

ВЛИЯНИЕ БЕЛКА POTN НА АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВ GLNR И POTA В КЛЕТКАХ *LENTILACTOBACILLUS HILGARDII*

© 2024 г. З. И. Исхакова^а, *, Д. Э. Журавлева^а, А. Р. Каюмов^а

^аКазанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008, Россия

*e-mail: zalinunya@mail.ru

Поступила в редакцию 14.10.2023 г.

После доработки 03.11.2023 г.

Принята к публикации 04.11.2023 г.

В бактериях РП-подобные белки являются глобальными регуляторами азотного и энергетического обмена, которые в ответ на доступность питания связывают белки-партнеры, модулируя их активность. Белок PotN из *Lentilactobacillus hilgardii*, представитель нового семейства РП-подобных белков, способен конкурентно связывать АТФ и АДФ, тем самым регулируя метаболизм в ответ на энергетический статус клетки. Так, при избытке АДФ, PotN связывает этот нуклеотид и преимущественно взаимодействует с субъединицей PotA ABC-транспортера полиаминов, подавляя ее АТФазную активность. При этом PotN также диссоциирует от фактора транскрипции GlnR, что восстанавливает способность последнего связывать ДНК и модулировать транскрипцию генов GlnR-регулона. Наоборот, в АТФ-состоянии PotN диссоциирует от PotA и связывается с фактором Gln R.

Ключевые слова: РП белок, регуляторные белки, *Lentilactobacillus hilgardii*

DOI: 10.31857/S0026365624020173

Лактобактерии широко используются в качестве пробиотических бактерий для поддержания гомеостаза кишечника и производства ферментированных и функциональных пищевых продуктов. В естественной среде обитания (ротовая полость и ЖКТ человека и животных, сырые и ферментированные молочные и растительные продукты) лактобациллы подвержены множественным стрессовым воздействиям, в том числе из-за несбалансированности легко метаболизируемых источников энергии, азота и углерода и должны иметь инструменты для регуляции обменных процессов в ответ на доступность питательных веществ.

РП белки представляют собой глобальные регуляторы, встречающиеся в клетках бактерий, архей и пластидах растений. РП белки реагируют на изменения в метаболическом состоянии клетки путем конкурентного связывания в различных соотношениях и комбинациях ключевых метаболитов — нуклеотидов, 2-оксoglутарата, глутамина. Связываясь с лигандами, РП белки меняют свою конформацию, что дает им возможность обратимо взаимодействовать с широким спектром белков-мишеней и, тем самым, изменять их активность, обеспечивая оптимальный уровень азотного и углеродного обмена в зависимости от доступности питательных веществ (Lüddecke, Forchhammer, 2013). Среди белков-мишеней для РП белков широко распространены факторы транскрипции, ABC-транспортеры,

ферменты ассимиляции азота и углерода (Xu et al., 2020, Selim et al., 2020, Grau et al., 2021). Связываясь со своими мишенями, РП белки модулируют их активность и за счет этого управляют интенсивностью ключевых этапов метаболизма, транспорта в клетку источников азота, а также могут регулировать выработку сигнальных молекул (ц-ди-ГМФ) и кофакторов (НАД⁺) (Gerhardt et al., 2020, Santos et al., 2020). Таким образом, РП белки являются основными регуляторными центрами клеточного метаболизма, “молекулярными процессорами”, обеспечивающими оптимальный уровень обмена веществ клетки в ответ на доступность питательных веществ (Forchhammer et al., 2022). РП-подобный белок встречается только у пяти из более чем 400 видов семейства *Lactobacillaceae*, идентифицированных к сегодняшнему дню. К ним относятся: *Lentilactobacillus hilgardii*, выделенный из вина, *Lentilactobacillus farragines*, выделенный из компостного материала, *Lentilactobacillus buchneri* из ротовой полости человека, *Loigolactobacillus bif fermentans*, выделенный из кисломолочных продуктов, *Liquorilactobacillus ghanensis*, выделенный из ферментированного какао. Более того, в клетках этих бактерий ген, кодирующий гомолог РП белка, расположен внутри оперона ABC-транспортера полиаминов *potABCD*, что не характерно для генов других описанных РП белков (Zhuravleva et al., 2020). Нами было продемонстрировано, что PotN может

связываться с субъединицей PotA АВС-транспортера полиаминов и фактором транскрипции GlnR, который относится к семейству MerR, и гомологи которого контролируют экспрессию генов азотного метаболизма в других бактериях (Iskhakova et al., 2022).

