

ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *rel* ИЗ *Mycobacterium smegmatis* НА АКТИВНОСТЬ *rpoS-lacZ*-СЛИЯНИЯ В *Escherichia coli*

Гуанозинтетрафосфат (ppGpp) является важной регуляторной молекулой бактерий, вовлеченной в процессы стринджент-ответа, регуляции персистенции, адаптации к стрессу, патогенности. Белок Rel из *Mycobacterium smegmatis* ответственен за синтез и деградацию ppGpp. Исследование посвящено детекции внутриклеточного уровня гуанозинтетрафосфата при помощи генного слияния ppGpp-зависимого гена *rpoS* с репортерным *lacZ* применительно к штамму с экспрессионной плазмидой pMind::rel. Использованный метод оценки позволяет количественно определять низкие концентрации гуанозинтетрафосфата, что трудно выполнимо при использовании методов аналитической химии. На данный момент метод не разработан для микобактерий, поэтому возникает потребность в использовании подходов анализа микобактериальных ppGpp-синтеза на кишечной палочке. В рамках исследования была сконструирована микобактериальная экспрессионная плазмида pMind с вставкой *rel* из *Mycobacterium smegmatis*. Полученная плазмида и исходный вектор были трансформированы в штамм со слиянием *rpoS-lacZ*. Культуры сравнивались путем измерения активности β -галактозидазы.

В штамме *Escherichia coli*, несущем плазмиду pMind с вставкой *rel*, было отмечено увеличение экспрессии *rpoS* по сравнению с контролем с плазмидой без вставки. Добавка индуктора экспрессии pMind тетрациклина не оказывала влияния на экспрессию *rpoS*.

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о наличии экспрессии с промотора *tetA* в экспрессионной плазмиде pMind и сохранении ферментативной активности белка Rel из *Mycobacterium smegmatis* в *Escherichia coli*. Отсутствие тетрациклиновой индукции может являться следствием неспособности репрессора TetR из pMind связываться с регуляторными участками в *Escherichia coli*.

Ключевые слова: гуанозинтетрафосфат, персистенция, экспрессионная плазмида pMind.

Продукт гена *rel* у микобактерий является основным белком, синтезирующим или расщепляющим гуанозинтетрафосфат (ppGpp). ppGpp – регуляторная молекула бактерий, вовлеченная в процессы стринджент-ответа, персистенции, адаптации к различным видам стресса. Способность микобактерий персистировать в человеческом организме – это значительная преграда в борьбе с туберкулезом, ограничивающая применение как лекарственных препаратов, так и вакцин [4].

Микобактериальный белок Rel в значительной степени гомологичен ppGpp-синтезамам *Escherichia coli*, последовательность аминокислот которых кодируется двумя генами – *relA* и *spoT*. Их продукты выполняют схожие функции в кишечной палочке: ответственны за стринджент-ответ, регуляцию персистенции, устойчивость к антибиотикам, вирулентность, выживание в организме хозяина [6].

Возрастание внутриклеточной концентрации ppGpp в условиях стресса повышает избирательность связывания альтернативных субъединиц с

кор-ферментом РНК-полимеразы, в частности σ^S или RpoS, ответственной за экспрессию генов адаптации к стационарной фазе, голоданию и многим другим стрессорным воздействиям [2]. Кроме того, гуанозинтетрафосфат индуцирует также транскрипцию σ^S , которая, таким образом, проявляет зависимость от ppGpp [5].

Это свойство в некоторых случаях используется для оценки внутриклеточного содержания гуанозинтетрафосфата, так как базовый уровень его концентрации с трудом определяется методами аналитической химии. В то время, транскрипция ppGpp-зависимых генов точно характеризует внутриклеточное содержание этой регуляторной молекулы [7].

Для оценки экспрессии можно использовать слияния промотора гена *rpoS* и последовательности репортерного гена, экспрессия которого, в свою очередь, определяется путем измерения ферментативной активности его белковых продуктов [7].

