

УДК 577.214

РЕГУЛЯЦИЯ ГЕНОВ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ФАКТОРАМИ ТРАНСКРИПЦИИ ПОДСЕМЕЙСТВА BltR

© 2011 г. И. А. Жаров^{1,2*}, М. С. Гельфанд^{2,3}, А. Е. Казаков²

¹Московский физико-технический институт, Москва, 117303

²Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук, Москва, 127994

³Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992

Поступила в редакцию 15.09.2010 г.

Принята к печати 31.11.2010 г.

Экспериментально изученный фактор транскрипции BltR *Bacillus subtilis*, входящий в семейство MerR, активирует транскрипцию генов, кодирующих транспортер множественной лекарственной устойчивости Blt и спермин/спермидин-ацетилтрансферазу BltD. В представленной работе методами сравнительной геномики изучены BltR-зависимые регулоны в геномах 25 видов бактерий. Структура промоторных областей генов, регулируемых BltR, характерна для активаторов семейства MerR: сайты связывания располагаются в увеличенных промежутках между элементами промоторов. Регулируемые гены, как правило, входят в состав одного локуса с геном регулятора и транскрибируются в противоположных с ним направлениях. У различных видов бактерий изученные факторы транскрипции регулируют гены транспортеров множественной лекарственной устойчивости и спермин/спермидин-ацетилтрансфераз. Эти транспортеры могут быть как вторичными, так и АТР-зависимыми. Однако, как показывает филогенетический анализ, их роль в клетке в качестве транспортеров множественной лекарственной устойчивости остается при этом неизменной.

Ключевые слова: сравнительная геномика, бактерии, множественная лекарственная устойчивость, полиамины, MerR.

REGULATION OF MULTIDRUG RESISTANCE GENES BY TRANSCRIPTIONAL FACTORS FROM THE BltR SUBFAMILY, by I. A. Zharov^{1,2*}, M. S. Gelfand^{2,3}, A. E. Kazakov² (¹Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, 117303 Russia; *e-mail: peshwalk@mail.ru; ²Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127994 Russia; ³Department of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia). BltR is a MerR family transcriptional factor, experimentally characterized in *Bacillus subtilis*. It activates transcription of genes encoding multidrug transporter Blt and spermine/spermidine acetyltransferase BltD. Here we studied BltR dependent regulons in 25 bacterial genomes using the comparative genomic approach. The structure of the promoter regions of regulated genes is typical for MerR family activators: the binding sites are located in long spacers between promoter elements. Regulated genes are usually co-localized with regulator genes and are divergently transcribed with them. The studied transcriptional factors regulate the transcription of multidrug transporter and spermine/spermidine acetyltransferase genes. These transporters can be either secondary or ATP-dependent. The phylogenetic analysis demonstrated that their role as multidrug transporters is conserved.

Keywords: comparative genomics, bacteria, multidrug resistance, polyamines, MerR.

Выработка у бактерий устойчивости к антибиотикам представляет собой серьезную проблему для здравоохранения. Транспортеры множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) — это мембранные белки, способные выводить структурно несходные антимикробные соединения из клетки [1]. Экспериментально охарактеризованы МЛУ-

транспортеры Bmr и Blt *Bacillus subtilis*, относящиеся к надсемейству MFS. Оба они способствуют удалению из клетки родаминовых красителей, бромистого этидия [2], фторхинолонов, акридиновых красителей, тетрафенилфосфония, хлормицетина, пуромидина, нетропсина и доксорубина [3, 4]. Bmr и Blt — гомологичные белки: их аминокислот-

Принятые сокращения: МЛУ — множественная лекарственная устойчивость; ABC — ATP Binding Cassette; MATE — Multi-drug and Toxic Compound Extrusion; MFS — Major Facilitator Superfamily.

* Эл. почта: peshwalk@mail.ru

ные последовательности идентичны на 51%. Транскрипцию генов этих транспортеров активируют белки BmrR и BltR соответственно. Некоторые субстраты BmrR (родамин 6G, тетрафенилфосфоний, астразон оранжевый и диэтил-2,4'-цианин) связываются и с BmrR, повышая его способность к взаимодействию с ДНК [5]. Эффекторы BltR не изучены. В одном опероне с *blt* расположен ген, кодирующий ацетилтрансферазу BltD. Этот фермент катализирует реакцию ацетилирования полиаминов спермина и спермидина, что приводит к их последующей деградации [6]. Примечательно, что транспортер Blt выводит из клетки не только спермидин, но и токсичные вещества [7].

Регуляторы транскрипции BmrR и BltR имеют гомологичные N-концевые домены, отвечающие за связывание с ДНК. Однако их C-концевые домены не гомологичны, поэтому можно предположить, что они связываются с различными эффекторами.

Механизм активации транскрипции также изучен экспериментально [8, 9]. В обоих случаях сайт связывания регулятора располагается между элементами –35 и –10 промоторов регулируемых оперонов. Длина промежутка между этими элементами составляет при этом 19 п.н. вместо обычных 17 п.н. Молекула ДНК в комплексе эффектор-BmrR-ДНК изогнута, причем расстояние между промоторными элементами уменьшено на длину, эквивалентную 2 п.н. Такие же деформации ДНК наблюдаются и при связывании других регуляторов семейства MerR – CueR, ZntR [10] и SoxR [11], гораздо менее сходных по аминокислотной последовательности с BltR, чем BmrR. Исходя из этого, можно предположить, что подобный принцип действия характерен и для BltR.

