

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ *BACILLUS PUMILUS* У РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ БАЦИЛЛ© 2022 г. А. О. Корягина^а, *, Ф. Р. Османова^а, А. А. Тойменцева^а, А. В. Лайков^а, М. Р. Шарипова^а^аФГАОУ ВПО “Казанский (Приволжский) федеральный университет”,
Казань, 420008 Республика Татарстан, Россия

*e-mail: tihonovaao93@gmail.com

Поступила в редакцию 06.10.2021 г.

После доработки 26.10.2021 г.

Принята к публикации 27.10.2021 г.

Проведено сравнительное исследование экспрессии внеклеточных сериновых протеиназ *Bacillus pumilus* (субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы) под контролем разных промоторов и сигнальных пептидов на основе LIKE-системы экспрессии у различных реципиентных штаммов *Bacillus subtilis* с помощью масс-спектрометрического анализа в режиме мониторинга множественных реакций (МРМ). Максимальная экспрессия субтилизиноподобной протеиназы установлена под контролем смоделированного сигнального пептида (SP_{Asp}) и индуцибельного промотора P_{Lial} LIKE-системы экспрессии в протеазодефицитном штамме *B. subtilis* 20-36, количество секретируемого белка составило 1.6 мкг/мкл культуральной жидкости. Оптимальная экспрессия глутамилэндопептидазы установлена под контролем сигнального пептида гена гликозидгидролазы *Bacillus megaterium* (SP_{Yngk}) и индуцибельного промотора P_{Lial} в протеазодефицитном штамме *B. subtilis* 20-36, максимальное количество белка составило 0.06 мкг/мкл. Сделано заключение о значимости подбора всех компонентов системы экспрессии для индивидуальных секретируемых белков, включая подбор оптимального сигнального пептида.

Ключевые слова: *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, субтилизиноподобная протеиназа, глутамилэндопептидаза, экспрессионные системы, оптимизация, масс-спектрометрический анализ

DOI: 10.31857/S0026365622020082

Бактерии рода *Bacillus* широко известны как продуценты промышленно-ценных ферментов и функциональных белков. Для получения гетерологичных полипептидов проводят конструирование и оптимизацию экспрессионных систем *Bacillus subtilis*, содержащих контролируемые и высокоактивные промоторы (Cai et al., 2019). С другой стороны, необходимым элементом секреторной системы *B. subtilis* является сигнальный пептид (Cui et al., 2018). Во многих случаях промышленные белки успешно секретируются под управлением гетерологичных сигнальных пептидов (Armenteros et al., 2019; Zhang et al., 2020), причем показано, что способность к секреции у рекомбинантных штаммов бацилл во многом зависит от сигнального пептида и специфических белков-мишеней (Brockmeier et al., 2006; Chen et al., 2015; Zhang et al., 2017; Huang et al., 2018). Наряду с использованием гетерологичных сигнальных пептидов для повышения экспрессии сериновых протеиназ *Bacillus pumilus* (субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы) в клетках *B. subtilis* мы тестировали различные промоторы: индуцибельный промотор LIKE-системы экспрессии (P_{Lial}) (Toymentseva et al., 2012)

и конститутивный промотор гена *degQ*, в составе которого замена единственного нуклеотида в регионе “-10” позволила получить конститутивную активность промотора P_{degQ36} (Msadek et al., 1991).

Подбор сигнальных пептидов проводили с применением LIKE-системы экспрессии (от нем. Lia-Kontrollierte Expression) под контролем сильного индуцибельного промотора P_{Lial} двухкомпонентной системы LiaRS *B. subtilis* (индуктор – стрессовые факторы). Длина регуляторного региона составляет 101 п.о. и включает LiaR-связывающую последовательность для индукции промотора P_{Lial}; оптимизированную до канонической рибосом-связывающей последовательности (–taaggagg–), характерную для генов бациллярных белков, расстояние от этого бокса до стартового кодона составляет 7 нуклеотидов. Такое расположение генетических элементов в промоторе повышает эффективность трансляции (Toymentseva et al., 2012). С помощью LIKE экспрессионной системы нами тестированы разные сигнальные пептиды *B. megaterium*: SP_{Pac} – сигнальный пептид гена пенициллинамидазы, SP_{Yngk} – сигнальный пептид гена гликозидгидролазы и

SP_{Asp} – смоделированный сигнальный пептид (Tikhonova et al., 2017). Установлено, что эффективными сигнальными пептидами в составе рекомбинантных конструкций с генами протеиназ *B. pumilus* (субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы) в составе LIKE-системы экспрессии являлись сигнальный пептид SP_{Yngk} для продукции глутамилэндопептидазы и смоделированный сигнальный пептид SP_{Asp} – для продукции субтилизиноподобной протеиназы (Tikhonova et al., 2017).

Важным этапом в оптимизации секреции белка является выбор реципиентного штамма (Gu et al., 2018, Contesini et al., 2018). Применение технологии рекомбинантной ДНК позволило изменять генетику штаммов-хозяев. Оказалось, что избыточное производство чужеродных белков у микроорганизмов приводит к сложным процессам в клетке, и подбор оптимальных штаммов для получения гетерологичных белков требует всестороннего изучения клеточной физиологии (Тоуа et al., 2014). Мы исследовали экспрессию протеиназ *B. pumilus* (субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы) в различных штаммах *B. subtilis*: протеазадефицитном штамме 20–36 с делециями собственных внеклеточных протеиназ (*Δapr-684*, *ΔnprE522*) и штамме 27–31, в геноме которого методом направленного редактирования удалены гены, продукты которых ответственны за спорующую, образование биопленок, антимикробных метаболитов и внеклеточных протеиназ (*ΔaprE*, *ΔaprX*, *ΔwprA*, *Δepr*, *Δbpr*, *Δvpr*, *Δmpr*, *ΔnprB*).

