

УДК 577.218+577.29

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНА МЕТАЛЛОЭНДОПЕПТИДАЗЫ *BACILLUS INTERMEDIUS*

А.Р. Сабирова, М.Р. Шарипова

Аннотация

Секвенирован фрагмент геномной ДНК *Bacillus intermedius* размером в 5896 п.о., содержащий 6 открытых рамок считывания, одна из которых соответствует гену металлопротеиназы (*mprVi*). Ген *mprVi* клонирован на плазмиде pSA1, и его нуклеотидная последовательность установлена (AN EU 678894.2). Открытая рамка считывания содержит 810 п.н. Регуляторная и структурная области гена *mprVi* имеют 98%-ную гомологию с геном секретируемой протеиназы *Bacillus pumilus*. В структурной области гена *mprVi* идентифицирован специфический продленный мотив активного сайта, сформированный 12 аминокислотами, и Met-поворот, которые характерны для представителей клана метцинкинов. Экспрессия гена происходит на 30-й час в стационарной фазе роста бацилл. Результаты анализа показали, что соответствующий выделенному гену белок MprVi является первым идентифицированным представителем металлоэндопептидаз клана метцинкинов у бацилл.

Ключевые слова: металлопротеиназа, *Bacillus intermedius*, секвенирование, метцинкины, экспрессия гена.

Введение

Бактерии рода *Bacillus* в постэкспоненциальную фазу роста продуцируют в среду различные внеклеточные протеиназы. В базе данных международного ГенБанка (www.ncbi.nlm.nih.gov) содержится информация о генах протеиназ различных организмов, в том числе *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*. Эта информация позволяет провести сравнительный анализ генов соответствующих белков.

Бациллы выделяют в культуральную жидкость комплекс протеиназ, соотношение компонентов которого определяется условиями обитания и развития продуцентов [1]. Направленное образование определенных групп протеиназ обеспечивает координацию метаболической активности и позволяет бактериям целесообразно использовать питательные вещества. Секретируемые протеазы бацилл могут быть разделены на две группы: сериновые и металлопротеиназы. Они отличаются рядом свойств. Ингибиторами сериновых протеиназ являются PMSF и DFP, металлопротеиназ – ЭДТА и о-фенантролин. Бациллярные протеиназы активны в области рН около 8. Белки разных групп отличаются по стабильности, специфичности и кинетическим характеристикам, что обеспечивает более глубокий гидролиз комплекса субстратов. Соотношение различных групп в комплексе секретируемых протеиназ является видовой характеристикой и обуславливается средой обитания микроорганизмов.

В пуле внеклеточных протеиназ *Bacillus intermedius* доминирующим ферментом является субтилизиноподобная сериновая протеиназа [2]. На ее долю приходится около 90% от внеклеточной протеолитической активности по расщеплению казеина. Доля сериновой глутамилэндопептидазы достигает 10% от общего пула секретируемых протеиназ *B. intermedius*. Гены обоих ферментов клонированы и секвенированы (AY754946.1, Y15136.1), соответствующие им белки выделены и детально изучены [3–5]. Вместе с тем в библиотеке хромосомной ДНК *B. intermedius* идентифицирован клон, обладающий внеклеточной протеолитической активностью. В отличие от двух первых белков активность этого фермента подавляется ингибиторами для металлопротеиназ – ЭДТА и офенантролином [6].

Целью исследования являлось секвенирование фрагмента ДНК *B. intermedius*, содержащего ген металлопротеиназы, геноинформационный анализ изолированной нуклеотидной последовательности и субклонирование соответствующего гена.

1. Материалы и методы

1.1. Штаммы бактерий, векторы и среды. Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе, приведены в табл. 1. Клетки *B. intermedius* и *B. subtilis* выращивали на среде Лурия – Бертона при 37 °С. Для трансформации и получения компетентных клеток использовали среды, описанные ранее [7]. Для отбора клонов, способных секретировать протеиназу, использовали селективную среду, содержащую 30% обезжиренного молока и 2% агара. Антибиотик эритромицин добавляли в среду культивирования в конечной концентрации 10 мкг/мл. Прирост биомассы измеряли нефелометрически на фотоэлектрокалориметре КФК-2 при 590 нм в кювете толщиной 1 см.

