

**ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ AmtB, GlnK И ГЛУТАМИНСИНТЕАЗЫ  
НА АКТИВНОСТЬ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ TnrA  
В КЛЕТКАХ *BACILLUS SUBTILIS***

© К. П. Федорова, Н. В. Тарасов, А. В. Халикова, О. Н. Ильинская,  
Б. И. Барабанщиков, А. Р. Каюмов<sup>1</sup>

Казанский (Приволжский) федеральный университет;  
<sup>1</sup> электронный адрес: kairatr@yandex.ru

Азот является макроэлементом для всех живых клеток — от бактерий до животных. Хотя ионы аммония ( $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ) токсичны для животных, они являются наиболее предпочтительным источником азота для большинства бактерий и ассимилируются глутаминсингтазой (ГС) в так называемом цикле GO-GAT. Недостаток азота для клетки запускает каскад регуляторных процессов и активацию большой группы генов, призванных утилизировать азот из других соединений. Так, у *Bacillus subtilis* гены белков, участвующих в азотном метаболизме, регулирует фактор транскрипции TnrA. В клетках он связан с белками GlnK и AmtB, взаимодействие с ингибионной формой ГС подавляет его ДНК-связывающую активность. Показано, что делеция белка AmtB, осуществляющего АТФ-зависимый транспорт ионов аммония в клетку из окружающей среды, приводит к дефициту азота в клетке и как следствие — повышенному уровню экспрессии генов TnrA-регулятора. При дефекте белка GlnK фактор TnrA конститутивно связан с ГС, и его активность снижена и в условиях недостатка источника азота. Активность фактора TnrA в клетках, видимо, подвержена постоянной репрессии со стороны ГС: в отсутствие ГС происходит значительное увеличение активности TnrA по сравнению с контролем даже в условиях азотного голодаания, когда ГС высокоактивна. Эти факты позволяют предположить, что активность фактора TnrA регулируется конкурентным связыванием с ГС и белком GlnK.

**Ключевые слова:** *Bacillus subtilis*, фактор транскрипции TnrA, глутаминсингтаза, азотный метаболизм.

**Принятые сокращения:** ГС — глутаминсингтаза, СТАВ — цетилтриметиламмоний-бромид, ONPG — орто-нитрофенил-β-галактозид.

В природных экосистемах азот редко встречается в форме, легко доступной для усвоения живыми организмами. Как правило, он представлен в виде нитратов и сложных органических соединений, требующих дополнительных затрат энергии для ассимиляции. Наиболее предпочтительным источником азота для любой клетки является глутамин или ионы аммония, которые транспортируются в клетку белками AmtB (Khademi, Stroud, 2006; Tremblay, Hallenbeck, 2009). Затем глутаминсингтаза (ГС) синтезирует глутамин путем присоединения иона аммония к остатку глутаминовой кислоты. Этот путь усвоения азота универсален для всех живых клеток — от бактерий до животных. В условиях недостатка восстановленного азота в клетке активируются гены, продукты которых участвуют в ассимиляции трудноусваиваемых источников азота. В клетках бацилл ключевую роль в регуляции азотного метаболизма играют фактор транскрипции TnrA и ГС. Избыток доступного азота приводит к наложению внутриклеточного глутамина, который подавляет активность ГС по принципу обратной репрессии. Эта форма ГС связывает TnrA и, видимо, подавляет его ДНК-связывающую активность (Wray et al., 2001). Недавно было показано, что комплекс с TnrA может формиро-

вать также и активная форма ГС, однако вопрос о том, активен ли в этом случае белок, остается открытым (Каутумов et al., 2011). При недостатке азота фактор TnrA активирует гены, ответственные за ассимиляцию альтернативных источников азота (Wray et al., 1996).

