

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ БАЦИЛЛ

Митрофанова О.С., Дудкина Е.В., Тихонова А.О., Гилязева А.Г., Тойменцева А.А., Шарипова М.Р.

*ФГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18*

email:mitrofaolga@gmail.com

поступила в редакцию 10 ноября 2014 года

Аннотация

В работе проанализированы особенности регуляторной области (промоторы) протеолитических ферментов *B. pumilus* 3-19 - субтилизиноподобной протеиназы, глутамилэндопептидазы и металлопротеиназы. На основе разработанных гибридных фьюжн конструкций определили минимальную область регуляции генов изучаемых протеиназ. Полученные данные могут быть использованы для направленного получения штаммов-продуцентов протеолитических ферментов *B. pumilus*.

Ключевые слова: *протеолитические ферменты, промоторы, репортерные фьюжн конструкции.*

Введение. Уникальной характеристикой бацилл является продукция внеклеточных протеолитических ферментов, которые играют исключительно важную роль, как в биологических процессах, так и в промышленности. Протеиназы обладают высокой фибринолитической и антикоагулянтной активностью, что предполагает их высокий терапевтический эффект при лечении тромбов [1-3].

Практическая ценность протеаз указывает на необходимость получения суперпродуцентов этих ферментов. С этой целью важно изучение механизмов, регулирующих экспрессию соответствующих генов. Экспрессия генов – перенос генетической информации от ДНК через РНК к полипептидам и белкам и контролируется на уровне транскрипции. Гены снабжены особыми участками, регулирующими их работу – промоторами (диспетчерами, определяющими где, когда и как “работать” гену). Вопрос о длине отдельного промотора и зависимости экспрессии гена от длины регуляторной области остается открытым. Оценка профиля экспрессии генов протеолитических ферментов *B. pumilus* – субтилизиноподобной протеиназы, глутамилэндопептидазы и металлопротеиназы и стала целью представленной работы.

Основная часть. Для определения длины промоторной области генов протеиназ *B. pumilus* 3-19 получали гибридные ДНК конструкции (фьюжн конструкции) на основе репортерного гена β-галактозидазы (*lacZ*). Для этого использовали интегративный вектор рАС6, который позволяет перенести гибридную ДНК (промотор+репортерный ген) в геном клеток *B. subtilis* 168 с последующим разрушением в геноме гена амилазы (*amyE*) (рисунок 1).

На основе биоинформационного анализа межгенных регионов генов протеиназ *B. pumilus* 3-19 выбрали три потенциальные длины промоторной области:

- 1) для гена субтилизиноподобной протеиназы – 445 п.о., 310 п.о., 280 п.о.
- 2) для гена глутамилэндопептидазы – 150 п.о., 122 п.о., 100 п.о.
- 3) для гена металлопротеиназы – 256 п.о., 200 п.о., 150 п.о.

Каждая длина промотора протеолитических генов была получена методом ПЦР. Анализ полученных ампликонов проводили с помощью гель-электрофореза (рисунок 2).

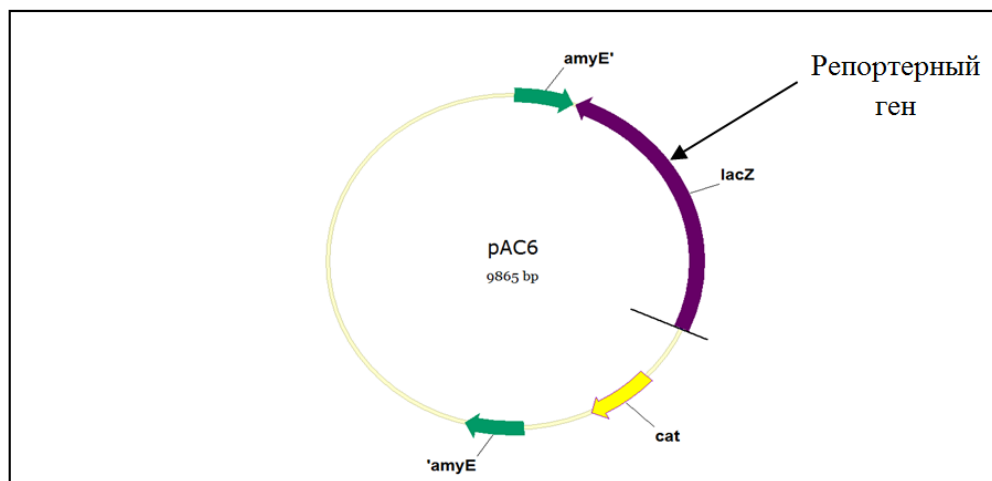


Рисунок 1. – Генетическая карта вектора рАС6 использованного в работе для получения гибридных ДНК (фьюжн конструкций).

