

УДК 577.214.625

## Биосенсоры для исследования активности промоторов и шаперонов в клетках *Bacillus subtilis*

© 2020 Е.Ю. ГНУЧИХ<sup>1,2\*</sup>, И.В. МАНУХОВ<sup>3,4</sup>, Г.Б. ЗАВИЛЬГЕЛЬСКИЙ<sup>2,5\*\*</sup><sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИгенетика, Курчатовский геномный центр, Москва, 117545<sup>2</sup> НИЦ «Курчатовский институт», Москва, 123182<sup>3</sup> Московский физико-технический институт, Московская область, Долгопрудный, 141700<sup>4</sup> Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук, Оренбург, 460000<sup>5</sup> Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, 117545

\*e-mail: gnuchikh\_ey@genetika.ru

\*\*e-mail: zavilgel@genetika.ru

Поступила в редакцию 29.10.2020 г.

После доработки 03.12.2020 г.

Принята к публикации 12.12.2020 г.

Сконструированы плазмиды для определения активности промоторов в клетках *Bacillus subtilis*. Плазмиды содержат разные по активности конститутивные (P<sub>fbaA</sub>, P<sub>ymdA\_mut3</sub>, P<sub>ymdA</sub>) и индуцируемые (P<sub>xylA</sub>, P<sub>xylA-sre</sub>) промоторы, под контролем которых расположены гены, кодирующие различные по термостабильности и структуре белки-репортеры. Оценивали следующие параметры биосенсоров: амплитуду ответа, пороговую концентрацию, минимальное время ответа и влияние катаболитной репрессии для индуцируемых промоторов. Проведено сравнение активности конститутивных промоторов. Показано, что амплитуда ответа индуцируемого промотора P<sub>xylA</sub> при концентрации D(+)-ксилозы 1% за два часа инкубации превышает контрольный уровень более чем в 100 раз, а промотора P<sub>xylA-sre</sub> — примерно в 80 раз. Однако промотор P<sub>xylA-sre</sub> более закрыт и репрессируется глюкозой. Сконструированные lux-биосенсоры, содержащие в качестве белков-репортеров бактериальные люциферазы, использованы для определения влияния молекулярных шаперонов DnaKJE и Триггер Фактора (ТФ) на уровень синтеза активных форм ферментов. Показано, что при отсутствии в бактериях *B. subtilis* шаперонов DnaKJE и ТФ синтез нативной термочувствительной люциферазы *Photobacterium leiognathi* значительно снижается, в то время как при отсутствии в клетках шаперона ТФ синтез нативной термостабильной люциферазы *Photobacterium luminescens* повышается примерно в два раза. В условиях ошибочной трансляции под действием стрептомицина и при отсутствии шаперонов DnaKJE и ТФ синтез активных форм обеих люцифераз значительно снижен.

**Ключевые слова:** *Bacillus subtilis*, бактериальная люцифераза, биосенсор, биолюминесценция, промоторы, экспрессия генов, шапероны, Триггер Фактор, DnaKJ

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-6-68-77

Бактерии рода *Bacillus* — востребованный объект промышленной биотехнологии, что связано в том числе со способностью синтезировать и секретировать большие количества белка во внеклеточную среду. Известно, что эффективная продукция секреторных ферментов в *Bacillus subtilis* зависит от посттрансляционного и транслокационного фолдинга полипептидной цепи, который контролируется соответственно находящимися в цитоплазме шаперонами

DnaKJE и GroES/EL и липопротеином PrsA [1–3]. Показано, что повышенная внутриклеточная концентрация DnaKJE и GroES/EL сопровождается снижением образования телец включения и увеличением активности целевого белка в клетке, а повышение экспрессии гена *prsA* значительно повышает выход секреторных белков [2–6]. Липопротеин PrsA стабилизирует экспортируемые белки в компартменте между цитоплазматической мембраной и клеточной стенкой [7–9].

Целью работы было создание на основе бактерий *B. subtilis* специфических и чувствительных биосенсоров для количественного определения активности промоторов и шаперонов в клетках.

**УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА**

**Штаммы бактерий**

В работе использовали штамм *Bacillus subtilis* 168, полученный из национального биоресурсного центра Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ), и его делеционные мутанты NBS 2001  $\Delta dnaK-dnaJ::Spc^r$  и NBS 1001  $\Delta tig::Cm^r$ , любезно предоставленные Н. Yoshikawa (Tokyo University of Agriculture, Япония) [10].

**Выделение ДНК, рестрикция, лигирование, ферменты и реактивы**

Эндонуклеазное расщепление, лигирование фрагментов ДНК, электрофорез в агарозном геле, выделение фрагментов ДНК из агарозного геля проводили по общепринятой методике [11]. ПЦР проводили с помощью высокоточной ДНК-полимеразы Q5 (New England BioLabs, Inc., США). Реакции молекулярного клонирования проводили с использованием ферментов фирм Promega (США) или Gibson Assembly Master Mix (New England BioLabs, Inc.). Субстрат бактериальной люциферазы *n*-деканаль получен от фирмы Sigma (США). *D*(+)-ксилоза получена от фирмы AppliChem (Германия).

**Среды и условия культивирования**

Компоненты питательных сред: триптон, дрожжевой экстракт, агар-агар, NaCl — были приобретены у компании «Хеликон» (Россия).

*B. subtilis* выращивали на LB или триптоновой среде [12] при 37°C и постоянной аэрации (200 об/мин.). Для трансформации и пересева штаммов *B. subtilis*, содержащих плазмиды, использовали триптоновую среду с добавлением триметоприма до конечной концентрации 8 мкг/мл или среды LB с добавлением хлорамфеникола (10 мкг/мл). Твердые среды дополнительно содержали 1,5%-ный агар-агар. Для индукции промотора PxyIA использовали *D*(+)-ксилозу (AppliChem).

**Трансформация**

Трансформацию *B. subtilis* проводили по методу Спицайзена [13].

**Конструирование челночных плазмид**

Сконструированные и использованные в работе плазмиды представлены в табл. 1.

