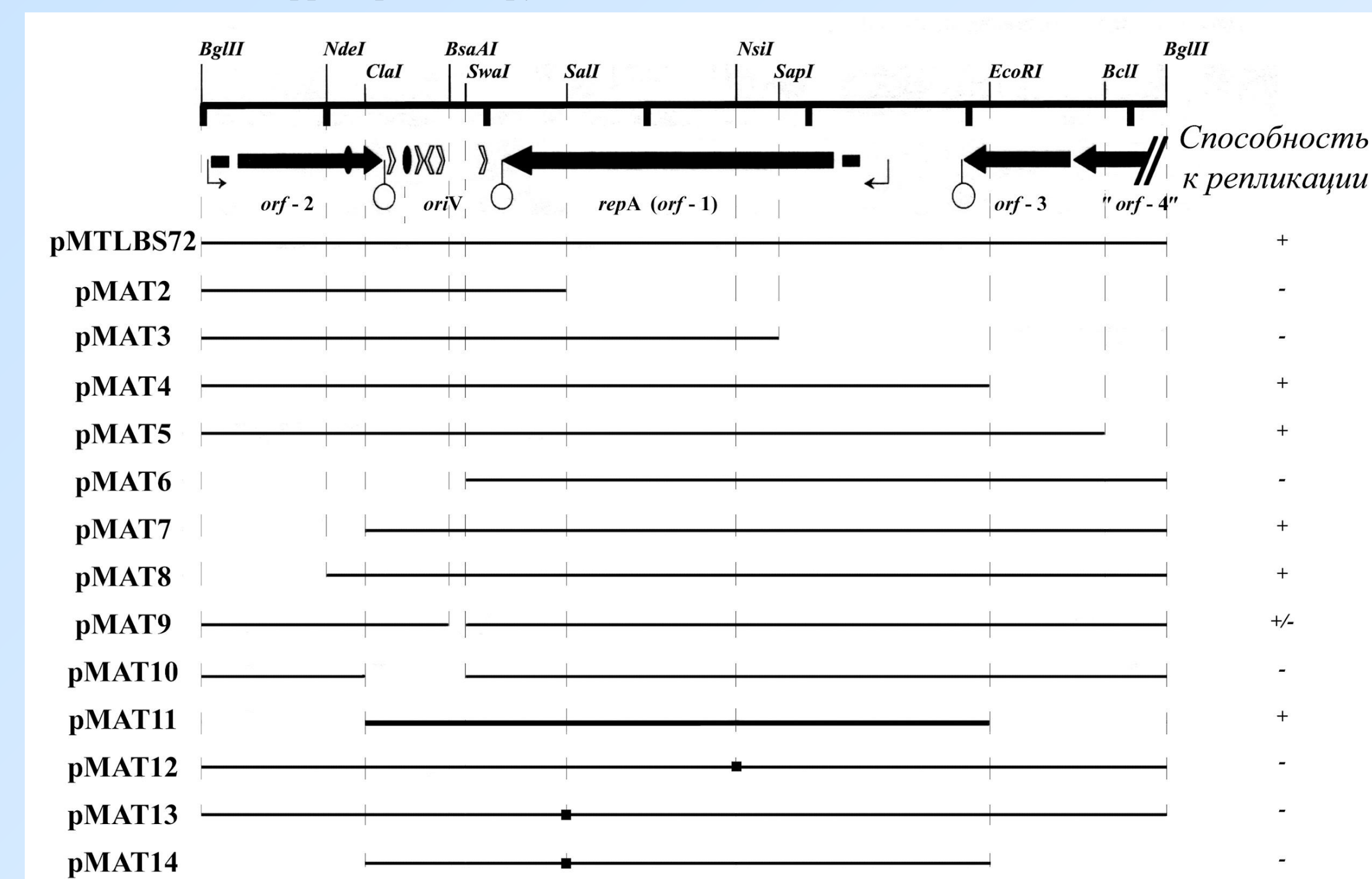


Рис. 3. Результаты функционального анализа *rep*-области плазмиды pBS72 бактерий *B. subtilis* бактерий *B. subtilis*. Делеционные (варианты pMAT2 – pMAT11) и инсерционные (варианты pMAT12 – pMAT14) мутанты были изолированы в бактериях *E. coli* и проанализированы на способность реплицироваться в бактериях *B. subtilis*: “+” – трансформирующая активность и стабильность наследования соответствует исходному варианту (вариант pMTLBS72); “+/–” – трансформирующая активность и стабильность наследования на порядок ниже чем у исходного варианта; “–” – мутантные плазмиды не трансформируют бактерии *B. subtilis*, ■ – места инсерций. Минимальный репликон плазмиды pBS72 соответствует варианту pMAT11.

