ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

УДК 579.85

ШАПЕРОН Dnak УЧАСТВУЕТ В ФОЛДИНГЕ, НО НЕ В РЕФОЛДИНГЕ ТЕРМОИНАКТИВИРОВАННЫХ БЕЛКОВ В Bacillus subtilis

© 2020 г. Е. Ю. Гнучих^{1, 3, *}, И. В. Манухов⁴, Г. Б. Завильгельский^{2, 3, **}

¹Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра "Курчатовский институт",

Курчатовский геномный центр, Москва, 117545 Россия

²Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра "Курчатовский институт", Москва, 117545 Россия

³НИЦ "Курчатовский институт", Москва, 123098 Россия

⁴Московский физико-технический институт, Московская область, Долгопрудный, 141700 Россия

*e-mail: gnuchikh_ey@genetika.ru **e-mail: zavilgel@genetika.ru Поступила в редакцию 07.11.2019 г. После доработки 12.12.2019 г. Принята к публикации 18.12.2019 г.

Проведено исследование роли шаперонов DnaKJE и триггер фактора ($T\Phi$) в процессах фолдинга и рефолдинга белков в *Bacillus subtilis*. В качестве исследуемых белков были использованы бактериальные люциферазы *Photobacterium leiognathi* и *Photorhabdus luminescens*. Показано, что в отличие от *Escherichia coli* в клетках *B. subtilis* шаперон DnaKJE участвует в основном в фолдинге белков, но не в рефолдинге термоинактивированных белков. Показано, что шаперон $T\Phi$ в *B. subtilis* участвует в синтезе термолабильной люциферазы *P. leiognathi*, но значительно снижает уровень синтеза темостабильной люциферазы *P. luminescens*.

Ключевые слова: фолдинг, рефолдинг, шапероны, DnaKJE, триггер фактор, стрептомицин, ошибочная трансляция, бактериальные люциферазы.

DOI: 10.31857/S0016675820090076

В грамотрицательных бактериях *Escherichia coli* шаперон DnaK-DnaJ-GrpE (DnaKJE) выполняет ключевую роль в процессе контроля за качеством продукции (белки), разрушая белковые агрегаты и восстанавливая нативные структуры неправильно собранных (misfolded) и денатурированных (unfolded) белков (рефолдинг) [1–7].

Кроме того, DnaKJE участвует совместно с шапероном триггер фактором ($T\Phi$) в формировании нативной структуры белковой макромолекулы в процессе синтеза на рибосоме (фолдинг) [8–12].

В грамположительных бактериях исследованы регуляция экспрессии белков-шаперонов [13– 15], влияние шаперонов на выживаемость бактерий при повышенных (стрессовых) температурах [16]. Показано, что шаперон DnaK *Bacillus subtillis* комплементирует способность расти при высокой температуре (40°С) мутантный штамм *E. coli* $\Delta dnaK$ [17]. Показано, что у *B. subtilis* механизм регуляции экспрессии генов теплового шока значительно отличается от такового в клетках *E. coli*. Относительно же участия шаперонов в процессах фолдинга и рефолдинга белков экспериментальные данные малочисленные и носят фрагментарный характер. Например, в работе [18] показано, что шаперон DnaK *B. subtilis in vitro* осуществляет рефолдинг денатурированного (5 М мочевина, 25°С) белка лактат-дегидрогеназы (LDH): за 50 мин инкубации в рефолдируемой среде, содержащей ATP, фосфоэнолпируват, NADH, пируваткиназу и DnaK, процент активного фермента увеличивался с 12 (спонтанный рефолдинг) до 75.

Аминогликозиды (стрептомицин, гентамицин, канамицин и др.) значительно усиливают процесс ошибочного синтеза белков на рибосоме, что приводит к формированию в клетке misfolded полипептидов [19–21]. Было также показано, что аминогликозиды индуцируют в клетках *В. subtilis* синтез белков теплового шока [22]. Поэтому представляло интерес использовать стрептомицин как индуктор ошибок трансляции для получения неправильно собранных полипептидов и оценить, как шапероны DnaK и ТФ "исправляют" ошибки, возникшие в процессе трансляции белка на рибосомах.

