

ИССЛЕДОВАНИЕ КАТАБОЛИТНОЙ РЕПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО ГЕНА α -АМИЛАЗЫ В КЛЕТКАХ *BACILLUS SUBTILIS*

Качан А.В., Евтушенко А.Н.

*Белорусский государственный университет, Минск,
av.kachan@mail.ru*

Среда обитания микроорганизмов содержит разнообразие источников углерода и энергии, что обуславливает необходимость их избирательной утилизации. Вещества, подвергающиеся катаболизму с меньшими энергетическими затратами, будут потребляться клетками в первую очередь, вместе с тем приводя к подавлению экспрессии генов транспорта и утилизации других питательных субстратов. Это явление, называемое катаболитной репрессией, является распространённым способом регуляции активности генов у бактерий и может использовать различные молекулярные механизмы [1]. Бактерии *Bacillus subtilis* обеспечивают катаболитный контроль экспрессии генов с помощью глобального транскрипционного регулятора CsrA. Данный белок семейства LacI/GalR активируется при повышении в клетке концентрации фруктозо-1,6-бисфосфата, одного из первичных интермедиатов гликолитического расщепления глюкозы [2]. Связываясь со специфическими участками в более чем 60 регулируемых оперонах, CsrA активирует либо подавляет их транскрипцию. Под катаболитным контролем в клетках *B. subtilis* находятся гены многочисленных внутриклеточных метаболических путей, дыхания, споруляции [3].

В клетках *B. subtilis* 168 ген *amyE*, кодирующий α -амилазу, является мишенью репрессирующего действия белка CsrA [4]. Ген *amyM3*, кодирующий чужеродную α -амилазу *AmyM3 B. flexus* 406, в клетках *B. subtilis* 168, культивируемых в среде с добавлением глюкозы, также подвергается репрессии. Амилолитическая активность бактерий через 3 ч после внесения в культуру глюкозы составляла 10,65% от активности фермента в культуре без глюкозы. Подавление синтеза фермента обусловлено фактором CsrA, так как после инактивации кодирующего регулятор гена бактерии способны синтезировать гетерологичную α -амилазу даже после добавления в среду культивирования глюкозы (рисунок 1).

Тем не менее, дефицит кислорода в среде культивирования, обусловленный недостаточной интенсивностью аэрации, приводит к мощной катаболитной репрессии синтеза α -амилазы *AmyM3* в клетках *B. subtilis*, выращиваемых в присутствии глюкозы. Данный эффект не связан с действием белка CsrA, так как наблюдается даже в культуре бактерий с инактивированным геном *csrA* (рисунок 1).