Целью работы являлось сравнение экспрессии сериновых протеиназ *B. pumilus* под контролем разных промоторов и сигнальных пептидов у штаммов-реципиентов *B. subtilis* 20–36 и 27–31 на основе масс-спектрометрического анализа в режиме мониторинга множественных реакций (MPM).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы и плазмиды. Штаммы, использованные и полученные в работе, представлены в табл. 1. Плазмидный вектор rGP382 предоставлен профессором Т. Mascher (Мюнхенский университет Людвига-Максимилиана, г. Мюнхен, Германия). Вектор rLIKE, а также оптимизированные сигнальными пептидами вектора LIKE-системы – из музея кафедры микробиологии КФУ (Тоументсева et al., 2012; Tikhonova et al., 2017).

Питательные среды и культивирование. Культивирование штаммов проводили на среде LB (Лурья–Бертани) (Sambrook, Green, 2012) следующего состава (%): триптон – 1.0; дрожжевой экстракт – 0.5; NaCl – 0.5; pH 8.5. Агаризованная среда LB включала дополнительно 2% агара (LA). Среды стерилизовали при 1 атм. в течение 30 мин. Для

приготовления сред использовали дистиллированную воду. Штаммы *B. subtilis*, содержащие рекомбинантные конструкции, выращивали на питательной среде при добавлении эритромицина в концентрации 10 мкг/мл. Для индукции LIKE-системы использовали антибиотик бацитрацин в концентрации 50 мкг/мл (Тоументсева et al., 2012). Для определения активности в культуральной жидкости рекомбинантных штаммов анализировали динамику роста бактерий с интервалом в 2 ч. Рост бактерий оценивали по изменению оптической плотности (ОП) культуры на спектрофотометре xMark (“BioRad”, США) при длине волны излучения $\lambda = 600$ нм.

Определение протеолитической активности. Протеолитическую активность определяли по расщеплению ферментом азоказеина. За единицу активности принимали количество фермента, гидролизующее в условиях эксперимента 1 мкг субстрата за 1 мин (Demiduk et al., 2004).

Количественный масс-спектрометрический анализ в режиме мониторинга множественных реакций (LC–MRM–MS). Для количественной оценки протеиназ 50 мл культуры выращивали в среде LB в течение 24 ч. Бацитрацин, 50 мкг/мл, добавляли в качестве индуктора к культуральной жидкости *B. subtilis*, содержащих LIKE-систему экспрессии, при достижении ОП₆₀₀ = 0.4–0.5. Для получения фракции внеклеточного белка клетки удаляли центрифугированием в течение 20 мин при 11000 g, а супернатант фильтровали через полиэфирсульфоновый фильтр (d = 90 мм, 0.22 мкм, “Merck”, “Millipore”). Супернатант осаждали в течение 30 мин на ледяной бане путем добавления 100% трихлоруксусной кислоты (ТХУ, w/v) в соотношении 1 : 10 к 50 мл отфильтрованного конечного раствора. Далее центрифугировали при 37000 g в течение 15 мин. Внеклеточные белки в полученном осадке растворяли в RapiGest SF 0.1% (“Waters”, США). Концентрацию общего белка измеряли в осажденных образцах с помощью набора BCA ProteinAssayKit (“Novagen”, США) в соответствии с инструкцией по применению. Для трипсинолиза использовали 300 мкг белка. К образцам добавляли трипсин (#V5111, “Promega”, США) в соответствии с инструкцией производителя. Детекцию пептидов осуществляли методом мониторинга множественных реакций (MPM) на масс-спектрометре Q-TRAP 6500 (“AB Sciex”, США), комбинированном с жидкостным хроматографом Infinity 1290 (“Agilent”, США). Количественное определение белков проводили с помощью построения калибровочных кривых с протеотипическими пептидами (Тоументсева et al., 2020). Пептид NAVDTANNR был использован для количественного определения субтилизиноподобной протеиназы, для глутамилэндопептидазы был подобран пептид TDTNIGNTVGYR (чистота пептидов >98%) (“Сервис Ген”, Россия). Протеотипиче-

Таблица 1. Штаммы, использованные в работе

Штамм	Генотип	Источник
<i>B. pumilus</i> 3-19	Str ^R	Музей кафедры микробиологии, КФУ
<i>B. subtilis</i>:		
20-36	$\Delta aprE$ -684, $\Delta nprE522$	Предоставлен проф. Е. Феррари, Genencor Int. Inc., США
27-31	$\Delta aprE$, $\Delta aprX$, $\Delta wprA$, Δepr , Δbpr , Δvpr , Δmpr , $\Delta nprB$	Предоставлены проф. J. Altenbuchner (Гронингенский университет, г. Гронинген, Германия)
AT1	$\Delta aprE$ -684, $\Delta nprE522$, pLIKE	(Tikhonova et al., 2017)
<i>B. subtilis</i> 20-36:		
MRB044	pLIKE-rep + SP _{aprBp} + <i>aprBp</i>	(Tikhonova et al., 2017)
MRB046	pLIKE-rep + SP _{Yngk} + <i>aprBp</i>	(Tikhonova et al., 2017)
MRB083	pLIKE + SP _{Asp} + <i>aprBp</i>	(Tikhonova et al., 2017)
MRB072	pGP382 + <i>aprBp</i>	Музей кафедры микробиологии, КФУ
MRB047	pLIKE-rep + SP _{gseBp} + <i>gseBp</i>	(Tikhonova et al., 2017)
MRB049	pLIKE-rep + SP _{Yngk} + <i>gseBp</i>	(Tikhonova et al., 2017)
MRB084	pLIKE + SP _{Asp} + <i>gseBp</i>	(Tikhonova et al., 2017)
MRB073	pGP382 + <i>gseBp</i>	Музей кафедры микробиологии, КФУ
<i>B. subtilis</i> 27-31:		
MRB089	pLIKE + <i>aprBp</i>	Музей кафедры микробиологии, КФУ
MRB090	pLIKE + SP _{Yngk} + <i>aprBp</i>	
MRB091	pLIKE + SP _{Asp} + <i>aprBp</i>	
MRB080	pGP382 + <i>aprBp</i>	
MRB085	pLIKE + <i>gseBp</i>	
MRB087	pLIKE + SP _{Yngk} + <i>gseBp</i>	
MRB088	pLIKE + SP _{Asp} + <i>gseBp</i>	
MRB081	pGP382 + <i>gseBp</i>	

