

ГЕНЕТИКА  
МИКРООРГАНИЗМОВ

УДК 579.61

ТРАНСКРИПЦИЯ ГЕНА *hlyIIR* *Bacillus cereus*

© 2021 г. А. С. Нагель<sup>1</sup>, Ж. И. Андреева-Ковалевская<sup>1</sup>, А. В. Сиунов<sup>1</sup>,  
М. О. Нагорных<sup>1</sup>, М. В. Захарова<sup>1</sup>, А. С. Солонин<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Пушчинский научный центр биологических исследований, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина Российской академии наук, Московская область, Пушкино, 142290 Россия

\*e-mail: solonin.a.s@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.06.2020 г.

После доработки 07.09.2020 г.

Принята к публикации 10.09.2020 г.

Изучена транскрипция гена *hlyIIR* *Bacillus cereus*, который является негативным транскрипционным регулятором гена гемолизина II (*hlyII*) – фактора патогенности *B. cereus*. Выявлена последовательность промотора перед геном *hlyIIR* и определена стартовая точка транскрипции. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* проведен анализ влияния белка-регулятора на транскрипцию с собственного промотора. В клетках *B. cereus* выявлен конститутивный характер синтеза конечного продукта. Полученные результаты могут указывать на отсутствие авторегуляции гена *hlyIIR* и участия промотора гена гемолизина II в регуляции экспрессии гена *hlyIIR*.

**Ключевые слова:** *Bacillus cereus*, *hlyIIR*, гемолизин II, регуляция транскрипции, авторегуляция, факторы патогенности.

**DOI:** 10.31857/S0016675821060072

*Bacillus cereus sensu lato* – видовой комплекс спорообразующих грамположительных бактерий, которые распространены повсеместно [1]. *B. cereus sensu stricto* является условным патогеном человека, вызывающим желудочно-кишечные инфекции [2]; *B. thuringiensis* – энтомопатогенный микроорганизм, широко использующийся в сельском хозяйстве [3]; *B. anthracis* – возбудитель смертельно опасного для млекопитающих заболевания – сибирской язвы [4]. В то же время анализ геномных последовательностей бактерий этой группы выявляет высокую степень подобия. Классификация этих бактерий основана на фенотипических отличиях, кодируемых в ряде случаев генами, локализованными на плаزمиде, наличие которых и определяет существование этих микроорганизмов в различных условиях окружающей среды. Продукция факторов патогенности этими бактериями может быть связана не только с наличием или отсутствием генов самих токсинов, но также с регуляцией их экспрессии [5].

Одним из факторов патогенности *B. cereus* является гемолизин II (HlyII). Он принадлежит к обширному семейству β-складчатых каналобразующих цитолизин, которые встраиваются в мембрану с образованием пор [6]. Гемолизин II широко распространен как среди штаммов *B. cereus*, так и *B. thuringiensis* [7].

Ген гемолизина II был впервые изолирован из библиотеки хромосомной ДНК *B. cereus*. EcoRI-фрагмент хромосомной ДНК размером 2.9 тпн при введении в *E. coli* в составе плазмидного вектора приводит к возникновению у трансформантов гемолитического фенотипа [8]. На том же участке ДНК за геном *hlyII* обнаружен ген транскрипционного регулятора (*hlyIIR*), продукт которого осуществляет регуляцию экспрессии гена гемолизина II [9]. HlyIIR принадлежит к TetR/AcrR-группе транскрипционных регуляторов [10].

Регуляция экспрессии гена может осуществляться как путем прямого контроля его экспрессии, так и опосредованно, путем регуляции экспрессии генов самих регуляторов или путем модуляции функции этих регуляторов.