Поэтому для проверки функциональности экспрессионной шаттл-плазмиды pMind [3],

которая содержит вставку кодирующей последовательности гена *rel* из *Mycobacterium smegmatis*, она была трансформирована в штамм кишечной палочки, несущий трансляционное слияние промотора гена *rpoS* и последовательности гена *lacZ*, кодирующего β-галактозидазу *Escherichia coli* [9].

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования использованы штаммы *Escherichia coli* и *Mycobacterium smegmatis* (см. табл. 1).

В целях исследования функций белка Rel *M. smegmatis* был сконструирован экспрессионный шаттл-вектор pMind со вставкой кодирующей последовательности гена *rel_{Msm}*. Последовательность белка была взята из базы данных BioСус [11]. На ее основе были сконструированы праймеры *rel Msm Nde* и *rel Msm Pac* (см. табл. 2), фланкирующие кодирующий регион гена и несущие сайты для рестриктаз NdeI и PacI (Thermo Scientific).

Далее при помощи этих праймеров и высокоточной ДНК-полимеразы Phusion (Thermo Scientific) была проведена ПЦР на матрице *M. smegmatis* mc²155 и амплифицирован фрагмент

ДНК (98°C 30"; 98°C 10" 72°C 90" 35x; 72°C 5'), который затем был очищен от компонентов ПЦР.

После инкубирования при 72°C в течение 30 минут в присутствии Taq-полимеразы (Thermo Scientific) и 0,2 mM dATP были добавлены адениловые липкие хвосты. Амплифицированный фрагмент ДНК был клонирован в промежуточный вектор pTZ57R при помощи InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific). Полученная плаزمида pTZ57R::*rel_{Msm}* была секвенирована при помощи праймеров, указанных в таблице 2. Замен обнаружено не было.

Плазмиды pMind и pTZ57R::*rel_{Msm}* были выделены из *E. coli* BMH pMind и BMH pTZ57R::*rel_{Msm}* методом щелочного лизиса [8], специфически расщеплены рестриктазами NdeI и PacI в присутствии буфера O и буфера PacI (Thermo Scientific) соответственно в течение 14 часов при 37°C. Фрагменты линейной ДНК длиной около 6 т. п. о. и 2,4 т. п. о. были выделены при помощи гель-электрофореза (BioRad, 90V, 1 час).

Вектор pMind и вставка *rel_{Msm}* с липкими концами были смешаны в соотношении 1:2 и подвергнуты обработке T4 ДНК-лигазой (Thermo Scientific) при 4°C в течение ночи.

Таблица 1 – Штаммы и плазмиды, использованные в работе

| Штамм | Генотип или описание |
|---------------------------------------|---|
| <i>Escherichia coli</i> | |
| BMH | <i>thi, supE, Δ(lac-proAB), [F', proAB, lacI^qZAM15]</i> |
| BMH pTZ57R:: <i>rel_{Msm}</i> | BMH, но pTZ57R:: <i>rel_{Msm}</i> |
| BMH pMind | BMH, но pMind |
| BMH pMind:: <i>rel_{Msm}</i> | BMH, но pMind:: <i>rel_{Msm}</i> |
| RO91 | <i>F' araD139 Δ(argF-lac)U169 deoC1 rpsL150 relA1 flbB5301 ptsF25 rbsR λRZ5 [rpoS742::lacZ^{hybr}] Am^R</i> |
| RO91 pMind | RO91, но pMind |
| RO91 pMind:: <i>rel_{Msm}</i> | RO91, но pMind:: <i>rel_{Msm}</i> |
| <i>Mycobacterium smegmatis</i> | |
| mc ² 155 | ATCC 607, но <i>ept</i> |
| Плазмиды | |
| pTZ57R:: <i>rel_{Msm}</i> | Промежуточный вектор с вставкой <i>rel_{Msm}</i> ; Am ^R |
| pMind | Экспрессионный микобактериальный шаттл-вектор; Km ^R , Hyg ^R |
| pMind:: <i>rel_{Msm}</i> | pMind, но <i>PtetA::rel_{Msm}</i> |

2 мкл лигазной смеси были смешаны с клетками *E. coli* ВМН и трансформированы при помощи Eppendorf Eporator согласно протоколу Mainiatis [8]. Спустя 1–2 часа культура высевалась на чашку с антибиотиком, был проведен отбор на устойчивость к канамицину (50 мкг/мл). Полученные штаммы проверены на устойчивость к гигромицину (50 мкг/мл) и к гигромицину с канамицином.

