

# Regulace syntézy exocelulárních proteas u bacilů

577.152 579

Dr. JIŘÍ CHALOUPKA, DrSc., Dr. JARMILA PAZLAROVÁ, CSc., Dr. MILADA DVOŘÁKOVÁ, Dr. HELENA KUČEROVÁ, Dr. MARIE STRNADOVÁ, Dr. LIBUŠE VÁCHOVÁ a Ing. JAROSLAV VOTRUBA, CSc.; Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha, oddělení enzymového inženýrství

**Klíčová slova:** *bacily, proteasy, regulace, represe, teplota, růst, sporulace*

Mikrobiální proteasy (= proteinasy, správně endopeptidasy) patří ke čtyřem typům enzymů: jsou to enzymy pepsinového typu s kyselým optimálním pH- (především houbové proteasy), široce zastoupené jsou neutrální metaloproteasy a alkalické enzymy serinového typu. Enzymy papainového typu (-SH proteasy) se vyskytují jen řídce. Z průmyslového hlediska mají význam především extracelulární kyselé a alkalické proteasy. První se používají v sýrařství jako částečná náhrada chymosinu, druhé jako součást pracích prášků. Mikrobiální proteasy se však uplatňují v potravinářském průmyslu (pekařství, pivovarství, masný průmysl), v koželužství, v medicíně a dalších odvětvích [1]. Bacily, které patří k nejvýznamnějším producentům průmyslových enzymů, vylučují do prostředí neutrální a alkalické proteasy. Pro

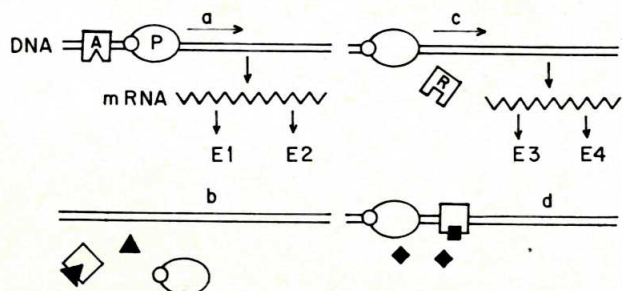
jejich efektivní fermentační výrobu, stejně jako pro cílený výběr produkčních mutant je důležité znát genetické a metabolické principy kontroly jejich syntézy. V této přehledné práci chceme konfrontovat dva převládající typy regulací, jež mohou ovlivnit jejich produkci — represí (potlačení syntézy) živinami a závislost jejich syntézy na sporulaci. Obsáhlá studie v tomto směru, ale s poněkud širší problematikou byla publikována *Priestem* [2].

Než se budeme podrobněji zabývat mechanismy, jež se uplatňují v regulaci syntézy proteas, chceme se stručně zmínit o hlavních rozdílech v kontrole tvorby enzymů v množících se a sporulujících buňkách.

V rostoucích populacích (a u nesporulujících i v nerostoucích kulturách) bakterií je syntéza enzymů kon-



trolována buď indukci, nebo represí. V prvním případě je tvorba enzymu vyvolána přítomností jeho substrátu nebo jiného metabolitu, označovaného jako induktor. Obecně známým příkladem je syntéza  $\beta$ -galaktosidasy, indukované laktosou. Při represí metabolit (korepresor) naopak tvorbu enzymu znemožní. Jak represe tak i indukce se realizuje prostřednictvím tzv. regulačních bílkovin, které reagují buď s induktorem, nebo korepresorem a jsou schopny rozeznat regulační oblast příslušného genu. Protože tvorba většiny proteas je regulována represí, povšimneme si podrobněji tohoto typu kontroly. Represe sama může být založena jednak na pozitivní (obr. 1 a, b), jednak na negativní (obr. 1 c, d) kontrole exprese genů. V prvním případě má regulační bílkovina povahu aktivátoru (A). Její interakce s regulační oblastí genu nebo operonu stimuluje nasednutí enzymu RNA polymerasy (P) na počátek (promotor) genu a jeho přepis na informační ribonukleovou kyselinu (mRNA).

