*УДК 577.21; 577.29*

**А. Р. Каюмов, А. В. Халитова, К. П. Федорова,**
**Л. А. Шмакова, Е. О. Михайлова, О. Н. Ильинская**

# ВЛИЯНИЕ ГЛУТАМИНСИНТЕТАЗЫ НА АКТИВНОСТЬ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ TNRA В КЛЕТКАХ *BACILLUS SUBTILIS*

*Ключевые слова: фактор транскрипции TnrA, глутаминсинтетаза, регуляции активности.*

*Высокая адаптационная способность бактерий определяется синтезом различных белков, направленных на адаптацию к неблагоприятным условиям среды. При азотном голодании, в клетках бацилл фактор транскрипции TnrA контролирует активность генов, продукты которых участвуют в азотном метаболизме. Его активность при избытке азота подавляется ингибированной формой глутаминсинтетазы. В работе показана негативная регуляция активности фактора транскрипции TnrA со стороны глутаминсинтетазы также и в условиях недостатка доступного азота. Активность фактора TnrA в клетках подавлена даже азотном голодании, несмотря на высокую активность глутаминсинтетазы. При этом в клетках, дефектных по глутаминсинтетазе, уровень транскрипции с TnrA зависимого промотора в 7 раз выше по сравнению с исходным штаммом. Это превышение активности связано с большим количеством белка TnrA в штамме, дефектном по глутаминсинтетазе.*

*Key words: transcription factor TnrA, glutamine synthetase, regulation of activity.*

*The bacterial capability to rapidly adapt to unfavorable environment conditions is determined by biosynthesis of variety proteins. Under nitrogen limitation, in Bacilli the transcription factor TnrA controls the genes of nitrogen metabolism. Under nitrogen excess conditions its activity is repressed by the feedback inhibited form of glutamine synthetase. Here we report the negative regulation of transcription factor TnrA by glutamine synthetase even under conditions of nitrogen limitation. The activity of TnrA in the cells is repressed under conditions despite of high activity of glutamine synthetase. At that in the glutamine synthetase deficient cells the TnrA-dependent transcription was 7-times higher in compare with a wild type cells. We attribute this increasing to the higher amount of TnrA in the mutant strain.*

## Введение

Голодание бактерий обусловлено лимитом того или иного компонента питательной среды, например источников углерода, азота, фосфора, железа и др. В таких условиях в клетках бактерий возрастает экспрессия генов, продукты которых участвуют в адаптации к неблагоприятным условиям [1, 2].

В случае роста бактерий *Bacillus subtilis* при недостатке азота, фактор транскрипции TnrA контролирует активность генов, продукты которых участвуют в азотном метаболизме [3, 4]. Наоборот, при избытке азота в клетках повышается концентрация внутриклеточного глутамина, который подавляет активность глутаминсинтетазы (ГС) по принципу обратной репрессии. Ингибированная ГС способна связывать белок TnrA, снижая его способность взаимодействовать с ДНК [3]. В условиях азотного голодания снимается репрессия ГС, TnrA освобождается из комплекса и вновь приобретает способность связываться с промоторами своих генов-мишеней. Однако, не только ингибированная, но и активная форма глутаминсинтетазы способна формировать комплекс с TnrA *in vitro*, а также *in vivo* в отсутствии белка GlnK [5]. Поэтому открытым остается вопрос об участии ГС в контроле активности фактора транскрипции TnrA при росте в условиях лимитации по источнику азота [6].

Целью работы явилось установление роли ГС в регуляции активности фактора транскрипции TnrA в клетках *B. subtilis* при росте в условиях лимитации по источнику азота.

## Материалы и методы

В работе использовали штаммы *B. subtilis* GP250 (*trpC2amyE::(nrgA-lacZ aphA3*), *Km*$^r$), несущий ген β-галактозидазы под контролем TnrA-зависимого промотора *nrgAB*, и *B. subtilis* GP251 (*ΔglnA::cat, Cm*$^r$, *trpC2amyE::(nrgA-lacZ aphA3*) *Km*$^r$), дефектный по гену *glnA*, получен на основе штамма *B. subtilis* GP250 [7].