**Плазмиды, использованные в работе**

**Plasmids used in the study**

Плазмида	Источник
pXen5	получена от Francis K.P. (Caliper Life Sciences, Inc., США) [14]
pT7-mut3	получена от Meighen E. (McGill University, Канада) [15]
pF2	[16]
pLF22ABleo	[17]
pLR	получена от Н.Н. Угаровой (МГУ им. М.В. Ломоносова) [18]
pCT5-bac2.0	получена из некоммерческой коллекции плазмид Addgene (Non-Profit Plasmid Repository, США) [19]
pMWAL1T-Ppur_dhfr_t1t2_MCS	[12]
pPfaA_MCS	[12]
pPymdA_MCS	данная статья
pPymdA_mut3_MCS	данная статья
pPymdA_ABCDExen	данная статья
pPymdA_mut3_ABCDExen	данная статья
pPfaA_ABCDExen	данная статья
pPxyIA_ABCDExen	данная статья
pPL_ABCDExen	данная статья
pPfaA_v.h.fusion	данная статья
pPymdA_mut3_v.h.fusion	данная статья
pPfaA_xenAB	[12]
pPfaA_leoAB	[12]
pPfaA_fishAB	данная статья
pPxyIA_MSC	[12]
pPxyIA_fishAB	данная статья
pPxyIA_leoAB	данная статья
pPymdA_mut3_leoAB	данная статья
pPxyIA_xenAB	[12]
pPymdA_xenAB	данная статья
pPymdA_mut3_xenAB	данная статья
pPfaA_luc	данная статья
pPymdA_mut3_luc	данная статья
pPxyIA_sfGFP	данная статья
pPxyIAcre_MSC	данная статья
pPxyIAcre_ABCDExen	данная статья

## Праймеры, использованные в работе

## Primers used in the study

Праймер	Нуклеотидная последовательность
P1	5'-GGCCGCGGTACCGAGCTCTTTTCTCCAACCTCATTGTAAATGTG-3'
P2	5'-TAAAGAAGAGCTTTCAGGTATTCGGTTAAGATGGCAAG-3'
P3	5'-GGCCGCGGTACCGAGCTCTTTCCTCCAACCTCATTGTAAATGTG-3'
P4	5'-CTGGTACCGCGGCCGCTCGAGGAAGCAAGAGGAGGACTCTCTATG-3'
P5	5'-GGGATCCGGCGCGCCGGGCCCTCGACTTAACTATCAAACGCTTCGGTT-3'
P6	5'-TATGCGGCCGCCAAGAGGAGGAGAAATGTTATGAAATTTGGAAACTTCCTT-3'
P7	5'-AGAAGGGCCCTGCCCTTCAGCATCAGTTA-3'
P8	5'-ATCGCGGCCGCTCTCAAGGAGGAATAGAGTATGAAGTTTGGAA-3'
P9	5'-TCGGGGCCCCGGCAATCTAATATATAAATTGCCCTT-3'
P10	5'-ATCGCGGCCGCTCTCAGATCGGAAGGTGGAAGAA-3'
P11	5'-TCGGGGCCCCGTACCTCGCGAATGCATCTA-3'
P12	5'-GCCGGGCCCTCGAGATTTCAACCTGGCCGTTAATAATGAATGA-3'
P13	5'-ATTGCGGCCGCTCGAGTACTAAGTATATTATAGGAGGCTAGCAAAA-3'
P14	5'-CTTGGCGCGCCGGGCCGAGGAGTCCCATGAAAATCAAGT-3'
P15	5'-GCTCGGTACCGCGGCCGCTCGAGGAAGCAAGAGGAGGACTCTCTATGTCAAAGGAGA AGAACTTTTACAGGTG-3'
P16	5'-GGGGATCCGGCGCGCCGGGCCCTTATTATAAAGTTCGTCCATACCGTGAG-3'
P17	5'-GCCGCGGTACCGAGCTCTTAAACCACTTTGTAAACGCTTACAAAATAGTT-3'
P18	5'-AGAAGAGCTTTCAGGAATTCGTTCTATTTTAGAACTCCTTTTTCATATGAGAAGGT-3'

Праймеры, использованные при конструировании плазмид, приведены в табл. 2.

В качестве основного вектора для конструирования биосенсорных плазмид использовали беспромоторную челночную плазмиду pMWAL1T-Ppur\_dhfr\_t1t2\_MCS [12], которая содержит терминаторы транскрипции, что позволяет при клонировании фланкировать ими промотор и репортерные гены. Клонированные промоторы встраивали направленными в противоположную сторону от области ориджина репликации для *B. subtilis*. Такая конструкция позволяет снизить влияние исследуемых промоторов на копияемость плазмид.

В беспромоторную челночную плазмиду pMWAL1T-Ppur\_dhfr\_t1t2\_MCS [12] по сайту рестрикции *SacI* сборкой Гибсона встроили два варианта конститутивного промотора PymdA гена *tnu* (кодирует эндорибонуклеазу Y) [20]: нативный и мутантный с заменой T→C в позиции +1. Фрагмент ДНК амплифицировали из геномной ДНК *B. subtilis* 168 с помощью праймеров P1/P2 и P2/P3. В результате были получены плазмиды pPymdA\_MCS и pPymdA\_mut3\_MCS соответственно с нативным и мутантным промотором.

В плазмиду pPfbA\_MCS [12], содержащую фрагмент с конститутивным промотором PfbA, по сайтам рестрикции *NotI/ApaI* встроили кассету с генами *luxABCDE* *Photobacterium luminescens* (далее

*P. luminescens*). Фрагмент ДНК размером 5,6 т.п.н. амплифицировали, используя праймеры P4/P5 из плазмиды pXen5 [14], в результате чего была получена плазида pPfbA\_ABCDE<sub>hex</sub>. С использованием эндонуклеаз *NotI/ApaI* кассета *luxABCDE* была вырезана из плазмиды pPfbA\_ABCDE<sub>hex</sub> и переклонирована в плазмиды pPymdA\_MCS, pPymdA\_mut3\_MCS, а также pPxyLA\_MSC [12] и pMWAL1T-Ppur\_dhfr\_t1t2\_MCS. В результате получены плазмиды pPymdA\_ABCDE<sub>hex</sub>, pPymdA\_mut3\_ABCDE<sub>hex</sub>, pPxyLA\_ABCDE<sub>hex</sub> и беспромоторная pPL\_ABCDE<sub>hex</sub> соответственно.