Таблица 1.	Штаммы і	и плазмиды,	используемые	в работе
------------	----------	-------------	--------------	----------

Бактерии и плазмиды	Источник	
Escherichia coli MG1655	Получен из ВКПМ	
Escherichia coli PK202 ∆dnaKJ14 dksA::kan	Получен от Craig E. [7]	
Bacillus subtilis 168	Получен из ВКПМ	
Bacillus subtilis NBS2001 ∆dnaK-dnaJ::Spc ^r	Получен от Yoshikawa H. [16]	
Bacillus subtilis NBS1001 ∆tig::Cm ^r	»	
Bacillus subtilis NBS2002 ∆dnaK-dnaJ::Spc ^r ∆tig::Cm ^r	»	
pMWAL-1TPpur_dhfr_t1t2_MCS	Настоящая работа	
pPfbaA_MCS	»	
pPxylA_MSC	»	
pPfbaA_xenAB	»	
pPfbaA_leoAB	»	
pPxylA_xenAB	»	

В настоящей работе проведено исследование роли шаперонов DnaK и T Φ в процессах фолдинга и рефолдинга белков *in vivo* в клетках *B. subtilis*. В качестве исследуемых белков были использованы бактериальные люциферазы. Показано, что в отличие от *E. coli* в клетках *B. subtilis* шаперон DnaKJE участвует в основном в фолдинге белков, но не в рефолдинге термоинактивированных белков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы и плазмиды

Штаммы и плазмиды, использованные в работе, представлены в табл. 1.

Ферменты, реактивы

Эндонуклеазное расшепление, лигирование фрагментов ДНК, электрофорез в агарозном геле, выделение фрагментов ДНК из агарозного геля проводили согласно [23]. ПЦР проводили с помощью высокоточной ДНК-полимеразы Q5 (NEB, США). Реакции молекулярного клонирования проводили с использованием ферментов фирм "Promega" (США) или Gibson Assembly Master Mix (NEB, США). Субстрат бактериальной люциферазы *n*-деканаль получен от "Sigma" (США). Антибиотики хлорамфеникол, триметоприм, спектиномицин и стрептомицин получены от "Sigma".

Среды и условия культивирования

Компоненты питательных сред триптон, дрожжевой экстракт, aгар-агар, NaCl были приобретены в "Helicon" (Россия).

E. coli выращивали в LB-среде (1%-ный триптон, 0.5%-ный дрожжевой экстракт и 0.5% NaCl),

ГЕНЕТИКА том 56 № 9 2020

В. subtilis выращивали в LB или в триптоновой среде (1.5%-ный триптон, 0.5% NaCl) при 37°С, если не указано иное, и постоянной аэрации (200 об./мин). Селективные среды для мутантов В. subtilis содержат хлорамфеникол 10 мкг/мл и/или спектиномицин 150 мкг/мл в LB-среде. Для трансформации и пересева штаммов B. subtilis, содержащих плазмиды, использовалась триптоновая среда с добавлением триметоприма 8 мкг/мл; для штаммов B. subtilis 168 и NBS2001 могла использоваться также среда LB с добавлением хлорамфеникола 10 мкг/мл. Селективные среды для E. coli с плазмидами содержат ампициллин 100 мкг/мл. Твердые среды дополнительно содержат 1.5%-ный агар-агар.

Для исследования фолдинга *B. subtilis* выращивали в течение ночи при 30°С при постоянной аэрации (200 об./мин), в триптоновой среде с добавлением триметоприма, далее разводили в 100 раз в LB-среде (+триметоприм) и выращивали при температуре, указанной в опыте.

Для индукции промотора *PxylA* использовалась 1%-ная D(+)-ксилоза (AppliChem, Германия).

При исследовании роста клеток и фолдинга люцифераз в присутствии аминогликозидов использовались среда, приготовленная на деионизованной воде, и стрептомицин в концентрации 8 и 15 мкг/мл соответственно.

Трансформация

Трансформацию *B. subtilis* проводили по методу Спицайзена [24], *E. coli* трансформировали кальциевым методом.

Конструирование челночных плазмид

Праймеры, используемые при конструировании плазмид, приведены в табл. 2. Челночные

Габлица 2. Праймеры, используемые в работе			
P1	5-GTTTCTACCCGGCTGCCGTAATAAAGGAGGTTTACCGATGATTGTTTCATTTATGGTCGCTATG-3		
P2	5-TCGGTACCCGGGGATCCTCGATTCTCCTCCTCTTTCTATATTAGT-3		
Р3	5-GTACTAATATAGAAAGAGGAGGAGAATCGAGCTGATGCAAAAACGAGGCTAGTTTAC-3		
P4	5-GAGCTCGGTACCGCGGCCGCTCGAGGGGGCCCGGCGCGCGGATCCCCATGCCGAACTCAGAAGTGAA-3		
P5	5-GCCGCGGTACCGAGCTTTTTCTCCATAACTAGGATACCAAC-3		
P6	5-AAAGAAGAGCTTTCAGGTATTCGAATCATGTCATTATGTTGCCGATTTG-3		
P7	5-AGAAGAGCTTTCAGGAATTCGTTCTATTTTAGAACTCCTTTTTCATATGAGAAGGT-3		
P8	5- GCCGCGGTACCGAGCTCGATTGAGCCAAGTTATTTCCTCCTTA-3		
P9	5-ACCGCGGCCGCTCGAGGAAGCAAGAGGAGGACTCTCTATG-3		
P10	5-GCCGGGCCCCTCGAGATTTCAACCTGGCCGTTAATAATGAATG		
P11	5-ATCGCGGCCGCTCTCAGATCGGAAGGTGGAAGAA-3		
P12	5-TCGGGGCCCGTACCTCGCGAATGCATCTA-3		

