

УДК 577.123.383:579.852.11

Реконструкция пуринового метаболизма у *Bacillus subtilis* с целью получения штамма-продуцента AICAR – нового препарата широкого терапевтического применения

К. В. Лобанов, Л. Эрраис Лопес, Н. В. Королькова, Б. В. Тяглов, А. В. Глазунов,
Р. С. Шакулов, А. С. Миронов*

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

*E-mail: alexmir@genetika.ru

Поступила в редакцию 24.02.2011 г.

РЕФЕРАТ AICAR – природное соединение, аналог и предшественник аденозина. Будучи активатором протеинкиназы, активируемой AMP (АМПК), AICAR имеет широкий терапевтический потенциал, поскольку он нормализует углеводный и липидный обмен и ограничивает пролиферацию опухолевых клеток. Синтез AICAR в клетках *Bacillus subtilis* контролируется ферментами биосинтеза пуринов, гены которых входят в состав пуринового оперона (*pur*-оперона). Проведена реконструкция пуринового метаболизма в клетках штамма *B. subtilis*, направленная на сверхпродукцию AICAR. С этой целью из генома *B. subtilis* удалили ген *purH*, кодирующий формилтрансферазу/IMP-циклогидролазу, фермент, контролирующий превращение AICAR в IMP, что обеспечивает накопление AICAR. Для увеличения продукции AICAR в хромосому бактерий внесли инсерцию, инактивирующую ген-регулятор *purR* и делетировали терминатор транскрипции, расположенный в лидерной области *pur*-оперона. Кроме того, сконструирован экспрессионный интегративный вектор, содержащий сильный промотор гена *rpsF*, кодирующего рибосомный белок S6. В этот вектор под контроль промотора гена *rpsF* клонирован гетерологичный ген *purF* *Escherichia coli*, кодирующий первый фермент биосинтеза пуринов со снятой аллостерической регуляцией, а также модифицированный ген *prs* *E. coli*, ответственный за синтез предшественника пуринов – фосфорибозилпирофосфата (PRPP). Модифицированные гены *purF* и *prs* встроили в хромосому штамма-продуцента. Полученный в результате проведенных генетических манипуляций штамм *B. subtilis* накапливает 11–13 г/л AICAR в культуральной жидкости.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА противоопухолевый препарат AICAR, метаболизм пуринов, реконструкция генома, штамм-продуцент *Bacillus subtilis*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ AICAR – 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибофуранозид; AICAR-P – нуклеотид-AICAR-фосфат; IMP – инозинмонофосфат; AMP – аденозинмонофосфат; АМПК – AMP-активируемая протеинкиназа; PRPP – фосфорибозилпирофосфат; GAR – 5-фосфорибозилглицинамидрибонуклеотид; GMP – гуанозинмонофосфат; ПЦР – полимеразная цепная реакция; КЖ – культуральная жидкость.

ВВЕДЕНИЕ

При всем разнообразии структурной организации генов, кодирующих ферменты биосинтеза пуриновых нуклеотидов, у различных организмов биохимия этого процесса консервативна: формирование пуринового цикла осуществляется на платформе рибозо-5-фосфата (все интермедиаты – нуклеотиды) с использованием одноуглеродного компонента (формиата и/или N10-формилтетрагидрофолата) [1].

Одноуглеродные соединения востребованы на двух этапах биосинтеза пуринов и соответственно при их недостатке могут накапливаться предшественники – фосфорибозилглицинамидрибонуклеотид (GAR) и 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибонуклеотид (AICAR-P). Среди них AICAR-P занимает особое положение, так как его формилирование и последующая циклизация завершают формирование пуринового гетероцикла с образованием инозин-

монофосфата (IMP) (рис. 1). Процесс превращения AICAR-P в IMP в клетках прокариот контролируется геном *purH*, который кодирует два домена с активностями AICAR-P-формилтрансферазы и IMP-циклогидролазы [2, 3]. Дальнейшие модификации IMP приводят к образованию АМР и GMP.

Несмотря на незавершенность структуры пуринового гетероцикла, AICAR-P является природным аналогом АМР, замещающим его в некоторых ферментативных реакциях *in vivo*. Наибольшее внимание за последнее десятилетие привлекает возможность замещения АМР в реакциях активации АМР-киназы (АМР-активируемая протеинкиназа) млекопитающих. АМРК – глобальный регулятор метаболических процессов, обеспечивающих энергетический статус организма эукариот [4, 5]. Для активации АМРК *in vivo* удобно использовать нуклеозид AICAR, который в клетках быстро фосфорилируется с образованием AICAR-P, аналога АМР. Появление AICAR-P имитирует накопление АМР и провоцирует перестройку энергетических процессов, направленную на преодоление мнимого энергетического стресса. Благодаря способности активировать АМРК препараты AICAR обладают широким терапевтическим потенциалом, поскольку они нормализуют углеводный [6] и липидный обмен [7]. Имитируя состояние энергетического стресса, AICAR подавляет рост опухолевых клеток [8]. Показана эффективность AICAR в предупреждении сахарного диабета типа 2 [9]. AICAR индуцирует апоптоз, он эффективен при хронических [10] и острых лейкозах [11].

Цель настоящей работы состояла в получении штамма-продуцента AICAR путем направленной реконструкции пуринового метаболизма в клетках *B. subtilis*. Выбор *B. subtilis* обусловлен тем, что генетический контроль и регуляция пуринового метаболизма у этих бактерий изучены достаточно подробно. Кроме того, штаммы рода *Bacillus* уже давно используются в качестве продуцентов пуриновых нуклеозидов и нуклеотидов, таких, как инозин, инозиновая и гуанозиновая кислоты [12, 13].

Пуриновый оперон *B. subtilis* – *purEKBCSQLFMNHD* (далее обозначаемый как *pur*-оперон), кодирует ферменты синтеза IMP – главного промежуточного соединения при биосинтезе пуриновых нуклеотидов (рис. 1).