Ранее было показано, что фактор транскрипции TnrA связан с мембранным комплексом белков GlnK—AmtB (Detsch, Stulke, 2003; Heinrich et al., 2006). Трансмембранный белок AmtB осуществляет транспорт ионов аммония в клетку из окружающей среды (Detsch, Stulke, 2003). Гомологи белка GlnK во многих клетках регулируют активность AmtB в зависимости от доступности азота в среде (Javelle et al., 2004), однако роль этого белка для клеток бацилл остается неизвестной (Detsch, Stulke, 2003). Показано, что фактор транскрипции TnrA связан с мембранным комплексом белков GlnK—AmtB (Heinrich et al., 2006). Удаление источника азота приводит к диссоциации мембранных комплексов AmtB—GlnK—TnrA и протеолитическому расщеплению TnrA (Каутумов et al., 2008). В отсутствие белка AmtB фактор TnrA конститутивно связан с белком GlnK и находится в цитоплазме. В отсутствие самого белка GlnK фактор TnrA связан с ГС независимо от доступности азота (Каутумов et al., 2011).

В настоящее время открытый остается вопрос о влиянии ГС, а также белков AmtB и GlnK на активность фактора TnrA. Цель настоящей работы — установить влияние этих белков на активность фактора транскрипции TnrA *in vivo*.

## Материал и методика

В работе использованы штаммы, предоставленные проф. Дж. Штульке из Университета Геттингена (Detsch, Stulke, 2003): *Bacillus subtilis* GP250 (*trpC2amyE::nrgA-lacZ aphA3, Km<sup>r</sup>*), несущий ген β-галактозидазы под контролем промотора *nrg*; *B. subtilis* GP251 (*trpC2amyE::nrgA-lacZ aphA3, Km<sup>r</sup>, ΔglnA::cat, Cm<sup>r</sup>*), дефектный по гену глутаминсингтазы; *B. subtilis* GP254 (*trpC2amyE::nrgA-lacZ aphA3, Km<sup>r</sup>, ΔnrgA::cat, Cm<sup>r</sup>*), дефектный по гену *nrgA*; *B. subtilis* GP253 (*trpC2amyE::nrgA-lacZ aphA3, Km<sup>r</sup>, ΔnrgB::cat, Cm<sup>r</sup>*), дефектный по гену *nrgB*.

Клетки *B. subtilis* выращивали при 37 °C на синтетической среде SMM (Anagnostopoulos, Spizizen, 1961), как описано ранее (Kayumov et al., 2008). Источниками азота служили NaNO<sub>3</sub> (20 мМ) и глутамин (0.02 %) в зависимости от цели эксперимента. Хлорамфеникол и канамицин добавляли в среду до конечной концентрации 10 мкг/мл. Посевным материалом служила 24-часовая культура, выращенная на среде с добавлением антибиотика.

Для определения белков TnrA, GlnK и ГС проводили иммуноблотинг (Кауштов et al., 2008). Пробы, нормализованные по белку (20 мкг общего белка), разделяли в 15%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (Laemmly, 1970). После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану и визуализировали с помощью вторичных антител, коньюгированных с пероксидазой (Sigma, США), и субстрата LumiLight (Roche Diagnostics, США). Концентрацию ионов аммония определяли с помощью реактива Нессслера (Hart et al., 1994).

Определение активности β-галактозидазы проводили по модифицированному методу (Miller, 1972). 5 мл культуры клеток центрифугировали при 12 тыс. об/мин в течение 2 мин. Супернатант выливали, клетки ресуспенсировали в 800 мкл буфера Z (14.5 г/л K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O, 5.4 г/л KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.75 г/л KCl, 0.250 г/л MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O), содержащего 1 мг/мл лизоцима, и инкубировали в течение 20 мин с качанием 200 об/мин при 37 °C. Затем вносили СТАВ (Sigma, США) до конечной концентрации 0.1 % и 80 мкл хлороформа. Смесь интенсивно перемешивали и центрифугировали при 12 тыс. об/мин в течение 2 мин. Затем добавляли 160 мкл субстрата (4 мг/мл ONPG (Sigma, США) в буфере Z). Реакционную смесь инкубировали при 30 °C. Реакцию останавливали после появления желтой окраски внесением 400 мкл 1 M раствора Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и замеряли поглощение при длине волны 405 нм. Активность (A) β-галактозидазы выражали в усл. ед. (нмоль · мин<sup>-1</sup> · мг<sup>-1</sup>) и рассчитывали по формуле  $A = \text{ОП}_{410} / C_6 \cdot t \cdot 0.0045$ , где ОП<sub>410</sub> — оптическая плотность реакционной смеси после завершения реакции при 410 нм, C<sub>6</sub> — концентрация белка в клеточном экстракте в мг/мл, измеренная по методу Бредфорд (Bradford, 1976), t — время инкубации, мин, 0.0045 — коэффициент экстинкции 1 нМ *o*-нитрофенола.