плазмиды конструировали на основе pMWAL-1TPpur, содержащей два ориджина репликации – pMW118 [GenBank accession number AB005475] для E. coli и pBS72 репликон тета-типа для B. subtilis [25], а также содержащей гены bla и cat, сообщающие устойчивость к ампициллину и хлорамфениколу в E. coli и B. subtilis соответственно. Дополнительно с помошью пары праймеров Р1/Р2 под промотор Рриг по сайту XbaI был клонирован ген dhfr из B. cereus ATCC14579, кодирующий дигидрофолатредуктазу и сообщающий устойчивость к триметоприму при малых концентрациях фолатов в питательной среде, в результате была получена плазмида pMWAL-1TPpur dhfr. В плазмиду pMWAL-1TPpur dhfr с помощью пары праймеров Р3/Р4 по сайтам BamHI/KpnI были встроены терминатор t1t2 гена rrnB и полилинкер, в результате была получена беспромоторная плазмида pMWAL-1TPpur_dhfr_t1t2_MCS. В эту плазмиду далее были клонированы промоторы. Конститутивный промотор PfbaA [26] был клонирован с помощью пары праймеров Р5/Р6 по сайту рестрикции SacI, в результате была получена плазмида pPfbaA MCS. Аналогичным образом по сайту SacI с помощью пары праймеров P7/P8 был клонирован индуцируемый промотор PxylA без CRE элемента и его репрессор xylR [27], в результате была получена плазмида pPxylA MSC. В полученные плазмиды по сайтам рестрикции NotI/ApaI были клонированы гены *luxAB* с оптимизированными последовательностями Шайн-Дальгарно, кодирующие α и β субъединицы люцифераз *Photorhab*dus luminescens и Photobacterium leiognathi, из плазмид pXen5 [28] и pLF22ABleo [29] с помощью пар праймеров Р9/Р10 и Р11/Р12 соответственно. В результате были сконструированы плазмиды pPfbaA xenAB, pPfbaA leoAB и pPxylA xenAB, используемые в настоящей работе для изучения процессов фолдинга и рефолдинга бактериальных люцифераз в клетках грамположительных бактерий *B. subtilis*.

Измерение интенсивности биолюминесценции

Бактериальная люцифераза катализирует окисление длинноцепочечного альдегида (RCHO) атмосферным кислородом (O₂) в присутствии восстановленного флавинмононуклеотида (FMNH₂):

> FMNH₂ + RCHO + O₂ → → FMN + RCOOH + H₂O + + квант света (λ_{max} = 490 нм).

In vivo измерение активности люциферазы проводили с использованием люминометра Biotox 7 (ООО "Ekon", Россия). Суспензию синтезирующей люциферазу бактериальной культуры (200 мкл) смешивали с 0.001%-ным *n*-деканалем (2 мкл) в этаноле и через 5–10 с проводили измерение интенсивности биолюминесценции.

Рефолдинг термоинактивированных люцифераз

В суспензию бактерий *E. coli* для ингибирования синтеза белка перед началом термоинактивации люцифераз вносили 167 мкг/мл хлорамфеникола. Термоинактивацию люцифераз проводили, выдерживая клетки при температуре 46°С 5 мин для люциферазы *P. leiognathi* и 10 мин при 48°С для *P. luminescens*.

В бактериях *B. subtilis* термоинактивацию люциферазы *P. leiognathi* проводили, инкубируя суспензию клеток *B. subtilis* с аэрацией при 46°С 30 мин, для *P. luminescens* — при 49°С 30 мин. Для ингибирования синтеза белка перед термоинактивацией был добавлен тетрациклин в концентрации 60 мкг/мл.

Рефолдинг люцифераз проводили при температуре, оптимальной для активности данной люциферазы: 23°С для *P. leiognathi* и 36°С для *P. luminescens* [30, 31], рефолдинг люцифераз в *B. subtilis* проводили с аэрацией суспензии клеток. Измерения проводили через определенные интервалы времени, отбирая пробу (200 мкл) и сразу после



Рис. 1. Кинетика рефолдинга люциферазы *P. leiognathi* (1, 2) и *P. luminescens* (3, 4) в клетках *E. coli* (a): 1, 3 – MG1655 $dnaKJ^+$, 2, 4 – PK202 $\Delta dnaKJ14$; в клетках *B. subtilis* (6): 1, 3 – 168 $dnaKJ^+$, 2, 4 – NBS2001 $\Delta dnaK-dnaJ$.

добавления *n*-деканаля (субстрат люциферазной реакции) измеряли интенсивность биолюминесценции.

