

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

РАЗЛИЧНОЕ ВЛИЯНИЕ ГЛУТАМИНСИНТЕАЗЫ НА ДНК-СВЯЗЫВАЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ Tnra и GlnR из BACILLUS SUBTILIS

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, факторы транскрипции *Tnra*, *GlnR*, глутаминсингетаза.

Факторы транскрипции *Tnra* и *GlnR*, представители семейства *MerR* регуляторов транскрипции, у бактерий *Bacillus subtilis* контролируют гены белков азотного метаболизма в условиях недостатка и избытка азота в среде. Одним из механизмов регуляции их ДНК-связывающей активности является взаимодействие с глутаминсингетазой. Методом поверхностного плазмонного резонанса установлено, что глутаминсингетаза оказывает различное действие на активность этих факторов транскрипции. В присутствии ингибированной глутаминсингетазы 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 глутаминсингетазу 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 глутаминсингетазой, 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 глутаминсингетазы.

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 сепарозе, 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)