

А. А. Тойменцева, А. М. Черёмин, Е. О. Михайлова,
М. Р. Шарипова

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОМОТОРОВ ПРОТЕИНАЗ *BACILLUS PUMILUS*

Ключевые слова: промотор, протеиназы, экспрессия, репортерный ген, факторы транскрипции, *Bacillus pumilus*.

С применением репортерных фьюжен конструкций исследованы 5'-фланкирующие регуляторные области (промоторы) генов внеклеточных протеиназ *B. pumilus* 3-19. Разработанные фьюжен конструкции исследовали в штаммах с мутациями по регуляторным белкам. Показано, что транскрипционные факторы *DegU* и *Spo0A* оказывают позитивное влияние на экспрессию генов протеолитических ферментов *B. pumilus*, однако их вклад в регуляцию различен.

Keywords: promoter, proteases, gene expression, reporter gene, transcription factors, *Bacillus pumilus*.

In this study, we characterized 5'-regulatory regions of protease genes from *B. pumilus* 3-19. To define the minimal size of protease gene promoters, we generated and analyzed expression of *gfp* fusion-reporter constructs harboring full-length and truncated promoters of different lengths. To find regulators which orchestrate the expression of serine proteases, activity of reporter constructs were further explored in recombinant *B. subtilis* mutants defective in regulatory genes. Our results indicate positive regulation of expression for all protease genes by *DegU* and *Spo0A* proteins but this regulation is different.

Введение

Продукция внеклеточных протеолитических ферментов в клетках бацилл является уникальной характеристикой этих бактерий. В классическом понимании функция протеиназ заключается в поставке питательных веществ в клетки для их роста и пролиферации [1]. Последние данные показывают, что инактивация протеолитических генов бацилл влияет на морфологию клеток, их биохимические и физиологические параметры, приводит к изменению уровня секреции других гидролаз [2, 3]. Более того, появляются данные, что получаемый в результате функционирования протеиназ набор пептидов не является простой суммой продуктов деградации белков, а вероятно отвечает за гомеостаз клеточной популяции. В результате чего возможно проявление эффекта «многоклеточности», когда в культуре часть клеток остается свободно живущими, часть образуют биопленки, другие приобретают способность принимать ДНК или переходить к спорообразованию [4]. Есть предположение (по аналогии с представителями энтеробактерий [5]), что протеиназы могут отвечать за вирулентность бактерий.

На уровне транскрипции позитивная регуляция протеолитических ферментов в клетках грамположительных бактерий происходит вследствие активации белков *DegU* и *Spo0A* [6, 7]. Выдвинута гипотеза, что активность белка *DegU* зависит от наличия в среде определенного стимула (осмотической концентрации среды, азотного, углеродного состава) [8, 9]. Активация транскрипционного фактора *Spo0A* происходит в условиях нехватки питательных веществ, но основная функция этого белка сводится к запуску процессов спорообразования [10]. Оба белка в фосфорилированной форме запускают транскрипцию протеолитических генов. Однако регулятор *Spo0A* способен не только напрямую связываться с промоторами, но и через белок-

белковое взаимодействие ингибировать активность репрессоров – *SinR*, *ScoC*, *AbrB* [11].

Описанная выше модель регуляции протеолитических генов установлена для клеток *Bacillus subtilis* и долгое время считалась надродовой характеристикой в регуляции гидролитических ферментов [12, 13]. Тем не менее, показано, даже внутри рода *Bacillus* транскрипция генов протеиназ происходит по-разному [14].

В работе исследованы регуляторные области генов протеиназ (промоторы) *B. pumilus* (субтилизиноподобной протеиназы, глутамилэндопептидазы, металлопротеиназы) с целью выявления их минимальной необходимой протяженности и определения их активации с помощью транскрипционных факторов *DegU* и *Spo0A*.

Материалы и методы исследования

Бактериальные штаммы *B. pumilus* 3-19, *B. subtilis* 168, *Escherichia coli* DH5α получены из собственной коллекции лаборатории Биосинтеза и Биоинженерии Ферментов К(П)ФУ. Мутантные по генам *degU* и *spo0A* штаммы *B. subtilis* любезно предоставлены проф. Т. Машером (Mascher T., Германия).

