

УДК 577.152.27

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ СЕРИН-ТРЕОНИНОВЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ ШТАММА *Bifidobacterium longum* V379M И ИЗУЧЕНИЕ ИХ АКТИВНОСТИ\*

© 2015 М.Г. Алексеева, Д.А. Мавлетова, Н.В. Колчина, В.З. Незаметдинова, В.Н. Даниленко\*\*

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,  
119991 Москва, ул. Губкина, 3; факс: +7(499)132-8962,  
электронная почта: valerid@rutenia.ru

Поступила в редакцию 17.06.15  
После доработки 02.07.15

Ранее авторами у различных видов *Bifidobacterium* были идентифицированы шесть серин-треониновых протеинкиназ (СТПК), обозначенных Pkb1–Pkb6. В данной работе оптимизированы методы выделения их каталитических доменов из штамма *B. longum* V379M: разработаны методы выделения нативных белков Pkb3 и Pkb4, денатурированного белка Pkb5 и белков Pkb1, Pkb2, Pkb6 из телец включения, оптимизированы условия проведения диализа для ренатурации белков. Все ферменты выделены в количествах, достаточных для измерения активности, их гомогенность подтверждена данными Ds-Na-ПААГ-электрофореза. Впервые исследована способность к автофосфорилированию каталитических доменов протеинкиназ Pkb3 и Pkb4, выделенных в нативном виде, и протеинкиназ Pkb1 и Pkb6, выделенных из телец включения. Явление автофосфорилирования было обнаружено только у каталитического домена протеинкиназы Pkb3.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** серин-треониновые протеинкиназы, выделение и очистка белков, автофосфорилирование.

Серин-треониновые протеинкиназы (СТПК) (КФ 2.7.11.1) – ферменты, модифицирующие другие белки путем их обратимого фосфорилирования по остаткам серина или треонина в консенсусных последовательностях и, тем самым, модулирующие активность широкого спектра ферментов и осуществляющие контроль специфических белок-белковых взаимодействий. СТПК эукариотического типа широко распространены у грамположительных бактерий [1]. Эти ферменты присутствуют у почвенных микроорганизмов, патогенов, комменсалов и пробиотических бактерий [2]. Некоторые роды бактерий, такие как *Lactobacillus*,

*Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Bacillus*, имеют одну–две СТПК [2]. Наибольшее количество СТПК обнаружено у бактерий класса *Actinobacteria*: >10 у рода *Mycobacterium* [1], >20 у рода *Nocardia* [2], >30 у рода *Streptomyces* [3], шесть СТПК идентифицированы у рода *Bifidobacterium* [4].

Обратимое фосфорилирование белков является важнейшим инструментом передачи сигналов из внешней среды в бактериальную клетку, а также регуляции клеточных функций [5–7]. СТПК и сопряженные с ними серин-треониновые фосфатазы регулируют экспрессию прокариотических генов путем посттрансляционной модификации различных белков, включая компоненты систем транскрипции и трансляции [8, 9]. Исследования показали, что СТПК играют существенную роль в процессе роста и деления клеток, репликации ДНК [10], построении клеточной стенки [11], образовании биопленок [12], споруляции и прорастании спор [13], вирулентности [5], стрессовом и адаптивном ответах [14, 15]. Ингибиторы СТПК являются перспективными антимикробными агентами [16, 17].

В последние годы наблюдается повышенный интерес к изучению бифидобактерий в связи с их пробиотическими свойствами и способ-

Принятые сокращения: СТПК – серин-треониновые протеинкиназы; а.о. – аминокислотные основания; ИПТГ – изопропилтиогалактозид; ДТТ – дитиотреитол; ФМСФ – фенилметилсульфонилфторид; ТМ-участок – трансмембранный участок; «PASTA» – домен, находящийся в C-терминальной области некоторых пенициллин-связывающих белков и бактериальных серин-треониновых киназ; «PASTA\_rkpB» – домен бактериальных RkpB-подобных серин-треониновых протеинкиназ.

\* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, VM15-179, 23.08.2015.

\*\* Адресат для корреспонденции.

ностью положительно воздействовать на здоровье человека [18]. Штаммы бифидобактерий широко используются в пищевой промышленности для получения ферментируемых молочных продуктов, а также лекарственных препаратов с пробиотической активностью [19]. Бифидобактерии являются важнейшим компонентом микрофлоры человека, они доминируют в составе микробиоты кишечника у детей грудного возраста [20, 21]. В последнее время большой интерес вызывает роль бифидобактерий в коммуникации «кишечная микробиота–мозг», в первую очередь в процессе развития нервной системы и мозга у детей [22–25].

Исследования структуры и функций СТПК бифидобактерий до недавнего времени не были представлены в российской и зарубежной литературе. Следует отметить, что экспериментальных данных о функциях бифидобактериальных генов и белков крайне мало, т.к. на настоящий момент не разработано эффективных методов для проведения нокаута генов у бифидобактерий [26]. Почти половина функций белков только предсказаны посредством анализа *in silico*, основанного на гомологии с известными белками других бактерий, остальные белки аннотированы как гипотетические [27]. По гомологии с белками других актинобактерий можно предположить, что СТПК бифидобактерий могут быть элементами систем сигнальной трансдукции и играть ключевую регуляторную роль в клетках бифидобактерий.

Ранее нами были идентифицированы и охарактеризованы шесть СТПК у различных штаммов *B. longum* [4, 28]. Поскольку изучение функций протеинкиназ бифидобактерий путем нокаута генов недоступно вследствие низкой эффективности трансформации и рекомбинации [26, 27], актуальными являются прямое изучение свойств и функций белков протеинкиназ, поиски их субстратов, изучение кристаллических структур. В связи с этим встает задача получения целевых белков в препаративных количествах.

Целью представленной работы является разработка методов выделения белков каталитических доменов протеинкиназ Pkb1–Pkb6 штамма *B. longum* B379M [29], а также определение способности протеинкиназ Pkb1, Pkb3, Pkb4 и Pkb6 к автофосфорилированию *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Бактериальные штаммы, векторы, среды и условия культивирования.** В работе использовали штаммы *Escherichia coli* BL21 (DE3): *F-ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3)* («Novagen», США) [30] и

BL21 (DE3) pLysS: *F-ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3)* [pLysS Cam<sup>R</sup>] («Stratagene», США) [31], плазмиду pET32a («Novagen», США) [30] и плазмиды pET32a:*pkb1*, pET32a:*pkb2*, pET32a:*pkb3*, pET32a:*pkb4*, pET32a:*pkb5* и pET32a:*pkb6*, содержащие клонированные каталитические домены серин-треониновых протеинкиназ промышленного пробиотического штамма *B. longum* B379M [4, 29].