Настоящая статья посвящена описанию промотора и транскрипции гена *hlyIIR* *B. cereus*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Бактериальные штаммы

Для большинства операций использовался штамм *Escherichia coli* Z85 (*thi*, Δ(*lac-proAB*), Δ(*srl-recA*), *hsdR*, *supE*, Tn10(Tc<sup>r</sup>), (F', -*traD*, *proAB*, *LacI* ΔM15)) [11], для экспрессии белка HlyIIR – *E. coli* M15pRep4 (pHR) (Km<sup>r</sup>, *lac*, *ara*, *gal*, *mtl*, F<sup>-</sup>) [9];

Таблица 1. Плазмиды

Название	Описание	Источник
pUJ1	2.9 тпн <i>EcoRI</i> -фрагмент хромосомной ДНК <i>B. cereus</i> VKM-B771, содержащий гены <i>hlyII</i> , <i>hlyIIR</i> в pUC19	[15]
p15KS-	Ap, Cm	Stratagene
pRH2	Ген <i>hlyIIR</i> в векторе p15KS	[9]
pF	Ген <i>lacZ</i> , клонированный в pUC19 по сайтам рестрикции <i>Bam</i> HI– <i>Hind</i> III	[16]
pFHR217	Промотор <i>hlyII</i> , ген <i>hlyII</i> , межгенный участок и промотор <i>hlyIIR</i> в <i>EcoRI</i> – <i>Bss</i> SI-фрагменте pUJ1, липкие концы застроены фрагментом Кленова, фрагмент затем встраивали по тупым концам в линейаризованную по сайту <i>Sma</i> I pF	Данная работа
pFHR217ΔKS	Делеция регуляторной области <i>hlyII</i> в pFHR217, чтобы оценить влияние промотора гена гемолизина II на транскрипцию <i>hlyIIR</i> . pFHR217 была гидролизована по сайтам <i>Kpn</i> I– <i>Spe</i> I и циклизована	Данная работа

в экспериментах *in vivo* использовался штамм *B. cereus* 771, аналогичный *B. cereus* AH820 (NC\_011773.1) и штамм *B. cereus* 4342-N-HlyIIR (аналогичный *B. cereus* ATCC 4342 (NZ\_CM000721.1), нокаутированный по гену *hlyIIR*); для анализа флуоресценции TurboGFP – штамм *B. subtilis* BD170 с плазмидой pPhlyIIR-tGFP, описанный в [12]. Выращивание бактерий *E. coli* проводили в жидких и на агаризованных средах LB. Для культивирования *B. cereus* использовалась 3.7%-ная сердечно-мозговая среда (ВНИ) фирмы “Difco”.

#### Плазмиды

Плазмиды, использованные в работе, перечислены и описаны в табл. 1.

#### Выделение белка

Выделение белка HlyIIR-6HIS осуществлялось как описано ранее из клеток *E. coli* M15pRep4 (pHR) [9]. Выделение РНК-полимеразы из *B. cereus* 771 описано в [9]. Выделение РНК-полимеразы из *E. coli* описано в [13].

#### Анализ гемолитической активности

Тестирование гемолитической активности проводили на эритроцитах человека с помощью методики, основанной на спектрофотометрической

регистрации гемоглобина, высвобождающегося при лизисе эритроцитов [8]. За единицу гемолитической активности (ГЕ) принято количество гемолизина, вызывающее лизис половины клеток 1 мл 0.5%-ной суспензии эритроцитов в ФСБ (74 мМ Na-фосфат, 77 мМ NaCl pH 6.8) за 30 мин при 37°C. Гемолитическую активность в присутствии холестерина измеряли как описано ранее [14].

#### Иммунохимическое определение белка

Вестерн-блоттинг проводили по методу, разработанному в лаборатории Харлоу [6] с помощью антител кролика, полученных к очищенному препарату HlyIIR.

#### Транскрипция *in vitro*, KMnO<sub>4</sub>-футпринтинг

Эксперименты по транскрипции *in vitro* и KMnO<sub>4</sub>-футпринтингу были выполнены как описано ранее [13]. Очищенные фрагменты ДНК с промоторными областями генов инкубировали с РНК-полимеразами *E. coli* и *B. cereus* (100 нМ) в буфере, содержащем 20 мМ трис-HCl pH 8.0, 100 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.1 мМ EDTA, 1 мМ DTT, 50 мкг БСА, 5% глицерина в объеме 10 мкл, в течение 7 мин при 37°C. При добавлении HlyIIR реакционная смесь инкубировалась дополнительные 10 мин при 37°C. Затем добавляли 5 мкл смеси из четырех рибонуклеотидтрифосфатов (конечная концентрация

ция 50 мкМ УТР и по 0.2 мМ АТР, ГТР, СТР каждого), содержащей 0.5 мCi [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-УТР и 20 мкг гепарина, и инкубировали еще в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением 15 мкл охлажденного стоп-буфера (95%-ный формамид, 0.05%-ный бромфеноловый синий). Полученные РНК-фрагменты анализировали методом электрофореза в 7%-ном ПААГ в денатурирующих условиях с добавлением 8 М мочевины. После электрофореза гель экспонировали с рентгеновской пленкой.