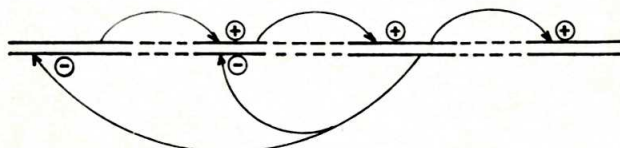


Obr. 1. Mechanismus represe syntézy enzymů  
(Podrobnosti viz text)

„Překladem“ mRNA na ribosomech jsou vytvářeny molekuly jednoho nebo několika druhů enzymů (v našem případě dvou  $E_1$  a  $E_2$ ). RNAPolymerasa je složitý enzym, obsahující několik podjednotek. Z regulačního hlediska je důležitá podjednotka sigma (značena kroužkem), spojená s ostatními podjednotkami poměrně volně, která velmi přesně rozpoznává na promotoru specifickou kombinaci nukleotidů, určující místo, na něž RNAPolymerasa nasedne. Jestliže do buňky vstoupí molekuly korepresoru (plně trojúhelníky), naváží se na aktivační bílkovinu (A), která ztratí schopnost interagovat s DNA a stimulovat nasedání RNAPolymerasy na promotor. Syntéza enzymu se proto zastaví.

Negativní kontrola naopak spočívá v tom, že regulační bílkovina — represor (R) může zabránit přepisu mRNA RNAPolymerasou. V přítomnosti korepresoru (černé čtverečky) — obr. 1d — se represor naváže sám na počátek genu, z něhož buď vytěsni RNAPolymerasu, nebo znemožní její pohyb. V nepřítomnosti korepresoru je však represor neaktivní, a proto může syntéza enzymů probíhat nerušeně (obr. 1c). Podrobněji o kontrole syntézy bílkovin viz Chaloupka [3, 4] a Škoda a Škodová [5].

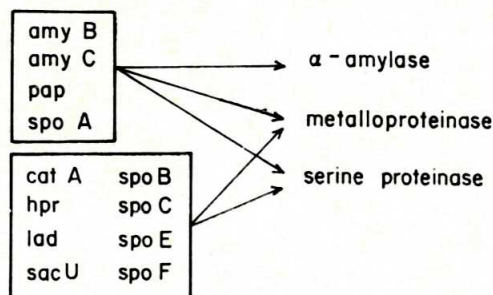
Regulace syntézy bílkovin při sporulaci je založena na podobných principech, je však poněkud složitější. Především se ve sporulujících buňkách vytvářejí různé  $\sigma$ -podjednotky RNAPolymerasy, které nahrazují  $\sigma$ -podjednotku přítomnou v rostoucích buňkách. Sporulační  $\sigma$  rozeznává jiné seskupení nukleotidů v promotoru a umožňuje tím, že sporulační lokusy (skupiny genů),



Obr. 2. Schéma následné indukce (+) a represe (—) syntézy bílkovin v průběhu sporulace bacilů

jichž je několik desítek, jsou přepisovány na mRNA pouze za sporulace. Druhou zvláštností jejich kontroly je vzájemná návaznost jejich exprese (obr. 2). Sporulační lokusy obsahují asi několik genů, z nichž jeden pravděpodobně kóduje aktivační bílkovinu, stimulující transkripci následujícího [— na obr. 2 znázorněno (+)]. Sporulační lokusy jsou však obvykle aktivní pouze po krátký časový úsek. Je to podle převládajících představ umožněno tím, že některé lokusy kódují represory, které „vypínají“ transkripci předcházejících genů — znázorněno (—).

