



УДК 577.152.342*153'135

ТЕСТ-СИСТЕМА НА ОСНОВЕ Lux-РЕГУЛОНА *Vibrio fischeri* ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МУТАНТНЫХ ФОРМ Lon-ПРОТЕИНАЗЫ *Escherichia coli*

© 1999 г. И. В. Манухов, Г. Е. Ерошников, Г. Б. Завильгельский[#], Л. М. Гинодман*, Э. Э. Мельников*, Т. В. Ротанова*, Н. Н. Старкова*, К. Б. Цирульников*

Государственный научный центр РФ ГНИИгенетика, 113545, Москва, 1-й Дорожный пр., д. 1;

* Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 12.10.98 г. Принята к печати 10.01.99 г.

Продемонстрирована возможность использования биолюминесцентного метода (Lux-тест) при исследовании функциональной активности *in vivo* Lon-протеиназы *E. coli* и ее мутантных форм. Тестирование основано на способности Lon-протеиназы специфически деградировать белок LuxR – положительный активатор транскрипции правого оперона *luxICDABE* морских бактерий *Vibrio fischeri*, и тем самым влиять на содержание люциферазы АВ в клетках. Выявлена корреляция между активностью мутантных Lon-протеиназ, определяемой *in vitro*, и интенсивностью биолюминесценции, измеренной при помощи Lux-теста.

Ключевые слова: Lon-протеиназа; ген *lon*; биолюминесценция; *lux*-гены; LuxR; регуляция транскрипции; *Escherichia coli*; *Vibrio fischeri*.

Ранее было показано [1], что Lon-протеиназа *E. coli* (КФ 3.4.21.53) специфически гидролизует LuxR, регуляторный белок *lux*-регулона морских бактерий *Vibrio fischeri*, активность которого определяет образование люциферазы LuxAB и ее субстрата. Это свойство Lon-протеиназы легло в основу создания биолюминесцентного метода тестирования ее активности.

Известно, что регулон *lux* морских бактерий *V. fischeri* состоит из двух групп генов (оперонов): 1) *luxR* и 2) *luxICDABE*. Транскрипция этих оперонов противоположно направлена с промоторов P_L и P_R , соответственно [2–4]. Ген *luxR* кодирует белок LuxR – активатор правого оперона; LuxR контролирует экспрессию генов *luxICDABE*, кодирующих, в свою очередь, следующие белки: а) синтетазу LuxI, ответственную за синтез аутоиндуктора (АИ) – *N*-(3-оксогексаноил)гомосеринлактона; б) α - и β -субъединицы люциферазы LuxAB и в) белки, ответственные за синтез субстрата люциферазы – тетрадекаальдегида [1]. Способностью связываться с регуляторным сайтом правого оперона и активировать транскрипцию с промотора P_R обладает только комплекс LuxR–АИ, характеризующийся высокой устойчивостью. В резуль-

тате синтезируется LuxI-синтетаза и начинается накопление в среде продукта ее функционирования – АИ, что приводит к увеличению содержания активной формы LuxR (в форме комплекса LuxR–АИ). Таким образом, в рассматриваемой системе регуляция осуществляется по принципу положительной обратной связи [5, 6]. Продуктом экспрессии генов правого оперона является люцифераза (LuxAB), функциональная активность которой определяет интенсивность биолюминесценции (Lux-тест).

Дегградация ключевого регуляторного белка LuxR *V. fischeri* в клетках *E. coli* свидетельствует об участии Lon-протеиназы в негативной регуляции транскрипции *lux*-оперона [1]. При этом показано, что изменение интенсивности биолюминесценции коррелирует с уровнем содержания активной Lon-протеиназы в клетках [1]. В настоящей работе демонстрируется возможность использования Lux-теста для оценки функциональной активности мутантных форм Lon-протеиназы, полученным методом направленного мутагенеза.