Бактерии выращивали при температуре +37°C, с аэрацией, на питательной среде Luria-Bertani (LB) следующего состава (г/л): триптон – 10, дрожжевого экстракта – 5 и NaCl – 10 (pH 7.0). Антибиотики добавляли в среду в конечных концентрациях (мкг/мл): ампидициллин (100 мкг/мл для клеток *E. coli*), хлорамфеникол (5 мкг/мл), канамицин (10 мкг/мл), тетрациклин (10 мкг/мл).

Плазмиды, рекомбинантные штаммы и олигонуклеотиды, использованные в работе, перечислены в таблице 1 и 2.

Для исследования промоторов генов протеиназ *B. pumilus* сконструированы репортерные фьюжен-конструкции с репортерным геном *gfpmut3*. Для этого регуляторные области расположенные upstream от структурной области генов

субтилизиноподобной протеиназы, глутамилэндонептидазы и металлопротеиназы (*PapBp*, *PgseBp* и *PmprBp* соответственно) были амплифицированы («Терцик», ДНК-технология, РФ) и клонированы в плазмиду pGFP*amyE* как описано в статье [15]. Полученные рекомбинантные плазмиды методом щелочного лизиса выделяли из клеток *E. coli* [16] и трансформировали в клетки *B. subtilis* [17]. Геномную ДНК мутантных штаммов (*B. subtilis* *degU::kann*, *B. subtilis* *spo0A::tet*) выделяли с помощью коммерчески растворов (QIAamp DNA Mini Kit, Германия) и трансформировали в рекомбинантные штаммы TMB1386 (*P_{aprBp}*₄₄₅) и TMB1337 (*P_{gseBp}*₁₅₀) (*P_{mprBp}*₂₅₆) (табл. 1).

Таблица 1 - Штаммы и плазмиды, использованные в работе

Плаزمид/Штамм	Генотип/Свойства ^а
pGFP <i>amyE</i>	<i>amyE front...amyE back</i> , <i>gfpmut3</i> , <i>cat</i> , <i>ColE1</i> , <i>bla</i>
pATFP111/TMB1386	W168 <i>amyE::pATFP111</i> (pGFP <i>amyE</i> - <i>PapBp</i> ₄₄₅)
pATFP104/TMB1337	W168 <i>amyE::pATFP104</i> (pGFP <i>amyE</i> + <i>PgseBp</i> ₁₅₀)
pATFP109/MR011	W168 <i>amyE::pATFP109</i> (pGFP <i>amyE</i> - <i>PmprBp</i> ₂₅₆)

^а Гены резистентности: *bla*, ампициллин; *cat*, хлорамфеникол; *tet*, тетрациклин; *kann*, канамицин.

Таблица 2 - Олигонуклеотиды, использованные в работе

Название праймера	Последовательность (5'-3')
PapBp_445_fw	[LIC]-GAATGGAAGGTCCTTGAT
PapBp_310_fw	[LIC]-AAATAGATGCTAGACGTTT
PapBp_280_fw	[LIC]-TAAGGCTTTTCGGGTATC
PapBp_rev	[LIC]-TTTCACGCACAATCCACA
PgseBp_150_fw	[LIC]-TCATAGAGAGAGATCAA
PgseBp_122_fw	[LIC]-GTTGGAAAGATACAAAACACC
PgseBp_100_fw	[LIC]-CACCTAATTTAAAAATG
PgseBp_rev	[LIC]-CATCATATTCCTCCTTTATG
PmprBp_256_fw	[LIC]-CTTATATTGAACAATTGA
PmprBp_200_fw	[LIC]-GGGCTTTTGTGTTTGTAAAG
PmprBp_150_fw	[LIC]-GTGTGCTGAAATATCCG
PmprBp_rev	[LIC]-TTTCATTCTATCCCTCCTTTG

LIC последовательности [14].

Контроль за ростом культуры и определение активности репортерного гена *gfpmut3* проводили с использованием многофункционального ридера для микропланшет (Synergy 2, BioTek, США). Для этого посевным материалом для инокуляции бациллярных штаммов служила 18-часовая ночная культура, которую разводили до значения оптической плотности - 0,05 (OD₅₉₀) в 96-луночных планшетах (Sarstedt, Германия). Рост клеток проводили с постоянным средним качением в общем объеме среды LB равном 150 мкл. Планшеты были накрыты крышками для предотвращения испарения среды. Рост клеток фиксировали при длине волны 600 нм, флуоресценцию клеток с использованием специальных фильтров – возбуждение при 485/20 нм, эмиссию при 528/20 нм. Измерения проводили каждые 10 мин на протяжении 30 часов. Активность

промоторов рассчитывали, как описано в статье [18].

