

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)*, Kmr), несущий ген β -галактозидазы под контролем TnrA-зависимого промотора *nrgAB*, и *B. subtilis* GP251 (Δ *glnA::cat*, Cmr, *trpC2amyE::(nrgA-lacZ aphA3)* Kmr), 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 37°C. 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 MgCl₂, лизоцим 1 мг/мл, 50 мМ трис-HCl, pH 7.4). Затем инкубировали 20 мин при температуре 37°C 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 иммуноблоттинг 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, конъюгированных 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 ($K_2HPO_4 \times 3H_2O$ – 14.5 г/л, KH_2PO_4 – 5.4 г/л, KCL – 0.75 г/л, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 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 измеряли 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 $A = OP_{410} / C_b \cdot t \cdot 0.0045$, где OP_{410} – оптическая плотность реакционной смеси после завершения реакции, замеренная при 410 нм; C_b – 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 гидроксилламин, 81 мМ глутамат натрия, 27 мМ $MgCl_2 \times 6H_2O$, pH 7.3), реакцию инициировали внесением АТФ (Sigma) до конечной концентрации в растворе 1.2 мкМ. Смесь инкубировали 30 минут при 37°C, реакцию останавливали внесением 500 мкл буфера SM (55 г/л $FeCl_3 \times 6H_2O$, 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 $A = OP_{540} \cdot 1.67 \cdot 1000 / C_b \cdot t$ где OP_{540} – оптическая плотность реакционной смеси после завершения реакции, замеренная при 540 нм; C_b – концентрация белка в клеточном экстракте в мг/мл, замеренная по методу [7]; t – время инкубации, мин; 1.67 – коэффициент экстинкции 1; 1000 – 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 ($OD_{600} \sim 0.6$), 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 *prg*, 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 глутамин 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 глутамин в среду культивирования приводило к снижению активности β -галактозидазы в исходном штамме (рис. 1). Активность β - галактозидазы, у.е.

Штамм	Время, ч	Активность β - галактозидазы, у.е.
GP250	0	1.0
GP251	0	1.0
GP251	0.5	0.8
GP250	0.5	0.8

Рис. 1 - Участие глутаминсинтетазы в контроле активности фактора транскрипции TnrA после внесения глутамин 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 глутамин, 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. *B.subtilis* GP250

Рис. 2 - Содержание белка TnrA в клетках исходного штамма *B.subtilis* GP250 и штамма с нокаут мутацией гена глутаминсинтетазы *B. subtilis* GP251 после внесения глутамин 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 Активность β - галактозидазы, у.е. 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 глутамин 0.02%, поскольку дефектный штамм является ауксотрофным по этой аминокислоте, а при концентрации глутамин 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. Активность β -галактозидазы, у.е. Время, ч а

Время, ч
Время, ч
GP250 б

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 ОП590 0.15 средой SMM, содержащей с 0.02 % глутамин. 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.