Табл. 1

Бактериальные штаммы и плазмиды

| Штамм или плаزمида | Характеристика | Источник информации |
|-----------------------------|--|---|
| <i>B. intermedius</i> 3-19 | Штамм дикого типа, Str ^R | Коллекция КГУ |
| <i>B. subtilis</i> BG 20-36 | Протеазодефицитный штамм | Е. Феррари (E. Ferrari), Genencor Int. Inc. USA |
| Pcb22 | Экспрессионный вектор, EU19035, Ap ^R , Em ^R | А.В. Сорокин |
| Pcm4 | С фрагментом ДНК <i>B. intermedius</i> 3-19 в 6 т.п.н. на плазмиде pCB22 | С.В. Костров, ИМГ РАН |
| Psa1 | С геном <i>mprBi</i> в 1.1 кб с плазмиды pCM4 | А.Р. Сабирова, в настоящей работе |

1.2. ДНК секвенирование. Фрагмент геномной ДНК размером в 5896 п.о. на плазмиде pCM4 амплифицировали с помощью синтетических олигонуклеотидов (pCB rev – АТАГСТТТАТАГAGTAGGTC, pCB dir – ССАСТАТСГАСТАСGCG). Условия проведения ПЦР-реакции: 1 цикл (94 °С – 1 мин); 30 циклов (94 °С – 30 с; 43 °С – 30 с; 72 °С – 6 мин); 1 цикл (72 °С – 10 мин). Результаты ПЦР-реакции оценивали электрофоретически в 1%-ном агарозном геле. Определение нуклеотидной последовательности фрагмента клонированной ДНК *B. intermedius*

проводили методом терминации цепи, используя в качестве матрицы амплификат вставки с плазмиды pCM4 (<http://www.genome-centre.narod.ru/>).

Анализ секвенированного фрагмента проводили при помощи NCBI BLAST сервера и он-лайн программы поиска открытых рамок считывания (ORF Finder) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) [8]. Промоторную область гена анализировали с помощью программы BPR0M (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>). Сигнальный пептид в конвертированных аминокислотных последовательностях идентифицировали, используя сервер SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>).

1.3. Картирование ДНК и субклонирование гена. ПЦР-продукт фрагмента геномной ДНК *B. intermedius* анализировали на содержание сайтов рестрикции. Фрагмент ДНК размером 6 кб обрабатывали ферментами рестрикции в разных комбинациях: *Bgl*II, *Dra*I, *Hind*II, *Nde*I, *Pvu*II, *Sac*I, *Sal*I, *Xba*I. Последовательность гена *mprBi* амплифицировали, используя олигонуклеотиды:

- *mprBiDir* (ТААССТGGATCCААТСAAAGGAGGGАТАGG), соответствующий началу регуляторной области гена протеазы с сайтом для распознавания рестриктазой *Bam*HI (подчеркнуто),

- *mprBiRev* (САТАААGGATCCСАAGCACАТАGGTGTТТG), соответствующий концу кодирующей области гена протеазы с сайтом для распознавания рестриктазой *Bam*HI (подчеркнуто).

Обработанный рестриктазой продукт амплификации очищали, используя набор GeneJET PCR Purification Kit (Fermentas), и клонировали в плазмиду pCB22, предварительно обработанную *Bgl*II рестриктазой. Корректное встраивание гена *mprBi* подтверждали амплификацией этого гена при помощи фланкирующих праймеров *mprBiDir* – *mprBiRev*. Достоверность фрагмента ДНК после субклонирования определяли повторным секвенированием. Полученная рекомбинантная плазида получила название pSA1. Для изучения экспрессии гена металлопротеиназы плазмидой pSA1 трансформировали протеазодефицитный штамм *B. subtilis* BG 20-36.

1.4. Определение протеолитической активности и ингибиторный анализ. Протеолитическую активность определяли в культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis* BG 20-36 (pSA1) по расщеплению азоказеина [9]. Измерение поглощения проводили на спектрофотометре (Bio-Rad, США) при длине волны 450 нм. За единицу активности принимали количество фермента, гидролизующего в условиях эксперимента 1 мкг субстрата за 1 мин.

Для выяснения действия ингибиторов на активность металлопротеиназы пробу выдерживали в присутствии реагента в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего определяли остаточную активность по гидролизу азоказеина. Ингибиторы добавляли к супернатанту в конечной концентрации 5 мМ. Остаточную активность выражали в процентах. За 100% принимали активность фермента в отсутствие ингибиторов в реакционной смеси. В работе использовали специфический ингибитор сериновых протеиназ PMSF, ингибиторы металлопротеиназ ЭДТА и 1,10-фенантролин, а также белковый ингибитор трипсина.