Определение минимального участка промотора для полноценной экспрессии генов протеиназ *Bacillus pumilus*

Нуклеотидная последовательность генов протеиназ (*aprBp*, *gseBp* и *mprBp*) *B. pumilus* 3-19 занесена в международную базу GenBank (инвентарные номера AY754946.2, Y15136.1, EU678894.2, соответственно). Выравнивание межгенных 5'-фланкирующих регионов указанных генов *B. pumilus* 3-19 в системе NCBI/BLAST показало, что все регионы обнаруживают высокую степень гомологии с нуклеотидными последовательностями штамма *B. pumilus* SAFR-032. В 5'-регуляторном регионе гена *gseBp* (-1149...+1) была обнаружена протяжённая последовательность (905 п.о.) с высокой степенью гомологии к гену NADPH-редуктазы (*yrhJ*, AN CP000813.1, 91% гомологии). В 5'-регуляторных регионах генов *aprBp* и *mprBp* потенциальных открытых рамок считывания не было обнаружено. На основании проведенного биоинформационного анализа мы предположили, что длина промотора гена *aprBp* может составлять до 445 п.о., гена *gseBp* - до 150 п.о., гена *mprBp* – до 256 п.о. Эти данные впоследствии подтвердили экспериментально. Для этого использовали репортерный ген зеленого флуоресцентного белка (*gfpmut3*), который клонировали (LIC методом) под контроль потенциальных промоторов протеиназ (*PapBp*, *PgseBp* и *PmprBp*) различной длины как описано в статье [15]. Использовали три варианта длины каждого промотора (включающие -445 п.о., -310 п.о., -280 п.о. для гена *aprBp*; -150 п.о., -122 п.о., -100 п.о. – для гена *gseBp*; 256 п.о., -200 п.о., -150 п.о., для гена *mprBp*). Рекомбинантные конструкции исследовали в клетках *B. subtilis*.

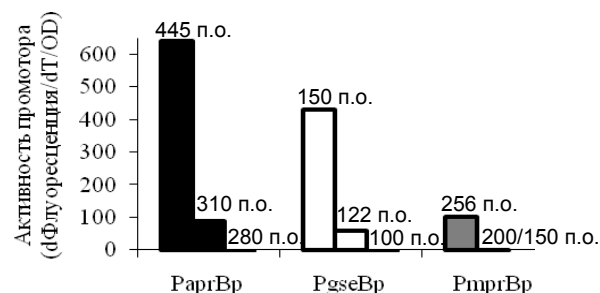


Рис. 1 - Активность промоторов протеиназ *B. pumilus* 3-19 (*aprBp*, *gseBp*, *mprBp*) имеющих различную протяженность. Количество пар оснований (п.о.) в промоторах указано над столбцами

Все рекомбинантные штаммы имели одинаковую скорость роста на питательной среде LB (отклонение в скорости роста не превышало 3%). На рисунке 1 показана активность промоторов протеиназ *B. pumilus* 3-19, выраженная через

активность репортерного белка GFP. Выявлено, что активность напрямую зависит от длины 5'-фланкирующего регуляторного региона во всех полученных конструкциях. При этом, максимальный уровень активности промотора *PaprBp* фиксировали когда его протяженность составляла 445 п.о. Сокращение регуляторного региона до 310 п.о. приводит к потере активности в 7 раз. Дальнейшее уменьшение промотора приводит к полной потере активности. Для конструкций с промотором *PgseBp* активность при длине промотора 1149 п.о. и 150 п.о. не отличалась и составляла 430 у.е. Однако уменьшение длины до 122 п.о. приводило к потере активности в 6 раз, а до 100 п.о. – к полной потере активности. Минимальный детектируемый уровень активности промотора *PmprBp* наблюдали, если его длина составляла 256 п.о.

На основании полученных результатов можно заключить, что для полноценной экспрессии гена *aprBp* необходимая длина промотора составляет 445 п.о., для гена *gseBp* – 150 п.о., для гена *mprBp* – 256 п.о.

