

УДК 577.322.4

Возможная функция гена *ribT* *Bacillus subtilis*: теоретическое предсказание, клонирование и экспрессия

А. П. Якимов^{1,2}, Т. А. Серегина³, А. А. Холодняк³, Р. А. Кренева¹, А. С. Мионов³,
 Д. А. Перумов¹, А. Л. Тимковский^{1,2*}

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ Курчатовский институт, 188300, Ленинградская обл., Гатчина, Орлова роща

²Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

³Государственный институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1

*E-mail: alt@AT1660.spb.edu

Поступило в редакцию 24.04.2014

РЕФЕРАТ Полная расшифровка функций и взаимодействия элементов оперона биосинтеза рибофлавина (*rib*-оперон) у *Bacillus subtilis* необходима для создания сверхпродуцентов этого важнейшего витамина. Функция гена *ribT*, замыкающего оперон, до сих пор не определена. В представленной работе проведен поиск гомологов гипотетической аминокислотной последовательности продукта этого гена в базах данных, а также анализ гомологий, теоретически предсказано распределение элементов вторичной структуры, предложена третичная структура белка RibT. Нуклеотидная последовательность гена *ribT* была амплифицирована и клонирована в стандартный мультикопийный экспрессионный вектор pET15b, а затем экспрессирована после индукции ИПТГ в клетках *Escherichia coli* BL21(DE3), содержащих индуцибельный ген РНК-полимеразы фага T7. Экспрессия гена *ribT* подтверждена электрофорезом в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (SDS-PAGE). Белковый продукт экспрессии очищен с помощью аффинной хроматографии. Таким образом, показана принципиальная возможность получения белка RibT в количествах, достаточных для дальнейшего изучения его структуры и функциональной активности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биоинформатика, индуцибельная экспрессия, клонирование гена, поиск гомологий, протеомика, теоретическая структура белка.

Основные этапы биосинтеза рибофлавина в клетках *Bacillus subtilis* были выяснены ранее. Оказалось, что этот процесс определяется двумя участками генома: *rib*-опероном и геном бифункциональной флавокиназы/FAD-синтазы *ribC*, входящим в состав оперона *truB-rpsO* [1, 2]. В состав *rib*-оперона, контролирующего весь путь образования рибофлавина, начиная с гуанозин-5'-трифосфата (стартовый предшественник), входят пять неперекрывающихся генов. Это четыре последовательно расположенных структурных гена: *ribG* (кодирует бифункциональную аминопиримидиндезаминазу/урацилредуктазу), *ribB* (ген рибофлавинсинтазы), *ribA* (ген GTP-циклогидролазы), *ribH* (ген люмазинсинтазы), а также замыкающий оперон – ген *ribT*, функция которого до настоящего времени не определена. Кроме того, этот оперон содержит три регуляторных элемента: регуляторную зону *ribO* с основным промотором P1 и два дополнительных внутренних промотора P2 и P3.

Ранее нами была определена относительная функциональная активность всех трех промоторов оперона [3]. При этом обнаружилось парадоксальное явление: промоторы P2 и P3 при их испытании порознь в составе соответствующих фрагментов оперона значительно различались по транскрипционной активности. Промотор P3, регулирующий транскрипцию гена *ribT*, в несколько раз превосходил по активности основной промотор P1. Промотор P2, наоборот, был в десятки раз слабее P1. При этом ни P2, ни P3 не регулируются флавинами, однако известно, что при транскрипции всего *rib*-оперона под контролем основного промотора P1 все элементы этого оперона транскрибируются согласованно с образованием полицистронной мРНК [4]. И это несмотря на наличие нескольких промоторов, различающихся по транскрипционной активности и механизму регуляции.

Функция гена *ribT* (по другим номенклатурам *urpK*) до настоящего времени остается совершен-