1.5. Статистическая обработка данных. Для описания признаков фермента использовали построения 95%-ных доверительных интервалов для средних.

2. Результаты и их обсуждение

В культуральной жидкости рекомбинантного штамма, несущего плазмиду с фрагментом ДНК *B. intermedius* размером 6 кб, обнаружена протеолитическая активность по гидролизу азоказеина. Уровень активности фермента понижался на 70–80% в присутствии ингибиторов металлопротеиназ (ЭДТА и о-фенантролин) в конечной концентрации 5 мМ. Напротив, 30-минутная инкубация со специфическими ингибиторами сериновых протеиназ (PMSF и ингибитор трипсина) практически не влияла на активность фермента в культуральной жидкости изолированного клона (табл. 2). Отсутствие протеолитической активности на синтетических олигопептидных субстратах Z-Glu-Na (для глутамилэндопептидазы) и Z-Ala-Ala-Leu-pNA (для субтилизина), а также данные по влиянию специфических ингибиторов на протеолитическую активность штамма *B. subtilis* рСМ4 позволили заключить, что фрагмент хромосомной ДНК *B. intermedius* содержит ген, кодирующий металлопротеиназу. Плазмида, содержащая фрагмент размером 6 кб хромосомной ДНК с геном металлопротеиназы получила название рСМ4.

Табл. 2

Активность внеклеточного фермента в присутствии специфических ингибиторов*

| Ингибиторы, 5 мМ | Остаточная активность, % |
|--------------------|--------------------------|
| PMSF | 87 ± 3 |
| ЭДТА | 20 ± 3 |
| о-фенантролин | 17 ± 3 |
| Ингибитор трипсина | 92 ± 3 |

*За 100% принимали протеолитическую активность в отсутствие ингибитора.

Провели определение нуклеотидной последовательности изолированного фрагмента геномной ДНК размером в 5896 п.н. Поиск открытых рамок считывания (ОРС) секвенированного фрагмента ДНК показал наличие 6 ОРС (рис. 1).

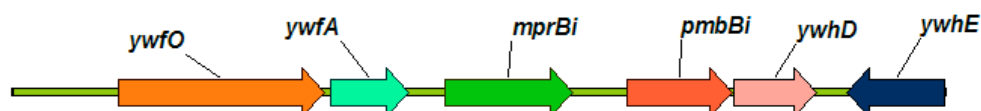


Рис. 1. Схематическое расположение открытых рамок считывания, идентифицированных в 6 кб фрагменте секвенированной геномной ДНК *B. intermedius*

Первая ОРС на клонированном фрагменте ДНК (433 а.к.о.) кодирует полипептид YwfO, который относится к суперсемейству фосфогидролаз. Соответствующий гену белок является металлизависимой фосфогидролазой и содержит два сайта связывания с ионами Mg^{+} , Zn-связывающий сайт и консервативный мотив HD в активном центре. Вторая ОРС (165 а.к.о.) соответствует гену *ywfA* и вместе с пятой рамкой считывания (172 а.к.о.) гена *ywhD* кодирует гипотетические белки, которые не имеют гомологии к известным генам. Во фрагменте геномной ДНК также идентифицирована ОРС *pmbBi* гена, кодирующая мембраносвязанную

металлопротеиназу из 220 а.к.о. Аминокислотная последовательность этого гена имеет 96%-ную гомологию с аминокислотной последовательностью гена *uwhC* *B. pumilus* SAFR-032, кодирующего мембраносвязанную металлопротеиназу семейства M50. Белки этого семейства локализованы в мембране и предназначены для осуществления транспорта через мембрану посредством сопряженной экспрессии продуктов генов, локализованных в других клеточных компартментах. Эти белки являются гомологами S2P семейства белков [10]. Это эукариотические белки, принимающие участие в регуляции метаболизма жиров и стеролов, так же как и в регуляции ответа на солевой стресс в эндоплазматическом ретикулуле. Прокариотические гомологи S2P белков, по-видимому, выполняют ключевую роль в регуляции стрессовых ответов, клеточном делении и дифференцировке [11]. Поиск сигнального пептида в аминокислотной последовательности *pmbBi* гена показал отсутствие потенциального сайта отщепления сигнального пептида. По-видимому, данный белок является интегральным мембранным белком и не секретируется в культуральную жидкость или на внешнюю поверхность мембраны. Следующая рамка считывания гена *uwhE* кодирует пенициллинсвязывающий белок, который состоит из трансгликозилазного и транспептидазного доменов на N- и C-концах соответственно. Это бифункциональный белок, трансгликозилазный домен которого катализирует полимеризацию муреин-гликановых цепей. Присутствие серина в активном центре является типичным для представителей данного семейства.

