

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТОКСИН-АНТИТОКСИНОВОГО ОПЕРОНА В ГЕНОМЕ ТЕРМОАЛКАЛОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *THERMOSYNTROPHA LIPOLYTICA*

Марданов А. В., Равин Н. В.

ФГБУН Центр «Биоинженерия» Российской академии наук, Москва, Россия (117312, Москва, просп. 60-летия Октября, 7/1), e-mail: nravin@mail.ru

Токсин-антитоксिनные системы, кодируемые оперонами, включающими гены токсичного для клетки белка, обладающего высокой стабильностью и нарушающего его активность нестабильного антитоксина, широко распространены у бактерий, архей и бактериофагов. Токсин-антитоксिनные системы, кодируемые плазмидами, обеспечивают их стабильное наследование в популяции за счет гибели бесплазмидных клеток, которые после инактивации антитоксина убивает более стабильный токсин. Функциональная роль аналогичных систем, кодируемых хромосомами микроорганизмов, менее очевидна, но предполагается их участие в регуляции ответа клетки на стрессовые условия среды. В результате расшифровки генома выделенной из содового озера термоалкалофильной бактерии *Thermosyntropha lipolytica* идентифицирован состоящий из двух генов оперон *toxAB*, кодирующий токсин-антитоксिनную систему ReB-RelE типа. Продукт первого гена, белок с молекулярной массой 11,1 кД и изoeлектрической точкой pI 5.53, гомологичен антитоксинам семейства Phd_YefM. Второй ген, перекрывающийся на несколько нуклеотидов с первым геном, кодирует белок с молекулярной массой 12,0 кД и pI 9.13, и гомологичен токсинам семейства RelE/ParE. В промоторной области оперона идентифицирован инвертированный повтор – вероятный сайт связывания комплекса токсин-антитоксин, регулирующего экспрессию оперона. Близкие гомологи белков ToxA и ToxB, кодируемые сходными по структуре оперонами, идентифицированы в геномах фирмикут родов *Thermoanaerobacterium*, *Thermincola*, *Pelotomaculum* и *Syntrophothermus*. Функции *toxAB* оперона *T. lipolytica* могут быть связаны с регуляцией физиологического состояния клетки в экстремальных условиях при изменении показателей температуры и pH воды содового озера.

Ключевые слова: бактерия, геном, система токсин-антитоксин, термоалкалофил.

IDENTIFICATION OF TOXIN-ANTITOXIN OPERON IN THE GENOME OF THERMOALKALIPHILIC BACTERIUM *THERMOSYNTROPHA LIPOLYTICA*

Mardanov A. V., Ravin N. V.

Centre “Bioengineering” of the Russian academy of sciences, Moscow, Russia (117312, Moscow, Prosp. 60-let Oktyabrya, bld. 7/1), e-mail: nravin@mail.ru

Toxin-antitoxin systems encoded by operons comprising genes encoding highly stable toxin and unstable antitoxin, counteracting activity of the toxin, frequently occur in bacteria, archaea and bacteriophages. Plasmid-encoded toxin-antitoxin systems ensures stable inheritance of plasmids in bacterial populations due to death of plasmid-free cells, became killed by stable toxin protein upon inactivation of unstable antitoxin. The functional role of similar chromosome-encoded systems is less defined but it was suggested that they are involved in cell response to environmental stress factors. Upon sequencing of the genome of thermoalcaliphilic bacterium *Thermosyntropha lipolytica*, isolated from a soda lake, we identified two-gene *toxAB* operon coding for RelB-RelE-type toxin-antitoxin system. Product of the first gene, 11,1 kD protein with calculated pI 5.53, is similar to Phd_YefM family toxins. The second genes, overlapping the first one in few nucleotides, encode 12 kD protein with calculated pI 9.13 and similar to RelE/ParF family toxins. Promoter region of the operon contains inverted repeat likely acting as a binding site of toxin-antitoxin complex regulating expression of the operon. The closest homologs of ToxA and ToxB proteins, encoded by similar operons, were identified in the genomes of Firmicutes belonging to genera *Thermoanaerobacterium*, *Thermincola*, *Pelotomaculum* and *Syntrophothermus*. Functions of *toxAB* operon of *T. lipolytica* may be related to regulation of physiological state of cells under extreme conditions involving variations of temperature and pH of soda lake water.

Key words: bacteria, genome, toxin-antitoxin system, thermoalkaliphile.