В плазмиды pPfbA\_MCS и pPymdA\_mut3\_MCS по сайтам рестрикции *NotI/ApaI* встроили фрагмент ДНК, содержащий гены *luxAB* *Vibrio harveyi* в моноцистронной форме, кодирующие трансляционно слитые α- и β-субъединицы люциферазы. Фрагмент ДНК амплифицировали с помощью праймеров P6/P7 с плазмиды pT7-mut3 [15]. В результате получили плазмиды pPfbA\_v.h.fusion и pPymdA\_mut3\_v.h.fusion.

В плазмиды pPfbA\_MCS и pPxyLA\_MSC (содержит индуцируемый D(+)-ксилозой промотор PxyLA [12]) по сайтам рестрикции *NotI/ApaI* клонировали гены *luxAB* *Aliivibrio fischeri* с измененными для грамположительных бактерий последовательностями Шайна-Дальгарно перед генами. Фрагмент ДНК амплифицировали,

используя праймеры P8/P9, с плазмиды pF2 [16]. В результате получили плазмиды pPfbA\_fishAB и pPxyA\_fishAB.

В плазмиды pPxyA\_MSC и pPymdA\_mut3\_MCS по сайтам рестрикции *NotI/ApaI* встроили гены *luxAB Photobacterium leiognathi*, амплифицированные с помощью праймеров P10/P11 из плазмиды pLF22ABleo [17]. В результате получены плазмиды pPxyA\_leoAB и pPymdA\_mut3\_leoAB.

В плазмиды pPymdA\_MCS и pPymdA\_mut3\_MCS по сайтам рестрикции *NotI/ApaI* встроили гены *luxAB P. luminescens*, амплифицированные с использованием праймеров P4/P12 с плазмиды pXen5 [14]. В результате получены плазмиды pPymdA\_xenAB и pPymdA\_mut3\_xenAB.

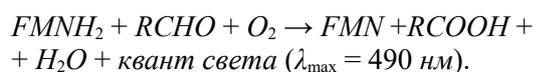
В плазмиды pPfbA\_MCS и pPymdA\_mut3\_MCS по сайтам рестрикции *NotI/ApaI* был встроены ген *luc*, кодирующий люциферазу светлячка *Luciola mingrelica*. Фрагмент ДНК амплифицировали, используя праймеры P13/P14 и плазмиду pLR [18] в качестве матрицы. В результате получены плазмиды pPfbA\_luc и pPymdA\_mut3\_luc.

В плазмиду pPxyA\_MSC под промотор PxyA по сайту рестрикции *XhoI* сборкой Гибсона был клонирован ген *sfGFP* [21]. Фрагмент ДНК амплифицировали с помощью праймеров P15/P16 с плазмиды pCT5-bac2.0 [19] в качестве матрицы, в результате получена плазида pPxyA\_sfGFP.

В беспромоторную плазмиду pMWAL1T-Pprug\_dhfr\_t1t2\_MCS [12] по сайту рестрикции *SacI* сборкой Гибсона был встроены фрагмент ДНК, кодирующий промотор PxyA с *cre*-элементом и репрессор хуIR [22], ДНК амплифицировали с использованием праймеров P17/P18, в качестве матрицы использовали геномную ДНК *B. subtilis* 168. В результате получена плазида pPxyAcre\_MSC. В плазмиду pPxyAcre\_MSC встроили кассету *luxABCDE P. luminescens*, по схеме, описанной выше, и получили плазмиду pPxyAcre\_ABCDExen.

### Определение люциферазной активности

Бактериальная люцифераза катализирует окисление длинноцепочечного альдегида (RCHO) кислородом (O<sub>2</sub>) в присутствии восстановленного флавинононуклеотида (FMNH<sub>2</sub>):



Измерение люциферазной активности проводили с использованием люминометра Biotox 7 (ООО «Экон», Россия) или планшетного люминометра LMA01 (Beckman, США). Интенсивность люминесцентного сигнала выражали

в относительных единицах (ОЕ), которые пропорциональны напряжению (мкВ) на обкладках фотоэлектронного умножителя люминометра.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Сравнение активностей конститутивных промоторов *B. subtilis*

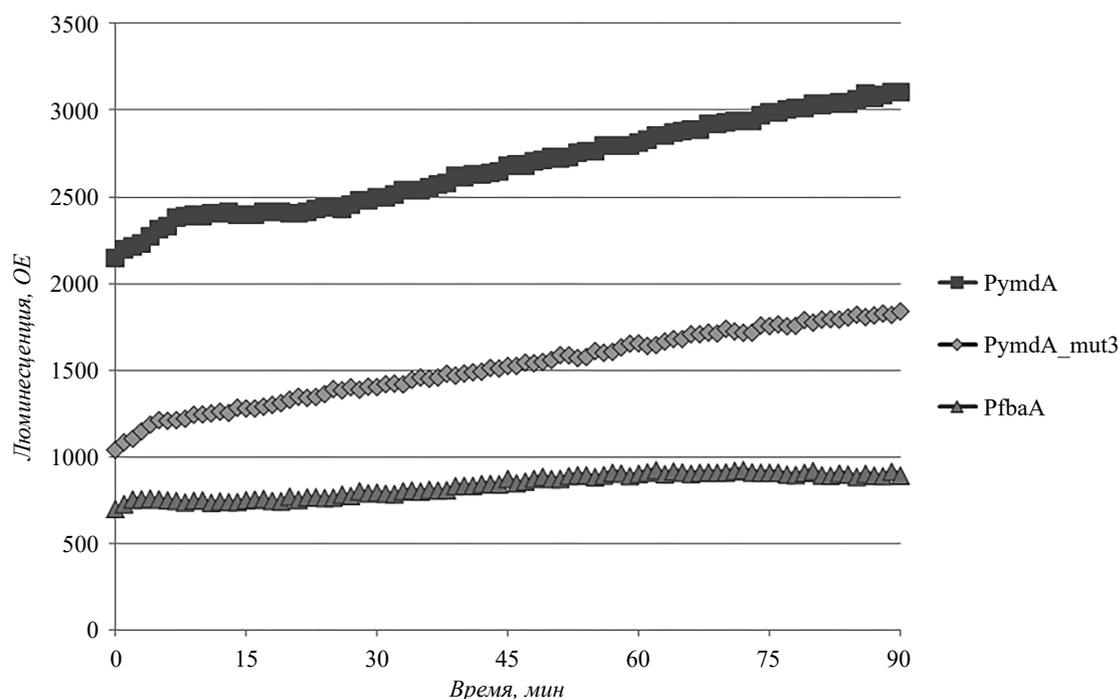
С использованием сконструированных lux-биосенсоров (клетки *B. subtilis* содержат гибридные плазмиды, в которых кассета генов *luxABCDE P. luminescens* встроена под исследуемый промотор) провели сравнение активностей конститутивных промоторов PfbA, PymdA\_mut3, PymdA. Промотор PfbA регулирует экспрессию гена *fbaA*, кодирующего фруктозо-1,6-бисфосфатаальдозу (fructose 1,6-bisphosphate aldolase), а промотор PymdA и его мутантный вариант PymdA\_mut3 — гена *rny*, кодирующего эндорибонуклеазу Y (endoribonuclease Y).