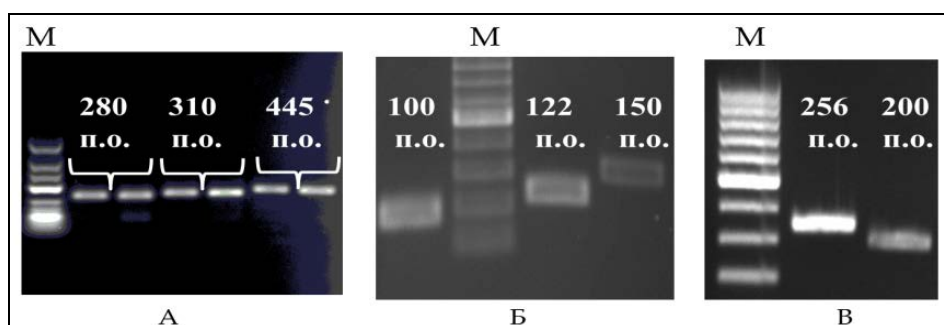


Рисунок 2. – Электрофорез ПЦР-продуктов в 1,5% агарозном геле. А – потенциальные промоторы гена субтилизиноподобной протеиназы; Б – потенциальные промоторы гена глутамилэндопептидазы; В – потенциальные промоторы гена металлопротеиназы.

На основе выбранного вектора рАС6 получили фьюжн конструкции, содержащие репортерный ген β -галактозидазы под контролем потенциальных промоторов генов протеиназ разной длины. Такие гибридные ДНК конструкции трансформировали в клетки *E. coli*, в результате получили набор рекомбинантных плазмид, перечисленных в таблице 1.

Таблица 1. – Векторы, полученные в работе.

Название вектора	Генотип вектора
рАТ601	W168 <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>amyE'</i> P _{aprBp_445} - <i>lacZ'</i> <i>amyE</i>
рАТ603	W168 <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>amyE'</i> P _{aprBp_310} - <i>lacZ'</i> <i>amyE</i>
рАТ604	W168 <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>amyE'</i> P _{aprBp_280} - <i>lacZ'</i> <i>amyE</i>
рАТ611	W168 <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>amyE'</i> P _{gseBp_150} - <i>lacZ'</i> <i>amyE</i>
рАТ612	W168 <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>amyE'</i> P _{gseBp_122} - <i>lacZ'</i> <i>amyE</i>
рАТ613	W168 <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>amyE'</i> P _{gseBp_100} - <i>lacZ'</i> <i>amyE</i>
рАТ614	W168 <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>amyE'</i> P _{mprBp_256} - <i>lacZ'</i> <i>amyE</i>
рАТ615	W168 <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>amyE'</i> P _{mprBp_200} - <i>lacZ'</i> <i>amyE</i>
рАТ616	W168 <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>amyE'</i> P _{mprBp_150} - <i>lacZ'</i> <i>amyE</i>

Полученные рекомбинантные плазмиды переносили в клетки *B. subtilis* 168, где с помощью гомологичной рекомбинации происходила интеграция гибридных фьюжн конструкций в геном бацилл (рисунок 3).

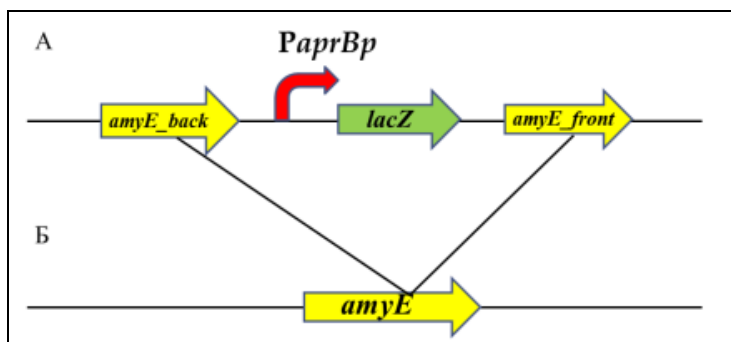


Рисунок 3. – Схема разрушения гена *amyE* в геноме *B. subtilis* 168 методом гомологичной рекомбинации. А - Гибридная фьюжн конструкция с промотором гена *aprBp*; Б – Геном *B. Subtilis* 168.

