



МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. М. В. ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

МАЛАЯ НЕКОДИРУЮЩАЯ 6S РНК В РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА СУРФАКТИНА КЛЕТКАМИ *BACILLUS SUBTILIS*

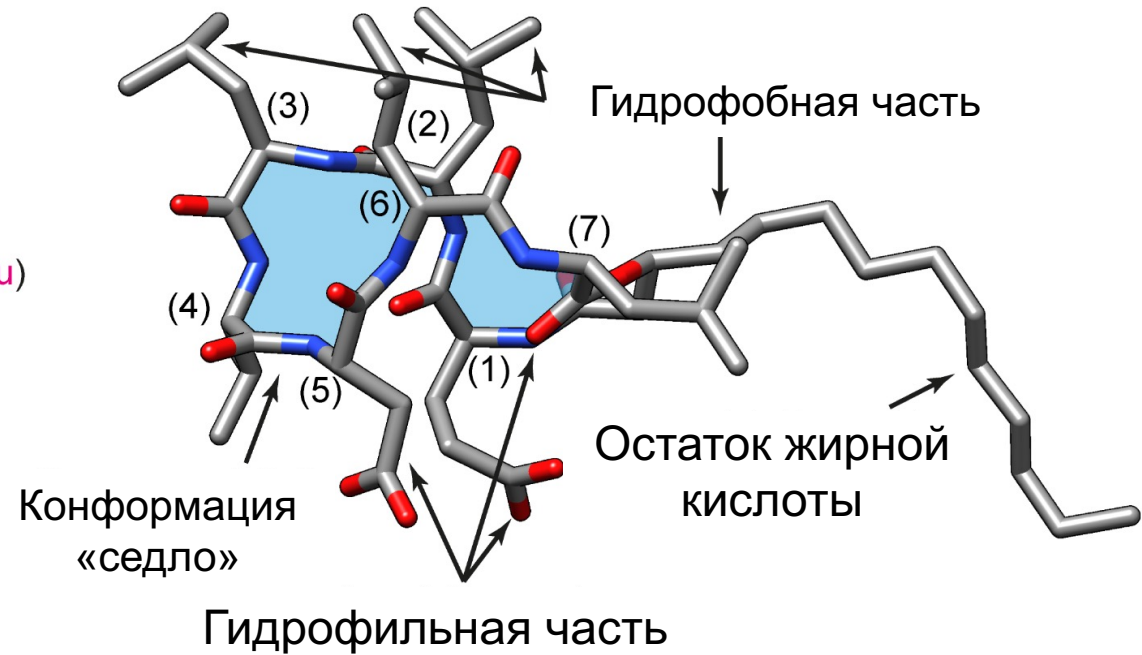
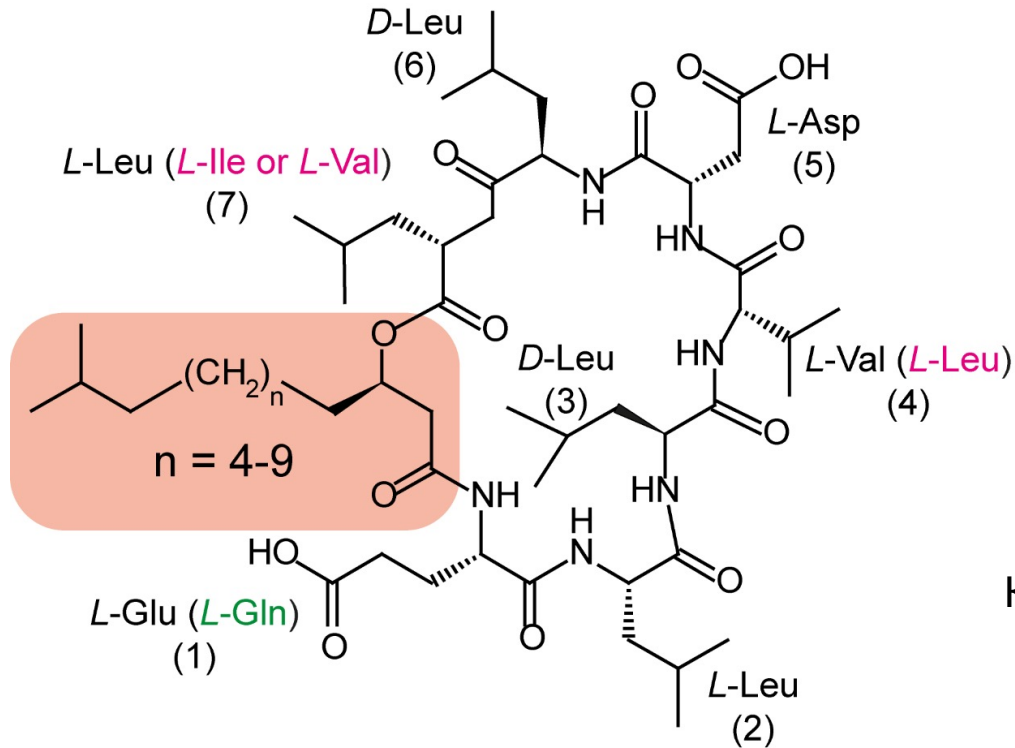
Линдин Е.Ю., Трефилов В.С., Буренина О.Ю.,
Зверева М.Э., Кубарева Е.А.



КУРЧАТОВСКИЙ
ГЕНОМНЫЙ ФОРУМ
21-22 ОКТЯБРЯ 2024

МОСКВА, 2024

СУРФАКТИН – ПРЕДСТАВИТЕЛЬ ЛИПОПЕПТИДНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ



