

УДК 577.21

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ПРОМОТОРНО-ОПЕРАТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА *hlyII* *Bacillus cereus* ОПРЕДЕЛЯЕТ УРОВЕНЬ ЕГО ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ

© 2025 г. А. М. Шадрин¹, Е. В. Шапырина¹, А. С. Нагель¹, А. В. Сиунов¹,
Ж. И. Андреева-Ковалевская¹, В. И. Саламов¹, А. С. Солонин¹. *

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скребины Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Московская обл., г. Пушкино, 142290 Россия

*e-mail: solonin.a.s@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.01.2025 г.

После доработки 04.02.2025 г.

Принята к публикации 10.02.2025 г.

Промоторно-операторная область гена *hlyII* *Bacillus cereus* включает удлиненный операторный участок с зеркальной симметрией, узнаваемый основным специфическим транскрипционным регулятором NlyIIR. Кроме того, в районе оператора гена *hlyII* располагаются участки, узнаваемые глобальными транскрипционными регуляторами Fur, OhrR и ResD. Последний является транскрипционным регулятором редокс-чувствительной системы сигнальной трансдукции ResDE. Обнаружены штаммы *Bacillus cereus sensu lato* с нарушением в проксимальной части района, узнаваемого NlyIIR, и в участке, узнаваемом белком ResD. Продемонстрирована существенная роль этих районов для экспрессии гена *hlyII*. Выявлены природные штаммы *Bacillus cereus* с делеционными нарушениями в проксимальной части оператора гена *hlyII*, узнаваемого NlyIIR, со значительно сниженным уровнем экспрессии гена *hlyII*. Нарушения в районе оператора, узнаваемого NlyIIR, снижают экспрессию гена *hlyII* в несколько десятков раз. Наличие интактного участка узнавания для ResD снижает экспрессию этого гена в несколько раз. Результаты данного исследования позволяют определить роль структурной вариабельности промоторно-операторной области гена *hlyII* *Bacillus cereus* в его транскрипционной активности.

Ключевые слова: сайт-направленный мутагенез, *Bacillus subtilis*, репортерный ген, эффективность транскрипции.

DOI: 10.31857/S0016675825060098 EDN: SWBRJQ

Патогенные бактерии синтезируют различные соединения участвующие в инфекционном процессе. Существенную роль в патогенезе играют порообразующие белки, которые нарушают целостность мембран эукариотических клеток, формируя в них поры, и позволяют бактериальным клеткам использовать различные клеточные питательные вещества. Эти токсины обеспечивают проникновение бактерий в организм хозяина вследствие преодоления его защитных систем, приводят к лизису клеток макроорганизмов и играют существенную роль в развитии инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями. Представители *Bacillus cereus sensu lato*, синтезирующие различные порообразующие токсины, могут вызывать пищевые отравления с диарейным и эметическим синдромами, а также заболевания глаз, нервной системы,

маститы, сепсис, пневмонию, эндокардит, менингит, энцефалит и другие болезни у человека [1].

Этот микроорганизм способен образовывать споры и формировать биопленки и является одним из основных бактериальных загрязнителей продуктов питания, лекарственных и косметических препаратов, производимых промышленностью [2, 3]. Большинство людей с инфекциями, связанными с *Bacillus cereus*, выздоравливают без какого-либо специального лечения. Однако описаны случаи выявления инвазивных заболеваний у пациентов с ослабленным иммунитетом [4]. *Bacillus cereus* способен противодействовать иммунной системе хозяина и существовать внутри своего хозяина. Показано, что *Bacillus cereus* индуцирует гибель макрофагов [5].

Один из цитолитических порообразующих токсинов *Bacillus cereus sensu lato* — гемолизин II (HlyII) — часто встречается в различных штаммах этой группы бактерий [6]. Гемолизин II участвует в патогенезе и способен убивать макроорганизмы, такие как дафнии, харовые водоросли [7, 8]. Патогенные штаммы *Bacillus cereus* обладают геном гемолизина II, тогда как в непатогенных штаммах этого гена не было обнаружено [9]. Таким образом, гемолизин II является одним из основных факторов патогенности в развитии заболеваний, вызываемых *Bacillus cereus sensu lato*.