Для выращивания клеток *E. coli* использовали среду Лурия (L-бульон) и среду ТВ с хлорамфениколом (34 мкг/мл). Твердые среды содержали 2% агара [32]. Для обеспечения селективного роста плазмидосодержащих клеток добавляли ампициллин (150 мкг/мл). Выделение плазмидной ДНК, приготовление компетентной культуры *E. coli* и трансформацию проводили стандартными методами [32].

**Получение биомассы *E. coli* для выделения рекомбинантных белков каталитических доменов протеинкиназ.** Клетки *E. coli*, содержащие рекомбинантные плазмиды, выращивали на качалке в жидких средах при 37° до оптической плотности 0,6 (~2 ч), затем индуцировали экспрессию генов СТПК добавлением ИПТГ. Далее проводили культивирование при 28° в течение 5 или 18 ч, после чего отбирали биомассу, клетки осаждали центрифугированием (5000 об/мин, 10 мин, 4°) и замораживали при –20°. Для изучения экспрессии осадок клеток суспендировали в Sample-буфере (62,5 мМ Tris-HCl, pH 6,8, 5%-ный глицерин (*m/V*), 2%-ный 2-меркаптоэтанол, 0,1%-ный Ds-Na, 0,001%-ный бромфеноловый синий), затем клетки разрушали прогреванием при 95° в течение 10 мин. Фракцию белков анализировали с помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза. В качестве контроля использовали фракцию белков штаммов *E. coli*, содержавших плазмиду pET32a без вставки.

**Выделение рекомбинантных белков протеинкиназ.** Рекомбинантные белки выделяли из лизатов *E. coli*, содержащих рекомбинантные плазмиды, согласно протоколу QIAexpress в нативных или денатурирующих условиях хроматографией с использованием набора Ni-NTA Fast Start Kit (6) («Qiagen», США). Фракции белков анализировали с помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза. Концентрацию выделенных белков определяли по методу Бредфорд [33]. К растворам выделенных белков добавляли глицерин до конечной концентрации 20%, растворы белков хранили при –20°.

**Масс-спектрометрический анализ выделенных белков.** Анализ проводили в Институте биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН). Трипсинолиз белковых препаратов в ПААГ для

их дальнейшего анализа методом отпечатка пептидных масс проводили в соответствии с методикой, описанной ранее [34]. Масс-спектрометрический анализ триптических гидролизатов осуществляли с использованием времяпролетного MALDI масс-спектрометра Ultraflex («Bruker Daltonics», Германия). Регистрацию положительно заряженных ионов проводили в отражательном режиме в диапазоне значений  $m/z$  600–4000 Да. Идентификацию белков проводили с использованием поисковой системы Mascot (MatrixScience) (<http://www.matrixscience.com/home.html>). Для идентификации использовали следующие параметры поисковой системы: Enzyme – Trypsin, Database – SwissProt, Taxonomy – Actinobacterium, Fixed modification – none, Variable modification – none, Missed cleavages – 1, Peptide tolerance – 100 ppm, Mass values (monoisotopic) – MH+.

**Исследование автофосфорилирования рекомбинантных белков протеинкиназ *in vitro*.** Реакцию автофосфорилирования проводили в течение 30 мин при 37° в буфере (25 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ MnCl<sub>2</sub>, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ФМСФ). Реакцию начинали добавлением АТР до конечной концентрации 10 мкМ (10 мкКи [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-АТР, ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН) в присутствии 1 мкг белка протеинкиназы. Реакцию останавливали добавлением Ds-Na-ПААГ-буфера для образцов, реакционную смесь прогревали в течение 5 мин при 95°. Образцы анализировали электрофоретически в 12,5%-ном Ds-Na-ПААГ. Для автордиографии гели фиксировали в 50%-ной ТХУ, окрашивали 0,1%-ным Кумасси R250 и экспонировали с рентгеновской пленкой.

Исследование автофосфорилирования протеинкиназ *in vitro* также проводили с использованием набора Kinase-Glo<sup>+</sup> Plus Luminiscent Kinase Assay V3772 («Promega», США). Величину автофосфорилирования определяли, измеряя количество АТР, оставшегося в ходе реакции. Реагент kinase-Glo, использующий АТР в качестве субстрата для Ultra-Glo-люциферазы, катализирует окисление люциферина, образуя при этом фотон света. Активность автофосфорилирования обратно пропорциональна интенсивности люминесцентного сигнала. Реакцию проводили в течение 30 мин при комнатной температуре в буфере (15 мМ HEPES-NaOH (pH 7,4), 20 мМ NaCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ ЭДТА, 0,02%-ный Tween 20, 0,01%-ный БСА). Реакцию начинали добавлением АТР до конечной концентрации 10 мкМ в присутствии 5, 10 и 20 мкг белка протеинкиназы. Реакцию останавливали добавлением равного объема реагента kinase-Glo. Люминесцентный сигнал измеряли, ис-

пользуя DTX 880 Multimode Detector («Beckman Coulter», США). Параметры измерения: время – 100 мс, чувствительность измерения – expected high activity.

**Биоинформатические методы анализа.** Поиск нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводился по базам данных, доступным на сайтах NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и UniProt (<http://www.uniprot.org/>).

Для расчета молекулярной массы и изоэлектрической точки белков использовали программу ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Основные характеристики генов и белков серин-треониновых протеинкиназ штамма *B. longum* V379M.** Геном *B. longum* subsp. *longum* содержит шесть генов СТПК: четыре консервативных гена (*pkb1*, *pkb3*, *pkb5*, *pkb6*), один видоспецифичный ген (*pkb2*) и один уникальный ген (*pkb4*) (табл. 1) [4, 28]. Гены *pkb5* и *pkb6* составляют оперон и частично перекрываются. Основываясь на высоком сходстве аминокислотных последовательностей каталитических доменов СТПК Pkb5 и Pkb6 бифидобактерий и протеинкиназ PknB и PknA *Mycobacterium tuberculosis* и учитывая высокое сходство в генетическом окружении *pknB–pknA* и *pkb5–pkb6*, можно предположить, что и функции у этих белков-ортологов сходные и связаны с процессами роста и деления клеток [4]. Ген *pkb1* соседствует с геном *plsC1*, отвечающим за синтез мембранных фосфолипидов, и генами, кодирующими  $\sigma$ -фактор РНК-полимеразы и ДНК-гиразы. Рядом с *pkb3* расположен ген, вовлеченный в сигнальную трансдукцию.