ния *n*-деканаля измеряли интенсивность люминесценции.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Рефолдинг термоинактивированных люцифераз

На рис. 1 представлена кинетика рефолдинга термоинактивированных бактериальных люцифераз — термолабильной *P. leiognathi* и термостабильной *P. luminescens* в клетках *E. coli* (*a*) и *B. subtilis* (*б*). Оптимальные температуры для активности люцифераз в *E. coli*: *P. leiognathi* — 23°С и *P. luminescens* — 36°С. Активность люциферазы определяли, проводя измерение интенсивности люминесценции. Термоинактивацию люцифераз в *E. coli* проводили, выдерживая клетки при повышенной температуре, до снижения уровня биолюминесценции на 3-4 порядка от исходного.

В клетках *E. coli* MG1655 *dnaKJ*⁺ наблюдается эффективный и быстрый рефолдинг люцифераз (для термолабильной люциферазы *P. leiognathi* уровень максимума рефолдинга достигает примерно

Фолдинг бактериальных люцифераз в клетках B. subtilis

Для исследования фолдинга штаммы *B. subtilis* выращивали в течение ночи при 30°С при постоянной аэрации (200 об./мин) в триптоновой среде с добавлением триметоприма, далее разводили в 100 раз в LB-среде (+триметоприм) и инкубировали при температуре, указанной в опыте. Для индукции промотора *PxylA* использовалась ксилоза (1%).

При исследовании роста клеток и фолдинга люцифераз в присутствии аминогликозидов использовался стрептомицин в концентрации 8 и 15 мкг/мл соответственно.

Через определенные интервалы времени отбирали аликвоты (200 мкл) и сразу после добавле-

ГЕНЕТИКА том 56 № 9 2020



Рис. 2. Фолдинг люциферазы *P. leiognathi* при разных температурах: $a - 28^{\circ}$ С, $\delta - 37^{\circ}$ С, $e - 40^{\circ}$ С. Представлена интенсивность люминесценции при $OD_{600} = 0.5$ штаммов *B. subtilis* 168 dnaKJ⁺, NBS1001 Δtig , NBS2001 $\Delta dnaK$ -dnaJ, NBS2002 $\Delta dnaK$ -dnaJ; Δtig .

80%, а для термостабильной люциферазы *P. luminescens* — 8—9%), который осуществляется в основном шапероном DnaKJE, так как в мутантном штамме *E. coli* PK202 $\Delta dnaKJ14$ рефолдинг термоинактивированных люцифераз практически отсутствует.

Так как оптимальные температуры для активности люцифераз в *B. subtilis* значительно превышают (примерно на $4-5^{\circ}$ C) таковые в *E. coli*: *P. leiognathi* – 28°C, *P. luminescens* – 40°C, то для определения уровня рефолдинга люцифераз в *B. subtilis* предварительную термоинактивацию ферментов проводили, выдерживая клетки при 46°C



Рис. 3. Фолдинг люциферазы из *P. luminescens* при разных температурах: $a - 40^{\circ}$ С, $\delta - 46^{\circ}$ С. Представлена интенсивность люминесценции при $OD_{600} = 0.5$ штаммов *B. subtilis* 168 dnaKJ⁺, NBS1001 Δtig , NBS2001 $\Delta dnaK$ -dnaJ, NBS2002 $\Delta dnaK$ -dnaJ; Δtig .

для *P. leiognathi* и 49°С для *P. luminescens* в течение 30 мин с аэрацией, при этом активность люцифераз снижалась примерно в 10 раз. В клетках *B. subtilis* 168 *dnaKJ*⁺ наблюдается восстановление активности термоинактивированных люцифераз (как *P. leiognathi*, так и *P. luminescens*) примерно до 60–70%, однако такой же уровень рефолдинга осуществляется и в мутантном штамме *B. subtilis* NBS2001 $\Delta dnaK$ -dnaJ.

Фолдинг люцифераз в B. subtilis

Для оценки сборки белка в процессе синтеза (фолдинг) в *B. subtilis* были использованы термолабильная люцифераза *P. leiognathi* и термостабильная люцифераза *P. luminescens*. На рис. 2 и 3 представлены гистограммы синтеза активных люцифераз в клетках *B. subtilis* 168 и мутантных штаммах (с делециями в генах, кодирующих шапероны DnaKJ и TФ) при различных температурах инкубации. На рис. 2 представлены гистограммы интенсивности биолюминесценции клеток *B. subtilis*, содержащих плазмиду pPfbaA_leoAB с генами *luxAB*, кодирующими термолабильную люциферазу *P. leiognathi*, при $OD_{600} = 0.5$ и температурах 28, 37 и 40°С.