Введение

Системы токсин-антитоксин были первоначально обнаружены на бактериальных плаزمидах как генетические элементы, обеспечивающие стабильное наследование плазмид в бактериальной популяции [4]. Как правило, эти системы представляют собой оперон из двух генов, первый из которых кодирует антитоксин, а второй – токсин [3]. Стабильная передача плазмиды в популяции обеспечивается за счет гибели клеток, в которых произошла случайная потеря плазмиды (post-segregational killing). Механизм специфической гибели бесплазмидных клеток определяется различием уровней стабильности токсина и антитоксина, – токсин является стабильным белком, а антитоксин быстро деградирует под действием внутриклеточных протеаз. Клетки, в которых произошла потеря плазмиды при делении, не будут содержать токсин-антитоксинового оперона и после быстрой инактивации антитоксина будут убиты оставшимся в клетке токсином [3].

По мере расшифровки полных геномов бактерий и архей на протяжении последних 15 лет стало ясно, что большое число разнообразных токсин-антитоксиновых систем кодируется не только плазмидами, но и хромосомами. Функции этих хромосомных локусов не очевидны и являются предметом обсуждения [10]. Высказываются предположения, что эти системы могут являться функциональным аналогом апоптоза эукариотических клеток и/или обеспечивать ответ бактериальной клетки на стрессовые условия, при которых происходит активация протеаз и деградация антитоксина. В этом случае клетка может переводиться в «спящее» состояние, в котором она будет находиться до прекращения действия стрессовых факторов. Обеспечивающие такую «стрессоустойчивость» токсин-антитоксиновые системы могут являться важными факторами патогенности, например, геном возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* кодирует более 60 токсин-антитоксиновых систем, а в геноме непатогенной микобактерии *Mycobacterium smegmatis* имеется лишь одна такая система [7].

По своему составу и механизму действия токсин-антитоксиновые системы могут быть разделены на три группы [10]. В системах типа I экспрессия гена токсина ингибируется антисмысловой РНК, транскрибируемой в противоположном направлении, т.е. антитоксином является молекула РНК. Чаще встречаются системы типа II, в которых токсин и антитоксин являются белками, их взаимодействие приводит к формированию комплекса, не проявляющего токсической активности. Наконец, в системах типа III антитоксин является молекулой РНК, которая взаимодействует с белком-токсином и ингибирует его активность.

Как было отмечено выше, генетические модули токсин-антитоксин встречаются в большинстве просеквенированных геномов бактерий и архей, причем их функции могут быть связаны с регуляцией ответа клетки на стрессовые условия. Недавно мы определили

нуклеотидную последовательность генома термоалкалофильной бактерии *Thermosyntropha lipolytica* [1]. Это относящийся к порядку *Clostridiales* микроорганизм [9] растет в экстремальных условиях высоких температур (от 52 до 70 °С) при щелочных значениях pH (7.15 - 9.5). Естественная вариация параметров температуры и pH в содовом озере приводит к периодическому попаданию бактерии в стрессовые условия, в которых функции токсин-антитоксиновой системы могут быть ей полезными.

Цель исследования: идентифицировать и охарактеризовать биоинформационными методами токсин-антитоксиновую систему, кодируемую геномом *T. lipolytica*.

Материалы и методы исследования

Штамм *T. lipolytica* был выделен В. А. Светличным из щелочного озера Богория в Кении [9] и предоставлен нам для исследований. Нуклеотидная последовательность генома этой бактерии была определена нами методом пиросеквенирования на геномном анализаторе GS FLX [1]. Поиск открытых рамок считывания, способных кодировать белки, осуществляли с помощью программы Genemark. Для предсказания функций белков соответствующие аминокислотные последовательности сравнивали с базой данных NCBI с помощью BLASTP. Анализ вторичной структуры белков проводили с помощью PSIPRED [5].

Результаты и их обсуждение

Поиск гомологов белковых продуктов, предсказанных открытыми рамками считывания, кодируемых в геномных последовательностях *T. lipolytica* по базе данных NCBI позволил идентифицировать локус, содержащий гомологи генов бактериальных токсина и антитоксина. Эти гены, *toxA* (антитоксин) и *toxB* (токсин), образуют оперон, структура которого характерна для токсин-антитоксиновых систем (рис. 1). Эти гены перекрываются на 11 нуклеотидов (включая стоп-кодон первого гена), а в 5'-концевой области оперона располагается вероятный промотор. Интересной особенностью является наличие вблизи района (-10) промотора инвертированного повтора TTAGCATAA. Вероятно, эта последовательность является сайтом связывания комплекса токсин-антитоксин, таким образом репрессирующего промотор оперона. Такой механизм регуляции по принципу отрицательной обратной связи может поддерживать постоянную концентрацию токсина и антитоксина в клетке, устраняя их случайные флуктуации.

