

## МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСПОРТА МАРГАНЦА У *Brucella*, ВОВЛЕКАЮЩИЙ ДЛИННУЮ СПИРАЛЬ РНК

© 2009 г. А.В. Селиверстов, В.А. Любецкий

Институт проблем передачи информации РАН, 127994, Москва, ГСП-4, Большой Красный пер., 19

E-mail: slystv@iitp.ru

Поступила в редакцию 28.11.08 г.

Установлено, что транспортеры двухвалентных катионов из семейства Nramp в фагосомах эукариотических клеток и в паразитирующих в этих клетках бактериях конкурируют за металлы, что имеет значение для выживания бактерий. Для каждой матричной РНК в ее 5'-нетранслируемой области у *Brucella* с помощью нашего алгоритма определялись длинные спирали. Найдены весьма близкие по нуклеотидному составу длинные спирали внутри мРНК, кодирующие марганцевые транспортеры и Ni-зависимую глиоксалазу I. Мы предполагаем, что длинные спирали в этих областях вовлечены в регуляцию стабильности РНК.

**Ключевые слова:** *Brucella*, транспорт марганца, спираль РНК.

α-Протеобактерии рода *Brucella* являются внутриклеточными паразитами овец (*B. melitensis*), коров (*B. abortus*), свиней (*B. suis*) [1]. Люди наиболее восприимчивы к виду *B. melitensis*. В работе предлагается специфический для рода *Brucella* новый механизм регуляции экспрессии некоторых генов, в том числе генов из семейства Nramp и генов металлопротеинов. Семейство Nramp объединяет транспортеры двухвалентных катионов металлов, в частности марганца Mn<sup>2+</sup>, железа Fe<sup>2+</sup>, цинка Zn<sup>2+</sup> и меди Cu<sup>2+</sup>. Транспортеры из семейства Nramp найдены как на мембране фагосомы макрофага у млекопитающих [2,3], так и у бактерий [4]. Эти транспортеры играют важную роль при фагоцитозе и также при выживании бактерий в процессе незавершенного фагоцитоза, например, *Brucella* являются внутриклеточными паразитами. Транспортеры бактерии и макрофага конкурируют друг с другом, способствуя выживанию бактерии внутри макрофага [2–4]. Упомянутые металлы входят в состав многих ферментов, защищающих бактерии от оксидативного стресса внутри фагосомы. Высказано предположение, что хотя транспортеры из семейства Nramp обычно доставляют катионы внутрь клетки, они также удаляют из клетки некоторые катионы, присутствующие в ней в избытке [5].

Для *Mycobacterium tuberculosis* экспериментально показано, что концентрация мРНК, соответствующей транспортеру из семейства Nramp, регулируется концентрацией катионов. Для этого случая показана возможность переноса различных катионов одним и тем же транс-

портером этого семейства, причем повышение концентрации одних катионов может снижать эффективность транспорта других катионов [4].

В нашей работе предлагается новый механизм регуляции, основанный на деградации мРНК при участии длинных спиралей РНК, расположенных до или после регулируемого гена. Некоторые рибонуклеазы являются металлопротеинами, включающими марганец. Марганец необходим и для рибонуклеазы Н II, вызывающей деградацию РНК в составе РНК-ДНК гибрида. Для предсказания спиралей РНК использован алгоритм, предложенный авторами. Геномы бактерий получены из базы данных GenBank, <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov>. Названия ортологичных генов из рода *Brucella* и из кишечной палочки приведены в таблице.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

С использованием нашего алгоритма для поиска спиралей РНК в лидерных областях генов обнаружены гены, перед которыми расположены длинные спирали РНК с периодическим повтором подряд восьми нуклеотидов в плечах спиралей, иногда с продолжением повтора в петлю спиралей (см. рис. 1). В каждом случае эти спирали найдены между сонаправленными генами, расположенными на небольшом расстоянии друг от друга (до 300 нуклеотидов) и без обычного терминатора между ними. Поэтому не исключается, что они входят в один оперон. Результаты, полученные с по-