Сурфактин

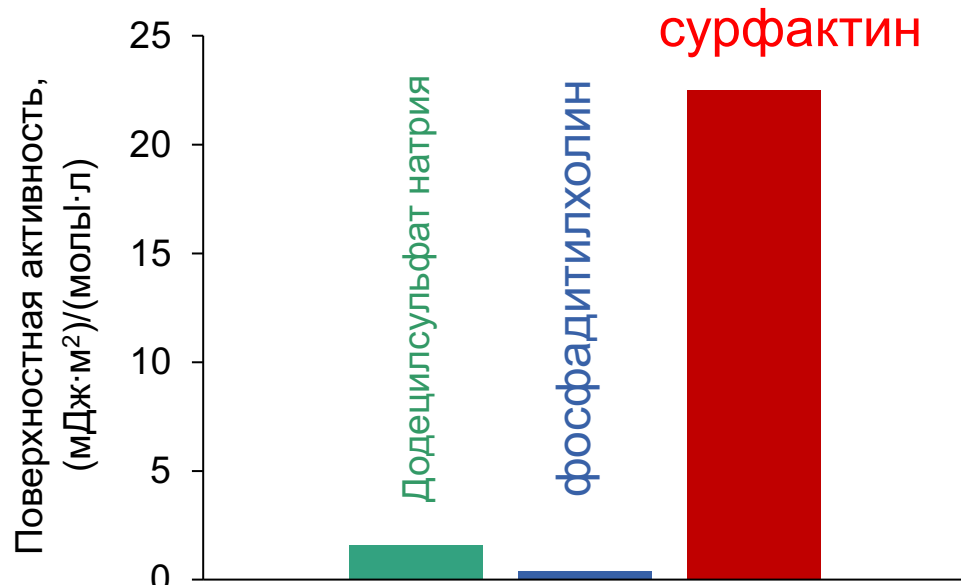
- Содержит циклический фрагмент (L-Glu₁-L-Leu₂-D-Leu₃-L-Val₄-L-Asp₅-D-Leu₆-L-Leu₇) и остаток β-гидроксикарбоновой кислоты (C₁₄-C₁₅)
- Известно несколько изоформ сурфактина
- В растворе принимает конформацию кресла или «седла», в которой гидрофобная и гидрофильные области молекулы сближены

СУРФАКТИН

Биологическая роль: активация «чувства кворума», дифференциация бактериальных клеток

Свойства:

- высокая поверхностная активность,
- биосовместимость, меньшая токсичность для живых организмов
- биоразлагаемость (гидролизуется стрептомицетами)
- способствует заживлению кожи
- антиоксидант и эмульгатор
- противовоспалительная и противоопухолевая активность

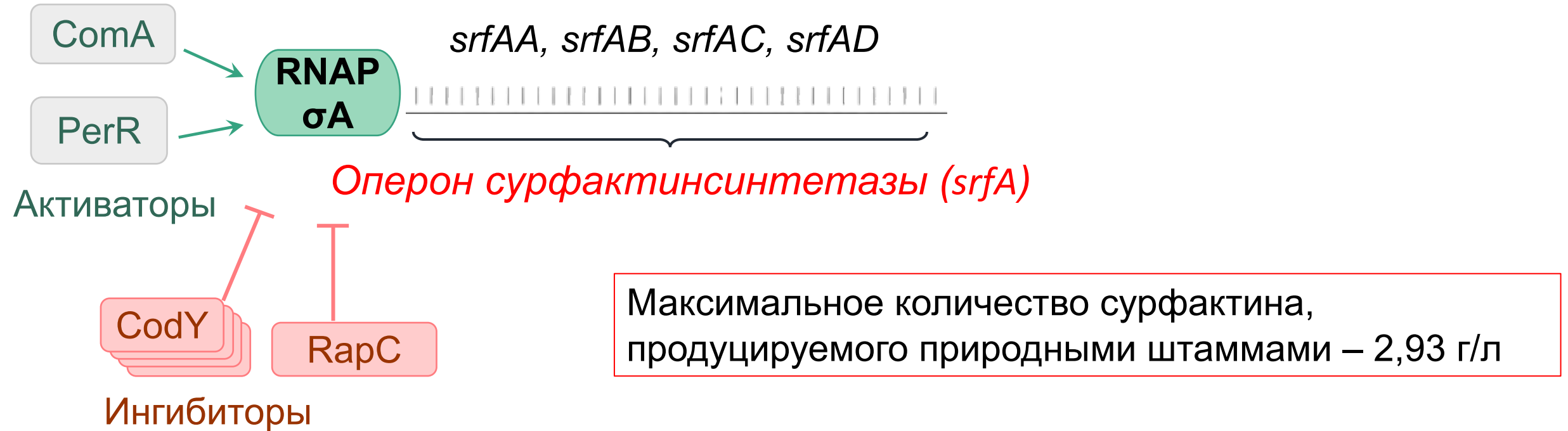


Применение:

- Сельское хозяйство,
- Добыча и очистка нефти,
- Фармацевтическая, пищевая и косметическая отрасли

БИОСИНТЕЗ СУРФАКТИНА

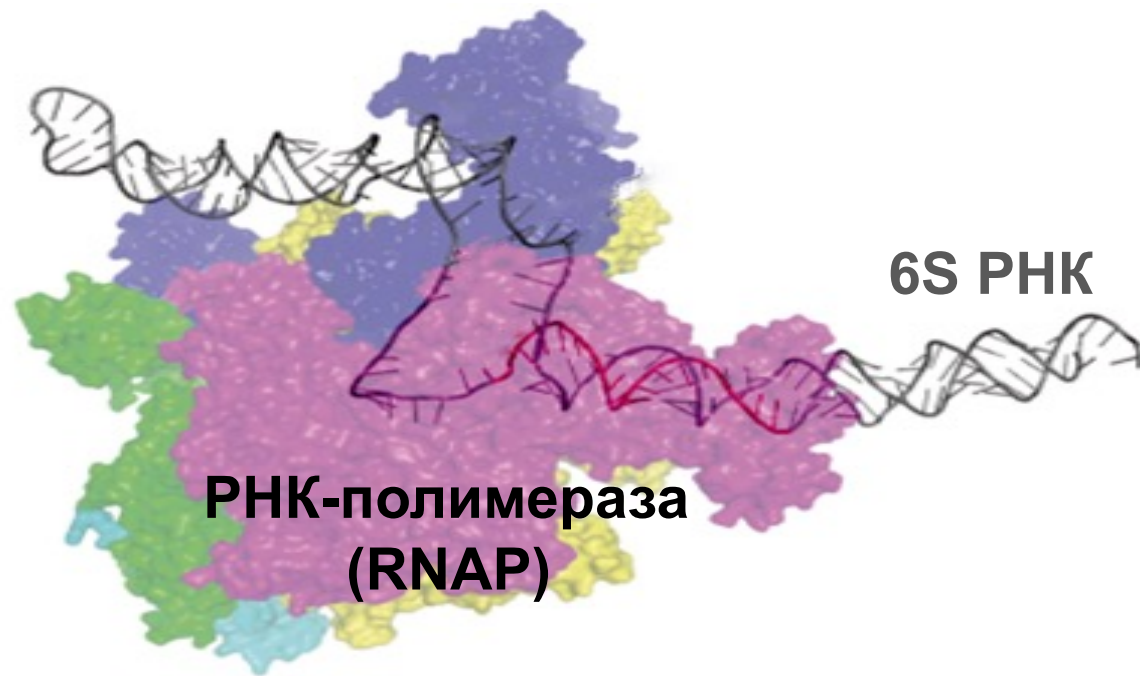
- Химический синтез протекает с низким выходом и является ресурсозатратным
- Микробиологический синтез с помощью рода *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. licheniformis*



6S РНК И БИОСИНТЕЗ СУРФАКТИНА

Почему 6S РНК?