Některé bacily, např. průmyslově využívaný *Bacillus subtilis*, syntetizují proteasy (neutrální a alkalickou) pouze v postexponenciální fázi růstu a na počátku sporulace. Jejich tvorba je tedy v zásadě regulována principy znázorněnými na obr. 2. Protože obě proteasy patří mezi exocelulární enzymy, je jejich syntéza a exkrece z buňky kontrolována celým souborem genů regulujících specificky jejich vlastní syntézu, jejich exkreci do média i sporulační mechanismus [6, 7, 8] — obr. 3. Mutace všech skupin genů může vést jak ke zvýšení, tak ke snížení produkce obou enzymů. Zajímavý výsledek mají mutace postihující sporulaci. Většina z nich vede ke ztrátě schopnosti tvořit proteasy, protože obvykle blokují počátek sporulace. Celá sekvence postupných aktivací genů se tím naruší a k expresi proteasových genů nedojde. Naproti tomu mutace postihující pozdější sporulační lokusy může mít za následek zablokování genů, jejichž produkty „vypínají“ syntézu proteas. Oba enzymy tedy mohou být produkovány po podstatně delší dobu než při sporulaci [9].



Obr. 3. Geny kontrolující syntézu exocelulárních enzymů u *B. subtilis*

Horní skupina genů kontroluje exkreci bílkovin, spodní kontroluje sporulaci nebo přímo syntézu proteas.

Geny pro alkalickou i neutrální proteasu *Bacillus subtilis* a některých dalších bacilů se podařilo izolovat a klónovat metodami genového inženýrství [10, 11]. Analýza nukleotidové sekvence jejich promotorové oblasti pomohla objasnit jejich závislost na sporulaci. Obsahuje totiž kombinace nukleotidů rozpoznávané sporulačními  $\sigma$ -podjednotkami RNAPolymerasy, ne však její vegetativní formou.

*Bacillus megaterium*, jež je objektem našeho studia, syntetizuje pouze jednu proteasu — metaloenzym. Na rozdíl od *Bacillus subtilis*, jsou naše vědomosti o syntéze proteasy u *B. megaterium* založeny převážně na studiu jeho fyziologie a částečně na analýze povahy jeho regulačních mutantů. Protože *B. megaterium* není dobře přístupný genetickým manipulacím, nebyla u něho dosud nikým provedena izolace, klónování a sekvenace proteasového genu.

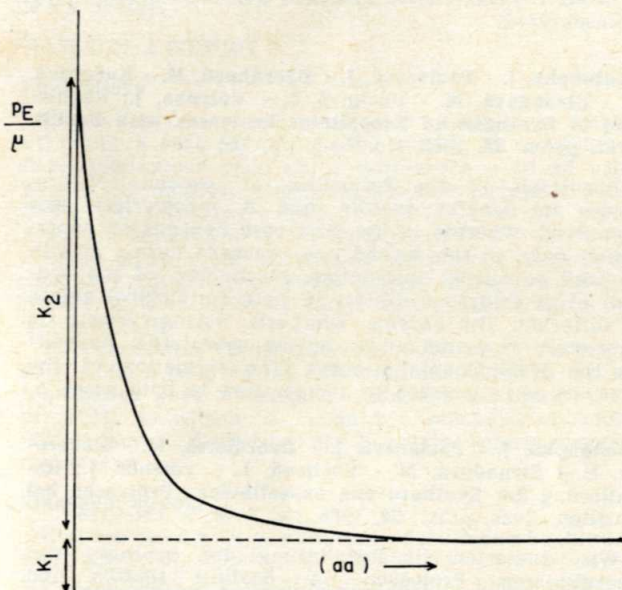
*Bacillus megaterium* syntetizuje a exkretuje neutrální metaloproteasu během růstu i během sporulace. Syntéza enzymu v rostoucích buňkách se kontroluje represí, v níž hrají klíčovou úlohu aminokyseliny [12, 13]. Její regulace je tedy za těchto podmínek pravděpodobně založena na principech znázorněných na obr. 1. Nevíme však, zda regulační bílkovinou je aktivační bílkovina (obr. 1 a, b) nebo represor (obr. 1 c, d). Nevíme rovněž, zda korepresorem jsou aminokyseliny jako takové, nebo nějaký jejich metabolit. Při sledování vztahu mezi spe-



cifickou rychlostí syntézy proteasy a koncentrací aminokyselin v médiu byla odvozena křivka (obr. 4), z níž vyplývá matematická formulace vyjadřující kontrolu produkce proteasy ( $p_E$ ) aminokyselinami.