В первой серии экспериментов, проведенных при 28°C, была изучена зависимость интенсивности биолюминесценции суспензии клеток *E. coli* бактериальных штаммов АВ1157 (*lon*⁺-штамм) и АВ1899 *lon1* (*lon*⁻-штамм, далее в тексте – АВ1899), содержащих плазмиду рАС16 с полным *lux*-регулоном *V. fischeri*, от концентрации клеток

Сокращения: АИ – аутоиндуктор, *N*-(3-оксогексаноил)гомосеринлактон.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 315-37-29; e-mail: lab2@vnigen.msk.su).

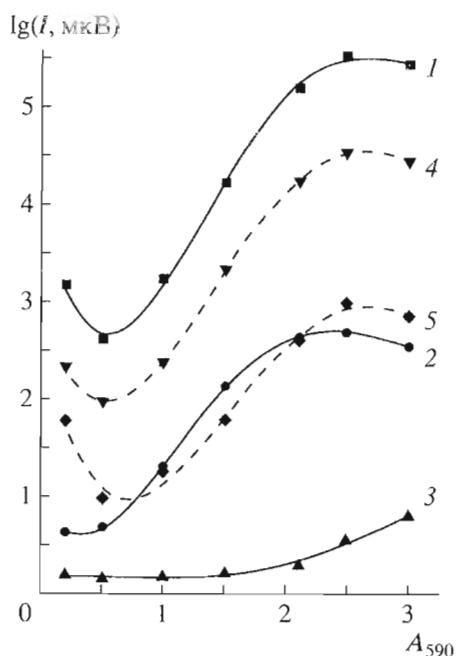


Рис. 1. Биолюминесценция суспензии клеток *E. coli* K12 AB1899 *lon1* (pAC16), содержащих плазмиды pBR327 (1, отрицательный контроль), pBRlon (3, положительный контроль), pBRlon-K362Q (4) и pBRlon-D423N (5). Кривая 2 соответствует биолюминесценции клеток штамма AB1157 *lon*⁺ (pAC16). По оси абсцисс — концентрация суспензии клеток, выраженная в единицах оптического поглощения; по оси ординат — интенсивность биолюминесценции в расчете на 200 мкл точной суспензии.

в процессе роста культуры. Как видно из рис. 1, интенсивность биолюминесценции клеток мутантного штамма AB1899 (кривая 1) на несколько порядков выше, чем у клеток дикого штамма AB1157 (кривая 2). Кроме того, у штамма AB1899 значительно сокращен характерный для штамма AB1157 лаг-период на кривой индукции свечения при малых и средних значениях оптической плотности. Введение плазмиды pBRlon, содержащей ген активной Lon-протеиназы (*lonA*), в клетки AB1899 (pAC16) практически полностью снимает эффект *lon1*-мутации (кривая 3). Более того, лаг-период на кривой индукции биолюминесценции у штамма AB1899 (pAC16, pBRlon) заметно увеличивается по сравнению с лаг-периодом у штамма AB1157 (pAC16), что может быть объяснено увеличением числа копий гена *lonA* в клетках, содержащих мультикопийную плазмиду pBRlon.

Для исследования мутантов Lon-протеиназы с помощью описанного выше Lux-теста были выбраны формы фермента, содержащие точечные мутации в мотивах Уолкера АТР-азного центра: мутант Lon-K362Q, лишенный (по результатам исследования *in vitro*) протеолитической активности, и мутант Lon-D423N, который сохраняет около 30% активности нативной Lon-протеиназы

[7]. Как видно из рис. 1, введение в клетки AB1899 плазмид, определяющих синтез мутантных форм Lon-протеиназы, приводит к ослаблению интенсивности их биолюминесценции (кривые 4 и 5, ср. 1). Более значительно этот эффект проявляется в случае введения плазмиды pBRlon-D423N. Эти результаты хорошо согласуются с данными по протеолитической активности мутантных ферментов *in vitro* [7]. Следует отметить, что несколько пониженный относительно *lon*⁻-контроля (кривая 1) уровень люминесценции образца, содержащего мутант Lon-K362Q, на наш взгляд, не связан с наличием остаточной протеолитической активности у этого мутанта, а определяется другими причинами, которые будут обсуждены ниже.

