

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НОВОГО ПРЕДСТАВИТЕЛЯ РП БЕЛКОВ POTN ИЗ LACTOBACILLUS HILGARDII С АТФАЗОЙ ABC-ТРАНСПОРТЕРА POTА

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

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

РП белки относятся к одному из широко распространенных семейств белков сигнальной трансдукции. Они участвуют в регуляции азотного обмена у бактерий, архей и пластид растений. РП белки взаимодействуют с широким спектром ферментов, транскрипционных факторов и мембранных транспортных белков в клетке и изменяют их активность в ответ на внутриклеточный уровень АТФ, АДФ, кетоглутарата и глутамин [1, 2]. В зависимости от выполняемых функций РП белки можно разделить на три подсемейства. Белки семейства GlnB контролируют активность глутаминсинтетазы. Белки семейства GlnK контролируют активность транспортера аммония в клетку AmtB. Белки семейства NifI осуществляют контроль над активностью динитрогеназы [3]. Геном *L. hilgardii* LMG 07934 содержит только один ген, кодирующий белок с гомологией к РП-подобным белкам. В отличие от классических генов, кодирующих РП белки, *glnB*, большинство из которых являются моноцистронными, или *glnK*, которые обычно организованы в опероне с геном транспортером аммоний *amtB*, у *Lactobacilli* гены гомологов РП, если они присутствуют, связаны с опероном *potABCD*, кодирующим ABC-транспортер для спермидина / путресцина. Эта ассоциация предполагает возможную роль этого РП белка в регуляции соответствующей активности поглощения полиаминов. Среди более чем 200 известных видов лактобацилл только четыре – *L. hilgardii*, *L. buchneri*, *L. farraginis* и *L. bifementas* – содержат ген РП гомолога в *pot*-опероне. Подобное генетическое соседство за пределами *Lactobacilli* было обнаружено только у *Lactococcus lactis*, где один ген РП паралога находится в *pot*-опероне, тогда как классический ген *glnK* представлен в опероне с *amtB*.

Гомологи РП из *L. hilgardii* и *L. buchneri* полностью идентичны и идентичны на 94 % и 75 % гомологами из *L. farraginis* и *L. bifementas*, соответственно (Таблица 1). Идентичность последовательности с ассоциированным с горшком гомологом РП из *L. lactis* составляет 57 %. Напротив, *GlnK* из *Bacillus subtilis*, ближайший хорошо охарактеризованный РП-белок, демонстрирует только 34 % идентичности с гомологом *L. hilgardii*. Большинство РП-белков из других организмов демонстрируют 33–46 % идентичности с гомологом *L. hilgardii* РП.

Таблица 1 – Гомология белка PotN *L. hilgardii* с другими РП-подобными белками

Организм	Идентичность, %	Гомология, %
<i>Lactobacillus buchneri</i> PotN	100	100
<i>Lactobacillus farraginis</i> PotN	94	98
<i>Lactobacillus bifementans</i> PotN	75	85
<i>Lactococcus lactis</i> PotN	57	73
<i>Lactococcus lactis</i> GlnK	43	57
<i>Bacillus subtilis</i> GlnK	34	49
<i>Enterococcus cecorum</i> GlnK	46	65
<i>Escherichia coli</i> GlnK	37	60
<i>Escherichia coli</i> GlnB	37	61
<i>Azospirillum brasilense</i> GlnZ	37	57
<i>Synechococcus elongatus</i> GlnB	41	61
<i>Arabidopsis thaliana</i> GlnB	38	57

Основываясь на уникальном генетическом контексте в *pot*-опероне и низкой идентичности последовательности с хорошо охарактеризованными РП-гомологами подсемейства GlnB и GlnK, мы назвали этот ген *potN* (нуклеотид-связывающий Pot-белок), указывая, что этот РП гомолог не принадлежит ни к GlnB, ни к GlnK, ни к каким-либо другим подсемействам РП белков, охарактеризованным до настоящего времени.

В геноме *L. hilgardii* белок PotN расположен в опероне *potABCD*. Белки PotABCD представляют собой

ABC-транспортер полиаминов спермидина / путресцина, который состоит из субстрат-связывающего белка PotD, расположенного на наружной стороне мембраны, двух каналобразующих белков PotV и PotC и АТФазы PotA связанной с каналобразующими белками и расположенной на внутренней стороне мембраны [4]. Исходя из расположения белков, наиболее вероятным белком для взаимодействия с РП белком является белок PotA. Ген белка PotA был клонирован в экспрессионный вектор, однако полный белок преципитировал *in vitro*; для решения этой проблемы N- и C-концевые домены белка были клонированы по отдельности. Однако удалось очистить только C-концевой домен PotAc, который является регуляторным, с которым проводились все дальнейшие эксперименты *in vitro*.

