

# Транскрипционная регуляция в локусе *yihEscherichiacoli*.

*Автор работы:*

Белоусова Евгения Александровна  
(ученица 11Н СУНЦ МГУ им. Колмогорова)

*Научные руководители:*

Гельфанд Михаил Сергеевич  
(заместитель директора  
Института Проблем Передачи Информации РАН,  
доктор биологических наук)

Тутукина Мария Николаевна  
(старший научный сотрудник  
Института Биофизики Клетки РАН,  
кандидат биологических наук)

Казнадзей Анна Денисовна  
(младший научный сотрудник  
Института Проблем Передачи Информации РАН)

*Место выполнения:*

Институт проблем передачи информации РАН  
Институт биофизики клетки РАН

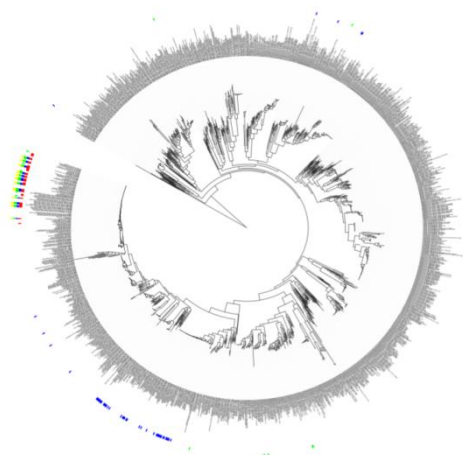
**Содержание:**

<b>1. Введение.....</b>	<b>2</b>
<b>2. Обзор литературы.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Ключевые моменты транскрипции бактерий.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1. Структурно-функциональная организация транскрипционного аппарата.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2. Этапы формирования транскрипционного комплекса.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2. Факторы регуляции транскрипции.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3. Кассета генов <i>uif</i>. Метаболические пути, контролируемые генами, входящими в её состав.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3.1. Метаболизм сульфоглюкозы.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3.2. Метаболизм глюкозы и сахарозы.....</b>	<b>8</b>
<b>2.4. Заключение по обзору литературы.....</b>	<b>9</b>
<b>3. Методы, оборудование и средства обработки данных.....</b>	<b>10</b>
<b>4. Обсуждение и результаты.....</b>	<b>12</b>
<b>4.1. Картирование промоторов кассеты генов <i>uif</i>.....</b>	<b>12</b>
<b>4.2. Изучение регуляции транскрипции генов <i>uif</i>-кассеты.....</b>	<b>14</b>
<b>5. Выводы.....</b>	<b>16</b>
<b>6. Заключение.....</b>	<b>16</b>
<b>7. Список литературы.....</b>	<b>17</b>

## 1. Введение.

Сегодня проводится огромное количество исследований, посвященных изучению биологических особенностей различных бактерий, причем, в первую очередь, они интересны как патогены человека. Бактерии вызывают огромное количество заболеваний человека, но для многих из них еще не разработаны эффективные методы лечения. Крупный блок методов лечения бактериальных заболеваний основан на воздействии препаратов на среду обитания патогенов, с целью смены последней на наиболее неблагоприятную. Для разработки подобных методов важно изучение механизмов ответной реакции бактерий на те или иные условия. В частности, одним из ключевых аспектов жизнедеятельности бактерий является сахарный метаболизм. Гены сахарного метаболизма занимают около 30% бактериального генома и обладают сложной регуляцией, обеспечивающей рациональное использование различных сахаров бактерией. В данной работе мы обращаем внимание на кассету генов сахарного метаболизма *yih*, которая отвечает за метаболизм глюкозы, лактозы, сульфоглюкозы, галактозы, глицерина и т. д. Эта кассета имеется у многих патогенных бактерий (например, у бактерий рода *Streptococcus*), а также у *Escherichia coli*. На рис. 1 показано наличие исследуемой кассеты у различных бактерий на эволюционном древе (широкий разброс обусловлен в основном горизонтальным переносом генов, характерным для прокариот).

Рис. 1. Гены кассеты *yih* на эволюционном древе бактерий.



В качестве объекта исследования была выбрана *E.coli* как непатогенный и наиболее удобный для работы в лаборатории вид бактерий. Таким образом, изучив особенности транскрипции и регуляции кассеты *yih* у *E.coli*, мы получим более полное понимание функционирования сахарного метаболизма у бактерий, что в дальнейшем может быть использовано для разработки эффективных методов борьбы с опасными патогенами.

Таким образом, **целью** нашей работы является:

**Картировать промоторы генов *uid*-касеты и изучить регуляцию транскрипции этих генов.**

Для достижения цели нам нужно будет выполнить ряд **задач**:

1. Проанализировать межгенные области с целью выявления потенциальных стартов транскрипции.
2. Проверить способность выявленных промоторов к взаимодействию с РНК-полимеразой.
3. С помощью множественного выравнивания выявить сайты связывания регуляторных белков вблизи обнаруженных стартов транскрипции.
4. Исследовать зависимость экспрессии генов *uid*-касеты от обнаруженных регуляторов в различных условиях роста бактериальной структуры.