Анализ образования открытого комплекса РНКП с промоторной областью ДНК выполняли с использованием метода  $\text{KMnO}_4$  (перманганатного) футпринтинга. Метод позволяет обнаружить тимины, которые становятся чувствительными к  $\text{KMnO}_4$  в одноцепочечной ДНК. Фрагменты ДНК с промоторными областями амплифицировали посредством ПЦР. Один из двух используемых праймеров метили [ $\gamma$ - $^{32}$ P]АТР с помощью полинуклеотидкиназы фага Т4. Реакционную смесь, содержащую ДНК, транскрипционный буфер и 1 мкл (100 нМ) РНК-полимеразы, инкубировали 7 мин при 37°C. После обрабатывали 20 мМ  $\text{KMnO}_4$  в течение 10–20 с при 37°C, реакцию останавливали добавлением 1 мкл  $\beta$ -меркаптоэтанола. ДНК переосаждали тремя объемами этанола, после чего обрабатывали пиперидином при 90°C. Образцы ДНК в стоп-буфере инкубировали в течение двух минут при 95°C и анализировали в 7%-ном денатурирующем ПААГ. После электрофореза гель экспонировали с рентгеновской пленкой.

#### Определение ДНК-связывающей активности *HlyIIR*

ДНК-связывающую активность определяли, используя метод задержки в геле. ДНК-зонды (20 нг ДНК) инкубировали 20 мин при 37°C с различными концентрациями белка в 20 мкл буфера (10 мМ трис-НСl рН 7.5, 10 мМ NaCl, 1 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 1 мкг БСА и 1 мкг ДНК цыпленка).

#### Определение $\beta$ -галактозидазной активности

$\beta$ -Галактозидазную активность тестировали как описано ранее [17].

#### Анализ флуоресценции *TurboGFP*

Клетки *B. subtilis* выращивали в 0.5 мл среды LB в 48-луночных планшетах при 37°C. Уровень флуоресценции измеряли в течение 24 ч каждые 10 мин при значениях 485 нм (возбуждение) и

535 нм (эмиссия). Выращивание культуры и все измерения проводили в мультирежимном планшетном ридере (Multi-functional plate reader) Filter Max F5 (Molecular Devices).