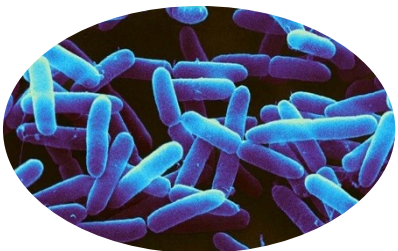
- глобальный регулятор транскрипции многих генов
- имитируя промотор, связывает РНК-полимеразу и ингибирует ее



ГИПОТЕЗА ИССЛЕДОВАНИЯ

Малые некодирующие 6S РНК влияют на биосинтез сурфактина клетками *Bacillus subtilis*

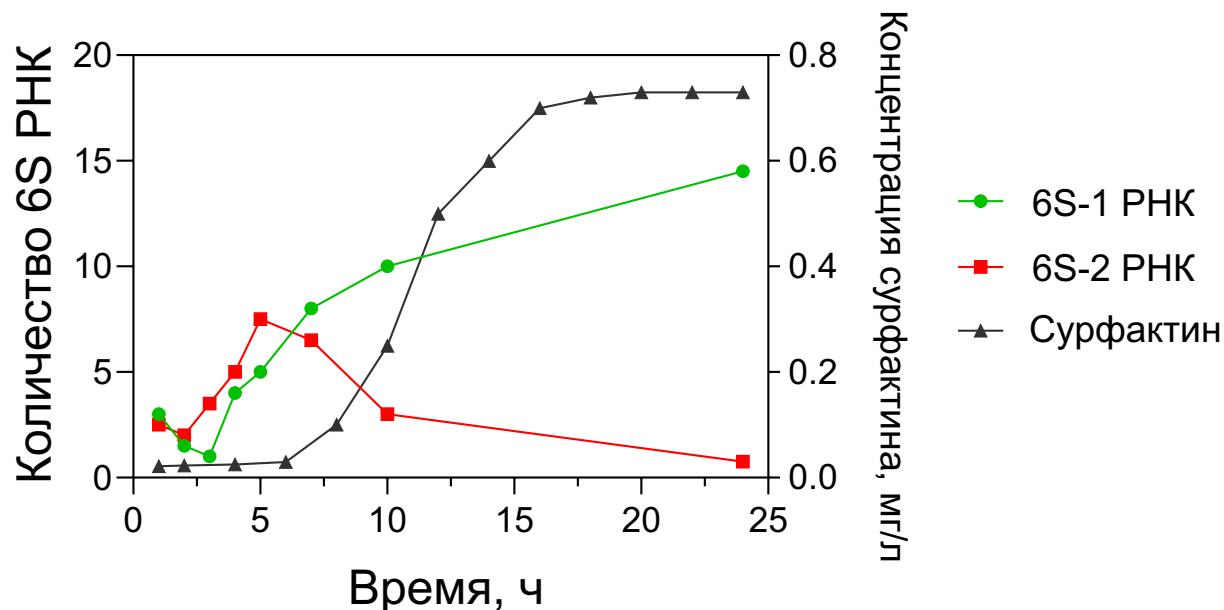
Почему *Bacillus subtilis*?



Штаммы:
Природный NCIB 3610
Лабораторный PY79

- непатогенные
- нетребовательные к питательной среде
- короткий ферментативный цикл
- облегченная секреция веществ
- **имеет две 6S РНК (6S-1 и 6S-2)**

Профиль экспрессии 6S-1 и 6S-2 РНК и количество сурфактина *B. subtilis*

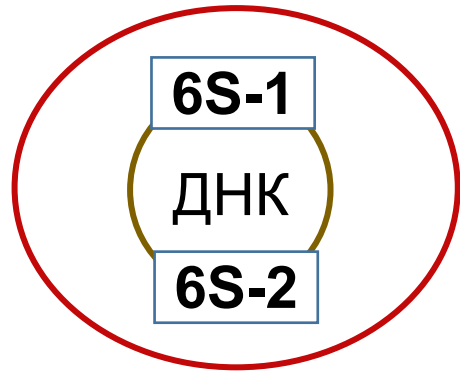


Количество 6S-1 РНК и сурфактина максимальное в поздней стационарной фазе роста

6S-2 и сурфактин участвуют в регуляции споруляции и образованию биопленок *B. subtilis*

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы *Bacillus subtilis* NCIB 3610 и PY79 с делециями генов 6S РНК