Активность ГС определяли по описанному методу (Patterson, Hespell, 1985). 5 мл культуры клеток центрифугировали при 12 тыс. об/мин в течение 2 мин. Супернатант выливали, клетки ресуспенсировали в 800 мкл буфе-

ра RM (50 мМ имидазола, 45 мМ гидроксиламина, 81 мМ глутамата натрия, 27 мМ MgCl<sub>2</sub>(6H<sub>2</sub>O, pH 7.3), содержащего 1 мг/мл лизоцима, и инкубировали в течение 20 мин с качанием при 200 об/мин при 37 °C. Затем вносили СТАВ в конечной концентрации 0.1 % и 80 мкл хлороформа. Смесь интенсивно перемешивали и центрифугировали при 12 тыс. об/мин в течение 2 мин. В смесь вносили АТФ (Sigma, США) до конечной концентрации 1.2 мкМ. Смесь инкубировали 30 мин при 37 °C, реакцию останавливали внесением 500 мкл буфера SM (55 г/л FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 20 г/л трихлоруксусной кислоты, 31 мл 6 М HCl). Реакционную смесь инкубировали 5 мин при комнатной температуре и центрифугировали 5 мин при 6 тыс. об/мин. Измеряли оптическую плотность при длине волны 540 нм. Активность ГС выражали в усл. ед. (нмоль · мин<sup>-1</sup> · мг<sup>-1</sup>) и рассчитывали по формуле  $A = \text{ОП}_{540} \cdot 1.67 \cdot 1000 / C_6 \cdot t$ , где ОП<sub>540</sub> — оптическая плотность реакционной смеси после завершения реакции при 540 нм, C<sub>6</sub> — концентрация белка в клеточном экстракте в мг/мл (Bradford, 1976), t — время инкубации, мин, 1.67 — коэффициент экстинкции, 1000 — коэффициент пересчета в нмоль.

## Результаты и обсуждение

Фактор транскрипции TnrA является одним из ключевых регуляторов азотного метаболизма клеток бацилл в условиях азотного голодания и в активном состоянии связан с комплексом белков GlnK—AmtB (Heinrich et al., 2006). Исследовали β-галактозидазную активность в клетках *B. subtilis* GP253 и *B. subtilis* GP254, дефектных по белкам GlnK и AmtB соответственно, а также в контрольном штамме бацилл *B. subtilis* GP250, выращенных на минимальной среде, содержащей 20 мМ нитрата натрия (рис. 1). Нитрат является трудноусваиваемым источником азота для клеток, поскольку требует больших энергетических затрат для восстановления азота, и в этих условиях наблюдается максимальное накопление белка TnrA (Kaushov et al., 2008). Возможно, по этой причине клетки находились в экспоненциальной фазе роста вплоть до 8-го ч культивирования, кривые роста всех трех штаммов не различались (даные не показаны). На протяжении всего роста в штамме с делецией гена *amtB* активность β-галактозидазы была в 9 раз выше по сравнению с исходным штаммом (рис. 1, a). Вероятно, это может быть связано как с ролью белка AmtB в передаче азотного сигнала, так и с нарушениями в транспорте ионов аммония (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) в клетки в мутантном штамме. Ионы NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, образуемые в клетке, частично диффундируют через клеточную мембрану в окружающую среду в виде свободного амиака (Kleiner, 1985). Возможно, в отсутствие белка AmtB, который осуществляет транспорт NH<sub>4</sub><sup>+</sup> в клетки, наблюдается дефицит азота внутри клеток по сравнению с исходным штаммом, что обусловливает высокую активность фактора транскрипции TnrA. Чтобы проверить это предположение, мы измерили концентрацию NH<sub>4</sub><sup>+</sup> в среде культивирования (см. таблицу). В исходном штамме белок AmtB возвращает ионы NH<sub>4</sub><sup>+</sup> снова в клетку (Detsch, Stulke, 2003), концентрация NH<sub>4</sub><sup>+</sup> в его культуральной жидкости составляла 53 мкМ и была в 1.5 раза ниже, чем в культуральной жидкости штамма с дефектом белка AmtB. Следовательно, в этом штамме происходят большие потери восстановленного азота и образуется его дефицит в клетке, что ведет к повышению