## 2. Обзор литературы.

### 2.1. Ключевые моменты транскрипции бактерий.

#### 2.1.1. Структурно-функциональная организация транскрипционного аппарата.

Все бактериальные гены, в том числе все гены *Escherichiacoli* транскрибируются только одним ферментом – ДНК-зависимой РНК-полимеразой (РНКП), которая состоит из шести субъединиц: пять постоянных ( $\alpha_2\beta\omega$ ) и одной из семи «сменных»  $\sigma$ -субъединиц ( $\sigma^{19(\text{Fec})}$ ,  $\sigma^{24(\text{E})}$ ,  $\sigma^{28(\text{F})}$ ,  $\sigma^{32(\text{H})}$ ,  $\sigma^{38(\text{S})}$ ,  $\sigma^{70(\text{D})}$  и  $\sigma^{54(\text{N})}$ ). Для инициации транскрипции РНКП узнает только определенные «сигнальные» элементы в последовательности ДНК и образует с ними специфические контакты. Такая последовательность, избирательно распознаваемая ферментом, называется промотором. Промотор занимает обширную область от -255 до +155 п. н. от точки старта транскрипции. Наиболее изученными «сигнальными» элементами промотора являются консервативные (консенсусные) гексануклеотиды, расположенные в промоторах  $\sigma^{70}$  на расстоянии 10 и 35 пар нуклеотидов выше стартовой точки транскрипции.

Табл. 1. Характеристика промоторных областей бактерий.

	Консенсус	Расстояние от старта (п.н.)	Оптимальное расстояние (п.н.)
Элемент -10	TATAAT	2-11	6
Элемент -35	TTGACA	22-38	29

Все промоторы в клетке в разной степени соответствуют консенсусу и это обеспечивает возможность регуляции активности промоторов в клетке. В промоторе

некоторые позиции являются более значимыми. Так, в элементе -10 наиболее часто встречающимися являются ТА - - Т, что, по-видимому, говорит об их большей значимости для работы промотора по сравнению с остальными. Каждая консервативная пара имеет определенное значение для формирования транскрипционного комплекса, но ни одна из них не является абсолютно необходимой.

Консенсусные последовательности определяют средство  $\sigma$ -субъединицы РНКП к промотору, но чаще всего промоторы не являются идеальными и способны обеспечить лишь базовый уровень транскрипции генов.

Область ДНК, расположенную по ходу синтеза РНК, т.е. справа от стартовой точки транскрипции принято называть “downstreamregion”, а участок, находящийся выше элемента -35 против хода транскрипции - “upstreamregion” или UP-элементом.

Элементы последовательностей вне гена, влияющие на активность транскрипции:

1. Динуклеотид TG. Отстоит на 1 п.н. от элемента -10. Промоторы с продленной 10 областью=> устойчивость открытых комплексов с РНК-полимеразой к низким температурам.
2. Мотив GGGA (позиции -4/-7). Позволяет РНКП формировать комплекс с промотором, у которого отсутствует элемент -35.
3. Последовательность GCGC (-4,-6 позиции). В промоторах, активно работающих в фазу быстрого роста.
4. UP-элемент, состоящий из A/T-богатой последовательности в 20 п.н. Вблизи -35 позиции.
5. Т-треки (до -219 позиции). Способствуют формированию устойчивых изгибов ДНК.
6. Динуклеотиды YR, где Y=T=C, R=G=A. Легко изгибаются в сторону малой или большой бороздок ДНК.

Значимые регуляторные последовательности могут также находиться в транскрибируемой части гена. Все эти особенности промоторной ДНК учитываются алгоритмом поиска промоторов PlatProm, который мы использовали в данной работе для картирования потенциальных стартов транскрипции. Он оценивает наличие всех необходимых элементов, и каждой точке в геноме присваивает «скор» - вероятность того, что именно в этой точке может начаться транскрипция. В отличие от многих других алгоритмов [9, 10], PlatProm также учитывает наличие в upstream области прямых и инвертированных повторов как потенциальных сайтов взаимодействия с регуляторными белками.

### **2.1.2. Этапы формирования транскрипционного комплекса.**

Транскрипция у эубактерий осуществляется РНКП, которая существует в двух состояниях: кор-фермент (рис.2) и холо-фермент (рис. 3). Кор-фермент (E) включает в себя 5

субъединиц ( $\alpha_2\beta\beta'$   $\omega$ ) и осуществляет синтез РНК на ДНК-матрице, однако неспособен узнавать промоторные последовательности, которые обеспечивают стабильное связывание фермента на ДНК, необходимое для инициации транскрипции. Фактором промотор-специфичности являются  $\sigma$ -субъединицы, входящие в состав холо-фермента ( $E\sigma$ ). Именно они ответственны за связывание холо-фермента с промоторной областью, а также за плавление ДНК в месте контакта.  $\sigma$ -субъединицы имеют ДНК связывающий мотив спираль-поворот-спираль, который контактирует с обеими цепями ДНК, но после инициации транскрипции они диссоциируют из комплекса РНКП-ДНК-мРНК.

Рис.2. Кор-фермент.

