

ŠTUDIJ VPLIVA POVEČANE KONCENTRACIJE BELJAKOVIN SinI IN SinR NA RAVEN BIOSINTEZE BACITRACINA PRI BAKTERIJI *Bacillus licheniformis* **

Tina DULAR^{a)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

Delo je prispelo 1999-07-07, sprejeto 1999-11-10.

Received July 07, 1999, accepted November 10, 1999.

IZVLEČEK

Bakterije rodu *Bacillus* so po Gramu pozitivni sporulirajoči bacili. Zelo dobro se prilagajajo različnim spremembam v okolju: pomanjkanju hranil, spremembam temperature in vrednosti pH. Pri bakteriji *Bacillus licheniformis* se proizvodnja peptidnega antibiotika bacitracina začne v pozni logaritemski fazi rasti in se konča med stacionarno fazo. Njegova biosinteza se ujema s proizvodnjo alkalne proteinaze. Da bi določili možne dejavnike s pozitivnim delovanjem glede na biosintezo bacitracina v bakteriji *B. licheniformis*, smo izvedli poskus z izražanjem genov, ki sodelujejo v procesih sporulacije in kompetence v *B. subtilis*. *B. licheniformis* smo transformirali s plazmidi pIS74 (*sinIR*) in pIS119 (*sinR*). Oba plazmida v bakterijah *B. subtilis* in *B. licheniformis* povzročata fenotip Spo⁻, zato se je pri rekombiniranih sevih *B. licheniformis* znižala aktivnost alkalne proteinaze in vsebnost bacitracina.

Ključne besede: mikrobiologija / bakterije / *Bacillus licheniformis* / *Bacillus subtilis* / antibiotiki / biosinteza / bacitracin / encimi / alkalne proteinaze / molekularna genetika / plazmidi / operon *sin*

INFLUENCE OF INCREASED CONCENTRATION OF SinI AND SinR PROTEINS ON THE LEVEL OF THE BACITRACIN BIOSYNTHESIS AT *Bacillus licheniformis* ††

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Bacillus* are Gram positive sporulating rods. They are highly adaptable to different environmental changes concerning substrate depletion, pH changes and strong temperature oscillations. Production of peptide antibiotic bacitracin in *B. licheniformis* starts in the late logarithmic growth phase and ends during the stationary phase. Its biosynthesis strongly correlates with an alkaline protease production. To define possible positively acting factors in terms of bacitracin production in *B. licheniformis* we performed an experiment expressing genes involved in the process of sporulation and competence in *B. subtilis*. *B. licheniformis* was transformed with plasmids pIS74 (*sinIR*) and pIS119 (*sinR*). Recombinant strains BA1 pIS74 and BA1 pIS119 produced less bacitracin and alkaline protease, because both plasmids in bacteria *B. subtilis* and *B. licheniformis* cause *spo*- phenotype.

Key words: microbiology / bacteria / *Bacillus licheniformis* / *Bacillus subtilis* / antibiotic / biosynthesis / bacitracin / enzymes / alkaline proteases / molecular genetics / plasmids / *sin* operon

** Prispevek je del diplomske naloge (zagovor 14. 05. 1999), mentorica doc.dr. Darja Žgur Bertok.

†† The paper is a part of graduation thesis (justification 14. 05. 1999), supervisor Ass.Prof. Darja Žgur Bertok, Ph.D.

UVOD

Številni bacili sintetizirajo izvencelične hidrolitične encime, s katerimi razkrajajo biopolimere, ki jih lahko uporabijo kot vir hrane in kot donorje elektronov. Mnogi pa sintetizirajo tudi antibiotike, kot so bacitracin, polimiksin, gramicidin, tirocidin in cirkulin. V večini primerov je produkcija antibiotikov vezana na sporulacijo.