ские пептиды для каждого их белков подбирали с помощью программного обеспечения Skyline (версия 20.1).

Математическая обработка результатов. Для количественной оценки сериновых протеаз *B. pumilus* методом МРМ нами подобраны уникальные пептиды для субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы с использованием программного обеспечения Skyline (версия 20.1, Сиэтл, Вашингтон, США). За измерение каждого белка принимали среднее арифметическое значение, рассчитанное на основании результатов МРМ-анализа в трех технических повторах. Статистический анализ и отображение полученных результатов было выполнено с применением пакета MS Excel (2016 г.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение динамики роста и активности рекомбинантных штаммов. *B. subtilis* широко применяется

как продуцент белков и ферментов для масштабного производства. Выбор промотора и сигнального пептида может существенно повлиять на уровень секреции белков у бацилл. Используя этот подход, мы провели сравнительную оценку экспрессии генов различных протеиназ в рекомбинантных штаммах *B. subtilis* под контролем разных промоторов и сигнальных пептидов. Изучали динамику роста рекомбинантных штаммов *B. subtilis* 20-36, секретирующих субтилизиноподобную протеиназу и глутамилэндопептидазу *B. pumilus* под контролем разных промоторов и сигнальных пептидов (рис. 1).

Сравнивали активность протеиназ под контролем собственного сигнального пептида и разных промоторов: индуцибельного промотора P_{LiaI} и конститутивного промотора P_{DegQ36}. Показано, что максимальная протеолитическая активность субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* в штамме *B. subtilis* MRB044 (pLIKE + SP_{AprBp} + *aprBp*) после индукции промотора составляла 0.64 ед./мл на