Группа из 12 сцепленных генов, образующих *pur*-оперон, локализована в районе 55° на хромосоме *B. subtilis* (рис. 2) [14]. Экспрессия *pur*-оперона *B. subtilis* находится под двойным негативным контролем, в котором участвуют белок-репрессор PurR [15] и терминатор транскрипции, расположенный в лидерной области оперона [16]. Показано, что низкомолекулярным эффектором белка PurR служит

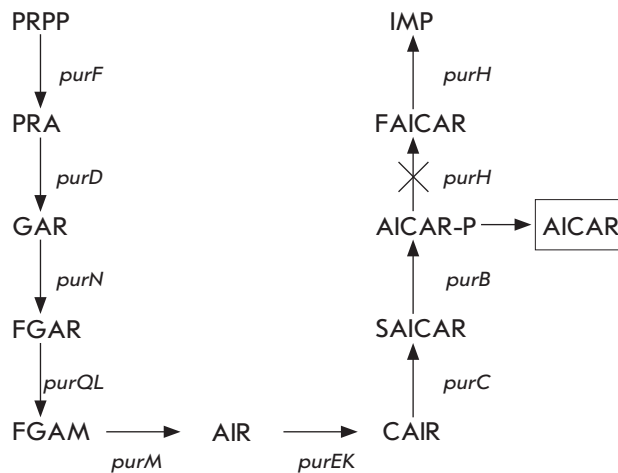


Рис. 1. Схема биосинтеза пуриновых нуклеотидов *de novo*. PRPP – 5'-фосфорибозил-1-пирофосфат, PRA – 5'-фосфорибозиламин, GAR – 5'-фосфорибозилглицинамид, FGAR – 5'-фосфорибозил-N-формилглицинамид, FGAM – 5'-фосфорибозил-N-формилглицинамидин, AIR – 5'-фосфорибозил-5-аминоимдазол, CAIR – 5'-фосфорибозил-5-аминоимдазол-4-карбоксилат, SAICAR – 5'-фосфорибозил-4(N-сукцинокарбоксамид)-5-аминоимдазол, AICAR-P – 5'-фосфорибозил-4-карбоксамид-5-аминоимдазол, FAICAR – 5'-фосфорибозил-4-карбоксамид-5-формамидоимдазол, IMP – инозин-5'-монофосфат, AICAR – 5-аминоимдазол-4-карбоксамидрибофуранозид.

PRPP [15], тогда как в качестве модулятора, усиливающего терминацию транскрипции перед первым структурным геном оперона, выступает гуанин [17]. Позднее выяснилось, что 5'-нетранслируемая область мРНК выполняет сенсорную функцию в отношении метаболита-эффектора гуанина и служит так называемым рибопереключателем [18, 19], обеспечивающим преждевременную терминацию транскрипции оперона [20, 21].

Таким образом, на первом этапе работы по получению штамма-продуцента AICAR необходимо было обеспечить максимальную экспрессию генов *pur*-оперона, устранив его негативную регуляцию под действием белка-репрессора PurR и терминатора транскрипции в лидерной области оперона. После этого из генома полученного штамма удалили ген *purH*, кодирующий формилтрансферазу/IMP-циклогидролазу, участвующую в синтезе AICAR. Инактивация этого фермента должна обеспечивать внутриклеточное накопление AICAR (рис. 1). На следующем этапе работы необходимо было увеличить пул основного предшественника синтеза пуринов *de novo* – PRPP. PRPP синтезируется из рибозо-5-

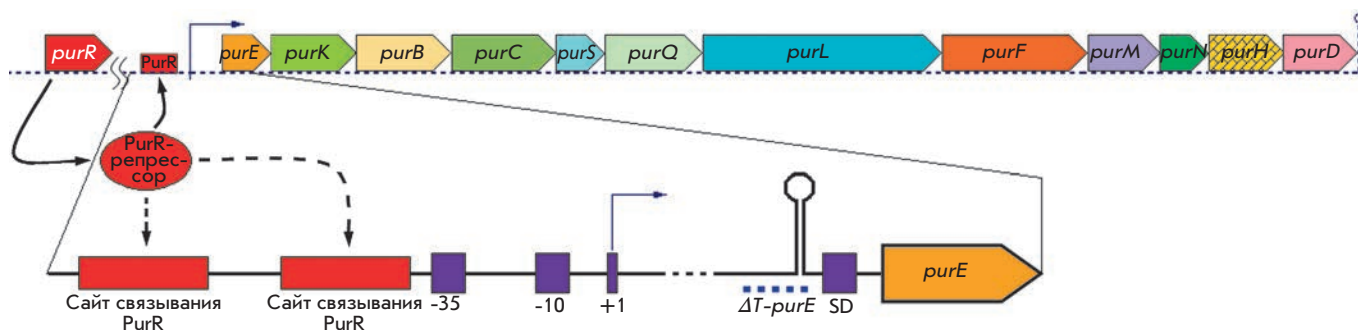


Рис. 2. Схема структурной организации *pur*-оперона и его регуляции. В верхней части рисунка показано относительное расположение 12 сцепленных структурных генов, образующих *pur*-оперон, и не сцепленный с ними ген *PurR*, кодирующий белок-репрессор *pur*-оперона. В нижней части рисунка представлена лидерная область *pur*-оперона с указанием сайтов связывания белка-репрессора PurR, сайта связывания РНК-полимеразы (-35 – -10), старта транскрипции (+1), терминатора транскрипции (в виде шпильчатой структуры) и сайта связывания рибосом (SD); пунктиром обозначен делетированный участок (ΔT -*purE*) лидерной области.

фосфата под контролем PRPP-синтазы, кодируемой геном *prs*. Этот фермент подвержен аллостерической регуляции с участием пуриновых нуклеотидов. Структурно-функциональная организация PRPP-синтазы, более детально изучена у бактерий *E. coli*, у которых получен мутантный вариант этого фермента со снятой аллостерической регуляцией [22]. Учитывая эти данные, был проведен сайт-направленный мутагенез гена *prs E. coli*, направленный на получение мутантного фермента, не подверженного ретроингибированию пуриновыми нуклеотидами, с целью его последующего переноса в клетки *B. subtilis*.

Еще одно препятствие для повышения продукции AICAR представляет аллостерическая регуляция первого фермента собственно пуринового биосинтеза – глутамин-PRPP-аминотрансферазы, кодируемой геном *purF* [23]. Известно, что глутамин-PRPP-аминотрансфераза из *E. coli*, в отличие от фермента *B. subtilis*, не подвержена инактивации в стационарной стадии роста бактерий [24]. Кроме того, у *E. coli* описан мутантный вариант этого фермента, устойчивый к ингибированию пуриновыми нуклеотидами [25]. Поэтому и в этом случае было решено использовать модифицированную сайт-направленным мутагенезом глутамин-PRPP-аминотрансферазу из *E. coli* с целью последующего ее переноса в клетки *B. subtilis*. Для оптимальной экспрессии модифицированных генов *prs* и *purF E. coli* в клетках *B. subtilis* на основе плазмиды pDG268 был сконструирован экспрессионный интегративный вектор, содержащий сильный промотор гена *rpsF*, кодирующего рибосомный белок S6. Наконец, на последнем этапе работы полученный вектор после клонирования в него генов *prs* и *purF E. coli* под контролем промотора гена *rpsF* встроили в хромосому штамма-продуцента AICAR *B. subtilis*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные штаммы и плазмиды

Использованные в работе бактериальные штаммы и плазмиды представлены в табл. 1. Штамм *B. subtilis* AM732 получен путем трансформации штамма Mu8u5u6 хромосомной ДНК, выделенной из штамма *B. subtilis* 168 с отбором трансформантов Pur⁺. Штамм AM743 получен путем трансформации штамма AM732 хромосомной ДНК, выделенной из штамма *B. subtilis* LCC28 с отбором трансформантов Neo^R на среде с неомицином.