V stacionarni fazi bakterije rodu *Bacillus* sintetizirajo encime (proteaze, amilaze), ki jim zagotavljajo dodaten vir hranil, in antibiotike, ki preprečujejo rast morebitnim tekmečem. Razvijejo tudi kompetenco in postanejo gibljive. Sporulacija je zadnja možnost, ki jo celice bacilov izberejo v primeru neustreznih življenjskih pogojev. Številne danes znane beljakovine imajo pri procesih stacionarne faze rasti celične populacije pomembno regulatorno vlogo.

Sinteza bacitracina poteka od pozne eksponentne do konca stacionarne faze. Raven biosinteze bacitracina je soodvisna z ravnijo proizvodnje alkalne proteinaze. Izražanje gena *aprE*, ki kodira zunajcelično alkalno proteinazo, je tesno povezano z začetkom sporulacije. Izražanje tega gena uravnavajo geni *degU*, *degQ*, *degR*, *hpr*, *sen*, *abrB*, *pai* in *sin*. ComK je glavni regulator za aktiviranje prepisa lastnega gena in izražanje poznih kompetenčnih genov. Gibljivost in sintezo avtolizina uravnava protein sigma (σ^D). Pri sporulaciji ima glavno vlogo Spo0A, katerega uravnava poteka preko količine in fosforilacije.

Bacitracin je peptidni antibiotik. Proizvajata ga bakterijski vrsti *Bacillus subtilis* in *Bacillus licheniformis*. Uporabljamo ga kot antibakterijski dejavnik in kot rastni promotor v živalski prehrani. Na amino-terminalnem delu linearnega pentapeptida je tiazolidinski obroč in heptapeptidni obroč na karboksi-terminalnem delu. Bacitracin A deluje predvsem proti po Gramu pozitivnim bakterijam tako, da zavira sintezo celične stene na ravni sinteze peptidoglikana. Poleg tega vpliva tudi na funkcije membrane, delovanje nekaterih hidrolitičnih encimov in biosintezo ubikinonskih predhodnikov (Konz in sod., 1997).

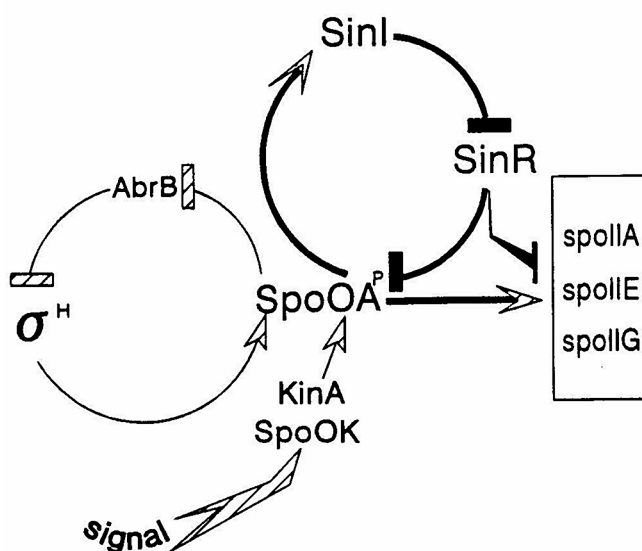
Bacitracin se sintetizira neribosomsko na multiencimskem kompleksu. Ta vsebuje tri peptidne sintetaze, BA1, BA2 in BA3. Geni, ki kodirajo module peptidnih sintetaz, so v operonu *bac*. Njihova razporeditev na kromosomu ustreza tudi zaporedju biokemičnega delovanja.

Multiencimski kompleks ima modularno strukturo, kjer se njihovo zaporedje ujema z zaporedjem aminokislin v peptidu. Modul je semiavtonomna enota. Ima celo informacijo, potrebno za prepoznavanje, aktivacijo in modifikacijo substrata. Minimalni modul vsebuje dve regiji: adenilacijsko in tiolacijsko. Vključijo pa se lahko še epimerizacijska, N-metilacijska za modifikacijo aktiviranega substrata, kondenzacijska regija za interakcijo med aminokislinami, aktiviran samo na sosednjih modulih, in tioesteraza, ki dodaja zadnjo aminokislino k linearni strukturi peptida (Marahiel in sod., 1997).