Очищенную плазмиду со вставкой анализировали при помощи гель-электрофореза (120V, 20 минут), рестрикционного анализа по сайтам BamHI а также при помощи ПЦР с праймерами Up pMind и Low pMind (табл. 2), амплифицирующими участок с сайтом клонирования.

Отсутствие замен нуклеотидов подтверждено при помощи секвенирования ДНК с праймеров, указанных в таблице 2.

Полученная плаزمид, а также плазмид без вставки были использованы для трансформации штамма *E. coli* RO91, несущего фаг λ с трансляционным слиянием *rpoS::lacZ*. Отбор производили по указанному выше способу, наличие слияния подтверждено ПЦР со специфичными праймерами *rpoS* Nde и Lowlink (см. табл. 2).

Полученный штамм RO91 pMind::*rel*_{Msm} сравнивали с контрольным RO91 pMind при помощи β -галактозидазной реакции с ОНФГ по Миллеру [1].

Перед экспериментом штаммы, сохраняемые на скошенном LB-агаре под слоем вазелина при +4°C, высевали на 5 мл питательной среды LB с добавлением соответствующих антибиотиков. После 6 часов культивирования в термостатируемом шейкере при 37°C клетки перено-

сили на 50 мл богатой среды LB в коническую колбу (250 мл) с добавлением антибиотиков. Культивировали 16 ч в термостатируемом шейкере при 37°C, 120 оборотов/мин. Далее для проведения эксперимента культуру переносили на 50 мл свежей среды, доводя плотность культуры на среде LB до OD600=0,1. Биомассу клеток оценивали после предварительного разведения культуры физиологическим раствором по оптической плотности при длине волны 600 нм на спектрофотометре.

Культуры для измерения β -галактозидазной активности отбирали после разведения через 2, 4, 6, 24, 48 и 72 часа и инкубировали при 28 °C в присутствии хромогенного субстрата для β -галактозидазы. Интенсивность желтой окраски продуктов β -галактозидазной реакции оценивали на спектрофотометре при длинах волн 420 и 550 нм.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета стандартных программ Statistica 5.0. Эксперимент имеет 4 повторности.

Результаты исследования и их обсуждение

Нами изучено влияние экспрессии гена *rel* из *Mycobacterium smegmatis* в шаттл-векторе pMind на активность трансляционного слияния промотора гена *rpoS*, кодирующего σ^S -субъединицу РНК-полимеразы *Escherichia coli*, и гена *lacZ*, кодирующего β -галактозидазу.

Уровень активности слияния в штамме RO91 с плазмидой со вставкой гена *rel*_{Msm} сравнивали с активностью слияния в штамме с плаз-

Таблица 2 – Олигонуклеотиды, использованные для ПЦР и секвенирования

| Праймер | Последовательность нуклеотидов |
|----------------|--|
| ПЦР | |
| rel Msm Nde | 5'-TCCATATGCTGGGCAGGAGGTGACA-3' |
| rel Msm Pac | 5'-CGCGTTAATTAACCGCTCGATCAGGC-3' |
| Up pMind | 5'-CCGGGCCCCGAGCAACACG-3' |
| Low pMind | 5'-CCGCAGGCTCGCGTAGGAATCATC-3' |
| rpoS Nde | 5'-GCCACCATATGAGTCAGAATACGCTGAAAGTT-3' |
| Lowlink | 5'-ACGCCGAGTTAACGCCATCAAAAA-3' |
| Секвенирование | |
| Up pMind | 5'-CCGGGCCCCGAGCAACACG-3' |
| Low pMind | 5'-CCGCAGGCTCGCGTAGGAATCATC-3' |
| rel Msm seq 1 | 5'-GCGATCCTGCACCCCAAGAAGTA-3' |
| rel Msm seq 2 | 5'-TCATCAAGCGCTGCAACGGAAGT-3' |