Кл. линия WT³⁶¹⁰
или WT^{PY79}



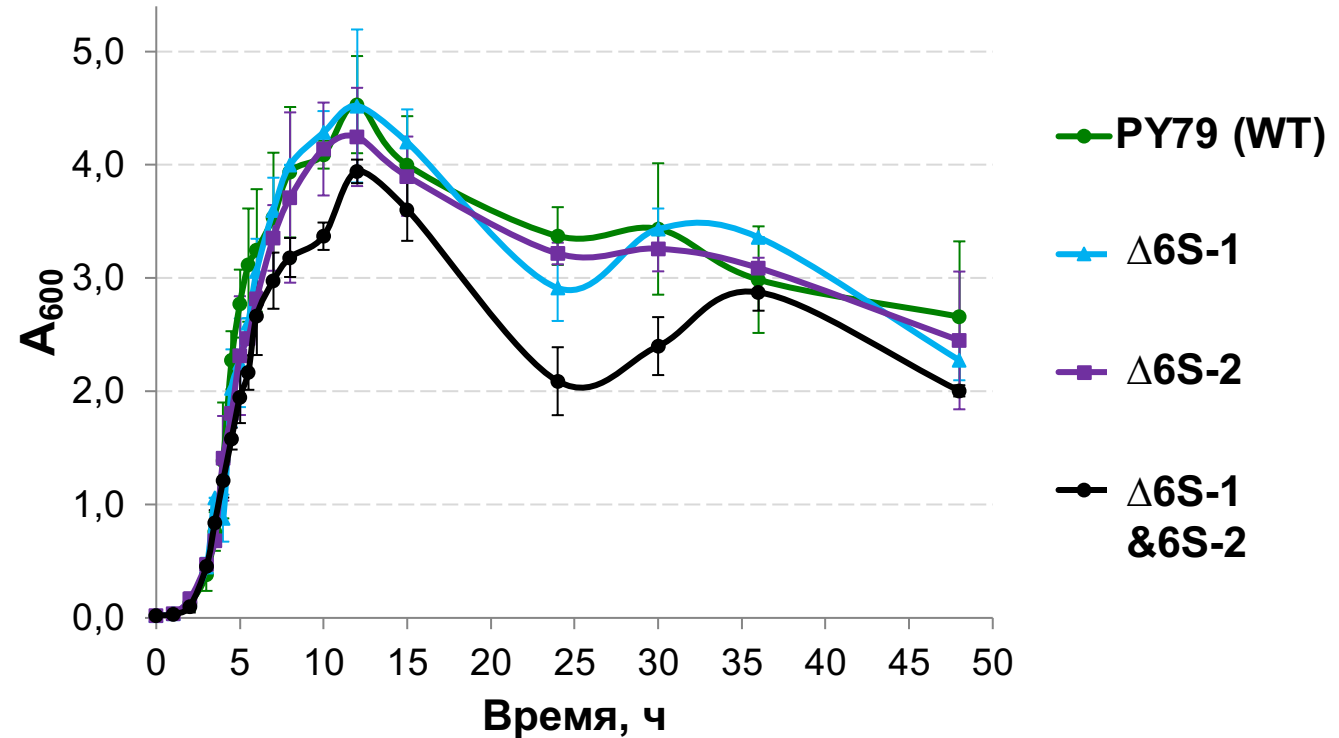
Кл. линия $\Delta 6S-2$ ³⁶¹⁰
или $\Delta 6S-2$ ^{PY79}