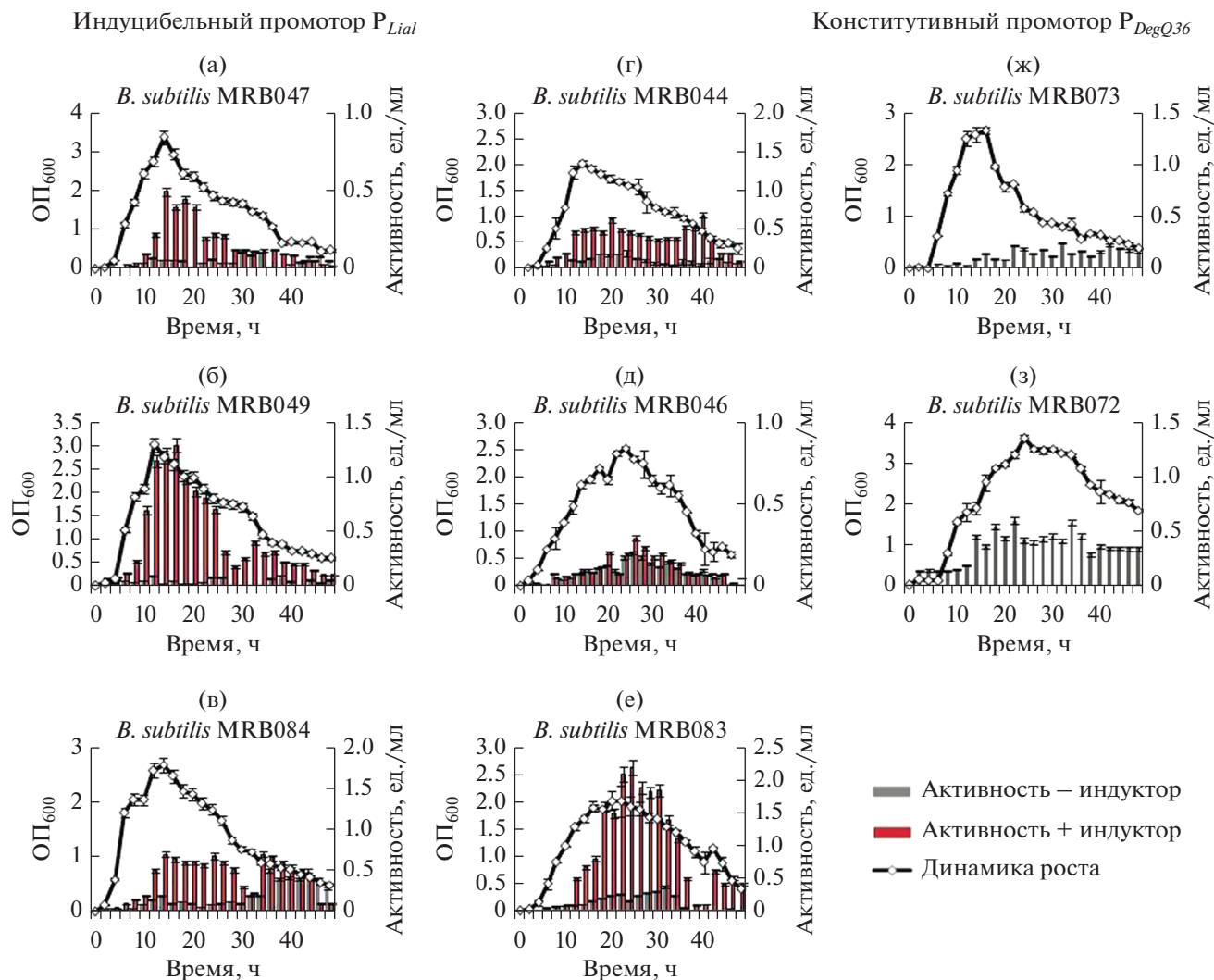


Рис. 1. Динамика роста и активности протеиназ рекомбинантных штаммов *B. subtilis* 20–36 с конструкциями генов ферментов с разными промоторами и сигнальными пептидами: а – *B. subtilis* MRB047 – ген глутамилэндопептидазы *B. pumilus* под контролем собственного сигнального пептида и индуцибельного промотора P_{Lial} ; б – *B. subtilis* MRB049 – ген глутамилэндопептидазы *B. pumilus* под контролем сигнального пептида гена гликозидгидролазы *B. megaterium* (SP_{Yngk}) и индуцибельного промотора P_{Lial} ; в – *B. subtilis* MRB084 – ген глутамилэндопептидазы *B. pumilus* под контролем смоделированного сигнального пептида (SP_{Asp}) и индуцибельного промотора P_{Lial} ; г – *B. subtilis* MRB044 – ген субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* под контролем собственного сигнального пептида и индуцибельного промотора P_{Lial} ; д – *B. subtilis* MRB046 – ген субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* под контролем сигнального пептида гена гликозидгидролазы *B. megaterium* (SP_{Yngk}) и индуцибельного промотора P_{Lial} ; е – *B. subtilis* MRB083 – ген субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* под контролем смоделированного сигнального пептида (SP_{Asp}) и индуцибельного промотора P_{Lial} ; ж – *B. subtilis* MRB073 – ген глутамилэндопептидазы *B. pumilus* под контролем собственного сигнального пептида и конститутивного промотора P_{DegQ36} ; з – *B. subtilis* MRB072 – ген субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* под контролем собственного сигнального пептида и конститутивного промотора P_{DegQ36} . Серыми столбцами обозначена протеолитическая активность в отсутствие индуктора, красными столбцами – протеолитическая активность с индуктором (бацитрацин).

20 ч роста, активность в штамме под контролем конститутивного промотора *B. subtilis* MRB072 ($pGP382 + aprBp$) составляла 0.62 ед./мл на 22 ч роста. Максимальная протеолитическая активность глутамилэндопептидазы в штамме под контролем собственного сигнального пептида и индуцибельного промотора *B. subtilis* MRB047 ($pLIKE + SP_{GseBp} + gseBp$) после индукции составляла

0.47 ед./мл на 18 ч роста, активность в штамме под контролем конститутивного промотора *B. subtilis* MRB073 ($pGP382 + gseBp$) составляла 0.23 ед./мл на 22 ч роста. Таким образом, активность субтилизиноподобной протеиназы практически не отличалась под контролем разных промоторов, активность глутамилэндопептидазы была выше под контролем индуцибельного промотора P_{Lial} .

Изучали активность субтилизиноподобной протеиназы под контролем собственного сигнального пептида (SP_{AprBp}) и рекомбинантных сигнальных пептидов *B. megaterium* (SP_{Yngk} , SP_{Asp}) в составе LIKE экспрессионной системы. Немецкие исследователи показали, что сигнальный пептид гена гликозидгидролазы *B. megaterium* (SP_{Yngk}), а также смоделированный *in silico* сигнальный пептид SP_{Asp} обеспечивали высокую эффективность секреции гетерологичной гликозидгидролазы *Thermobifida fusca* (в 6 раз выше, чем ее собственный сигнальный пептид) (Stammen et al., 2010). При тестировании этих сигнальных пептидов нами установлено, что максимальная протеолитическая активность субтилизиноподобной протеиназы под управлением сигнального пептида SP_{Yngk} в штамме *B. subtilis* MRB046 ($pLIKE + SP_{Yngk} + aprBp$) после индукции промотора составляла 0.3 ед./мл на 28 ч роста, а в штамме *B. subtilis* MRB083 под контролем сигнального пептида SP_{Asp} ($pLIKE + SP_{Asp} + aprBp$) – 2.2 ед./мл на 24 ч роста, что указывает на большую эффективность смоделированного сигнально пептида (рис. 1д, 1е).

Изучали активность глутамилэндопептидазы под контролем собственного сигнального пептида (SP_{GseBp}) и рекомбинантных сигнальных пептидов *B. megaterium* (SP_{Yngk} , SP_{Asp}) в составе LIKE экспрессионной системы. Показали, что максимальная активность глутамилэндопептидазы в штамме *B. subtilis* MRB049 под управлением сигнального пептида SP_{Yngk} ($pLIKE + SP_{Yngk} + gseBp$) после индукции промотора составила 1.3 ед./мл на 16 ч роста, в штамме *B. subtilis* MRB084 под контролем сигнального пептида SP_{Asp} ($pLIKE + SP_{Asp} + gseBp$) составила 0.75 ед./мл на 16 ч роста (рис. 1б, 1в).