Интеграцию гибридных фьюжн конструкций в геном клеток *B. subtilis* 168 проверяли с использованием индикаторной среды (рисунок 4).

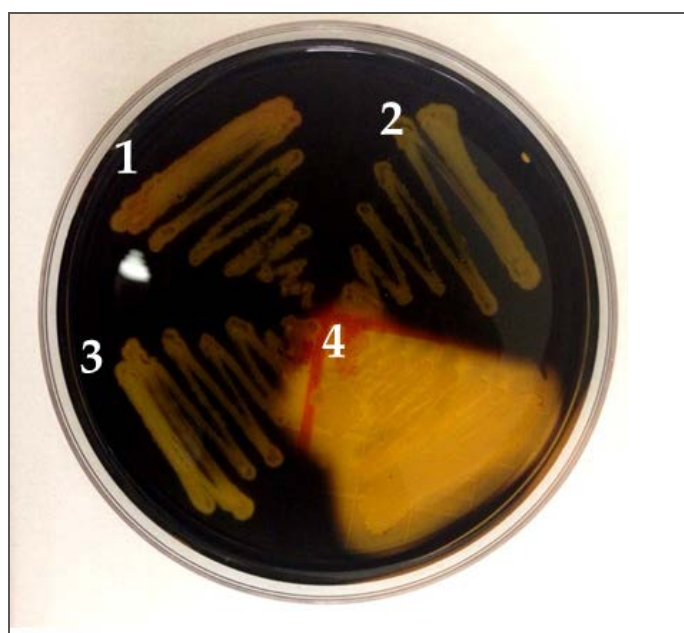


Рисунок 4. – Тест на расщепление крахмала. 1-3 – Рекомбинантные клетки *B. subtilis*, содержащие в геноме гибридную фьюжн конструкцию. Клетки не образуют зон расщепления крахмала. 4 – Контрольный штамм *B. subtilis* 168 (дикий тип), образует зоны расщепления крахмала.

Далее проверяли экспрессию репортерного гена *lacZ* под контролем промоторов генов *aprBp*, *gseBp* и *mprBp* *B. pumilus* 3-19 разной длины. Экспрессию гена в рекомбинантных штаммах исследовали в течение 10 часов методом измерения активности β-галактозидазы (рисунки 5-7).

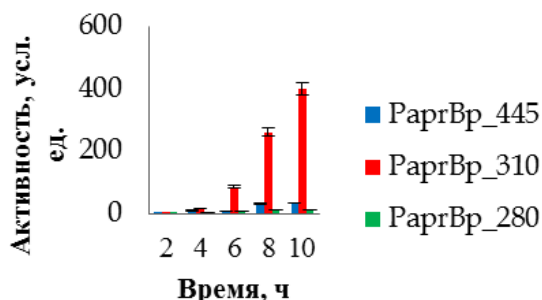


Рисунок 5. – Экспрессия репортерного гена *lacZ* под контролем потенциальных промоторов гена *aprBp*.

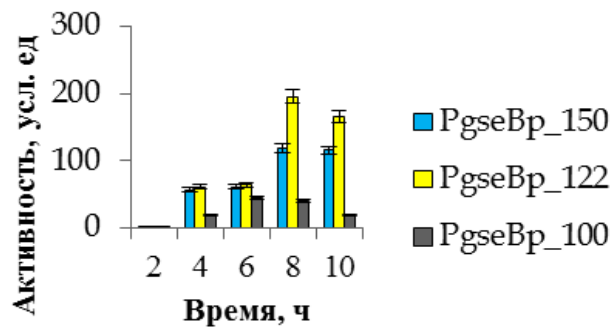


Рисунок 6. – Экспрессия репортерного гена *lacZ* под контролем потенциальных промоторов гена *gseBp*.

