

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 пролифрации [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* DH5 α 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): ампициллин (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. subtilis* сконструированы репортерные фьюжн-конструкции с репортерным геном *gfpmut3*. Для этого регуляторные области расположенные upstream от структурной области генов субтилизиноподобной протеиназы, глутамилэндопептидазы и металлопротеиназы (PaprBp, PgseBp и PmprBp соответственно) были амплифицированы («Терцик», ДНК-технология, РФ) и клонированы в плазмиду pGFPamyE 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 коммерческих растворов (QIAamp DNA Mini Kit, Германия) и трансформировали в рекомбинантные штаммы TMB1386 (PaprBp_445) и TMB1337 (PgseBp_150) (PmprBp_256) (табл. 1). Таблица 1 - Штаммы и плазмиды, использованные в работе Плаزمида/Штамм Генотип/Свойства а pGFPamyE amyE front...amyE back, *gfpmut3*, *cat*, ColE1, *bla* pATFP111/TMB1386 W168 amyE::pATFP111 (pGFPamyE-PaprBp_445) pATFP104/TMB1337 W168 amyE::pATFP104 (pGFPamyE+PgseBp_150) pATFP109/MR011 W168 amyE::pATFP109 (pGFPamyE-PmprBp_256) а Гены резистентности: *bla*, ампициллин; *cat*, хлорамфеникол; *tet*, тетрациклин; *kann*, канамицин. Таблица 2 - Олигонуклеотиды, использованные в работе

Название праймера	Последовательность (5'-3')
PaprBp_445_fw [LIC]	GAATGGAAGGTCCTTGAT
PaprBp_310_fw [LIC]	AAATAGATGCTAGACGTTT
PaprBp_280_fw [LIC]	TAAGGCTTTTCGGGTATC
PaprBp_rev [LIC]	TTTCACGCACAATCCACA
PgseBp_150_fw [LIC]	TCATAGAGAGAGATCAA
PgseBp_122_fw [LIC]	GTTGGAAAGATACAAAACACC
PgseBp_100_fw [LIC]	CACCTAATTTAAAATG
PgseBp_rev [LIC]	CATCATATTCCTCTTTATG
PmprBp_256_fw [LIC]	CTTATATTGAACAATTGA
PmprBp_200_fw [LIC]	GGGCTTTTTTTGTTTTGTAAAG
PmprBp_150_fw [LIC]	GTGTGCTGAAATATCCG
PmprBp_rev [LIC]	TTTCATTCCTATCCCTCCTTTG

LIC последовательности [14]. Контроль за ростом культуры и определение активности репортерного гена *gfpmut3* проводили с использованием многофункционального ридера для микропланшет (Synergy 2, BioТек, 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 качанием в общем объеме среды LB равном 150 мкл. Планшеты были накрыты крышками для предотвращения испарения среды. Рост клеток фиксировали при длине волны 600 нм, флюоресценцию 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 (*PaprBp*, *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*. 280 п.о. 310 п.о. 122 п.о. 100 п.о. 200/150 п.о. 256 п.о. 150 п.о. 445 п.о. 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 *argVp* необходимая длина промотора составляет 445 п.о., для гена *gseVp* – 150 п.о., для гена *mpvVp* – 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 *PapvVp_445*, *PgseVp_150* и *PmpvVp_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 *PapvVp_445+gfpmut3* (pATFP111), *PgseVp_150+gfpmut3* (pATFP104) и *PmpvVp_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, глутамилэндопептидазы 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.

1 2 3 Рис. 2 - Влияние мутаций по генам *degU* и *spo0A* на экспрессию репортерного гена *gfpmut3* под контролем промоторов субтилизиноподобной протеиназы (1), глутамилэндопептидазы (2) и металлопротеиназы (3) *B. pumilus* 3-19. К – контроль, активность промоторов (*PapvVp_445*, *PgseVp_150* и *PmpvVp_256*) в исходном штамме без мутаций. Полученные результаты свидетельствуют, что организация регуляторной области генов протеиназ *B. pumilus* различна: промотор гена доминирующей протеиназы - *PapvVp* более протяженный (445 п.о.) по сравнению с промоторами генов минорных протеиназ *PgseVp* (150 п.о.) и *PmpvVp* (256 п.о.). Можно предположить, что такая структура промоторов коррелирует с биохимическими характеристиками и функцией ферментов в клетке. Доминирующая в протеолитическом пуле протеиназа *ArgVp*, 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 секретлируемые ферменты (глутамилэндопептидаза 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*.