

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, глутаминсинтетазы, регуляция 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 глутаминина, 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 присутствии 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 \square -галактозидазы под контролем TnrA-зависимого промотора *nrgAB*, и *B. subtilis* GP251 (Δ *GlnA::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 объема среды к объему 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% глутаминина 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 mM KCl, 2 mM MgCl₂, лизоцим 1 мг/мл, 50 mM 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