Таким образом, замена собственного сигнального пептида субтилизиноподобной протеиназы (SP_{AprBp}) на смоделированный сигнальный пептид SP_{Asp} в сочетании с сильным индуцибельным промотором P_{Lial} позволила повысить активность фермента в 4 раза, а замена собственного сигнального пептида глутамилэндопептидазы (SP_{GseBp}) на рекомбинантный сигнальный пептид SP_{Yngk} позволила повысить активность фермента в 9 раз.

Изучали экспрессию протеиназ *B. pumilus* в штамме *B. subtilis* 27-31, в геноме которого методом направленного редактирования удалены гены, продукты которых ответственны за споруляцию, образование биопленок, антимикробных метаболитов и внеклеточных протеиназ. Динамика роста рекомбинантных штаммов *B. subtilis* 27-31, секретирующих субтилизиноподобную протеиназу и глутамилэндопептидазу, была схожей: к 12–14 ч роста рекомбинантные культуры достигали максимальной оптической плотности и переходили в фазу отмирания культуры, стационарная фаза практически отсутствовала (рис. 2). Проводили

сравнительный анализ активности субтилизиноподобной протеиназы под контролем собственного сигнального пептида и разных промоторов: индуцибельного промотора P_{Lial} и конститутивного промотора P_{DegQ36} . Показано, что максимальная протеолитическая активность субтилизиноподобной протеиназы в культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis* MRB089 под контролем индуцибельного промотора ($pLIKE + SP_{AprBp} + aprBp$) после индукции составляла 0.8 ед./мл на 14 ч роста, активность протеиназы в культуральной жидкости штамма под контролем конститутивного промотора *B. subtilis* MRB080 ($pGP382 + aprBp$) составляла 0.85 ед./мл на 16 ч роста (рис. 2г, 2з). Таким образом, полученные данные по активности субтилизиноподобной протеиназы в штамме *B. subtilis* 27-31 коррелируют с активностью протеиназы в штамме *B. subtilis* 20-36, активность протеиназы под контролем собственного сигнального пептида и разных промоторов практически не различалась.

Оценивали активность субтилизиноподобной протеиназы в культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis* 27-31 под контролем индуцибельного промотора P_{Lial} и рекомбинантных сигнальных пептидов *B. megaterium* (SP_{Yngk} , SP_{Asp}). Нами установлена максимальная протеолитическая активность в культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis* MRB091 под контролем смоделированного сигнального пептида SP_{Asp} ($pLIKE + SP_{Asp} + aprBp$) – 1.8 ед./мл, в культуральной жидкости штамма *B. subtilis* MRB090 под контролем сигнального пептида SP_{Yngk} ($pLIKE + SP_{Yngk} + aprBp$) после индукции промотора активность составила 0.32 ед./мл (рис. 2д, 2е). Таким образом, для оптимальной экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы наиболее эффективным является гетерологичный смоделированный сигнальный пептид (SP_{Asp}) в сочетании с сильным индуцибельным промотором P_{Lial} .

Сравнивали активность глутамилэндопептидазы под контролем собственного сигнального пептида и двух промоторов (P_{Lial} и P_{DegQ36}) в штамме *B. subtilis* 27-31. Показано, что максимальная активность глутамилэндопептидазы в штамме под контролем собственного сигнального пептида и индуцибельного промотора *B. subtilis* MRB085 ($pLIKE + SP_{GseBp} + gseBp$) после индукции составляла 0.18 ед./мл на 14 ч роста, активность в штамме под контролем конститутивного промотора *B. subtilis* MRB081 ($pGP382 + gseBp$) составляла 0.34 ед./мл на 12 ч роста (рис. 2а, 2ж). Таким образом, при экспрессии гена глутамилэндопептидазы под контролем собственного сигнального пептида более эффективным является конститутивный промотор.