Кл. линия $\Delta 6S-1$ ³⁶¹⁰
или $\Delta 6S-1$ ^{PY79}

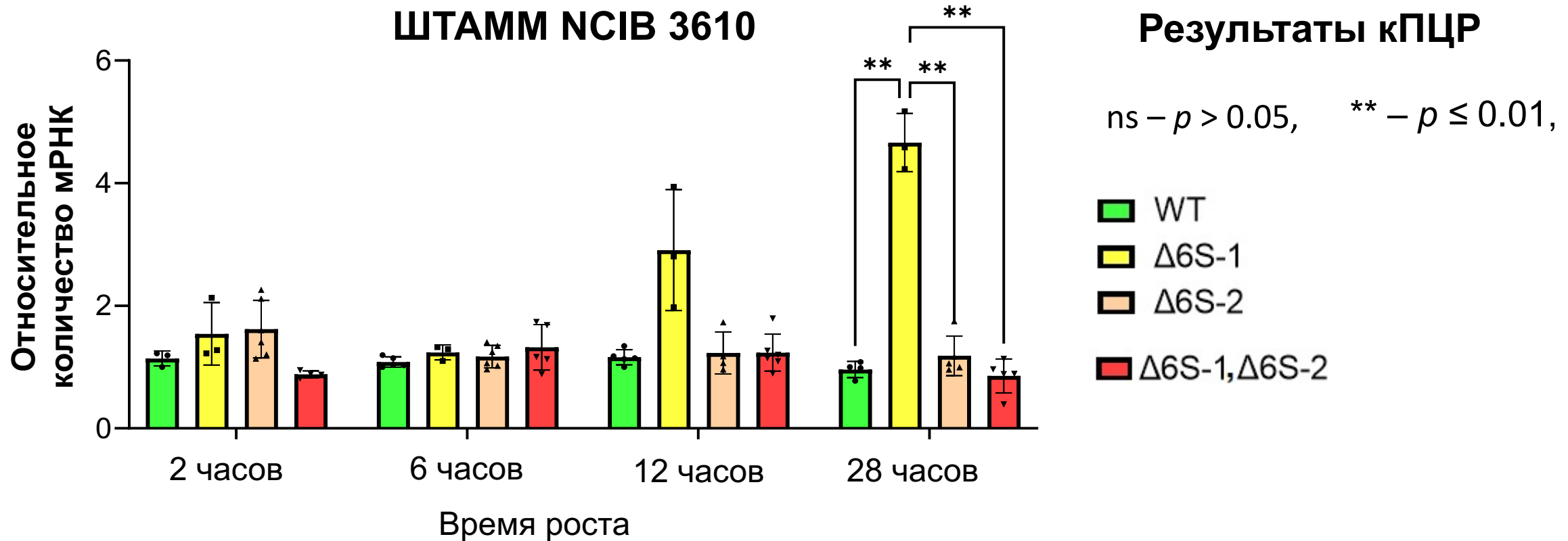


Кл. линия $\Delta 6S-1\&6S-2$ ³⁶¹⁰
или $\Delta 6S-1\&6S-2$ ^{PY79}



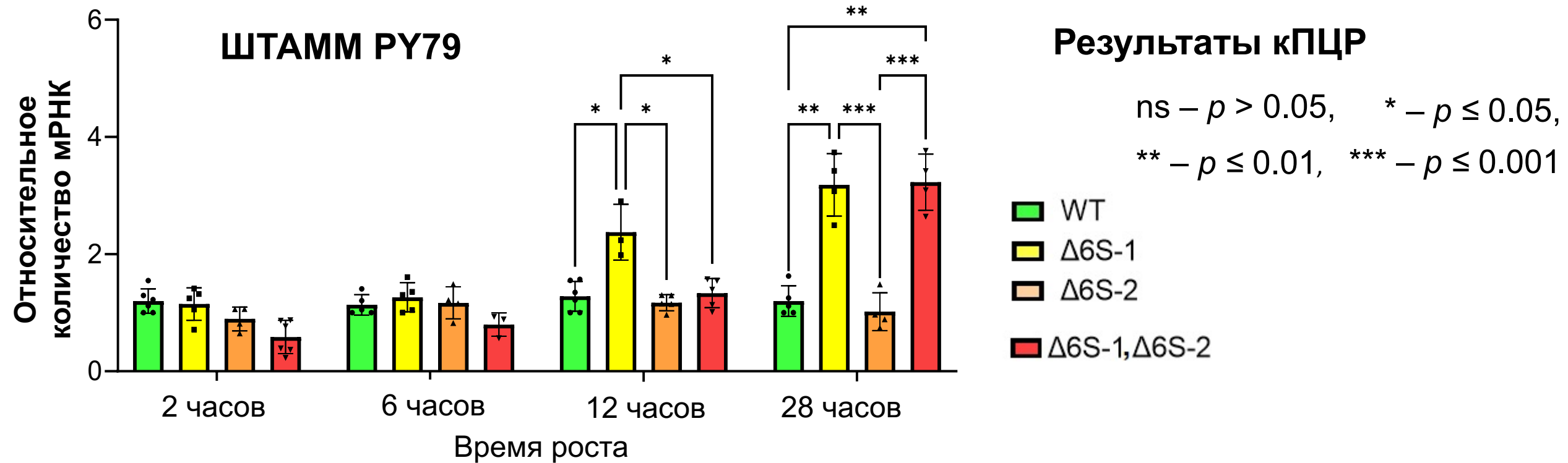
Одиночная и совместная делеции генов 6S РНК несут существенного влияния на характер клеточного роста

ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНОВ 6S РНК НА УРОВЕНЬ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНА *srfAA*, КОДИРУЮЩЕГО ПЕРВУЮ СУБЪЕДИНИЦУ СУРФАКТИНСИНТЕТАЗЫ



- Удаление 6S-1 РНК из штамма NCIB 3610 повышает эффективность транскрипции гена *srfAA* примерно в 5 раз в поздней стационарной фазе клеточного роста
- Удаление 6S-2 РНК и обеих 6S РНК не оказывает влияние на уровень транскрипции гена *srfAA*

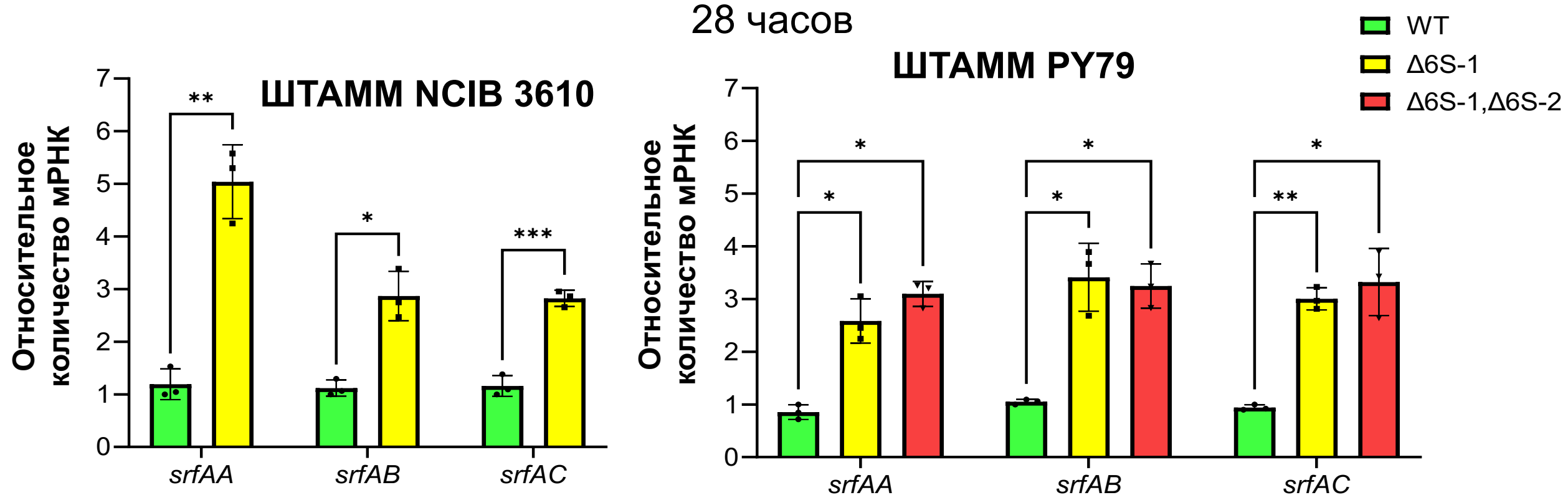
ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНОВ 6S РНК НА УРОВЕНЬ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНА *srfAA*, КОДИРУЮЩЕГО ПЕРВУЮ СУБЪЕДИНИЦУ СУРФАКТИНСИНТЕТАЗЫ



- Удаление 6S-1 РНК и обеих 6S РНК из штамма PY79 повышает эффективность транскрипции гена *srfAA* примерно в 3 раза в поздней стационарной фазе клеточного роста
- Удаление 6S-2 РНК не оказывает влияние на уровень транскрипции гена *srfAA*

ВЛИЯНИЕ ДЕЛЕЦИИ 6S НА УРОВЕНЬ ТРАНСКРИПЦИИ ОПЕРОНА *srfA* В ПОЗДНЕЙ СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЕ

