

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ GLNR ИЗ *LACTOBACILLUS HILGARDII*

Д.Э. Журавлева, З.И. Исхакова, А.Р. Каюмов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Бактерии рода *Lactobacillus* – грамположительные, палочковидные, факультативно аэробные или микроаэрофильные неспорообразующие бактерии. Лактобациллы широко распространены в природе, занимают различные ниши в организме человека и животных, используются в промышленности, но, несмотря на это, их азотный метаболизм остается слабо изученным. Одними из ключевых белков в азотном метаболизме бактерий являются РП-белки. РП – семейство сигнальных белков, контролирующих широкий спектр мишеней в клетке. Из 280 видов рода *Lactobacillus*, известных на сегодняшний день, только 5 видов имеют гены, кодирующие РП-подобные белки в геноме.

Ранее в нашей лаборатории при исследовании РП-подобного белка PotN из *L. hilgardii* было обнаружено, что с ним коэлюируется белок GlnR семейства факторов транскрипции MerR. Белки GlnR в клетках разных бактерий принимают участие в регуляции метаболизма азота. Функция GlnR в клетках *L. hilgardii* пока не исследована. Поэтому целью работы было установить функциональную роль MerR-подобного фактора транскрипции GlnR в клетках *L. hilgardii*.

Было произведено полногеномное секвенирование *L. hilgardii* на платформах Illumina MiSeq и Oxford Nanopore MinION. Анализ генома показал, что ген *glnR* находится в опероне *glnRA* с глутаминсинтетазой, в клетках ближайших родственных бактерий *B. subtilis*, вместе они осуществляют регуляцию метаболизма азота в условиях его избытка.

Ген *glnR* был клонирован в экспрессионный вектор pET15b, и рекомбинантный белок GlnR был очищен до электрофоретически гомогенного состояния с помощью аффинной хроматографии. Методом гель-фильтрации было показано, что белок GlnR не способен к димеризации в условиях *in vitro* в отличие от *L. plantarum* и *B. subtilis*. Также методом ВЭЖХ проводили верификацию взаимодействия белка GlnR с белком PotN. В результате было показано, что тример белка PotN может связывать либо три, либо два, либо 1 димер GlnR. В условиях без эффекторных молекул образуются все виды комплексов, а в присутствии АТФ и АДФ комплексы образуются в небольших количествах, исследуемые белки находятся в основном в виде мономеров. Мы предполагаем, что в присутствии эффекторных молекул изменяется конформация белка PotN, что препятствует его связыванию с GlnR (рисунок 1).

Затем проводили верификацию взаимодействия белка GlnR с белком PotN методом микроколичественного термofореза. Было обнаружено, что аффинность белков в отсутствии эффекторных молекул составляет 1.3 μM , присутствие АТФ понижает аффинность в 10 раз, присутствие АДФ в 3 раза. Значит, что присутствие эффекторных молекул препятствует образованию комплексов PotN-GlnR, что подтверждает результаты предыдущих экспериментов.

Так как анализ аминокислотной последовательности GlnR выявил наличие характерного ДНК-связывающего мотива спираль-поворот-спираль, мы предположили наличие у белка GlnR ДНК-связывающих свойств. Мы исследовали ДНК-связывающую активность GlnR методом задержки в геле. Мы установили, что GlnR взаимодействует с ДНК только при больших концентрациях белка, при добавлении белка PotN ДНК-связывающая активность GlnR повышается, и комплекс GlnR-ДНК образуется при в 10 раз меньших концентрациях белка GlnR. Здесь можно говорить о том, что PotN повышает ДНК-связывающую активность GlnR.

В зависимости от доступности питательных веществ для клетки белок PotN может связывать от одного до трех димеров GlnR, тем самым повышая его ДНК-связывающую активность. Этот механизм можно назвать способом регуляции активности GlnR.

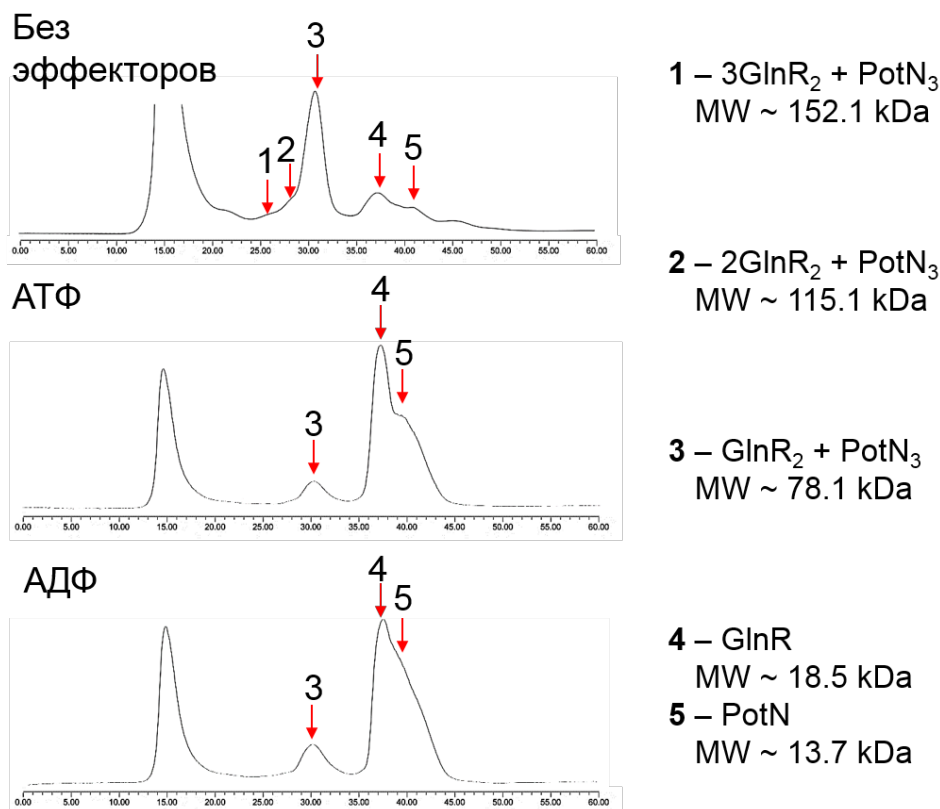


Рисунок 1 – Хроматограммы смесей белков PotN и GlnR в присутствии и отсутствии эффекторных молекул

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук (№ МД-572.2020.4).

ЛИТЕРАТУРА

- Дорошчук, Н.А. Регуляция азотного метаболизма в грамположительных бактериях [Текст] / Н.А. Дорошчук, М.С. Гельфанд, Д.А. Родионов // Мол. Биол. –2006. – Т.40. – № 5. – С. 919–926.
- Brown, N.L. The MerR family of transcriptional regulators [Text] / N.L. Brown, J.V. Stoyanov, S.P. Kidd, J.L. Hobman // FEMS Microbiol. –2003. – V.27. – P.145–163.
- Fisher, S.H. Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la difference! [Text] / S. H. Fisher // Mol. Microbiol. – 1999. – V.32. – P.223–232.
- Forchhammer, K. P (II) signal transducers: novel functional and structural insights [Text] / K. Forchhammer // Trends Microbiol. –2008. – V.16. – P.65–72.
- Kormelink, T.G. Comparative genome analysis of central nitrogen metabolism and its control by GlnR in the class Bacilli [Text] / T.G. Kormelink, E. Coenders, Y. Hagemeijer, L. Overmars, R.J. Siezen, W.M. de Vos, C. Francke // BMC Genomics. –2012. – V.13. – P.191.