Влияния мутаций по генам *degU* и *spo0A* на функциональную активность промоторов протеиназ *B. pumilus*

Ранее показано, что межгенные 5'-регуляторные регионы (промоторы) генов протеиназ *B. pumilus* 3-19 содержат потенциальные сайты связывания с белками DegU (DegU~P) и Spo0A [19-21]. Для того, чтобы достоверно оценить зависимость экспрессии протеолитических генов *B. pumilus* 3-19 от белков DegU и Spo0A, исследовали экспрессию репортерного гена *gfpmut3* под контролем промоторов *PaprBp_445*, *PgseBp_150* и *PmprBp_256* в мутантных штаммах. Для этого геномную ДНК штаммов *B. subtilis*, содержащих мутации по генам *spo0A::tet* и *degU::kann*, переносили в штаммы с рекомбинантными конструкциями *P_{aprBp_445}+gfpmut3* (pATFP111), *P_{gseBp_150}+gfpmut3* (pATFP104) и *P_{mprBp_256}+gfpmut3* (pATFP109) (Таблица 1).

Мы наблюдали для всех конструкций 100% подавление активности репортерного белка GFP в штаммах с мутацией по гену *degU*. Таким образом, экспрессия сериновых протеиназ в клетках *B. pumilus* (субтилизиноподобной протеиназы, глутамилэндонептидазы и металлопротеиназы) напрямую зависит от функционирования двухкомпонентной системы DegS/U (рис. 2).

Мутация по гену *spo0A* приводила лишь к снижению активности репортерного белка GFP. Такой результат не доказывает прямого позитивного влияния системы Spo0A-фосфопередачи в регуляции экспрессии генов секреторных ферментов *B. pumilus*, но, тем не менее, не исключает его влияния (рис. 2).

Таким образом, транскрипционные факторы DegU и Spo0A оказывают позитивное влияние на экспрессию генов протеолитических ферментов *B. pumilus*, однако их вклад в регуляцию различен.

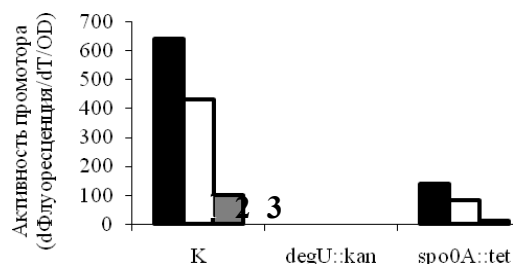


Рис. 2 - Влияние мутаций по генам *degU* и *spo0A* на экспрессию репортерного гена *gfpmut3* под контролем промоторов субтилизиноподобной протеиназы (1), глутамилэндонептидазы (2) и металлопротеиназы (3) *B. pumilus* 3-19. К – контроль, активность промоторов (*PaprBp_445*, *PgseBp_150* и *PmprBp_256*) в исходном штамме без мутаций

Полученные результаты свидетельствуют, что организация регуляторной области генов протеиназ *B. pumilus* различна: промотор гена доминирующей протеиназы – *PaprBp* более протяженный (445 п.о.) по сравнению с промоторами генов минорных протеиназ *PgseBp* (150 п.о.) и *PmprBp* (256 п.о.). Можно предположить, что такая структура промоторов коррелирует с биохимическими характеристиками и функцией ферментов в клетке. Доминирующая в протеолитическом пуле протеиназа ArgBp, на которую приходится до 70% активности, неспецифически расщепляет пептиды, белковые субстраты [19] и, по-видимому, имеет более сложную организацию регуляторной области гена (например, для контроля высокой активности фермента). В тоже время, минорные секретируемые ферменты (глутамилэндонептидаза и металлопротеиназа) активность которых в клетке не превышает 10%, гидролизуют гидрофильные пептиды по строго заданным сайтам [20, 21], вероятно, нуждаются в меньшем количестве транскрипционных регуляторов, которые могут связываться с промоторами. С другой стороны нами показано, что факторы транскрипции DegU и Spo0A имеют схожее влияние на активность промоторов протеиназ *B. pumilus*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (ГК № 14.132.21.1766).