Результаты кПЦР

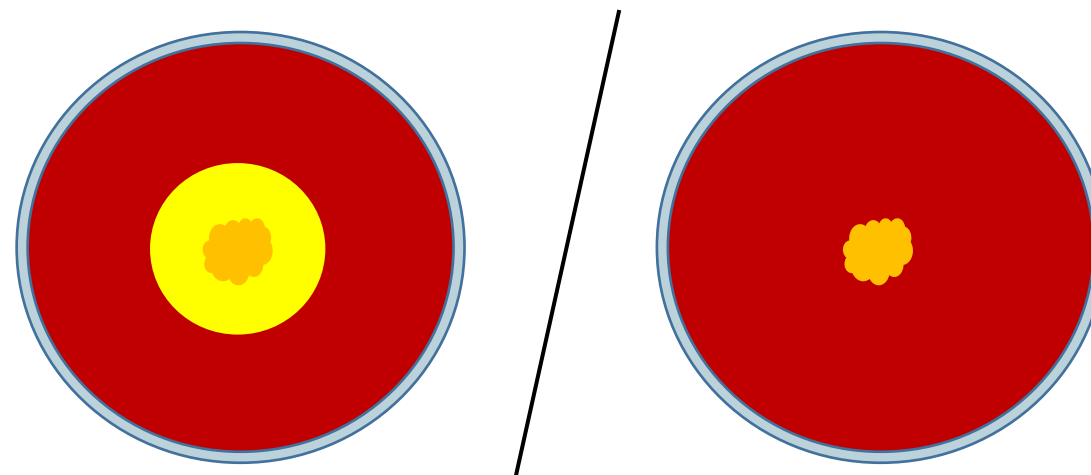
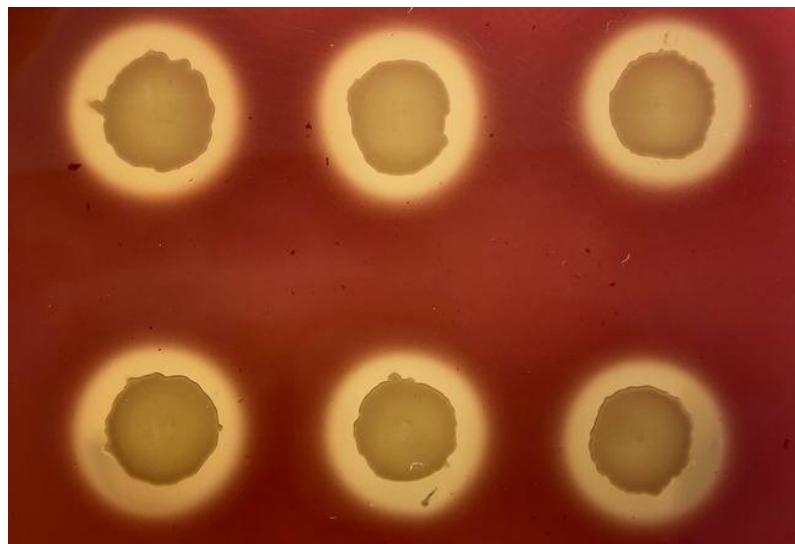


Повышение эффективности транскрипции генов, кодирующих остальные субъединицы сурфактинсинтетазы, наблюдалось для обоих штаммов ($\Delta 6S-1^{3610}$, $\Delta 6S-1^{PY79}$ и $\Delta 6S-1, \Delta 6S-2^{PY79}$) в поздней стационарной фазе клеточного роста (28 часов)

СПОСОБНОСТЬ ШТАММА К БИОСИНТЕЗУ СУРФАКТИНА