Среды и условия культивирования

В качестве полноценной питательной среды для выращивания бактерий использовали среду LB [31] или стандартную минимальную среду Спицайзена с необходимыми добавками [26]. Аминокислоты добавляли в количестве 50 мкг/мл. В качестве источника углерода использовали глюкозу (0.4%). При необходимости в среду добавляли: ампициллин (Amp) – 100 мкг/мл, хлорамфеникол (Cm) – 10 мкг/мл, эритромицин (Em) – 1 мг/мл, неомицин (Neo) – 5 мг/мл. Метионин и лейцин добавляли в концентрации 50 мкг/мл. В случае пуриновых ауксотрофов в качестве источника пуринов использовали гипоксантин, аденин или гуанин (20 мкг/мл).

Трансформирующую ДНК *B. subtilis* выделяли по методу Сайто и Миуры [32], эксперименты по трансформации проводили по Анагностопулосу и Спицайзену [26].

Манипуляции с плазмидной ДНК

Выделение плазмидной ДНК, клонирование, трансформацию в клетки *E. coli* и анализ рекомбинантных

Таблица 1. Используемые в работе бактериальные штаммы и плазмиды

Штаммы, плазмиды	Генотип	Происхождение
<i>Bacillus subtilis</i>		
168	<i>trpC</i>	[26]
Му8у5у6	<i>leu met purF</i>	[27]
LCC28	<i>purR::neo</i>	[28]
AM747	<i>trpC purH::(pMutin2purH'-lacZ) ΔT-purE</i>	[21]
AM732	<i>leu met</i>	Данная работа
AM743	<i>leu met purR::neo</i>	«
AM764	<i>leu met purR::neo ΔT-purE</i>	«
AM778	<i>leu met purR::neo ΔT-purE ΔpurH</i>	«
AM793	<i>leu met ΔpurH</i>	«
AM811	<i>leu met purR::neo ΔT-purE ΔpurH amyE::[P_{trnSF}-prs_E]</i>	«
AM813	<i>leu met purR::neo ΔT-purE ΔpurH amyE::[P_{trnSF}-purF_E]</i>	«
AM815	<i>leu met purR::neo ΔT-purE ΔT ΔpurH amyE::[P_{trnSF}-prs_E-purF_E]</i>	«
<i>E. coli</i>		
TG1	<i>thi supE hsdΔ5 Δ(lac-proAB)/F' tra Δ36 proAB⁽⁺⁾ lacI^(q) lacZ ΔM15</i>	ВКПМ
MG1655	Прототроф	[29]
Плазмиды		
pDG268	Ap ^r (<i>E. coli</i>) Cm ^r (<i>B. subtilis</i>)	[18]
pNZT1	Em ^r	[30]
pLE1	как pDG268, но содержит промотор P _{trnSF}	Данная работа
pLE2	как pLE1, но содержит ген <i>prs_E</i>	«
pLE3	как pLE1, но содержит ген <i>purF_E</i>	«
pLE4	как pLE1, но содержит гены <i>prs_E</i> и <i>purF_E</i>	«

плазмид проводили с использованием стандартных методов [31].

Препараты ферментов

Эндонуклеазы рестрикции, T4-ДНК-лигаза, термостабильная Taq-полимераза получены от компании «Fermentas».

Полимеразная цепная реакция

ПЦР проводили на приборе MyCycler (компания «Bio-Rad Laboratories»). Температурный режим подбирали с учетом длины амплифицированного фрагмента, длины и состава используемых праймеров. Выделение и очистку ПЦР-продуктов проводили с использованием набора Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (компания «Fermentas»).

Сайт-направленный мутагенез

Сайт-направленный мутагенез проводили с помощью ПЦР с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров. Состав праймеров и их характеристика приведены в табл. 2. Присутствие соответствующих мутаций проверяли секвенированием по методу Сэнгера [33].

Условия ферментации

Проверяли способность штаммов, полученных в ходе работы, накапливать AICAR в культуральной жидкости (КЖ). Посевную культуру штаммов культивировали при 37°C в течение 18 ч на LB-бульоне. Затем по 0.5 мл культуры добавляли к 4.5 мл ферментационной среды в пробирках 20 x 200 мм и культивировали при 37°C в течение 72 ч на роторной качалке. Состав ферментационной среды (%): соевая мука – 3, кормовые дрожжи – 1, кукурузный экстракт – 5, (NH₄)₂HPO₄ – 0.6, мочевины – 0.4, сахар (пищевой) – 15, pH 7.0.

Определение концентрации AICAR в культуральной жидкости

КЖ, полученную в процессе ферментации, центрифугировали для освобождения от клеток, после чего в супернатанте определяли концентрацию AICAR методом количественной тонкослойной хроматографии на пластинках Сорбфил. Состав разработанной нами элюирующей системы: хлороформ-метанол-25% водный раствор аммиака в объемном соотношении 5 : 3 : 1. В качестве альтернативного метода использовали количественную ВЭЖХ на хрома-

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

Праймер	Ген	Нуклеотидная последовательность*	Координаты**	
			5'	3'
N1	<i>purN_B</i>	ccccgcgggcggaacgattccacat (SacII)	+135	+154
N2	<i>purN_B</i>	cgctgcagttcttttcgaaaggaacga (PstI)	+652	+630
D1	<i>purD_B</i>	cgctgcagttcacaacattaaggggatgaaaa (PstI)	-28	-5
D2	<i>purD_B</i>	cgcggtaccttttctgcacatatgcc (KpnI)	+410	+389
F1	<i>purF_E</i>	cgcatcgataggaggtgcaaacagatgtcggtattgtcggtatc (ClaI)	+1	+22
F2	<i>purF_E</i>	cgcgctcagcgaaggcatcatcct (EspI)	+1530	+1511
F3	<i>purF_E</i>	gggcttcgttCaaccgctat	+968	+991
F4	<i>purF_E</i>	atagcggttttGaacgaagccc	+991	+968
F5	<i>purF_E</i>	ggtattgatatgTGgagcgccacgg	+1216	+1242
F6	<i>purF_E</i>	ccgtggcgctcCAcatatcaatacc	+1242	+1216
P1	<i>prs_E</i>	cgcgatccaaggaggttctctcAtgctgatatga (BamHI)	-21	+3
P2	<i>prs_E</i>	cccatcgatgccgggttcgattagtgttcga (ClaI)	+949	+928
P3	<i>prs_E</i>	ctgacagtggCtctgcacgctg	+366	+377
P4	<i>prs_E</i>	agcgtgcagaGccactgtcagc	+377	+366
R1	<i>rpsF_B</i>	cgcgaattcttgcggcgccgggtat (EcoRI)	-223	-205
R2	<i>rpsF_B</i>	cgcgatccataatgggcaaggagcaat (BamHI)	-31	-51

*Последовательность праймеров дана в ориентации 5'–3'. Заглавными жирными буквами указаны нуклеотидные замены, введенные в праймеры для проведения сайт-направленного мутагенеза. Подчеркнуты сайты узнавания рестриктаз, приведенных в скобках.