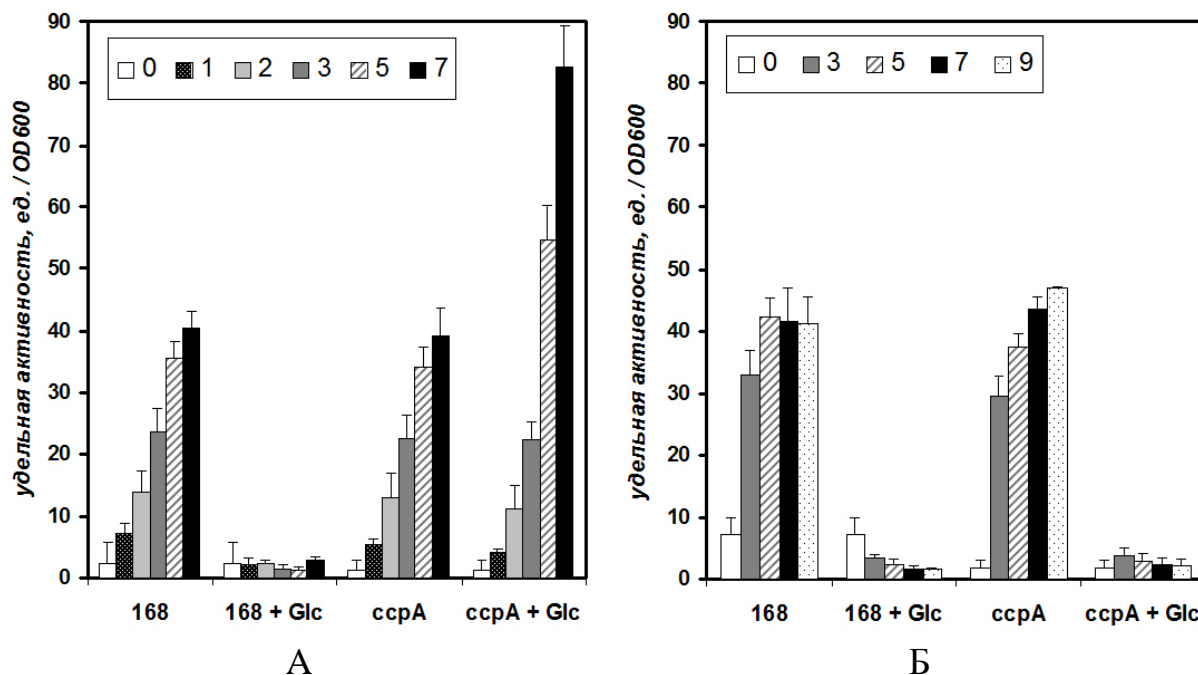


Рисунок 1 – Удельная амилолитическая активность (среднее значение $\pm \sigma$) бактерий *B. subtilis* дикого типа (168) или с инактивированным геном *cspA* после культивирования в среде без добавок либо после внесения 1% глюкозы (Glc) при интенсивной (А) либо пониженной аэрации (Б). Уровни активности измерены через 0, 1, 2, 3, 5, 7 либо 9 ч после внесения в культуру глюкозы.

Имеются данные, что синтез внеклеточных протеаз, в первую очередь субтилизина ArgE, также существенно подавляется, когда клетки *B. subtilis* выращивают в анаэробных условиях в присутствии глюкозы [5]. Молекулярный механизм такого подавления синтеза протеазы изучен недостаточно хорошо, тем не менее, известно, что в контроле транскрипции гена *aprE* участвуют такие транскрипционные факторы, как SpoOA, DegU, ScoC, AbrB, CodY и другие [6]. Ввиду того, что активность генов внеклеточных протеаз *aprE* и *nprE* подавляется в экспоненциальной фазе за счёт совместного влияния упомянутых регуляторов ScoC, AbrB и CodY [7], а также того, что в изучаемых нами условиях в клетках *B. subtilis* наблюдается подавление синтеза не только α -амилазы, но и внеклеточных протеаз, было решено получить штамм *B. subtilis* 168, содержащий инактивированные гены *scoC*, *codY* и *abrB*, и оценить влияние данных мутаций на катаболитную репрессию гена *amyM3* в условиях дефицита кислорода.

Оценка глюкозной репрессии гена *amyM3* в полученных мутантных штаммах *B. subtilis* 168 *cspA*⁻ *scoC*⁻, *cspA*⁻ *scoC*⁻ *abrB*⁻ и *cspA*⁻ *scoC*⁻ *abrB*⁻ *codY*⁻ показала, что инактивация гена, кодирующего регулятор *abrB* приводит к частичному снятию глюкозной репрессии синтеза α -амилазы AmyM3. В штаммах *B. subtilis*, содержащих интактный ген *abrB*, независимо от наличия либо отсутствия в клетках катаболитного регулятора CspA, внесение в питательную среду глюкозы приводило к практически полному подавлению

синтеза фермента. Бактерии с инактивированными генами *scpA* и *abrB* при культивировании в аналогичных условиях продолжали выделять небольшие количества α -амилазы даже после внесения в среду глюкозы. Уровень удельной активности внеклеточного фермента достигал 10,35 ед. через 3 ч после внесения глюкозы, что превышало активность штамма, содержащего интактный ген *abrB*, в 4,2 раза (рисунок 2). Амилолитическая активность штаммов, имеющих мутации *scpA*⁻ и *abrB*⁻, через 3 ч после внесения в культуру глюкозы составляла 35% от активности фермента в культуре без глюкозы.