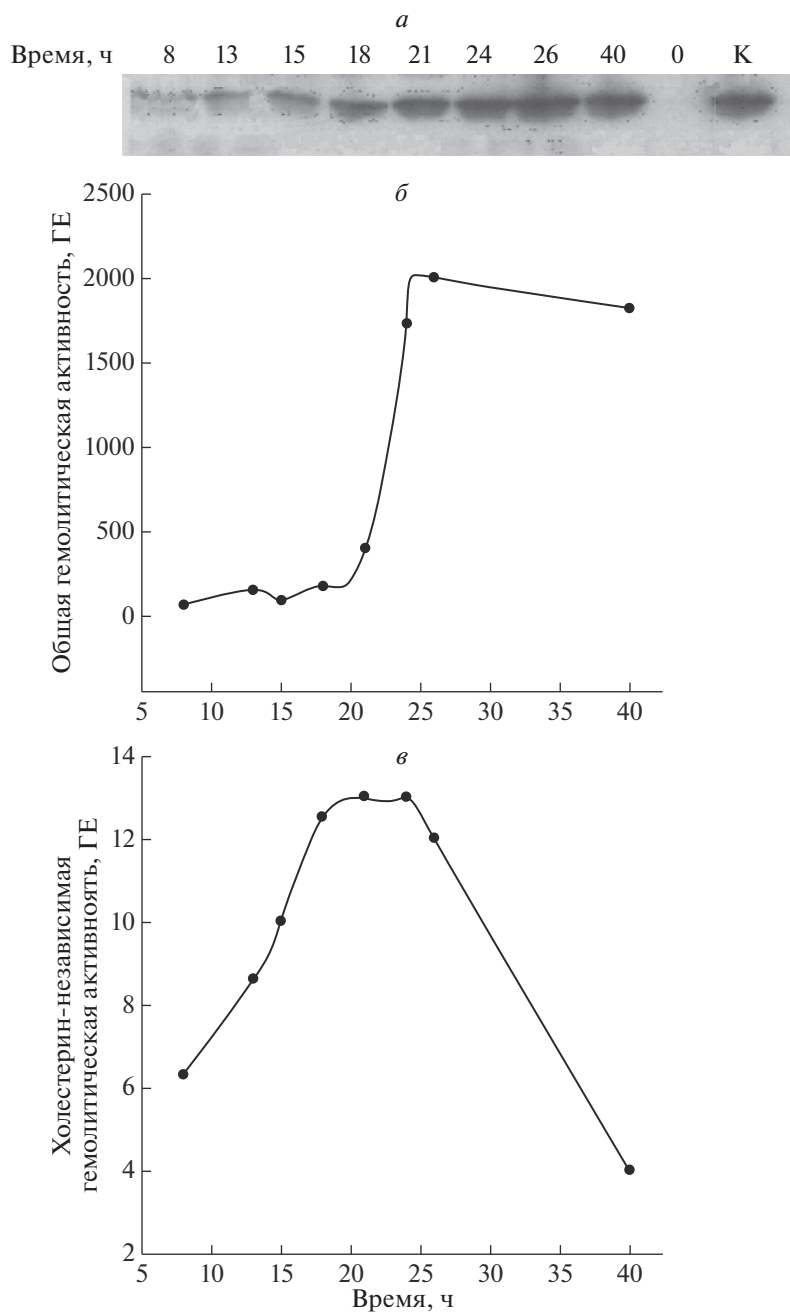
## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *HlyIIR* накапливается в клетках в процессе роста

Анализ синтеза белка *HlyIIR* с помощью иммуноблоттинга поликлональными антителами против *HlyIIR* показал, что его максимальный уровень достигается в начале стационарной фазы роста *B. cereus*. Как можно видеть на рис. 1,а, в клетках штамма *B. cereus* 4342-N-*HlyIIR*, с нокаутом по гену *hlyIIR*, использованного в качестве отрицательного контроля (дорожка 0), поликлональные антитела не выявили присутствия *HlyIIR*. Для того чтобы исследовать связь между содержанием в клетке белка-регулятора и гемолитической активностью в культуральной среде, измеряли общую и холестерин-независимую гемолитическую активность. Увеличение содержания белка *HlyIIR* на определенном этапе приводит к снижению как общей, так и холестерин-независимой гемолитической активности в культуральной среде (рис. 1). Данные, представленные на рис. 1,а, демонстрируют, что ген *hlyIIR* экспрессируется конститутивно и участвует в подавлении гемолитической активности.