Рис. 4. Рост бактерий *B. subtilis* 168 $dnaKJ^+$ и мутантных штаммов NBS1001 Δtig , NBS2001 $\Delta dnaK-dnaJ$, NBS2002 $\Delta dnaK-dnaJ \Delta tig$ в присутствии стрептомицина 8 мкг/мл при 37°С за 5 ч (*a*). Фолдинг люциферазы *P. luminescens* в присутствии стрептомицина 15 мкг/мл (*б*). Индукцию проводили при 40°С, стрептомицин был внесен в образцы за 5 мин до индукции 1%-ной ксилозой. По оси ординат приведена активность люциферазы (за 100% принята активность в штамме *B. subtilis* 168 $dnaKJ^+$), через 25 мин после начала индукции.

Как видим, уровень синтеза активной люциферазы зависит от наличия шаперонов DnaKJ и $T\Phi$, а также от температуры инкубации. При оптимальной температуре 28°С для проявления активности люциферазы, синтез нативного фермента в *B. subtilis* 168 при $OD_{600} = 0.5$ происходит в 40 раз более активно, чем в двойном мутанте NBS2002 $\Delta tig \Delta dnaK$ -dnaJ в тех же условиях. В одиночных мутантах NBS2001 *ДапаК-dnaJ* и NBS1001 *Δtig* уровень фолдинга активной люциферазы также снижен, но в меньшей степени (синтез активного фермента снижен в 5 раз в NBS2001 и в 2.5 раза в NBS1001). При инкубации клеток при более высоких температурах – 37°С (рис. 2,б) и 40°С (рис. 2,в) одновременно с синтезом активного фермента происходит термоинактивация белка, что видно на гистограммах по уровню биолюминесценции. Однако зависимость уровня фолдинга от активности шаперонов сохраняется, причем в одиночном мутанте NBS1001 Δtig снижение синтеза активного фермента менее значи-

ГЕНЕТИКА том 56 № 9 2020

тельно по сравнению с таковым при оптимальной температуре 28°С.

На рис. 3 представлены гистограммы, показывающие интенсивность биолюминесценции клеток *B. subtilis*, содержащих плазмиду pPfbaA-xenAB с генами *luxAB*, кодирующими термостабильную люциферазу *P. luminescens*, при $OD_{600} = 0.5$ и температурах 40 и 46°С.

При температуре 40° С (рис. 3,*a*) в клетках мутанта NBS1001 Δtig , содержащего только делецию гена tig, уровень синтеза активного белка примерно в 3 раза превышает таковой, характерный для бактерий дикого типа, при этом почти нет разницы между диким типом и мутантными штаммами с делецией $\Delta dnaK$ -dnaJ (NBS2001) и $\Delta dnaK$ -dnaJ; Δtig (NBS2002). Однако при повышенной температуре 46°С (рис. 3, δ) делеция $\Delta dnaK$ -dnaJ снижает уровень синтеза активного фермента по сравнению с диким типом в 2 раза, при этом дополнительная делеция по гену tig еще сильнее снижает уровень фолдинга, как и в варианте с термолабильной люциферазой, но в клетках одинарного мутанта NBS1001 *Δtig* сохраняется повышенный уровень синтеза активного фермента, примерно в 2 раза выше, чем в диком типе. Нужно также отметить, что уровень биолюминесценции в штамме дикого типа при температурах 40 и 46°С практически одинаков, но заметно отличается в мутантных штаммах.

Влияние антибиотиков аминогликозидов на фолдинг люцифераз в клетках B. subtilis

На рис. 4 представлены экспериментальные данные зависимости роста клеток *B. subtilis* (*a*) и синтеза люциферазы *P. luminescens* (δ) от времени инкубации в питательной среде, содержащей стрептомицин.

Как видим, делеции генов *tig* и особенно *dnaKdnaJ* значительно снижают как скорость роста популяции клеток (рис. 4,*a*), так и синтез активных форм фермента (рис. 4,*б*). Что же касается двойного мутанта NBS2002 $\Delta tig \Delta dnaK$ -*dnaJ*, то при максимальном снижении скорости роста бактерий в этом штамме наблюдается несколько повышенный уровень синтеза активной люциферазы по сравнению с таковым в одиночном мутанте NBS2001 $\Delta dnaK$ -*dnaJ*.

ОБСУЖДЕНИЕ

В грамотрицательных бактериях основная функция АТФ-независимого шаперона ТФ – фолдинг вновь синтезируемой полипептидной цепи – тесно связана с работой рибосомы, с 50S-субъединицей, с которой ТФ формирует прочный комплекс (основной контакт с белком L23) [32]. Согласно основной схеме, ТФ, локализованный на рибосоме в области рибосомного туннеля, при высвобождении полипептидной цепи в цитоплазму осуществляет первичную сборку белка, завершение же процесса сборки белка (фолдинг) осуществляют в цитоплазме шапероны DnaKJE и GroEL/ES [10, 12, 33, 34]. ТФ в процессе первичной сборки белка, действуя совместно с рибосомой, задерживает (замедляет) окончательный фолдинг полипептида, значительно понижая вероятность формирования неправильных (misfolded) конформаций и агрегирования за счет введения в процесс дополнительных стадий, определяющих частичную раскрутку (unfolding) предварительно собранного домена, с последующим правильным процессом укладки цепи [11, 35, 36].