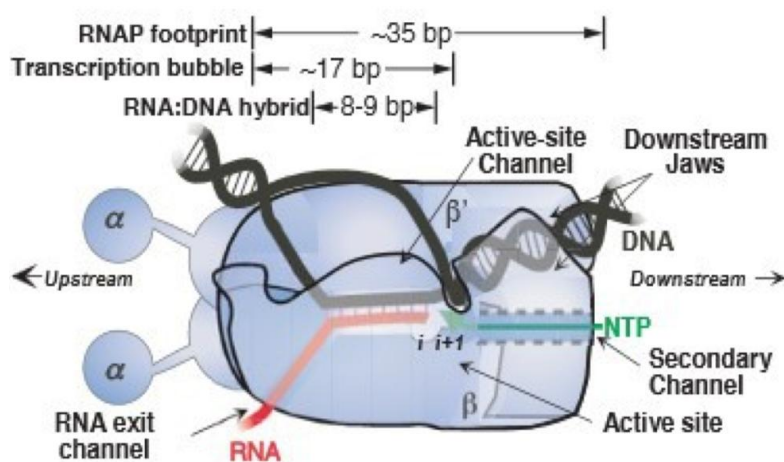
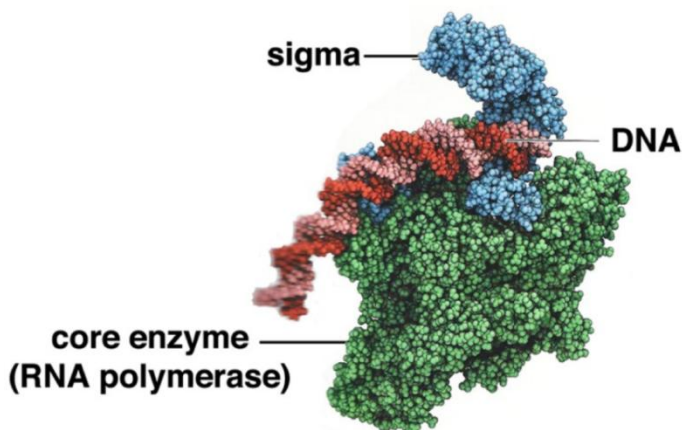


Рис. 3. Холофермент.



Таким образом, процесс транскрипции начинается с того, что холо-фермент РНКП узнает сигнальные элементы в промоторной ДНК, после чего образуется транскрипционный комплекс. Изменение сродства РНКП к промотору позволяет регулировать экспрессию гена с помощью специальных белковых факторов транскрипции, которые могут связываться с промоторной ДНК и либо усиливать стабильность и продуктивность комплексов с РНКП (в этом случае белок называется активатором), либо, напротив, закрывать доступ ферменту

(репрессор). Активация транскрипции регуляторным белком осуществляется либо за счет изменения конформации ДНК, либо за счет вытеснения связанного с промотором репрессора.

Остановимся подробнее на факторах транскрипционной регуляции.

## **2.2. Факторы транскрипции.**

В настоящее время известно 1765 генов *E. coli*, находящихся под контролем специфических регуляторов. Это около 38% от всего генома. Гены, не регулирующиеся специфическими регуляторами, называются конститутивными.

Концентрация каждого фактора зависит от внешних условий и позволяет управлять транскрипционным аппаратом клетки в зависимости от ее нужд.

Большинство факторов транскрипции состоят из двух доменов, выполняющих разные функции. Один из доменов воспринимает внутренний или внешний сигнал путем связывания лиганда белковой или небелковой природы (часто метаболита). Второй домен непосредственно взаимодействует со специфической последовательностью на ДНК, находящейся вблизи или перекрывающейся с сайтами связывания РНКП или других факторов транскрипции.

Промоторы, активируемые регуляторными белками, делят на 3 класса:

- 1) Регуляторный белок связывается с ДНК в upstream-области и формирует контакт с C-концевым доменом  $\alpha$ -субъединицы;
- 2) Регулятор связывается вблизи -35 области и может потенциально взаимодействовать со всеми субъединицами РНКП;
- 3) Регулятор имеет несколько сайтов связывания белков регуляторов.

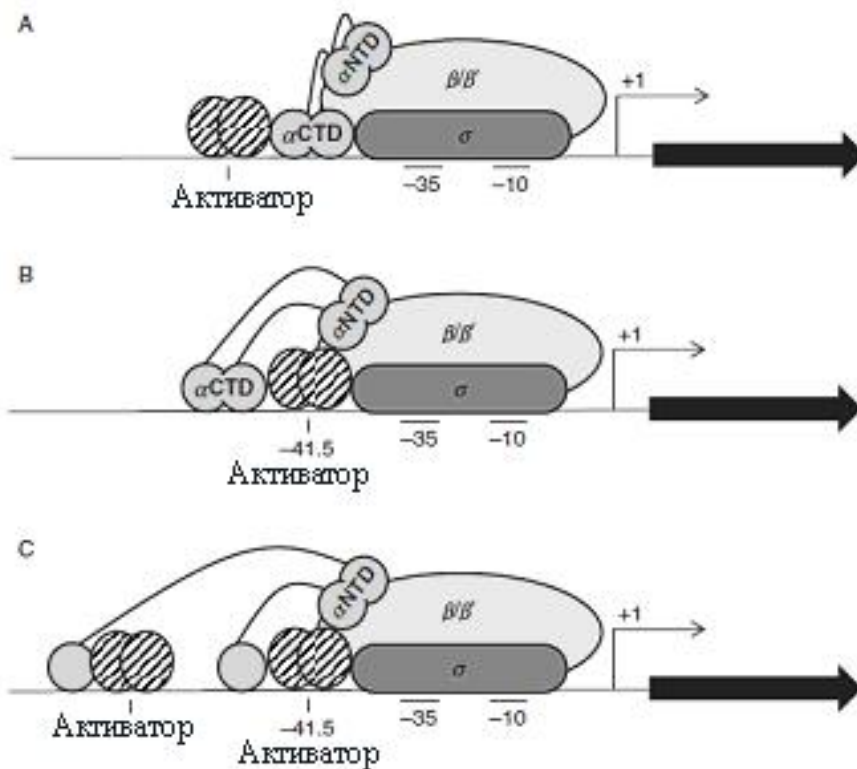


Рис. 4. Классификация активируемых промоторов по расположению сайта связывания белка-активатора. А – промоторы первого класса, В – промоторы второго класса, С – промоторы третьего класса.