Операторный район гена *hlyII* содержит участок в размере 44 пн с практически полной зеркальной симметрией, узнаваемый транскрипционным регулятором HlyIIR [10]. Ген регулятора *hlyIIR* расположен на расстоянии около 300 пн, непосредственно за геном *hlyII* [11]. HlyIIR входит в семейство транскрипционных регуляторов TetR/AcrR [12]. Белок HlyIIR находится в водном растворе в виде димера, и два димера HlyIIR независимо связываются с инвертированными повторами операторной области гена гемолизина II [10]. Среди обширной коллекции штаммов *Bacillus cereus sensu lato* обнаружены штаммы с нарушением целостности оператора, узнаваемого HlyIIR, в его проксимальной части. Эти штаммы синтезируют HlyII в десятки раз меньше, следовательно, проксимальная часть оператора, узнаваемая HlyIIR, является существенной для экспрессии гена *hlyII*.

В настоящей работе мы исследовали штамм *Bacillus cereus* V370 с делецией 28 пн в проксимальной части оператора HlyIIR. Эффективность экспрессии гена *hlyII* в данном штамме снижалась в десятки раз. Изменения структуры операторной области приводят к значительному снижению экспрессии гена гемолизина II. Выяснение причин резкого снижения транскрипционной активности при нарушении структуры оператора будет определено в ближайшее время. К настоящему моменту можно лишь заключить, что выявление структурных изменений в операторной области гена *hlyII*, существенных для экспрессии этого токсина, чрезвычайно важно для понимания основ и протекания инфекционного процесса.

В операторном районе гена гемолизина II обнаруживаются участки, узнаваемые глобальными транскрипционными регуляторами **Fur**, **OhrR** и **ResDE**. Данные белки вовлечены в регуляцию продукции нескольких факторов патогенности многих микроорганизмов [12–15]. Для ряда болезнетворных микробов показано, что экспрессия генов, ответственных за патогенность, регулируется небольшими молекулами, свободно проникающими внутрь клетки. Так, присутствие железа в среде обитания приводит к блокировке экспрессии факторов патогенности, а снижение концентрации

свободных ионов железа обеспечивает их эффективный синтез [13, 16].

При анализе последовательности промоторов *hlyII Bacillus cereus sensu lato* в базе данных бактериальных геномов (NCBI) идентифицированы последовательности, аналогичные каноническому сайту связывания Fur *Bacillus subtilis* (BS). Минимальным участком узнавания Fur является 7-1-7 гептамерный мотив. Два таких мотива с перекрытием образуют канонический сайт связывания Fur, состоящий из 19 пн [17]. Мы обнаружили, что во всех проанализированных последовательностях оператор Fur состоит только из одного гептамерного мотива и перекрывает точку инициации транскрипции *hlyII*. Роль регулятора Fur в репрессии экспрессии гена *hlyII* нами ранее детально описана [18].

Кроме влияния небольших молекул, изменение рН или окислительно-восстановительных условий культивирования микроорганизма также являются существенными для экспрессии генов, кодирующих токсины. В частности, условия культивирования влияют на участие в регуляции экспрессии генов чувствительной к окислительно-восстановительному потенциалу среды, отвечающей за регуляцию генов аэробного и анаэробного метаболизма у многих бактерий, в том числе у бактерий рода *Bacillus* [19].

В ряде штаммов *Bacillus cereus sensu lato* в операторном районе было обнаружено как наличие, так и отсутствие участка узнавания для ResD — одного из участников двухкомпонентной системы сигнальной трансдукции ResDResE. Двухкомпонентная система состоит из связанной с мембраной сенсорной гистидинкиназы ResE и цитоплазматического транскрипционного регулятора ответа ResD [19]. Кроме репрессии ResD может участвовать в активации транскрипции через связь с РНК-полимеразой в проксимальном и дистальном сайтах промотора, представляя уникальную конфигурацию для активации транскрипции [20, 21].