На рис. 1 представлено сравнение активностей конститутивных промоторов PfbA, PymdA и PymdA\_mut3. Культуры клеток *B. subtilis* 168, содержащие плазмиды pPymdA\_ABCDExen, pPymdA\_mut3\_ABCDExen и pPfbA\_ABCDExen, выращивали в жидкой среде LB при температуре 37 °C до значения оптической плотности (OD<sub>600</sub>) 0,35, после чего суспензию клеток вносили в лунки (200 мкл/лунка) 96-луночного планшета, который помещали в люминометр и инкубировали при комнатной температуре без перемешивания. Интенсивность сигнала люминесценции измеряли в относительных единицах (ОЕ) в течение 90 мин с периодом 3 мин.

Как можно заметить, при синтезе с промотора PymdA уровень синтезированного репортерного белка за один и тот же интервал времени примерно в 1,5–2,0 раза выше уровня экспрессии этого белка с промотора PymdA\_mut3 и в 3–4 раза выше, чем с промотора PfbA. За время эксперимента не наблюдали существенных изменений в соотношении уровней люминесценции для тестируемых штаммов, что вполне логично при сравнении активностей конститутивных промоторов.

### Сравнение активностей индуцируемых промоторов *B. subtilis*

Регулон XylR контролирует утилизацию ксилана и ксилозы и включает в себя два оперона: *xylAB* и *xylPB*. Экспрессия генов регулона контролируется  $\sigma$ A-фактором РНК-полимеразы и двумя транскрипционными факторами: репрессором XylR и регулятором катаболитной репрессии CsrA (carbon catabolite protein A). Нами использованы промоторы PxyA и PxyA-cre; в последнем в вектор встроены фрагмент с лидерной



**Рис. 1.** Активность конститутивных промоторов PfbA, PymdA\_mut3 и PymdA в составе соответствующих плазмид pPymdA\_ABCDExen, pPymdA\_mut3\_ABCDExen и pPfbA\_ABCDExen в клетках *B. subtilis* 168. Активность промоторов оценивали по экспрессии белка-репортера люциферазы *P. luminescens*. По оси абсцисс отложено время инкубации бактерий при комнатной температуре без перемешивания, по оси ординат — интенсивность люминесценции в относительных единицах (ОЕ).

**Fig. 1.** Comparison of activities of the PfbA, PymdA\_mut3 and PymdA constitutive promoters. *B. subtilis* 168 bacteria contained pPymdA\_ABCDExen, pPymdA\_mut3\_ABCDExen or pPfbA\_ABCDExen plasmid. The abscissa shows the incubation time of bacteria at room temperature without agitation; the ordinate shows the luminescence intensity in relative light units (RLU).

Таблица 3

**Экспрессия люциферазы *P. luminescens* в клетках *B. subtilis* 168, содержащих плазмиды pPxylA\_ABCDExen и pPxylAcre\_ABCDExen**

**Expression of *P. luminescens* luciferase in *B. subtilis* 168 cells containing pPxylA\_ABCDExen and pPxylAcre\_ABCDExen plasmids\***

Плазмида/промотор	Интенсивность люминесценции, ОЕ*				
	без индукции	ксилоза			
		0,05%	0,5%	1%	1% + глюкоза 0,5%
pPxylA_ABCDExen/PxylA	5	876	1 721	2 142	2 361
pPxylAcre_ABCDExen/PxylA-cre	5	167	465	439	63

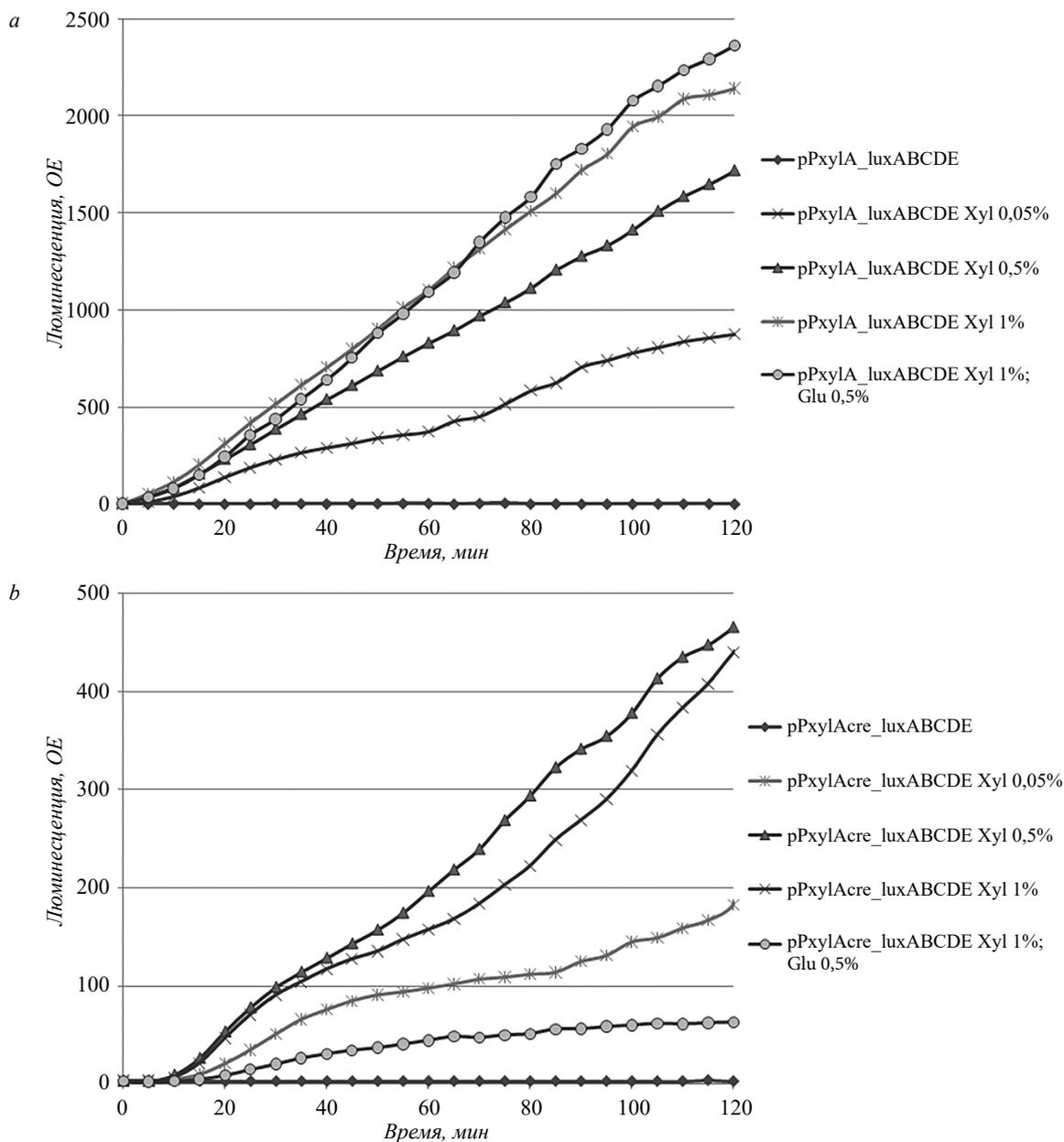
\*Примечание: Бактерии инкубировали в среде LB с разными концентрациями D(+)-ксилозы в течение 120 мин при комнатной температуре.