Факторы регуляции транскрипции можно классифицировать по:

1. Моменту диссоциации из транскрипционного комплекса:
  - Диссоциируют сразу после образования транскрипционного комплекса;
  - Взаимодействуют с РНКП во время элонгации транскрипции;
2. Числу генов – мишеней:
  - Глобальные (регулируют большое число генов нескольких метаболических путей);
  - Специфические (регулируют некоторые конкретные гены);
3. По характеру влияния на промотор:
  - Репрессоры (связываются с коровой частью промотора или сразу за ним);
  - Активаторы:
    - 1) Способствуют образованию открытого комплекса;
    - 2) Стабилизируют контакт РНКП с промотором.

Некоторые регуляторные белки могут выполнять двойную роль, то есть, выступать в качестве как активатора, так и репрессора на промоторах разных генов, или даже на одном и том же промоторе в зависимости от наличия лиганда.



### 2.3. Кассета генов *yih*, и метаболические пути, контролируемые генами, входящими в её состав.

Белки, закодированные в изучаемой кассете *yih*, регулируют метаболизм сахаров, в числе которых на сегодняшний день глюкоза, сульфоглюкоза и лактоза. По функциям они являются:

Табл. 2. Гены кассеты *yih*.

Ген	Функция белка
<i>ompL</i>	Порин
<i>yihO</i>	Транспортер
<i>yihP</i>	Транспортер
<i>yihQ</i>	Гликозидаза
<i>yihR</i>	Эпимераза
<i>yihS</i>	Изомераза
<i>yihT</i>	Альдолаза
<i>yihU</i>	Редуктаза
<i>yihV</i>	Киназа
<i>yihW</i>	Транскрипционный фактор

#### 2.3.1. Метаболизм сульфоглюкозы.

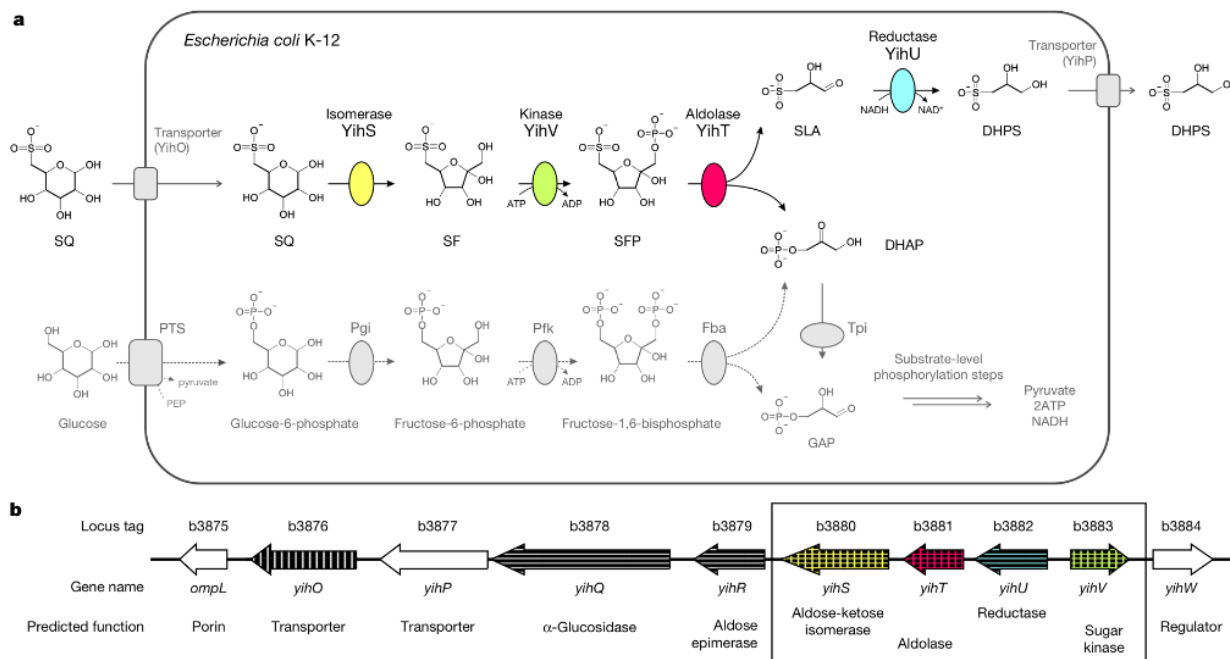


Рис. 5. а) метаболический путь сульфогликолиза, б) кассета генов, где:

- Вертикальными линиями обозначены гены, необходимые для роста на сульфоглюкозе согласно данным мутационного анализа;
- Горизонтальными линиями – гены, индуцируемые для роста на сульфоглюкозе по данным анализа протеома и / или транскриптома;

- В рамке – гены, кодирующие 4 основных фермента метаболизма сульфоглюкозы;

### 2.3.2. Метаболизм глюкозы и лактозы.

На рис.6представлены гипотетические пути метаболизма лактозы, построенные на основе биоинформатических предсказаний, один из которых, по нашим предположениям, может быть реализован с участием ферментов, кодируемых генами *yihU*, *yihV*, *yihR*, *yihT*.