Цель настоящей работы – изучение BltR-зависимых регулонов в геномах бактерий. Мы идентифицировали и исследовали гомологи белка BltR, их потенциальные сайты связывания и регулируемые ими опероны в геномах 25 видов бактерий.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Сайты связывания искали в области –400...+50 п.н. относительно старта трансляции гена, аннотированного в базе данных GenBank. Для поиска промоторов использовали консенсусную последовательность промотора *B. subtilis* [12]. Поиск сайтов проводили перед всеми генами в геноме. Гены полагали принадлежащими одному оперону, если они имели одинаковое направление транскрипции, а расстояние между ними не превышало 150 п.н.

Значимость сайтов определяли при помощи метода, отличного от стандартного метода проверки соответствия [13]. Ранее было показано, что сайты связывания активаторов семейства MerR располагаются между промоторными элементами, промежутки между которыми увеличен и составляет 19 п.н. у BltR [4]. В ходе поиска сайтов это подтвер-

дилось и для гомологов белка BltR. При этом расстояние между центром палиндрома и 5'-концом элемента –35 промотора фиксировано и равно 13 п.н., поэтому с учетом этих фактов провели повторный поиск. Потенциальный сайт связывания считали значимым, если вес сайта превышал пороговое значение (принятое равным 5.00), и его центр располагался на расстоянии 13 п.н. от 5'-конца потенциального –35-элемента промотора. Этот метод применим для поиска сайтов связывания белков-активаторов. Действительно, для активации транскрипции необходимо определенное взаимное расположение сайта и промотора, в то время как расположение сайта репрессоров транскрипции может быть более свободным [14].

Белки подсемейства BltR определяли следующим способом. Сначала среди всех белков, представленных в базе данных GenBank (RefSeq) [15], по полной аминокислотной последовательности белка BmrR *B. subtilis* (gi:50812267) провели поиск его гомологов. При этом максимальное значение e-value принимали равным 3×10^{-8} , чтобы можно было включить в рассмотрение белки различных подсемейств (BmrR, BltR и TipAL-Mta). Эти подсемейства очень близки и образуют тесную группу внутри семейства MerR. К тому же, белки BmrR, BltR и Mta (в последнем случае – N-концевой фрагмент) активируют транскрипцию генов, кодирующих транспортеры МЛУ в *B. subtilis* [4, 5, 166]. В выборку включили также все белки, содержащие консервативные домены НТН_BmrR, НТН_BltR и НТН_BmrR-like, аннотированные в базе данных GenBank (CDD) [15]. Регуляторы транскрипции обычно классифицируются по их ДНК-связывающим доменам. Поэтому мы полагали, что аннотация различных консервативных ДНК-связывающих доменов приблизительно соответствует искомой классификации отобранных регуляторных белков. Этот отбор проводили на начальном этапе до строгого определения подсемейств и выбора порядка работы с ними. По аминокислотным последовательностям N-концевых доменов, отвечающих за связывание с ДНК и димеризацию этих белков, построено общее филогенетическое дерево (данные не приведены). На этом дереве 33 из 40 белков, содержащих консервативный домен НТН_BltR, располагаются на одной ветви. Кроме того, на этой ветви лежат также 12 белков, содержащих иные консервативные домены. Представителями подсемейства BltR мы считали все 45 белков этой ветви.

Нуклеотидные последовательности геномов, координаты точек старта трансляции генов, аминокислотные последовательности и консервативные домены белков взяты из базы данных GenBank [15].

Программное обеспечение. Поиск гомологов проводили при помощи программы BLASTP из семейства программ BLAST [17]. Для множественного выравнивания аминокислотных последователь-

ностей использовали программу MUSCLE [188]. Филогенетические деревья строили методом ближайшего соседа при помощи пакета программ PHYLIP [19]. Поиск сайтов связывания регуляторов и построение матриц позиционных весов выполняли с использованием пакета программ GenomeExplorer [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Регуляторы подсемейства BltR обнаружены преимущественно в геномах Firmicutes

На первом этапе работы нами проведен поиск гомологов регулятора транскрипции BltR. В 32 геномах бактерий обнаружены 45 таких белков, кодируемых хромосомными генами. Из этих геномов 30 принадлежат бактериям, относящимся к Firmicutes, и по одному – к типам Bacteroidetes и Proteobacteria. Далее в этих геномах вели поиск потенциальных сайтов связывания BltR. В основу матриц позиционных весов был положен сайт из *B. subtilis*: TATACGGTAACCATATA [4].

Потенциальные сайты связывания 33 белков подсемейства BltR найдены перед 45 оперонами в 25 геномах бактерий (табл. 1). В геномах *Dorea longicatena* и *Lactobacillus brevis* не найдено сайтов связывания, а в геномах *Clostridium leptum*, *Lactobacillus gasserii*, *L. delbrueckii*, *Listeria monocytogenes* и *Listeria innocua* найденные сайты имели вес меньше порогового. Эти геномы в дальнейшем не рассматривали. Такое распределение ортологов по бактериальным типам позволяет предположить, что произошел горизонтальный перенос генов из геномов бактерий типа Firmicutes в геномы представителей двух других типов. При этом внутри типа Firmicutes виды, геномы которых содержат ген *bltR*, образуют полифилетическую группу на таксономическом дереве.