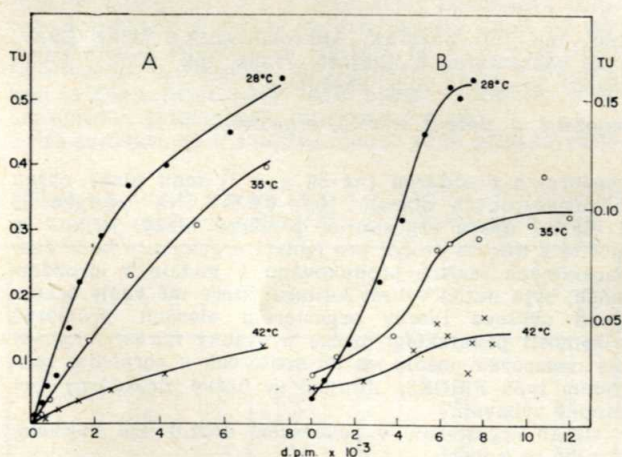
$$\frac{p_E}{\mu} = k_1 + k_2 \cdot e^{-k_3(aa)}$$

kde  $\mu$  je specifická růstová rychlost,  $k_1$  konstanta určující nereprimovatelnou syntézu enzymu,  $k_2$  konstanta vyjadřující syntézu enzymu v nepřítomnosti aminokyselin,



Obr. 4. Vztah mezi koncentrací aminokyselin a produkcí proteasy u *B. megaterium*  
[Podrobnosti uvedeny v textu]

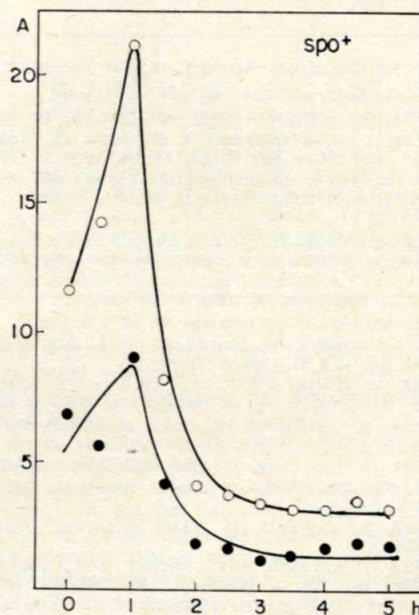
$k_3$  je represní koeficient, specifický pro danou směs aminokyselin,  $aa$  je koncentrace aminokyselin. Vedle složení média se uplatňuje v regulaci syntézy exocelulární proteasy i teplota. Specifická rychlost syntézy enzymu klesá se stoupající teplotou a je kontrolována na transkripční i posttranskripční úrovni [14, 15] — obr. 5A.



Obr. 5. Potlačení tvorby proteasy za růstu (A) a za sporulace (B) teplotou

Aktivita enzymu je udána v tyrosinových jednotkách (TU/ml), syntéza bílkovin (dpm) byla měřena inkorporací  $^{14}\text{C}$ -leucinu. Teploty v  $^{\circ}\text{C}$  jsou uvedeny u jednotlivých křivek.

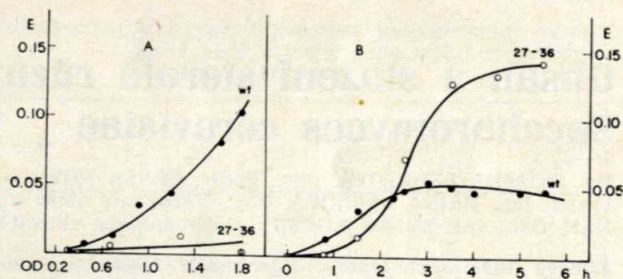
Tvorba proteasy v průběhu sporulace je u *B. megaterium* mnohem méně citlivá k represí aminokyselinami, než je její syntéza za růstu [16]. Mimo to probíhá pouze po 1–2 hodiny a potom se téměř zastaví (obr. 6).



