СУПЕРПРОДУЦЕНТЫ ГУАНИЛСПЕЦИФИЧНЫХ РИБОНУКЛЕАЗ[1]

В.В. Ульянова, Р. Шах Махмуд, В.И. Вершинина

Получены данные о регуляции экспрессии генов внеклеточных гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл в условиях голодания. На их основе разработан подход для получения штаммов-суперпродуцентов этих практически значимых ферментов.

SUPERPRODUCERS OF GUANYL-SPECIFIC RIBONUCLEASES

V.V. Ulyanova, R. Shah Mahmud, V.I. Vershinina

The information about regulation of Bacillus extracellular guanyl-specific ribonucleases gene expression under stravation conditions is obtained. On this basis an approach to creation of strains overproducing these practically important enzymes is worked out.

Гуанилспецифичные рибонуклеазы бацилл привлекают внимание исследователей благодаря наличию таких биологических эффектов, как противоопухолевое и противовирусное действие [1–3]. Для получения препаративных количеств РНКаз, которые также могут быть использованы в качестве реагентов для удаления РНК в процессе очистки плазмид, необходим штамм-суперпродуцент. Бактерии, способные к повышенному синтезу РНКаз, получали путем оптимизации продукции фермента микроорганизмом, обработки культур мутагеном с последующим скринингом на наличие штаммов-суперпродуцентов, клонирования генов РНКаз на мультикопийных плазмидах [4–6]. Эти методы позволили добиться 5–10-кратного увеличения активности рибонуклеазы *B. intermedius* по сравнению с природным продуцентом. В настоящей работе предложен иной подход. Он основан на знаниях механизмов регуляции экспрессии генов РНКаз и предусматривает устранение белка – негативного регулятора транскрипции их генов.

Максимальное накопление гуанилспецифичных рибонуклеаз в окружающей среде происходит в начале стационарной фазы роста бактерий. Этот период характеризуется недостатком питательных веществ и высокой плотностью популяции. В этих неблагоприятных условиях переход клеток в покоящиеся формы – споры зависит от активности регуляторного белка Spo0A [7]. Мы исследовали промоторы генов гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл на наличие потенциальных сайтов для взаимодействия со Spo0A белком и обнаружили, что биназоподобные рибонуклеазы (РНКазы *B. intermedius*, *B. pumilus*, *B. thuringienis*), в отличие от барназоподобных (РНКазы *B. amyloliquefaciens* и *B. circulans*), таких сайтов не содержат (рис. 1).

[1] Работа поддержана Молодежным грантом РТ №14-24/2010(Г) и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (ГК №П1053 от 31 мая 2010 г.).

Рис. 1. Локализация потенциальных сайтов в промоторах генов гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл для взаимодействия со Spo0A-белком. Сайты на кодирующей цепи выделены маркером, на некодирующей цепи – обведены в рамку

Однако при изучении экспрессии генов РНКаз в рекомбинантных штаммах *B. subtilis* JH642 (*pheA1 trpC2*) и 667 (Δ*spo0A667*) установлено, что делеция гена этого регулятора по-разному сказывается на уровне активностей биназо- и барназоподобных рибонуклеаз (рис. 2): рибонуклеаза *B. amyloliquefaciens* практически не детектировалась, уровень активность РНКазы *B. circulans* соответствовал контролю, в то время как активность рибонуклеаз *B. intermedius*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis* в 5–6 раз превышала контрольные значения. Следовательно, Spo0A-белок, несмотря на наличие в промоторе потенциальных сайтов взаимодействия, не контролирует экспрессию гена РНКазы *B. circulans* и вместе с тем является активатором экспрессии гена РНКазы *B. amyloliquefaciens* и негативным регулятором экспрессии биназоподобных рибонуклеаз. В последнем случае его эффект объясняется репрессией регуляторных путей, ведущих к активации синтеза данных РНКаз [6, 8]. Только полное удаление Spo0A-белка оказывает значительное влияние на РНКазную активность, так как в экспериментах с мутантными штаммами, обладающими гиперактивной фосфатазой регулятора Spo0A (фосфатаза Spo0E) и характеризующимися потенциальным присутствием малых количеств Spo0A-белка, отмечено восстановление уровня биназоподобных РНКаз до базового.