мидой без вставки. Результаты исследования показали, что штамм с вставкой имеет более высокий уровень экспрессии *rpoS*, чем штамм без вставки. Наибольшие различия наблюдались в стационарной фазе культуры (24, 48, 72 час) по сравнению с фазой экспоненциального роста (2, 4, 6 час) (рис. 1).

Исходя из этого, можно сделать вывод о наличии экспрессии с промотора гена *tetA* плазмиды pMind в *Escherichia coli*, а также о сохранении ppGrp-синтетазной активности микробактериального белка Rel.

Биомассу культуры оценивали по оптической плотности. Значимых различий между штаммами с плазмидой с вставкой *rel* и без вставки не обнаружено (рис. 2).

Дополнительно были проведены эксперименты по измерению активности *rpoS* в штамме с pMind:rel_{Msm} при добавке 10 и 20 ng/ml тетрациклина, индуктора экспрессии с промотора гена тетрациклиновой устойчивости *tetA* в сравнении с контролем без добавки. Значимых различий между культурами обнаружено не было, что предположительно является следствием неспособности

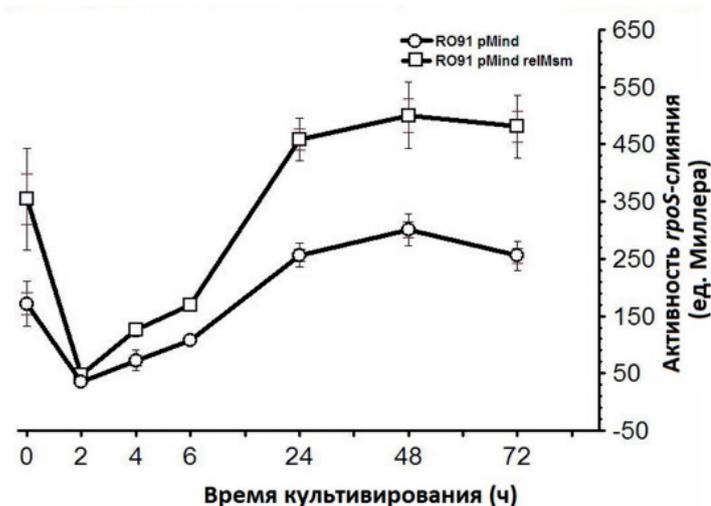


Рисунок 1 – Активность трансляционного *rpoS-lacZ* слияния в зависимости от времени культивирования в штаммах с плазмидой pMind с вставкой *rel* из *Mycobacterium smegmatis* и без вставки в *Escherichia coli*

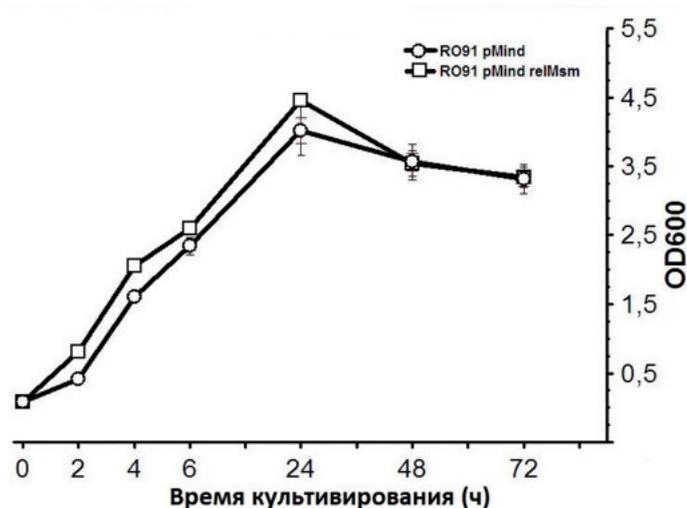


Рисунок 2 – Изменение оптической плотности культуры RO91 pMind в зависимости от времени культивирования

репрессора TetR из pMind связываться с регуляторными участками в *Escherichia coli*.