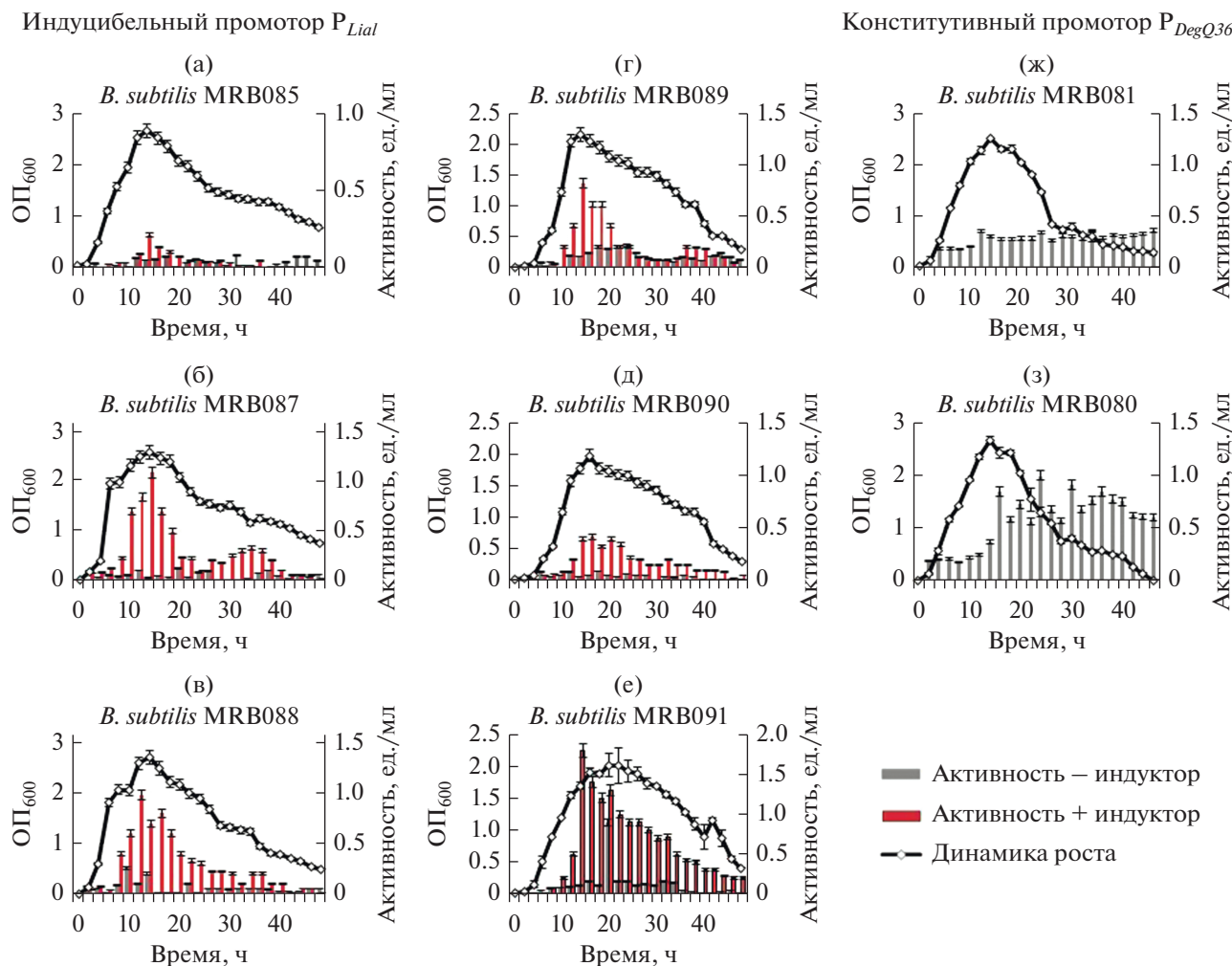


Рис. 2. Динамика роста и активности протеиназ рекомбинантных штаммов *B. subtilis* 27-31 с конструкциями генов ферментов с разными промоторами и сигнальными пептидами: а – *B. subtilis* MRB085 – ген глутамилэндопептидазы *B. pumilus* под контролем собственного сигнального пептида и индуцибельного промотора P_{LiaI} ; б – *B. subtilis* MRB087 – ген глутамилэндопептидазы *B. pumilus* под контролем рекомбинантного сигнального пептида гена гликозилгидролазы *B. megaterium* (SP_{Yngk}) и индуцибельного промотора P_{LiaI} ; в – *B. subtilis* MRB088 – ген глутамилэндопептидазы *B. pumilus* под контролем смоделированного сигнального пептида (SP_{Asp}) и индуцибельного промотора P_{LiaI} ; г – *B. subtilis* MRB089 – ген субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* под контролем собственного сигнального пептида и индуцибельного промотора P_{LiaI} ; д – *B. subtilis* MRB090 – ген субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* под контролем рекомбинантного сигнального пептида гена гликозилгидролазы *B. megaterium* (SP_{Yngk}) и индуцибельного промотора P_{LiaI} ; е – *B. subtilis* MRB091 – ген субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* под контролем смоделированного сигнального пептида (SP_{Asp}) и индуцибельного промотора P_{LiaI} ; ж – *B. subtilis* MRB081 – ген глутамилэндопептидазы *B. pumilus* под контролем собственного сигнального пептида и конститутивного промотора P_{DegQ36} ; з – *B. subtilis* MRB080 – ген субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* под контролем собственного сигнального пептида и конститутивного промотора P_{DegQ36} . Серыми столбцами обозначена протеолитическая активность в отсутствие индуктора, красными столбцами – протеолитическая активность с индуктором (бацитрацин).

Изучали активность глутамилэндопептидазы под контролем рекомбинантных сигнальных пептидов *B. megaterium* (SP_{Yngk} , SP_{Asp}) в составе LIKE экспрессионной системы в штамме *B. subtilis* 27-31. Показано, что максимальная активность глутамилэндопептидазы в культуральной жидкости модифицированного штамма *B. subtilis* MRB087 под контролем сигнального пептида SP_{Yngk} ($pLIKE + SP_{Yngk} + gseBp$) после индукции промотора со-

ставляла 1.1 ед./мл; в культуральной жидкости штамма *B. subtilis* MRB088 под контролем смоделированного сигнального пептида ($pLIKE + SP_{Asp} + gseBp$) активность глутамилэндопептидазы составила 0.98 ед./мл (рис. 2б, 2в). Таким образом, для получения внеклеточной глутамилэндопептидазы наиболее эффективными являются рекомбинантные сигнальные пептиды (SP_{Yngk} и SP_{Asp}) в сочетании с сильным индуцибельным промотором P_{LiaI} .