Бактерии культивировали на минимальной среде SMM как описано в работе [8] при соотношении объёма среды к объёму колбы 1:7.5 при температуре 37ºС. Источником азота служил глутамин (0.02 %). В качестве инокулята использовали 24 ч культуру, выращенную на среде SMM с 0.04% глутамина в качестве источника азота. Антибиотики вносили в конечных концентрациях - 10 мкг/мл хлорамфеникол и 10 мкг/мл канамицин.

Для приготовления клеточного экстракта клетки отмывали и ресуспендировали в буфере DB (50 мМ KCl, 2 мМ $MgCl_2$, лизоцим 1 мг/мл, 50 мМ трис-HCl, pH 7.4). Затем инкубировали 20 мин при температуре 37ºС и разрушали на ультразвуковом деспергаторе УЗД-2 при 22 кГц в течение 10 сек. Полученный лизат центрифугировали 1 мин при 13 тыс. об/мин для удаления остатков клеточной стенки.

Для определения белков TnrA, GlnK и глутаминсинтетазы проводили иммуноблотинг как описано в [8]. Пробы, нормализованные по белку (20 мкг общего белка), разделяли в 15 % полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану и визуализировали с

помощью вторичных антител, коньюгированных с пероксидазой (Sigma) и субстрата LumiLight (Roche Diagnostics).

Определение активности β-галактозидазы проводили по модифицированному методу [3, 9]. 50 мкл клеточного экстракта вносили в 800 мкл буфера Z ($K_2HPO_4x3H_2O$ – 14.5 г/л , $KH_2PO_4$ – 5.4 г/л, KCL – 0.75 г/л, $MgSO_4x7H_20$ – 0.25 г/л), добавляли 160 мкл субстрата (4 мг/мл ONPG (Sigma) в буфере Z) и инкубировали при 30°C. После появления желтой окраски останавливали реакцию внесением 400 мкл 1 М раствора $Na_2CO_3$ и замеряли поглощение при длине волны 410 нм на планшетном спектрофотометре TECAN 100 plus. Активность β-галактозидазы выражали в условных единицах нМоль·мин$^{-1}$·мг$^{-1}$ и рассчитывали по формуле $A=ОП_{410}/С_б \cdot t \cdot 0.0045$, где $ОП_{410}$ – оптическая плотность реакционной смеси после завершения реакции, замеренная при 410 нм; $С_б$ – концентрация белка в клеточном экстракте в мг/мл, замеренная по методу [10]; t – время инкубации, мин; 0.0045 – коэффициент экстинкции 1 нМ о-нитрофенола.

Определение активности глутаминсинтетазы проводили как в работе [3]. 100 мкл клеточного экстракта вносили в 700 мкл буфера RM (50 мМ имидазол, 45 мМ гидроксиламин, 81 мМ глутамат натрия, 27 мМ $MgCl_2x6H_2O$, pH 7.3), реакцию инициировали внесением АТФ (Sigma) до конечной концентрации в растворе 1.2 мкМ. Смесь инкубировали 30 минут при 37$^o$C, реакцию останавливали внесением 500 мкл буфера SM (55 г/л $FeCl_3X6H_2O$, 20 г/л трихлоруксусной кислоты, 31 мл 6 М HCl). Реакционную смесь инкубировали 5 минут при комнатной температуре и центрифугировали 5 минут при 6 тыс. об/мин. Замеряли оптическую плотность при длине волны 540 нм планшетном спектрофотометре TECAN 100 plus. Активность глутаминсинтетазы выражали в условных единицах нМоль·мин$^{-1}$·мг$^{-1}$ и рассчитывали по формуле $A=ОП_{540} \cdot 1.67 \cdot 1000/С_б \cdot t$ где $ОП_{540}$ – оптическая плотность реакционной смеси после завершения реакции, замеренная при 540 нм; Сб – концентрация белка в клеточном экстракте в мг/мл, замеренная по методу [7]; t – время инкубации, мин; 1.67 – коэффициент экстинкции 1; 1000 – коэффициент коэффициент пересчета в нмоль.