В данной работе мы показываем, что связывание PotN с АТФазой PotA подавляет активность последней, тем самым представляя инструмент адаптации *L. hilgardii* к условиям различной доступности питательных веществ для энергетического и пластического обменов.

Рекомбинантные штаммы *Escherichia coli* BL-21(DE3) (*dcm ompT hsdS* ($r_B^- m_B^-$) *gal λ*(DE3)) (“Stratagene”, США) выращивали в питательной среде LB (Sambrook et al., 1989) с ампициллином 100 мкг/мл. Плазмиды pASK3-PotN и pASK3-PotN91 обеспечивают синтез полноценного и мутантного (с заменой G91A) белков PotN и PotN91, соответственно, несущих С-концевую StrepII-аффинную метку (Iskhakova et al., 2022). Плазмиды pET15-GlnR и pET15-PotAc обеспечивают синтез белка GlnR и С-концевого АТФазного домена белка PotA, несущих N-концевой гексастидиновый олигопептид (Iskhakova et al., 2022). Для индукции биосинтеза белка к культуре клеток, находящихся в экспоненциальной фазе роста, добавляли изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид до конечной концентрации 1 мМ или ангидротетрациклина гидрохлорид до конечной концентрации 0.2 мкг/мл (Iskhakova et al., 2022).

Хроматографическую очистку белков, содержащих гистидиновый аффинный пептид, проводили на Ni-NTA сефарозе, а белков со стрептавидиновой аффинной меткой — на стрептактин сефарозе (“Iba LifeScience”, Германия) (Iskhakova et al., 2022).

Уровень АТФазной активности определяли по содержанию образующегося при гидролизе АТФ неорганического фосфата (Pi) методом по Lanzetta et al., 1979. Кратко, 20 мкл смеси 20 мкМ PotAc в фосфатно-солевом буфере (рН 8.0), содержащем 2 мМ MgATФ, инкубировали при 30 °С в течение 15, 30, 60, 120 и 240 мин. Затем реакцию останавливали внесением 80 мкл раствора малахитового зеленого MG-АМ. В качестве холостой пробы использовали 2 мМ MgATФ без фермента. Через 1–2 мин вносили 10 мкл 34% цитрата натрия и через 5 мин измеряли поглощение при длине волны 650 нм на планшетном спектрофотометре TECAN Infinite 200 Pro (“Tecan”, Швейцария). Для приготовления реагента MG-АМ смешивали 1 мл раствора молибдата аммония (4.2% ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ в 4 N HCl) с 3 мл 0.045% раствора малахитового зеленого и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре (до прозрачности), добавляли 0.08 мл 2% Nonidet P-40, перемешивали и фильтровали через бумажный фильтр.

Взаимодействие между белками PotN, PotAc, GlnR и ДНК исследовали методом микромасштабного термофореза (MST). Для анализа были сконструированы два комплементарных олигонуклеотида, один из которых содержал флуорофор Cy3 на 5'-конце (/Cy3/-CAATAAATAAAATGT TACCTAATCTTACATTGAATGCTAC и GTAAGC ATTCAATGTAAGATTAAGTAACATTATTAT TG). После гибридизации олигонуклеотиды образовывали ДНК-дуплекс, способный к взаимодействию с Gln R. Гибридизацию проводили в буфере GB (10 мМ *mpuc*-HCl, 1 мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl; рН 7.4), смешивая меченые и немеченые олигонуклеотиды в эквимоллярных концентрациях путем охлаждения с 98 до 25 °С в течение 1 ч. PotN, PotAc, GlnR и ДНК-дуплексы смешивали в эквимоллярном соотношении 1 : 1 : 1 : 1 с конечной концентрацией 1 мкМ в буфере для MST с добавлением 0.05% Tween 20 и инкубировали 10 мин при 25 °С. Образцы центрифугировали в течение 10 мин при 10 тыс. об./мин и загружали в капилляры Monolith NT.115 (“NanoTemper Technologies”, Германия). MST проводили на Monolith NT.115 (“NanoTemper Technologies”, Германия) при температуре 25 °С, мощности светодиода 20% и средней мощности MST. Данные трех независимых измерений были проанализированы (программное обеспечение MO.Affinity Analysis, версия 2.1.3, “NanoTemper Technologies”, Германия) с использованием сигнала от времени включения MST, равного 20 с.