*Brucella melitensis* 16M chromosome I  
 1<sup>st</sup> helix upstream *mntH*  
GGAGUAAGGGCAGUAGGGCAGUAGGGCAGUAGGGCAGUAGGGCAGUAGGGCAGUGAAGAA  
UAUGGUCGCUGCGGCUAUGUACAACCAAAACAUACUCCCCUACUCCCCUUAUUCCCCUAVU  
CCCUUAAACAUACUGCCUUACUGCCUUACUGCCUUACUGCCUUAVUCC  
 2<sup>nd</sup> helix upstream *BMEI1889*  
UAGGGCAGUAGGGCAGUAGGGCAGUAGGGCAGUAGGGCAGUAGGGCAGUGAAGAAUAUGG  
UCGCUGCGGCCAUGCAGCAACCAAAACAUACUCCCCUACUCCCCUUAUUCCCCUAVUCCU  
UAACAUACUGCCUUAVUGCCUUACUGCCUUACUGCCUUAA  
*Brucella suis* 1330 chromosome I  
 1<sup>st</sup> helix upstream *mntH*  
GGAGUAAGGGCAGUAGGGCAGUAGGGCAGUAGGGCAGUGAAGAAUAUGGUCGCUGCGCU  
AUGUACAAACCAAAACAUACUCCCCUACUCCCCUAVUCCCCUUAACAUACUGCC  
UUACUGCCUUAVUGCCUUACUGCCUUAVUCC  
 2<sup>nd</sup> helix upstream *BR0055*  
UAGGGCAGUAGGGCAGUAGGGCAGUAGGGCAGUAGGGCAGUAGGGCAGUGAAGAAUAUGG  
AGAAUAUGGUCGCUGCGCCAUGCAGCAACCAAAACAUACUCCCCUACUCCCCUAVUCCC  
CUAUUCCCCUAAACAUACUGCCUUAVUGCCUUACUGCCUUAA  
*Brucella abortus* biovar 1 str. 9-941 &  
*Brucella melitensis* biovar Abortus 2308 chromosome I  
 1<sup>st</sup> helix upstream *mntH*  
GGAGUAAGGGCAGUAGGGCAGUGAAGAAUAUGGUCGCUGCGCUAUGUACAACCAAAACA  
UACUCCCCCUACUCCCCUAVUCCCCUAVUCCCCUUAACAUACUGCCUUACUGCCUUAVUCC  
 2<sup>nd</sup> helix upstream *BruAb1\_0055* & *BAB1\_0052*  
UAGGGCAGUAGGGCAGUGAAGAAUAUGGUCGCUGCGCCAUGCAGCAACCAAAACAUAC  
UCCCCUACUCCCCUAVUCCCCUUAACAUACUGCCUUAVUGCCUUACUGCCUUAA  
CUGCCUUACUGCCUUAA

**Рис. 1.** Найденные с помощью нашего алгоритма длинные спирали перед генами, ортологичными *mntH* и *BMEI1889*. Перед геном *mntH* найденные две спирали разделены односторонним выпячиванием из одного нуклеотида, плечи спиралей выделены подчеркиванием. Лидерные области ортологичных генов к *mntH* и *BMEI1889* у *B. abortus* biovar I str. 9-941 и *B. melitensis* biovar Abortus 2308 совпадают.

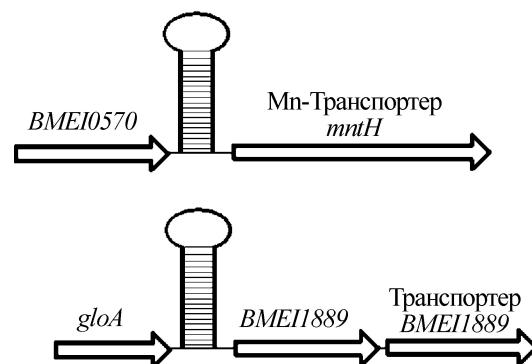
мощью предложенного нами алгоритма, относятся к следующим двум случаям (рис. 2).

**Первый случай** состоит в том, что перед длинной спиралью расположен гипотетический ген *BMEI0570*, а после нее – ген *mntH* из семейства Nram (Pfam номер PF01566,  $E = 2,5 \cdot 10^{-156}$ ).

**Второй случай** состоит в том, что перед длинной спиралью расположен ген *gloA*, кодирующий Ni-зависимую глиоксалазу I (фермент EC 4.4.1.5), а после нее – ген *BMEI1889* гипотетического белка, С-концевой домен которого гомологичен домену белка, продуцируемого в клубеньках растений при внедрении *Rhizobium* (Pfam номер PF02451,  $E = 0,44$ ). Далее за этим геном следует ген *BMEI1890* гипотетического транспортера с неизвестной функцией, включающего домены DUF1775 ( $E = 5,5 \cdot 10^{-40}$ ) и DUF461 ( $E = 2,4 \cdot 10^{-45}$ ), второй из которых характерен для многих транспортеров (см. рис. 2 и таблицу).