## Результаты исследований и обсуждение

Ранее было показано, что в клетках с нокаут мутацией гена глутаминсинтетазы происходит конститутивная экспрессия TnrA-зависимых генов [3, 4]. При наличии доступного восстановленного азота в клетке повышается уровень глутамина, который в свою очередь приводит к ингибированию глутаминсинтетазы конечным продуктом. Такая форма ГС способна образовывать комплекс с фактором транскрипции TnrA, переводя его в неактивную форму [4]. Однако в этих исследованиях клетки изначально культивировали в условиях избытка доступного азота. Поэтому мы решили проверить репрессию фактора транскрипции TnrA глутаминсинтетазой при выращивании клеток в условиях лимитации по источнику азота с последующим внесением его избытка.

Клетки *B. subtilis* GP251 и *B. subtilis* GP250 выращивали на среде SMM с концентрацией глутамина 0.02% до поздней экспоненциальной фазы роста ($OD_{600}$ ~ 0.6), затем в среду вносили глутамин до конечной концентрации 0.2% и продолжали культивирование. Рост обоих штаммов при этом практически не отличался. В этих штаммах ген β-галактозидазы находится под контролем промотора *nrg*, который позитивно регулируется белком TnrA. Это позволяет судить об активности фактора транскрипции по величине β-галактозидазной активности в клетках. Образцы клеток для анализа отбирали до внесения глутамина в среду, и затем через каждые 30 минут культивирования. Клетки в каждой точке отделяли от культуральной жидкости центрифугированием и готовили клеточный экстракт. Затем определяли в них активность β-галактозидазы для оценки активности фактора транскрипции TnrA. Внесение глутамина в среду культивирования приводило к снижению активности β-галактозидазы в исходном штамме (рис. 1).

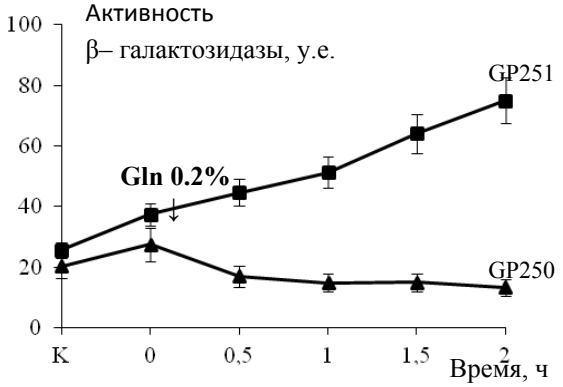


**Рис. 1 - Участие глутаминсинтетазы в контроле активности фактора транскрипции TnrA после внесения глутамина до концентрации 0.2 % в клетках рекомбинантных штаммов *B.subtilis* GP250 (исходный штамм), *B.subtilis* GP251**

В мутантном штамме снижения активности не наблюдалось, что свидетельствует о негативной регуляции активности фактора транскрипции TnrA со стороны глутаминсинтетазы в условиях избытка доступного азота. При этом количество TnrA в клетках обоих штаммов не уменьшалось после внесения глутамина, что говорит о высокой стабильности белка внутри клеток (рис 2).

Наши данные показали, что ГС участвует в репрессии активности фактора TnrA при повышении доступности азота для клетки, в условиях ингибирования глутаминсинтетазы. Однако недавно было показано, что и активная форма ГС способна взаимодействовать с белком TnrA [5]. Поэтому представляло интерес выяснить, как влияет глутаминсинтетаза на экспрессию TnrA зависимых генов и в условиях азотного голодания.