\*Note: Bacterial cells were grown in LB with different concentration of D(+)-xylose 120 min at room temperature.

частью гена *xylA*, содержащей *cre*-элемент (catabolite responsive elements). Регулятор *CsrA* связывается с *cre*-элементом в присутствии глюкозы и ограничивает транскрипцию *xylA* [23]. Культуры клеток *B. subtilis* 168 с плазмидами pPxylAcre\_ABCDExen и pPxylA\_ABCDExen выращивали в жидкой среде LB при температуре 37 °C до OD<sub>600</sub> = 0,35, добавляли индуктор D(+)-ксилозу (0 мин) и инкубировали при

комнатной температуре без перемешивания. Интенсивность люминесценции измеряли в течение 120 мин с 5-минутным интервалом.

В табл. 3 и на рис. 2 и приведены данные по экспрессии активного репортерного белка при транскрипции под контролем индуцируемых промоторов PxylA и PxylA-cre в присутствии разных концентраций D(+)-ксилозы как индуктора и влиянию глюкозы на катаболитную репрессию.



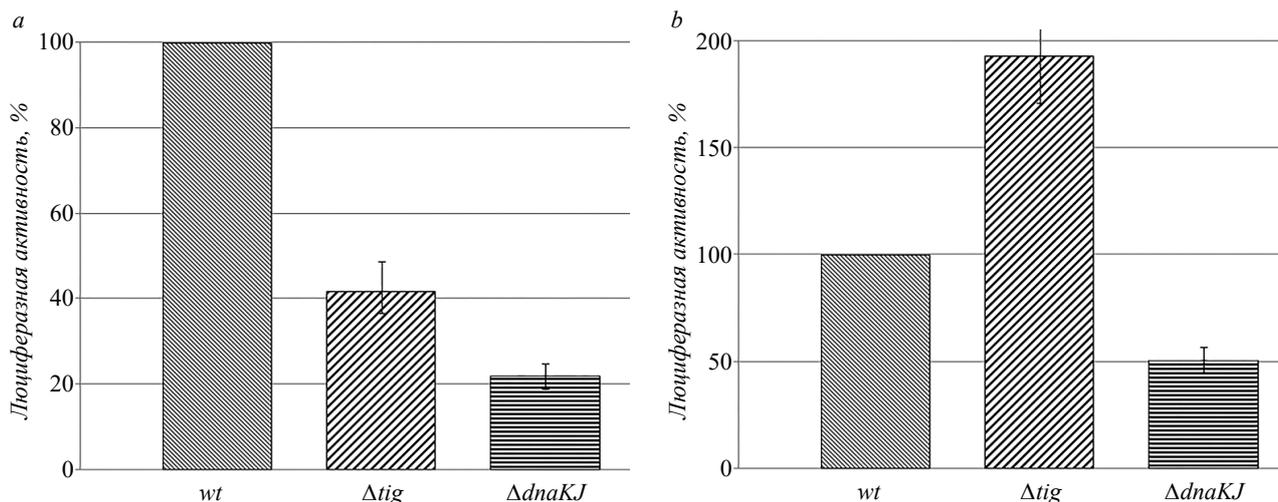
**Рис. 2.** Активность индуцируемых промоторов PxyIA (a) и PxyIA-cre (b) в присутствии разных концентраций D(+)-ксилозы и влияние глюкозы на катаболитную репрессию транскрипции. Клетки *B. subtilis* 168 содержат плазмиды pPxyIA\_ABCDEexen и pPxyIAcre\_ABCDEexen.

**Fig. 2.** Comparison of the activities of inducible promoters PxyIA (a) and PxyIA-cre (b) in the presence of different concentrations of the inducer D(+)-xylose, and measurement of the effect of glucose on catabolic repression of transcription from the promoters. Cells of *B. subtilis* 168 strain contain pPxyIAcre\_ABCDEexen and pPxyIA\_ABCDEexen plasmids. The abscissa axis shows the incubation time, the ordinate axis shows the bioluminescence intensity in RLU.

Как видно из приведенных данных, уже при концентрации 0,05% D(+)-ксилозы экспрессия гена репортерного белка с промотора PxyIA усиливается в 175 раз по сравнению с неиндуцированным вариантом (рис. 2a и табл. 3), однако последующее увеличение концентрации индуктора на порядок приводит всего к двукратному повышению амплитуды ответа биосенсора. При дополнительном введении 0,5%-ной глюкозы

за 2 ч инкубации ответ биосенсора практически не изменился.