Таблица 2. Количественный анализ секретируемых протеиназ рекомбинантными штаммами

Штамм	Целевой белок (мкг/мкл), индуктор “-”/“+”	Штамм	Целевой белок (мкг/мкл), индуктор “-”/“+”
субтилизиноподобная протеиназа (<i>AprBp</i>)		глутамилэндопептидаза (<i>GseBp</i>)	
<i>B. subtilis</i> 20-36		<i>B. subtilis</i> 20-36	
<i>B. subtilis</i> MRB044 (<i>SP_{aprBp}</i>)	0.024/1.5	<i>B. subtilis</i> MRB047 (<i>SP_{gseBp}</i>)	0.00036/0.005
<i>B. subtilis</i> MRB046 (<i>SP_{Yngk}</i>)	0.005/0.03	<i>B. subtilis</i> MRB049 (<i>SP_{Yngk}</i>)	0.006/0.06
<i>B. subtilis</i> MRB092 (<i>SP_{Asp}</i>)	0.032/1.6	<i>B. subtilis</i> MRB093 (<i>SP_{Asp}</i>)	0.0042/0.04
<i>B. subtilis</i> MRB072 (<i>pGP382 + aprBp</i>)	0.08	<i>B. subtilis</i> MRB073 (<i>pGP382 + gseBp</i>)	0.038
<i>B. subtilis</i> 27-31		<i>B. subtilis</i> 27-31	
<i>B. subtilis</i> MRB089 (<i>SP_{aprBp}</i>)	0.02/0.7	<i>B. subtilis</i> MRB085 (<i>SP_{gseBp}</i>)	0.0001/0.002
<i>B. subtilis</i> MRB090 (<i>SP_{Yngk}</i>)	0.0046/0.01	<i>B. subtilis</i> MRB087 (<i>SP_{Yngk}</i>)	0.002/0.04
<i>B. subtilis</i> MRB091 (<i>SP_{Asp}</i>)	0.022/0.9	<i>B. subtilis</i> MRB088 (<i>SP_{Asp}</i>)	0.0001/0.001
<i>B. subtilis</i> MRB080 (<i>pGP382 + aprBp</i>)	0.03	<i>B. subtilis</i> MRB081 (<i>pGP382 + gseBp</i>)	0.034

Масс-спектрометрический анализ культуральной жидкости исследуемых штаммов для количественного определения сериновых протеиназ. Для количественной оценки внеклеточных протеиназ рекомбинантных штаммов, а также оценки влияния оптимизации экспрессионной системы мы использовали подход на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии/танDEMной масс-спектрометрии в режиме мониторинга множественных реакций (MPM). Эта технология позволяет с высокой чувствительностью определить количественное содержание целевого белка и при этом не требует наработки специфичных антител. Для количественной оценки сериновых протеиназ с применением программного обеспечения Skyline конструировали уникальные протеотипические пептиды для каждого фермента на основе их первичной структуры: NAVDTANNR для субтилизиноподобной протеиназы, TDTNIGNTVGYR для глутамилэндопептидазы (степень чистоты пептидов составляла >98%) (Toumentseva et al., 2020).

По результатам MPM-анализа нами показано, что оптимизация экспрессионной системы с использованием рекомбинантного сигнального пептида *SP_{Yngk}* *B. megaterium* в протеазодефицитном штамме *B. subtilis* 20-36 позволила увеличить секрецию глутамилэндопептидазы (после индукции промотора *P_{Lial1}*) в 60 раз по сравнению со штаммом, где глутамилэндопептидаза находится под контролем собственного сигнального пептида *SP_{GseBp}*.

Штамм *B. subtilis* 20-36 с системой экспрессии для субтилизиноподобной протеиназы, содержащий смоделированный сигнальный пептид *SP_{Asp}* под контролем индуцибельного промотора *P_{Lial1}*, оказался более эффективным для продукции фермента: концентрация белка после индукции LIKE-системы увеличилась в 66 раз (табл. 2). Количественный анализ секретируемых протеиназ рекомбинантными штаммами показал, что более эффективным реципиентным штаммом является протеазодефицитный штамм *B. subtilis* 20-36 (табл. 2), максимальное количество субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы составило 1.6 и 0.06 мкг/мкл соответственно. В штамме *B. subtilis* 27-31 с редактированным геномом максимальное количество субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы составило 0.9 и 0.04 мкг/мкл. Отсутствие корреляции между активностью и количеством белка в штамме *B. subtilis* 27-31, по-видимому, связано с быстрым отмиранием культуры после достижения максимума роста (рис. 2).

В настоящем исследовании нами изучена экспрессия сериновых протеиназ *B. pumilus* (субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы) под контролем разных промоторов и сигнальных пептидов в реципиентных штаммах *B. subtilis*. Показано, что для продукции субтилизиноподобной протеиназы наиболее эффективной оказалась конструкция в протеазодефицитном штамме-реципиенте *B. subtilis* 20-36, содержащая LIKE-систему

