

Для определения белков-партнеров для взаимодействия с LpGlnR, проводили pull down анализ с экстрактом клеток *L.plantarum* 8P43. Ранее было показано, что в клетках *Bacillus subtilis* белок GlnR, гомология которого с белком лактобацилл составляет 84%, взаимодействует с глутаминсинтетазой в присутствии глутамина и ДНК. Поэтому к экстракту клеток добавляли глутамин до конечной концентрации 20 мМ и ДНКазу (1 мкг/мл) для разрушения геномной ДНК. Анализ фракций элюции не выявил белков партнеров для белка LpGlnR. Однако, анализ самого белка LpGlnR выявил его ограниченный протеолиз с С-конца во фракциях, где была внесена ДНКаза. По-видимому, в отсутствие ДНК белок LpGlnR не взаимодействует с регуляторными партнерами (предположительно – с глутаминсинтетазой по аналогии с *Bacillus subtilis*) и подвергается частичной деградации. Данный факт может отражать способ регуляции активности белка в клетках *L.plantarum*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 14-04-32317 мол_а.

РОЛЬ ЦИНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО САЙТА В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ РЕГУЛЯТОРА FUR В. CEREUS

Салям В.И., Шадрин А.М., Солонин А.С.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН,
Пущино, Россия

v.salyamoff@yandex.ru

Ferric Uptake Regulator (Fur) является одним из важнейших плеiotропных регуляторов транскрипции грамположительных бактерий, в частности у *V. cereus*. Данный регулятор не только контролирует экспрессию генов, вовлеченных в метаболизм железа, но прямо или опосредованно влияет на экспрессию сотен генов с различными функциями. В частности, Fur вовлечен в контроль ряда факторов патогенности.

Мы провели моделирование трехмерной структуры Fur *V. cereus* на основе опубликованной структуры гомолога – Fur *Campylobacter jejuni*, который имеет наибольшее сходство аминокислотных последовательностей (идентичность 33%), среди известных структурных гомологов Fur.

Результаты нашего моделирования показали, что несмотря на сходство аминокислотных последовательностей, структурная организация металлсвязывающих сайтов (МСС) данных белков значительно различаются.

ДНК-связывающей формой белка Fur является симметричный димер, содержащий 2-3 атома двухвалентных металлов на каждый мономер, находящихся в соответствующих МСС (структурный, регуляторный и дополнительный).

Структурный МСС Fur состоит из четырех остатков цистеина и включает атом цинка. Предполагается, что при окислении цистеинов и образовании дисульфидных мостиков удержание цинка внутри сайта становится невозможным, что в свою очередь делает невозможным образование димера и, соответственно, связывание белка с ДНК.

В этой работе мы определили ДНК-связывающую активность белка Fur *V. cereus* ATCC-14579 методом задержки в геле с использованием в качестве ДНК-субстрата промотора гена гемолизина II, содержащего оператор Fur в различных условиях.

Было установлено что, добавление SH-восстанавливающих агентов приводило к увеличению константы связывания белка Fur с его оператором в 11,3 раза. Следовательно, наиболее эффективной ДНК-связывающей формой является форма белка Fur с восстановленными SH-группами. Переход белка Fur из окисленной в восстановленную форму может служить дополнительным фактором регуляции в бактериальной клетке.

Также при помощи масс-спектрометрии, нативного электрофореза и направленного мутагенеза была выяснена роль каждого цистеинового остатка в формировании и функционировании МСС.