Влияние мутантных форм Lon-протеиназы на биолюминесценцию клеток AB1899 (pAC16) можно оценивать также в опытах с неделящимися клетками (по содержанию люциферазы LuxAB). В этой серии экспериментов бактериальную культуру выращивали до ранней или средней логарифмической фазы при достаточно высокой температуре (42°C) с целью инактивации эндогенных люциферазы и регуляторного белка LuxR, относящихся к группе термолабильных белков. Затем отмыванием клеток удаляли эндогенный низкомолекулярный АИ и переводили клетки в так называемую среду "conditioned medium" [1], содержащую АИ в высокой концентрации (среда А) и приготовленную из надосадочной фракции, полученной в результате центрифугирования стационарной культуры AB1899 (pAC16) [8]. Подготовленную таким образом бактериальную суспензию выдерживали при фиксированной температуре в интервале 20–28°C без перемешивания и измеряли содержание вновь синтезированной люциферазы LuxAB по интенсивности биолюминесценции через определенные промежутки времени (рис. 2). Следует отметить, что затраты времени (2–3 ч) на проведение эксперимента по этой модифицированной методике в несколько раз меньше, чем при использовании процедуры, примененной в первой серии экспериментов (рис. 1).

При инкубации клеток без перемешивания увеличение интенсивности люминесценции происходит исключительно за счет биосинтеза люциферазы LuxAB *de novo* (показано ингибированием биосинтеза хлорамфениколом [1]). Поскольку активатор транскрипции правого оперона белок LuxR синтезируется независимо от содержания АИ в клетке, внесение в каждую пробу в составе среды А одинакового количества АИ определяет момент и степень открытия правого оперона только как функцию количества образовавшихся активных комплексов LuxR–АИ, что в свою очередь зависит от активности Lon-протеиназы. Чем выше активность Lon-протеиназы, тем выше уровень деградации молекул LuxR, и, следовательно,

но, тем позднее будет открываться правый оперон *luxICDABE* (фиксируется по замедленной и более низкой по интенсивности биолюминесценции клеток).

Вариант Lux-теста с использованием среды А был применен для определения активности *in vivo* как форм Lon-протеиназы, содержащих мутации в АТР-азном центре (K362Q, D423N), так и мутантных форм фермента с заменами в протеолитическом домене (S679A, H665Y, H667Y), неактивных по гидролизу казеина *in vitro* [9]. Результаты проведенных опытов представлены на рис. 2.

Видно, что образование в клетках мутантных форм Lon-протеиназы, содержащих аминокислотные замены K362Q, H667Y, H665Y и S679A, приводит к примерно одинаковым зависимостям интенсивности биолюминесценции образцов от времени (рис. 2, кривые 3, 5–7, соответственно), в целом, сходным с кривой интенсивности биолюминесценции для контрольного штамма AB1899 (pAC16, pBR327) (рис. 2, кривая 1). Тем не менее в области плато интенсивность биолюминесценции суспензий клеток, содержащих мутантные формы Lon-протеиназы, примерно на порядок ниже таковой для контрольного штамма. Этот эффект нельзя объяснить проявлением в системе *in vivo* остаточной протеолитической активности у исследуемых мутантов, поскольку в мутанте Lon-S679A (кривая 7) осуществлена замена каталитического остатка серина в протеолитическом центре, и этот мутант заведомо является протеолитически неактивной формой Lon-протеиназы. Более того, результаты Lux-теста дают основание полагать, что мутанты K362Q, H665Y и H667Y так же как и S679A не обладают протеолитической активностью (что согласуется с результатами определения активности этих мутантов *in vitro*). Пониженную (относительно контрольного образца) интенсивность биолюминесценции клеток, содержащих мутантные формы Lon-протеиназы, можно объяснить либо так называемым эффектом “секвестрирования” (полностью лишенная протеолитической активности мутантная Lon-протеиназа сохраняет способность связывать белок-субстрат и тем самым уменьшает внутриклеточное содержание активных молекул LuxR), либо частичным восстановлением активности при рекомбинации субъединиц исследуемого мутантного белка и неактивной Lon-протеиназы, присутствующей в клетках штамма AB1899 *lon1* (мутация *lon1* сохраняет способность клетки синтезировать фермент, но функционально неактивный). Выбор между этими двумя возможностями можно будет сделать при использовании Δlon -штаммов, содержащих “нокаутную” *lon*-мутацию, характеризующуюся полным отсутствием эндогенной Lon-протеиназы.