В 25 геномах бактерий сайты связывания регуляторов подсемейства BltR находятся на фиксированном расстоянии от элемента –35 промотора

Мы установили, что палиндромный мотив связывания регулятора состоит из нечетного числа нуклеотидов. Сайт всегда располагается между элементами –35 и –10 промотора регулируемого гена. Длина промежутка между элементами промотора составляет 19 п.н., тогда как у бактерий она обычно равна 17 п.н. [211]. При этом центр палиндрома находится на фиксированном расстоянии (13 п.н.) от 5'-конца –35-элемента промотора. На диаграмме Лого (рис. 1) заметно, что палиндромный мотив перекрывается с –35-элементом промотора. Исходя из этого, принято правило определения значимости сайтов, найденных при повторном поиске (см. “Экспериментальную часть”). Однозначное взаиморасположение сайта и промотора позволяет

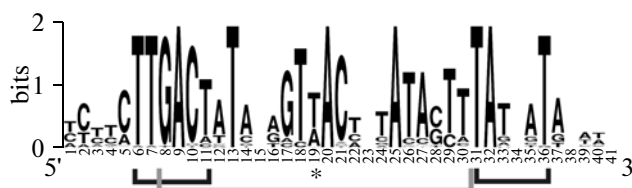


Рис. 1. Диаграмма Лого промоторных областей регулируемых генов. Черными скобками отмечены элементы промотора. Серой скобкой отмечен палиндромный мотив, звездочкой показан его центр.

предположить, что все регуляторы семейства BltR являются активаторами транскрипции.

В восьми геномах найдено более одного регулятора подсемейства BltR (рис. 2). Во всех случаях в дивергоне с геном регулятора располагается регулируемый оперон. Единственное исключение составляет геном *C. difficile*. В нем между геном, кодирующим регулятор (gi:126699120), и потенциальным регулируемым геном расположено примерно 13000 п.н. и 10 генов. При этом ген регулятора и регулируемый оперон находятся на разных цепях ДНК. В геномах *B. pumilus*, *C. bartlettii*, *C. phytofermentans*, *C. ramosum*, *C. sporogenes*, *Lysinibacillus sphaericus* и *Ruminococcus gnavus* сайты связывания регулятора обнаружены перед оперонами, не входящими в один локус с генами регуляторов. В 12 из 26 геномов найдено более одного значимого сайта связывания (рис. 2).

Белки подсемейства BltR регулируют транскрипцию генов, кодирующих транспортеры МЛУ и ацетилтрансферазы

В изученных бактериальных геномах среди регулируемых генов наиболее широко представлены гены (табл. 2), кодирующие транспортеры семейства МАТЕ (в 13 геномах), ацетилтрансферазы (в 12 геномах) и транспортеры надсемейства АВС (в 10 геномах). При этом в 9 геномах обнаружены и гены, кодирующие ацетилтрансферазы, и гены транспортеров. Ацетилтрансферазы являются близкими гомологами белка BltD из *B. subtilis* и, по-видимому, также обладают спермин/спермидин-ацетилтрансферазной активностью. Гены АВС-транспортеров, как правило, расположены тандемно (рис. 2). Транспортеры этих групп используют различные механизмы транспорта: АВС-транспортеры – энергию гидролиза АТФ, а МАТЕ-транспортеры относятся к Na^+/H^+ -антипортерам.

Субстраты указанных транспортеров определяли с помощью филогенетического анализа. С этой целью были построены филогенетические деревья транспортеров обеих групп, содержащие белки, гены которых регулируются гомологами BltR, и экспериментально охарактеризованные белки (рис. 3).

Таблица 1. Регуляторы, регулируемые гены и их промоторные области

Геном	gi-идентификатор		Вес	Нуклеотидная последовательность
	регулятор	регулируемый белок		
<i>Alkaliphilus metalliredigens</i>	150388453	150388452	6.41	TTGACTatagtggttacaccatacttTATTAT
<i>A. oremlandii</i>	158319861	158319860	6.25	TTGACTataagataaaccttatagttTATAAT
<i>Anaerostipes caccae</i>	167746581	167746582	5.93	TTGACTttacacctactgaatacttTAAGGT
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	154685067	154685066	6.29	TTGACTatacggtaaacatataccttTATGAT
<i>B. halodurans</i>	15616608	15616607	5.82	TTGACTatcgtgttacaccacacctTAGTAT
<i>B. pumilus</i>	157692587	157692588	5.72	TTGACTatggagttactccacccttTATGAT
–	–	157693118	5.50	TTTACTctagagttactccatacttTACACT
<i>Bacillus</i> sp. B14905	126650590	126650591	6.54	TTGACTatataagtaactatatacttTAGATT
<i>B. subtilis</i>	16079711	16079712	6.45	TTGACTatacggtaaacatatacctTATGAT
<i>Bacteroides capillosus</i>	154496178	154496179	5.71	TTGACTgtcgggttacccgatactcTATAAT
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	15896684	15896685	6.03	TTGACTatataagttacaatatccctTATTAT
<i>C. bartlettii</i>	164687741	164687742	6.26	TTGACTatcctgttactgaatacttTAGTAT
–	–	164688754	6.29	TTGACTatggagttactccatagttTATTAT
–	–	164688081	5.15	TTGACAttaaagtaactggaaacttTACACT
<i>C. bolteae</i>	160941689	160941690	6.16	TTGACTatcgggttacccatagcaTATGAT
–	–	160940294	5.25	TTGACTctaaagctactttatggttTATAGT
<i>C. botulinum</i>	148378886	148378885	6.18	TTGACTattgagtaactctatacttTATAAT
–	–	148379916	6.51	TTGACTataaggtaacattatagttTATGAT
<i>C. butyricum</i>	182420230	182420239	5.99	TTGACTatcctgttacaggatacctTATTAT
<i>C. difficile</i>	126698600	126698601	6.42	TTGACTatcctgttacagtatagttTATCAT
–	–	126699657	6.15	TTGACTttagggttacagatacttTAGGAT
–	–	126699120	6.43	TTGACTatataagttactatataagctTATTAT
<i>C. phytofermentans</i>	160881741	160881740	5.99	TTGACTatggagctactccatacttTATATT
–	–	160878259	5.66	TTGACTataagacgaccttatagttTATAAT
–	–	160879754	5.89	TTGACAatataagttactatataccttTATAGT
–	–	160880229	5.51	ATGACTatcatgtaaatttatagtaTATTGT
<i>C. ramosum</i>	167754927	167754926	6.66	TTGACTataaggttaccttatagttTATCAT
–	–	167754837	5.51	TTGACTatacgcctagacaatagttTAGAGT
–	–	167755192	6.00	TTGACTataaggttaactcttatagttTAAGAT
–	–	167755703	6.06	TTGACTttacagtaactgtagacttTATGAT
<i>Clostridium</i> sp. L2-50	160894538	160894539	6.48	TTGACTatagggttaccctatagtaTATGCT
<i>C. spiroforme</i>	169351488	169351487	6.26	TTGACTataaggtaaccttatagttTATTAT
–	–	169351323	5.25	TTGACAttacagttactgtatatttTATCAT
–	–	169347356	6.13	TTGACAttacagttactgtatacttTATCAT
<i>C. sporogenes</i>	187779436	187779437	6.51	TTGACTataaggtaacattatagttTATCAT
–	–	187780222	5.46	TAGACTatataaattaccatattttTAGTAT
–	–	187778000	6.00	TTGACTattgagtaactccatacttTATAAT
<i>Desulfotalea psychrophila</i>	51244047	51244048	5.35	TTGACCatatagttactatataccgTATAAG
<i>Eubacterium dolichum</i>	160916222	160916223	5.37	TTGATCttacagttactgtatagttTATCAT
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	169829923	169829924	6.54	TTGACTatataagtaactatatacttTAAATT
–	–	169828740	6.02	TTGACTatataagttactatacagttTAAAAT
<i>Ruminococcus gnavus</i>	154505010	154505009	6.13	TTGACAttacagttactgtatacttTATCAT
–	–	154504419	5.62	TTGACCatcgtcttactctatagttTATTGT
<i>R. torques</i>	153815902	153815901	5.71	TTGACTgtacagttactgtacattaTATGAT
–	–	153815375	5.44	TTGAGTatataagtaacaatataccaTATAAT