Транспорт полиаминов в клетку осуществляет белковым комплексом PotABCD при участии АТФазного белка PotA, который является белком-партнером для PotN. Поэтому можно ожидать влияние взаимодействия PotN с PotA на АТФазную активность последнего и функционирование всего АВС-транспортера. Исследовали АТФазную активность рекомбинантного С-концевого цитоплазматического домена PotAc в присутствии PotN при соотношении белков PotAc : PotN — 1 : 0.5, 1 : 1, 1 : 5. Белки глутаминсинтетаза и БСА (бычий сывороточный альбумин) были использованы в качестве положительного и отрицательного контролей, соответственно.

Как видно на рис. 1, уровень активности белка PotN соответствует отрицательному контролю, следовательно, белок не имеет АТФазной активности.

С-концевой домен белка PotA сохранил АТФазную активность. Низкое количество белка PotN не оказывало влияния на активность белка PotAc, тогда как PotN в эквимоллярной концентрации и выше в значительной степени снижал активность PotAc. Следовательно, связывание с PotN негативно влияет на функциональную активность этой АТФазы, по всей видимости, приводя к прекращению поступления полиаминов в клетку путем транспорта АВС-транспортером PotABCD. Уровень полиаминов в клетках бактерий регулируются

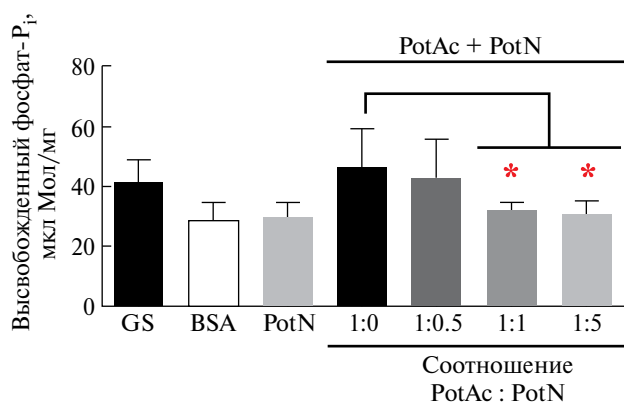


Рис. 1. Влияние PotN на АТФазную активность PotAc. В качестве контроля были использованы глутаминсинтетаза (GS, положительный контроль) и бычий сывороточный альбумин (BSA, отрицательный контроль). На графике представлены средние значения $\pm$ стандартное отклонение из 3 повторов эксперимента. Значимость различий между комплексом PotN-PotAc и PotAc оценивали методом Крускала-Уоллиса с поправкой Шидака. Достоверными различия считали при $*p < 0.05$.

биосинтезом, утилизацией и транспортом (Igarashi, Kashiwagi, 2010). Анализ генома *L. hilgardii* показал, что данной бактерии доступна только система транспорта полиаминов, следовательно, PotN может контролировать рост и развитие клетки, а также предохранять клетку от избытка полиаминов в условиях низкой доступности энергетического питания.

Ранее было показано, что белок PotN подавляет активность фактора транскрипции GlnR: GlnR в присутствии PotN с большей эффективностью связывается с ДНК в присутствии АДФ, чем при АТФ (значения КД = 0.46 и 1.26 мкМ, соответственно) (Журавлева, 2021). При этом PotN связывается с GlnR преимущественно в присутствии

АТФ (Iskhakova et al., 2022), следовательно, в этих условиях комплекс GlnR-ДНК образуется в значительно более низких количествах. Также присутствие PotA должно вносить вклад в способность GlnR связывать ДНК.

Чтобы смоделировать комплексный эффект АТФ и АДФ на взаимодействие GlnR с ДНК в присутствии PotN и PotA, исследовали подвижность ДНК в смеси PotN-GlnR-PotAc-ДНК с помощью MST. Белки и двухцепочечную ДНК, меченную Cy3, смешивали в эквимольном соотношении 1 : 1 : 1 : 1 и измеряли подвижность ДНК в комплексе с белком GlnR в различных условиях (рис. 2а).