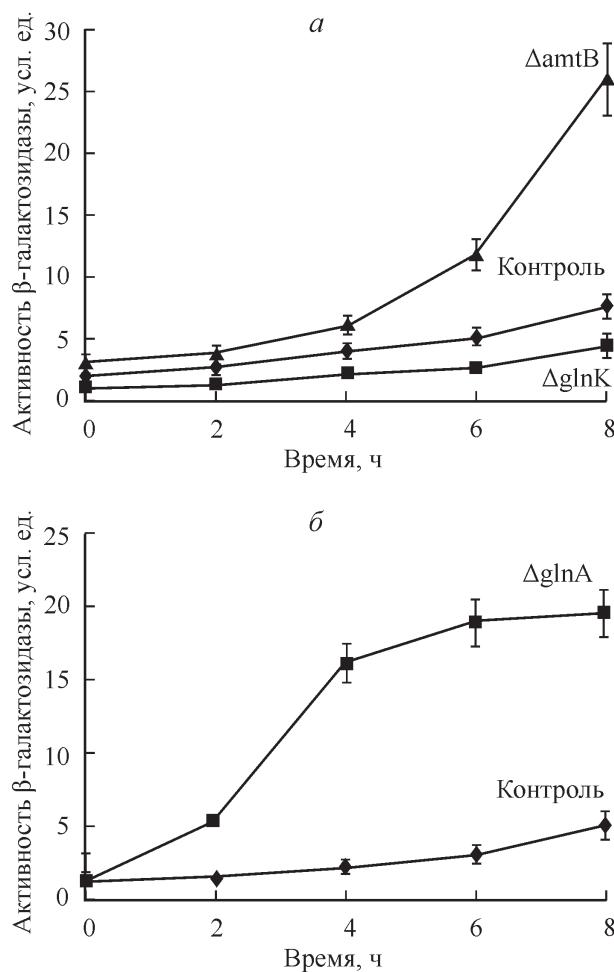


Рис. 1. Участие белков AmtB, GlnK (а) и глутаминсинтетазы (б) в контроле активности фактора транскрипции TnrA в условиях лимита источника азота.

Об активности TnrA судили по активности β-галактозидазы.

активности фактора TnrA (рис. 1, а). Доказательством дефицита азота в этих клетках также является повышенная активность ГС (см. таблицу).

При дефекте белка GlnK концентрация  $\text{NH}_4^+$  в культуральной жидкости была также в 1.8 раза выше, чем у исходного штамма (см. таблицу). Вероятно, при отсутствии белка GlnK нарушена регуляция белка AmtB, что приводит к утечке  $\text{NH}_4^+$  из клетки через открытый транспортный канал белка AmtB. Однако активность β-галактози-

дазы была в 2 раза ниже по сравнению с контролем (рис. 1, а; см. таблицу). Возможно, это объясняется конститутивным образованием комплекса TnrA—ГС в этом штамме (Kayumov et al., 2011), что подавляет активность фактора TnrA независимо от доступности азота для клетки.

Для установления роли ГС в регуляции активности фактора TnrA в условиях недостатка азота исследовали активность β-галактозидазы в штамме *B. subtilis* GP251, дефектном по гену *glnA*, а также в контроле *B. subtilis* GP250 при росте на среде SMM (рис. 1, б). В качестве источника азота использовали глутамин в конечной концентрацией 0.02 %, поскольку мутантные клетки являются ауксотрофными по этой аминокислоте, а при концентрации глутамина 0.02 % создаются условия недостатка азота (Wray et al., 2001). В исходном штамме активность ГС была высокой, что свидетельствовало о росте клеток в условиях недостатка азота (см. таблицу). Активность же β-галактозидазы была в 7 раз ниже чем в штамме, дефектном по гену *glnA* (рис. 1, б).