Примечание. Положение промоторной области указано относительно старта трансляции. Элементы промотора выделены прописными буквами. Серым выделены позиции сайта связывания, совпадающие с консенсусом.

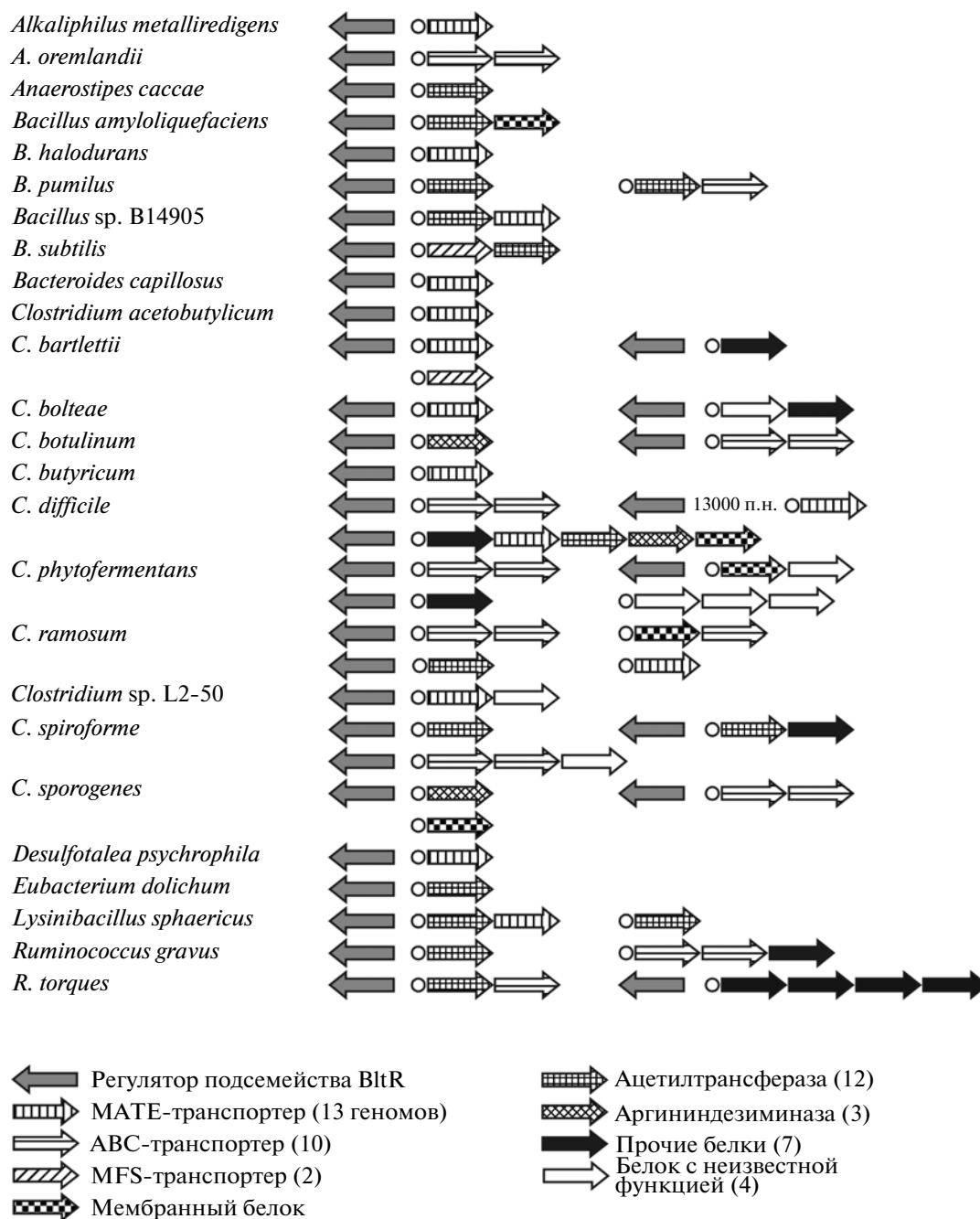


Рис. 2. Структура BltR-зависимых регулонов. Кружками отмечены потенциальные сайты связывания регуляторов подсемейства BltR.