АТФ-зависимый шаперон DnaKJE в E. coli осуществляет в основном рефолдинг неправильно собранных и ленатурированных белков, но также участвует в процессе фолдинга совместно с ТФ [1]. DnaKJE формирует комплекс с белком в результате Ван-дер-Ваальсового взаимодействия с гидрофобными участками в полипептидной цепи субстрата. С энергетической точки зрения действие шаперона DnaKJE состоит в совершении работы против барьера свободной энергии за счет гидролиза АТФ, в результате которой стабильная денатурированная форма белка-субстрата с низкой свободной энергией переходит в процессе раскручивания полипептидной цепи (активность шаперона – "unfoldase") в "открытый" конформер с высокой свободной энергией, который затем может спонтанно перейти в состояние нативного конформера с низкой свободной энергией [37, 38].

В настоящей работе в качестве белков-субстратов использованы гомологичные ферменты бактериальные люциферазы, характеризующиеся различной термочувствительностью. В работе [31] было показано, что в клетках *E. coli* шаперонная активность DnaKJE значительно понижается с ростом термостабильности белка-субстрата.

Однако согласно данным, представленным на рис. 1, в грамположительных бактериях *B. subtilis* рефолдинг термоинактивированных люцифераз не зависит от активности шаперона DnaKJE, а уровень рефолдинга термостабильной и термолабильной люцифераз практически одинаков.

В работе [39] было показано, что в клетках штамма *E. coli* $\Delta tig \Delta dnaKJ$ (клетки не способны расти при температуре выше 30°С) образуется примерно в 10 раз больше белков-агрегатов по сравнению с таковыми в клетках штамма с одиночной мутацией $\Delta dnaKJ$, что прямо указывает на кооперативное участие шаперонов ТФ и DnaKJE в фолдинге синтезируемых на рибосоме полипептидов. На основании данных, представленных на рис. 2 и 3, подобный вывод справедлив и для грамположительных бактерий *B. subtilis*, так как в двойном мутанте NBS2002 уровень синтеза активных люцифераз значительно снижен по сравнению с таковым в клетках штаммов, содержащих одиночные мутации Δtig или $\Delta dnaK$ -dnaJ. В работе [39] также показано, что в клетках E. coli увеличение внутриклеточной концентрации ТФ примерно в 4 раза носит летальный характер, причем не только в мутантных штаммах, но также и в клетках дикого типа, причем летальность ТФ связана в основном с формированием агрегата – белка OmpF (outer membrane porin), который в процессе синтеза формирует прочный комплекс с ТФ и не способен поэтому к дальнейшему процессированию, проводимому шаперонами SecB и SecA. Можно предположить, что наблюдаемое в настоящей работе усиление фолдинга термостабильной люциферазы P. luminescens в клетках B. subtilis Δtig по сравнению с таковым в клетках дикого типа (рис. 3) также связано с формированием прочного комплекса синтезируемой на рибосоме полипептидной цепи с шапероном ТФ в результате Ван-дер-Ваальсового взаимодействия гидрофобных сайтов, замедляющего фолдинг. Необходимо отметить, что для термолабильной люциферазы P. leiognathi подобного эффекта не наблюдается (рис. 2).

Как видно из данных, представленных на рис. 4, δ , в присутствии аминогликозида стрептомицина в бактериях *B. subtilis* уровень синтеза активной люциферазы *P. luminescens* значительно снижается в штамме, содержащем делецию $\Delta dnaK$ -dnaJ, и в меньшей степени в мутантном штамме Δtig . Отметим, что повышения уровня фолдинга люциферазы в одиночном мутанте Δtig по сравнению с таковым в диком штамме (рис. 3) в данном случае не наблюдается, что указывает на необходимость шаперона ТФ в проводимом в присутствии аминогликозида фолдинге белка, содержащего большое количество трансляционных ошибок.

Полученные в настоящей работе результаты, с использованием на модели бактериальных люцифераз, различающихся по термостабильности, показывают, что шаперон DnaKJE в B. subtilis принимает непосредственное участие в процессе синтеза белка на рибосоме, но в отличие от соответствующего шаперона в клетках E. coli практически не способен проводить рефолдинг термоинактивированных белков. Следовательно, система АТФ-зависимых шаперонов в грамположительных бактериях значительно отличается по механизму действия от шаперонов, работающих в грамотрицательных бактериях. Согласно нашим предварительным данным важную роль в системе АТФ-зависимых шаперонов в клетках B. subtilis выполняют белки "теплового шока" группы Hsp90.