На рис. 2b представлена зависимость уровня экспрессии белка-репортера с промотора PxyIA-cre от концентрации D(+)-ксилозы. В этом случае амплитуда ответа в присутствии 1%-ной D(+)-ксилозы превышает контрольную примерно в 80 раз, а введение в среду 0,5%-ной глюкозы сильно снижает экспрессию гена-репортера — через



**Рис. 3.** Люциферазная активность клеток *B. subtilis*, экспрессирующих термолabile люциферазу *Photobacterium leiognathi* при 28 °С (а) и термостабильную люциферазу *P. luminescens* при 46 °С (b) с плазмид pPfbA\_leoAB и pPfbA\_xenAB соответственно (OD<sub>600</sub> = 0,5). Штаммы *B. subtilis*: 168 (wt), NBS 1001 (Δ*tig*) и NBS 2001 (Δ*dnaKJ*). Люциферазная активность в клетках штамма *B. subtilis* 168 принята за 100%.

**Fig. 3.** Luminescence intensity of *B. subtilis* cells, expressing thermolabile luciferase *P. leiognathi* at 28 °C (a) or thermostable luciferase *P. luminescens* at 46 °C (b) (OD<sub>600</sub> = 0.5) from pPfbA\_leoAB or pPfbA\_xenAB plasmid, respectively. *B. subtilis* strains: 168 (wt), NBS 1001 (Δ*tig*) и NBS 2001 (Δ*dnaKJ*). The luciferase activity in the cells of the *B. subtilis* 168 strain was taken to be 100%.

2 ч инкубации интенсивность люминесценции биосенсора превышает контрольный уровень всего в 12 раз (табл. 3).

Уровень экспрессии с промоторов Pхy1A и Pхy1A-cre без индукции близки фоновым значениям люминесценции (2–4 ОЕ). Пороговая концентрация индуктора D(+)-ксилозы для промотора Pхy1A составляет 50 мкМ (7,5·10<sup>-4</sup>%), а для промотора Pхy1A-cre — 100 мкМ (1,5·10<sup>-3</sup>%). В присутствии 1%-ной D(+)-ксилозы минимальное время ответа составляет 3–5 мин для промотора Pхy1A и 8–10 мин для промотора Pхy1A-cre.

### Влияние делеционных мутаций генов, кодирующих молекулярные шапероны DnaKJE и Триггер Фактор, на синтез активных форм бактериальных люцифераз

В следующей серии экспериментов были определены уровни синтеза активных люцифераз, гены которых расположены в плаزمиде под конститутивным промотором PfbA, в штамме *B. subtilis* 168 (дикий тип) и мутантных штаммах, у которых отсутствуют участвующие в синтезе активных форм белков шапероны Триггер Фактор (ТФ) и DnaK.

Экспериментальные данные по синтезу функционально активных люцифераз: термолabile люциферазы *Photobacterium leiognathi* при 28 °С и термостабильной *P. luminescens* при 46 °С — в клетках *B. subtilis* 168 дикого типа (wt) и мутантах

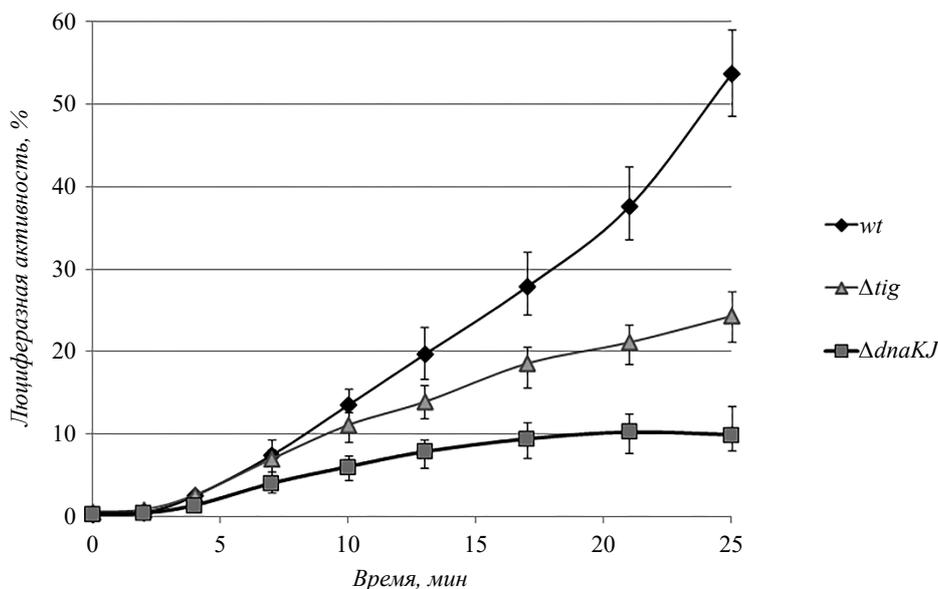
NBS 1001 Δ*tig*::Cm<sup>r</sup> и NBS 2001 Δ*dnaK-dnaJ*::Spс<sup>r</sup> представлены на рис. 3. Уровень синтеза активной люциферазы в штамме дикого типа принят за 100%.

Как видно из представленных результатов, в мутантном штамме *B. subtilis* NBS 1001 Δ*tig*::Cm<sup>r</sup> при отсутствии ТФ содержание термолabile люциферазы *Photobacterium leiognathi* в 2,5 раза ниже, чем в клетках дикого типа (рис. 3a), в то время как содержание термостабильной люциферазы *P. luminescens*, напротив, повышено почти в два раза (рис. 3b).

В отсутствие шаперона DnaKJ в клетках *B. subtilis* NBS 2001 Δ*dnaK-dnaJ*::Spс<sup>r</sup> уровень синтезированной активной люциферазы *Photobacterium leiognathi* снижен примерно в пять раз, а люциферазы *P. luminescens* — в два раза (рис. 3).

Можно предположить, что наблюдаемое нами повышение активности люциферазы *P. luminescens* в клетках *B. subtilis* Δ*tig*::Cm<sup>r</sup> по сравнению с таковой в клетках дикого типа (рис. 3b) связано с тем, что в клетках дикого типа происходит формирование прочного комплекса синтезируемой на рибосоме полипептидной цепи с ТФ, что замедляет процесс укладки белка и тем самым понижает уровень синтеза нативной формы люциферазы. Необходимо отметить, что для термолabile люциферазы *Photobacterium leiognathi* не выявлено повышения активности в клетках *B. subtilis* Δ*tig*::Cm<sup>r</sup>.