На обоих деревьях изученные нами транспортеры располагаются на отдельной ветви.

Один из изученных в данной работе МЭТЕ-транспортеров (gi:126699109 из *C. difficile*) ранее был охарактеризован экспериментально [22]. Он выводит из клетки бромистый этидий и акрифлавин и относится к Na^+ -антипортерам (см. табл. 3). Кроме того, бромистый этидий стимулирует транскрипцию гена этого транспортера [22]. В число транспортеров МЛУ входят все экспериментально охарак-

теризованные белки семейства МЭТЕ [23]. Ближайшие экспериментально изученные гомологи АВС-транспортеров, как можно предположить, также являются транспортерами МЛУ (рис. 3, табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе показано, что регуляторы подсемейства BltR встречаются почти исключительно у бактерий типа Firmicutes. Только в двух случаях эти регуляторы найдены у бактерий других типов

Таблица 2. Функциональные типы регулируемых генов

Геном	Количество регуляторов	Количество сайтов	Наличие генов в регулоне							
			ABC	MATE	MFS	Мембранный белок	Ацетилтрансфераза	Аргининдезиминая	Прочие белки	
<i>Alkaliphilus metalliredigens</i>	1	1		D						
<i>A. oremlandii</i>	1	1	D							
<i>Anaerostipes caccae</i>	1	1					D			
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1				D	D			
<i>B. halodurans</i>	1	1		D						
<i>B. pumilus</i>	1	2	D				D/S			
<i>Bacillus</i> sp. B14905	1	1		D			D			
<i>B. subtilis</i>	1	1			D		D			
<i>Bacteroides capillosus</i>	1	1		D						
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	1	1		D						
<i>C. bartlettii</i>	2	3		D	S					D
<i>C. bolteaе</i>	2	2		D						D
<i>C. botulinum</i>	2	2	D					D		
<i>C. butyricum</i>	1	1		D						
<i>C. difficile</i>	3	3	D	D		D	D	D	D	D
<i>C. phytofermentans</i>	3	4	D			D				D/S
<i>C. ramosum</i>	2	4	D/S	S		S	D			
<i>Clostridium</i> sp. L2-50	1	1		D						D
<i>C. spiroforme</i>	3	3	D				D			D
<i>C. sporogenes</i>	2	3	D			S		D		
<i>Desulfotalea psychrophila</i>	1	1		D						
<i>Eubacterium dolichum</i>	1	1					D			
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	1	2		D			D/S			
<i>Ruminococcus gnavus</i>	1	2	S				D			S
<i>R. torques</i>	2	2	D				D			D

Примечание. D – ген располагается в дивергоне с регулятором. S – ген не входит в один локус с регулятором. Пустая ячейка – отсутствие гена в регулоне.

(*Bacteroides capillosus* и *Desulfotalea psychrophila*). Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей регуляторных белков трех родственных подсемейств BltR, BmrR и TirAL/Mta позволил выделить группу из 45 белков, формирующих отдельную ветвь на филогенетическом дереве. Подавляющее большинство из этих белков имеют N-концевой ДНК-связывающий домен, аннотированный в базе данных NCBI CDD как HTH_BltR. Таким образом, можно утверждать, что все эти белки принадлежат к подсемейству BltR. В трех из этих 45 белков в базе данных NCBI CDD аннотирован ДНК-связывающий домен типа HTH_BmrR-like (gi: 16803170, 16800165, 116333464) и в одном – домен типа HTH_BmrR

(gi:1160932044). Еще в шести белках аннотирован ДНК-связывающий домен HTH_MerR-SF без указания подсемейства (gi: 153856027, 153815375, 227520881, 160916222, 169347356, 154505010). В четырех из этих белков (gi: 153815375 160916222, 169347356, 154505010) мы нашли сайт связывания, типичный для подсемейства BltR, что служит дополнительным аргументом в пользу отнесения этих белков к данному подсемейству.

Филогенетическое дерево белков подсемейства BltR не соответствует таксономическому дереву типа Firmicutes. Можно предположить, что эти регуляторные системы неоднократно утрачивались в ходе эволюции или передавались посредством горизонтального переноса. Ортологи генов транс-