Генетическое окружение *pkb2* (ген, кодирующий домен фибронектина и рецептор цитокинов; ген, имеющий сигнальный FHA-домен), а также необычно высокая дивергентность аминокислотной последовательности каталитического домена Pkb2 у разных видов бифидобактерий позволяют предположить возможное участие данного гена в адаптации различных видов бифидобактерий к условиям обитания. Уникальный ген *pkb4*, характерный для видов *B. longum* и *B. bifidum*, соседствует с геном, кодирующим ДНК-связывающий белок семейства регуляторов транскрипции и вовлеченным в адаптивную клеточную реакцию [4, 28].

Ранее нами осуществлено клонирование каталитических доменов всех шести обнаруженных протеинкиназ Pkb1–Pkb6 штамма *B. longum* V379M в клетках *E. coli* в экспрессионном векторе pET32a [4].

Таблица 1. Характеристика белков серин-треониновых протеинкиназ *B. longum* subsp. *longum*

СТПК	Характеристика полноразмерного белка (каталитического домена) СТПК				Характеристика С-концевого участка
	длина гена, п.н.	длина белка, а.о.	молекулярная масса, кДа	pI	
Pkb1	2274 (726)	757 (242)	80,070 (26,334)	5,14 (5,74)	3 «PASTA»-домена, 2 «PASTA_pknB2»-домена, 1 ТМ-участок
Pkb2	1422 (732)	473 (244)	51,540 (26,766)	6,32 (6,47)	1 ТМ-участок
Pkb3	2220 (861)	739 (287)	76,989 (30,363)	4,87 (4,88)	5 ТМ-участков
Pkb4	1701 (708)	566 (236)	60,439 (25,916)	5,34 (5,98)	1 ТМ-участок
Pkb5	2073 (804)	690 (268)	72,260 (29,344)	5,54 (5,59)	4 «PASTA_pknB»-домена, 1 ТМ-участок
Pkb6	951 (735)	316 (245)	34,592 (26,705)	6,97 (5,68)	—

Примечание. Представленные в таблице результаты совпадают для всех штаммов с секвенированными геномами, относящихся к подвиду *B. longum* subsp. *longum* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Bifidobacterium%20longum>).

**Оптимизация условий культивирования штаммов *E. coli*, содержащих рекомбинантные СТПК.**

Рекомбинантные штаммы *E. coli*, содержащие плазмиды рЕТ32а:*pkb1*, рЕТ32а:*pkb2*, рЕТ32а:*pkb3*, рЕТ32а:*pkb4*, рЕТ32а:*pkb5* и рЕТ32а:*pkb6*, выращивали в жидких средах LB и ТВ с индукцией ИПТГ в концентрации 0,25, 0,5, 1,0 и 1,5 мМ в течение 5 или 18 ч, затем клетки осаждали центрифугированием (5000 об/мин, 10 мин, 4°), ресуспендировали в Sample-буфере и анализировали с помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза.

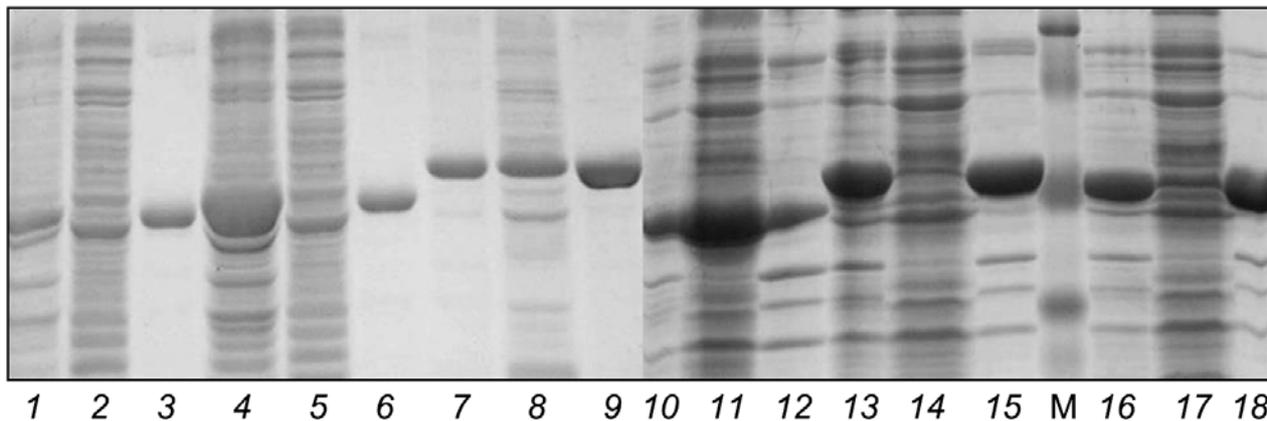
Максимальный уровень экспрессии белков всех протеинкиназ наблюдался при выращивании с индукцией 1 мМ ИПТГ в течение 18 ч на среде ТВ. Уровень экспрессии целевых белков составлял 40–50% от общего клеточного белка. Анализ электрофореграмм показал экспрессию белков с молекулярными массами 44, 45, 48, 44, 47 и 45 кДа. Эти величины соответствуют расчетным молекулярным массам рекомбинантных белков каталитических доменов протеинкиназ в сумме с молекулярной массой белка всего линкера плазмиды рЕТ32а, содержащей ген тиоредоксина (*Trx*). Биомассу, полученную из 15 мл культуры, осаждали центрифугированием (6000 об/мин, 4226 г, 15 мин, 4°), замораживали при –20° и затем использовали для выделения белков.

**Разработка условий лизиса клеток *E. coli* для выделения каталитических доменов протеинкиназ *B. longum* В379М.** Для проверки возможности выделения белков в нативных условиях клетки *E. coli*, содержавшие рекомбинантные плазмиды, размораживали при 4°, ресуспендировали в

3 мл нативного лизирующего буфера (50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 мМ Tris-HCl, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазол, 1 мМ ФМСФ, 5 мМ ДТТ, рН 8,0) с добавлением лизоцима (1 мг/мл) и 20 мМ 2-меркаптоэтанола и инкубировали при 4° в течение 1 ч. Затем подвергали ультразвуковой дезинтеграции в течение 4 мин, не допуская нагревания раствора, и центрифугировали (7500 об/мин, 6600 г, 30 мин, 4°) для разделения на растворимую фракцию (лизат) и осадок (тельца включения). Полученные фракции анализировали с помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза (рис. 1). По результатам лизиса для дальнейшей работы был выбран штамм *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

Анализ выделенных фракций белков Pkb3 и Pkb4 показал, что целевой белок находился как в растворимой форме, так и во фракции телец включения, причем примерно в равном соотношении, что дало возможность выделения этих белков в нативных условиях. Исследование выделенных фракций белков Pkb1, Pkb2, Pkb5 и Pkb6 показало, что весь целевой белок находился в осадке (накапливался в клетках в виде нерастворимых телец включения), данные белки можно выделять только в денатурирующих условиях с последующим рефолдингом.