Работа поддержана государственным заданием № 595-00003-19 ПР. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Calloni G., Chen T., Schermann S.M. et al. DnaK functions as a central hub in the E. coli chaperone network // Cell. Rep. 2012. V. 1. № 3. P. 251–264. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2011.12.007
- 2. *Hesterkamp T., Bukau B.* Role of the DnaK and HscA homologs of Hsp70 chaperones in protein folding in *E. coli* // EMBO J. 1998. V. 17. № 16. P. 4818–4828. https://doi.org/10.1093/emboj/17.16.4818
- Liu C.P., Perrett S., Zhou J.M. Dimeric trigger factor stably binds folding-competent intermediates and cooperates with the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone system to allow refolding // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 14. P. 13315–13320. https://doi.org/10.1074/jbc.M414151200
- Tyedmers J., Mogk A., Bukau B. Cellular strategies for controlling protein aggregation // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2010. V. 11. № 11. P. 777–788. https://doi.org/10.1038/nrm2993
- Stoecklin G., Bukau B. Telling right from wrong in life cellular quality control // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2013. V. 14. № 10. P. 613–615. https://doi.org/10.1038/nrm3662
- 6. *Doyle S.M., Genest O., Wickner S.* Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2013. V. 14. № 10. P. 617–629.

https://doi.org/10.1038/nrm3660

- Kang P.J., Craig E.A. Identification and characterization of a new *Escherichia coli* gene that is a dosage-dependent suppressor of a *dnaK* deletion mutation // J. Bacteriol. 1990. V. 172. № 4. P. 2055–2064. https://doi.org/10.1128/jb.172.4.2055-2064.1990
- Deuerling E., Schulze-Specking A., Tomoyasu T. et al. Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins // Nature. 1999. V. 400. № 6745. P. 693–696. https://doi.org/10.1038/23301
- 9. *Frydman J*. Folding of newly translated proteins *in vivo*: the role of molecular chaperones // Annu. Rev. Bio-chem. 2001. V. 70. № 1. P. 603–647. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.603
- Agashe V.R., Guha S., Chang H.C. et al. Function of trigger factor and DnaK in multidomain protein folding: increase in yield at the expense of folding speed // Cell. 2004. V. 117. № 2. P. 199–209. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00299-5
- 11. Hoffmann A., Becker A.H., Zachmann-Brand B. et al. Concerted action of the ribosome and the associated chaperone trigger factor confines nascent polypeptide folding // Mol. Cell. 2012. V. 48. № 1. P. 63–74. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.018

- Wruck F, Avellaneda M.J., Koers E.J. et al. Protein folding mediated by trigger factor and Hsp70: new insights from single-molecule approaches // J. Mol. Biol. 2018. V. 430. № 4. P. 438–449. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.09.004
- Schulz A., Schumann W. hrcA, the first gene of the Bacillus subtilis dnaK operon encodes a negative regulator of class I heat shock genes // J. Bacteriol. 1996. V. 178. № 4. P. 1088–1093. https://doi.org/10.1128/jb.178.4.1088-1093.1996
- Mogk A., Homuth G., Scholz C. et al. The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis* // EMBO J. 1997. V. 16. № 15. P. 4579–4590. https://doi.org/10.1093/emboj/16.15.4579
- Schumann W. Regulation of bacterial heat shock stimulons // Cell Stress Chaperones. 2016. V. 21. № 6. P. 959–968. https://doi.org/10.1007/s12192-016-0727-z
- 16. *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. V. 66. № 7. P. 1583–1586. https://doi.org/10.1271/bbb.66.1583
- 17. Mogk A., Bukau B., Lutz R. et al. Construction and analysis of hybrid Escherichia coli–Bacillus subtilis dnaK genes // J. Bacteriol. 1999. V. 181. № 6. P. 1971–1974.
- Shi L., Ravikumar V., Derouiche A. et al. Tyrosine 601 of Bacillus subtilis DnaK undergoes phosphorylation and is crucial for chaperone activity and heat shock survival // Front. Microbiol. 2016. V. 7. P. 533. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00533
- 19. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Wierzbowski J. et al. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death // Cell. 2008. V. 135. № 4. P. 679–690. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.038
- 20. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Collins J.J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks // Nat. Rev. Microbiol. 2010. V. 8. № 6. P. 423–435. https://doi.org/10.1038/nrmicro2333
- 21. Goltermann L., Good L., Bentin T. Chaperonins fight aminoglycoside-induced protein misfolding and promote short-term tolerance in *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. № 15. P. 10483–10489. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.420380
- 22. Lin J.T., Connelly M.B., Amolo C. et al. Global transcriptional response of Bacillus subtilis to treatment with subinhibitory concentrations of antibiotics that inhibit protein synthesis // Antimicrob. Agents Chemother. 2005. V. 49. № 5. P. 1915–1926. https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1915-1926.2005
- Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001. 2344 p.
- 24. *Spizizen J*. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1958. V. 44. № 10. P. 1072–1078. https://doi.org/10.1073/pnas.44.10.1072
- 25. Titok M.A., Chapuis J., Selezneva Y.V. et al. Bacillus subtilis soil isolates: plasmid replicon analysis and con-