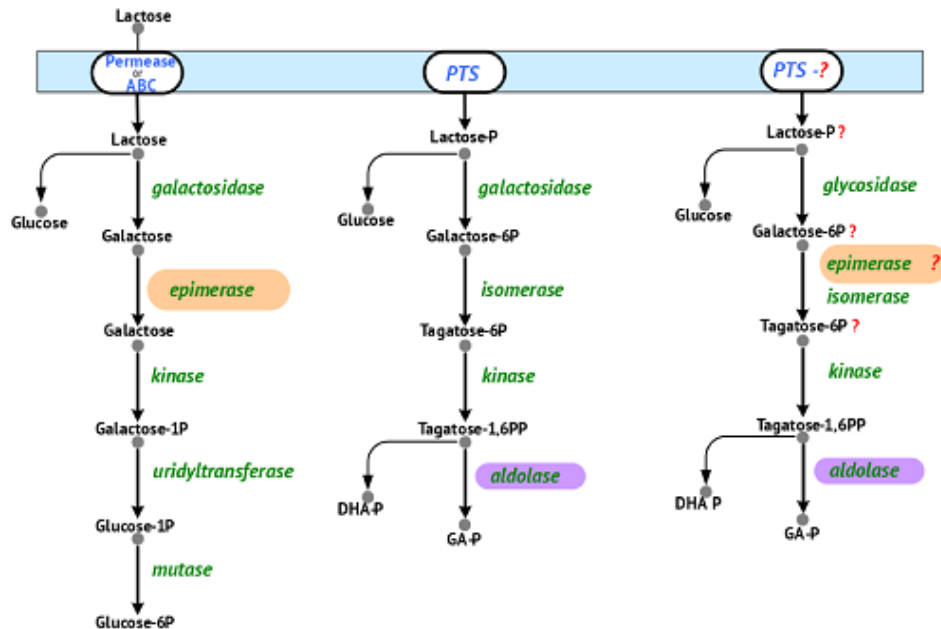


Рис. 6.Пути метаболизма лактозы, предсказанные методами сравнительной геномики (данные получены в рамках Школы Молекулярной и Теоретической Биологии)

### 2.4. Заключение по литературному обзору.

Таким образом, транскрипция - это сложный процесс, в котором, помимо ДНК (промотора) и РНКП, участвуют еще белки регуляторы транскрипции и их лиганды, а также белки нуклеоида. Белки нуклеоида отвечают за упаковку ДНК, а значит, определяют ее свойства и способность РНКП эффективно осуществлять транскрипцию.

Уже известные данные о функциях белков, кодируемых генами кассеты *yih*, наталкивают на мысль о том, что данная кассета недостаточно изучена и требует более полных данных о своём строении и роли в жизнедеятельности бактерий. Поэтому было интересно проверить, действительно ли белки, кодируемые генами *yih*-кассеты, способны в определённых условиях утилизировать лактозу. Для этого необходимо исследовать динамику изменения их экспрессии при росте бактерий на различных сахарах. Кроме того, важно понять механизм, позволяющий клетке почувствовать присутствие в среде того или иного сахара и переключить свой метаболизм с одного пути на другой. Для этого необходимо иметь

информацию о регуляторных белках, контролирующих транскрипцию того или иного гена при росте бактериальной культуры на различных источниках углерода.

Исследования подобного рода могут устранить определённые пробелы в общей картине метаболизма бактерий, пополнить систему научных знаний в области бактериальной геномики новыми примерами и моделями механизмов регуляции экспрессии генов.

### **3. Методы, оборудование и средства обработки данных**

Практическая часть исследования производилась в Институте Биофизики Клетки РАН (г. Пущино). Объектом исследования был штамм *E. coli* K12 MG1655.

Последовательности исследуемых межгенных областей были взяты из базы данных MicrobesOnline [Dehaletal.,2010]. Для исследования структурно-функциональной организации регуляторной области генов кассеты *yih* была использована компьютерная программа PlatProm [Shavkunovetal., 2009]. Эта программа осуществляет поиск потенциальных промоторов с учетом консервативных элементов и генетического окружения каждой позиции на исследуемом участке генома. Множественное выравнивание исследуемых участков генома было произведено с помощью алгоритма Pro-Coffee (<http://tcoffee.crg.cat>, [Notredameetal.,2000]). Праймеры для ПЦР в реальном времени были подобраны с помощью программы Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Для построения трёхмерных структур белков использовалась программа Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>).

В ходе мы также прибегали к экспериментальным методам. Среди них: ПЦР-амплификация, электрофорез с задержкой в геле, выделение тотальной мРНК, обратная транскрипция с праймерами к исследуемым генам, ПЦР в реальном времени.