Литература

1. J.W. Veening, O.A. Igoshin, R.T. Eijlander, R. Nijland, L.W. Hamoen, O.P. Kuipers, *Mol Syst Biol.*, **4**, 184 (2008).
2. А.А. Тойменцева, А.И. Ахметова, М.Р. Каримова, Ч. Нямсурэн, Ю.О. Пономарева, Е.И. Шагмарданова, А.А. Ризванов, М.Р. Шарипова, *Микробиология*, **82**, 1, 59 (2013).
3. L. Westers, H. Westers, G. Zanen, H. Antelmann, M. Hecker, D. Noone, K.M. Devine, J.M. van Dijk, W.J. Quax, *Proteomics*, **8**, 13, 2704-2713 (2008).
4. D. López, R. Kolter, *FEMS Microbiol Rev.*, **34**, 2, 134-149 (2010).
5. Н.М. Замалютдинова, И.Р. Галиева, А.О. Арапова, Е.О. Михайлова, М.Р. Шарипова, А.М. Марданова, *Вестник*

- Казанского технологического университета, **16**, 191-195 (2013).
6. F.A. Davidson, C. Seon-Yi, N.R. Stanley-Wall, *PLoS One*, **7**, 6, e38574 (2012).
 7. M.K. Dahl, T. Msadek, F. Kunst, G. Rapoport, *J. Biol. Chem.*, **267**, 20, 14509-11454 (1992).
 8. S.M. Ruzal, C. Sanchez-Rivas, *Curr. Microbiol.*, **37**, 368-372 (1998).
 9. F. Kunst, G. Rapoport, *J. Bacteriol.*, **177**, 2403-2407 (1995).
 10. M. Fujita, J.E. Gonzalez-Pastor, R. Losick, *J. Bacteriol.*, **187**, 1357-1368 (2005).
 11. V. Molle, M. Fujita, S.T. Jensen, P. Eichenberger, J.E. Gonzalez-Pastor, *Mol. Microbiol.*, **50**, 1683-1701 (2003).
 12. A. Sánchez, J. Olmos *Bacillus subtilis* transcriptional regulators interaction, *Biotechnol Lett.*, **26**, 5, 403-407 (2004).
 13. K. Tsukahara, M. Ogura, *FEMS Microbiol. Lett.*, **280**, 1, 8-13 (2008).
 14. S. Abe, A. Yasumura, T. Tanaka, *J. Bacteriol.*, **191**, 9, 3050-3058 (2009).
 15. C. Borgmeier, R. Biedendieck, K. Hoffmann, D. Jahn, F. Meinhardt, *Microbiol. Biotechnol.*, **92**, 3, 583-596 (2011).
 16. P. Bisicchia, E. Botella, K.M., *Plasmid*, **64**, 143-149 (2010).
 17. H.C. Birnboim, J. Doly, *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523 (1979).
 18. C.R. Harwood, S.M. Cutting *Molecular Biological Methods for Bacillus*, Chichester: Wiley, England, 1990, 581 p.
 19. E. Botella, M. Fogg, M. Jules, S. Piersma, G. Doherty, A. Hansen, E.L. Denham, L. Le Chat, P. Veiga, K. Bailey, P.J. Lewis, J.M. van Dijk, S. Aymerich, A.J. Wilkinson, K.M. Devine, *Microbiology*, **156**, 1600-1608 (2010).
 20. M. Sharipova, N. Balaban, A. Kayumov, Y. Kirillova, A. Mardanova, L. Gabdrakhmanova, I. Leshchinskaya, G. Rudenskaya, T. Akimkina, D. Safina, I. Demidyuk, S. Kostrov, *Microbiol Res.*, **163**, 1, 39-50 (2008).
 21. M.R. Sharipova, E.I. Shagimardanova, I.B. Chastukhina, T.R. Shamsutdinov, N.P. Balaban, A.M. Mardanova, G.N. Rudenskaya, I.V. Demidyuk, S.V. Kostrov, *Mol. Biol. Rep.*, **34**, 2, 79-87 (2007).
 22. А.Р. Сабирова. Дисс. канд. биол. наук, К(П)ФУ, Казань, 2011. 150 с.

© **А. А. Тойменцева** - м.н.с. каф. микробиологии К(П)ФУ; **А. М. Черёмин** – асп. той же кафедры; **Е. О. Михайлова** – к.б.н., доц. каф. БСМЭ КНИТУ, katyushka.glukhova@gmail.com; **М. Р. Шарипова** - д.б.н., проф. каф. микробиологии К(П)ФУ, marsharipova@gmail.com.