Это позволяет сделать вывод о том, что активность фактора транскрипции TnrA в исходном штамме частично подавлена, несмотря на высокую активность ГС. По всей видимости, и активная форма ГС может подавлять активность TnrA, что согласуется с данными о взаимодействии активной ГС с TnrA *in vitro* (Kayumov et al., 2011): ингибиторы ГС глутамин и АМФ повышали эффективность ее взаимодействия с TnrA всего в 2 раза. Вероятно, в клетках дикого типа ГС частично связывает TnrA даже в условиях лимита азота, и активность фактора транскрипции определяется соотношением содержания комплекса GlnK—TnrA, в котором TnrA активен, и комплекса ГС—TnrA, где активность TnrA подавлена. Поэтому в клетках с делецией гена ГС, где репрессия TnrA отсутствует, наблюдается высокий уровень транскрипции TnrA-зависимых генов. Наборот, в клетках, дефектных по гену белка GlnK, где ГС конститутивно связывает фактор TnrA, наблюдается снижение активности β-галактозидазы.

Доказательством этой гипотезы служат результаты Вестерн-блот-анализа, которые показали, что содержание фактора TnrA в исходных клетках и мутантных по белкам AmtB и GlnK не различается (рис. 2). Следовательно, различия в активности β-галактозидазы в мутантных клетках по сравнению с контрольными обусловлены регуляцией активности фактора TnrA, вероятно, за счет связывания с ГС, а не изменением его количества. С другой стороны, в отсутствие ГС количество TnrA резко увеличивается, что,

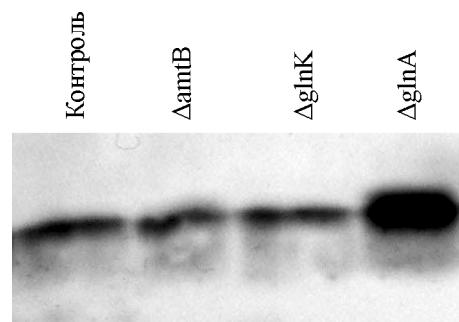


Рис. 2. Содержание белка TnrA в клетках исходного штамма *Bacillus subtilis* GP250 (контроль) и штаммов с делецией генов белков AmtB (ΔamtB), GlnK (ΔglnK) и глутаминсинтетазы (ΔglnA), выращенных в условиях лимитации по источнику азота.

Вестерн-блот-анализ.

Показатель	Штамм		
	<i>B. subtilis</i> GP250 (исходный)	<i>B. subtilis</i> GP254 (ΔamtB)	<i>B. subtilis</i> GP253 (ΔglnK)
[ $\text{NH}_4^+$ ] в культуральной жидкости, мкМ на 1ед. биомассы	53 ± 5	73 ± 12	86 ± 18
Активность глутаминсинтетазы, нмоль · мин <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup>	30 ± 4	38 ± 5	18 ± 4

по-видимому, и определяет повышение активности  $\beta$ -глактозидазы в этом штамме. Эти данные позволяют сделать заключение о том, что и активная форма ГС способна подавлять активность TnrA, а не только ингибиованная форма, как сообщалось ранее (Wray et al., 2001). Возможно, активность фактора транскрипции TnrA в клетках бацилл определяется его конкурентным взаимодействием с белком GlnK и ГС.

Таким образом, в клетках бацилл активность генов ассимиляции альтернативных источников азота регулируется на двух уровнях и определяется в первую очередь количеством ионов аммония, поступающих в клетку как путем простой диффузии, так и за счет активного транспорта с помощью белка AmtB. Поскольку в природной среде их содержание минимально, поступление их в клетку полностью определяется работой белка AmtB, активность которого, по всей видимости, регулирует белок GlnK в зависимости от энергетического статуса клетки (Heinrich et al., 2006). На втором этапе ГС связывает поступившие ионы аммония в глутамин, и при большом количестве образованного глутамина происходит ингибирование фермента, сопровождающееся связыванием фактора транскрипции TnrA в неактивную форму и, следовательно, снижением уровня экспрессии TnrA-зависимых генов, в том числе генов белков AmtB и GlnK. При дефекте любого из этих белков происходит нарушение транспорта или ассимиляции ионов аммония и всего азотного метаболизма клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (ГК № 16.740.11.0611 от 31 мая 2011 г.).