Гемолитический тест (метод кровяного агара)

NCIB
3610



+ сурфактин

+ гемолиз

- сурфактин

- гемолиз

Штамм PY79 не способен к биосинтезу
сурфактина

Штамм NCIB 3610 синтезирует сурфактин

PY79



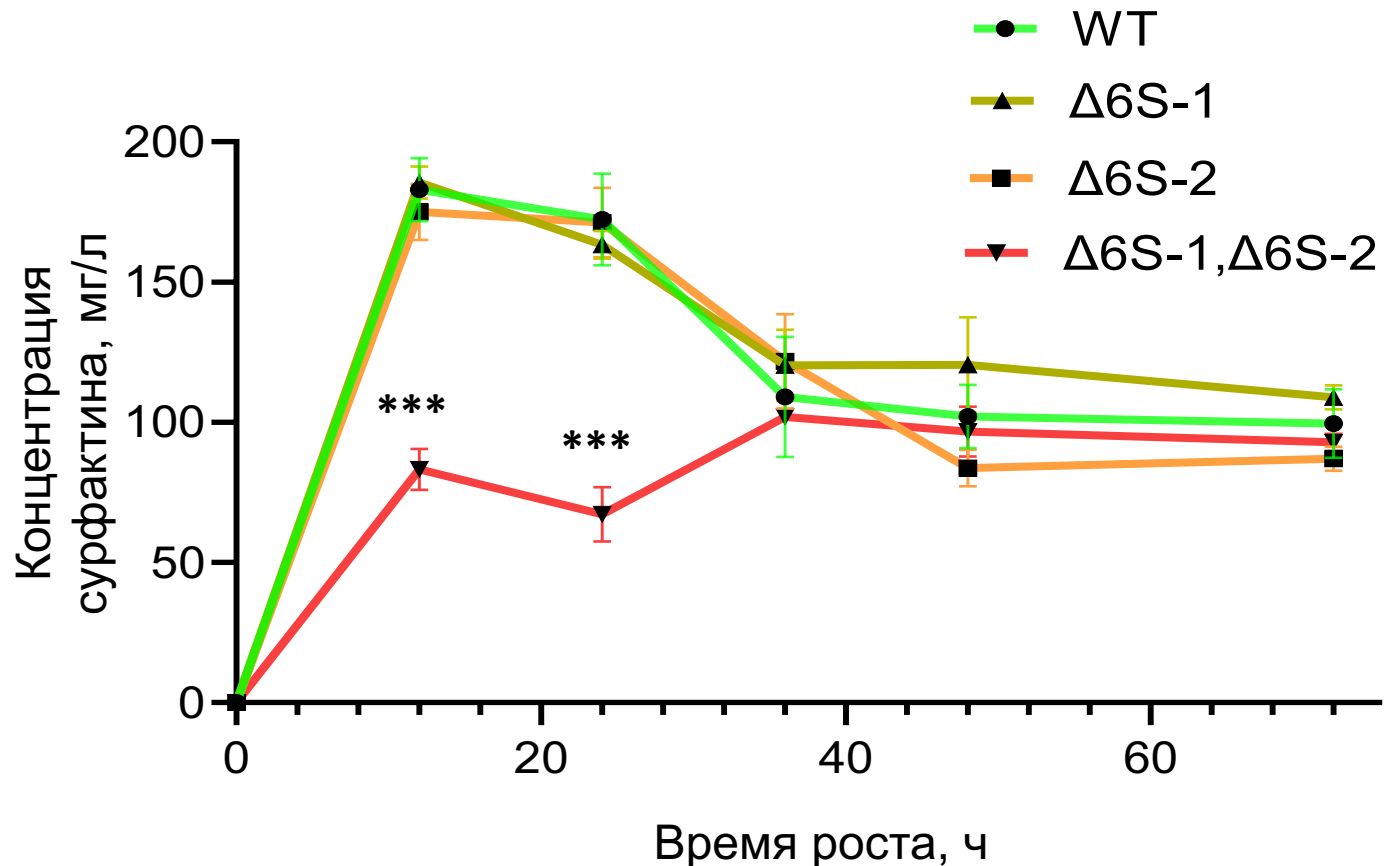
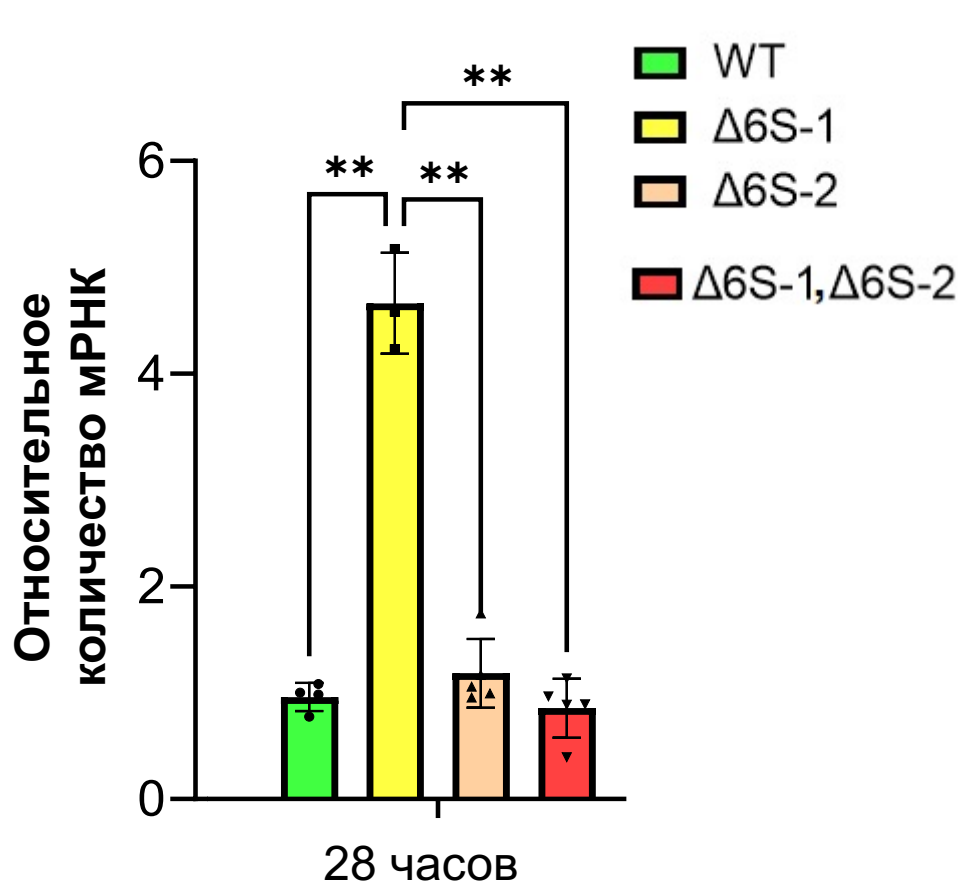
Мутация в гене **sfp** - 4'-фосфопантетеинилтрансферазы – потеря способности к биосинтезу сурфактина