Третья по расположению ОРС (рис. 1) соответствовала гену металлопротеиназы *mprBi* и имела 99% гомологии с аминокислотной последовательностью гена протеиназы *B. pumilus* SAFR-032. Этот белок, как и его аналоги, не был изолирован и охарактеризован у бацилл ранее. Установлено, что он имеет высокую степень гомологии к конвертированным аминокислотным последовательностям секретируемых металлопротеиназ клана M12. Поиск сигнального пептида в программе SignalP показал наличие потенциального сайта (ASA) отщепления сигнального пептида. Наличие сигнального пептида в структуре генного продукта свидетельствует о внеклеточной локализации зрелого белка *B. intermedius*, секретируемого бактериями в среду культивирования к месту его функционирования. Сравнительный анализ ОРС гена *mprBi* с ОРС гена *pmbBi* показал отсутствие какой-либо гомологии структурной части генов. В результате анализа конвертированных аминокислотных последовательностей генов *mprBi* и *pmbBi* было выявлено наличие разных структурных доменов, характеризующих эти протеиназы как белки, представляющие различные суперсемейства (рис. 2). Более того, активные центры MprBi (рис. 2, а) и PmbBi (рис. 2, б) располагаются на C- и N-концах соответственно. Различия в структурной организации генов, принадлежность к различным суперсемействам металлопротеиназ свидетельствуют о том, что продукты этих генов представляют собой ферменты различной локализации и, по-видимому, выполняют различные физиологические функции в клетках бацилл.

Нуклеотидная последовательность фрагмента геномной ДНК *Bacillus intermedius* размером 6 кб, установленная в результате проведенного исследования, депонирована нами в международную базу данных GenBank под номером EU678894.

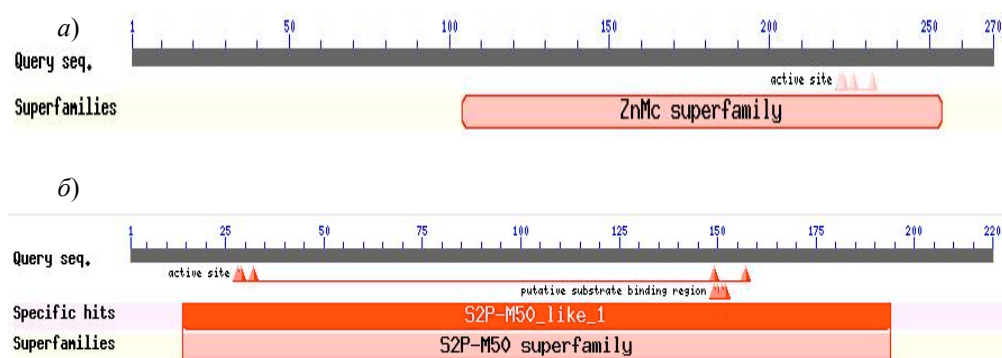


Рис. 2. Структурные домены, идентифицированные в программе BLAST NCBI в открытых рамках считывания генов секретируемой металлопротеиназы *mprBi* (а) и мембраносвязанной металлопротеиназы *pmbBi* (б) *Bacillus intermedius*

Ген металлопротеиназы, в том числе его регуляторную область, амплифицировали и субклонировали в вектор экспрессии pCB22, в результате чего получили рекомбинантную плазмиду pSA1. Нуклеотидная последовательность гена металлопротеиназы *mprBi* и соответствующая ей аминокислотная последовательность представлены на рис. 3.