### Список литературы

- Anagnostopoulos C., Spizizen J. 1961. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 81 : 741—746.
- Bradford M. M. 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248—254.
- Detsch C., Stulke J. 2003. Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB. *Microbiology*. 149 : 3289—3297.
- Hart S. C., Stark J. M., Davidson E. A., Firestone M. K. 1994. Nitrogen mineralization, immobilization and nitrification. In: Methods of soil analysis: 985—1018.
- Heinrich A., Woyda K., Brauburger K., Meiss G., Detsch C., Stulke J., Forchhammer K. J. 2006. Interaction of the membrane-bound GlnK-AmtB complex with the master regulator of nitrogen metabolism TnrA in *Bacillus subtilis*. *Biol. Chem.* 281 : 34 909—34 917.
- Javelle A., Severi E., Thornton J., Merrick M. 2004. Ammonium sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB—GlnK complex formation. *J. Biol. Chem.* 279 : 8530—8539.
- Kayumov A., Heinrich A., Fedorova K., Iljinskaya O., Forchhammer K. 2011. Interaction of the general transcription factor TnrA with the PII-like protein GlnK and glutamine synthetase in *Bacillus subtilis*. *FEBS J.* 278 : 1779—1788.
- Kayumov A., Heinrich A., Sharipova M., Iljinskaya O., Forchhammer K. 2008. Inactivation of the general transcription factor TnrA in *Bacillus subtilis* by proteolysis. *Microbiology*. 154 : 2348—2355.
- Khademi S., Stroud R. 2006. The Amt/MEP/Rh family: structure of AmtB and the mechanism of ammonia gas conduction. *Physiology*. 21 : 419—429.
- Kleiner D. 1985. Energy expenditure for cyclic retention of  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  during  $\text{N}_2$  fixation by *Klebsiella pneumoniae*. *FEBS Lett.* 187 : 237—239.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 : 680—685.
- Miller J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. New York: Cold Spring Harbor Lab. 466.
- Patterson J. A., Hespell R. B. 1985. Glutamine synthetase activity in the ruminal bacterium *Succinivibrio dextrinosolvens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 : 1014—1020.
- Tremblay P., Hallenbeck P. 2009. Of blood, brains and bacteria, the Amt/Rh transporter family: emerging role of Amt as a unique microbial sensor. *Mol. Microbiol.* 71 : 12—22.
- Wray L. V., Ferson A. E., Rohrer K., Fisher S. H. 1996. TnrA, a transcription factor required for global nitrogen regulation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 93 : 8841—8845.
- Wray L. V., Zalieckas J. M., Fisher S. H. 2001. *Bacillus subtilis* glutamine synthetase controls gene expression through a protein-protein interaction with transcription factor TnrA. *Cell*. 107 : 427—435.

Поступила 26 VII 2012

### THE ROLE OF AmtB, GlnK AND GLUTAMINE SYNTHETASE IN REGULATION OF TRANSCRIPTION FACTOR TnrA IN *BACILLUS SUBTILIS*

K. P. Fedorova, N. V. Tarasov, A. V. Khalitova, O. N. Iljinskaya, B. I. Barabanschikov, A. R. Kayumov<sup>1</sup>

Kazan (Volga region) Federal University

<sup>1</sup> e-mail: kairatr@yandex.ru

The nitrogen is a macroelement for all alive cells, from bacteria to animals. Although  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  are highly toxic to animal, they are the preferred source of nitrogen for the most microorganisms and are assimilated by glutamine synthetase in the GOGAT cycle. The nitrogen limitation triggers a number of regulatory processes and activates many genes, providing the utilizing of alternative nitrogen sources. In *Bacillus subtilis* the genes of nitrogen metabolism are regulated by the transcription factor TnrA. In a cells it is bound to AmtB-GlnK proteins, the interaction with Glutamine synthetase (GS) represses its DNA-binding activity. Here we show the lack of AmtB leads to the nitrogen deficiency in a cell and, consequently, the increased expression of TnrA-dependent genes. In the lack of GlnK the transcription factor TnrA is constitutive bound to GS, the TnrA activity is repressed even under nitrogen limit conditions. Apparently, the TnrA activity is subjected to permanent repression by GS. In the absence of GS, the TnrA activity is strongly higher in compare to control, even under nitrogen limitation, when GS is active. These data allow to suggest that TnrA activity is regulated by the competitive binding to GlnK and GS.

**Key words:** *Bacillus subtilis*, transcription factor TnrA, glutamine synthetase, nitrogen metabolism.