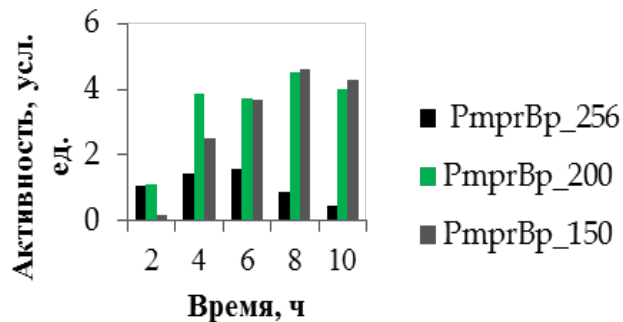


Рисунок 7. – Экспрессия репортерного гена *lacZ* под контролем потенциальных промоторов гена *mprBp*.

Как видно из данных на рисунке 5, экспрессия гена *lacZ* происходит эффективнее, если длина потенциального промотора гена *aprBp* составляет 310 п.о. Активность β-галактозидазы в 1,5-2 раза выше, если размер потенциального промотора гена *gseBp* составляет 122 п.о. по сравнению с промотором длиной 150 п.о. (рисунок 6). Экспрессия репортерного гена *lacZ* под контролем потенциального промотора гена металлопротеиназы *B. pumilus* 3-19 во всех конструкциях была крайне низкой.

Заключение. В ходе проведенного исследования показано, что организация регуляторной области генов протеиназ *B. pumilus* 3-19 различна: промотор гена доминирующей в пуле гидролитических ферментов протеиназы *ArgBp* более протяженный (310 п.о.) по сравнению с промоторами генов минорных протеиназ *GseBp* (122 п.о.) и *MprBp* (256 п.о.). Такая структура промоторов соотносится с биохимическими характеристиками и функциями изучаемых ферментов в клетке: доминирующая в протеолитическом пуле протеиназа *ArgBp* (до 70% активности в клетках бацилл) [4], имеет более сложную организацию регуляторной области гена; минорные секретируемые ферменты (глутамилэндонептидаза и металлопротеиназа) активность которых в клетке не превышает 10% [5-6], по-видимому, нуждаются в меньшем количестве транскрипционных регуляторов, которые могут связываться с промоторами.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке программы развития деятельности студенческих объединений Казанского (Приволжского) федерального университета (2014 г.).

Список литературы

- 1) Балабан Н.П., Шарипова М.Р. Практическое применение бациллярных протеаз // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. 2011. Т.153,№2. С.29-40.
- 2) Данилова Ю.В., Черёмин А.М., Замалева А.И., Марданова А.М., Замалютдинова Н.М., Шарипова М.Р. Тромболитическая и фибринолитическая активность бактериальных протеаз // Гены и клетки. 2012. Т.7,№3. С.49-51.
- 3) Danilova Y.V., Shagimardanov E.I., Margulis A.B., Toymentseva A.A., Balaban N.P., Rudakova N.L., Rizvanov A.A., Sharipova M.R., Palotás A. Bacterial enzymes effectively digest Alzheimer's β-amyloid peptide // Brain Res Bull. 2014. V.108. P.113-117.

- 4) Sharipova M. R., Balaban N.P., Kayumov A., Kirillova Y., Mardanova A., Gabdrakhmanova L., Leshchinskaya I., Rudenskaya G., Akimkina T., Safina D., Demidyuk I., Kostrov S. The expression of the serine proteinase gene of *Bacillus intermedius* in *Bacillus subtilis* // *Microbiol. Res.* 2008. V.163,№1. P.39-50.
- 5) Sharipova M.R., Shagimardanova E.I., Chastukhina I.B., Shamsutdinov T.R., Balaban N.P., Mardanova A.M., Rudenskaya G.N., Demidyuk I.V., Kostrov S.V. The expression of *Bacillus intermedius* glutamyl endopeptidase gene in *Bacillus subtilis* recombinant strains // *Mol. Biol. Rep.* 2007. V.34,№2. P.79-87.
- 6) Рудакова Н.Л., Сабирова А.Р., Каюмов А.Р., Марданова А.М., Балабан Н.П., Шарипова М.Р. Секретируемая металлопротеиназа *bacillus intermedius*: получение гомогенного препарата фермента и исследование физико-химических свойств // *Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки.* 2010. Т.152,№2. С.145-154.