Способность белка Rel из *Mycobacterium smegmatis* проявлять ферментативную актив-

ность в *Escherichia coli* может быть связана с высокой степенью гомологии бактериальных ppGpp-синтетаз [10].

05.10.2017

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Пермского края в рамках научного проекта «р_а 16-44-590279», программы УрО РАН проект №15-4-4-1 и гранта РФФИ №16-35-00095 мол_а

Список литературы:

1. Миллер, Дж. Эксперименты в молекулярной генетике: пер. с англ. Зограф Ю.Н., Ильиной Т.С., Никифорова В.Г. под ред. Алиханяна С.И. – М.: Мир, 1976. – 436 с.
2. Ткаченко, А.Г. Молекулярные механизмы стрессорных ответов у микроорганизмов. – Екатеринбург: УрО РАН, 2012. – 107 с.
3. Tetracycline-inducible gene regulation in mycobacteria / M.C. Blokpoel [et al] // Nucleic Acids Res. - 2005. doi: 10.1093/nar/gni023
4. The relA Homolog of *Mycobacterium smegmatis* Affects Cell Appearance, Viability, and Gene Expression / J. Dahl [и др.] // J. of Bacteriol. – 2005. – Vol.187. – No7. – P. 2439-2447.
5. Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli* / T. Durfee [и др.] // J. Bacteriol. – 2007. – P.1084-1096.
6. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology / V.Haurlyuk [et al] // Nature Reviews Microbiology. – 2015. – P.1-12. doi:10.1038/nrmicro3448
7. Maisonneuve, E. (p)ppGpp Controls Bacterial Persistence by Stochastic Induction of Toxin-Antitoxin Activity / E. Maisonneuve, M. Castro-Camargo, K.M. Gerdes // Cell. – 2013. – Vol. 154. – P.1140-1150.
8. Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual / T. Maniatis, M.R. Green, J.Sambrook // Cold Spring Harbor Laboratory Press. – Изд. 4-е. – P.32-34, 84-87, 119-122.
9. Simons, R.W. Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions / R.W. Simons, F. Houman, N. Kleckner // Gene. – 1987. – Vol. 53. – No 1. – P.85-96.
10. Weiss, L.A. Essential Roles for *Mycobacterium tuberculosis* Rel beyond the Production of (p)ppGpp / L.A. Weiss, C.L. Stallings // J. of Bacteriol. – 2013. – Vol.195. – No. 24. – P.5629-5638.
11. BioCyc: Pathway/Genome Database Collection [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://biocyc.org>, свободный.

Сведения об авторах:

Сидоров Роман Юрьевич, лаборант-исследователь лаборатории адаптации микроорганизмов института Экологии и Генетики Микроорганизмов УрО РАН, студент 2 курса магистратуры кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета
614081 г. Пермь, ул. Голева, 13, тел.: (342) 212-21-59,
614990 г. Пермь, ул. Букирева, 15, тел.: (342) 2-396-501; e-mail: sidorowr@gmail.com

Ткаченко Александр Георгиевич, заведующий лабораторией адаптации микроорганизмов института Экологии и Генетики Микроорганизмов УрО РАН, профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета, доктор медицинских наук, профессор
614081 г. Пермь, ул. Голева, 13, тел.: (342) 212-21-59,
614990 г. Пермь, ул. Букирева, 15, тел.: (342) 2-396-501; e-mail: agtkachenko@iegm.ru