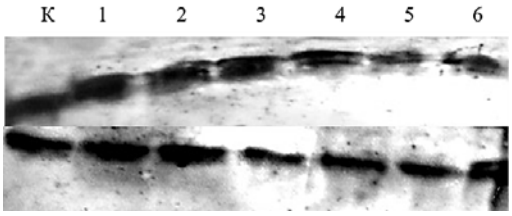


**Рис. 2 - Содержание белка TnrA в клетках исходного штамма *B.subtilis* GP250 и штамма с нокаут мутацией гена глутаминсинтетазы *B. subtilis* GP251 после внесения глутамина до концентрации 0.2 % к клеткам, выращенным в условиях азотного голодания (0.02% глутамин). К – клетки, выращенные в присутствии 0.02 % Gln. 1, 2, 3, 4, 5, 6 – клетки после выращивания 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 часа в присутствии 0.2 % Gln**

Для установления роли ГС в регуляции активности фактора TnrA в условиях недостатка азота, исследовали активность β-галактозидазы в рекомбинантном штамме *B. subtilis* GP251, дефектном по гену *glnA* соответственно, а также в исходном штамме *B. subtilis* GP250. Для этого клетки исследуемых штаммов выращивали на среде SMM в течение 24 часов, затем полученную культуру разводили средой SMM с конечной концентрацией глутамина 0.02%, поскольку дефектный штамм является ауксотрофным по этой аминокислоте, а при концентрации глутамина 0.02 % создаются условия недостатка азота [3]. Клетки выращивали в течение 7.5 часов и определяли в них активность β-галактозидазы (Рис. 3).

В исходном штамме *B. subtilis* 250 обнаруживалась достаточно высокая активность глутаминсинтетазы, что свидетельствовало о росте клеток в условиях недостатка азота (Рис. 3, Б). Активность же β-галактозидазы была в 7 раз ниже чем в штамме, дефектном по гену *glnA* (Рис. 3, А). Это позволяет сделать вывод, что активность фактора транскрипции TnrA в исходном штамме частично подавлена, несмотря на высокую активность глутаминсинтетазы. По всей видимости, и активная форма ГС может подавлять активность TnrA, что согласуется с данными о взаимодействии активной ГС с TnrA *in vitro* [5]. Вероятно, в клетках дикого типа глутаминсинтетаза частично подавляет активность фактора транскрипции TnrA даже в условиях лимитации по азоту. В ее отсутствии репрессия TnrA снимается, что приводит к высокому уровню транскрипции TnrA зависимых генов.

Предыдущие эксперименты показали, что, несмотря на лимитацию клеток по источнику азота, в клетках дикого типа ГС частично подавляет активность фактора TnrA. В результате этого в клетках, дефектных по глутаминсинтетазе, уровень транскрипции с TnrA зависимого промотора был в 7 раз выше по сравнению с исходным штаммом. Представляло интерес выяснить, связано это повышение активности с увеличением количества белка TnrA в клетке, или это эффект подавления его ДНК-связывающей способности из-за связывания с ГС.