ПЦР-смесь (20 мкл) содержала по 10 пмоль праймеров, 125 мкМ каждого dNTP, 100 нг геномной ДНК, 1 X Taq – буфер (67 мМ Tris-HCl, pH 8,8, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 15 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2% BSA), 1 U Taq ДНК-полимеразы (Евроген, Россия), стерильную деионизованную воду.

Оценка способности фрагментов ДНК к образованию комплексов с  $\sigma^{70}$ -РНК-полимеразой *E. coli* производилась с помощью метода задержки в геле (Electrophoretic Mobility Shift Assay - EMSA, gel-shift). Каждый образец, включая контрольный, содержал ~1 пмоль ДНК растворенной в 1x транскрипционном буфере (5 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,01 мМ EDTA, 25 мкг/мл BSA, 5 мМ NaCl) и был предварительно выдержан при 37°C в течение 20 минут. Затем в опытные образцы добавляли 1, 2 или 4 пмоль  $\sigma^{70}$ -РНК-полимеразы (Sigma, США), не вынимая пробы из термостата, и инкубировали еще 20 минут для формирования комплексов. После этого в пробы добавляли гепарин (конечная концентрация 20 мкг/мл) для разрушения неспецифических контактов. Образцы наносили на предварительно прогретый до 36-37°C 4% ПААГ при минимальном токе. Разделение

комплексов и свободной ДНК проводили при напряжении ~280 В и силе тока ~140-150 мА. Гель окрашивали бромистым этидием, визуализировали в проходящем УФ-свете.

Реакция обратной транскрипции не может быть произведена без предварительного выделения суммарной клеточной фракции РНК. Для этого рост бактерий останавливали на экспоненциальной фазе, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в буфере, содержащем 15 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 0,45 М сахарозы, 8 мМ EDTA, с добавлением лизоцима (5 мг/мл). После инкубации на льду в течение 15 минут смесь центрифугировали 6 минут при 8000-10000 об/мин (+4°C). Осадок растворяли в 0,5 мл буфера, содержащего 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 10 мМ NaCl, 10 мМ цитрата натрия и 1,5 % SDS, добавляли 15 мкл 97% DEPC и тщательно перемешивали. Смесь переносили в чистый эппендорф, инкубировали 5 минут при 37°C и охлаждали на льду. После добавления 250 мкл насыщенного раствора NaCl для осаждения белков и связанной с ними ДНК образцы 10 минут инкубировали на льду и осаждали центрифугированием при 14000 об/мин в течение 20 минут (+4°C). Содержащий РНК супернатант переносили в новую пробирку и добавляли 3 объема ледяного этанола для осаждения РНК. Затем образцы выдерживали 30 минут при -70°C и центрифугировали 20 минут при 12000 об/мин, +4°C. Осадок дважды промывали 70% спиртом, высушивали и растворяли в milliQ-воде, обработанной DEPC. Полученный препарат обрабатывали ДНКазой I (NewEnglandBiolabs, 7,5 Ku, 37°C, 30 минут). Фермент инактивировали нагреванием до 70°C в течение 10 минут. Качество полученной РНК контролировали электрофоретически в денатурирующем полиакриламидном геле (4% ПААГ с 8 М мочевиной). Концентрацию препаратов определяли на спектрофотометре ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., США). Далее для проведения реакции обратной транскрипции концентрацию РНК в полученных образцах выравнивали по наименьшей концентрации, и в реакцию всегда брали равное количество РНК. Смесь РНК (2 мкг) с праймером (4 пмоль) прогревали в течение 10 минут при 70°C, затем в пробирку добавляли 8 мкл смеси, содержащей 5x реакционного буфера (Fermentas, 250 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 250 мМ KCl, 20 мМ MgCl<sub>2</sub> и 50 мМ DTT) и dNTP до конечной концентрации 0,2 мМ. После этого образцы охлаждали на льду в течение 2 минут, собирали конденсат со стенок коротким центрифугированием (1-2 секунды) и вносили в реакцию 20 U M-MuLV обратной транскриптазы (RevertAid, Fermentas, Литва). Синтез кДНК осуществляли при 40°C в течение 40 минут. Для инактивации фермента смесь инкубировали 5 минут при 85°C.

Наконец, финальный этап эксперимента был проведен с помощью метода ПЦР в реальном времени. Реакцию проводили на амплификаторе ДТ-322 (ДНК-Технология, Россия) с использованием интеркалирующего в двуцепочечную ДНК флуоресцентного красителя SYBRGreenI (Sigma, США). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 2-4 мкл кДНК, по 4

пмоль каждого праймера, 0,1 мМ каждого dNTP, стандартный буфер (Евроген, Россия), 1 мкл SYBRGreenI (разведение 1:3000) и 1 Utaq-полимеразы (Евроген, Россия). Программа амплификации для всех пар праймеров была следующей: предварительная денатурация при 94°C, 2 минуты; далее 30-35 циклов: 94°C - 30 секунд, 54°C – 30 секунд, 72°C – 35 секунд. Флуоресцентный сигнал регистрировали в конце каждого цикла в течение 15 секунд. В качестве позитивного контроля использовали пробы, содержащие геномную ДНК *E.coli* (наблюдали только ожидаемый продукт), а в качестве негативного – пробы с РНК, проведенные через реакцию обратной транскрипции без добавления фермента (синтез ампликонов отсутствовал). Качество ПЦР-продуктов оценивали электрофоретически в 5%-ом ПААГ (210 В, 100 мА). Количественный анализ уровня экспрессии проводили при помощи программы q\_PCR (ДНК-Технология). Относительное количество синтезированных ампликонов рассчитывали по формуле  $2^{\Delta Ct}$ .