Для формы Lon-D423N, частично сохраняющей протеолитическую активность, как и в первом варианте тестирования (рис. 1, кривая 5), ха-

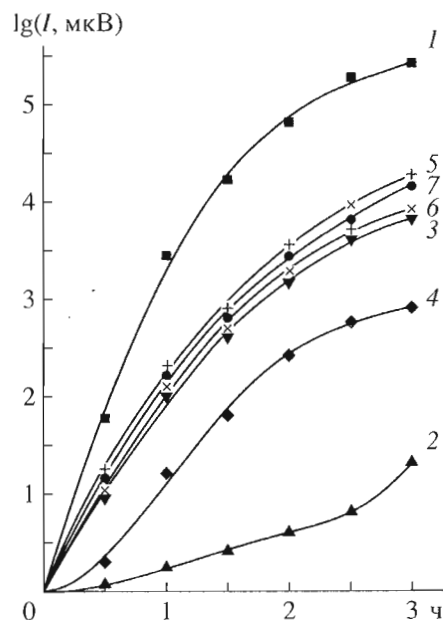


Рис. 2. Кинетика биолюминесценции клеток *E. coli* K12 AB1899 *lon1* (pAC16), содержащих плазмиды: pBR327 (1 – отрицательный контроль); pBRlon (2 – положительный контроль); pBRlon-K362Q (3); pBRlon-D423N (4); pBRlon-H665Y (5); pBRlon-H667Y (6) и pBRlon-S679A (7).

рактерен лаг-период и уменьшенная примерно на порядок по сравнению с другими Lon-мутантами интенсивность биолюминесценции в области плато (рис. 2, кривая 4). Таким образом, и в случае использования модифицированного варианта Lux-теста обнаруживается корреляция данных по оценке протеолитической активности мутантных форм Lon-протеиназы *in vivo* и *in vitro* [7, 9].

Представленные на рис. 2 результаты полученные при 20°C. Более высокая температура проведения модифицированного варианта Lux-теста приводит к замедлению в нарастании интенсивности биолюминесценции и снижению значения ее величины при “насыщении”. При 28°C для контрольного штамма AB1899 (pAC16, pBR327) интенсивность сигнала в области плато оказывается пониженной примерно на два порядка, что объясняется термочувствительностью Lux-белков *V. fischeri* (по данным работы [10] при выращивании бактерий *E. coli* с гибридной *lux*-плазмидой при 30–37°C люцифераза образует, в основном, агрегированную форму, но при 20°C она остается в форме растворимого белка).

Таким образом, результаты проведенных в данной работе экспериментов демонстрируют возможность использования биолюминесцентного метода (Lux-тест) для анализа *in vivo* активности мутантных форм Lon-протеиназы *E. coli*. Преимущества Lux-теста определяются его высокой чувствительностью и возможностью быстро и срав-

нительно просто определять внутриклеточную активность различных форм Lon-протеиназы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приготовление компетентных клеток, трансформацию, выделение и очистку плазмидной ДНК, электрофорез ДНК в агарозном геле проводили по стандартным методикам [11].

Использованные бактериальные штаммы: *E. coli* K12 AB1157 F⁻ *thr-1 leu-6 proA2 his-4 argE3 thi-1 lacY1 galK2 ara-14 xyl-5 ml-1 tsx-33 rpsL31 supE44*; *E. coli* K12 AB1899 *lon1* (остальные маркеры аналогичны маркерам штамма AB1157).

Условия роста клеточных культур. Клетки выращивали в условиях термостатирования на агаризованной или в жидкой LB-среде в присутствии антибиотиков (хлорамфеникол – 25 мкг/мл, ампициллин – 200 мкг/мл). При проведении модифицированного Lux-теста клетки перед переводом в среду А дважды промывали исходной средой с последующим центрифугированием (15 мин, 15000 g). Оптическое поглощение бактериальной суспензии измеряли при длине волны 590 нм (A_{590}).