**Выделение белков каталитических доменов протеинкиназ Pkb3 и Pkb4 из растворимой фракции.** С целью повышения растворимости исследуемых белков Pkb3 и Pkb4 были изменены условия культивирования штаммов *E. coli*, содержащих рекомбинантные плазмиды рЕТ32а:*pkb3* и рЕТ32а:*pkb4*: при проведении индукции ИПТГ температура была снижена с 28 до 26°, а



**Рис. 1.** Электрофореграмма фракций белков штамма *E. coli* BL21(DE3)pLysS, содержащего плазмиды рЕТ32а:рkb1–рЕТ32а:рkb6: 1–3 – Pkb1, 4–6 – Pkb2, 7–9 – Pkb3, 10–12 – Pkb4, 13–15 – Pkb5, 16–18 – Pkb6; 1, 4, 7, 10, 13, 16 – контроли экспрессии; 2, 5, 8, 11, 14, 17 – лизаты; 3, 6, 9, 12, 15, 18 – осадки (тельца включения); М – маркер молекулярного веса белков SM0441 («Fermentas», Литва)

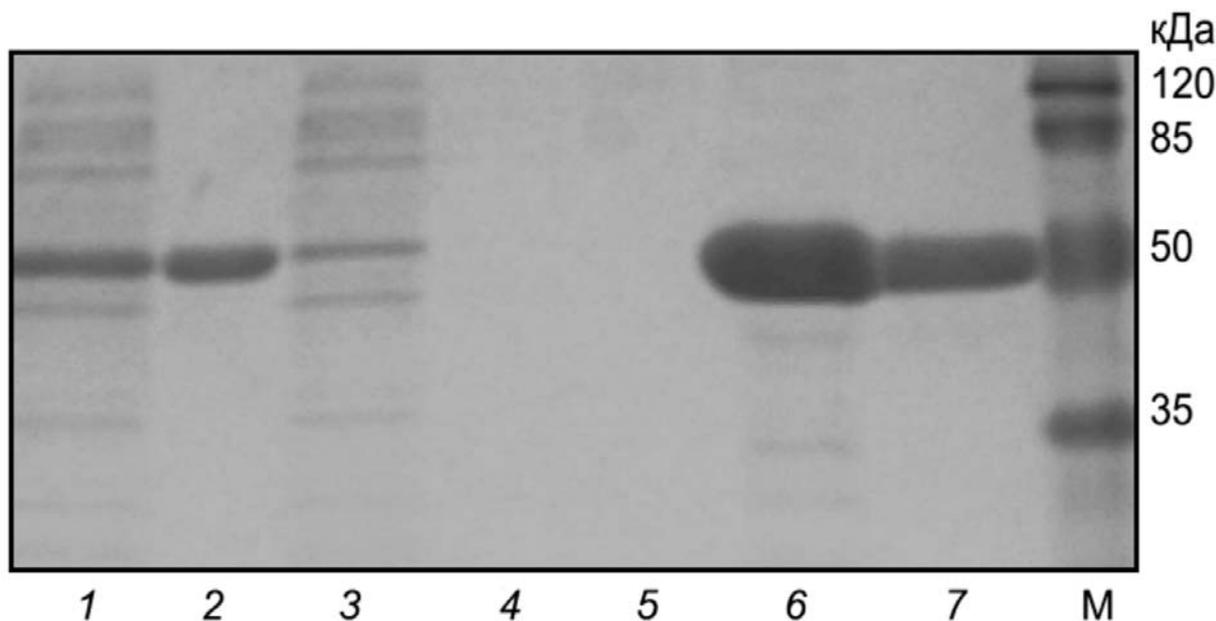
время выращивания при индукции сокращено до 5 ч. В данных условиях выращивания культуры при выделении белков уже >70% белка переходило в растворимую фракцию.

В оптимизированных условиях проводили выращивание штаммов *E. coli*, содержащих рекомбинантные плазмиды, в 250 мл среды. Для выделения белков использовали набор Ni-NTA Fast Start Kit (6). Все последующие операции по выделению белков проводили при 4°. Осадок ресуспендировали в 15 мл нативного лизирующего буфера с добавлением лизоцима и 2-меркаптоэтанол, инкубировали при 4° в течение 1 ч. Затем подвергали ультразвуковой дезинтеграции в течение 4 мин, не допуская нагревания раствора, и центрифугировали (7500 об/мин, 6600 г, 30 мин, 4°) для осаждения клеточных обломков. Лизаты наносили на колонки, предварительно уравновешенные лизирующим буфером, колонку трижды промывали промывочным буфером (50 мМ Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 мМ Tris-HCl, 300 мМ NaCl, 50 мМ имидазол, 1 мМ ФМСФ, 5 мМ ДТТ, pH 8,0). Связавшиеся белки дважды элюировали с колонок буфером, содержащим 300 мМ имидазол.

На рис. 2 представлена электрофореграмма этапов выделения и очистки белка каталитического домена Pkb3. Выход белков Pkb3 и Pkb4 из 250 мл культуральной жидкости составлял  $11,6 \pm 1,5$  и  $28 \pm 3$  мг соответственно, чистота выделенных белков – не менее 98%. Масс-спектрометрический анализ подтвердил, что выделенные белки являются белками каталитических доменов протеинкиназ Pkb3 и Pkb4 *B. longum*.

**Выделение каталитических доменов протеинкиназ Pkb1, Pkb2, Pkb5 и Pkb6 из нерастворимой фракции.** Выделение данных белков проводили

в денатурирующих условиях. Для отработки условий лизиса штаммы *E. coli*, содержащие рекомбинантные плазмиды рЕТ32а:рkb1, рЕТ32а:рkb2, рЕТ32а:рkb5 и рЕТ32а:рkb6, выращивали с индукцией 1 мМ ИПТГ в 15 мл среды ТВ, содержащей хлорамфеникол и ампициллин. Клетки, собранные центрифугированием (5000 об/мин, 2935 г, 10 мин, 4°), ресуспендировали в 3 мл денатурирующего лизирующего буфера (8 М мочевины, 100 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 мМ Tris-HCl, pH 8,0) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Однако после разделения полученного лизата на растворимую и нерастворимую фракции все белки находились в осадке, что сильно затрудняло их последующую очистку и ренатурацию. Наиболее простым из известных способов повышения лизиса является увеличение времени лизиса до трех и более часов и проведение последующей обработки ультразвуком. В этих условиях белки переходили в растворимую фракцию, но не связывались с Ni-агарозой колонки. В связи с этим концентрация мочевины во всех буферных растворах была снижена до 6 М. Клетки, собранные центрифугированием 250 мл культуральной жидкости, ресуспендировали в 15 мл денатурирующего лизирующего буфера (6 М мочевины, 100 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 мМ Tris-HCl, pH 8,0) и инкубировали при комнатной температуре в течение 2,5 ч, обрабатывали ультразвуком в течение 4 мин и центрифугировали (7500 об/мин, 6600 г, 30 мин, 4°), затем лизат наносили на колонку, предварительно уравновешенную лизирующим буфером, содержащим 6 М мочевины. Колонку трижды промывали денатурирующим промывочным буфером (6 М мочевины, 100 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 мМ Tris-HCl,



**Рис. 2.** Электрофореграмма этапов выделения и очистки белка каталитического домена Pkb3: 1 – лизат, 2 – осадок, 3 – «проскок», 4 – промывка 1, 5 – промывка 2, 6 – элюция 1, 7 – элюция 2, М – маркер молекулярного веса белков SM0441 («Fermentas», Литва)

50 мМ имидазол, рН 5,3). Связавшиеся белки дважды элюировали с колонок денатурирующим буфером с 6 М мочевиной, содержащим 300 мМ имидазол.