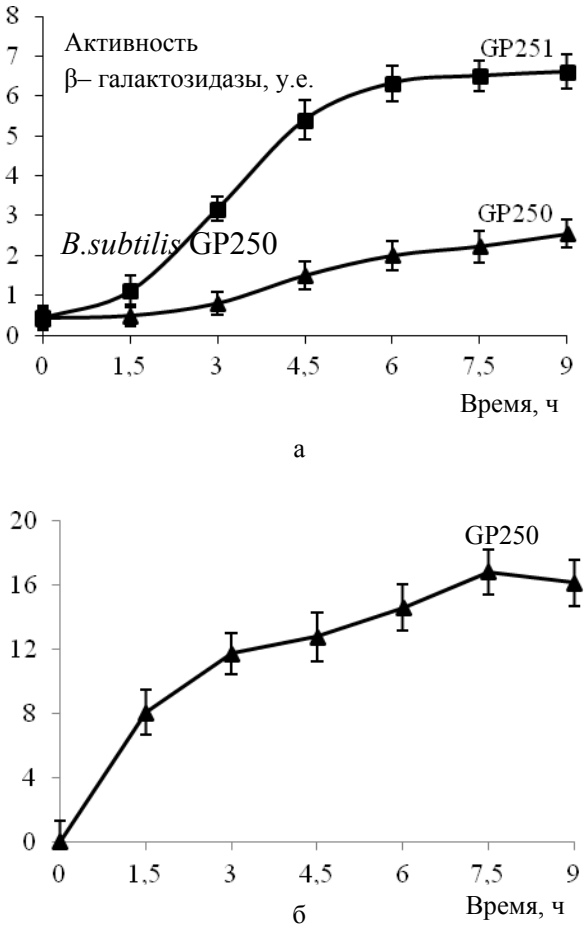


**Рис. 3 - Участие глутаминсинтетазы в контроле активности фактора транскрипции TnrA в условиях лимитации по источнику азота. А) активность β-галактозидазы в клетках *B.subtilis* GP250 (исходный штамм) и *B.subtilis* GP251(штамм с мутацией гена глутаминсинтетазы); Б) активность глутаминсинтетазы в клетках *B.subtilis* GP250**

Клетки мутантного штамма *B. subtilis* GP251, а также контрольного штамма *B. subtilis* 250 выращивали на среде SMM с 0.04 % глутамином в течение 24 часов, затем полученную культуру разводили до $ОП_{590}$ 0.15 средой SMM, содержащей с 0.02 % глутамина. Клетки выращивали в течение 7.5 часов, образцы отбирали через 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5 часа инкубирования и анализировали с помощью western blott. Результаты анализа показали, что количество фактора транскрипции TnrA в штамме дефектном по ГС выше, чем в контрольном штамме (данные не приводятся). Вероятно, это является следствием того, что фактор TnrA способен повышать уровень транскрипции своего собственного гена [4], а в отсутствии ГС репрессия TnrA снимается и происходит конститутивная транскрипция TnrA зависимых генов. Поэтому можно предположить, что повышенная активность фактора TnrA в штамме, дефектном по ГС (*B. subtilis* GP251), является следствием его более высокого содержания в клетках.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России", номер государственного соглашения 14.A18.21.0185.*

## Литература

1. L.V. Wray, A. E. Ferson, K. Rohrer, S.H. Fisher, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 8841-8845 (1996).
2. А.Р. Каюмов, М.И. Богачев, Е.О. Михайлова, *Вестник Казанского технологического университета,* **8**, 175-180 (2011).
3. К.П. Федорова, Н.В. Тарасов, А.В. Халитова, О.Н. Ильинская, Б.И. Барабанщиков, А.Р. Каюмов, *Цитология*, **54**, 898-901 (2012).
4. L.V. Wray, J.M. Zalieckas, S.H. Fisher, *Cell*, **107**, 427-435 (2001).
5. A. Kayumov, A.Heinrich, K. Fedorova, O. Ilinskaya, K. Forchhammer, *FEBS J.*, **278**, 1779–1788 (2011).
6. 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).
7. C. Detsch, J. Stulke, *Microbiology*, **149**, 3289-3297 (2003).
8. A. Kayumov, A. Heinrich, M. Sharipova, O. Iljinskaya, K. Forchhammer, *Microbiology*, **154,** 2348-2355 (2008).
9. J.H. Miller, *Experiments in Molecular Genetics*, **466**, 1431-1435 (1972).
10. M.M. Bradford, *Anal. Biochem.,* **72**, 248-254 (1976).
11. J.A. Patterson, R.B. Hespell, *Appl Environ Microbiol.,* **50**, 1014-1020 (1985).

---

© **А. Р. Каюмов** – канд. биол. наук, асс. каф. генетики Института фундаментальной медицины и биологии К(П)ФУ, kairatr@yandex.ru; **А. В. Халитова –** студ. К(П)ФУ; **К. П. Федорова** – асп. каф. микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии К(П)ФУ, kpfedorova@gmail.com; **Л. А. Шмакова** – науч. сотр. Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН; **Е.О. Михайлова -** канд. биол. наук, асс. каф. химической кибернетики КНИТУ, katya_o_m@rambler.ru; **О. Н. Ильинская** – зав. каф. микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии К(П)ФУ, olga.ilinskaya@ksu.ru.