Одна и та же периодическая последовательность, показанная на рис. 3,

AGGGCAGUAGGGCAGUAGGGCAGU  
AGGGCAGU



**Рис. 2.** Взаимное расположение кодирующих областей и длинной шпильки для двух мРНК у *B. melitensis* 16M. Для других бруцелл расположение шпильки и кодирующих областей аналогичное. Вверху перед длинной спиралью расположена кодирующая область гипотетического гена *BMEI0570*, а после нее – кодирующая область гена *mntH* из семейства Nram (Pfam, PF01566). Внизу перед длинной спиралью расположена кодирующая область гена *gloA* Ni-зависимой глиоксалазы I (EC 4.4.1.5), а после нее – ген *BMEI1889* гипотетического белка. Далее за ним следует ген *BMEI1890* гипотетического транспортера с неизвестной функцией, включающего домены DUF1775 и DUF461, второй из которых характерен для многих транспортеров.

Ортологичные гены у *Brucella* и кишечной палочки

<i>B. melitensis</i> 16M	<i>B. suis</i> 1330	<i>B. abortus</i> biovar 1 str. 9-941	<i>B. melitensis</i> biovar Abortus 2308	<i>E. coli</i> K-12	Аннотация гена
<i>BMEI0570</i>	<i>BR1440</i>	<i>BruAb1_1435</i>	<i>BAB1_1459</i>		
<i>BMEI0569</i>	<i>BR1441</i>	<i>BruAb1_1436</i>	<i>BAB1_1460</i>	<i>mntH</i>	Семейство Nramp (PF01566)
<i>BMEI1888</i>	<i>BR0056</i>	<i>BruAb1_0056</i>	<i>BAB1_0053</i>	<i>gloA</i>	Глиоксалаза I (PF00903); EC 4.4.1.5
<i>BMEI1889</i>	<i>BR0055</i>	<i>BruAb1_0055</i>	<i>BAB1_0052</i>		Включают домен PF02451
<i>BMEI1890</i>	<i>BR0054</i>	<i>BruAb1_0054</i>	<i>BAB1_0051</i>		Включают домены DUF1775 (PF07987) и DUF461 (PF04314)
<i>BMEI1542</i>	<i>BR0386</i>	<i>BruAb1_0411</i>	<i>BAB1_0415</i>	<i>rnhB</i>	Рибонуклеаза Н II; EC 3.1.26.4

присутствует в 5'-плечах у всех найденных нами спиралей мРНК у *B. melitensis* 16M, *B. suis* и, кроме того, что пока не имеет объяснения, в геномах мыши *Mus musculus*, крысы *Rattus norvegicus* и утконоса *Ornithorhynchus anatinus*. В секвенированных геномах других млекопитающих, представленных в GenBank, такие повторы отсутствуют. У этих трех млекопитающих указанная последовательность не входит в состав длинных спиралей РНК. У *B. abortus* biovar 1 str. 9-941 и у *B. melitensis* biovar Abortus 2308 вместо четырехкратного повтора выше найден двукратный повтор с тем же периодом.

Последовательности длиной в 100–150 нуклеотидов, гомологичные фрагментам найденных нами спиралей или их петель, обнаружены в других местах геномов *Brucella*, однако они не входят в состав какой-либо длинной спирали РНК. Но такие последовательности не найдены у других бактерий. По аналогии с хорошо известными случаями можно думать, что указанные спирали у *Brucella* возникли из транспозирующихся IS-элементов ([6] с. 230–232).

Мы полагаем, что найденные нами спирали транскрибируются вместе с указанными генами и образуются на мРНК, а не на ДНК по той причине, что в них имеются GU-пары. В этом случае длинная спираль может образоваться только на РНК. Кроме того, эти спирали находятся между генами одной цепи ДНК, которые расположены на небольшом расстоянии друг от друга, т.е. они могут входить в единый оперон. Консервативность спирали – длинная шпилька с повтором в ее плече буквально одного слова AGGGCAGU позволяет предполагать, что она находится под давлением стабилизирующего отбора и, следовательно, существует как спираль на мРНК. Хотя у многих

бактерий транскрипция гена *mntH* регулируется белком MntR, связывающим ДНК, этот белок отсутствует у *Brucella*. Наличие консервативной

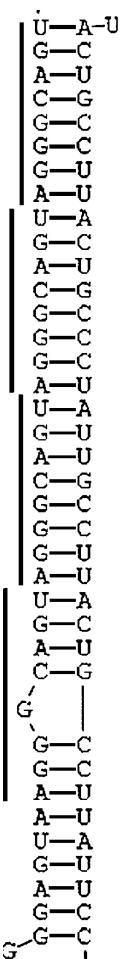


Рис. 3. Черенок длинной шпильки перед геном *mntH* у *B. melitensis* 16M. Черенок содержит повтор, выделенный чертой.