**Координаты 5'- и 3'-концов праймеров указаны относительно старта трансляции соответствующих генов. Гены *B. subtilis* обозначены знаком _(B), а *E. coli* – знаком _(E).

тографе системы «ALLIANCE» (Separations Module Waters 2695, Photodiode Array detector Waters 2996).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Усиление экспрессии *pur*-оперона *B. subtilis*

В работе, посвященной изучению регуляции экспрессии *pur*-оперона *B. subtilis* [21], мы показали, что при повреждении гена *purR*, кодирующего белок-репрессор оперона, наблюдается почти 20-кратное усиление экспрессии репортерного гена *lacZ*, встроенного в ген *purH*, по сравнению с экспрессией в штамме дикого типа. При делетировании из генома штамма дикого типа 94 п.н., захватывающих Rho-независимый терминатор транскрипции (ΔT -*purE*), который расположен в лидерной области *pur*-оперона (рис. 2), экспрессия репортерного гена *lacZ* увеличивалась примерно в 10 раз. Однако при объединении обеих мутаций обнаруживался ярко выраженный синергичный эффект: экспрессия гена *lacZ* возрастала более чем в 200 раз. Учитывая эти данные, на первом этапе конструирования штамма-продуцента AICAR были проведены опыты

по инактивации гена *purR* и делеции терминатора транскрипции (ΔT -*purE*).

В качестве исходного материала использовали штамм AM732 – Pur⁺-производный штамма Ми8и5и6 (табл. 1), охарактеризованного ранее [21]. Для перенесения в геном штамма AM732 инсерции *purR::neo*, полностью инактивирующей синтез белка-репрессора PurR, штамм AM732 трансформировали хромосомной ДНК, выделенной из штамма LCC28 (*purR::neo*), с отбором устойчивых к неомицину (Neo^R) рекомбинантов. В результате для дальнейшей работы отобрали штамм AM743 *purR::neo* (табл. 1). Делецию ΔT -*purE* в геноме штамма AM743 *purR::neo* получали по следующей схеме. Первоначально получили протяженную делецию ΔL -*E*, полностью перекрывающую лидерную область *pur*-оперона и частично первый структурный ген *purE*, что привело к появлению ауксотрофности по пуринам. Получение такой делеции детально описано в работе [21]. В делеционный вариант штамма AM743 *purR::neo* ΔL -*E* с помощью трансформации ДНК, выделенной из штамма AM747 (табл. 1), переносили делецию терминатора транскрипции ΔT -*purE*, отбирая трансформанты Pur⁺

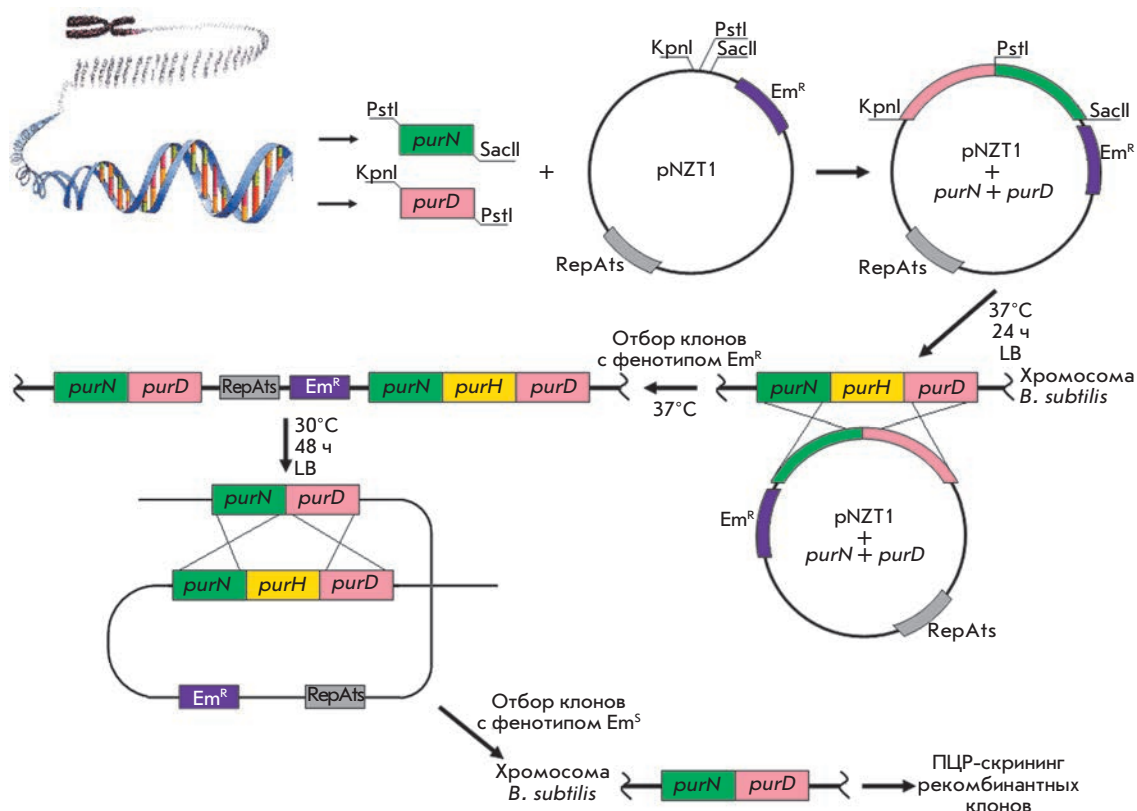


Рис. 3. Схема получения делеции структурного гена *purH* с использованием метода, описанного в работе [30].

на минимальной среде Спицайзена, не содержащей пуринов. В результате получили штамм AM764, содержащий в геноме инсерцию *purR::neo* и делецию терминатора транскрипции ΔT -*purE*.

Получение делеции гена *purH* в составе хромосомы *B. subtilis*

Из схемы биосинтеза пуринов (рис. 1) следует, что для внутриклеточного накопления AICAR необходимо инактивировать формилтрансферазу/IMP-циклогидролазу, кодируемую геном *purH*. Делеция гена *purH* в составе хромосомы *B. subtilis* получена методом [30], основанным на использовании специально сконструированной плазмиды pNZT1 – производной интегративного вектора rKS1 [34]. Плазмида pNZT1 содержит маркер устойчивости к эритромицину (*Em^R*) и полилинкер с множественными сайтами рестрикции для клонирования целевых фрагментов хромосомной ДНК, но, что самое главное, ее репликация чувствительна к температуре: при 30°C плазмида существует в автономном состоянии, однако при температуре 37°C репликация блокируется, и плазмида может встроиться в хромосому за счет гомологичной рекомбинации, если в ее составе клонирован какой-либо хромосомный фрагмент (рис. 3). Поскольку интеграция плазмиды в хромосому происходит в результате единичного акта рекомбинации в обла-

сти гомологии между клонированным фрагментом и хромосомой, сайт интеграции плазмиды в хромосому оказывается фланкированным гомологичными дублированными последовательностями. Культивирование таких бактерий при температуре 30°C (пермиссивной для репликации плазмиды pNZT1) может приводить к ее выщеплению из хромосомы с захватом одной из копий фланкированных последовательностей хромосомы, что позволяет заменять дикий аллель любого гена хромосомы на мутантный, клонированный в составе плазмиды pNZT1 (рис. 3).