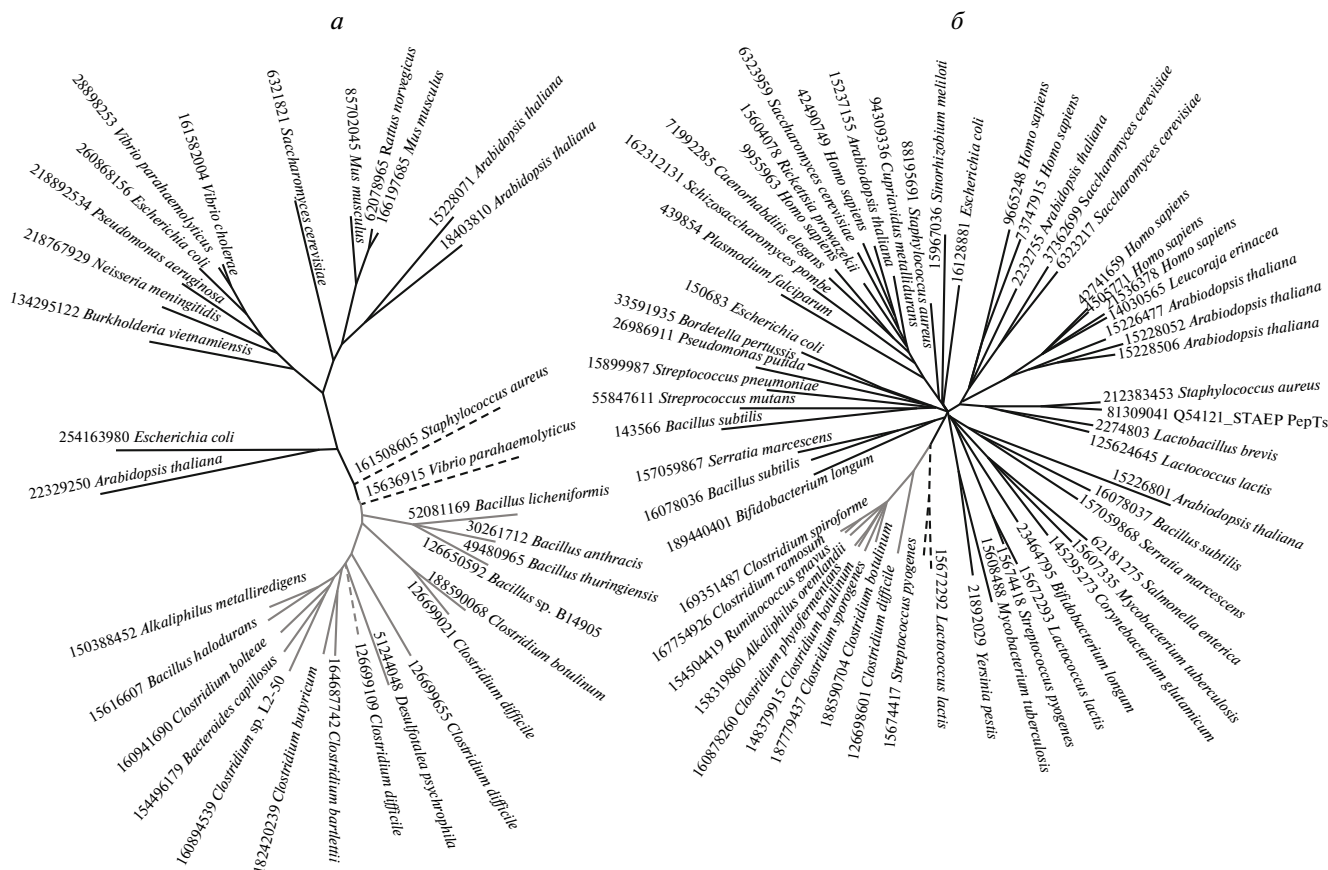


Рис. 3. Филогенетические деревья транспортеров семейства МАТЕ (а) и надсемейства АВС (б). Подписи к листьям указывают gi-идентификаторы белков. Черным показаны экспериментально охарактеризованные белки. Серым показаны белки, изученные в данной работе. Пунктиром отмечены экспериментально охарактеризованные белки, изученные в данной работе.

портных белков и других белков МЛУ, регулируемых активаторами подсемейства BltR, присутствуют в гораздо более широком наборе геномов (данные не приведены), чем изученные регуляторные белки. Мы предполагаем, что в таких геномах экспрессия генов транспортеров МЛУ может регулироваться другими механизмами.

Механизм активации транскрипции регуляторами семейства MerR известен на примере белка BmrR из *B. subtilis*. Активатор, связываясь с ДНК, приводит к ее изгибанию и сокращению расстояния между элементами промоторов [8, 9], что делает возможным связывание РНК-полимеразы с промотором. В ходе исследования установлено, что сайты связывания регуляторов подсемейства BltR расположены в промежутке между промоторными элементами и перекрываются с -35 -элементом. Длина промежутка между элементами промоторов равна 19 п.н., тогда как для бактерий типична длина 17 п.н. [21]. То же верно и для экспериментально изученных сайтов связывания белков BltR и BmrR *B. subtilis*. Из этого следует, что изученные нами регуляторы, скорее всего, являются активаторами транскрипции.

Гены, кодирующие изученные регуляторы подсемейства BltR, в подавляющем большинстве случаев расположены в одном локусе с регулируемым геном, но транскрибируются в противоположном направлении, образуя дивергоны. Исключение представляет лишь *C. difficile*, в геноме которого между регулятором и регулируемым геном *cdeA* расположены 10 генов. Можно предположить, что в данном случае произошел разрыв дивергона вследствие вставки фрагмента ДНК, содержащего эти гены. Ранее экспериментально показали, что бромистый этидий служит субстратом для CdeA, а транскрипция гена *cdeA* стимулируется при его добавлении в среду [22]. В то же время, бромистый этидий выводится из клеток *B. subtilis* транспортером Bmg и служит эффектором для BmrR [5]. Исходя из этого, можно предположить, что функциональность регулятора сохранилась и у *C. difficile*, а бромистый этидий — один из его лигандов.

