

К. П. Федорова, И. С. Шарафутдинов, Н. В. Тарасов,
Е. О. Михайлова, О. Н. Ильинская, А. Р. Каюмов

РАЗЛИЧНОЕ ВЛИЯНИЕ ГЛУТАМИНСИНТЕТАЗЫ НА ДНК-СВЯЗЫВАЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ TnrA И GlnR ИЗ *BACILLUS SUBTILIS*

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, факторы транскрипции *TnrA*, *GlnR*, глутаминсинтетаза.

Факторы транскрипции *TnrA* и *GlnR*, представители семейства *MerR* регуляторов транскрипции, у бактерий *Bacillus subtilis* контролирует гены белков азотного метаболизма в условиях недостатка и избытка азота в среде. Одним из механизмов регуляции их ДНК-связывающей активности является взаимодействие с глутаминсинтетазой. Методом поверхностного плазмонного резонанса установлено, что глутаминсинтетаза оказывает различное действие на активность этих факторов транскрипции. В присутствии ингибированной глутаминсинтетазы ДНК-связывающая активность белка *TnrA* снижается, тогда как аффинность *GlnR* к ДНК возрастает. Этот факт коррелирует с активностью факторов *TnrA* и *GlnR* в различных условиях доступности азота и характеризует глутаминсинтетазу как триггерный фермент, контролирующий азотный обмен клетки.

Key words: *Bacillus subtilis*, transcription factors *TnrA* and *GlnR*, glutamine synthetase.

The transcription factors *TnrA* and *GlnR*, members of the *MerR* family of transcription regulators, control the genes of the nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis* under conditions of nitrogen deficiency and excess, respectively. Their DNA-binding activity is regulated by the interaction with the glutamine synthetase, the key enzyme of ammonium assimilation. By surface plasmon resonance it has been established that glutamine synthetase has a different effect on the activity of these transcription factors. In the presence of inhibited glutamine synthetase, the DNA-binding activity of *TnrA* is decreased, while *GlnR* affinity to DNA increases. This fact correlates with the activity of *TnrA* and *GlnR* in various conditions of nitrogen availability and characterizes the glutamine synthetase as a trigger enzyme that controls nitrogen metabolism.

Введение

Активность генов бактерий контролируется факторами транскрипции – ДНК связывающими белками. В клетках *B. subtilis* гены азотного метаболизма регулируют факторы транскрипции *TnrA* и *GlnR*, которые относятся к семейству белков *MerR* [1, 2]. При этом белок *TnrA* активен в условиях недостатка восстановленного азота, а белок *GlnR* – в условиях его избытка. Белки семейства *MerR* находятся в клетках в димерной форме и имеют два функциональных домена [3, 4]. При этом N-концевой домен взаимодействует с ДНК, а C-концевой участвует в трансдукции сигнала. Ранее было показано, что оба белка взаимодействуют с глутаминсинтетазой, в результате чего меняется их ДНК-связывающая способность [5,6,7]. Целью данной работы был сравнительный анализ ДНК-связывающей способности белков *TnrA* и *GlnR* в присутствии глутаминсинтетазы.

Материалы и методы

Для гиперэкспрессии целевых белков использовали штамм *E. coli* BL21. Вектор pET15b («Novagen») реплицируется в клетках *E. coli*, несет сильный промотор фага T7 под контролем *lac*-оператора и обеспечивает гиперэкспрессию рекомбинантных белков с образованием гексагистидинового участка на N-конце белка в клетках *E. coli* BL21. Плазмиды pET15b-*TnrA*, pET15b-*TnrA*35, pET15b-*GlnR* и pET15b-*GlnR*40 получены ранее [7-9].

Культивирование штаммов *E. coli* проводили на среде LB. При выращивании рекомбинантных штаммов *E. coli* в среду вносили ампициллин до конечной концентрации в среде 100 мкг/мл.

Очистку нативного и рекомбинантных белков *TnrA* и *GlnR*, с 6-гистидиновой последовательностью на N-конце белка, проводили на Ni-NTA сефарозе, как описано в [7, 8].

Изучение ДНК-связывающей активности белка *TnrA* проводили методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) на приборе BIAcore X (Biacore AB, Швеция) как в работе [8]. В качестве специфической последовательности ДНК использовали олигонуклеотиды с модификацией в виде биотина на 5' конце, содержащие *TnrA*-узнаваемый участок промотора гена *nrgA* (5'биотин-AAAAC CATGT CAGGA AATCT TACAT GAAAA 3') и комплементарные олигонуклеотиды без модификации (5' TTTTC ATGTA AGATT TCCTG ACATG G TTTT 3'). Контролем служили олигонуклеотидные фрагменты гена устойчивости к ампициллину на плазмиде pET15b, в которых отсутствовала *TnrA*-узнаваемая последовательность (5'биотин-CAGTG AGGCA CCTAT CTCAG CGATC TGTCT 3', 5' AGACA GATCG CTGAG ATAGG TGCCT CACTG 3'). Гибридизацию олигонуклеотидов проводили как описано в [12]. Далее иммобилизовали готовые ДНК-дуплексы на сенсорной поверхности SA чипа (BIAcore AB). Иммобилизацию ДНК-дуплексов и анализ ДНК-связывающей способности белков *TnrA* и *GlnR* проводили при 25°C в буфере HBS (10 mM HEPES, 300 mM NaCl, EDTA 0.2 mM, 3 mM MgCl₂, 0.005% Nonidet P-40, pH 7.4). Канал 1 (FC1) чипа