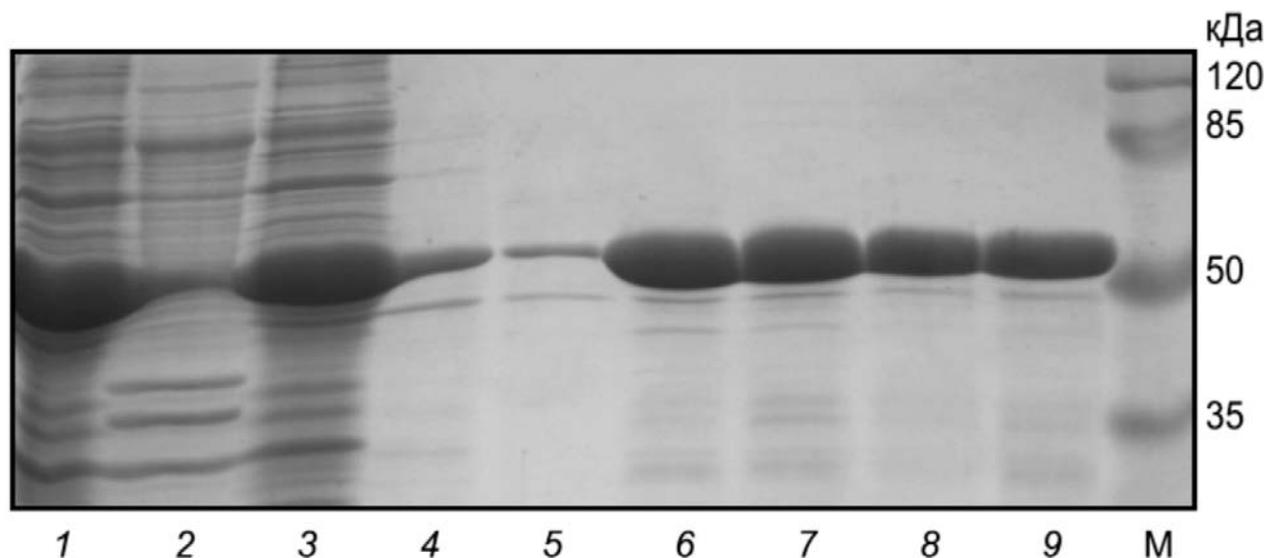
В таких условиях был выделен белок каталитического домена протеинкиназы Pkb5 в чистом виде. Выделенный белок восстанавливали 2-меркаптоэтанолом и ренатурировали диализом против буфера (1,5 М мочевины, 50 мМ Tris HCl, 200 мМ NaCl, 10%-ный глицерин, рН 8,0). Выход белка Pkb5 из 250 мл культуральной жидкости составлял  $10 \pm 1$  мг, чистота выделенного белка – не менее 98% (рис. 3). Масс-спектрометрический анализ подтвердил, что выделенный белок является каталитическим доменом протеинкиназы Pkb5 *B. longum*.

Каталитические домены протеинкиназ Pkb1, Pkb2 и Pkb6 не удалось выделить в денатурирующих условиях методом, разработанным для Pkb5. Для белков Pkb1, Pkb2 и Pkb6 был разработан метод выделения белков из тельц включения. Клетки ресуспендировали в 15 мл лизирующего буфера с добавлением лизоцима, 2-меркаптоэтанолу и 0,3%-ного Тритона Х-100 (для повышения растворимости) в течение 1 ч, обрабатывали ультразвуком в течение 4 мин и центрифугировали (7500 об/мин, 6600 g, 30 мин, 4°). Полученные тельца включения дважды промывали 10 мл лизирующего буфера с добавлением 0,5%-ного Тритона Х-100, обрабатывали ульт-

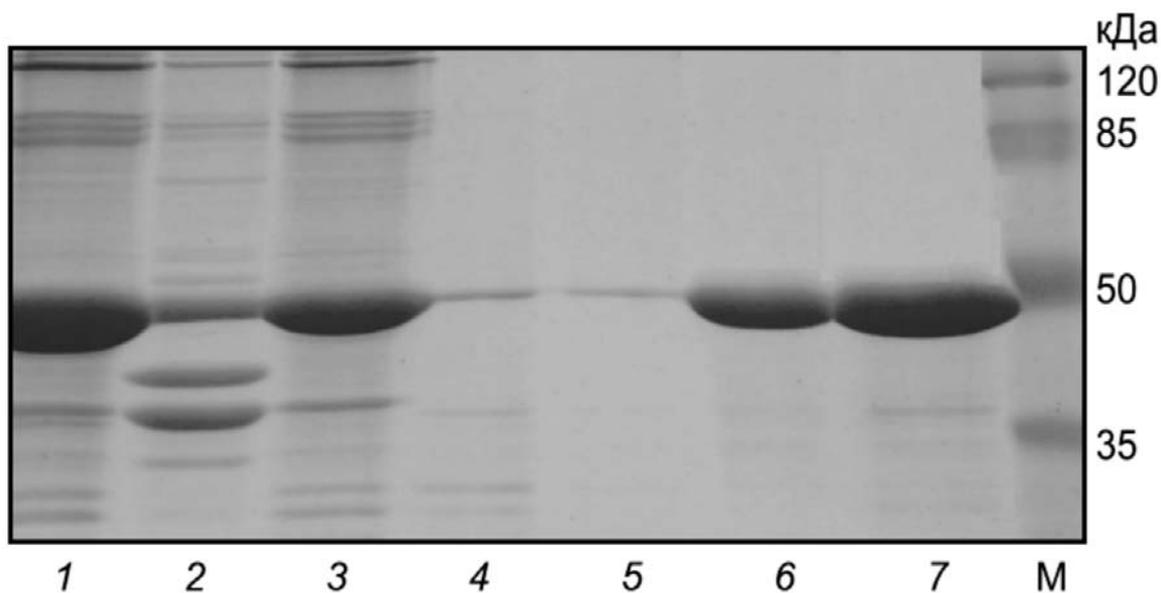
развуком в течение 2 мин и центрифугировали (7500 об/мин, 6600 g, 30 мин, 4°). Затем тельца включения ресуспендировали в 15 мл денатурирующего лизирующего буфера с 6 М мочевиной, инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин и центрифугировали при тех же условиях, лизат наносили на колонку, предварительно уравновешенную денатурирующим лизирующим буфером. Колонку трижды промывали денатурирующим промывочным буфером (6 М мочевины, 100 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 мМ Tris-HCl, 50 мМ имидазол, рН 5,3). Связавшиеся белки дважды элюировали с колонок денатурирующим буфером с 6 М мочевиной, содержащим 300 мМ имидазол. Выделенные белки восстанавливали 2-меркаптоэтанолом и ренатурировали диализом в описанных выше условиях.