Указанное свойство плазмиды pNZT1 использовано для делетирования гена *purH*. С этой целью проведена ПЦР-амплификация фрагментов хромосомы, фланкирующих ген *purH*. С использованием праймеров N1 и N2 (табл. 2) амплифицировали дистальный участок размером 517 п.н. гена *purN*, примыкающий к 5'-концу гена *purH*, и клонировали по сайтам узнавания рестриктаз *SacII* и *PstI* в плазмиду pNZT1. На следующем этапе с участием праймеров D1 и D2 (табл. 2) амплифицировали проксимальный участок размером 442 п.н. гена *purD*, примыкающий к 3'-концу гена *purH*, и клонировали по сайтам узнавания рестриктаз *PstI* и *KpnI* в полученную на предыдущем этапе плазмиду pNZT1, содержащую вставку фрагмента гена *purN*. Сконструированной таким образом плазмидой трансформировали штамм *E. coli*

TG1. Трансформанты Em^R отбирали на среде с эритромицином (300 мкг/мл) при 30°C. С помощью ПЦР проверяли присутствие в полученных клонах плазмиды pNZT1 с клонированными фрагментами генов *purN* и *purD*. Выделенными из проверенных клонов плазмидами pNZT1-*purN-purD* трансформировали штамм AM764 *purR::neo ΔT-purE*. Отбор трансформантов Em^R проводили на среде с эритромицином (3 мкг/мл). Несколько клонов Em^R культивировали в жидкой среде LB с эритромицином (3 мкг/мл) при 37°C в течение ночи, а затем рассеивали на чашки со средой LB с эритромицином (3 мкг/мл) и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. Рекомбинанты Em^R формировались в результате интеграции плазмиды pNZT1-*purN-purD* в соответствующий хромосомный локус, что подтверждали ПЦР-амплификацией фрагмента размером 2413 п.н. при использовании праймеров N1 и D2. Несколько клонов Em^R засеивали в жидкую LB-среду без антибиотика и инкубировали на качалке при 30°C в течение 48 ч, а затем рассеивали на чашки со средой LB без антибиотика и инкубировали еще 24 ч при 30°C. Выросшие клоны проверялись на выщепление интегрированной плазмиды pNZT1, о чем судили по появлению эритромицинчувствительных клонов. Как отмечалось выше, выщепление плазмиды может сопровождаться либо сохранением в составе хромосомы аллеля дикого типа гена *purH*, либо заменой этого аллеля на делецию $\Delta purH$ (рис. 3). Интеграцию (перенос) делеции $\Delta purH$ в хромосому штамма AM764 *purR::neo ΔT-purE* подтверждали наработкой ПЦР-фрагмента размером 2413 п.н. с участием праймеров N1 и D2. Один из вариантов штамма AM764 *purR::neo ΔT-purE*, включившего делецию $\Delta purH$ и названный AM778, накапливал до 4–5 г/л AICAR в КЖ и рос на минимальной среде только при добавлении гипоксантина, аденина или гуанина, что подтверждало наличие в его геноме дефектного гена *purH*. Параллельно был сконструирован контрольный штамм AM793, содержащий $\Delta purH$, но не несущий мутаций *purR::neo* и $\Delta T-purE$, которые обеспечивают дерепрессию ферментов биосинтеза пуринов.

Для повышения продуктивности полученного штамма было целесообразно увеличить внутриклеточное содержание PRPP – ключевого предшественника биосинтеза пуринов (рис. 1). Известно, что PRPP-синтазы, ответственные за синтез PRPP в клетках как *B. subtilis* [35], так и *E. coli* [36], подвержены аллостерическому ингибированию пуриновыми нуклеотидами, в том числе, вероятно, и фосфорилированными производными AICAR. Как отмечалось во «Введении», описан мутантный вариант PRPP-синтазы *E. coli*, не подверженный аллостерической регуляции [22]. Поэтому была поставлена задача по-

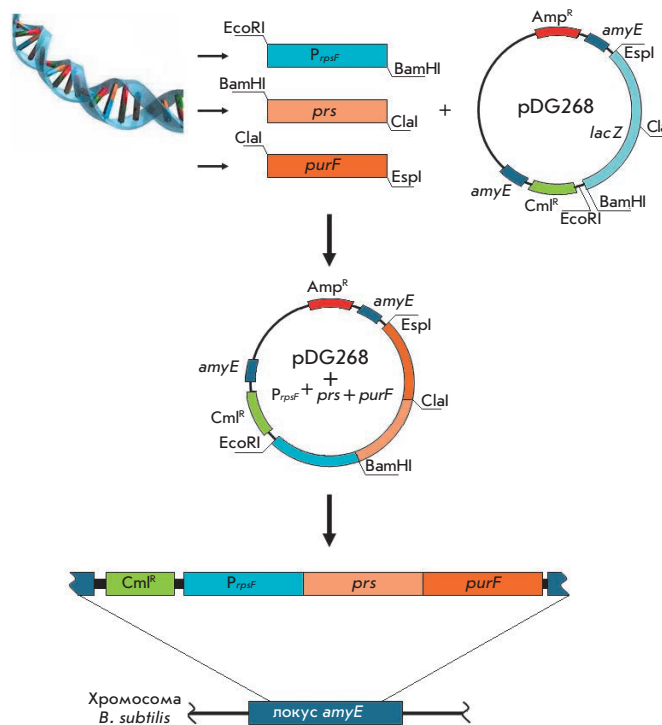


Рис. 4. Схема клонирования генов *prs* и *purF* *E. coli* под контролем промотора гена *rpsF* *B. subtilis* в составе плазмиды pDG268 и их интеграции в хромосому *B. subtilis*.

лучить аналогичный мутантный фермент *E. coli*, клонировать его и оптимизировать экспрессию в клетках штамма-производителя AM778. Однако, прежде чем приступить к этой работе, необходимо было сконструировать интегративный экспрессионный вектор, обеспечивающий высокий уровень экспрессии гетерологичных генов *E. coli* в клетках *B. subtilis*.