На рис. 4 представлены данные по зависимости синтеза люциферазы *P. luminescens* в клетках



**Рис. 4.** Синтез нативной термостабильной люциферазы *P. luminescens* в клетках *B. subtilis* в присутствии стрептомицина при температуре 40 °С. Штаммы *B. subtilis*: 168 (wt), NBS 1001 ( $\Delta tig$ ), NBS 2001 ( $\Delta dnaKJ$ ) — содержат плазмиду pPxylA\_xenAB. Активность фермента указана в процентах от интенсивности люминесценции клеток соответствующих штаммов без индукции ошибок трансляции. Ошибки трансляции вызывали добавлением к культуре клеток 15 мкг/мл стрептомицина за 5 мин до индукции промотора PxylA 1%-ной D(+)-ксилозой. По оси абсцисс — время инкубации культуры клеток с момента добавления индуктора.

**Fig. 4.** Synthesis of native *P. luminescens* thermostable luciferase in the presence of streptomycin at 40 °C. *B. subtilis* strains, 168 (wt), NBS 1001 ( $\Delta tig$ ), NBS 2001 ( $\Delta dnaKJ$ ), contain the pPxylA\_xenAB plasmid. The enzyme activity is indicated as a percentage of the luminescence intensity of the cells of the corresponding strains without induction of translation errors (control) — ordinate axis. Translation errors were caused by the addition of 15  $\mu$ g/mL streptomycin to the cell culture 5 min before the induction of the PxylA promoter with 1% D(+)-xylose. The abscissa shows the incubation time of the cell culture at 40 °C from the moment the inductor was added.

*B. subtilis* в условиях индуцируемого стрептомицином ошибочного синтеза белка. Ошибки трансляции индуцировали добавлением к культуре клеток 15 мкг/мл стрептомицина за 5 мин до индукции промотора PxylA 1%-ной D(+)-ксилозой. Из приведенных данных видно, что в этом случае эффективность синтеза люциферазы *P. luminescens* во всех исследованных штаммах *B. subtilis* снижена относительно контрольных, причем особенно сильно в штаммах, мутантных по шаперонам. Через 20 мин в штамме *B. subtilis* дикого типа активность люциферазы составляла около 40%, в штамме  $\Delta tig::Cm^r$  — 20% и  $\Delta dnaKJ::Src^r$  — 10% по сравнению с контрольными клетками с ненарушенной трансляцией. Можно предположить, что при образовании значительного количества дефектов в полипептидах, индуцируемых стрептомицином, связь ТФ с синтезируемой термостабильной люциферазой ослабевает и, как следствие, уменьшается время укладки нативной формы фермента. В результате ТФ практически не замедляет скорость синтеза как термолabileй, так и термостабильной люцифераз.

На основании полученных в работе результатов можно предполагать, что сконструированные

биосенсоры найдут применение в исследованиях по оценке активности конститутивных и индуцируемых промоторов, а также влияния белков-шаперонов ТФ и DnaK на уровень синтеза активных форм ферментов в клетках *Bacillus subtilis*.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа И. Манухова выполнена при финансовой поддержке РФФ по гранту 20-16-00088. Исследование Е. Гнучих по конструированию lux-биосенсоров частично профинансировано РФФИ (проект № 20-34-70132).

#### ЛИТЕРАТУРА

- Stephenson K., Carter N.M., Harwood C.R., et al. The influence of protein folding on late stages of the secretion of  $\alpha$ -amylases from *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett.*, 1998, 430(3), 385–389. doi: 10.1016/S0014-5793(98)00698-X
- Wu S.C., Ye R., Wu X.C., et al. Enhanced secretory production of a single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis* by coproduction of molecular chaperones. *J. Bacteriol.*, 1998, 180(11), 2830–2835. doi: 10.1128/jb.180.11.2830-2835.1998