На рис. 4 представлена электрофореграмма этапов выделения и очистки белка каталитического домена Pkb2. Выход белков Pkb1, Pkb2 и Pkb6 из 250 мл культуральной жидкости составлял  $8,0 \pm 1,0$ ,  $8,5 \pm 1,3$  и  $8,5 \pm 1,8$  мг соответственно, чистота выделенных белков – не менее 98%. Масс-спектрометрический анализ подтвердил, что выделенные белки являются каталитическими доменами протеинкиназ Pkb1, Pkb2 и Pkb6 *B. longum*.

**Исследование автофосфорилирования выделенных белков Pkb1, Pkb3, Pkb4, Pkb6.** Первым



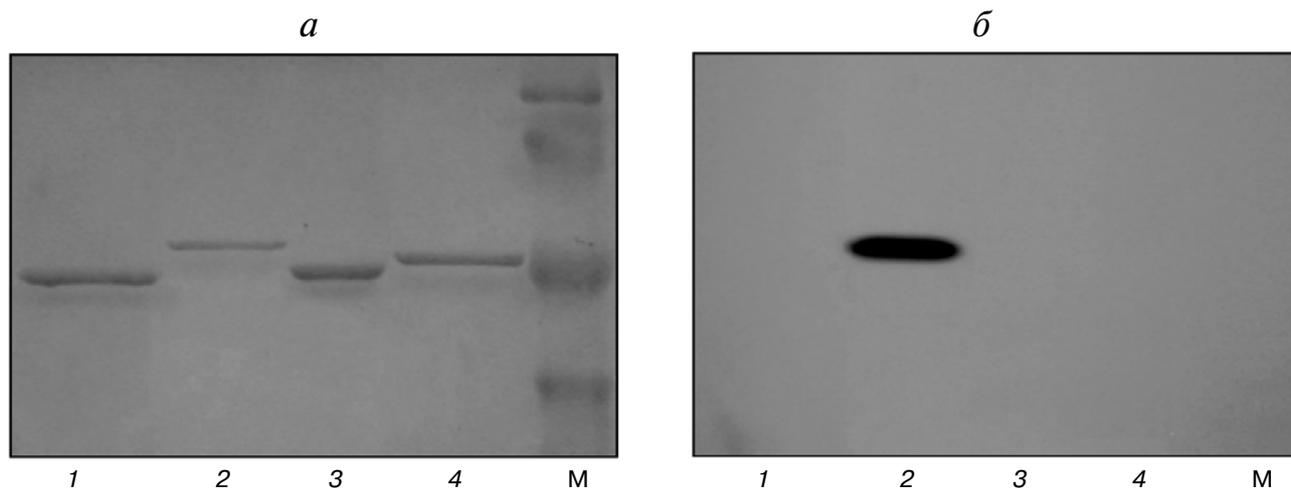
**Рис. 3.** Электрофореграмма этапов выделения и очистки белка каталитического домена Rkb5 в денатурирующих условиях: 1 – лизат, 2 – осадок, 3 – «проскок», 4 – промывка 1, 5 – промывка 2, 6 – элюция 1, 7 – элюция 2, 8 – элюция 3, 9 – проба после диализа, М – маркер молекулярного веса белков SM0441 («Fermentas», Литва)



**Рис. 4.** Электрофореграмма этапов выделения и очистки белка каталитического домена Rkb2 из телец включения: 1 – осадок, 2 – лизат, 3 – «проскок», 4 – промывка 1, 5 – промывка 2, 6 – элюция 1, 7 – элюция 2, М – маркер молекулярного веса белков SM0441 («Fermentas», Литва)

этапом функционирования многих бактериальных СТПК в клетке является автофосфорилирование собственной молекулы [35–37]. Ранее мы показали способность к автофосфорилированию для двух СТПК (Rkb2 и Rkb5) из шести исследуемых в настоящей работе [4]. В данной работе мы исследовали способность к автофос-

форилированию у четырех оставшихся СТПК с использованием двух подходов: инкубацией с  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  и люминесцентной реакции. Белки инкубировали с  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  в буферном растворе, затем проводили электрофорез меченых белков в SDS-ПААГ (рис. 5, а). Для регистрации меченых белков полученный SDS-ПААГ экспо-



**Рис. 5.** Автофосфорилирование каталитических доменов протеинкиназ с использованием  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ . *a* – Электрофореграмма автофосфорилированных белков протеинкиназ: 1 – Pkb1, 2 – Pkb3, 3 – Pkb4, 4 – Pkb6, М – маркер молекулярного веса белков SM0441 («Fermentas», Литва); *б* – радиоавтограф автофосфорилированных протеинкиназ

нировали с рентгеновской пленкой KODAK MXG Film (100sh) (рис. 5, б).

Полученные результаты демонстрируют способность белка каталитического домена протеинкиназы Pkb3 к автофосфорилированию. Автофосфорилирование у белков каталитических доменов протеинкиназ Pkb1, Pkb4 и Pkb6 в данных условиях не обнаружено.

Исследование автофосфорилирования белков Pkb1, Pkb3, Pkb4 и Pkb6 проводили также с помощью люминесцентной реакции по количеству АТР, оставшегося в ходе реакции. Степень автофосфорилирования каталитического домена протеинкиназы Pkb3 при количестве 5 мкг на точку составляла 25%, 10 мкг на точку – 43%, 20 мкг на точку – 70%, показывая линейную зависимость (табл. 2). В ходе реакции автофосфо-

рирования белков каталитических доменов протеинкиназ Pkb1, Pkb4 и Pkb6 количество оставшегося АТР не отличалось от количества оставшегося АТР в контрольной пробе.