Последовательность <i>sfp</i> в NCIB 3610	ГCAAAC-AGGAAGGCAAAGGCTTATCGCTTCCGCTTGATT I K Q E G K G L S L P L D ...
Последовательность <i>sfp</i> в PY79	ГCAAAC A AGGAAGGCAAAGGCTTATCGCTTCCGCTTGATT I K Q G R Q R L I A S A STOP
Последовательность <i>sfp</i> , нормированная на <i>B. subtilis</i> 168	ГCAAAC A AGGAAGGCAAAGGCTTATCGCTTCCGCTTGATT I K Q G R Q R L I A S A STOP

- Последовательность гена *sfp*, кодирующего 4'-фосфопантетеинилтрансферазу в штамме PY79 идентична последовательности референсного гена в *B. subtilis* 168, который не продуцирует сурфактин
- Штамм NCIB 3610 не имеет мутаций в гене *sfp* и способен к продукции сурфактина

Дальнейшие эксперименты проводились только со штаммом
NCIB 3610

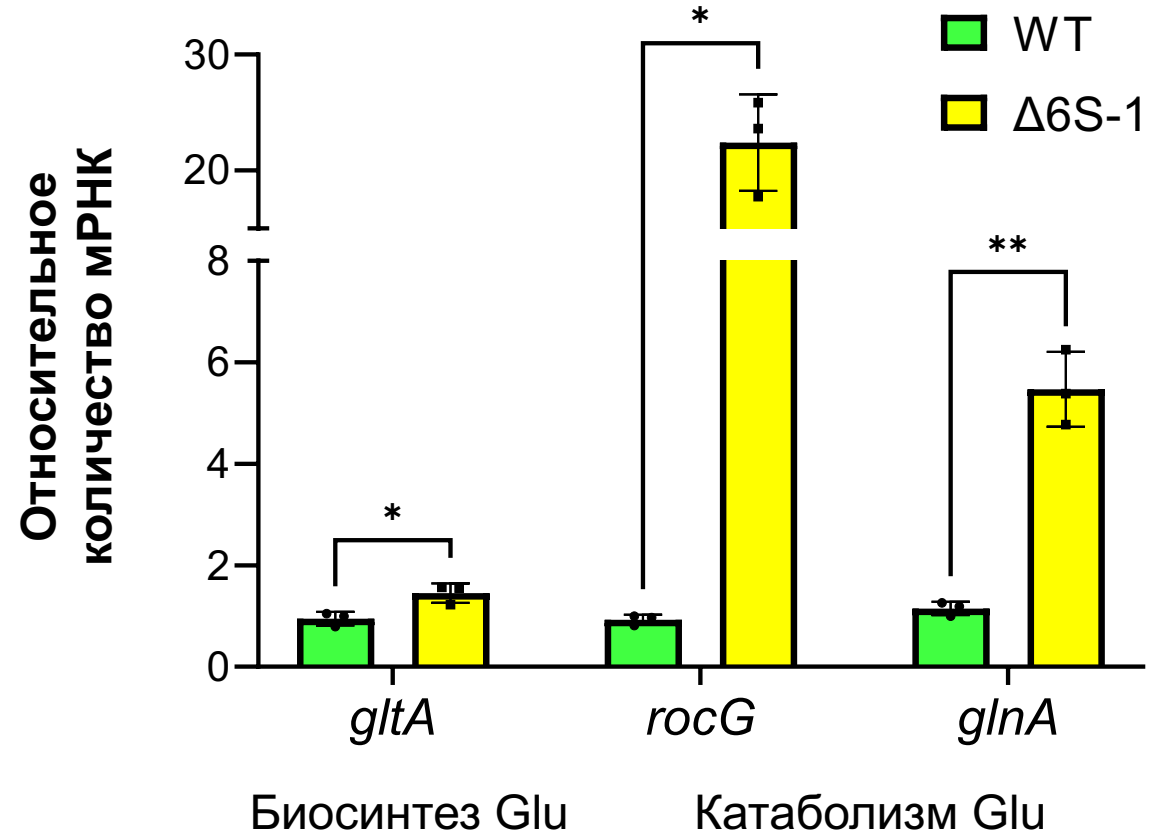
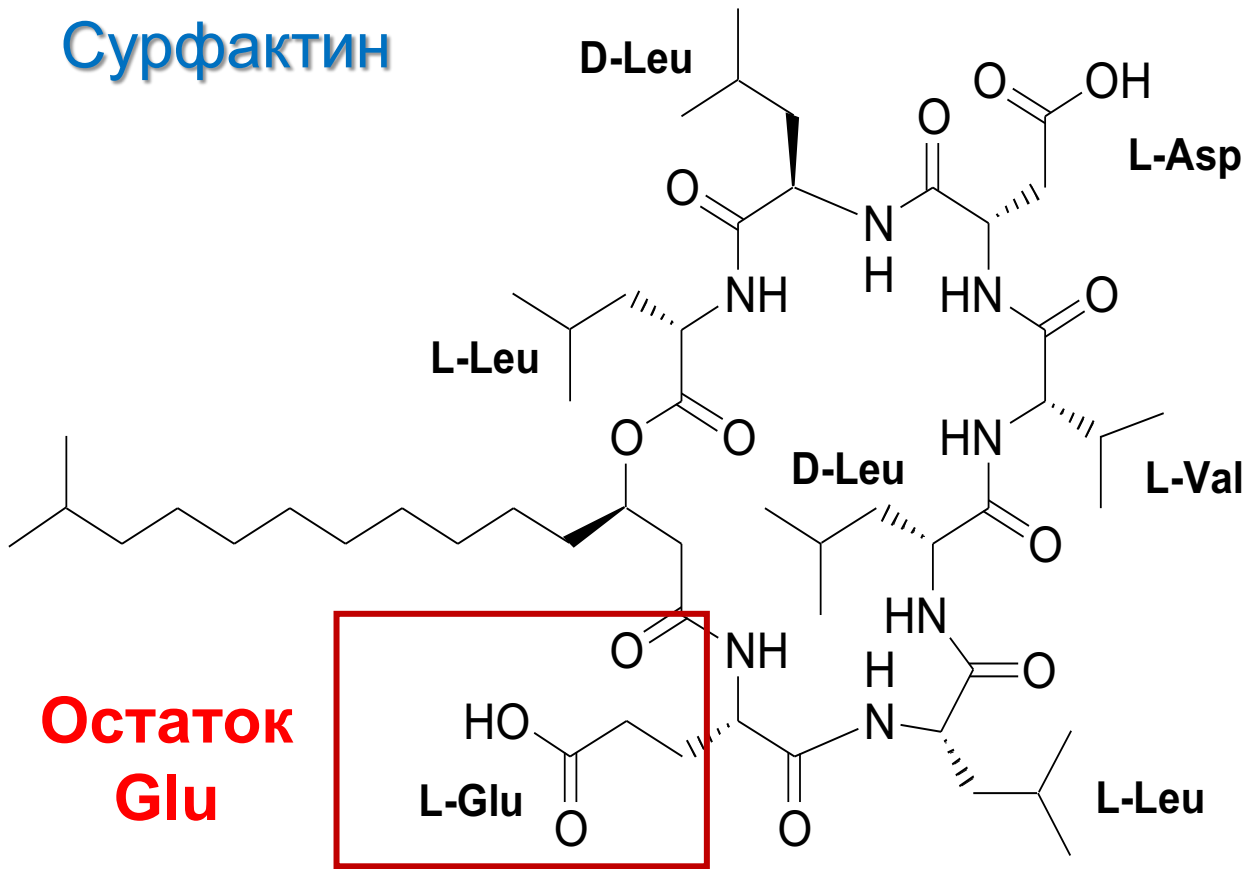
ЭФФЕКТИВНОСТЬ БИОСИНТЕЗА СУРФАКТИНА В ШТАММЕ NCIB 3610



- Несмотря на активацию транскрипции генов, кодирующих сурфактинсинтетазу, в образцах WT и Δ6S-1 количество продуцируемого сурфактина было одинаковое в поздней стационарной фазе
- Для образца с двойной делецией не наблюдалось изменений в эффективности транскрипции, однако количество сурфактина понизилось в первые 24 часа роста

ЭФФЕКТ 6S-1 РНК НА ТРАНСКРИПЦИЮ ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ С МЕТАБОЛИЗМОМ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ШТАММЕ NCIB 3610

Сурфактин



Удаление 6S-1 РНК приводит к активации генов *rocG* и *glnA*, кодирующих глутаматдегидрогеназу и глутаминсинтетазу (примерно в 20 и 5,5 раз), однако количество мРНК глутаматсинтетазы не изменяется

ВЫВОДЫ

- ✦ Делеция 6S-1 РНК, но не 6S-2 РНК в клетках *B. subtilis* PY79 и NCIB 3610 повышает уровень транскрипции генов оперона *srfA*, ответственного за биосинтез сурфактина в клетке
- ✦ Совместная делеция 6S РНК повышает уровень транскрипции генов оперона *srfA* в штамме PY79, но не имеет влияния в штамме NCIB 3610 cells
- ✦ Штамм PY79 не способен к продукции сурфактина в силу мутации в гене *sfp*, кодирующего 4'-фосфопантетеинилтрансферазу
- ✦ Делеция генов 6S-1 и 6S-2 РНК не влияет на эффективность биосинтеза сурфактина в клетках NCIB 3610.
- ✦ Делеция 6S-1 в клетках штамма NCIB 3610 приводит к повышению транскрипции генов, кодирующих белки, участвующие в метаболизме глутамата, понижая его уровень в клетке