Operon *sin* vsebuje gena *sinI* in *sinR*. SinR uravnava izražanje genov za kompetenco in gibljivost bakterijskih celic pozitivno, negativno pa izražanje gena *aprE*, *spo0A* in genov II stopnje sporulacije. SinI zavira delovanje SinR, ker deluje kot antagonist SinR s tem, da preprečuje vezavo SinR na tarčno zaporedje. Izražanje genov *sinR* in *sinI* uravnavajo različni mehanizmi. Izražanje *sinI* narašča proti koncu vegetativne faze rasti celične populacije. Gen *sinR* se izraža med rastjo celične populacije v nizkih koncentracijah, na koncu eksponentne faze pa se njegovo izražanje rahlo poveča (Bai in sod., 1993).

SinR je inhibitor izražanja genov II stopnje sporulacije in ključnega zgodnjega sporulacijskega gena *spo0A*. Predsporulirajoče celice morajo znižati raven SinR, preden vstopijo v sporulacijo. Ko zmanjka vira ogljika, sta Spo0K in KinA potrebna za regulacijo SinI in s tem za inaktivacijo SinR. Spo0A-P se veže na promotor *abrB* in ovira njegovo prepisovanje. Ker je AbrB represor *spo0H*, znižanje koncentracije AbrB poveča količino E- σ^H , ki bolj aktivno prepíše zgodnje sporulacijske gene, vključno s *spo0A*, *kinA* in *spo0F*. Ta avtokatalizni mehanizem poveča količino Spo0A-P, potrebne za indukcijo genov II stopnje. Spo0A-P se veže na promotor *sinI* in direktno pozitivno uravnava ta gen. Ko raven SinI naraste na začetku stacionarne faze,

raven aktivnega SinR pade. Poveča se prepis iz promotorja *spo0A* P_S, zato se poveča izražanje Spo0A in indukcija genov II stopnje (Mandič-Mulec in sod., 1995).



Slika 1. Vloga SinR v začetku sporulacije (Mandič-Mulec in sod., 1995).

Figure 1. The role of SinR protein at the beginning of sporulation (Mandič-Mulec *et al.*, 1995).

V našem poskusu smo poskušali ugotoviti, ali SinI in SinR vplivata na raven biosinteze bacitracina. V ta namen smo izvedli poskus z izražanjem kloniranih genov v bakteriji *B. licheniformis*, *sinIR* na plazmidu pIS74 in *sinR* na plazmidu pIS119. Oba gena sodelujeta v procesih sporulacije in kompetence v *B. subtilis*. Oba plazmida povzročata fenotip Spo⁻. Ker SinR zavira izražanje gena za alkalno proteinazo, njena raven biosinteze pa je soodvisna z ravni biosinteze bacitracina, smo kot model uporabili gen *sinR*. S tem smo poskušali ugotoviti, kaj se zgodi, če porušimo ravnovesje med proteini, ki odločajo, ali bo celica sporulirala ali pa bo postala kompetentna.

MATERIAL IN METODE

Bakterijski sevi

- *Bacillus licheniformis* BA1 (KRKA-produkcijski sev)
- *Bacillus subtilis* MT119
- *Bacillus subtilis* MT120
- *Bacillus subtilis* 1012
- *Bacillus subtilis* 1A 510.

Plazmidi

- pIS74 (pCES XbaI-HindIII *SinIR*-Cm^R)
- pIS119 (pBD347 MboI-HindIII *sinR*-Cm^R)

Kromosomsko DNK iz bakterije *Bacillus licheniformis* smo izolirali s pomočjo proteinaze K in SDS, plazmidno DNK iz bakterije *Bacillus licheniformis* pa smo izolirali po metodi z alkalno lizo.