В восьми из 26 геномов обнаружено более одного регулятора подсемейства BltR. В семи геномах найдены потенциальные регулируемые гены, вблизи которых отсутствуют регуляторы подсемейства BltR. Однако сайты, расположенные перед этими гена-

Таблица 3. Экспериментально изученные транспортеры, гомологичные анализируемым в данной работе

Организм	Белок	Семейство	Субстрат	Ссылка
<i>Bacillus subtilis</i>	Vmr	MFS	Бромистый этидий, тетрафенилфосфоний, родамин 6G, акрифлавин, фторхинолоны, хлоромидетин, пурамицин, нетропсин, доксорубицин	2, 3, 4
<i>B. subtilis</i>	Blt	MFS	То же и спермидин	4, 7
<i>Clostridium difficile</i>	CdeA	MATE	Бромистый этидий, акрифлавин	22
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	VmrA	MATE	Бромистый этидий, тетрафенилфосфоний, акрифлавин, 4,6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI)	23, 24
<i>Staphylococcus aureus</i>	MerA	MATE	Бромистый этидий, тетрафенилфосфоний, DMG-MINO, тигециклин, ципрофлоксацин, норфлоксацин, пентамидин, хлористый бензалконий, цетримид, хлоргексидин, деквалиний, акрифлавин, кристаллический фиолетовый, 4,6-диамидино-2-фенилиндол, Hoechst 33342, пиронин Y, родамин 6G, триметиламмоний-1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен (ТМА-DPH)	25, 26
<i>Lactococcus lactis</i>	LmrCD	ABC	Бромистый этидий, даунорубицин, 2',7'-бис(карбоксиэтил)-5(6)-карбоксифлуоресцеин, пентаацетоксиметилловый эфир (BCECF-AM), Hoechst 33342, родамин 6G, холевая кислота	27, 29
<i>Streptococcus pyogenes</i>	RscAB	ABC	Не исследованы	29

ми, были значимыми и аналогичными сайтам перед генами, расположенными в одном локусе с геном регулятора. В этом случае возможна или регуляция транскрипции таких генов регуляторами, гены которых расположены в других локусах, или потеря регуляции при сохранении сайта связывания. Если в геноме присутствует лишь один ген регулятора подсемейства BltR (как у *B. pumilus*, *L. sphaericus* и *R. gnavus*), то этот регулятор связывается с данными сайтами. Если же в геноме присутствует более одного гена, кодирующего гомолог BltR (*C. bartlettii*, *C. phytofermentans*, *C. ramosum* и *C. sporogenes*), то невозможно определить, какому из них соответствует данный сайт. Поскольку число значимых сайтов в геноме не превышает числа регуляторов более чем на два, рассмотренные в работе регуляторы являются локальными.

В представленной работе применен новый метод определения значимости сайтов. Сайт считали значимым, если он расположен на фиксированном расстоянии от элементов промотора, промежуток между элементами промотора увеличен, а вес сайта превышает пороговое значение. Этот метод пригоден для поиска сайтов связывания активаторов транскрипции семейства MerR. Тем не менее, идентификация генов, перед гомологами которых в большем числе геномов найдены сайты связывания белков подсемейства BltR, как регулируемых, относительно более надежна.

Среди генов, регулируемых белками подсемейства BltR, наиболее многочисленны гены транспортеров и спермин/спермидин-ацетилтрансфераз. Среди этих белков экспериментально охарактеризованы MFS-транспортер Blt [4, 7], ацетилтрансфераза BltD [6] из *B. subtilis* и MATE-транспортер CdeA из *C. difficile* [22]. Гены MFS-транспортеров регулируются только в геномах *B. subtilis* и *C. bartlettii*, при-

чем соответствующие белки не гомологичны. Ближайшие экспериментально изученные гомологи MATE-транспортеров – белки VmrA *Vibrio parahaemolyticus* [23, 24] и MerA *Staphylococcus aureus* [255, 266], и гомологи ABC-транспортеров – YdaG и YdbA (LmrCD) *Lactococcus lactis* [27, 28] и RscAB *Streptococcus pyogenes* [29]. VmrA и MerA, подобно всем транспортерам семейства MATE, относятся к транспортерам МЛЮ [23], как и LmrCD, тогда как только предполагается, что RscAB играет эту роль (табл. 3). Поэтому можно думать, что анализируемые в нашей работе белки семейства MATE – это транспортеры МЛЮ. С меньшей степенью достоверности можно предположить, что такую функцию выполняют и ABC-транспортеры.

Интересно, что эти транспортеры используют различные механизмы транспорта. MFS-транспортеры – это H⁺-антипортеры, а среди MATE-транспортеров встречаются как H⁺, так и Na⁺-антипортеры. Экспериментально изученный MATE-транспортер CdeA *C. difficile* относится к Na⁺-антипортерам [22]. По-видимому, его гомологи, рассмотренные в нашей работе, также используют Na⁺-зависимый механизм транспорта. ABC-транспортеры используют энергию гидролиза АТФ. Таким образом, регуляция и функции изученных нами систем транспорта, вероятно, одинаковы, несмотря на различие в способах экспорта токсичных веществ.

Регуляция генов ацетилтрансфераз, гомологичных BltD *B. subtilis*, в 12 геномах из 25 позволяет предположить, что изученная регуляторная система имеет отношение к метаболизму полиаминов в грамположительных бактериях. Возможно, регулируемые транспортеры могут выводить спермидин из клетки, подобно Blt. Известно, что в клетках *Escherichia coli* ацетилирование спермидина приводит к его деградации и стимулируется его избытком в

клетке или среде, а также при низких температурах [30], тепловом шоке, пониженной кислотности и воздействии этанола [31]. Состав изученных регулонов позволяет предположить, что существует связь между системами МЛУ и метаболизма полиаминов у бактерий типа Firmicutes. Эта связь представляет собой предмет дальнейших исследований.