Конструирование интегративного экспрессионного вектора на основе плазмиды pDG268

В качестве исходного материала для получения интегративного экспрессионного вектора была выбрана плазмида pDG268. Эта плазмида способна реплицироваться в клетках *E. coli*, но не *B. subtilis*, однако при введении в клетки *B. subtilis* она может интегрироваться в хромосомный локус *amyE* *B. subtilis*. Плазмида pDG268 содержит кассету, которая включает полилинкер для клонирования, репортерный ген *lacZ* без собственного промотора и ген устойчивости к хлорамфениколу (Cm^R) (рис. 4). Кассета фланкирована фрагментами гена *amyE*, что позволяет встраивать вектор с клонированным фрагментом в локус *amyE* на хромосоме *B. subtilis*.

В качестве промотора, способного обеспечить высокий уровень экспрессии клонированных генов

cgcgaa R1 (EcoRI)
 tatgaggatccttcttgccggggcggtatggcaggagctaagaggcaggaaaagtccgc
 atactcctagaagaacgcccgcgccataccgtcctcgatttctccgtccttttcaggcg
 cttgaagggaaagaatatgtgggtccaagacggagatgttattcatttccgatttaatgta
 gaacttcctttcttatacaccaggttctgcctctacaataagtaaaggctaaattacat
 -35 -10 +1
 taggatgcagTTGTAAagggacaagagctttggTATAATataaaattgtgagtaatagaa
 atcctacgtcaacatttccctgttctcgaacctatattatattttaacactcattatctt
 ttattgctccttgcccattatgg
 aataacgaggaacgggtaataacc
 R2 (BamHI) taggcgc

Рис. 5. Нуклеотидная последовательность промотора гена *rpsF*. Жирным выделены последовательности -10 и -35 промотора и старт транскрипции (+1). Рамкой обведен UP-элемент промотора. Нуклеотидная последовательность праймеров, использованных для клонирования промотора, обозначена синим.

E. coli в клетках *B. subtilis*, был выбран промотор гена *rpsF*, кодирующего рибосомный белок S6 у бацилл. Известно, что промоторы генов рибосомных белков относятся к наиболее сильным промоторам *B. subtilis*, их экспрессия координирована со скоростью роста бактерий и достигает максимума на логарифмической стадии роста [37, 38]. Нуклеотидная последовательность промотора гена *rpsF* представлена на рис. 5. Как следует из рис. 5, промотор P_{rpsF} содержит каноническую последовательность -10, последовательность -35, близкую к канонической, а также АТ-богатую область в районе -70...-50 п.н., так называемый UP-элемент, обеспечивающий более эффективную инициацию транскрипции [39].

С целью клонирования промотора P_{rpsF} в плазмиду pDG268 фрагмент ДНК, содержащий промоторную область гена *rpsF*, амплифицировали методом ПЦР с хромосомы *B. subtilis* 168 с использованием праймеров R1 и R2 (табл. 2). Полученный ПЦР-фрагмент обрабатывали эндонуклеазами рестрикции EcoRI и BamHI и клонировали в плазмиду pDG268, обработанную теми же рестриктазами (рис. 4). Лигазной смесью трансформировали штамм *E. coli* TG1. Трансформанты, несущие вставку искомого фрагмента, отбирали на индикаторной среде, содержащей ампициллин в концентрации 120 мкг/мл и X-gal. Колонии трансформантов имели ярко-голубую окраску, так как репортерный ген *lacZ* оказывался под контролем клонированного промотора P_{rpsF} . Присутствие вставки подтверждали с помощью ПЦР с использованием праймеров R1 и R2. Затем полученную плазмиду встраивали в хромосомный локус *amyE* *B. subtilis* путем отбора устойчивых к хлорамфениколу (Cm^R) трансформантов. Схема интеграции вектора pDG268 с клонированным промотором гена *rpsF* представлена на рис. 4. Определение активности β -галактозидазы в этих трансформантах показало, что экспрессия ре-

портерного гена *lacZ* под контролем промотора P_{rpsF} почти на порядок превышала экспрессию этого гена под контролем обычных промоторов, например природного промотора *pur*-оперона (данные не представлены). Сконструированный вектор назван pLE1.

Сайт-направленный мутагенез гена *prsE* *E. coli* (prs_E)

Согласно опубликованным данным, специфическая мутация в гене *prsE*, приводящая к замене Asp128 → Ala в PRPP-синтазе, приводит к снятию ретроингибирования фермента пуриновыми нуклеотидами [22]. Для получения аналогичной мутации осуществлен синтез олигонуклеотидных праймеров P3 и P4 (табл. 2), содержащих замены нуклеотидов (обозначены заглавными буквами), приводящие к образованию мутантного белка с заменой Asp128 → Ala. На первом этапе амплифицировали ПЦР-фрагменты с участием двух пар праймеров: P4-P1 (фланкирует 5'-конец гена *prsE* и содержит сайт узнавания для рестриктазы BamHI) и P3-P2 (фланкирует 3'-конец гена *prsE* и содержит сайт узнавания для рестриктазы ClaI). Затем состыковали полученные фрагменты и амплифицировали полноразмерный ген *prsE* с использованием праймеров P1 и P2 (табл. 2). Важно подчеркнуть, что в 5'-область праймера P1 включена оптимизированная для экспрессии в бациллах нуклеотидная последовательность сайта связывания рибосомы (SD). На следующем этапе ПЦР-фрагмент P1-P2, содержащий мутантный ген *prsE*, клонировали в полученный ранее вектор pLE1 с использованием рестриктаз BamHI и ClaI. В результате получили плазмиду pLE2, содержащую мутантный ген *prsE* под контролем промотора P_{rpsF} . На заключительном этапе плазмиду pLE2 встроили в хромосомный локус *amyE* *B. subtilis* по описанной выше схеме (рис. 4). Полученный в результате интеграции плазмиды pLE2 штамм назван AM811 (табл. 1).

Сайт-направленный мутагенез гена *purF* *E. coli* (*purF_E*)

Первый фермент пуринового биосинтеза – глутамин-PRPP-аминотрансфераза (ген *purF*), играет ключевую роль в обеспечении нормального функционирования пути биосинтеза пуринов у *E. coli* и *B. subtilis* и подвержен еще более сложной по сравнению с PRPP-синтазой аллостерической регуляции с участием нуклеотидов [40]. Поэтому можно было ожидать, что использование мутантной глутамин-PRPP-аминотрансферазы из *E. coli*, аналогичной описанной в работе [25], позволит повысить продукцию АИКАР. Согласно данным [25], замена Lys326 → Gln в белке модифицирует сайт связывания GMP (А-сайт), а замена Pro410 → Trp – сайт связывания AMP (С-сайт), причем комбинация этих мутаций делает фермент практически устойчивым к действию любых пуриновых нуклеотидов. Сайт-направленный мутагенез гена *purF_E* проводили по схеме, описанной в предыдущем разделе. Для получения замены Lys326 → Gln синтезировали олигонуклеотидные праймеры F3 и F4, а для замены Lys326 → Gln – праймеры F4 и F5 (в табл. 2 соответствующие нуклеотидные замены выделены заглавными буквами и жирным шрифтом). После ПЦР-амплификации этих праймеров с фланкирующими праймерами F1 и F2 и последующей состыковкой ПЦР-фрагментов получен полноразмерный ген *purF_E*, кодирующий белок с обеими аминокислотными заменами. Как и в случае гена *prs_E*, в состав праймера F1 был введен оптимизированный для бацилл сайт SD. Модифицированный ген *purF_E* клонировали в плазмиду pLE1 под контроль промотора P_{trpF} по ClaI- и EspI-сайтам. Таким же образом клонировали модифицированный ген *purF_E* в плазмиду pLE2, содержащую ген *prs_E*. Соответствующие плазмиды получили наименование pLE3 и pLE4 (табл. 1). На заключительном этапе плазмиды pLE3 и pLE4 встроили в хромосомный локус *amyE* *B. subtilis* по описанной выше схеме (рис. 4). Полученные в результате интеграции плазмид pLE3 и pLE4 штаммы названы AM813 и AM815 соответственно (табл. 1).