### Картирование промотора гена *hlyIIR*

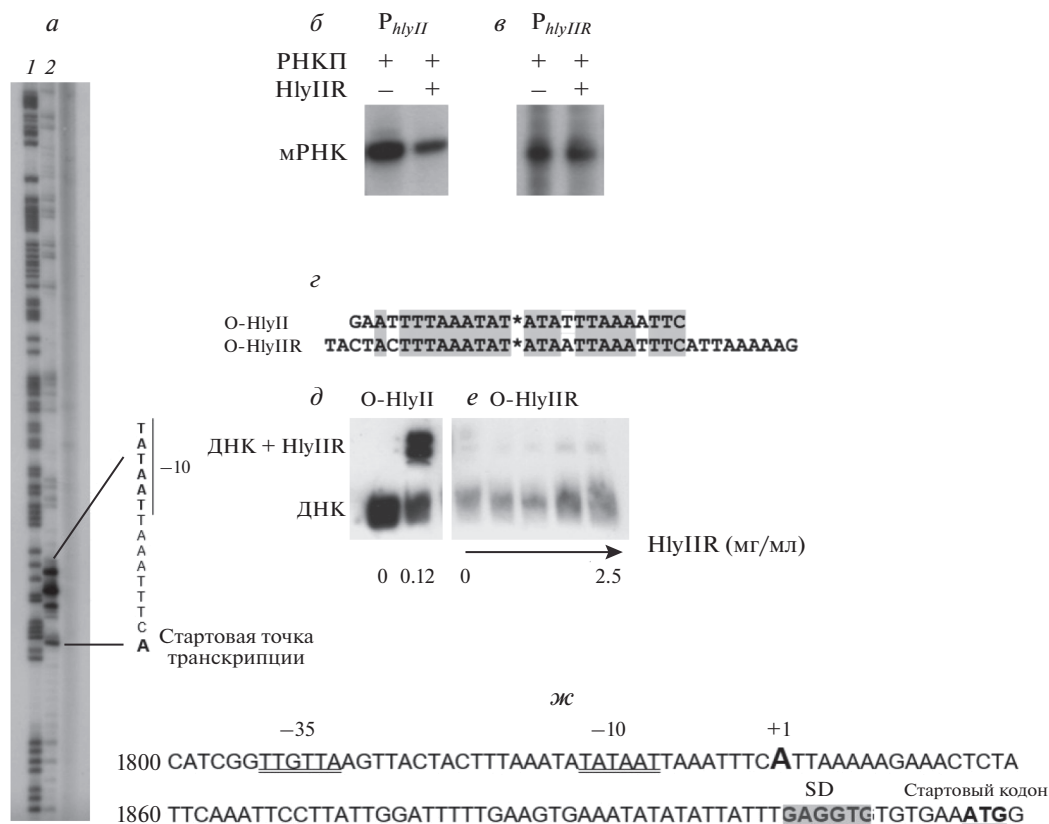
Тандемное расположение генов *hlyII* и *hlyIIR* и их функциональная связь позволяют предположить, что эти гены могут образовывать оперон и регулироваться совместно. В то же время после гена гемолизина II расположен транскрипционный терминатор, а перед геном *hlyIIR* обнаружена нуклеотидная последовательность, гомологичная консенсусным последовательностям большинства промоторов прокариот. Таким образом, транскрипция гена *hlyIIR* возможна как с промотора гена *hlyII*, так и с собственного промотора и невозможно исключить влияние обоих промоторов на эффективность экспрессии гена *hlyIIR*. Чтобы прояснить ситуацию, было решено определить способна ли РНК-полимераза *B. cereus* связывать предполагаемый промотор *hlyIIR in vitro*. Для этого фрагменты ДНК, соответствующие предполагаемому промотору и началу гена *hlyIIR*, были использованы как матрицы для транскрипции. Длина образуемых транскриптов была одинакова в случае использования как РНК-полимеразы *E. coli*, так и РНК-полимеразы *B. cereus*. Обе полимеразы узнают промотор *hlyIIR*, поэтому было



**Рис. 1.** Изменение содержания белка HlyIIIR в клетках и уровня гемолитической активности в культуральной среде в процессе роста штамма *B. cereus* 771. *а* – уровень HlyIIIR в клетках *B. cereus*, отобранных в разных точках роста, показанный с помощью иммуноблота; *б* – общая гемолитическая активность; *в* – холестерин-независимая гемолитическая активность.

решено в последующих экспериментах использовать РНК-полимеразу из *E. coli*, поскольку в этом случае сигнал намного сильнее (данные не показаны). Для картирования промотора использовали методику перманганатного футпринтинга [13]. Участки одноцепочечной ДНК могут образыв-

ваться в результате формирования открытого комплекса ДНК–РНК-полимераза и плавления ДНК в этом месте. Результаты представлены на рис. 2,а. На изучаемом участке ДНК обнаружен один открытый комплекс ДНК с РНК-полимеразой *E. coli*. Определена точка начала транскрипции.



**Рис. 2.** Промотор *hlyIIR*. *а* – картирование промотора *hlyIIR*. Представлены результаты перманганатного футпринтинга. Дорожка 1 – А + G реакция, дорожка 2 – реакция с  $KMnO_4$ . Стрелками отмечено местоположение открытого промоторного комплекса ДНК–РНК–полимераза; *б* – влияние белка-регулятора HlyIIR на транскрипцию гена *hlyII*; *в* – влияние белка-регулятора HlyIIR на транскрипцию собственного гена; *г* – последовательности участка, расположенного перед геном *hlyIIR*, и центральной части оператора *hlyII*; *д* – связывание HlyIIR с операторным участком гена *hlyII*; *е* – связывание HlyIIR с участком, перекрывающимся с промотором *hlyIIR* (рис. 2,г); *ж* – последовательность ДНК в области промотора *hlyIIR* (GenBank: AY212780).