Приготовление среды А. Стационарную культуру AB1899 (pAC16) [8] центрифугировали (15 мин, 15000 g), стерилизовали прогреванием при 65°C (15 мин) и разбавляли свежей средой LB в соотношении 1 : 1.

Плазмидные конструкции: pAC16 состоит из вектора pACYC184 и *VamH1*-фрагмента ДНК хромосомы *V. fischeri* с полным *lux*-регулоном; pBRlon состоит из вектора pBR327 и фрагмента ДНК *E. coli* K12 с полноразмерным геном *lonA* [12]. Были использованы также ранее сконструированные плазмиды с геном *lonA*, содержащим точечные мутации в различных участках струк-

турной области гена: pBRlon-K362Q, pBRlon-D423N, pBRlon-H665Y, pBRlon-H667Y, pBRlon-S679A [7, 9].

Измерение билюминесценции. Измерение интенсивности билюминесценции проводили на люминометре, состоящем из фотоумножителя ФЭУ-85 и микровольтметра В2-15, в специальных кюветках при температуре 25°C и объеме суспензии 200 мкл.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Завильгельский Г.Б., Манухов И.В. // Молекулярн. биология. 1997. Т. 31. С. 945–949.
2. Engelbrecht J., Silvermann M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 4154–4158.
3. Baldwin T.O., Devine J.H., Heckel R.C., Lin J.W., Shadel G.S. // J. Biolumin. Chemolumin. 1989. V. 4. P. 326–341.
4. Meighen E.A. // Microbiol. Rev. 1991. V. 55. P. 123–142.
5. Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P. // J. Bacteriol. 1994. V. 176. P. 269–275.
6. Salmond G.P., Bycroft B.W., Stewart G.S.A.B., Williams P. // Mol. Microbiol. 1995. V. 16. P. 615–622.
7. Мельников Э.Э., Цирульников К.Б., Гинодман Л.М., Ротанова Т.В. // Биоорганич. химия. 1998. Т. 24. С. 293–299.
8. Завильгельский Г.Б., Манухов И.В., Расторгуев С.М. // Генетика. 1996. Т. 32. С. 1246–1252.
9. Starkova N.N., Koroleva E.P., Rumsh L.D., Ginodman L.M., Rotanova T.V. // FEBS Lett. 1998. V. 422. P. 218–220.
10. Waddle J., Baldwin T.O. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991. V. 178. P. 1188–1193.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
12. Америк А.Ю., Антонов В.К., Остроумова Н.И., Ротанова Т.В., Чистякова Л.Г. // Биоорганич. химия. 1990. Т. 16. С. 869–880.

Test-System Based on the *Vibrio fischeri* Lux Regulon for Studying Functional Activity of the *Escherichia coli* Protease Lon and Its Mutant Forms

I. V. Manukhov*, G. E. Eroshnikov*, G. B. Zavilgelsky**, L. M. Ginodman**, E. E. Melnikov**, T. V. Rotanova**, N. N. Starkova**, and K. B. Tsurulnikov**

*GNIgenetika State Research Center, Pervyi Dorozhnyi proezd 1, Moscow, 113545 Russia

**Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

The possibility of application of the bioluminescence method (Lux-test) for studying *in vivo* functional activity of *Escherichia coli* protease Lon and its mutants was demonstrated. This assay is based on the capacity of protease Lon and its mutant forms for specific degradation of the LuxR protein, a positive transcriptional activator of the right operon *luxICDABE* from the marine bacterium *Vibrio fischeri*, and thus to affect the level of AB luciferase in the cells. A correlation between *in vitro* activity of the protease Lon mutants and the intensity of bioluminescence measured by the Lux-test was revealed.

Key words: Lon protease, lon gene, bioluminescence, lux genes, Lux R, transcription regulation, *Escherichia coli*, *Vibrio fischeri*

To whom correspondence should be addressed; phone +7 (095) 315-3729; e-mail: lab2@vnigen.msk.su.