3. Yao D., Su L., Li N., Wu J. Enhanced extracellular expression of *Bacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -amylase in *Bacillus subtilis* through signal peptide optimization, chaperone overexpression and  $\alpha$ -amylase mutant selection. *Microb. Cell. Fact.*, 2019, 18(1), 69. doi: 10.1186/s12934-019-1119-8
4. Kontinen V.P., Sarvas M. The PrsA lipoprotein is essential for protein secretion in *Bacillus subtilis* and sets a limit for high level secretion. *Mol. Microbiol.*, 1993, 8(4), 727–737. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01616.x
5. Quesada-Ganuza A., Antelo-Varela M., Mouritzen J.C., et al. Identification and optimization of PrsA in *Bacillus subtilis* for improved yield of amylase. *Microb. Cell. Fact.*, 2019, 18(1), 158. doi: 10.1186/s12934-019-1203-0
6. Chen J., Fu G., Gai Y., et al. Combinatorial Sec pathway analysis for improved heterologous protein secretion in *Bacillus subtilis*: identification of bottlenecks by systematic gene overexpression. *Microb. Cell. Fact.*, 2015, 14, 92. doi: 10.1186/s12934-015-0282-9
7. Kontinen V.P., Saris P., Sarvas M. A gene (prsA) of *Bacillus subtilis* involved in a novel, late stage of protein export. *Mol. Microbiol.*, 1991, 5(5), 1273–1283. doi: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb01901.x
8. Jacobs M., Andersen J.B., Kontinen V., Sarvas M. *Bacillus subtilis* PrsA is required *in vivo* as an extracytoplasmic chaperone for secretion of active enzymes synthesized either with or without pro-sequences. *Mol. Microbiol.*, 1993, 8(5), 957–966. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01640.x
9. Vitikainen M., Lappalainen I., Seppala R., et al. Structure-function analysis of PrsA reveals roles for the parvulin-like and flanking N- and C-terminal domains in protein folding and secretion in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(18), 19302–19314. doi: 10.1074/jbc.M400861200
10. Reyes D.Y., Yoshikawa H. DnaK chaperone machine and trigger factor are only partially required for normal growth of *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2002, 66(7), 1583–1586. doi: 10.1271/bbb.66.1583
11. Sambrook J., Russell D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3-Volume Set). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. [https://www.researchgate.net/publication/200037138\\_Molecular\\_Cloning\\_A\\_Laboratory\\_Manual\\_3-Volume\\_Set](https://www.researchgate.net/publication/200037138_Molecular_Cloning_A_Laboratory_Manual_3-Volume_Set)
12. Гнучих Е.Ю., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. Шаперон DnaK участвует в фолдинге, но не в рефолдинге термоинактивированных белков в *Bacillus subtilis*. *Генетика*, 2020, 56(9), 1034–1042. doi: 10.31857/s0016675820090076
13. Spizizen J. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1958, 44(10), 1072–1078. doi: 10.1073/pnas.44.10.1072
14. Francis K.P., Yu J., Bellinger-Kawahara C., et al. Visualizing pneumococcal infections in the lungs of live mice using bioluminescent *Streptococcus pneumoniae* transformed with a novel gram-positive lux transposon. *Infect. Immun.*, 2001, 69(5), 3350–3358. doi: 10.1128/IAI.69.5.3350-3358.2001
15. Boylan M., Pelletier J., Meighen E.A. Fused bacterial luciferase subunits catalyze light emission in Eukaryotes and Prokaryotes. *J. Biol. Chem.*, 1989, 264(4), 1915–1918. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2644245>
16. Завильгельский Г.Б., Манухов И.В. Lon-протеаза участвует в регуляции транскрипции lux-оперона *Vibrio fischeri*. *Генетика*, 1994, 30(3), 337–341.
17. Deryabin D.G., Karimov I.F., Manukhov I.V., et al. Differential analysis of bactericidal systems of blood serum with recombinant luminescent *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* strains. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2012, 154(1), 59–63. doi: 10.1007/s10517-012-1875-5
18. Lundovskikh I.A., Leontieva O.V., Dementieva E.I., Ugarova N.N. Recombinant *Luciola mingrelica* Firefly luciferase. Folding *in vivo*, purification and properties. *Bioluminescence and Chemiluminescence. Perspectives for the 21st Century Proceedings of the 10th Internal Symposium*. Wiley & Sons, Chichester, 1999. <https://istina.msu.ru/publications/article/3285306/>
19. Seo S.O., Schmidt-Dannert C. Development of a synthetic cumate-inducible gene expression system for *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, 103(1), 303–313. doi: 10.1007/s00253-018-9485-4
20. Guiziou S., Sauveplane V., Chang H.-J., et al. A part toolbox to tune genetic expression in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.*, 2016, 44(15), 7495–7508. doi: 10.1093/nar/gkw624
21. Overkamp W, Beilharz K, Weme R.D.O., et al. Benchmarking various green fluorescent protein variants in *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Lactococcus lactis* for live cell imaging. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2013, 79(20), 6481–6490. doi: 10.1128/AEM.02033-13
22. Bhavsar A.P, Zhao X, Brown E.D. Development and characterization of a xylose-dependent system for expression of cloned genes in *Bacillus subtilis*: conditional complementation of a teichoic acid mutant. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67(1), 403–410. doi: 10.1128/AEM.67.1.403-410.2001
23. Jacob S., Allmansberger R., Gärtner D., Hillen W. Catabolite repression of the operon for xylose utilization from *Bacillus subtilis* W23 is mediated at the level of transcription and depends on a cis site in the xylA reading frame. *Mol. Gen. Genet.*, 1991, 229(2), 189–196. doi: 10.1007/BF00272155

## Biosensors for the Determination of Promoters and Chaperones Activity in *Bacillus subtilis* Cells

E.Y. GNUCHIKH<sup>1,2\*</sup>, I.V. MANUKHOV<sup>3,4</sup>, and G.B. ZAVILGELSKY<sup>2,5\*\*</sup>

<sup>1</sup> National Research Center “Kurchatov Institute” — GOSNIIGENETIKA, Kurchatov Genomic Center, Moscow, 117545 Russia

<sup>2</sup> National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182, Russia

<sup>3</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow Region, Dolgoprudny, 141700, Russia

<sup>4</sup> Federal Scientific Center of Biological Systems and Agricultural Technologies of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, 460000, Russia

<sup>5</sup> State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, 117545, Russia

\*e-mail: gnuchikh\_ey@genetika.ru

\*\*e-mail: zavilgel@genetika.ru

Received October 29, 2020

Revised December 3, 2020

Accepted December 12, 2020

**Abstract**—Plasmids to determine the activities of promoters in *Bacillus subtilis* cells have been constructed. Plasmids contain constitutive (P<sub>fbaA</sub>, P<sub>ymdA\_mut3</sub>, P<sub>ymdA</sub>) and inducible (P<sub>xylA</sub>, P<sub>xylA-cre</sub>) promoters of different activities and genes under their control encoding reporter proteins with different thermostability and structure. The following main parameters were measured: maximal response, threshold concentration, minimal response time and the effect of catabolite repression for the inducible promoters. The activities of the constitutive promoters were compared. It was shown that the activity of the inducible P<sub>xylA</sub> promoter at a D(+)-xylose concentration of 1% was more than 100-fold higher and that of the P<sub>xylA-cre</sub> promoter was about 80-fold higher than the control level after 2 h of incubation. However, P<sub>xylA-cre</sub> is tightly closed and sensitive to glucose repression. The constructed *lux* sensors containing bacterial luciferases as reporter proteins were used to assess the influence of DnaKJE and trigger factor (TF) molecular chaperones on the level of synthesis of active enzymes. It was shown that the absence of both of the above chaperones in *B. subtilis* cells led to a significant decrease in the synthesis of the native thermolabile *Photobacterium leiognathi* luciferase, while the lack of TF increased the activity of the thermostable *Photobacterium luminescens* luciferase by about 2 times as compared to wild type *Bacillus subtilis* 168. Erroneous translation under the streptomycin action and in the absence of both DnaKJE and TF chaperones significantly suppressed the synthesis of both luciferases.

**Key words:** *Bacillus subtilis*, bacterial luciferase, biosensor, bioluminescence, promoter, chaperone, Trigger Factor, DnaKJ

**Funding**—The work of I. Manukhov was supported by the Russian Science Foundation under the grant 20-16-00088. E. Gnuchikh's research on the design of *lux*-biosensors was partially funded by the Russian Foundation for Basic Research (project No. 20-34-70132).

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-6-68-77