Поиск гомологии гена *mprBi* к генам известных протеиназ в базе данных NCBI показал 99%-ную гомологию с геном, кодирующим гипотетический белок WPUM 3392 *Bacillus pumilus* SAFR-032 (YP_001488604.1). Обнаружена также 98%-ная гомология с геном репролизина семейства цинкзависимых металлопротеиназ *Bacillus pumilus* ATCC 7061 (ZP_03055196.1) и 69%-ная гомология с геном гипотетического белка BL03917 *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 (YP_081058.1). Выравнивание последовательностей этих генов показало, что цинксвязывающие сайты в активном центре данных протеиназ идентичны. Отметим, что нами не обнаружено гомологии секвенированной металлопротеиназы MprBi к наиболее распространенному бактериальному ферменту – термолизину *B. thermoproteolyticus* (X76986.1). Анализ структуры активного центра, размер открытой рамки считывания у различных представителей металлопротеиназ показали низкую степень схожести металлопротеиназ *B. intermedius* с термолизинподобной протеиназой *B. thermoproteolyticus* (табл. 3).

Секвенирование гена металлопротеиназы *B. intermedius* показало, что ОРС гена состоит из 810 п.о., что соответствует 270 а.к.о. (рис. 3). Предположительный сайт Шайна – Дальгарно (SD) располагается в 7 нуклеотидах слева от предполагаемой точки инициации трансляции (ATG). Регуляторные области, –10 (GAATATA) и –35 (TAGAAG) боксы, расположены на расстоянии 61 и 31 п.н. от стартового кодона соответственно. При помощи программы SignalP в структуре ОРС идентифицирован потенциальный сайт отщепления (ASA) сигнального пептида размером в 29 а.к.о.

В структурной области гена *mprBi* идентифицирован консервативный мотив активного центра из 5 аминокислот HEXXH, включающий два гистидина в качестве цинковых лигандов, присутствие которого указывает на принадлежность продукта секвенированного нами гена к цинкзависимым металлоэндопептидазам

```

301 TTTTGTGTTTTGTAAGACCCAGACSSAAAAGCGSTATTTTCCGATGAAATG
351 TGTGCTGAAATATCCGAAAAATTAGTGAATATGACGTATTTGCACTTTTT
                                     -35
401 TTTTGTGTATCCAATTCSCCTGTTTTTGAAGTGAATAGAAAGGAAAAATGGTGA
                                     -10      +1      RBS      M
451 ATTTTCAGTGAATATAAACCTTGTAAGAAATCAAAGGAGGGATAGGAATG
   K K R S V F L S F L L V G S L L P
502 AAAAAGCGTTCAGTCTTTTGTTCATTTTATTGGTAGGTAGTTTGTACCG
   G V S S A S A P V A S A G H G H D
553 GGAGTAAGTTCAGCTTCAGCACCGTTCGCGAGTGCCTGGTCATGGGCATGAT
   H G H A P F E T H I S E G L P K A
604 CATGGTCATGCGCCGTTTCGAAACACATATTAGTGAGGGGTTCGCAAAGGCA
   N D F K D L T K A P P I E R D V K
655 AACGATTTTAAAGATTTGACGAAAGCACCTCCAATGAACGAGATGTGAAA
   T K V L D E S G K Q V G S R T F K
706 ACAAAGGTATTAGATGAGTCTGGTAAGCAAGTAGGCTCTAGAACCTTTAAG
   A N T G D S I S T K A S T G S Q K
757 GCGAATACAGGAGATTCTATTTCAACAAAGGCAAGCACAGGCAGTCAAAAA
   V T V Y A V A D A Q Y R A K Y S D
808 GTAACGGTTTATGCTGTAGCAGATGCGCAGTATCGTGCGAAATATAGTGAC
   W Q T R I V S I I E Q A D V T F N
859 TGGCAGACCGGATTGTTCAGCATCATTTGAGCAAGCGGACGTGACCTTTAAC
   R D H D V D F V V Q A V G S W T S
910 CGTGATCATGATGTGGACTTTGTCTGACAAGCCGTAGGATCTTGGACGCTCT
   S G S N A E Q I L S N L S R S F D
961 TCAGGATCAAATGCAGAGCAAATTTTATCTAACCTTTTCGCGCAGCTTTGAT
   G R G Y D F V T G F T A N P N F D
1012 GGCAGAGGATACGATTTTGTCACTGGATTTACAGCAAATCCAAACTTTGAT
   A G G I A Y V Y N S A P S G S A F
1063 GCGGGCGGAATCGCTTATGTATACAATAGTGCACCGAGCGGAAGTGCATTC
   A V N L D Q G T A N T A K A A T H
1114 GCCGTAAACCTTGATCAAGGAACAGCGAACACCGCAAAAAGCGGCTACGCAT
   E Y G H N F G L P H D P Q G S G G I
1165 GAATACGGTCAATACTTTGGCTTACCGCATGACCCTCAAGGCAGCGGCATT
   V C L M N Y D Y S Y T V D F F D A
1216 GTCTGCTTAATGAACTATGATATTCTCTACACAGTCGATTTCTTTGATGCG
   A H K N Q V N R N K A W Y R *
1267 GCTCATAAAAATCAAGTGAACCGTAACAAAGCGTGGTACAGATAAAAATAAG
1318 AGACAAAAGGACAAACACSTATGTGCTTGTCTTTTATGCTTACAGGTC
1369 GCTGATGCGTTTTCTCTACGGCATAGTGTCTTTTTCATTTCTTCAAT