Используемое оборудование упомянуто в тексте, кроме того почти на каждом этапе использовался прибор Вортекс, эппендорфы, пробирки.

#### 4. Обсуждение и результаты

##### 4.1. Картирование промоторов кассеты генов *yih*.

Ранее считалось [4], что гены *yihUTSR* транскрибируются полицистронно, а значит, их экспрессия должна одинаково меняться при изменении условий роста бактериальной культуры. Однако результаты полногеномного экспрессионного скрининга при росте на лактозе, а также данные, полученные в рамках ШМТБ 2015, говорят о том, что эти гены экспрессируются дифференцированно (то есть не представляют собой оперон) и если экспрессия генов *yihU* и *yihT* реагирует на появление лактозы в среде, то уровень мРНК гена *yihR* остается неизменным. Это может означать их независимую транскрипцию. Основываясь на этом факте, мы выдвинули следующую гипотезу:

**Между генами *yih* находятся дополнительные промоторы.**

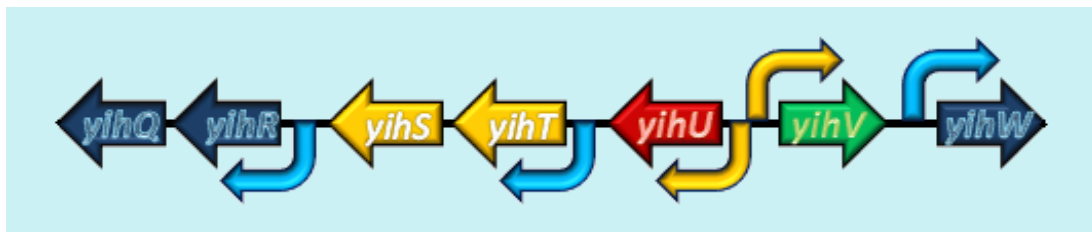


Рис. 7. Предполагаемые промоторы *yih*-кассеты.

Для проверки этого предположения мы сначала картировали возможные старты транскрипции с помощью алгоритма PlatProm с последующей ручной проверкой консенсусных элементов. Оказалось, что между генами *yihU* и *yihT*, *yihS* и *yihR* алгоритмом с

высокой вероятностью – “скором” (выше 9 при пороговом уровне достоверности 7,4) – находятся потенциальные точки инициации транскрипции. При этом между генами *yihT* и *yihS* потенциальных промоторов с высоким “скором” не было, что хорошо согласуется с синхронным изменением их экспрессии – значит, эти гены находятся в опероне. Затем мы проверили, связываются ли области, содержащие обнаруженные нами потенциальные промоторы, с РНК-полимеразой. Для этого с помощью Primer3 были подобраны праймеры к соответствующим межгенным областям, и с помощью ПЦР-амплификации получены фрагменты ДНК, содержащие интересующие нас межгенные области. Затем мы оценили их способность связывать РНК-полимеразу с помощью метода задержки в геле (band-shift). Результаты данного эксперимента приведены на рис. 8:

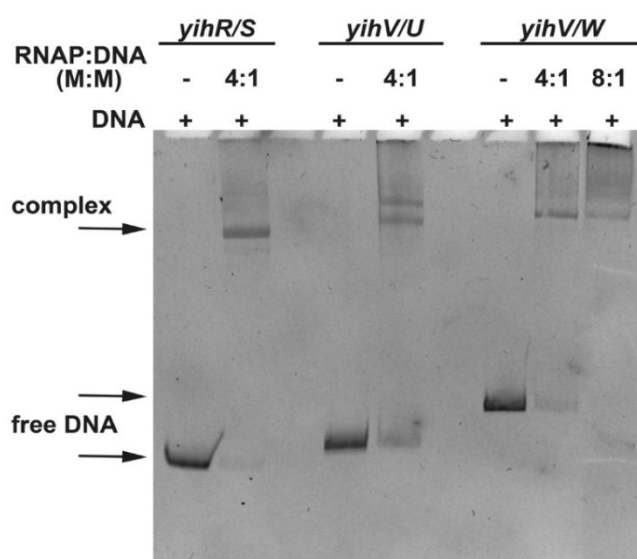


Рис. 8. Оценка способности исследуемых межгенных областей связывать РНК-полимеразу с помощью метода задержки в геле (band-shift).

Если РНК-полимераза связывается с исследуемым фрагментом ДНК, то масса фрагмента увеличивается, и он задерживается в геле. В результате, помимо свободной ДНК, мы видим еще одну полосу с существенно меньшей подвижностью. Количество свободной ДНК при этом пропорционально уменьшается. Таким образом, рис. 8 говорит о том, что между генами *yihR* и *yihS* и *yihV* и *yihW* найдены промоторы – полоса на геле — это исследуемая межгенная область и связавшаяся с ней РНК-полимераза.