Определение способности штаммов накапливать АИКАР

Для оценки способности полученных в ходе работы штаммов накапливать АИКАР проводили опыты по ферментации в условиях, описанных в разделе «Экспериментальная часть». Результаты этих опытов суммированы на рис. 6.

Как следует из данных, приведенных на рис. 6, исходный штамм AM732 практически совсем не накапливает АИКАР. Только после удаления из генома

Штамм	Накопление АИКАР в КЖ (г/л)
AM732 (дикий тип)	<0.0001
↓	
AM793 <i>ΔpurH</i>	0.5–0.8
↓	
AM778 <i>purR::neo ΔT-purE ΔpurH</i>	4–5
↓	
AM811 <i>purR::neo ΔT-purE ΔpurH amyE::[P_{trpF}-<i>prsE</i>]</i>	7–8
↓	
AM813 <i>purR::neo ΔT-purE ΔpurH amyE::[P_{trpF}-<i>purF_E]</i></i>	9–10
↓	
AM815 <i>purR::neo ΔT-purE ΔpurH amyE::[P_{trpF}-<i>prsE</i>-<i>purF_E]</i></i>	11–13

Рис. 6. Этапы конструирования штаммов-продуцентов АИКАР и их продуктивность.

этого штамма гена *purH* (штамм AM793) наблюдается незначительное (< 1 г/л) накопление АИКАР в КЖ. Мутации *purR::neo* и *ΔT-purE* (штамм AM788), обеспечивающие полную дерепрессию ферментов биосинтеза пуринов, приводят к существенному увеличению накопления АИКАР, до 4–5 г/л. Дальнейшее, почти двукратное, увеличение продуктивности отмечено у штаммов AM811 и AM813, экспрессирующих один из мутантных десенсибилизированных белков *E. coli* – PRPP-синтазу (ген *prs*) или глутамин-PRPP-аминотрансферазу (ген *purF*). Максимальное накопление АИКАР – до 11–13 г/л, обнаруживается у штамма AM815, характеризующегося полной дерепрессией ферментов биосинтеза пуринов и одновременно содержащего модифицированные гены *prs_E* и *purF_E* под контролем промотора P_{trpF}.

Интересно, что практически весь синтезируемый в клетках АИКАР экскретируется в КЖ: в специально проведенных нами опытах показано, что внутриклеточная концентрация АИКАР составляет не более 2% от его концентрации в среде. Механизм экскреции АИКАР не известен, хотя имеются данные, что в процессе его экспорта из клеток бацилл принимает участие мембранный белок, кодируемый геном *rbuE* [41].

Этапы конструирования продуцента АИКАР направлены на стимуляцию биосинтеза пуриновых нуклеотидов, следовательно, АИКАР, обнаруживаемый в КЖ, образуется при дефосфорилировании нуклеотида АИКАР-Р, синтезированного *de novo*, а не является вторичным продуктом биосинтеза гистидина. Поскольку АИКАР-Р – это природный аналог AMP, а АИКАР – аналог аденозина, повышенное содержание этих соединений в клетках продуцента сопровождается, вероятно, множественными метаболическими эффектами (см. выше), значение кото-

рых для продукции AICAR далеко не ясно. В клетках микроорганизмов AICAR-P служит не только интермедиатом метаболизма пуринов, но и регуляторной молекулой общеклеточного значения. Превращение AICAR-P в IMP требует участия N10-формилтетрагидрофолата, поэтому повышенный уровень AICAR-P в клетках может сигнализировать о нарушении одноуглеродного метаболизма, что позволяло ранее считать этот нуклеотид сигналом тревоги (alarmone) [42]. Несмотря на то что прокариоты не имеют для AICAR-P мишени, подобной АМПК животных, направленность физиологического действия этого аналога АМР в них сохраняется. В частности, инактивация гена *purH* в *Salmonella enterica* и накопление в клетках AICAR-P приводит к подавлению активности фруктозо-1,6-бисфосфатфосфатазы, вследствие чего клетки теряют способность к глюконеогенезу и не растут на глицерине и других глюконеогенных субстратах [43]. В клетках прокариот и низших эукариот (например, дрожжей) некоторое количество AICAR-P образуется как побочный продукт биосинтеза гистидина, что создает дополнительные возможности регуляции биосинтеза пуриновых нуклеотидов [44]. Множественные и далеко не полностью изученные регуляторные связи AICAR-P осложняют конструирование штаммов-продуцентов и требуют дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований на основе бактерий *B. subtilis* получен штамм-продуцент AICAR – нового препарата широкого терапевтического применения. Стратегия получения штамма-продуцента AICAR основана на направленной реконструкции пуринового метаболизма в клетках *B. subtilis*. На первом этапе работы в ген *purR*, кодирующий белок-репрессор *pur*-оперона, внесена инсерция, а также был удален терминатор транскрипции в лидерной области *pur*-оперона, что обеспечило максимальную дерепрессию ферментов биосинтеза пуринов *de novo*. Затем из генома бактерий удалили

ген *purH*, кодирующий формилтрансферазу/IMP-циклогидролазу. Инактивация этого фермента нарушает реакцию превращения AICAR в IMP и приводит к его накоплению в клетке. На следующем этапе работы проведен сайт-направленный мутагенез генов *prs* и *purF* *E. coli*, кодирующих ключевые ферменты синтеза предшественников пуринов, с целью получения их мутантных вариантов, не подверженных ретроингибированию пуриновыми нуклеотидами. Наконец, на последнем этапе работы модифицированные гены *prs* и *purF* *E. coli* встроили в хромосому *B. subtilis* под контроль сильного промотора, обеспечивающего высокий уровень их экспрессии в клетках *B. subtilis*. В итоге получили штамм-продуцент, накапливающий 11–13 г/л AICAR в КЖ.