```

Рис. 3. Нуклеотидная последовательность гена *mprVi*. Предположительные области -10, -35 и RBS обозначены серым цветом. Уникальный мотив активного центра HE_xH_xH_xG_xH/D и метиониновый изгиб подчеркнуты и выделены жирным. Звездочкой отмечен стоп-кодон. Предположительные терминаторы транскрипции подчеркнуты. Стрелкой указан предполагаемый сайт отщепления сигнального пептида

клана M12. Структура активного центра белка из 5 аминокислот является метал-лосвязывающим сайтом. В зависимости от расположения третьего цинкового лиганда металлоэндопептидазы подразделяют на глутинкины (HEXXH+E), аспинкины (HEXXH+D) и метцинкины (HEXXHXXGXXH/D, Met-поворот CLMNY) [12]. Последние характеризуются более протяженной консервативной структурой активного центра и следующей за ней консервативной структурой Met-поворота (название дано по присутствию в этом фрагменте остатка метионина).

Табл. 3

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов металлопротеиназ

| № | Представители металлопротеиназ | Гомология активного центра, % | Гомология регуляторной области гена, % | Гомология структурной области гена, % | Размер ОРС, п.н. |
|---|---|-------------------------------|--|---------------------------------------|------------------|
| 1 | <i>mprBi</i> – внеклеточная металлопротеиназа <i>B. intermedius</i> | 100 | 100 | 100 | 810 |
| 2 | Zn-зависимая металлопротеиназа <i>B. pumilus</i> ATCC 7061 | 100 | 98 | 98 | 827 |
| 3 | Астацин <i>A. astacus</i> (crayfish) | 42 | – | 42 | 756 |
| 4 | <i>npr</i> -термолизин <i>B. thermoproteolyticus</i> | 25 | 0 | 45 | 1647 |

В последовательности аминокислот, конвертируемой из последовательности нуклеотидов (рис. 3) секвенированного нами гена *mprBi*, идентифицировали последовательности, гомологичные продленному мотиву активного центра и структуре метионинового поворота.

Таким образом, результаты анализа структуры гена *mprBi* позволяют отнести металлопептидазу к классу метцинкинов. Эти белки, как правило, являются секретируемыми ферментами, которые обнаружены как у животных, так и у микроорганизмов [13]. Тем не менее, до настоящего времени не описан ни один фермент семейства метцинкинов у бацилл. Итак, изолированный в работе клон продуцирует металлоэндопептидазу MrpBi, которая является первым представителем семейства метцинкиновых белков у бацилл.

Изучали экспрессию гена *mprBi*, клонированного на плазмиде pSA1, в рекомбинантном штамме *B. subtilis* по сравнению с соответствующим геном рекомбинантного штамма *B. subtilis*, несущего плазмиду pCM4. Уровень протеолитической активности в культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis* (pSA1) с субклонированным геном металлопротеиназы и *B. subtilis* (pCM4) с геномной вставкой размером в 5896 п.о. существенно не отличался. В обоих случаях уровни протеолитической активности в присутствии и в отсутствие ингибитора сериновых протеиназ PMSF были одинаковыми. Полученные результаты позволили заключить, что при субклонировании гена в плазмиду pSA1 сохранились все необходимые структурные и регуляторные элементы, необходимые для экспрессии гена.