Obr. 6. Rychlost syntézy proteasy při inkubaci ve sporulačním médiu (B)

A — enzymová aktivita vytvořená během 30 minut, vztažená k 1 mg sušiny buněk (o) a k rychlosti inkorporace  $^{14}\text{C}$ -leucinu do bílkovin (●), h — hodiny inkubace ve sporulačním médiu.

Zvyšování rychlosti syntézy enzymu a jeho náhlé vypnutí po 2. hodině sporulace naznačují, že jeho tvorba je v tomto případě kontrolována sporulačním mechanismem (obr. 2), na rozdíl od jeho kontroly v rostoucích buňkách, kde se uplatňuje represe aminokyselinami.



Obr. 7. Syntéza proteasy během růstu (A) a při inkubaci ve sporulačním médiu (B)

E — enzymová aktivita (TU/ml), OD — optická hustota kultury, h — hodiny; wt — původní kmen (spo+), 27–36 mutanta (spo–).

Ve snaze potvrdit nebo vyvrátit představu o dvojí kontrole syntézy proteasy u *B. megaterium* jsme se snažili získat po mutagením zásahu EMS (ethylmethylsulfonát) mutanty, které by se od výchozího kmene lišily v syntéze enzymu buď za růstu, nebo za sporulace [17]. Nejzajímavější z těchto mutantů je asporogenní kmen 27–36, který během růstu proteasy téměř netvoří, ale ve sporulačním médiu ji naopak syntetizuje větší množství než výchozí kmen (obr. 7). Pravděpodobně jde o mutaci v pozdějších sporulačních stádiích, která nedovede včas „vypnout“ expresi proteasového genu, aktivovaného na počátku sporulace. Existence mutací podobného typu



naznačuje, že syntéza enzymu za obou fyziologických stavů je regulována odlišně. Nicméně i během sporulace zůstává tvorba proteasy citlivá k teplotě (obr. 5 B). Teplota však nepříznivě ovlivňuje i vlastní sporulaci, a proto nelze říci, zda je v tomto případě tvorba proteasy postižena primárně, nebo v důsledku inhibice sporulace.

### Literatura

- [1] ANSTRUP, K.: *Economic microbiol.*, **5**, 1981, s. 49—114.
- [2] PRIEST, F. G.: *Bacteriol. Rev.*, **41**, 1977, s. 711—753.
- [3] CHALOUPKA, J.: *Biologické listy*, **45**, 1980, s. 81—101.
- [4] CHALOUPKA, J., V. Krumphanzl, Z. Reháček, ed. *Modern bio technology*, UNESCO a MBÚ ČSAV, Praha, 1984, s. 248—291.
- [5] ŠKODA, J., ŠKODOVÁ, H.: *Molekulární genetika pro potravinářské chemiky a biotechnology*, SNTL/ALFA, Praha, 1984, s. 1—205.
- [6] HOCH, J. A.: *Advances in genetics*, **18**, 1976, s. 69—98.
- [7] PIGGOT, P. J., COOTE, J. G.: *Bacteriol. Rev.*, **40**, 1976, s. 908 až 962.
- [8] PIGGOT, P. J.: *Biol. Rev.*, **54**, 1979, s. 347—367.
- [9] DOD, B. J., BALASSA, G.: *Biochimie*, **55**, 1973, s. 105.
- [10] WONG, S. L., PRICE, C. W., GOLDFARB, D. S., DOI, R. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1984, s. 1184—1188.
- [11] VASANTHA, N., THOMPSON, L. D., RHODES, C., BANNER, C., NAGLE, J., FILPULA, D.: *J. Bacteriol.*, **159**, 1984, s. 811—819.
- [12] CHALOUPKA, J., KŘEČKOVÁ, P.: *Folia Microbiol.*, **11**, 1966, s. 82—88.
- [13] CHALOUPKA, J.: *Ann. Inst. Pasteur*, **117**, 1989, s. 631—636.
- [14] VÁVROVÁ, M., CHALOUPKA, J.: *Folia Microbiol.*, **28**, 1983, s. 65—70.
- [15] CHALOUPKA, J., VÁVROVÁ, M.: *FEMS Microbiol. Letters*, **17**, 1983, s. 327—329.
- [16] CHALOUPKA, J., SEVERIN, A. I., SASTRY, K. J., KUČEROVÁ H., STRNADOVÁ, M.: *Can. J. Microbiol.*, **28**, 1982, s. 1214—1218.
- [17] KUČEROVÁ, H., VÁCHOVÁ, L., CHALOUPKA, J.: *Folia Microbiol.*, **29**, 1984, s. 99—103.