В заключение следует отметить, что совсем недавно появилось сообщение о том, что AICAR успешно прошел вторую стадию клинических испытаний в качестве противоопухолевого средства [45]. AICAR оказывает положительный эффект при хроническом лимфоцитарном лейкозе, множественной миеломе и мантийно-клеточной лимфоме. Важно подчеркнуть, что приведенная в каталогах стоимость коммерческих препаратов AICAR составляет от \$100 до \$1000 за грамм, что, по-видимому, обусловлено его получением путем химического синтеза. Высокая стоимость делает AICAR малодоступным для научно-исследовательской работы и тем более для терапии метаболического синдрома. Сконструированный нами штамм-продуцент AICAR может стать основой для разработки промышленного микробиологического производства общедоступного препарата AICAR, стоимость которого будет на порядки ниже по сравнению с указанными выше ценами. ●

Авторы выражают благодарность

Н.П. Закатаевой за предоставление плазмиды *pNZT1*, а также В.А. Муратовой и Г.И. Сергеевой за квалифицированную техническую помощь.

Работа выполнена при частичной поддержке Фонда некоммерческих программ «Династия».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Buchanan J.M., Hartman S.C. // Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 1959. V. 21. P. 199–261.
- Zalkin H., Nygaard P. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Washington, DC.: ASM Press, 1996. P. 561–579.
- Switzer R.L., Zalkin H., Saxild H.H. *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. Washington, DC.: ASM Press, 2002. P. 255–269.
- Hardie D.G., Carling D., Carlson M. // Ann. Rev. Biochem. 1998. V. 67. P. 821–855.
- Hardie D.G., Salt I.P., Hawley S.A., Davies S.P. // Biochem. J. 1999. V. 338. P. 717–722.
- Rutter G.A., Xavier G.S., Leclerc I. // Biochem. J. 2003. V. 375. P. 1–16.
- Gaidhu M.P., Fediuc S., Anthony N.M., So M., Mirpourian M., Ceddia R.B. // J. Lipid Res. 2009. V. 50. P. 704–715.
- Swinnen J.V., Beckers A., Brusselmans K., Organe S., Segers J., Timmermans L., Vanderhoydonc F., Deboel L., Derua R., Waelkens E., et al. // Cancer Res. 2005. V. 65. P. 2441–2448.
- Pold R., Jensen L.S., Jessen N., Buhl E.S., Schmitz O., Flyvbjerg A., Fujii N., Goodyear L.J., Gotfredsen C.F., Brand C.L., et al. // Diabetes. 2005. V. 54. P. 928–934.
- Campas C., Lopez J.M., Santidrian A.F., Barragan M., Bellosillo B., Colomer D., Gil J. // Blood. 2003. V. 101. P. 3674–3680.

11. Sengupta T.K., Leclerc G.M., Hsieh-Kinzer T.T. // *Mol. Cancer*. 2007. V. 6. № 46. P. 1–12.
12. Matsuno K., Mori Y., Asahara T. // *US Patent* 7326546. 2008.
13. Asahara T., Mori Y., Zakataeva N.P., Livshits V.A., Yoshida K., Matsuno K. // *Appl. Microb. Biotechnol.* 2010. V. 87. P. 2195–2207.
14. Ebbole D.J., Zalkin H. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 8274–8287.
15. Weng M., Nagy P.L., Zalkin H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. P. 7455–7459.
16. Ebbole D.J., Zalkin H. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 10894–10902.
17. Johansen L.E., Nygaard P., Lassen C., Agerso Y., Saxild H.H. // *J. Bacteriol.* 2003. V. 185. P. 5200–5209.
18. Mironov A.S., Gusarov I., Rafikov R., Lopez L.E., Shatalin K., Kreneva R.A., Perumov D.A., Nudler E. // *Cell*. 2002. V. 111. P. 747–756.
19. Nudler E., Mironov A.S. // *Trends Biochem. Sci.* 2004. V. 29. P. 11–17.
20. Mandal M., Boese B., Barrick J.E., Winkler W.C., Breaker R.R. // *Cell*. 2003. V. 113. P. 577–586.
21. Лобанов К.В., Королькова Н.В., Еремина С.Ю., Эрраис Лопес Л., Миронов А.С. // *Генетика*. 2011. Т. 47. № 7. С. 890–899.
22. Hove-Jensen B., Nygaard P. // *Eur. J. Biochem.* 1982. V. 126. P. 327–332.
23. Meyer E., Switzer R.L. // *J. Biol. Chem.* 1979. V. 254. P. 5397–5402.
24. Turnbough C.L., Switzer R.L. // *J. Bacteriol.* 1975. V. 121. P. 108–114.
25. Zhou G., Smith J.L., Zalkin H. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 6784–6789.16. C.L.
26. Anagnostopoulos C., Spizizen J. // *J. Bacteriol.* 1961. V. 81. P. 741–746.
27. Yoshikawa H., Sueoka N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1963. V. 49. P. 559–566.
28. Christiansen L.C., Schou S., Nygaard P., Saxild H.H. // *J. Bacteriol.* 1997. V. 179. P. 2540–2550.
29. Blattner F.R., Plunkett G. 3rd., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., et al. // *Science*. 1997. V. 277. P. 1453–1474.
30. Zakataeva N.P., Nikitina O.V., Gronskiy S.V., Romanenkov D.V., Livshits V.A. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 85. P. 1201–1209.
31. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
32. Saito H., Miura K.I. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1963. V. 42. P. 619–629.
33. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
34. Shatalin K.Y., Neyfakh A.A. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. V. 245. P. 315–319.
35. Arnvig K., Hove-Jensen B., Switzer R.L. // *Eur. J. Biochem.* 1990. V. 192. P. 195–200.
36. Hove-Jensen B., Harlow K.W., King C.J., Switzer R.L. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. P. 6765–6771.
37. Henkin T.M. // *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics / Eds Sonenshein A.L., Hoch J.A., Losick R. Washington, D.C.: American Soci. Microbiol. 1993. P. 669–682.
38. Linder C., Nijland R., Hartkamp M. // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. P. 1097–1105.
39. Estrem S.T., Gaal T., Ross W. Gourse R.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 9761–9766.
40. Chen S., Tomchick D.R., Wolle D., Hu P., Smith J.L., Switzer R.L., Zalkin H. // *Biochemistry*. 1997. V. 36. P. 10718–10726.
41. Sheremet A.S., Gronskiy S.V., Akhmadyshev R.A., Novikova A.E., Livshits V.A., Shakulov R.S., Zakataeva N.P. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2011. V. 38. P. 65–70.
42. Bochner B.R., Ames B.N. // *Cell*. 1982. V. 29. P. 929–937.
43. Dougherty M.J., Boyd J.M., Downs D.M. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 28. P. 33892–33899.
44. Rebora K., Laloo B., Daignan-Fornier B. // *Genetics*. 2005. V. 170. P. 61–70.
45. Пресс-релиз компании «Advancell» от 16.02.2011.