Снижение флуоресценции коррелирует с повышением массы молекулы/комплекса. В присутствии АТФ флуоресценция была в 2 раза ниже, следовательно, ДНК более подвижна за счет малой эффективности образования комплекса ДНК-GlnR. Это, по всей вероятности, происходит за счет того, что GlnR связан с PotN. Наоборот, в присутствии АДФ наблюдается высокий уровень флуоресценции (рис. 2б). Следовательно, образуется комплекс ДНК-GlnR, в то время как PotN, скорее всего, находится в комплексе с PotA. Чтобы доказать роль АТФ и АДФ в этом процессе, этот эксперимент был проведен с белком PotN91, неспособным связывать нуклеотиды (Iskhakova et al., 2022). Как видно из рис. 2, в присутствии PotN91 внесение АТФ и АДФ не влияло на подвижность ДНК.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что в клетках *L. hilgardii* белок PotN в зависимости от соотношения АТФ: АДФ связывает либо PotA, либо GlnR, соответственно, тем самым регулируя поступление полиаминов в клетку и транскрипцию генов GlnR регулона в ответ на доступность энергетического питания.

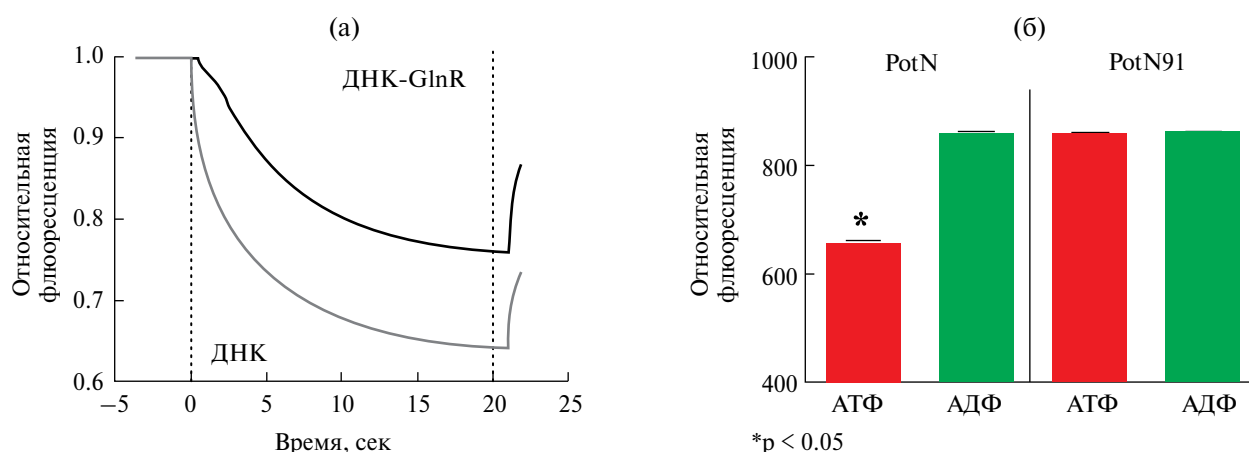


Рис. 2. Уровень относительной флуоресценции ДНК. (а) — Типичные MST-трассировки изменения интенсивности флуоресценции одиночной ДНК и комплекса ДНК-GlnR. (б) — Изменение интенсивности флуоресценции ДНК в системе PotN-GlnR-PotAc-ДНК в сочетании с различными нуклеотидами. Значимость различий флуоресценции в присутствии разных нуклеотидов оценивали по *t*-тесту Стьюдента. Достоверными различия считали при $*p < 0.05$.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность профессору Карлу Форшхаммеру (Университет Тюбингена, Германия) за консультации при планировании экспериментов и руководителю Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Максименко Оксане Геннадьевне за использование услуг и возможностей Центра коллективного пользования Института биологии гена РАН. Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности; проект № FZSM-2023-0013.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

З.И. Исхакова, Д.Э. Журавлева — экспериментальные процедуры, А.Р. Каюмов — руководство работой; все авторы участвовали в написании и утверждении рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Журавлева Д.Э. Регулон фактора транскрипции GlnR в клетках *Lentilactobacillus hilgardii* и механизм регуляции его ДНК-связывающей активности. Автореферат дис. ... канд. биол. наук, 28.12.2021. Казань: Казанский федеральный университет, 2021. 24 с.

Каюмов А.Р. Молекулярные механизмы регуляции азотного обмена грамположительных бактерий. Автореферат дис. ... докт. биол. наук, 24.01.2019. Казань: Казанский федеральный университет, 2018. 40 с.

Forchhammer K., Selim K.A., Huergo L.F. New views on PII signaling: from nitrogen sensing to global metabolic control // Trends Microbiol. 2022. V. 30. P. 733–735.

