

Анализ взаимодействия транскрипционных факторов NahR – like типа с регуляторными областями

Фролова А. А., Позднякова – Филатова И. Ю.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;
ali.frolowa@yandex.ru

Некоторые представители рода *Pseudomonas* способны метаболизировать нафталин, простейший представитель ПАУ, через образование промежуточного салицилат - иона до интермедиатов цикла трикарбоновых кислот. Рост этих микроорганизмов в присутствии салицилата приводит к индукции двух оперонов, кодирующих ферменты деградации нафталина и салицилата. Активация транскрипции происходит в присутствии транскрипционного фактора NahR, принадлежащего к LysR – семейству, в комплексе с молекулой индуктором.

Исследуемые в данной работе транскрипционные регуляторы NahR из штаммов *P.putida* G7 и AK5 гомологичны друг другу на 90%. В литературе NahR (G7) называют архетипичным и приводят как модельный регулятор, т.к. это первый охарактеризованный транскрипционный регулятор генов деструкции нафталина и салицилата. Гомология генов деструкции нафталина штамма *P.putida* AK5 достигает 99% с генами штаммов *P.putida* NCIB 9816-4 (pDTG1) и *P.putida* ND6 (pND6-1).

Были получены fusion – конструкции *nahR(G7)::gfp* и *nahR(AK5)::gfp* с регуляторными областями генов деструкции салицилата из штаммов *P.putida* G7 и AK5, соответственно. Градуировочные зависимости интенсивности флуоресценции GFP полученных систем от концентрации салицилата натрия имеют сигмоидальный вид и описываются уравнением Хилла. Физический смысл коэффициентов уравнения позволяет соотнести различия параметров белковых взаимодействий аффинной природы с заменами в последовательности белков или регуляторных областей.

Динамический диапазон определяется как максимальное увеличение экспрессии относительного базального уровня и показывает сродство транскрипционного фактора к ДНК. Динамический диапазон, а следовательно, и стабильность комплекса ДНК-белок выше в системе *nahR(G7)::gfp*. Проанализировав аминокислотные последовательности ДНК – связывающих доменов, исследуемых транскрипционных регуляторов, были обнаружены замены, соответствующие нерегулярным участкам, которые не влияют на связывание белка с ДНК.

Выравнивание регуляторных областей генов деструкции нафталина и салицилата, показало наличие высокогомологичного участка с вырожденным палиндромом. Из литературы известно, что сайты связывания транскрипционных факторов LysR – семейства почти неизменно содержат мотив TTCА – N₆ – TGAT. В регуляторной области генов деструкции салицилата штамма *P.putida* G7 была обнаружена абсолютно идентичная последовательность, у штамма *P.putida* AK5 выявлена замена G на A. Помимо типичного консенсуса TTCА – N₆ – TGAT у штамма *P.putida* G7 был обнаружен вырожденный палиндром TTCAT – N₄ – ATGAT, содержащий более короткую вариативную часть, для штамма *P.putida* AK5 подобного не наблюдается.

Наличие в регуляторной области генов деструкции салицилата штамма *P.putida* G7 консенсусной для LysR – семейства последовательности палиндрама может быть причиной более высокой стабильности комплекса транскрипционного фактора с ДНК. Дальнейшее подтверждение этой гипотезы требует характеристики *in vitro* взаимодействия белка с регуляторной областью.