Bakterijsko kulturo smo kultivirali v elenmajericah s 30 ml sporulacijskega gojišča z $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ antibiotika kloramfenikola in jo inkubirali na stresalniku pri 37°C in 220 obratih/minuto preko noči. Za fiziološke poskuse smo uporabili 3-litrski bioreaktor (B. Braun Biotech Biostat MD) z 1,5 l produkcijskega medija iz sojine moke, škroba in mineralov. Mikrobni populaciji smo določili vsebnost bacitracina (po mikrobiološki metodi ali s kromatografsko metodo HPLC Pharmacia LKB, mobilna faza ($\text{CH}_3\text{CN} : \text{CH}_3\text{OH} = 1 : 1$) / $0,05\text{M KH}_2\text{PO}_4 = 49 / 51$) v povezavi s produkcijo encimov pozne faze rasti: aktivnostjo alkalne proteinaze, določene z azokazeinom, in alkalne fosfataze s p-nitrofenilfosfatom kot substratom.

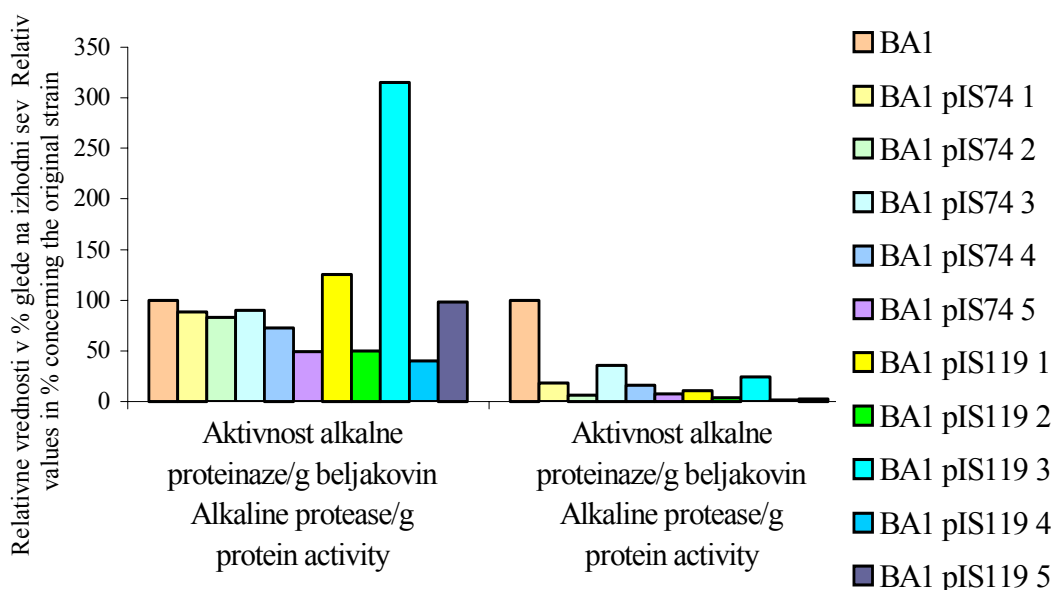
REZULTATI IN RAZPRAVA

Izhodni sevi bakterij *B. subtilis* so na sporulacijskem gojišču sporulirali, rekombinirani sevi *B. subtilis* pa niso sporulirali. Celice so bile tudi gibljive. Enake rezultate smo dobili tudi pri bakterijah seva *B. licheniformis*. Netransformirane celice so sporulirale in bile gibljive. Transformirane celice niso sporulirale, kar je v skladu z objavljenimi rezultati.