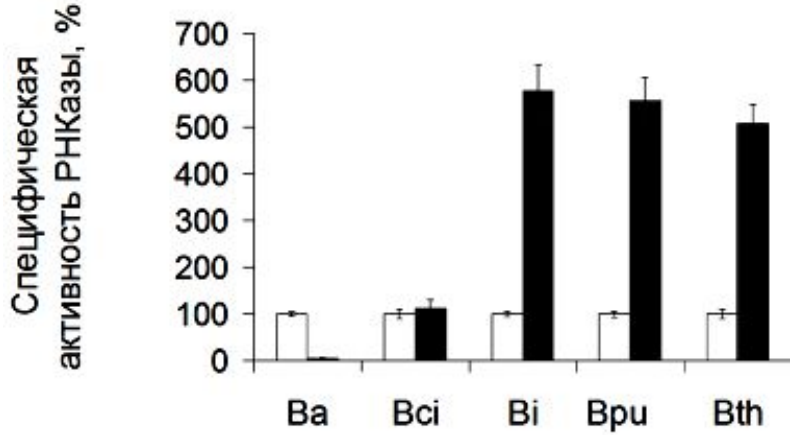

Рис. 2. Экспрессия генов рибонуклеаз бацилл в рекомбинантных штаммах *B. subtilis*, несущих делецию в гене регуляторного белка Spo0A. Уровни активностей РНКаз *B. amyloliquefaciens* (Ba), *B. circulars* (Bci), *B. intermedius* (Bi), *B. pumilus* (Bpu), *B. thuringiensis* (Bth) в рекомбинантных штаммах *B. subtilis* с полноценным Spo0A белком обозначены белыми столбиками, в Spo0A мутантных штаммах – черными

Таким образом, нами были получены суперпродуценты биназоподобных рибонуклеаз. На примере РНКазы *B. intermedius* нам удалось увеличить выход фермента

в 30 раз по отношению к природному продуценту *B. intermedius* 7P. Вместе с тем данные результаты могут быть использованы и для эффективной экспрессии барназоподобных РНКаз. В этом случае ген барназоподобной рибонуклеазы необходимо поместить под контроль промотора биназоподобной РНКазы и экспрессировать полученную конструкцию в Spo0A-дефектном штамме. Следует отметить, что применение *spo0A* мутантных штаммов для получения внеклеточных целевых белков имеет такие преимущества, как нарушение синтеза протеолитических ферментов, что способствуют продукции полноразмерных секретируемых белков [9], и неспособность образовывать споры, что важно в крупномасштабных ферментационных процессах [10].

Литература

1. *Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N.* Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents // BioEssays. 2008. Vol. 30. P. 781–790.

2. *Edelweiss E., Balandin T.G., Ivanova J.L. et al.* Barnase as a new therapeutic agent triggering apoptosis in human cancer cells // PLoS One. 2008. Vol. 3, I. 6. P. e2434.

3. *Грибенча С.В., Поцелуева Л.А., Баринский И.Ф. и др.* Защитная активность РНКазы *Bacillus intermedius* у морских свинок и кроликов, зараженных уличным вирусом бешенства // Вопросы вирусологии. 2006. Т. 51. С. 41–46.

4. *Знаменская Л.В., Клейнер Г.И., Паэгле Б.Я.* Оптимизация условий культивирования *Bacillus intermedius* для повышения биосинтеза щелочной внеклеточной РНКазы // Микробиология. 1980. Т. 49, вып. 5. С. 722–726.

5. *Балабан Н.П., Вершинина В.И., Знаменская Л.В., Чернокальская Е.Б.* Устойчивые к антибиотикам мутанты *Bacillus intermedius* – продуценты ряда ферментов // Биологические науки. 1992. Вып. 2. С. 139–143.

6. *Знаменская Л.В., Вершинина О.А., Вершинина В.И., Лещинская И.Б.* Экспрессия генов гуанилспецифичных рибонуклеаз *Bacillus intermedius* и *Bacillus pumilus* регулируется двухкомпонентной системой трансдукции сигнала РНО регулона *Bacillus subtilis* // Микробиология. 1999. №3. С. 304–311.

7. *Fujita M., Losick R.* Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A // Genes Dev. 2005. Vol. 19. P. 2236–2244.

8. *Ульянова В.В., Золотова М.А., Харитонова М.А. и др.* Роль двухкомпонентной системы ResD-ResE в регуляции экспрессии генов гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл // Мол. ген. микроб. Вирусол. 2008. №3. С. 23–28.

9. *Kodama T., Endo K., Ara K. et al.* Effect of *Bacillus subtilis spoOA* mutation on cell wall lytic enzymes and extracellular proteases, and prevention of cell lysis // J. Biosci. Bioeng. 2007. Vol. 103, № 1. P. 13–21.

10. *Oh M.K., Kim B.G., Park S.H.* Importance of spore mutants for fed-batch and continuous fermentation of *Bacillus subtilis* // Biotechnol. Bioeng. 1995. Vol. 47. P. 696–702.