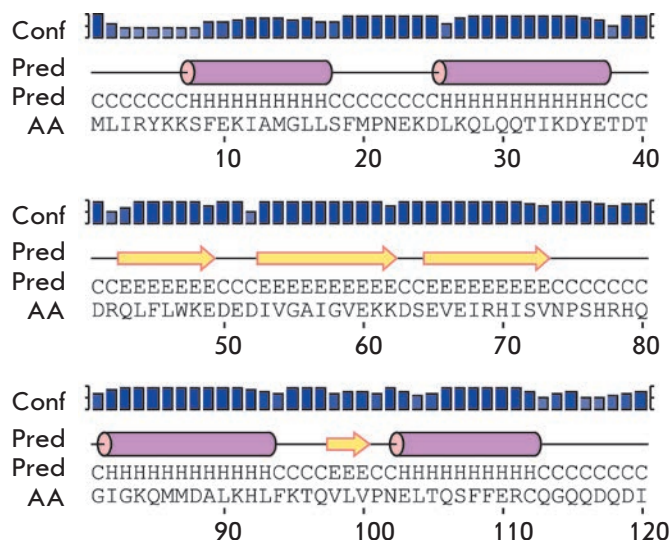


Рис. 1. Предсказание элементов вторичной структуры продукта гена *ribT*. Conf – надежность предсказания, Pred – расчетные данные, AA – аминокислота

но неясной. Получены косвенные указания на то, что мутации в гене *ribT* безразличны для работы *rib*-оперона и накопления рибофлавина. Так, Перкинс и соавт. [5] показали, что инактивация гена *ribT* не приводит к ауксотрофии по рибофлавину, но существенно снижает выход рибофлавина у штаммов-продуцентов. Из этого следует, что функция гена *ribT* важна для биосинтеза рибофлавина, но может быть лимитирующей при предельном повышении интенсивности биосинтеза рибофлавина.

Таким образом, выяснение функции продукта гена *ribT* может дать дополнительные возможности для создания промышленно перспективных сверхпродуцентов рибофлавина – одного из важнейших витаминов.

На основании известной нуклеотидной последовательности гена *ribT* была выведена аминокислотная последовательность его белкового продукта. Гипотетический белок состоит из 124 аминокислот и имеет молекулярную массу 14.5 кДа. При помощи сервиса PSIPRED [6] получено предсказание участков, с большой вероятностью образующих элементы вторичной структуры (рис. 1).

Затем по этой последовательности был осуществлен поиск гомологий и с использованием программы Clustal [5] проведено множественное выравнивание последовательности белкового продукта гена *ribT* только среди белков, структуры которых представлены в банке PDB [7] (рис. 2).

Из них были выбраны 1N71, 3FRM, 2G3A, 1Z4R, 3EY5, 2K5T, 3BLN, и по гомологии построена структура, представленная на рис. 3. Так как в некото-

рых кристаллических структурах белков-гомологов присутствует ацетил-CoA, с использованием программного комплекса Molsoft ICM Pro [8] был проведен докинг данного лиганда в нашу гипотетическую структуру.

Поскольку большинство выбранных белков-гомологов (за исключением 3FRM, чья функция неизвестна) относятся к ацетилтрансферазам, можно предположить, что гипотетический продукт гена *ribT* также принадлежит к ферментам этого класса.

Мы предположили, что роль белкового продукта данного гена может заключаться в ацетилировании атома N(5) флавинов, что приводит к образованию их восстановленных форм и поддерживает высокий уровень транскрипции *rib*-оперона. Ранее с нашим участием был установлен механизм ингибирования транскрипции путем непосредственного взаимодействия флавинов с лидерной последовательностью мРНК [9]. Логичность нашего предположения подтверждается данными в пользу того, что ингибирующее транскрипцию взаимодействие с лидерной последовательностью сенсорной РНК осуществляет окисленная форма FMN [10]. Поэтому ацетильное восстановление, осуществляемое продуктом гена *ribT*, может быть важным для поддержания синтеза рибофлавина на высоком уровне. Это предположение требует прямой экспериментальной проверки.

Отсюда следует задача дальнейших исследований, а именно, осуществление полного цикла экспрессии гена *ribT* в препаративном режиме, получение достаточных количеств очищенного нативного белкового продукта и прямая проверка *in vitro* его функциональной (ферментативной) активности.