Свойства данной двухкомпонентной системы хорошо изучены у непатогенной *Bacillus subtilis*, однако известно лишь несколько работ по изучению роли ResDE в регуляции продукции токсинов *Bacillus cereus* [19, 22–24]. Обнаружение данными авторами штаммов, лишенных участка связывания с белком ResD, позволило исследовать роль двухкомпонентной системы сигнальной трансдукции ResDResE на транскрипционную активность промотора гена *hlyII*.

В настоящей работе мы сконструировали рекомбинантную плазмиду, где промоторно-операторная область гена *hlyII* — из штамма *Bacillus cereus* V370 (в которой обнаружена делеция части оператора для HlyIIR), но содержащая интактную последовательность сайта узнавания ResD, слита

Таблица 1. Определение уровня экспрессии гена *hlyII* в аэробных условиях

<i>Bacillus subtilis</i> ResD+ P _{<i>hlyII B-370</i>}	<i>Bacillus subtilis</i> ResD– P _{<i>hlyII B-370</i>}	<i>Bacillus subtilis</i> ResD+ P _{<i>hlyII B-771</i>}	<i>Bacillus subtilis</i> ResD– P _{<i>hlyII B-771</i>}
38 ± 1.9	120 ± 6	5200 ± 260	6100 ± 305

Примечание. Представлены средние значения уровня бета-галактозидазной активности в единицах Миллера в результате пяти экспериментов.

в иерархии регуляторных сигналов, отвечающих за выбор пути синтеза гемолизина II *Bacillus cereus sensu lato*.

Заметное снижение транскрипционной активности промоторно-операторной области гена *hlyII* с делецией с –196 по –228 от стартового кодона, возможно, связано с нарушением участка, ответственного за взаимодействие с РНК-полимеразой [11], или нарушением UP-элемента этой области, который обеспечивает как удаленное связывание, так и взаимодействие между регуляторами РНК-полимеразой [27].

Таким образом, можно сделать вывод, что исследование регуляции бактериальных генов породообразующих токсинов позволит определить возможность выбора условий, при которых подавляется экспрессия этих генов, что может привести к снижению патогенности микроорганизма. Анализ промоторно-операторных районов генов, участвующих в патогенезе, позволит выявить критические точки в этих районах, обеспечивающие степень экспрессии патогенных генов. Наличие или отсутствие участка, узнаваемого ResDE в составе операторного района гена *hlyII*, определяет возможность значительного снижения уровня экспрессии породообразующего токсина HlyII.

Расшифровка условий экспрессии гена *hlyII* позволяет определить подходы для терапии заболеваний, вызванных *Bacillus cereus*, а также создаст предпосылки для разработки нового класса лекарственных средств, подавляющих продукцию HlyII – одного из основных токсинов *Bacillus cereus sensu lato*.

Исследование сотрудников АСН и АСС выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 24-24-00456.