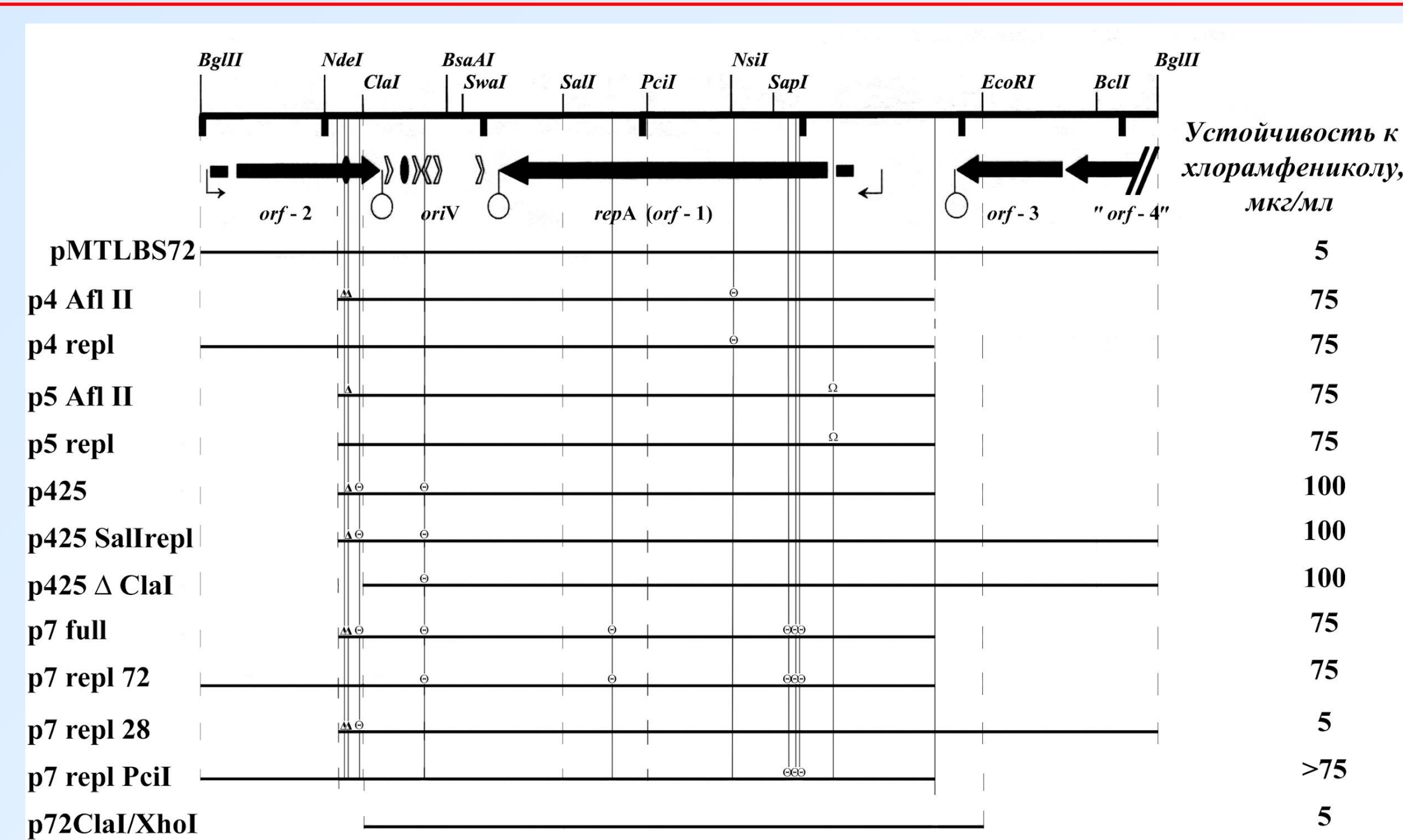


Рис. 5. Локализация мутаций в пределах *rep*-области плазмиды pBS72. Обозначения мутаций: инсерции (Ω), делеции (Δ), транзиции (A) и трансверсии (Θ).