Гомологичные на уровне нуклеотидных последовательностей опероны были обнаружены нами в геномах, родственных *T. lipolytica* бактерий, – *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* DSM 571, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485, *Pelotomaculum thermopropionicum* SI, *Syntrophothermus lipocalidus* DSM 12680 и *Thermincola* sp. JR. Высокий уровень гомологии наблюдался не только в пределах кодирующих последовательностей *toxAB* генов, но и в промоторной области. В частности,

последовательность ТТАГСАТАА сохранялась в неизменном виде у всех перечисленных бактерий, несмотря на более низкий уровень гомологии участков, расположенных между этим сайтом и стартовым кодоном *toxA* (рис. 1), что свидетельствует о функциональной значимости этого сайта.

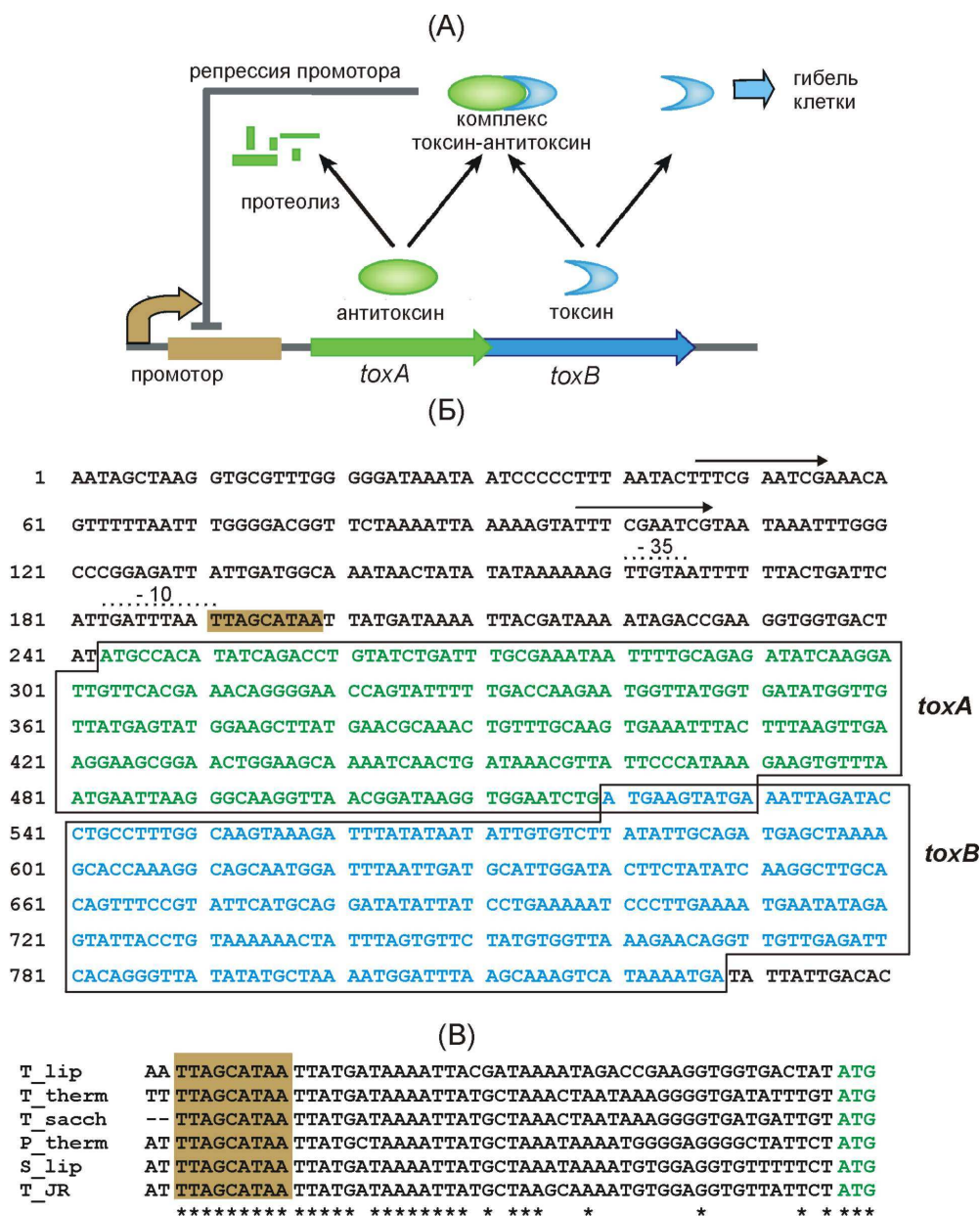


Рис. 1. (А) Структура и схема функционирования *toxAB* оперона *T. lipolytica*. (Б) Нуклеотидная последовательность *toxAB* оперона *T. lipolytica*. Районы -35 и -10 промотора показаны пунктирными линиями, стрелками показана повторяющаяся последовательность с неизвестной функцией. (С) Сравнение нуклеотидных последовательностей промоторных областей токсин-антитоксिन-оперонов *T. lipolytica* (T_lip), – *T. thermosaccharolyticum* (T_therm), *T. saccharolyticum* (T_sacch), *P. thermopropionicum* (P_therm), *S. lipocalidus* (S_lip) и *Thermincola sp.* JR (T_JR).

относятся к этому семейству [3]. Характерной особенностью YefM антитоксина *E. coli*, а также Phd, является редкий тип конформации белка – в нативном состоянии он является «развернутой» (unfolded) молекулой, чувствительной к действию протеаз [2]. Комплекс токсина с антитоксином, напротив, имеет компактную конформацию и отличается высокой стабильностью. Однако среди YefM антитоксинов имеются и структурированные белки, например, YefM антитоксин из *M. tuberculosis* [10].

Выводы

Геном термоалкалофильной бактерии *T. lipolytica* содержит оперон *toxAB*, кодирующий токсин-антитоксиновую систему ReB-ReIE типа. Функции этого оперона могут быть связаны с регуляцией физиологического состояния клетки в экстремальных условиях при изменении показателей температуры и pH воды содового озера.

Список литературы