V tekočem sporulacijskem gojišču se je pri rekombiniranih sevih *B. licheniformis* BA1 pIS74 znižala aktivnost alkalne proteinaze, najbolj pri klonu 5. Gen *sinR* se je verjetno izrazil in zaviral izražanje gena *aprE*. Na osnovi teh rezultatov lahko sklepamo, da gen *sinR* pri bakteriji *B. licheniformis* ovira izražanje gena *aprE* tako kot pri *B. subtilis*.

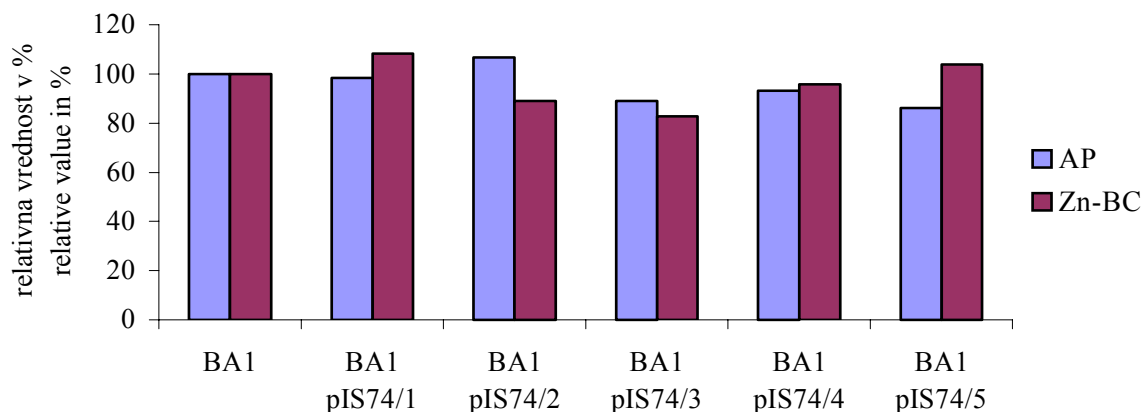
Pri rekombiniranih sevih BA1 pIS119 se je aktivnost alkalne proteinaze očitno znižala le pri klonih 2 in 4. Pri klonih 1 in 5 se biosintezni potencial alkalne proteinaze ni bistveno spremenil glede na izhodni sev, pri klonu 3 pa se je zelo povečal. Lahko da se gen *sinR* pri klonu 3 ni izrazil in tako ni vplival na izražanje gena *aprE*, ali pa je pri podvojevanju plazmida prišlo do rekombinacije, ki je okvarila originalni gen *sinR* *B. licheniformis*. Seveda pa je verjetneje, da je prišlo do segregacije in so bakterije tega klona izgubile plazmid.

V obeh primerih (BA1 pIS74 in BA1 pIS119) pa je bila aktivnost alkalne fosfataze opazno nižja kot pri izhodnem sevu. Na osnovi tega sklepamo, da smo z vnosom plazmidov z geni *sin* vplivali tudi na proizvodnjo alkalne fosfataze.



Graf 1. Biosintezni potencial rekombiniranih sevov *B. licheniformis* v sporulacijskem gojišču.
Graph 1. Biosynthetic potential of recombinant *B. licheniformis* strains in sporulation medium.

V biosinteznem gojišču se biosintezni potencial rekombiniranih sevov ni bistveno spremenil glede na izhodni sev. Možno je, da v biosinteznem gojišču učinek povišane koncentracije proteina SinR pri *B. licheniformis* ni enak kot v sporulacijskem gojišču. Možno je tudi, da je prišlo do ločevanja plazmida pri hčerinskih celicah, saj v biosinteznem gojišču ni bilo selekcijskega pritiska.



Graf 2. Biosintezni potencial rekombiniranih sevov *B. licheniformis* BA1 pIS74 v biosinteznem gojišču. AP: alkalna proteinaza; Zn-BC: relativna koncentracija bacitracina.

Graph 2. Biosynthetic potential of recombinant strains of *B. licheniformis* BA1 pIS74 in the biosynthetic medium. AP: alkaline protease; Zn-BC: relative bacitracin concentration.