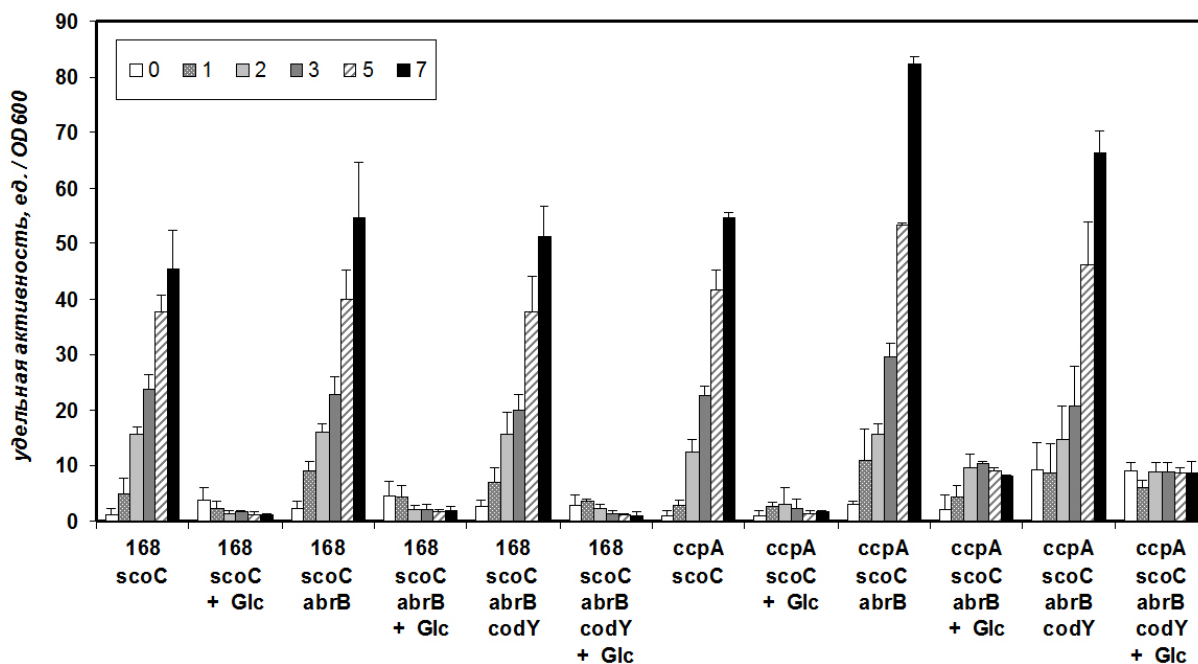


Рисунок 2 – Удельная амилолитическая активность (среднее значение $\pm \sigma$) бактерий *B. subtilis* дикого типа (168) или с инактивированными генами *scpA*, *scoC*, *abrB* и *codY* после культивирования в среде без добавок либо после внесения 1% глюкозы (Glc) при пониженной аэрации. Измерения проводили через 0, 1, 2, 3, 5 и 7 ч после внесения в культуру глюкозы.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют об участии регулятора *abrB* в катаболитной репрессии гетерологичного гена α -амилазы *amyM3* в клетках *B. subtilis*. Инактивация гена приводит к значимой, но далеко не полной дерепрессии гена. Исходя из этого наблюдения можно предположить, что белок *AbrB* оказывает не прямое, а опосредованное влияние на глюкозную репрессию гена α -амилазы. Регулон данного транскрипционного фактора представлен более чем 35 оперонами, причём он может выступать как в роли репрессора, так и в роли активатора. Методом геномного футпринтинга было обнаружено более 700 сайтов связывания на хромосоме *B. subtilis* [8]. Высока вероятность того, что выявленный эффект достигается за счёт продуктов генов, входящих в состав регулона *AbrB*.

Литература

1. Deutscher J. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria // *Curr. Opin. Microbiol.* 2008. V. 11. P. 87–93.
2. Fujita Y. Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2009. V. 73. P. 245–259.
3. Blencke H.-M., Homuth G., Ludwig H., Mäder U., Hecker M., Stülke J. Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways // *Metabol. Eng.* 2003. V. 5. P. 133–149.
4. Henkin T.M., Grundy F.J., Nicholson W.L., Chambliss G.H. Catabolite repression of α -amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a *trans*-acting gene product homologous to the *Escherichia coli lacI* and *galR* repressors // *Mol. Microbiol.* 1991. V. 5. P. 575–584.
5. Espinosa-de-los-Monteros J., Martinez A., Valle F. Metabolic profiles and *aprE* expression in anaerobic cultures of *Bacillus subtilis* using nitrate as terminal electron acceptor // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001. V. 57. P. 379–384.
6. Abe S., Yasumura A., Tanaka T. Regulation of *Bacillus subtilis aprE* expression by *glnA* through inhibition of *scoC* and σ^D -dependent *degR* expression // *J. Bacteriol.* 2009. V. 191. P. 3050–3058.
7. Barbieri G., Albertini A.M., Ferrari E., Sonenshein A.L., Belitsky B.R. Interplay of CodY and ScoC in the regulation of major extracellular protease genes of *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* 2016. V. 198. P. 907–920.
8. Chumsakul O., Nakamura K., Kurata T., Sakamoto T., Hobman J., Ogasawara N., Oshima T., Ishikawa S. High-resolution mapping of in vivo genomic transcription factor binding sites using in situ DNase I footprinting and ChIP-seq // *DNA Res.* 2013. V. 20. P. 325–338.