Для проверки возможности экспрессии ген *ribT* амплифицировали с хромосомной ДНК *B. subtilis* с помощью праймеров RibT10 – 5'-CGCCATATGT-TAATTCGTTATAAAAAATCGTTT-3' и RibT11 – 5'-CGCCTCGAGTAATTATTGTATGAAATGTCT-TGATC-3' (олигонуклеотиды, использованные в работе, синтезированы фирмой «Евроген»). Первый олигонуклеотид комплементарен проксимальной, а второй – дистальной области гена *ribT*. ПЦР проводили в амплификаторе MyCycler фирмы Bio-Rad по следующей схеме: сначала клетки разрушали при 95°C в течение 3 мин, затем проводили 25 циклов амплификации, которые включали денатурацию ДНК при 95°C в течение 30 с, отжиг праймеров при 60°C в течение 30 с и достройку ДНК при 72°C в течение 30 с. На последнем этапе проводили достройку ДНК при 72°C в течение 2 мин. В результате был синтезирован фрагмент длиной 372 п.н., содержащий структурную область гена *ribT*, фланкированную сайтами узнавания рестриктаз NdeI и XhoI. После электрофоретического разделения продуктов ПЦР искомым

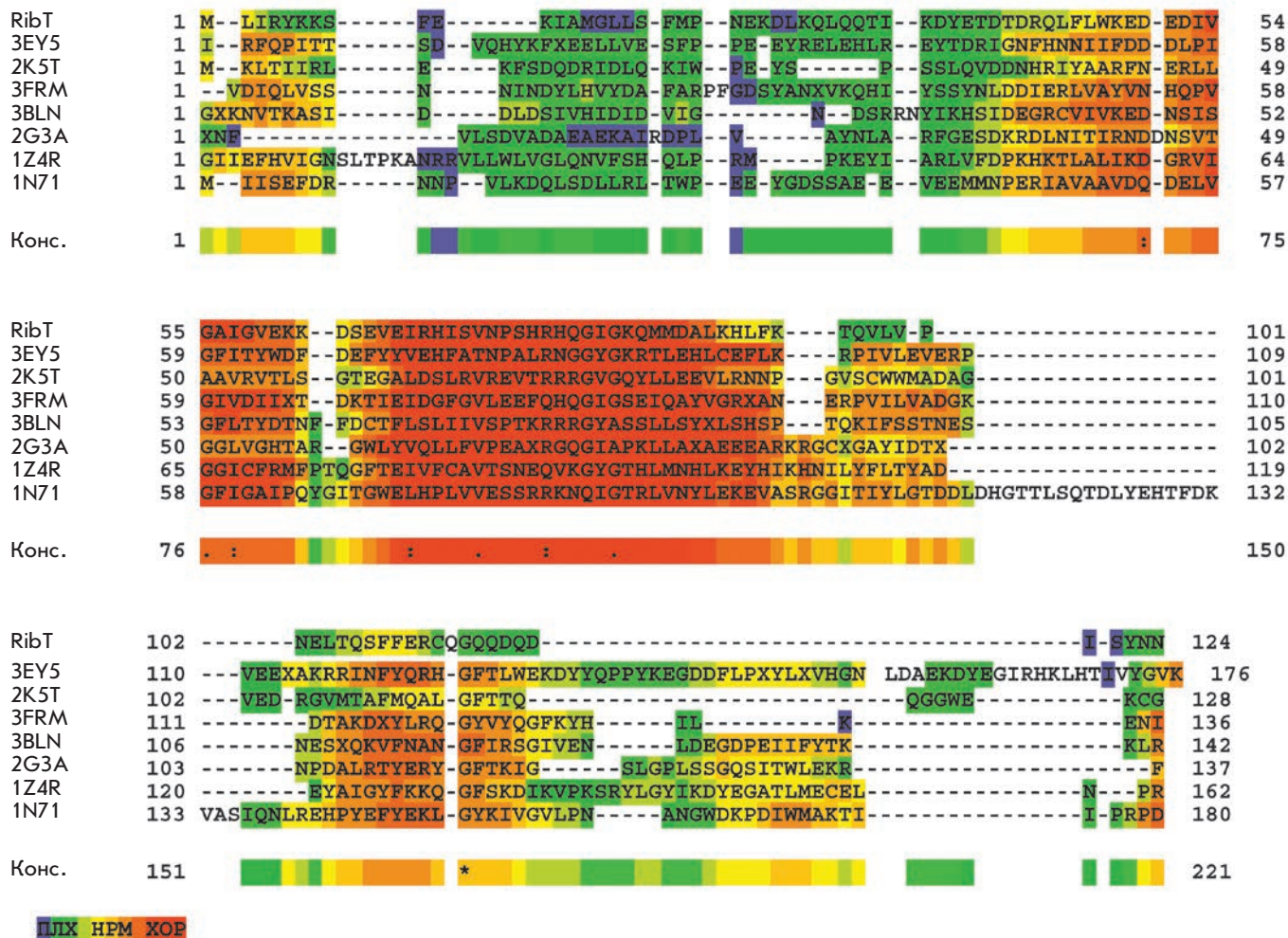


Рис. 2. Множественное выравнивание аминокислотной последовательности белкового продукта гена *ribT* с предполагаемыми гомологами (цветовая схема описана по адресу <http://www.jalview.org/help/html/colourSchemes/clustal.html>). Конс. – консервативная последовательность; ПЛХ – плохо; НРМ – нормально, удовлетворительно; ХОР – хорошо