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

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bottone E.J. Bacillus cereus, a volatile human pathogen // Clin. Microbiol. Rev.* 2010. V. 23. № 2. P. 382–398. <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-09>
2. *Hall-Stoodley L., Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections // Cell Microbiol.* 2009. V. 11. № 7. P. 1034–1043. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x>
3. *Hsueh Y.-H., Somers E.B., Lereclus D. et al. Biofilm formation by Bacillus cereus is influenced by PlcR, a pleiotropic regulator // Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. № 7. P. 5089–5092. <https://doi.org/10.1128/AEM.00573-06>
4. *John S., Neary J., Lee C.H. Invasive Bacillus cereus infection in a renal transplant patient: A case report and review // Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2012. V. 23. № 4. P. e109–110. <https://doi.org/10.1155/2012/461020>
5. *Ramarao N., Lereclus D. The InhA1 metalloprotease allows spores of the B. cereus group to escape macrophages // Cell Microbiol.* 2005. V. 7. № 9. P. 1357–1364. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00562.x>
6. *Baida G., Budarina Z.I., Kuzmin N.P. et al. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of hemolysin II gene from Bacillus cereus // FEMS Microbiol. Lett.* 1999. V. 180. № 1. P. 7–14. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08771.x>
7. *Sineva E.V., Andreeva-Kovalevskaya Z.I., Shadrin A.M. et al. Expression of Bacillus cereus hemolysin II in Bacillus subtilis renders the bacteria pathogenic for the crustacean Daphnia magna // FEMS Microbiol. Lett.* 2009. V. 299. № 1. P. 110–119. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01742.x>
8. *Kataev A.A., Andreeva-Kovalevskaya Z.I., Solonin A.S. et al. Bacillus cereus can attack the cell membranes of the alga Chara corallina by means of HlyII // Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1818. № 5. P. 1235–1241. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.01.010>
9. *Cadot C., Tran S.-L., Vignaud M.-L. et al. InhA1, NprA, and HlyII as candidates for markers to differentiate pathogenic from nonpathogenic Bacillus cereus strains // J. Clin. Microbiol.* 2010. V. 48. № 4. P. 1358–1365. <https://doi.org/10.1128/JCM.02123-09>
10. *Rodikova E.A., Kovalevskiy O.V., Mayorov S.G. et al. Two HlyIIR dimers bind to a long perfect inverted repeat in the operator of the hemolysin II gene from Bacillus*

- cereus* // FEBS Lett. 2007. V. 581. № 6. P. 1190–1196. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.02.035>
11. Budarina Z.I., Nikitin D.V., Zenkin N. et al. A new *Bacillus cereus* DNA-binding protein, HlyIIR, negatively regulates expression of *B. cereus* haemolysin II // Microbiology. (Reading). 2004. V. 150. № Pt 11. P. 3691–3701. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27142-0>
 12. Kovalevskiy O.V., Lebedev A.A., Surin A.K. et al. Crystal structure of *Bacillus cereus* HlyIIR, a transcriptional regulator of the gene for pore-forming toxin hemolysin II // J. Mol. Biol. 2007. V. 365. № 3. P. 825–834. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.074>
 13. Ramarao N., Sanchis V. The pore-forming haemolysins of bacillus cereus: A review // Toxins (Basel). 2013. V. 5. № 6. P. 1119–1139. <https://doi.org/10.3390/toxins5061119>
 14. Gupta L.K., Molla J., Prabhu A.A. Story of pore-forming proteins from deadly disease-causing agents to modern applications with evolutionary significance // Mol. Biotechnol. 2024. V. 66. № 6. P. 1327–1356. <https://doi.org/10.1007/s12033-023-00776-1>
 15. Lopez Chiloeches M., Bergonzini A., Frisan T. Bacterial toxins are a never-ending source of surprises: From natural born killers to negotiators // Toxins (Basel). 2021. V. 13. № 6. <https://doi.org/10.3390/toxins13060426>
 16. Helgason E., Caugant D.A., Olsen I. et al. Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections // J. Clin. Microbiol. 2000. V. 38. № 4. P. 1615–1622. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.4.1615-1622.2000>
 17. Baichoo N., Helmann J.D. Recognition of DNA by Fur: A reinterpretation of the Fur box consensus sequence // J. Bacteriol. 2002. V. 184. № 21. P. 5826–5832. <https://doi.org/10.1128/JB.184.21.5826-5832.2002>
 18. Sineva E., Shadrin A., Rodikova E.A. et al. Iron regulates expression of *Bacillus cereus* hemolysin II via global regulator Fur // J. Bacteriol. 2012. V. 194. № 13. P. 3327–3335. <https://doi.org/10.1128/JB.00199-12>
 19. Rosenfeld E., Dupont C., Zigha A. et al. Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73 strain // Can. J. Microbiol. 2005. V. 51. № 2. P. 149–158. <https://doi.org/10.1139/w04-132>
 20. Jacob H., Geng H., Shetty D. et al. Distinct interaction mechanism of RNA polymerase and ResD at proximal and distal subsites for transcription activation of nitrite reductase in *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. 2022. V. 204. № 2. <https://doi.org/10.1128/JB.00432-21>
 21. Härtig E., Geng H., Hartmann A. et al. *Bacillus subtilis* ResD induces expression of the potential regulatory genes yclJK upon oxygen limitation // J. Bacteriol. 2004. V. 186. № 19. P. 6477–6484. <https://doi.org/10.1128/JB.186.19.6477-6484.2004>
 22. Esbelin J., Jouanneau Y., Dupont C. *Bacillus cereus* Fnr binds a [4Fe-4S] cluster and forms a ternary complex with ResD and PlcR // BMC Microbiology. 2012. V. 12. № 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-125>
 23. Sun G., Sharkova E., Chesnut R. et al. Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. 1996. V. 178. № 5. P. 1374–1385. <https://doi.org/10.1128/jb.178.5.1374-1385.1996>
 24. Nakano M.M., Zhu Y., Lacelle M. et al. Interaction of ResD with regulatory regions of anaerobically induced genes in *Bacillus subtilis* // Mol. Microbiol. 2000. V. 37. № 5. P. 1198–1207. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02075.x>
 25. Sievers F., Wilm A., Dineen D. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega // Mol. Syst. Biol. 2011. V. 7. P. 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
 26. Geng H., Zhu Y., Mullen K. et al. Characterization of ResDE-dependent fnr transcription in *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. 2007. V. 189. № 5. P. 1745–1755. <https://doi.org/10.1128/JB.01502-06>
 27. Mishra A., Hughes A.C., Amon J.D. et al. SwrA extends DegU over an UP element to activate flagellar gene expression in *Bacillus subtilis* // bioRxiv. 2023. <https://doi.org/10.1101/2023.08.04.552067>