Участки -10 и -35 промотора гена *hlyIIR* картированы (рис. 2,а, ж) и определено направление синтеза РНК.

*HlyIIR не связывается со своим промоторным участком в условиях in vitro*

Перед геном *hlyIIR* обнаружен участок ДНК (рис. 2,г, O-HlyIIR), имеющий высокую гомологию с центральной частью операторной области гена *hlyII* (рис. 2,г, O-HlyII). Так как HlyIIR связывается с оператором гена *hlyII* [9], было решено проверить связывается ли HlyIIR с этим участком гена *hlyIIR* в условиях *in vitro*. Для этого радиоактивно меченные двухцепочечные ДНК, соответствующие последовательностям, показанным на рис. 2,г, были использованы в экспериментах по изменению подвижности ДНК в гелях. Несмотря на то, что HlyIIR связывается с оператором гена *hlyII* (рис. 2,д), связывания с частично гомологичным участком гена *hlyIIR* не обнаружили (рис. 2,е).

Димеры HlyIIR эффективно связываются по флангам оператора гена *hlyII*, но не с его центральной частью [18]. Обнаруженный нами район гомологии участка, расположенного перед *hlyIIR* с центром оператора *hlyII*, не обеспечивает взаимодействия этого участка с HlyIIR.

Транскрипция гена *hlyII* подавляется в присутствии HlyIIR (рис. 2,б), что соответствует опубликованным ранее данным [9], в то время как транскрипция гена *hlyIIR* в присутствии белка HlyIIR не подавлялась (рис. 2,в). Следовательно, в условиях *in vitro* транскрипционный регулятор HlyIIR участвует в регуляции экспрессии гена *hlyII*, но не влияет на экспрессию собственного гена.

*HlyIIR не регулирует экспрессию своего гена в условиях in vivo*

Как следует из рис. 1,а, белок HlyIIR накапливается в процессе роста клеток, что может означать,

Таблица 2. Регуляция HlyIIR в системе *in vivo*

Плазмидная конструкция	β-Галактозидазная активность (ед./мл)	
	p15KS-	pRH2
pFHR217 (P <sub>hlyII</sub> , P <sub>hlyIIR</sub> )	373 ± 62	224 ± 56
pFHR217ΔKS (P <sub>hlyIIR</sub> )	420 ± 65	234 ± 55

что его экспрессия осуществляется конститутивно, не регулируемо. Для проверки этого предположения были созданы генетические конструкции, в которых репортерный ген β-галактозидазы находится под контролем как P<sub>hlyIIR</sub>, так и участка генома *B. cereus*, содержащего оба промотора P<sub>hlyII</sub> и P<sub>hlyIIR</sub>. Результаты этих экспериментов приведены в табл. 2. Показано, что введение в клетку на совместимых плазидах гена-репортера под контролем промотора *hlyIIR* и гена самого *hlyIIR* не выявило существенной разницы между экспрессией репортерного гена в присутствии или отсутствии промотора *hlyII*. Можно заключить, что по крайней мере в клетках *E. coli* ген регулятора экспрессируется только со своего собственного промотора. Гибридизация РНК бактериальных клеток с радиоактивно меченым ДНК-зондом также свидетельствует о том, что мРНК *hlyII* и *hlyIIR* синтезируются в клетке независимо друг от друга (рис. 2, б, в). Следовательно, HlyIIR в *E. coli* не может контролировать свою экспрессию через регуляцию синтеза би-цистронной РНК. Конститутивный синтез HlyIIR в клетках *B. cereus* обеспечивается транскрипцией с собственного промотора, не регулируемого HlyIIR.

Таким образом, транскрипция гена *hlyIIR* происходит только с собственного промотора и не контролируется конечным продуктом.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия белка прямо или опосредованно может контролироваться несколькими транскрипционными регуляторами. Важнейшей задачей становится получение количественной информации, так как далеко не все процессы, которые мы можем наблюдать в пробирке, могут быть осуществлены в клетке.