фрагмент ДНК элюировали из геля с помощью набора GeneClean фирмы Fermentas. Ген *ribT* клонировали в мультикопийный экспрессионный вектор pET15b, содержащий промотор фага T7, индуцируемый изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ), по сайтам эндонуклеаз рестрикции NdeI и XhoI. Вектор pET15b содержит нуклеотидные последовательности для His-Tag перед сайтом узнавания рестриктазы NdeI и для сайта-мишени тромбина. Полученной лигазной смесью трансформировали клетки штамма *Escherichia coli* TG1. Отбор трансформантов проводили на агаризованной среде LB, содержащей ампициллин в качестве селективного маркера. Скрининг рекомбинантных клонов проводили методом ПЦР с использованием плазмидных праймеров pT7P – 5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГ-ГГГ-3' и pT7T – 5'-ГСТАГТТАТТГСТСАГСГ-

ГТ-3'. Из отобранных трансформантов выделяли плазмидную ДНК и при помощи рестрикционного анализа определяли наличие вставки в гибридных плаزمидях. Этими плазмидями, обозначенными как pET15b/*ribT*, трансформировали клетки штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащего индуцибельный ген РНК-полимеразы бактериофага T7.

Синтез белка RibT индуцировали, добавляя в ростовую среду ИПТГ в конечной концентрации 1 мМ. Экспрессию гена *ribT* определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (SDS-PAGE) общего белка клеток *E. coli* BL21(DE3), содержащих плазмиду pET15b/*ribT*. В качестве контроля использовали лизат клеток штамма BL21(DE3), содержащего плазмиду pET15b без вставки (рис. 4А).

В клеточном лизате штамма BL21(DE3), содержащего плазмиду pET15b/*ribT*, после опосредованной

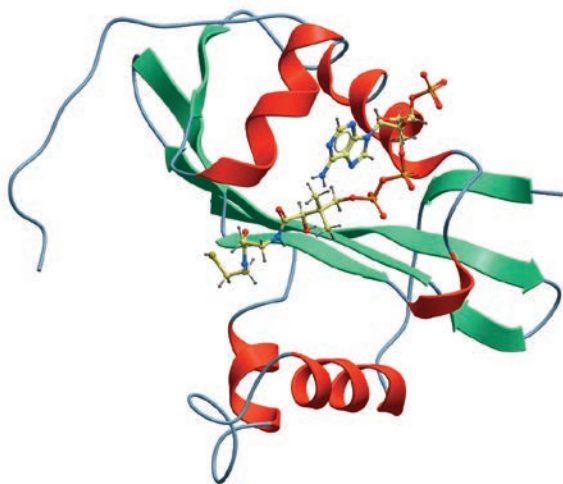


Рис. 3. Предполагаемая третичная структура продукта гена *ribT* в комплексе с ацетил-CoA

ИПТГ-индукции появляется дополнительная фракция белка с молекулярной массой приблизительно 14.5 кДа, что согласуется с расчетной молекулярной массой белка RibT (см. выше).

Меченный His-Tag рекомбинантный белок RibT выделяли с использованием TALON® Magnetic Beads (Clontech, США). Клетки штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащего плазмиду pET15b/*ribT*, выращенные в присутствии 1 мМ ИПТГ, собирали центрифугированием. Биомассу ресуспендировали в буфере следующего состава: 20 мМ натрий фосфат, pH 7.0, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол. Клетки разрушали ультразвуком и центрифугировали в течение 20 мин при 14000 об/мин. Супернатант инкубировали вместе с TALON® Magnetic Beads в течение 1 ч при 4°C. Далее смолу промывали четырьмя объемами того же буфера. Элюцию белка проводили буфером: 20 мМ натрий фосфат, pH 7.0, 300 мМ NaCl, 300 мМ имидазол. Элюированные фракции белка анализировали с помощью SDS-PAGE-электрофореза (рис. 4Б). Полосы 7–10 принадлежали целевому белку с достаточно высокой степенью чистоты и молекулярной массой