ГЕНЕТИКА том 56 № 9 2020

struction of a new theta-replicating vector // Plasmid. 2003. V. 49. \mathbb{N} 1. P. 53–62. https://doi.org/10.1016/s0147-619x(02)00109-9

- 26. *Guiziou S., Sauveplane V., Chang H.J. et al.* A part toolbox to tune genetic expression in *Bacillus subtilis* // Nucl. Acids Res. 2016. V. 44. № 15. P. 7495–7508. https://doi.org/10.1093/nar/gkw624
- 27. *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. V. 67. № 1. P. 403–410. https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.403-410.2001
- 28. 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. V. 69. № 5. P. 3350–3358. https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.3350-3358.2001
- 29. Дерябин Д.Г., Каримов И.Ф., Манухов И.В. и др. Дифференцированная оценка бактерицидных систем сыворотки крови с использованием рекомбинантных люминесцирующих штаммов *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2012. Т. 154. № 7. С. 68–73.
- 30. *Тюлькова Н.А., Сандалова Т.П.* Сравнительное исследование влияния температуры на бактериальные люциферазы // Биохимия. 1996. Т. 61. № 2. С. 275–287.
- 31. *Manukhov I.V., Eroshnikov G.E., Vyssokikh M.Y. et al.* Folding and refolding of thermolabile and thermostable bacterial luciferases: the role of DnaKJ heat-shock proteins // FEBS Lett. 1999. V. 448. № 2–3. P. 265–268. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00384-1
- 32. *Kramer G., Rauch T., Rist W. et al.* L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome // Nature.

2002. V. 419. № 6903. P. 171–174. https://doi.org/10.1038/nature01047

- 33. Ying B.W., Taguchi H., Ueda T. Co-translational binding of GroEL to nascent polypeptides is followed by post-translational encapsulation by GroES to mediate protein folding // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 31. P. 21813–21819. https://doi.org/10.1074/jbc.M603091200
- 34. *Gloge F., Becker A.H., Kramer G. et al.* Co-translational mechanisms of protein maturation // Curr. Opin. Struct. Biol. 2014. V. 24. P. 24–33. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.11.004
- 35. *Mashaghi A., Kramer G., Bechtluft P. et al.* Reshaping of the conformational search of a protein by the chaperone trigger factor // Nature. 2013. V. 500. № 7460. P. 98–101. https://doi.org/10.1038/nature12293
- Nilsson O.B., Müller-Lucks A., Kramer G. et al. Trigger factor reduces the force exerted on the nascent chain by a cotranslationally folding protein // J. Mol. Biol. 2016. V. 428. № 6. P. 1356–1364. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.02.014
- Sharma S.K., De los Rios P., Christen P. et al. The kinetic parameters and energy cost of the Hsp70 chaperone as a polypeptide unfoldase // Nat. Chem. Biol. 2010. V. 6. N
 N
 12. P. 914–920. https://doi.org/10.1038/nchembio.455
- 38. *Priya S., Sharma S.K., Goloubinoff P.* Molecular chaperones as enzymes that catalytically unfold misfolded polypeptides // FEBS Lett. 2013. V. 587. № 13. P. 1981–1987.

https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.014

39. Genevaux P., Keppel F., Schwager F. et al. In vivo analysis of the overlapping functions of DnaK and trigger factor // EMBO Rep. 2004. V. 5. № 2. P. 195–200. https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400067

DnaK Chaperone Takes Part in Folding but Not in Refolding of Thermal Inactivated Proteins in *Bacillus subtilis*

E. Yu. Gnuchikh^{a, c, *}, I. V. Manukhov^d, and G. B. Zavilgelsky^{b, c, **}

^aState Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center "Kurchatov Institute", Kurchatov Genomic Center, Moscow, 117545 Russia ^bState Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms

of National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, 117545 Russia

^cNRC "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia

^dMoscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow Oblast, 141700 Russia

*e-mail: gnuchikh ey@genetika.ru

**e-mail: zavilgel@genetika.ru

The role of DnaKJE and trigger factor (TF) chaperones in folding and refolding of proteins in *Bacillus subtilis* is studied. Bacterial luciferases of *Photobacterium leiognathi* and *Photorhabdus luminescens* as protein substrates have been used. It is shown that DnaKJE takes part in folding but not in refolding of the thermal inactivated proteins. It is shown that the TF take part in the synthesis of thermolabile *P. leiognathi* luciferase, but significantly decreases the level of synthesis of thermostable *P. luminescens* luciferase.

Keywords: folding, refolding, chaperone, DnaKJE, trigger factor, streptomycin, mistranslation, bacterial luciferase.