У всех мутантов были обнаружены изменения в терминальной области *orf2*. Поскольку в использованном мини-репликоне *orf2* является неполной, а одна из делеций характерна для всех охарактеризованных мутантов, то возникшие изменения копийности могут быть связаны в т.ч. с функцией *dnaA*-бокса, локализованного в пределах *orf2*, и примыкающих к нему областей. Интересно, что одна из транзиций *mut7* затрагивает центральный район инвертированного повтора области *oriV* (ttaaAatttaa → ttaaGatttaa), и может изменять его предполагаемую функцию мишени для посадки регуляторной молекулы. Помимо описанных выше мутаций у *mut4* в пределах *repA*-гена выявлена трансверсия G→T в позиции 286, приводящая к замене A→S (97) в области ДНК-связывающего домена полипептидной цепи *RepA*, а у *mut7* - 4 транзиции A→G в позициях 82, 85, 152, 607, приводящие к аминокислотным заменам K→E (28), R→G (29), E→G (51) того же домена *RepA*, и в области домена, ответственного за АТФ-азную активность - N→D (223). У *mut5* выявлена инсерция С между старт-кодом *repA*-гена и последовательностью Шайн-Дальгарно (RBS): 5'-gatcggggagcCaccatATG-3', что может изменить уровень экспрессии *repA*-гена и, как следствие, концентрацию *RepA* в клетке.

На следующем этапе работы были осуществлены эксперименты по установлению связи между типом мутационного изменения и его фенотипическим проявлением, детектируемым по уровню устойчивости к антибиотикам, данные представлены на (рис 5).

**Заключение**  
Система бипериклонных векторов была создана на базе репликона новой плазмиды тета-типа pBS72 и репликона плазмиды pBR322. Данные вектора эффективно трансформируют клетки *E. coli* и *B. subtilis* ( $10^6$  и  $10^5$  клеток на 1 мкг ДНК), структурно и сегрегационно стабильны, однако копийность указанных векторов в клетках *B. subtilis* не велика (5-6 копий). С использованием химического мутагенеза удалось получить варианты, демонстрирующие устойчивость к повышенным концентрациям антибиотика.

**References**  
1. Anagnostopoulos C., Spizizen J. // J. Bacteriol. – 1961. – Vol. 81, № 5. - P. 741-746.  
2. Birnboim H. L., Doly J. // Nucl. Acids. Res. – 1979. – Vol. 7, № 6. – P. 1513-1523.  
3. Bron S. Plasmids // Molecular Biological Methods for *Bacillus*. Ed. Harwood C.R. - John Wiley and Sons Ltd, Chichester. – 1990. – p. 75-174.  
4. Kozlovskiy Yu.E., Prozorov A.A. // Reports of AS USSR. – 1981. – Vol 258, № 6. – P. 1457-1459 (in Russian).  
5. Lagodich A.V., Cherva E.A., Shtaniuk Ya.V., Prokulevich V.A., Fomichev Yu.K., Prozorov A.A., Titok M.A. // Molecular Biology. –2005. – Vol. 39, № 2. – P. 306-309.  
6. Lagodich A.V., Shtaniuk Ya.V., Prozorov A.A., Titok M.A. // Molecular Biology. – 2004. – Vol. 38, № 3. – P. 366-369.  
7. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed./Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Publications, NY.- 1989.-468 P.  
8. Titok M.A., Chapuis J., Selezneva Y.V., Lagodich A.V., Prokulevich V.A., Ehrlich S.D., Janniere L. // Plasmid. – 2003. – Vol. 49, № 1. – P. 53-62.