Работа получила частичную поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (08-04-01000 и 10-04-00431), программы “Молекулярная и клеточная биология” Российской академии наук и Государственного контракта 02.740.11.0101.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grkovic S., Brown M.H., Skurray R.A. 2002. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 671–701.
2. Neyfakh A.A., Bidnenko V.E., Chen L.B. 1991. Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 4781–4785.
3. Neyfakh A.A. 1992. The multidrug efflux transporter of *Bacillus subtilis* is a structural and functional homolog of the *Staphylococcus* NorA protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 484–485.
4. Ahmed M., Lyass L., Markham P.N., Taylor S.S., Vazquez-Laslop N., Neyfakh A.A. 1995. Two highly similar multidrug transporters of *Bacillus subtilis* whose expression is differentially regulated. *J. Bacteriol.* **177**, 3904–3910.
5. Ahmed M., Borsch C.M., Taylor S.S., Vazquez-Laslop N., Neyfakh A.A. 1994. A protein that activates expression of a multidrug efflux transporter upon binding the transporter substrates. *J. Biol. Chem.* **269**, 28506–28513.
6. Woolridge D.P., Martinez J.D., Stringer D.E., Gerner E.W. 1999. Characterization of a novel spermidine/spermine acetyltransferase, BltD, from *Bacillus subtilis*. *Biochem J.* **340**, 753–758.
7. Woolridge D.P., Vazquez-Laslop N., Markham P.N., Chevalier M.S., Gerner E.W., Neyfakh A.A. 1997. Efflux of the natural polyamine spermidine facilitated by the *Bacillus subtilis* multidrug transporter Blt. *J. Biol. Chem.* **272**, 8864–8866.
8. Zheleznova-Heldwein E.E., Brennan R.G. 2001. Crystal structure of the transcription activator BmrR bound to DNA and a drug. *Nature.* **409**, 378–382.
9. Newberry K.J., Brennan R.G. 2004. The structural mechanism for transcription activation by MerR family member multidrug transporter activation, N terminus. *J. Biol. Chem.* **279**, 20356–20362.
10. Changela A., Chen K., Xue Y., Holschen J., Outten C.E., O'Halloran T.V., Mondragon A. 2003. Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science.* **301**, 1383–1387.
11. Watanabe S., Kita A., Kobayashi K., Miki K. 2008. Crystal structure of the [2Fe-2S] oxidative-stress sensor SoxR bound to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 4121–4126.
12. Helmann J.D., Moran C.P. 2002. RNA polymerases and sigma factors. In: *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives: from Genes to Cells*. Eds Sonenshein A.L., Hoch J.A., Losick R. Washington, D.C.: ASM Press, 289–312.
13. Mironov A.A., Koonin E.V., Roytberg M.A., Gelfand M.S. 1999. Computer analysis of transcription regulatory patterns in completely sequenced bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **27**, 2981–2989.
14. Gralla J.D., Collado-Vides J. 1996. Organization and function of transcription regulatory elements. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. Eds Neidhardt F.C., Curtiss R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B., Reznikoff W., Riley M., Schaechter M., Umberger H.E. Washington, D.C.: ASM Press, 1232–1245.
15. Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Wheeler D.L. 2008. GenBank. *Nucl. Acids Res.* **36**, D25–D30.
16. Baranova N.N., Danchin A., Neyfakh A.A. 1999. Mta, a global MerR-type regulator of the *Bacillus subtilis* multidrug-efflux transporters. *Mol. Microbiol.* **31**, 1549–1559.
17. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402.
18. Edgar R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792–1797.
19. Felsenstein J. 1989. PHYLIP – phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics.* **5**, 164–166.
20. Миронов А.А., Винокурова Н.П., Гельфанд М.С. 2000. Программное обеспечение анализа бактериальных геномов. *Молекуляр. биология.* **34**, 253–262.
21. Snyder L., Champness W. 1997. *Molecular Genetics of Bacteria*. Washington, D.C.: ASM Press.
22. Dridi L., Tankovic J., Petit J.C. 2004. CdeA of *Clostridium difficile*, a new multidrug efflux transporter of the MATE family. *Microb. Drug Resist.* **10**, 191–196.
23. Kuroda T., Tsuchiya T. 2009. Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim. Biophys. Acta.* **1794**, 763–768.
24. Chen J., Morita Y., Huda M.N., Kuroda T., Mizushima T., Tsuchiya T. 2002. VmrA, a member of a novel class of Na(+)-coupled multidrug efflux pumps from *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **184**, 572–576.
25. McAleese F., Petersen P., Ruzin A., Dunman P.M., Murphy E., Projan S.J., Bradford P.A. 2005. A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived *Staphylococcus aureus* mutants to tigecycline. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1865–1871.
26. Kaatz G.W., McAleese F., Seo S.M. 2005. Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1857–1864.
27. Lubelski J., Mazurkiewicz P., van Merkerk R., Konings W.N., Driessen A.J.M. 2004. ydaG and ydbA of *Lactococcus lactis* encode a heterodimeric ATP-binding cassette-type multidrug transporter. *J. Biol. Chem.* **279**, 34449–34455.
28. Lubelski J., de Jong A., van Merkerk R., Agustiandari H., Kuipers O.P., Kok J., Driessen A.J.M. 2006. LmrCD is a major multidrug resistance transporter in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* **61**, 771–781.
29. Dalton T.L., Collins J.T., Barnett T.C., Scott J.R. 2006. RscA, a member of the MDR1 family of transporters, is repressed by CovR and required for growth of *Streptococcus pyogenes* under heat stress. *J. Bacteriol.* **188**, 77–85.
30. Tabor C.W., Tabor H. Polyamines in microorganisms. 1985. *Microbiol Rev.* **49**, 81–99.
31. Carper S.W., Willis D.G., Manning K.A., Gerner E.W. Spermidine acetylation in response to a variety of stresses in *Escherichia coli*. 1991. *J. Biol. Chem.* **266**, 12439–12441.