

СОЗДАНИЕ ВЕКТОРОВ ДЛЯ СЕКРЕЦИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ БЕЛКОВ

Н. Г. Доружинская, Е. В. Охримук, И. М. Лиморова, А. Н. Евтушенков

*Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь,
dorujinskaya@yahoo.com*

Секреция внеклеточных белков во внешнюю среду имеет некоторые преимущества в сравнении с внутриклеточной локализацией продуктов экспрессии. Секреция обеспечивает упрощенный процессинг, повышенную биологическую активность, высокую стабильность продукта и его растворимость. Кроме того, если промышленно значимый белок секретируется в культуральную жидкость, нет необходимости разрушения клеток, что приводит к загрязнению продуктов цитоплазматическим содержимым. Цель данной работы – сконструировать векторы секреции, направляющие гетерологичные белки во внешнюю среду. Вирулентность многих бактериальных патогенов определяется секрецией внеклеточных белков. *Erwinia chrysanthemi* вызывает мягкие гнили у многих растений. Характерные симптомы мацерации тканей и гибели клеток вызываются внеклеточными пектатлиазами, целлюлазами и протеазами. Пектатлиазы и целлюлазы содержат N-концевые сигнальные аминокислотные последовательности, называемые лидерными пептидами, функция которых заключается в обеспечении транслокации данных ферментов через цитоплазматическую мембрану. Таким образом, N-концевые лидерные последовательности могут использоваться для секреции гетерологичных белков.

В качестве модельного белка, позволяющего регистрировать функционирование созданных в ходе работы секреторных векторов, служил внутриклеточный фермент ксилозоизомераса из *Arthrobacter nicotianae*. Ксилозоизомераса (EC 5.3.1.5) катализирует обратимую изомеризацию D-ксилозы в D-ксилозу на первом этапе метаболизма ксилозы, следующему по пентозофосфатному пути. Этот фермент также рассматривается как глюкозоизомераса благодаря его способности конвертировать D-глюкозу в D-фруктозу. Вторая каталитическая способность используется в индустрии при производстве фруктозных сиропов из кукурузного крахмала.

В начале работы проводилось субклонирование ранее полученной плазмиды pCel, несущей ген целлюлазы (*celZ*) и плазмиды pS7, содержащей ген пектатлиазы (*pelB*). В результате проведенного секвенирования укороченных плазмид с фрагментами генов пектатлиазы и целлюлазы было выявлено наличие N-концевых лидерных последовательностей в клонированных фрагментах. С использованием праймеров, сконструированных на основе определенных последовательностей генов *celZ* и *pelB*, была проведена амплификация лидерных пептидов с их промоторными областями. Синтезированные в результате ПЦР фрагменты были клонированы в плазмидный мультикопийный вектор pUC18. Полученная ранее плазмида pPr4, несущая фрагмент хромосомы *A. nicotianae*, амплифицировалась с помощью ПЦР с использованием праймеров, сконструированных на основе определенных последовательностей гена ксилозоизомерасы (*xylA*). Амплифицированный фрагмент вырезался по введенным сайтам рестрикции и в конечном итоге лигировался с плазмидой pUC18, содержащей N-концевую лидерную последовательность целлюлазы либо – пектатлиазы. Такие гибридные конструкции трансформировались в штамм *Escherichia coli* XL1-Blue. Высокая ферментативная активность ксилозоизомерасы в клетках *E. coli* указывала на то, что данный белок конститутивно экспрессируется и приобретает активную форму. Большая часть синтезированного фермента локализовалась в периплазме клеток *E. coli*

XL1-Blue. В ходе последующей работы планируется ввести гибридные конструкции в бактерии *E. chrysanthemi* и исследовать секрецию ксилоизомеразы во внешнюю среду.