Гемолизин II — один из факторов, определяющих приспособление условно-патогенных бацилл к окружающей среде. Продукция гемолизина II одной клеткой может оказаться недостаточной, по-

этому необходима согласованная экспрессия этого гена во всей бактериальной популяции. Ранее нами было показано, что HlyIIR, ген которого расположен вслед за геном гемолизина II, является негативным регулятором экспрессии гена гемолизина II [9]. Он связывается с инвертированным повтором в операторном участке гена *hlyII* [18] и способен уменьшать эффективность инициации РНК синтеза. Экспрессия *hlyII* зависит от состояния окружающей среды. Чрезмерное накопление гемолизина II может быть потенциально опасным для бактериальной клетки. Эффективность транскрипции этого гена определяется присутствием индуктора, который обнаруживается в плазме крови [19]. В сапрофитном состоянии необходим негативный контроль экспрессии *hlyII*. Белок регулятора накапливается в процессе роста бактерий и его накопление пропорционально плотности бактериальной культуры и общей гемолитической активности в окружающей среде.

Перед геном *hlyIIR* картирован промотор, содержащий –10 и –35 последовательности, и определена точка инициации транскрипции. Промотор перекрывается с участком, который имеет гомологию с центральной областью оператора *hlyII*. Постепенное накопление белка регулятора в клетках может указывать на отсутствие автоингибирования. Синтез РНК в условиях *in vitro* происходит с обнаруженной точки начала транскрипции. Синтез полноразмерного транскрипта с промотора P<sub>hlyIIR</sub> не ингибировался присутствием HlyIIR. Эксперименты по ко-экспрессии гена *hlyIIR* с репортерным геном β-галактозидазы под контролем P<sub>hlyIIR</sub> подтверждают, что ген *hlyIIR* экспрессируется в клетке с собственного промотора и его влияние на транскрипцию не обнаружено. Анализ эффективности транскрипции с P<sub>hlyIIR</sub> в клетках *B. subtilis* с помощью репортерного гена *turbogfp* также не выявил зависимости эффективности транскрипции с промотора P<sub>hlyIIR</sub> от присутствия белка HlyIIR [12]. В ходе настоящей работы опи-

