

ПАРАМЕТРЫ АФФИННОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НЕКОТОРЫХ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ, ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К САЛИЦИЛАТУ

Фролова А.А., Позднякова-Филатова И.Ю., Захарова М.В.

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Пуццино,
ali.frolowa@yandex.ru*

Бактерии рода *Pseudomonas* известны своей способностью к деградации ПАУ, в частности, нафталина, фенантрена, карбарила и т.д. Салицилат – ион является ключевым интермедиатом путей их деструкции и, одновременно, индуктором транскрипционных регуляторов этих путей. Способность салицилата как лиганда аффинно связываться с некоторыми регуляторными белками позволяет использовать их в качестве биораспознающих элементов биосенсоров [3]. Ранее в литературе было описано создание микробного сенсора на основе транскрипционного фактора NahR, чувствительного к салицилату, из штамма *Pseudomonas putida* G7 [2].

В данной работе объектами исследования являются транскрипционные регуляторы NahR (AK5) и SgpR (AK5) из штамма *P. putida* AK5 и NahR (G7) из штамма *P. putida* G7, чувствительные к салицилату. Исследуемые регуляторы гомологичны друг другу с разной степенью идентичности, поэтому присутствующие отличия в аминокислотных последовательностях могут влиять на характеристики аффинного взаимодействия белка с лигандом.

Были получены фьюжн-конструкции *nahR* (G7)::*gfp*, *nahR* (AK5)::*gfp* и *sgpR* (AK5)::*gfp*. По экспериментальным данным построены градуировочные зависимости интенсивности флуоресценции GFP полученных систем от концентрации салицилата натрия. Зависимости имеют сигмоидальный вид и хорошо описываются уравнением Хилла. Физический смысл коэффициентов уравнения позволяет соотнести различия параметров белковых взаимодействий аффинной природы с аминокислотными заменами.

Сродство регуляторного белка к ДНК характеризуется динамическим диапазоном и определяется как максимальное увеличение экспрессии относительного базального уровня. Стабильность комплекса ДНК-белок выше в системе *nahR* (G7)::*gfp*. Проанализировав пространственную структуру регуляторов, было сделано предположение, что аминокислотные замены в положениях 74 и 75 последовательности линкера, участвующего в димеризации молекулы, могут влиять на стабильность комплекса белок – ДНК. Аффинность белка к лиганду для NahR (AK5) и NahR(G7) увеличивается при связывании каждой молекулы индуктора, что характеризуется положительным коэффициентом кооперативности.

Ограничившись использованием прямого участка градуировочной зависимости были определены коэффициенты чувствительности, характеризующие сродство белка к лиганду. Для системы *nahR(G7)::gfp* коэффициент чувствительности больше, следовательно, сродство белка NahR(G7) к салицилату натрия выше. Для системы *sgpR(AK5)::gfp* зависимость не описывается уравнением Хилла и не имеет воспроизводимого линейного участка.

Классическим лигандом, образующим комплекс с исследуемыми в данной работе регуляторными белками является салицилат-ион. Однако, некоторые исследователи показывают возможность активации транскрипции в присутствии замещенных салицилатов [1]. Была исследована субстратная специфичность бактериальных систем *nahR (G7)::gfp*, *nahR (AK5)::gfp* и *sgpR (AK5)::gfp* по хлор-, метил- и амино- замещенным салицилатам. Показано, что замещенные в положении 3 гораздо хуже активируют транскрипцию, чем салицилат. 4-хлорсалицилат и 4-метилсалицилат обладают большей специфичной к регуляторным белкам NahR(AK5) и NahR(G7). Для SgpR все соединения, кроме салицилата не активируют транскрипцию. Построение моделей белков в комплексе с салицилатом и анализ литературных данных позволили определить возможные ключевые аминокислоты в субстрат - связывающем домене. Предполагается, что отсутствие активации транскрипции в присутствии замещенных салицилатов в положении 3 связано с пространственным расположением аспарагина 169. И наоборот, отсутствие аминокислотных остатков в белке рядом с положением 4 молекулы салицилата, а также возможные дополнительные стабилизирующие связи могут быть причиной высоких уровней транскрипции в присутствии этих замещенных.

Молекула салицилата в субстрат-связывающей полости белка SgpR располагается гораздо свободнее, чем у NahR (AK5) и NahR(G7), что не объясняет наблюдаемой для SgpR субстратной специфичности. Ближайший гомолог с известной кристаллической структурой, по которой была построена пространственная модель, имеет низкий процент гомологии с SgpR, возможно, данная модель не совсем корректна. Чтобы подтвердить или опровергнуть эти предположения, необходимо получить точную кристаллическую структуру всех регуляторов.

Литература

1. Cebolla A., Sousa C., De Lorenzo V. Effector specificity mutants of the transcriptional activator NahR of naphthalene degrading *Pseudomonas* define protein sites involved in binding of aromatic inducers // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272, № 7. P. 3986–3992.
2. Park H.H. et al. NahR: Effects of replacements at Asn 169 and Arg 248 on promoter binding and inducer recognition // Arch. Biochem. Biophys. 2005. Vol. 434, № 1 SPEC. ISS. P. 67–74.
3. Xue H. et al. Design, construction, and characterization of a set of biosensors for aromatic compounds // ACS Synth. Biol. 2014. Vol. 3, № 12. P. 1011–1014.