экспрессии и смоделированный сигнальный пептид SP_{Asp}, количество белка составило 1.6 мкг/мкл, что в 66 раз больше по сравнению с секрецией под контролем собственного сигнального пептида. Для продукции глутамилэндопептидазы наиболее эффективным оказался сигнальный пептид гена гликозидгидролазы *B. megaterium* SP_{Yngk}, количество белка после индукции промотора составило 0.06 мкг/мкл. Таким образом, с применением количественных методов анализа нами установлено, что в процессе оптимизации экспрессионной системы у бацилл для каждой гетерологичной конструкции важно подбирать промоторы и сигнальные пептиды, чтобы обеспечить условия эффективной секреции, а также применять оптимальный штамм-продуцент.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета, поддержана грантом РФФИ № 19-08-00853а и субсидией, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности, проект № 0671-2020-0058 (масс-спектрометрический анализ).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Armenteros J.J.A., Tsirigos K.D., Sonderby C.K., Petersen T.N., Winther O., Brunak S., Nielsen H. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks // *Nat. Biotechnol.* 2019. V. 37. P. 420–423.
- Brockmeier U., Caspers M., Freudl R., Jockwer A., Noll T., Eggert T. Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*: a powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive bacteria // *J. Mol. Biol.* 2006. V. 362. P. 393–402.
- Cai D., Rao Y., Zhan Y., Wang Q., Chen S. Engineering *Bacillus* for efficient production of heterologous protein: current progress, challenge and prospect // *J. Appl. Microbiol.* 2019. V. 126. P. 1632–1642.
- Chen J., Gai Y., Fu G., Zhou W., Zhang D., Wen J. Enhanced extracellular production of α -amylase in *Bacillus subtilis* by optimization of regulatory elements and over-expression of PrsA lipoprotein // *Biotechnol. Lett.* 2015. V. 37. P. 899–906.
- Contesini F.J., Melo R.R., Sato H.H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2018. V. 38. P. 321–334.
- Cui W., Han L., Suo F., Liu Z., Zhou L., Zhou Z. Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 34. Art. 145.
- Demidyuk I.V., Romanova D.V., Nosovskaya E.A., Chestukhina G.G., Kuranova I.P., Kostrov S.V. Modification of substrate-binding site of glutamyl endopeptidase from *Bacillus intermedium* // *Protein Eng. Des. Sel.* 2004. V. 17. P. 411–416.
- Ferrari F.A., Capello J. Biosynthesis of protein polymers // *Protein-Based Materials. Bioengineering of Materials* / Eds. McGrath K., Kaplan D. Boston: Birkhäuser, 1997. P. 37–60.
https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4094-5_2
- Gu Y., Xu X., Wu Y., Niu T., Liu Y., Li J., Du G., Liu L. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: From rational design to industrial applications // *Metab. Eng.* 2018. V. 50. P. 109–121.
- Huang X., Cao L., Qin Z., Li S., Kong W., Liu Y. Tat-independent secretion of polyethylene terephthalate hydrolase PETase in *Bacillus subtilis* 168 mediated by its native signal peptide // *J. Agric. Food Chem.* 2018. V. 66. P. 13217–13227.
- Msadek T., Kunst F., Henner D., Klier A., Rapoport G., Dedonder R. Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in *Bacillus subtilis*: expression of the regulatory genes and analysis of mutations in *degS* and *degU* // *J. Bacteriol.* 1990. V. 172. P. 824–834.
- Sambrook J., Green M.R. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th edn. N.Y.: Cold Spring Harbor, 2012. P. 1885.
- Stammen S., Müller B.K., Korneli C., Biedendieck R., Gamer M., Franco-Lara E., Jahn D. High-yield intra- and extracellular protein production using *Bacillus megaterium* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. P. 4037–4046.
- Tikhonova A., Toymentseva A., Sharipova M. Screening of heterologous signal peptides for optimization of the LIKE-expression system // *BioNanoSci.* 2017. V. 7. P. 408–414.
- Toya Y., Hirasawa T., Morimoto T., Masuda K., Kageyama Y., Ozaki K., Ogasawara N., Shimizu H. ¹³C-metabolic flux analysis in heterologous cellulase production by *Bacillus subtilis* genome-reduced strain // *J. Biotechnol.* 2014. V. 179. P. 42–49.
- Toymentseva A.A., Koryagina A.O., Laikov A.V., Sharipova M.R. Label-free multiple reaction monitoring, a promising method for quantification analyses of specific proteins in bacteria // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. Art. 4924.
- Toymentseva A.A., Schrecke K., Sharipova M.R., Mascher T. The LIKE system, a novel protein expression toolbox for based on the promoter // *Microb. Cell Fact.* 2012. V. 11. P. 143–156.
- Zhang K., Su L., Duan X., Liu L., Wu J. High-level extracellular protein production in *Bacillus subtilis* using an optimized dual-promoter expression system // *Microb. Cell Fact.* 2017. V. 16. P. 1–15.
<https://doi.org/10.1186/s12934-017-0649-1>
- Zhang K., Su L., Wu J. Recent advances in recombinant protein production by *Bacillus subtilis* // *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2020. V. 11. P. 295–318.

Quantitative Analysis of *Bacillus pumilus* Serine Proteinases in Recombinant *Bacillus* Strains

A. O. Koryagina^{1, *}, F. R. Osmanova¹, A. A. Toymentseva¹, A. V. Laikov¹, and M. R. Sharipova¹

¹Kazan Federal University, Kazan, 420008 Republic of Tatarstan, Russia

*e-mail: tihonovaa093@gmail.com

Received October 6, 2021; revised October 26, 2021; accepted October 27, 2021

Abstract—A comparative study of the expression of *B. pumilus* extracellular serine proteinases (subtilisin-like proteinase and glutamyl endopeptidase) under the control of different promoters and signal peptides based on the LIKE expression system in various *B. subtilis* recipient strains was carried out using mass spectral analysis in the monitoring of multiple reactions (MRM) mode. The maximum expression of the subtilisin-like proteinase was established under the control of a simulated signal peptide (SP_{Asp}) and an inducible promoter of the P_{Lial} – LIKE expression system in the protease-deficient strain *B. subtilis* 20-36; the amount of secreted protein was 1.6 µg/µL of the culture liquid. The optimal expression of glutamyl endopeptidase was established under the control of the signal peptide of the *Bacillus megaterium* glycoside hydrolase gene (SP_{Yngk}) and the inducible promoter P_{Lial} in the protease-deficient strain *B. subtilis* 20-36, the maximum amount of protein was 0.06 µg/µL. It was concluded that selection of all components of the expression system for individual secreted proteins is of importance, including the selection of the optimal signal peptide.

Keywords: *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, subtilisin-like proteinase, glutamyl endopeptidase, expression systems, optimization, mass spectral analysis