Variability of the Promoter-Operator Region of *Bacillus cereus hlyII* Gene Impacts on Its Transcriptional Activity Level

A. M. Shadrin¹, E. V. Shapyrina¹, A. S. Nagel¹, A. V. Siunov¹,
Zh. I. Andreeva-Kovalevskaya¹, V. I. Salyamov¹, A. S. Solonin^{1, *}

¹*Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, FSBIS FRC Pushchino Scientific Centre of Biological Research, Russian Academy of Sciences, Moscow oblast, Pushchino, 142290 Russia*

*e-mail: solonin.a.s@yandex.ru

The promoter-operator region of the *Bacillus cereus hlyII* gene includes an elongated operator region with mirror symmetry, recognizable with the main specific transcriptional regulator HlyIIR. In addition, regions for the global transcription regulators Fur, OhrR, and ResD, are located in the region of the *hlyII* gene operator. The latter is a transcriptional regulator of the redox-sensitive ResDE signal transduction pathway. *Bacillus cereus* sensu lato strains were found with a disturbance in the proximal part of the area recognized by HlyIIR and ResD. The essential role of these regions in the expression of the *hlyII* gene has been demonstrated. Natural strains of *Bacillus cereus* with deletions in the proximal region of the HlyIIR operator of the *hlyII* gene have a significantly reduced expression level of *hlyII* were identified. Disturbances in HlyIIR operator reduce the expression of *hlyII* several tens of times. The presence of an intact recognition site for ResD reduces the expression of this gene several times under aerobic conditions. These results allow us to determine the influence of structural variability in the promoter-operator region of *Bacillus cereus hlyII* genes on its transcriptional activity.

Keywords: site-directed mutagenesis, *Bacillus subtilis*, reporter gene, transcription efficiency.