Pri rekombiniranih sevih BA1 pIS119 se je biosintezni potencial nekoliko bolj znižal kot pri BA1 pIS74, posebno pri klonih 2, 3, 4 in 5. Plazmid pIS74 ima gen *sinI*, ki je inhibitor SinR. Zato je bilo pričakovati, da bo fenotip tega plazmida šibkejši.

Rekombinirane seve bakterije *B. licheniformis* BA1 pIS74 in BA1 pIS119 smo gojili v bioreaktorju in jih po pH vrednostih, parcialnem tlaku kisika, aktivnosti alkalne proteinaze in vsebnosti bacitracina primerjali z izhodnim sevom. Ne glede na plazmid je metabolizem rekombiniranih in izhodnih sevov podoben.

SKLEPI

Očitno je, da smo z vnosom plazmidov z geni *sinI* in *sinR* spremenili biosintezni potencial proizvodnega seva *Bacillus licheniformis*. Ne vemo pa, kako, kdaj in če sta se oba gena izrazila. Za odgovor bi potrebovali rezultate raziskav *in vitro* na molekularni ravni.

Rekombinirani sevi *Bacillus licheniformis* na sporulacijskem gojišču niso sporulirali, znižala pa se je aktivnost alkalne proteinaze in vsebnost bacitracina. Na osnovi tega lahko sklepamo, da gen *sinR* v *B. licheniformis* povzroča enak fenotip kot v *B. subtilis*. V biosinteznem gojišču pa ni očitnih razlik med transformiranimi in netransformiranimi celicami, vendar je zaradi načina gojenja lahko prišlo do ločevanja in izgube plazmida. Vlogo SinR v biosinteznem gojišču bo možno preveriti na mutantah, ki imajo gen *sinR* inaktiviran, saj so te mutante stabilne tudi v odsotnosti selekcijskega pritiska.

V prihodnje bi morali:

1. v proizvodni sev BA1 klonirati plazmid s samim genom *sinI* ali *sinR*, ter ugotovljati, kako ti vplivajo na izražanje 'pozni' dogodkov v celični populaciji (encime,

- sporulacijo, antibiotike).
2. izolirati tri genetsko spremenjene seve proizvodnega seva *B. licheniformis*, in sicer brez lastnih genov *sinI*, *sinR* ter *sinIR*. Na ta način bi lahko proučevali vpliv kloniranih genov *sin* neposredno, brez morebitnega vpliva »originalnih« genov *sin*.
 3. izolirati gene *sin* iz proizvodnega seva *B. licheniformis*, jih klonirati v plazmide, ki se podvajajo po modelu »theta« in ne proizvajajo enovrvičnih intermediatov. Ti lahko v določenih primerih vstopijo v procese rekombinacije. Pri nadaljnjem delu bi morali uporabljati samo homologne gene, ker bi samo na ta način izključili morebitne napake, nastale zaradi nehomolognih (neizraženih) genov.

VIRI

- Bai, U./ Mandič-Mulec, I./ Smith, I. SinI modulates the activity of SinR, a developmental switch protein of *Bacillus subtilis*, by protein-protein interaction. *Genes Dev.*, 7(1993), 139-148.
- Dular, T. Študij vpliva povečane koncentracije beljakovin SinI in SinR na raven biosinteze bacitracina. Diplomski naloga, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 1999, 57 s.
- Konz, D./ Klens, A./ Schörgendorfer, K./ Marahiel, M. A. The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chem. Biol.*, 4(1997), 927-937.
- Mandič-Mulec, I./ Doukhan, L./ Smith, I. The *Bacillus subtilis* SinR protein is a repressor of the key sporulation gene *spo0A*. *J. Bacteriol.*, 177(1995)16, 4619-4627.
- Marahiel, M. A./ Stachelhaus, T./ Mootz, H. D. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.*, 97(1997), 2651-1673.