С помощью ИТС было выявлено, что PotAc взаимодействует с АТФ, но не с путресцином и спермидином, однако присутствие магния подавляет взаимодействие с АТФ. Белок не обладает АТФазной активностью, скорее всего это является следствием того, что белок находится не в полноценном состоянии.

Для верификации взаимодействия белка PotN с белком PotA были использованы как методы *in vitro* (Pull Down), так и *in vivo* (бактериальная дигибридная система).

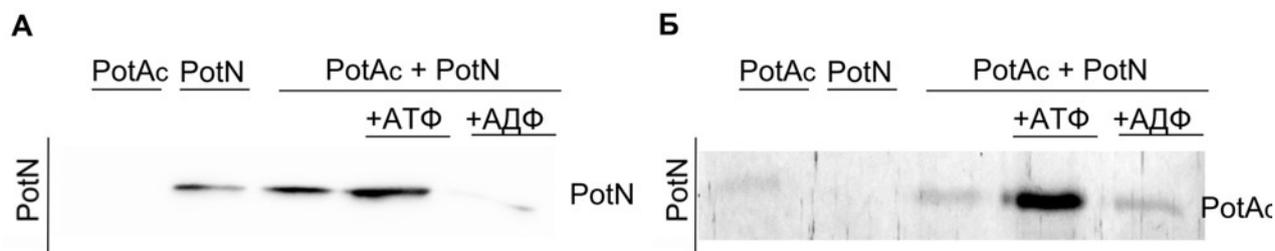


Рисунок 1 – Оценка взаимодействия белка PotN с белком PotAc в присутствии и в отсутствии АТФ и АДФ на Ni-NTA сефарозе (А) и Strep-tactin сефарозе (Б)

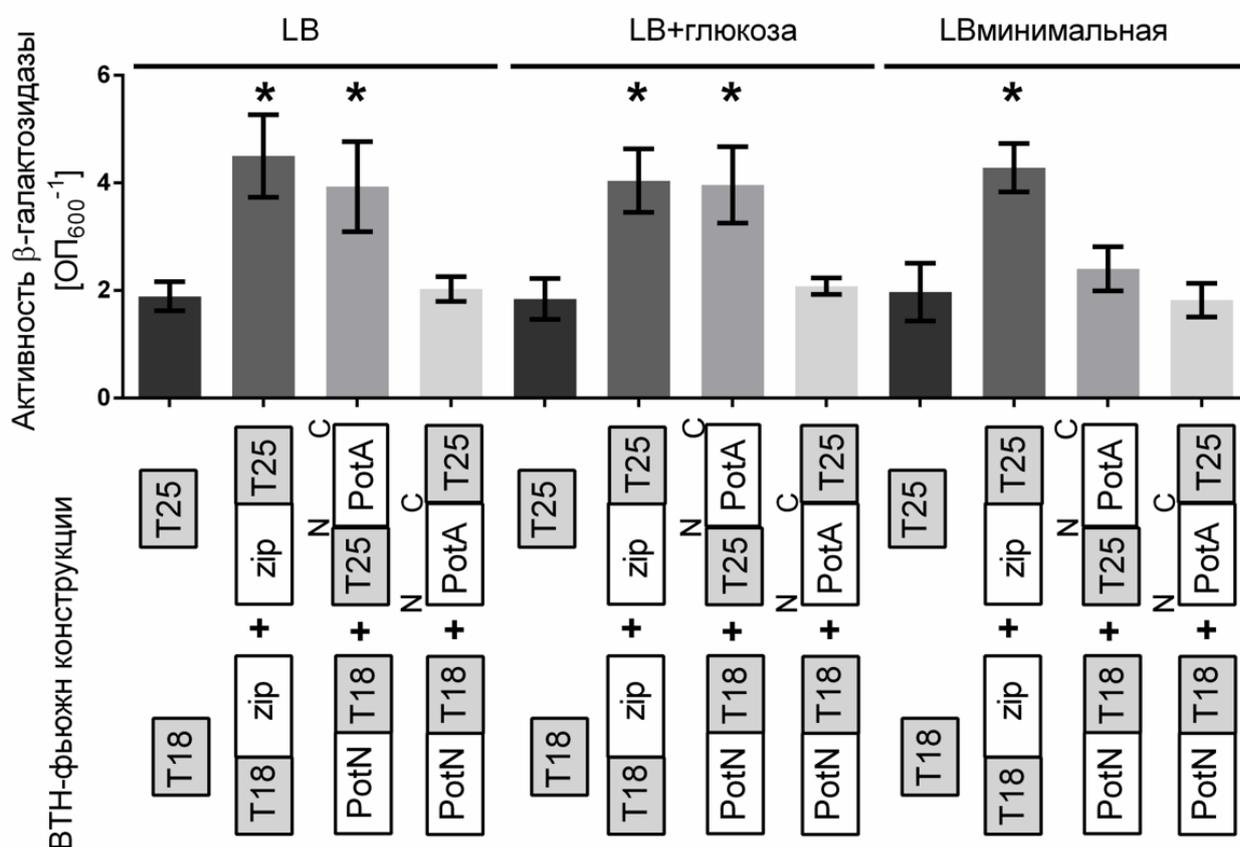


Рисунок 2 – Анализ взаимодействия белков PotN с белком PotA, в различных условиях