**Chaloupka, J. - Pazlarová, J. - Dvořáková, M. - Kučerová, H. - Strnadová, M. - Váchová, L. - Votruba, J.: Regulace syntézy exocelulárních proteas u bacilů.** *Kvas. prům.* **32**, 1986, č. 7—8, s. 191—194.

Byla porovnávána regulace syntézy exocelulárních proteas u *Bacillus subtilis* a *B. megaterium*. Zatímco u prvního závisí syntéza na sporulaci, u druhého probíhá za růstu i za sporulace. Mechanismus kontroly syntézy proteasy za obou fyziologických stavů se však liší. Během růstu se uplatňuje represe aminokyselinami, v druhém závisí na průběhu sporulace. V obou případech se však tvorba proteasy snižuje při zvyšování kultivační teploty.

**Халоупка, Ю., Пазларова, Я., Дворжакова, М., Кучерова, Г., Стрнадова, М., Вахова, Л., Вотруба, Я.: Регуляция синтеза экзоцеллюлярных протеаз в бациллах.** *Квас. прум.* **32**, 1986, № 7—8, стр. 191—194.

Мы сравнивали синтез экстрацеллюлярных протеаз у *B. subtilis* и *B. megaterium*. У первого организма синтез протеаз отвисит от споруляции, у второго протеаз в течение развития культуры и в течение споруляции. Механизм регуляции в развивающейся культуре микроорганизмов основан на репрессии аминокислотами, в течение споруляции отвисит от этого процесса. В обоих случаях синтез протеазы подавлен повышенной температурой.

**Chaloupka, J. - Pazlarová, J. - Dvořáková, M. - Kučerová, H. - Strnadová, M. - Váchová, L. - Votruba, J.: Regulation of Synthesis of Exocellular Proteases with Bacilli.** *Kvas. prům.* **32**, 1986, No. 7—8, pp. 191—194.

Regulation of the formation of exocellular proteases in *Bacillus subtilis* and *B. megaterium* was compared. Whereas in the first case depends on sporulation only, in the second one proceeds during growth as well as during sporulation. Mechanism of the control of proteinase synthesis in both physiological stages is different. The enzyme synthesis during growth is repressed by amino acids, during sporulation depends on the developmental process. The formation of the protease is suppressed by temperature in both cases.

**Chaloupka, J. - Pazlarová, J. - Dvořáková, M. - Kučerová, H. - Strnadová, M. - Váchová, L. - Votruba, J.: Regulierung der Synthese von exocellulären Proteasen bei Bazillen.** *Kvas. prům.* **32**, 1986, Nr. 7—8, S. 191—194.

Wir studierten die Regulierung der Synthese von exocellulären Proteasen in *Bacillus subtilis* und *Bacillus megaterium*. Die Synthese dieser Enzyme in *Bacillus subtilis* ist von der Sporulierung abhängig, *Bacillus megaterium* synthetisiert die Protease während Wachstums und auch während Sporulierung. Die Regulierung der Enzymsynthese in beiden physiologischen Zuständen ist unterschiedlich. In der Wachstumsphase ist durch die Aminosäuren gehemmt, in der Sporulierungsphase ist von diesem Prozess abhängig. Die Proteasesynthese ist in beiden Fällen durch die erhöhte Temperatur gehemmt.