1. Гумеров В. М., Марданов А. В., Колосов П. М., Равин Н. В. Выделение и характеристика липазы из термоалкалофильной бактерии *Thermosyntropha lipolytica* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т.48. – №4. – С. 376–382.
2. Cherny I., Gazit E. The YefM antitoxin defines a family of natively unfolded proteins: implications as a novel antibacterial target // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279. – P. 8252–8261.
3. Gerdes K., Christensen S. K., Lobner-Olesen A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci // Nat. Rev. Microbiol. - 2005. – Vol. 3. – P. 371–382.
4. Gerdes K., Rasmussen P. B., Molin, S. Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1986. – Vol. 83. – P. 3116–3120.
5. Jones D.T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices // J. Mol. Biol. – 1999. – Vol. 292. – P. 195–202.
6. Makarova K.S., Wolf Y.I., Koonin E.V. Comprehensive comparative-genomic analysis of type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes // Biol. Direct. – 2009. – Vol. 4. – P.19.
7. Pandey D. P., Gerdes K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes // Nucleic Acids Res. – 2005. – Vol. 33. – P. 966–976.
8. Pedersen K., Zavialov A. V., Pavlov M. Y., Elf J., Gerdes K., Ehrenberg M. The bacterial toxin ReIE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site // Cell. – 2003. – Vol. 112. – P. 131–140.

9. Svetlitshnyi V., Rainey F., Wiegel J. *Thermosyntropha lipolytica* gen. nov., sp. nov., a lipolytic, anaerobic, alkalitolerant, thermophilic bacterium utilizing short and long chain fatty acids in syntrophic coculture with a methanogenic archaeum // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1996. – Vol. 46. – P. 1131–1137.
10. Yamaguchi Y., Park J. H., Inouye M. Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea // Annu. Rev. Genet. – 2011. – Vol. 45. – P. 61–79.

Работа была выполнена при выполнении при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы, государственный контракт П479).

Рецензенты:

Бонч-Осмоловская Елизавета Александровна, д.б.н., зам. директора по научной работе ФГБУН Института микробиологии им. С. Н. Виноградского Российской академии наук, г. Москва.

Игнатов Александр Николаевич, д.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУН Центра «Биоинженерия» Российской академии наук, г. Москва.