Для верификации взаимодействия *in vitro* был использован метод Pull Down анализа на Strep-tactin сефарозе (Рисунок 1). Ранее в нашей лаборатории были очищены до электрофоретической гомогенности белок PotN со Strep-tag последовательностью, и белок PotAc с His<sub>6</sub>-tag последовательностью. Очищенные белки смешивали в пропорциях 1:2, где 1 – это объем белка с аффинной меткой Strep-tag, а 2 – это объем белка без аффинной метки Strep-tag. Аналогично проводили анализ на Ni-NTA сефарозе. Данный эксперимент также проводился при добавлении к пробам дополнительно 2 мМ АТФ и 2 мМ АДФ. Очищенные белки, один из которых несет в себе аффинную Strep-tag метку, смешивали и наносили на колонку. Если белки способны взаимодействовать друг с другом, то комплекс белков связывается с колонкой и не сходит с нее во время промывки сорбента.

В дальнейшем белковый комплекс ко-элюировался с колонки и анализировался в полиакриламидном геле. Результаты показали, что PotN эффективно взаимодействует с белком PotAc, при этом присутствие АТФ усиливает их взаимодействие, а АДФ – подавляет.

Взаимодействие белков *in vivo* исследовали с помощью бактериальной дигибридной системы [5]. Данная система – простой и, в то же время, быстрый способ выявления белок-белковых взаимодействий *in vivo*. Система содержит ген аденилатциклазы (*сyaA*), состоящий из двух фрагментов: T25 и T28. При физическом разделении эти фрагменты неактивны, но при их соединении восстанавливается активность аденилатциклазы с помощью взаимодействующих между собой белков, катализируя превращение АТФ в цАМФ. Комплекс БАК (белок, активирующий катаболизм) и цАМФ включает экспрессию гена *lac*, который кодирует  $\beta$ -галактозидазу. Измерение активности  $\beta$ -галактозидазы позволяет определить наличие или отсутствие взаимодействия между исследуемыми белками. Для проведения анализа ген белка PotA был клонирован в экспрессионный вектор pKT25 с получением N- и C-концевых фьюжн конструкций, а ген белка PotN был клонирован в вектор pUT18 с получением C-концевой фьюжн конструкции, как это было раньше сделано для других подобных белков. Далее этими плазмидами по очереди трансформировали штамм *E.coli* ВТН<sub>101</sub>. Также были получены контрольные штаммы с плазмидами pKT25-pUT18, в качестве отрицательного контроля, и pKT25zip-pUT18zip – положительного.

Ранее с помощью ИТС было показано, что белок PotN имеет способность связывать АТФ и АДФ, при этом связывание АДФ происходит в примерно 7 раз эффективнее связывания АТФ. Поэтому были смоделированы различные условия проведения эксперимента:

- 1) стандартная среда LB
- 2) условия голодания (содержание АТФ понижено)
- 3) избыток питательных веществ посредством внесения 1 % глюкозы (содержание АТФ повышено).

Анализ показал высокую активность  $\beta$ -галактозидазы, когда фрагмент T25 находился на N-конце белка PotA (Рисунок 2). Следовательно, взаимодействие PotN происходит с C-концевой частью белка PotA. При повышенном содержании глюкозы, активность  $\beta$ -галактозидазы незначительно возрастала, что указывает на повышение эффективности взаимодействия PotN-PotA при высоких концентрациях АТФ. В условиях голодания активность  $\beta$ -галактозидазы снижалась, что говорит о негативном влиянии АДФ на взаимодействие белков.

Таким образом, сродство PotN к белку PotAc зависит от внутриклеточного соотношения АТФ/АДФ.

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

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Forchhammer, K. P(II) signal transducers: novel functional and structural insights [Text] / K. Forchhammer // Trends Microbiol – 2008. – V.6. – P.65–72.
2. Merrick, M. Post-translational modification of PII signal transduction proteins [Text] / M. Merrick // Frontiers in Microbiology – 2015. – V.5. – P.763.
3. Lapina, T. The PII signaling protein from red algae represents an evolutionary link between cyanobacterial and Chloroplastida PII proteins [Text] / T. Lapina K. Selim, K. Forchhammer, E. Ermilova // Scientific Reports – 2018 – V.790. – P.1–14.
4. Igarashi, K. Polyamine transport in bacteria and yeast [Text] / K. Igarashi, K. Kashiwagi // Biochem J. – 1999. – V.344. – P.633–642.
5. Battesti, A. The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli* [Text] / A. Battesti, E. Bouveret // Methods – 2012 – V.58. – P.325–334.