Способность к автофосфорилированию была обнаружена только у белка каталитического домена протеинкиназы Pkb3. Обобщая данные, полученные авторами в ранее опубликованной [4] и представленной работах, из шести СТПК в совокупности нам удалось показать способность к автофосфорилированию только для трех протеинкиназ: Pkb2, Pkb3 и Pkb5.

Наиболее хорошо исследованы свойства СТПК микобактерий. Штаммы *M. tuberculosis* содержат 11 серин-треониновых протеинкиназ эукариотического типа. Все протеинкиназы *M. tuberculosis* были клонированы в *E. coli* (каталитический домен и/или полноразмерный белок), для каждой протеинкиназы на основе индивидуального подхода был выбран вектор для клонирования, оптимизированы условия экспрессии и отобран экспрессионный штамм, разработаны методы выделения белков в нативных или денатурирующих условиях с оптимизацией условий ренатурации. Для белков всех протеинкиназ *M. tuberculosis* было показано автофосфорилирование [35–41].

В настоящей работе оптимизированы условия выращивания штаммов *E. coli* для выделения белков протеинкиназ, разработаны методы выделения белков каталитических доменов шести протеинкиназ *B. longum* в препаративном количестве: нативных белков Pkb3 и Pkb4, белка Pkb5

**Таблица 2.** Исследование автофосфорилирования протеинкиназы Pkb3

Количество СТПК в реакционной смеси, мкг	Количество АТР, оставшегося после киназной реакции, %	Автофосфорилирование СТПК, %
5	75 ± 3	25 ± 3
10	57 ± 2	43 ± 2
20	30 ± 7	70 ± 7

Примечание. Приведены усредненные результаты четырех независимых измерений ± s.d.

в денатурирующих условиях, белков Pkb1, Pkb2 и Pkb6 из телец включения. Оптимизированы условия проведения диализа для ренатурации белков, выделенных из нерастворимой фракции.

Представленные исследования по оптимизации методов выделения белков каталитических

доменов шести протеинкиназ *B. longum* в препаративных количествах открывают новые возможности для изучения структуры и функции белков серин-треониновых протеинкиназ актинобактерий: получению трехмерной структуры белков и поиску субстратов для протеинкиназ *B. longum*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pereira, S.F., Goss, L., and Dworkin, J. (2011) Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **75**, 192–212.
- Zakharevich, N.V., Osolodkin, D.I., Artamonova, I.I., Palyulin, V.A., Zefirov, N.S., and Danilenko, V.N. (2012) Signatures of the ATP binding pocket as a basis for structural classification of the serine/threonine protein kinases of gram-positive bacteria, *Proteins*, **80**, 1363–1376.
- Petricikova, K., and Petricek, M. (2003) Eukaryotic-type protein kinases in *Streptomyces coelicolor*: variations on a common theme, *Microbiology*, **149**, 1609–1621.
- Nezametdinova, V.Z., Zakharevich, N.V., Alekseeva, M.G., Averina, O.V., Mavletova, D.A., and Danilenko, V.N. (2014) Identification and characterization of the serine/threonine protein kinases in *Bifidobacterium*, *Arch. Microbiol.*, **196**, 125–136.
- Chao, J., Wong, D., Zheng, X., Poirier, V., Bach, H., Hmama, Z., and Av-Gay, Y. (2010) Protein kinase and phosphatase signaling in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and pathogenesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 620–627.
- Ruggiero, A., De Simone, P., Smaldone, G., Squeglia, F., and Berisio, R. (2012) Bacterial cell division regulation by Ser/Thr kinases: a structural perspective, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **13**, 756–766.
- Alber, T. (2009) Signaling mechanisms of the *Mycobacterium tuberculosis* receptor Ser/Thr protein kinases, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **19**, 650–657.
- Kobir, A., Shi, L., Boskovic, A., Grangeasse, C., Franjevic, D., and Mijakovic, I. (2011) Protein phosphorylation in bacterial signal transduction, *Biochim. Biophys. Acta*, **1810**, 989–994.
- Burnside, K., and Rajagopal, L. (2012) Regulation of prokaryotic gene expression by eukaryotic-like enzymes, *Curr. Opin. Microbiol.*, **15**, 125–131.
- Fernandez, P., Saint-Joanis, B., Barilone, N., Jackson, M., Gicquel, B., Cole, S.T., and Alzari, P.M. (2006) The Ser/Thr protein kinase PknB is essential for sustaining mycobacterial growth, *J. Bacteriol.*, **188**, 7778–7784.
- Gomez-Velasco, A., Bach, H., Rana, A.K., Cox, L.R., Bhatt, A., Besra, G.S., and Av-Gay, Y. (2013) Disruption of the serine/threonine protein kinase H affects phthiocerol dimycocerosates synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*, *Microbiology*, **159**, 726–736.
- Reck, M., Rutz, K., Kunze, B., Tomasch, J., Surapaneni, S.K., Schulz, S., and Wagner-Dobler, I. (2011) The biofilm inhibitor carolacton disturbs membrane integrity and cell division of *Streptococcus mutans* through the serine/threonine protein kinase PknB, *J. Bacteriol.*, **193**, 5692–5706.
- Shah, I.M., Laaberki, M.-H., Popham, D.L., and Dworkin, J. (2008) A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments, *Cell*, **135**, 486–496.
- Kumar, D., and Narayanan, S. (2012) PknE, a serine/threonine kinase of *Mycobacterium tuberculosis* modulates multiple apoptotic paradigms, *Infect. Genet. Evol.*, **12**, 737–747.
- Kumar, D., Palaniyandi, K., Challu, V.K., Kumar, P., and Narayanan, S. (2013) PknE, a serine/threonine protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis* has a role in adaptive responses, *Arch. Microbiol.*, **195**, 75–80.
- Lougheed, K.E., Osborne, S.A., Saxty, B., Whalley, D., Chapman, T., Bouloc, N., Chugh, J., Nott, T.J., Patel, D., Spivey, V.L., Kettleborough, C.A., Bryans, J.S., Taylor, D.L., Smerdon, S.J., and Buxton, R.S. (2011) Effective inhibitors of the essential kinase PknB and their potential as anti-mycobacterial agents, *Tuberculosis (Edinburgh)*, **91**, 277–286.
- Danilenko, V.N., Osolodkin, D.I., Lakatos, S.A., Preobrazhenskaya, M.N., and Shtil, A.A. (2011) Bacterial eukaryotic type serine-threonine protein kinases: from structural biology to targeted anti-infective drug design, *Curr. Top. Med. Chem.*, **11**, 1352–1369.
- Ventura, M., O'Flaherty, S., Claesson, M.J., Turrioni, F., Klaenhammer, T.R., van Sinderen, D., and O'Toole, P.W. (2009) Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics, *Nat. Rev. Microbiol.*, **7**, 61–71.
- Reid, G., Younes, J.A., Van der Mei, H.C., Gloor, G.B., Knight, R., and Busscher, H.J. (2011) Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities, *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**, 27–38.
- Avershina, E., Storro, O., Oien, T., Johnsen, R., Wilson, R., Egeland, T., and Rudi, K. (2013) Bifidobacterial succession and correlation networks in a large unselected cohort of mothers and their children, *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 497–507.
- Turrioni, F., Peano, C., Pass, D.A., Foroni, E., Severgnini, M., Claesson, M.J., Kerr, C., Hourihane, J., Murray, D., Fuligni, F., Gueimonde, M., Margolles, A., De Bellis, G., O'Toole, P.W., van Sinderen, D., Marchesi, J.R., and Ventura, M. (2012) Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota, *PLoS One*, **7**, e36957.
- Borre, Y.E., O'Keefe, G.W., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2014) Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders, *Trends. Mol. Med.*, **20**, 509–518.
- Diaz Heijtz, R., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Bjorkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M.L., Forssberg, H., and Pettersson, S. (2011) Normal gut microbiota modulates brain development and behavior, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 3047–3052.
- Savignac, H.M., Tramullas, M., Kiely, B., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2015) Bifidobacteria modulate cognitive processes in an anxious mouse strain, *Behav. Brain Res.*, **287**, 59–72.
- Hidalgo-Cantabrana, C., Lopez, P., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilan, C.G., Suarez, A., Margolles, A., and Ruas-Madiedo, P. (2012) Immune modulation capability of exopolysaccharides synthesised by lactic acid bacteria and bifidobacteria, *Probiotics Antimicro. Prot.*, **4**, 227–237.
- Hirayama, Y., Sakanaka, M., Fukuma, H., Murayama, H., Kano, Y., Fukiya, S., and Yokota, A. (2012) Development of a double-crossover markerless gene deletion system in