Чтобы подтвердить, что именно связывание факторов транскрипции с глутаминсинтетазой оказывает влияние на их ДНК-связывающую активность, данные эксперименты были проведены с мутантными белками TnrA35 и GlnR40. Ранее было показано, что удаление 35 аминокислотных остатков с С-конца белка TnrA, а также удаление 40 аминокислотных остатков с С-конца белка GlnR делает невозможным их взаимодействие с глутаминсинтетазой [6,7]. Как видно из рисунков 2 и 3, характер взаимодействия с ДНК мутантных белков TnrA35 и GlnR40 не зависел от присутствия глутаминсинтетазы. Следовательно, именно связывание с этим ферментом модулирует ДНК-связывающую активность данных факторов транскрипции.

Подсчет кинетических параметров взаимодействия белков с ДНК (Таблица 1) показал, что в присутствии ингибированной глутаминсинтетазы ДНК-связывающая активность белка TnrA снижается в 4 раза, поскольку равновесная константа диссоциации K_D возрастает. В то же время аффинность GlnR к ДНК возрастает в 2,5 раза [1,2]. Этот факт коррелирует с активностью факторов TnrA и GlnR в различных условиях доступности азота. При этом ДНК-связывающая активность мутантных белков с делециями С-концевого домена не изменялась после внесения глутаминсинтетазы. Полученные данные характеризуют глутаминсинтетазу как триггерный фермент, контролирующий азотный обмен клетки.

Таблица 1 – Кинетические константы k_a и k_d и вычисленные равновесные константы диссоциации K_D для взаимодействия белков TnrA и GlnR с промотором гена *nrgA*

Белки	Константы скорости		K_D, M
	$k_a \times 10^4, M^{-1} \times c^{-1}$	$k_d \times 10^{-3}, c^{-1}$	
TnrAwt	6.7 ± 0.32	2.2 ± 0.17	3.2 ± 0.56
TnrAwt + GSинг.	3.8 ± 0.52	4.4 ± 0.31	11.6 ± 0.62
TnrA35	13.0 ± 0.81	4.4 ± 0.01	3.4 ± 0.55
TnrA35+ GS инг.	11.7 ± 0.53	4.1 ± 0.35	3.5 ± 0.42
GlnRwt	13.1 ± 0.42	1.9 ± 0.17	1.4 ± 0.56
GlnR wt + GSинг.	13.0 ± 0.21	0.3 ± 0.2	22 ± 0.13
GlnR40	98 ± 0.14	2.5 ± 0.09	0.3 ± 0.25
GlnR40+ GSинг.	103 ± 0.23	2.6 ± 0.18	0.3 ± 0.22

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009-2013 годы, гранта РФФИ №12-04-01226-а и Гранта по программе «Михаил Ломоносов» А/12/75478.

Литература

1. L.V. Wray, A.E. Ferson, K. Rohrer, S.H. Fisher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 8841-8845 (1996).
2. J.M. Zalieckas, L.V. Wray Jr, S.H. Fisher, *J. Bacteriol*, **188**, 2578–2585 (2006).
3. J.L. Hobman, *Mol Microbiol*, **63**, 1275-1278 (2007).
4. К.П. Федорова, И.С. Шарафутдинов, Е.Ю. Турбина, М.И. Богачев, О.Н. Ильинская, А.Р. Каюмов, *Молекулярная биология*, **47(2)**, 331-337 (2013).
5. L.V. Wray Jr, S.H. Fisher, *J. Bacteriol*, **189**, 20-27 (2007).
6. S.H. Fisher, L.V. Wray Jr, *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**, 1014–1019 (2008).
7. A. Kayumov, A. Heinrich, K. Fedorova, O. Ilinskaya, K. Forchhammer, *FEBS J.*, **278**, 1779-1788 (2011).
8. K. Fedorova, A. Kayumov, K. Woyda, O. Ilinskaja, K. Forchhammer, *FEBS Lett*, **587**, 1293-1298 (2013).
9. A. Heinrich, K. Woyda, K. Brauburger, G. Meiss, C. Detsch, J. Stülke, K. Forchhammer, *J. Biol. Chem.*, **281**, 34909-34917 (2006).
10. М.И. Богачев, Е.О. Михайлова, А.Р. Каюмов, *Вестник Казанского технологического университета*, **15**, 225-227 (2012).
11. А.Р. Каюмов М.И. Богачев Е.О. Михайлова, *Вестник Казанского технологического университета*, **8**, 175-180 (2011).
12. D.J. Hart, R.E. Speight, M.A. Cooper, J.D. Sutherland, J.M. Blackburn, *Nucleic Acids Res.*, **27**, 1063-1069 (1999).
13. А.Б. Маргулис, А.Р. Курбангалиева, Н.В. Белоногова, Л.З. Латыпова, Э.Н. Хакимуллина, Е.А. Тризна, М.И. Богачев, А.Р. Каюмов, *Вестник Казанского технологического университета*, **15**, 220-224 (2012).
14. L. V. Wray, J. M. Zalieckas, S. H. Fisher, *Cell*, **107**, 427-435 (2001).