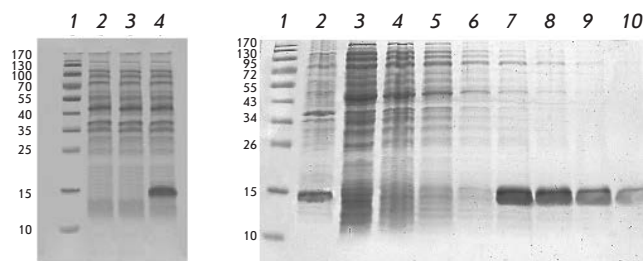


Рис. 4. Электрофоретический анализ (SDS-PAGE) экспрессии гена *ribT* и очистки рекомбинантного белка RibT. А – фракция общего белка из клеток *E. coli* BL21(DE3). 1 – белковый маркер; 2 – фракция белков клеток BL21(DE3), содержащих плазмиду pET15b без вставки *ribT*; 3 – фракция белков клеток BL21(DE3), содержащих плазмиду pET15b/*ribT*, выращенных без добавления ИПТГ; 4 – индукция белка RibT в клетках BL21(DE3), содержащих плазмиду pET15b/*ribT*, в присутствии 1 мМ ИПТГ. Б – белковая фракция из клеток BL21(DE3) pET15b/*ribT* до и после аффинной сорбции на TALON® Magnetic Beads. 1 – белковый маркер; 2 – фракция общего белка клеток BL21(DE3) pET15b/*ribT* после индукции ИПТГ; 3–6 – фракции, содержащие не связавшиеся белки; 7–10 – последовательная элюция фракций белка RibT, меченого His-Tag, в присутствии 300 мМ имидазола

около 14.5 кДа, что хорошо согласуется с теоретическим предсказанием.

ВЫВОДЫ

Теоретическая аминокислотная последовательность и анализ гомологий продукта гена *ribT* в банке PDB позволили осуществить молекулярное моделирование и предсказать возможную трехмерную структуру этого белка. Экспериментально осуществлена экспрессия гена *ribT* и доказана принципиальная возможность получения белка RibT в количествах, достаточных для дальнейшего изучения его структуры и функциональной активности. ●

Работа поддержана РФФИ (грант № 11-04-00476).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чикиндас М.Л., Миронов В.Н., Лукьянов Е.В., Борецкий Ю.Р., Арутюнова Л.С., Рабинович П.М., Степанов А.И. // Молекул. генет. микробиол. вирусол. 1987. Т. 4. № 1. С. 22–26.
2. Миронов В.Н., Перумов Д.А., Краев А.С., Степанов А.И., Скрябин К.Г. // Молекул. биология. 1990. Т. 24. № 3. С. 256–261.
3. Складорова С.А., Кренева Р.А., Перумов Д.А., Миронов А.С. // Генетика. 2012. Т. 48. № 10. С. 1–9.
4. Mironov V.N., Kraev A.S., Chikindas M.L., Chernov B.K., Stepanov A.L., Skryabin K.G. // Mol. Gen. Genet. 1994. V. 242. № 2. P. 201–208.
5. Perkins J.B., Sloma A., Hermann T., Theriault K., Zachgo E., Erdenberger T., Hannett N., Chatterjee N.P., Williams II V., Rufo Jr. G.A., et al. // J. Industr. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 22. P. 8–18.
6. Jones D.T. // J. Mol. Biol. 1999. V. 292. P. 195–202.
7. Bernstein F.C., Koetzle T.F., Williams G.J., Meyer Jr. E.E., Brice M.D., Rodgers J.R., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M. // J. Mol. Biol. 1977. V. 112. P. 535.
8. Abagyan R.A., Totrov M.M., Kuznetsov D.N. // J. Comp. Chem. 1994. V. 15. P. 488–506.
9. Mironov A.S., Gusarov I., Rafikov R., Errais Lopez L., Shatalin K., Kreneva R.A., Perumov D.A., Nudler E. // Cell. 2002. V. 111. № 4. P. 747–756.
10. Serganov A., Huang L., Patel D.J. // Nature. 2009. V. 458. P. 233–237.