сан промотор  $P_{hlyIIR}$  и определена его локализация. Транскрипция гена *hlyIIR* происходит только с собственного промотора и не контролируется конечным продуктом.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-01017.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Patiño-Navarrete R., Sanchis V. Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria // Res. Microbiol. 2017. V. 168. № 4. P. 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.07.002>
2. Ehling-Schulz M., Lereclus D., Koehler T.M. The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential // Microbiol. Spectr. 2019. V. 7. № 3. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018>
3. Chattopadhyay A., Bhatnagar N.B., Bhatnagar R. Bacterial insecticidal toxins // Crit. Rev. Microbiol. 2004. V. 30. № 1. P. 33–54. <https://doi.org/10.1080/10408410490270712>
4. Pilo P., Frey J. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis* // Infect. Genet. Evol. 2018. V. 64. P. 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.06.024>
5. Ceuppens S., Rajkovic A., Heyndrickx M. et al. Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications // Crit. Rev. Microbiol. 2011. V. 37. № 3. P. 188–213. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.558832>
6. Miles G., Bayley H., Cheley S. Properties of *Bacillus cereus* hemolysin II: A heptameric transmembrane pore // Protein Sci. 2002. V. 11. № 7. P. 1813–1824. <https://doi.org/10.1110/ps.0204002>
7. Budarina Z.I., Sinev M.A., Mayorov S.G. et al. Hemolysin II is more characteristic of *Bacillus thuringiensis* than *Bacillus cereus* // Arch. Microbiol. 1994. V. 161. № 3. P. 252–257. <https://doi.org/10.1007/BF00248701>
8. Синеv М.А., Бударина Ж.И., Гавриленко И.В. и др. Доказательство существования гемолизина II *Bacillus cereus*: клонирование генетической детерминанты гемолизина II // Мол. биология. 1993. Т. 27. № 6. С. 1218–1229.
9. Budarina Z.I., Nikitin D.V., Zenkin N. et al. A new *Bacillus cereus* DNA-binding protein, HlyIIR, negatively regulates expression of *B. cereus* haemolysin II // Microbiology (Reading, Engl.). 2004. V. 150. № 11. P. 3691–3701. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27142-0>
10. Kovalevskiy O.V., Lebedev A.A., Surin A.K. et al. Crystal structure of *Bacillus cereus* HlyIIR, a transcriptional regulator of the gene for pore-forming toxin hemolysin II // J. Mol. Biol. 2007. V. 365. № 3. P. 825–834. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.074>
11. Зайцев Е.Н., Зайцева Е.М., Бакланова И.В. и др. Клонирование и секвенирование гена *resA* из штамма *Pseudomonas aeruginosa* // Генетика. 1986, Т. 22. № 11. С. 2721–2727.
12. Нагель А.С., Андреева-Ковалевская Ж.И., Сиунов А.В., Солонин А.С. Челночная векторная плазмида с *turbogfp* в качестве репортерного гена для анализа промоторной активности в клетках *E. coli* и *B. subtilis* // Технология живых систем. 2020. Т. 17. № 4. С. 18–30.
13. Zakharova M., Minakhin L., Solonin A., Severinov K. Regulation of RNA polymerase promoter selectivity by covalent modification of DNA // J. Mol. Biol. 2004. V. 335. № 1. P. 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.09.081>
14. Bernheimer A.W., Grushoff P. Extracellular hemolysins of aerobic sporogenic bacilli // J. Bacteriol. 1967. V. 93. № 5. P. 1541–1543.
15. Baida G., Budarina Z.I., Kuzmin N.P., Solonin A.S. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of hemolysin II gene from *Bacillus cereus* // FEMS Microbiol. Lett. 1999. V. 180. № 1. P. 7–14. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08771.x>
16. Бударина Ж.И. Ген гемолизина II *Bacillus cereus*: клонирование, регуляция экспрессии, идентификация продукта: Дис. ... канд. биол. наук. Пушкино: Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, 2005. 141 с.
17. Николаев И.В., Епишин С.М., Захарова Е.С. и др. Молекулярное клонирование гена секретируемой бета-галактозидазы мицелиального гриба *Penicillium canescens* // Мол. биология. 1992. Т. 26. С. 869–875.
18. Rodikova E.A., Kovalevskiy O.V., Mayorov S.G. et al. Two HlyIIR dimers bind to a long perfect inverted repeat in the operator of the hemolysin II gene from *Bacillus cereus* // FEBS Lett. 2007. V. 581. № 6. P. 1190–1196. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.02.035>
19. Андреева-Ковалевская Ж.И., Сиунов А.В., Бударина Ж.И. и др. Зависимость эффективности транскрипции гена гемолизина II *Bacillus cereus* от источника плазмы крови // Вестник биотехнологии и физико-хим. биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2017. Т. 13. № 1. С. 5–12.

## Transcription of the *hlyIIR* Gene of *Bacillus cereus*

A. S. Nagel<sup>a</sup>, Zh. I. Andreeva-Kovalevskaya<sup>a</sup>, A. V. Siunov<sup>a</sup>,  
M. O. Nagornykh<sup>a</sup>, M. V. Zakharova<sup>a</sup>, and A. S. Solonin<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>*Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Centre of Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

*\*e-mail: solonin.a.s@yandex.ru*

The transcription of the *hlyIIR* gene of *Bacillus cereus*, which is a negative transcriptional regulator of the hemolysin II gene (*hlyII*), the pathogenicity factor of *B. cereus*, has been studied. The sequence of the promoter upstream of the *hlyIIR* gene was identified and start point of transcription was determined. The effect of the HlyIIR on the transcription of its own promoter was analyzed *in vitro* and *in vivo*. The constitutive synthesis of the final product was revealed in *B. cereus*. The results obtained indicate the absence of autoregulation of the *hlyIIR* gene and the absence of the participation of the hemolysin II gene promoter in the regulation of *hlyIIR* gene expression

**Keywords:** *Bacillus cereus*, *hlyIIR*, hemolysin II, transcription regulation, autoregulation, pathogenicity factors.