Gerhardt E.C.M., Parize E., Gravina F., Pontes F.L.D., Santos A.R.S., Araújo G.A.T., Goedert A.C., Urbanski A.H., Steffens M.B.R., Chubatsu L.S., Pedrosa F.O., Souza E.M., Forchhammer K., Ganusova E., Alexandre G., de Souza G.A., Huergo L.F. The protein–protein interaction network reveals a novel role of the signal transduction protein PII in the control of c-di-GMP homeostasis in *Azospirillum brasilense* // mSystems. 2020. V. 5. Art. e00817–20.

Grau F.C., Burkovski A., Muller Y.A. Crystal structures of adenylylated and unadenylylated PII protein GlnK from *Corynebacterium glutamicum* // Acta Crystallogr. D Struct. Biol. 2021. V. 77. P. 325–335.

Igarashi K., Kashiwagi K. Modulation of cellular function by polyamines // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2010. V. 42. P. 39–51.

Iskhakova Z., Zhuravleva D., Laykov A., Forchhammer K., Kayumov A. The preliminary characterization of P-II like protein GlnK from *Lactobacillus brevis* // FEBS J. 2016. V. 283. P. 228.

Iskhakova Z., Zhuravleva D.E., Heim C., Hartmann M.D., Laykov A.V., Forchhammer K., Kayumov A.R. PotN represents a novel energy-state sensing PII subfamily, occurring in firmicutes // FEBS J. 2022. V. 289. P. 5305–5321.

Lanzetta P.A., Alvarez L.J., Reinach P.S., Candia O.A. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate // Anal. Biochem. 1979. V. 100. P. 95–97.

Lüddecke J., Forchhammer K. From PII signaling to metabolite sensing: a novel 2-oxoglutarate sensor that details PII-NAGK complex formation // PLoS. One. 2013. V. 8. Art. e83181.

Santos A.R.S., Gerhardt E.C.M., Parize E., Pedrosa F.O., Steffens M.B.R., Chubatsu L.S., Souza E.M., Passaglia L.M.P., Sant'Anna F.H., de Souza G.A., Huergo L.F. NAD⁺ biosynthesis in bacteria is controlled by global carbon/nitrogen levels via PII signaling // J. Biol. Chem. 2020. V. 295. P. 6165–6176.

Selim K.A., Lapina T., Forchhammer K., Ermilova E. Interaction of N-acetyl-l-glutamate kinase with the PII signal transducer in the non-photosynthetic alga *Polytomella parva*: co-evolution towards a hetero-oligomeric enzyme // FEBS J. 2020. V. 287. P. 465–482.

Xu M., Tang M., Chen J., Yang T., Zhang X., Shao M., Xu Z., Rao Z. PII signal transduction protein GlnK alleviates feedback inhibition of N-acetyl-l-glutamate kinase by l-arginine in *Corynebacterium glutamicum* // Appl. Environ. Microbiol. 2020. V. 86. Art. e00039–20.

Zhuravleva D.E., Iskhakova Z.I., Ozhegov G.D., Gogoleva N.E., Khusnutdinova D.R., Shagimardanova E.I., Forchhammer K., Kayumov A.R. Complete genome sequence of *Lactobacillus hilgardii* LMG 7934, carrying the gene encoding for the novel PII-like protein PotN // Curr. Microbiol. 2020. V. 77. P. 3538–3545.

Effect of the PotN Protein on Activities of the GlnR and PotA Proteins in the Cells of *Lentilactobacillus hilgardii*

Z. I. Iskhakova^{1, *}, D. E. Zhuravleva¹, and A. R. Kayumov¹

¹Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420008 Russia

*e-mail: zalinunya@mail.ru

Received October 14, 2023; revised November 3, 2023; accepted November 4, 2023

Abstract—Bacterial PII-like proteins are global regulators of nitrogen and energy metabolism, which respond to nutrient availability by binding their partner proteins, thus modulating their activity. The PotN protein from *Lentilactobacillus hilgardii*, a member of the new family of PII-like proteins, is capable of competitive binding of ATP and ADP, thus regulating metabolism in response to the cell energy status. Thus, under ADP excess, PotN binds this nucleotide and interacts mostly with the PotA subunit of the polyamine ABC transporter, suppressing its ATPase activity. PotN also dissociates from the transcription factor GlnR, restoring its ability to bind DNA and modulate expression of the genes of the GlnR regulon. On the contrary, in the ATP state PotN dissociates from PotA and binds to the GlnR factor.

Keywords: PII protein, regulatory proteins, *Lentilactobacillus hilgardii*