Исследование динамики роста и накопления протеолитической активности (рис. 4) металлопротеазы рекомбинантного штамма *B. subtilis* (pSA1) показало, что активность фермента обнаруживается в культуральной жидкости на 20-й час роста, ее уровень достигает максимума на 30–34-й час роста, что соответствует стационарной фазе роста культуры.

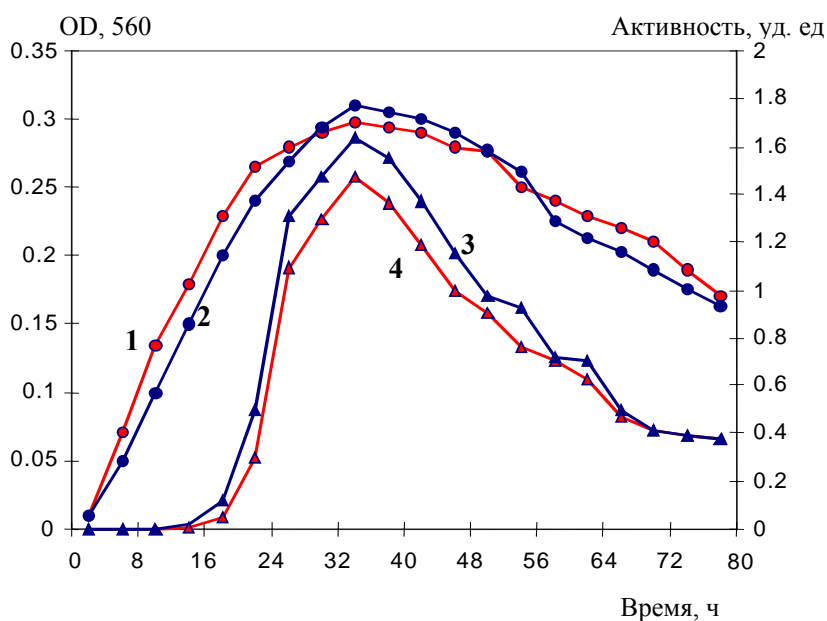


Рис. 4. Динамика роста и накопления протеолитической активности. 1 – рост рекомбинантного штамма *B. subtilis* BG 2036 (pCM4); 2 – рост рекомбинантного штамма *B. subtilis* BG 2036 (pSA1); 3 – протеолитическая активность штамма *B. subtilis* BG 2036 (pSA1); 4 – протеолитическая активность штамма *B. subtilis* BG 2036 (pCM4)

Таким образом, фрагмент геномной ДНК *B. intermedius* был секвенирован, выявлено 6 открытых рамок считывания, кодирующих различные полипептиды. Анализ регуляторной области гена металлопротеиназы позволил выявить сайт Шайна-Дальгарно, –10 и –35 области, необходимые для инициации трансляции и транскрипции соответственно. Анализ структурной области гена после конвертирования в аминокислотную последовательность показал наличие сигнального пептида на 5'-конце, что характеризует данный фермент как секретрируемый. Идентификация в структурной области гена *mprBi* продленного мотива активного центра HExxHxxGxxH/D и метионинового изгиба позволила отнести фермент к семейству метцинкинов. Фрагмент ДНК с геном *mprBi* был субклонирован под собственным промотором с получением плазмиды pSA1, при этом уровень экспрессии гена не снижался по сравнению с экспрессией в рекомбинантном штамме *B. subtilis* BG 2036 (pCM4). Экспрессия гена происходит в стационарной фазе роста культуры. Пока не ясно, какой вклад вносит выявленный нами метцинкин в белковый круговорот у бацилл. В связи с чем представляет приоритетный научный интерес изучение регуляции экспрессии этого гена, что позволит приблизиться к пониманию его физиологической роли в жизнедеятельности этих бактерий.

Авторы выражают глубокую признательность и благодарность профессору С.В. Кострову (ИМГ РАН, Москва) за предоставленную для работы плазмиду pCM4, старшему научному сотруднику И.В. Демидюку (ИМГ РАН, Москва) за помощь в подготовке образцов для секвенирования ДНК.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 09-04-99044 р-офи), федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» 2009–2013 гг. № ПЗ44, гранта АН РТ № 14-24/2010 (Г) и аналитической ведомственной целевой федеральной программы РНП 2.11.1005.