длинной спирали на мРНК, которая отсутствует (кроме *Brucella*) у всех других видов, представленных в GenBank, позволяет предположить, что у *Brucella* имеется другая регуляция гена *mntH*. Это дополняет утверждение из [7], где предположено, что ген *mntH* принадлежит к MUR-регулону.

**Гипотеза** состоит в том, что рассматриваемая спираль с указанным повтором нуклеотидов служит местом связывания металлопротеина, включающего марганец или цинк, с мРНК, который влияет на стабильность мРНК. Связывание металлопротеина и, следовательно, стабильность мРНК зависит от концентрации катионов металла.

Кандидатом на роль соответствующего регуляторного металлопротеина может служить рибонуклеаза Н II (EC 3.1.26.4), которая связывает марганец и вызывает деградацию мРНК за счет связывания рибонуклеазы с длинной спиралью. В присутствии достаточного количества марганца найденная нами длинная спираль РНК подвергается деградации этой рибонуклеазой. Если марганца мало, то рибонуклеаза не разрушает мРНК, содержащую ген *mntH* транспортера, и марганец поступает в бактерию.

Найденные спирали РНК с периодической структурой также могут служить местом кооперативного связывания регуляторного белка, защищающего мРНК от деградации в случае, если катионов мало. При этом регуляторный элемент может располагаться как в 5'-лидерной, так и в 3'-трейлерной области регулируемого гена. Подобный случай приведен, например, в работе [6].

Хотя ближайшие гомологи транспортера MntH из *Brucella* специфичны именно к марганцу, по аналогии с *Mycobacterium* можно предположить, что MntH у *Brucella* может участвовать в транспорте нескольких двухвалентных металлов. Длинные шпильки с повтором одного и того же слова в плече найдены как перед транспортером MntH, так и перед транспортером с неизвестной специфичностью. Поэтому можно предположить, что этот второй транспортер, следующий за геном Ni-зависимой глиоксалазы I и входящий вместе с ним в единый оперон, также связан с транспортом катионов двухвалентных металлов.

Авторы благодарны рецензенту за ценные замечания.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта ISTC 2766 Международного научно-технического центра.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M.-L. Boschioli, V. Foulongne, and D. O'Callaghan, *Current Opinion in Microbiology* **4**, 58 (2001).
2. E. Pinner, S. Gruenheid, M. Raymond, and P. Gros, *J. Biol. Chem.* **272**, 28933 (1997).
3. N. Jabado, F. Canonne-Hergaux, S. Gruenheid, et al., *Blood* **100**, 2617 (2002).
4. D. Agranoff, I. M. Monahan, J. A. Mangan, et al., *J. Exp. Med.* **190**, 717 (1999).
5. D. Wagner, J. Maser, I. Moric, et al., *Microbiology* **151**, 323 (2005).
6. М. Сингер и П. Берг, Гены и геномы (Мир, М., 1998), т. 2.
7. D. A. Rodionov, M. S. Gelfand, J. D. Todd, et al., *PLoS Comput. Biol.* **2**, 1568 (2006).

## Mechanism of Manganese Transport Regulation Based on the Long RNA Helix in *Brucella*

A.V. Seliverstov and V.A. Lyubetsky

*Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, Bolshoi Karetnyi per. 19, Moscow, 127994 Russia*

It has been found that divalent cation transporters of the Nramp family in cell phagosomes and bacteria that parasitize on the cell compete for metals, which is crucial for bacterial survival. Long helices were determined by means of our algorithm for each mRNA in the 5'-untranslated region in *Brucella*. Conserved long RNA helices were found in mRNA that encode manganese transporters as well as Ni-dependent Glyoxalase I. We suggest that long helices in these regions are involved in the regulation of RNA stability.

*Key words:* *Brucella*, manganese transport, RNA helix