- Bifidobacterium longum*: functional analysis of the  $\alpha$ -galactosidase gene for raffinose assimilation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 4984.
27. Sakaguchi, K., He, J., Tani, S., Kano, Y., and Suzuki, T. (2012) A targeted gene knockout method using a newly constructed temperature-sensitive plasmid mediated homologous recombination in *Bifidobacterium longum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **95**, 499–509.
  28. Zakharevich, N.V., Averina, O.V., Klimina, K.M., Kudryavtseva, A.V., Kasianov, A.S., Makeev, V.J., and Danilenko, V.N. (2015) Complete genome sequence of *Bifidobacterium longum* GT15: identification and characterization of unique and global regulatory genes, *Microb. Ecol.*, in press.
  29. Averina, O.V., Nezametdinova, V.Z., Alekseeva, M.G., and Danilenko, V.N. (2012) Genetic instability of probiotic characteristics in the *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* B379M strain during cultivation and maintenance, *Russ. J. Genet.*, **48**, 1103–1111.
  30. Mierendorf, R., Yeager, K., and Novy, R. (1994) Innovations, *Newsletter Novagen*, **1**, 1–3.
  31. Calik, P., and Levent, H. (2009) Effects of pretreated beet molasses on benzaldehyde lyase production by recombinant *Escherichia coli* BL21(DE3)pLySs, *J. Appl. Microbiol.*, **107**, 1536–1541.
  32. Sambrook, J., Fritsch, E.E., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  33. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
  34. Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen J.V., and Mann, M. (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes, *Nat. Protoc.*, **1**, 2856–2860.
  35. Damle, N.P., and Mohanty, D. (2014) Mechanism of autophosphorylation of mycobacterial PknB explored by molecular dynamics simulations, *Biochemistry*, **53**, 4715–4726.
  36. Molle, V., Brown, A.K., Besra, G.S., Cozzone, A.J., and Kremer, L. (2006) The condensing activities of the *Mycobacterium tuberculosis* type II fatty acid synthase are differentially regulated by phosphorylation, *J. Biol. Chem.*, **281**, 30094–30103.
  37. Thakur, M., Chaba, R., Mondal, A.K., and Chakraborti, P.K. (2008) Interdomain interaction reconstitutes the functionality of PknA, a eukaryotic type Ser/Thr kinase from *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Biol. Chem.*, **283**, 8023–8033.
  38. Duran, R., Villarino, A., Bellinzoni, M., Wehenkel, A., Fernandez, P., Boitel, B., Cole, S.T., Alzari, P.M., and Cervenansky, C. (2005) Conserved autophosphorylation pattern in activation loops and juxtamembrane regions of *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr protein kinases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **333**, 858–867.
  39. Lakshminarayan, H., Narayanan, S., Bach, H., Sundaram, K.G., and Av-Gay, Y. (2008) Molecular cloning and biochemical characterization of a serine threonine protein kinase, PknL, from *Mycobacterium tuberculosis*, *Protein Express. Purif.*, **58**, 309–317.
  40. Gopalswamy, R., Narayanan, P.R., and Narayanan, S. (2004) Cloning, overexpression, and characterization of a serine/threonine protein kinase pknI from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Protein Express. Purif.*, **36**, 82–89.
  41. Av-Gay, Y., Jamil, S., and Drews, S.J. (1999) Expression and characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinase PknB, *Infect. Immun.*, **67**, 5676–5682.

## ISOLATION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT PROTEINS SERINE-THREONINE KINASES OF STRAIN *Bifidobacterium longum* B379M AND STUDY OF THEIR ACTIVITY

**M. G. Alekseeva, D. A. Mavletova, N. V. Kolchina,  
V. Z. Nezametdinova, V. N. Danilenko\***

*N. I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy  
of Sciences, ul. Gubkina 3, Moscow 119991, Russia;  
fax: +7(499)132-8962, E-mail: valerid@rutenia.ru*

Received June 17, 2015  
Revision received July 2, 2015

Earlier in the laboratory of genetics of microorganisms, six serine/threonine protein kinases (STPK) of *Bifidobacterium* were identified and named Pkb1–Pkb6. In the present study, the methods of isolation of six STPK catalytic domains of the proteins of *B. longum* B379M were optimized. The method of isolation Pkb3 and Pkb4 in native conditions, the method of isolation Pkb5 in denaturing conditions, and the method of isolation Pkb1, Pkb2, and Pkb6 from inclusion bodies were developed. The dialysis conditions for renaturation of the proteins were optimized. All of the enzymes were isolated in quantities sufficient for study of protein activity. The proteins were homogeneous according to SDS-PAGE. The autophosphorylation ability of Pkb1, Pkb3, Pkb4, and Pkb6 was investigated in the first time. Autophosphorylation was detected only for the Pkb3 catalytic domain protein.

**Key words:** serine/threonine protein kinase, isolation and purification of proteins, autophosphorylation