Summary

A.R. Sabirova, M.R. Sharipova. Structure Organisation of Metalloendopeptidase Gene of *Bacillus intermedius*.

The 6 kb genome DNA fragment of *Bacillus intermedius* has been cloned. It contains 6 open reading frames, one of which corresponds to metalloprotease gene (*mprBi*). The *mprBi* gene has been cloned on pSA1 plasmid and its nucleotide sequence has been determined (EU 678894.2). The open reading frame consists of 810 bp. Regulatory and structure regions of *mprBi* gene have 98% homology with secreted protease gene of *Bacillus pumilus*. The specific prolonged motif of active site and Met-turn were identified in the structure of *mprBi* gene. The motif of active site consists of 12 aminoacid residues common for metzincin clan representatives. The expression of metalloprotease gene was shown to appear at 30th hour of bacilla growth. The data received strongly suggests that MprBi protein corresponding to isolated gene is the first identified member of metalloendopeptidases of metzincin clan within bacilli.

Key words: metalloproteinase, *Bacillus intermedius*, DNA sequence, metzincin, gene expression.

Сокращения

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
PMSF – phenylmethanesulfonyl fluoride
DFP – diisopropylfluorophosphate

Литература

1. Каюмов А.Р., Шарипова М.Р. Механизмы регуляции синтеза бактериальных субтилаз // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2005. – Т. 147, кн. 2. – С. 89–99.
2. Шарипова М.Р. Поздние стадии секреции белков у бацилл: Обзор // Биохимия. – 2002. – Т. 67, Вып. 11. – С. 1461–1473.
3. Михайлова Е.О., Марданова А.М., Бабалан Н.П., Руденская Г.Н., Шарипова М.Р. Выделение и характеристика субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis* AJ73 на разных фазах роста бацилл // Биохимия. – 2007. – Т. 72, Вып. 2. – С. 228–235.
4. Шамсутдинов Т.Р., Балабан Н.П., Марданова А.М., Данилова Ю.В., Руденская Г.Н., Шарипова М.Р. Выделение и характеристика глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis* на разных фазах роста // Биоорган. химия. – 2008. – Т. 34, № 3. – С. 1–5.
5. Соколова Е.А., Шамсутдинов Т.Р., Балабан Н.П. Оптимизация выделения внеклеточных протеиназ *Bacillus intermedius* 3-19, секретируемых бактериями в поздней стационарной фазе роста // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2007. – Т. 149, кн. 2. – С. 114–125.

6. Балабан Н.П. Металлопротеиназы бацилл. Классификация, структурные особенности и термостабильность белков // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2007. – Т. 149, кн. 2. – С. 6–24.
7. Anagnostopoulos C., Spizizen J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. – 1961. – V. 81, No 5. – P. 741–746.
8. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Res. – 1997. – V. 25, No 17. – P. 3389–3402.
9. Demidyuk I.V., Kalashnikov A.E., Gromova T.Y., Gasanov E.V., Safina D.R., Zabolotskaya M.V., Rudenskaya G.N., Kostrov S.V. Cloning, sequencing, expression, and characterization of protealysin, a novel neutral proteinase from *Serratia proteamaculans* representing a new group of thermolysin-like proteases with short N-terminal region of precursor // Protein Expr. Purif. – 2006. – V. 47, No 2. – P. 551–561.
10. Feng L., Yan H., Wu Z., Yan N., Wang Z., Jeffrey P.D., Shi Y. Structure of a site-2 protease family intramembrane metalloprotease // Science. – 2007. – V. 318, No 5856. – P. 1608–1612.
11. Makinoshima H., Glickman M.S. Site-2 proteases in prokaryotes: regulated intramembrane proteolysis expands to microbial pathogenesis // Microbes Infect. – 2006. – V. 8, No 7. – P. 1882–1888.
12. Jiang W., Bond J.S. Families of metalloendopeptidases and their relationships // FEBS Lett. – 1992. – V. 312, No 2–3. – P. 110–114.
13. Sterchi E.E., Stocker W., Bond J.S. Меприны, мембранно-связанные и секретируемые астацин металлопротеиназы // Mol. Aspects Med. – 2008. – V. 29, No 5. – P. 309–328.

Поступила в редакцию
08.04.10

Сабирова Альбина Рушановна – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: albina-12@mail.ru

Шарипова Маргарита Рашидовна – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Margarita.Sharipova@ksu.ru