

Применение спектрофлуориметра ChronosDFD с цифровой обработкой сигнала в частотной области (ISS, США) в биохимических исследованиях.

Аннотация статьи

FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATE ACTS BOTH AS AN INDUCER AND AS A STRUCTURAL COFACTOR OF THE CENTRAL GLYCOLYTIC GENES REPRESSOR (CggR)

Silvia Zorrilla, Denis Chaix, Alvaro Ortega, Carlos Alfonso, Thierry Doan, Emmanuel Margeat, German Rivas, Stephan Aymerich, Nathalie Declerck, Catherine A. Royer.

Biochemistry, 2007, 46 (51), 14996–1500.

ФРУКТОЗО-1,6-БИФОСФАТ ДЕЙСТВУЕТ И КАК ИНДУКТОР, И КАК СТРУКТУРНЫЙ КОФАКТОР ГЕНОВ ЦЕНТРАЛЬНЫХ ГЛИКОЛИТИЧЕСКИХ ПУТЕЙ CggR

Во всех бактериальных клетках углеводный обмен является сложным процессом, включающим множество различных метаболических путей, согласованность их протекания обеспечивается сложными механизмами регуляции. Одним из таких механизмов регуляции является комплекс ферментов, регулирующих взаимные превращения триозофосфатов в процессе центрального гликолитического пути. В клетках сенной палочки *Bacillus subtilis*, эти ферменты регулируются опероном *gapA*. Основным ферментом, регулируемым опероном *gapA*, является NAD-зависимый фермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GapA). Хотя другие ферменты центрального гликолитического пути участвуют и в реакциях гликолиза, и в обратных им реакциях глюконеогенеза, GapA принимает участие только в гликолизе. Для проведения соответствующих реакций глюконеогенеза *B. Subtilis* и другие Грамположительные бактерии продуцируют NADP-зависимую гегидрогеназу (GapB). Экспрессия гена GapA регулируется двумя репрессорами транскрипции. Эти белки — катаболический контрольный белок (CcpA) и репрессор гена центрального гликолитического пути (CggR).

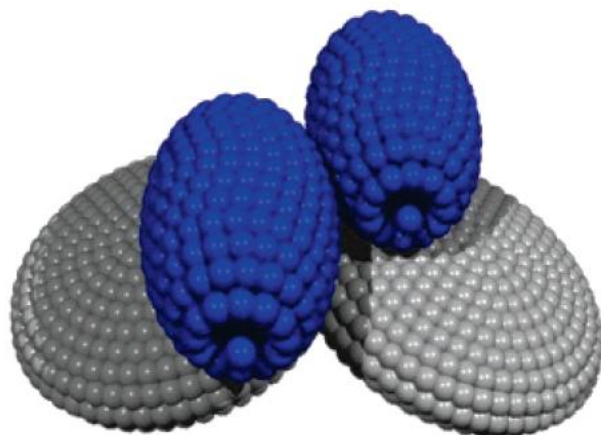


Рис. 1. Модель структуры димера CggR.

Последний фермент относится к семейству SorC ферментов и является одним из немногих членов семейства, для которого исследована кодирующая последовательность ДНК. Известно, что CggR регулируется первым цистроном оперона *gapA*. В N-концевом участке белка содержится способный связываться с ДНК мотив «спираль-поворот-спираль». Этот мотив гомологичен соответствующим мотивам глюкозоамин-6-фосфат деаминазы и других ферментов семейства NagB. Взаимодействие CggR с целевым участком ДНК модулируется индуктором фруктозо-1,6-бифосфатом, который представляет собой сложный эфир фруктозы и ортофосфорной кислоты, промежуточное соединение гликолиза.

Группой французских и испанских исследователей было проведено подробное исследование особенностей взаимодействия фруктозо-1,6-бифосфата с CggR. Учёные прибегли к различным методам исследований, одним из которых было измерение времени жизни флуоресценции CggR в присутствии

фруктозо-1,6-бифосфата. В качестве флуоресцентных меток исследователи использовали тетраметилродамин, красители Alexa Fluor 488 и Atto 647N, ковалентно привязанные к аминок группам белка. Для проведения измерений учёные использовали специальный **спектрофлуориметр с разрешением во времени (ISS, США)**. Ключевой особенностью данного прибора является технология модуляции возбуждения флуоресценции с использованием различных источников света и детекторов и последующей цифровой обработкой сигнала. Источники работают с установленной пользователем модуляцией частоты сигнала. Сигнал флуоресценции содержит основную частоту, повторяющую скорость работы лазера, и гармонические сигналы, отстающие по фазе. Математическая обработка полученного сигнала позволяет определить амплитуду и отставание по фазе для каждого компонента. По разности фаз между флуоресценцией и возбуждением на заданной частоте и по отношению амплитуд происходит вычисление времени жизни флуоресценции в широчайшем диапазоне — от 10 пс до 1 с в области длин волн 200 — 1700 нм.

Флуоресцентный анализ в совокупности с другими методами исследования показал, что фруктозо-1,6-бифосфат проявляет высокую степень сродства ко второму сайту связывания репрессора и вызывает значительные конформационные изменения в структуре комплекса CggR/ДНК, но без каких-либо последствий для степени сродства CggR с его оператором. Связывание с этим сайтом уменьшает степень олигомеризации белка, а вызванные конформационные изменения способствуют его стабилизации. По мнению авторов исследования, полученные данные говорят о том, что фруктозо-1,6-бифосфат играет двойственную роль по отношению к CggR. Помимо того, что он действует как индуктор транскрипции при связывании с сайтом низкого сродства, фруктозо-1,6-бифосфат может связываться с сайтом высокого сродства и вызывать изменения в конформации и стабильности белка, т.е. действуя как кофактор.

Подготовил Алексей Шнитко
ООО «НКЦ «ЛАБТЕСТ»
тел.: +7 495 605 35 07
факс: +7 495 605 39 44
a.shnitko@lab-test.ru
www.lab-test.ru