

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 С-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 Т7 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-TnrA35, pET15b-GlnR и pET15b-GlnR40 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 использовали в качестве контрольного и наносили на него неспецифические ДНК-дуплексы, канал 2 (FC2) использовали в качестве опытного и иммобилизовали на его поверхности специфические ДНК-дуплексы. Наносили ДНК-дуплексы со скоростью 10 мкл/мин на каждый канал SA чипа до

количества ДНК на поверхности равному 1800 резонансных единиц (РЕ). Специфическое взаимодействие анализируемых белков с молекулами ДНК определяли как разницу единиц резонанса (ΔPE) между опытным и контрольным каналами (FC2-FC1). Анализируемые пробы объемом 75 мкл, содержащие 200 нМ исследуемых белков, наносили со скоростью 30 мкл/мин. Поверхность чипа восстанавливали нанесением 10 мкл 2М NaCl при скорости 15 мкл/мин.

Результаты исследований и обсуждение Сравнительный анализ белков TnrA и GlnR Мы провели сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белков TnrA и GlnR (Рис. 1). TnrA MTTEDHSYKDKKVISIGIVSELTGLSVRQIRYYEE GlnR MS--DNIRRSMP LFP IGV MQLTELSARQIRYYEE *: *: :: :*:**** :** **:***** TnrA RKL IYPQRSSRGTRKYSFADVERLMDIANKREDGV GlnR NGLIFPARSEGNRR LFSFHDVDKLL EIKHLIEQGV . **: * **: . * : ** **: :*: * : *: ** TnrA QTAEILKDMRKKEQ--MLKNDPQVRKKMLEGQLNA GlnR NMAGIKQILAKAEAEPEQKQNEKTKKPMKHDLSDD : * * : : * * *: :*: * * .. : TnrA HFR-- YKNR----- GlnR ELRQLLKNELMQAGRFQRGNTFRQGDSRFFH .: * **. Рис. 1 – Выравнивание аминокислотных последовательностей белков TnrA и GlnR. «*» - идентичные аминокислоты; «:» - гомологичные аминокислоты с одинаковым зарядом, «.» - гомологичные гидрофобные аминокислоты. Как видно из рисунка, оба белка имеют высокую гомологию N-конца белка. При этом при помощи ранее нами разработанного алгоритма [10-11] было установлено, что гомология ДНК связывающего домена (IGIVSELTGLSVRQIRYYEE) составляет 90%. Однако С-концевой домен сигнальной трансдукции не имеет гомологии, хотя для обоих белков показано его взаимодействие с глутаминсинтетазой [5,6,7]. Возможно, это коррелирует с активностью факторов TnrA и GlnR в различных условиях доступности азота. С другой стороны, это позволяет ожидать различное влияние глутаминсинтетазы на их ДНК-связывающую активность. Влияние глутаминсинтетазы на ДНК-связывающую активность белков TnrA и GlnR В ряде работ была показана необходимость С-конца белков TnrA и GlnR для их взаимодействия с глутаминсинтетазой и значение этого взаимодействия на активность данных факторов транскрипции [5,6,7,13]. Мы исследовали ДНК-связывающую активность этих белков методом поверхностного плазмонного резонанса. Специфическое взаимодействие белков TnrA и GlnR с промотором TnrA-зависимого гена определяли как разницу между взаимодействием TnrA со специфичной и неспецифичной последовательностями ДНК. В качестве специфической последовательности ДНК использовали олигонуклеотиды, содержащие TnrA-узнаваемый участок промотора гена *nrpA* (TGTNAN7TNACA), в неспецифической последовательности использовали участок гена устойчивости к ампициллину, в котором отсутствовал такой участок. На поверхность сенсорного чипа наносили равномолярные концентрации белков (200 нМ) в пересчете на молекулярную массу каждого белка. Эксперименты показали, что в соответствии с ранее опубликованными данными [1] присутствие

глутаминсинтетазы, ингибированной 20 мМ глутамином и 10 мМ АМФ, значительно подавляло взаимодействие фактора TnrA с ДНК (рис. 2). Напротив, внесение фермента к белку GlnR повышало количество фактора транскрипции, связывающегося с ДНК (рис. 3). Рис. 2 – Анализ взаимодействия полноценного и мутантного белка TnrA с промотором TnrA-зависимого гена *prgA* методом поверхностного плазмонного резонанса. Эффективность связывания мутантных белков с ДНК показана в резонансных единицах. Рис. 3 – Анализ взаимодействия полноценного и мутантного белка GlnR с промотором гена *prgA* методом поверхностного плазмонного резонанса. Эффективность связывания мутантных белков с ДНК показана в резонансных единицах. 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 *prgA*

Белки	Константы скорости K_D , М	k_a ´ 10 ⁴ , М ⁻¹ × с ⁻¹	k_d ´ 10 ⁻³ , с ⁻¹	k_d / k_a ´ 10 ⁻⁸
TnrAwt	6.7 ± 0.32	2.2 ± 0.17	3.2 ± 0.56	TnrAwt + GSинг. 3.8 ± 0.52
TnrA35	13.0 ± 0.81	4.4 ± 0.01	3.4 ± 0.55	TnrA35+ GSинг. 11.7 ± 0.53
GlnRwt	13.1 ± 0.42	1.9 ± 0.17	1.4 ± 0.56	GlnRwt + GSинг. 13.0 ± 0.21
GlnR40	98 ± 0.14	2.5 ± 0.09	0.3 ± 0.25	GlnR40+ GSинг. 103 ± 0.23