Однако в случае участка между генами *yihU* и *yihV* на геле видно две полосы на малом расстоянии друг от друга. Это явление объясняется наличием еще одного промотора на другой цепи (то есть с этим участком ДНК связывалось либо 2 молекулы РНК-полимеразы — это первая полоса с более тяжелым и объёмным комплексом, либо 1 молекула — это вторая

полоса более легких комплексов). Значит, кассета генов *yih* является далеко не классическим бактериальным опероном, и, скорее всего, ее гены *yihU*, *yihV*, *yihR* и *yihS* вовлечены в различные метаболические пути и, возможно, обладают различной регуляцией.

Результаты представлены в таблице 3:

Табл. 3. Результаты картирования промоторов.

<i>yihU/yihV</i>	<i>yihR/yihS</i>	<i>yihV/yihW</i>
2 промотора	1 промотор	1 промотор

#### 4.2. Изучение регуляции транскрипции генов *yih*-кассеты.

Как правило, кассеты генов, кодирующих ферменты сахарного метаболизма, находятся под контролем глобального регулятора cAMP-CRP [5-7], а также локального регулятора, ген которого обычно находится поблизости. В изучаемой кассете наиболее вероятным локальным транскрипционным регулятором является белок, кодируемый геном *yihW*, потому что изучение этого белка с помощью программы Phyre2 подтвердило, что он относится к распространённому семейству регуляторов сахарного метаболизма GlpR (рис. 9, 10). Поэтому мы выдвинули следующую гипотезу:

**Белок YihW может регулировать (ингибировать или активировать) транскрипцию генов *yihU* и *yihV* при росте клеток *E.coli* с различными источниками углерода в качестве источника питания.**

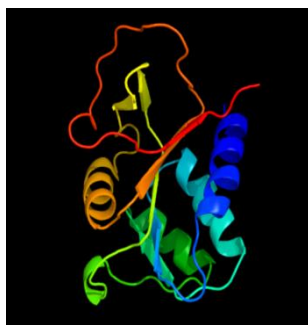


Рис. 9. Белок GlpR Рис. 10. Белок YihW

Мы вырастили колонии *E.coli* на четырёх различных источниках углерода: глюкозе, глицерине, галактозе, лактозе. Затем через 4 часа роста (экспоненциальная фаза роста) выделили тотальную мРНК, и с помощью геноспецифического праймера и обратной транскриптазы провели обратную транскрипцию. После чего уже с использованием двух праймеров провели амплификацию этих фрагментов ДНК в реальном времени. Чистота полученных продуктов была оценена с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 11).

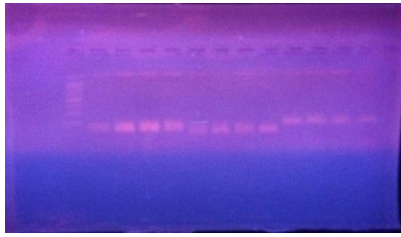


Рис. 11. Оценка чистоты продуктов, полученных методом ПЦР-амплификации в реальном времени.

При анализе результатов количество мРНК на глюкозе было принято за единицу, соответственно, активность транскрипции генов на других сахарах измерялась относительно глюкозы.

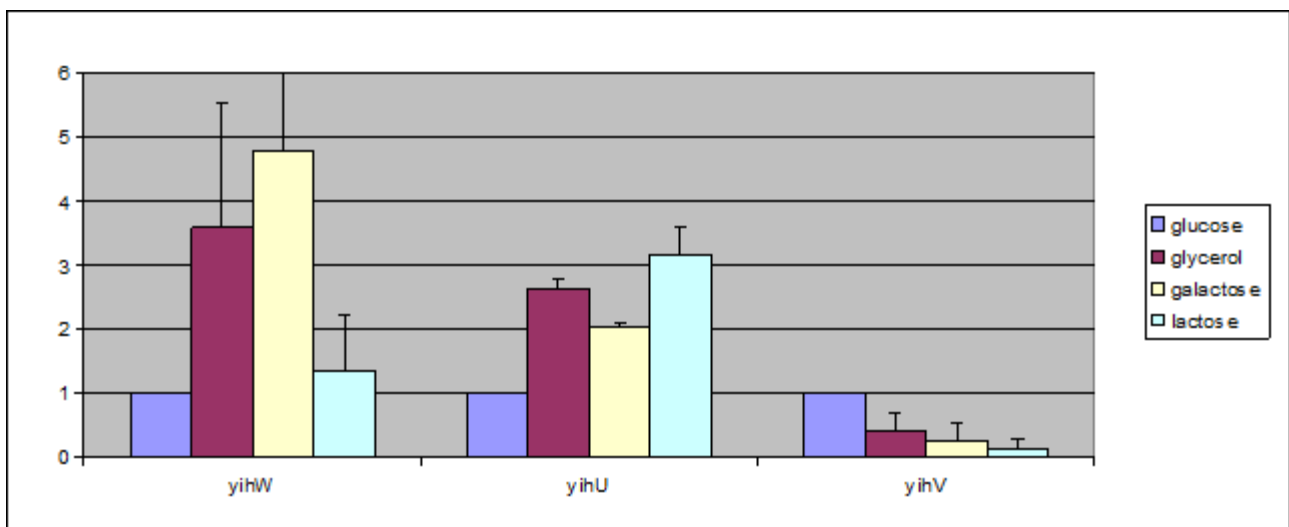


График 1. Транскрипция исследуемых генов при росте бактериальной культуры на различных сахарах.

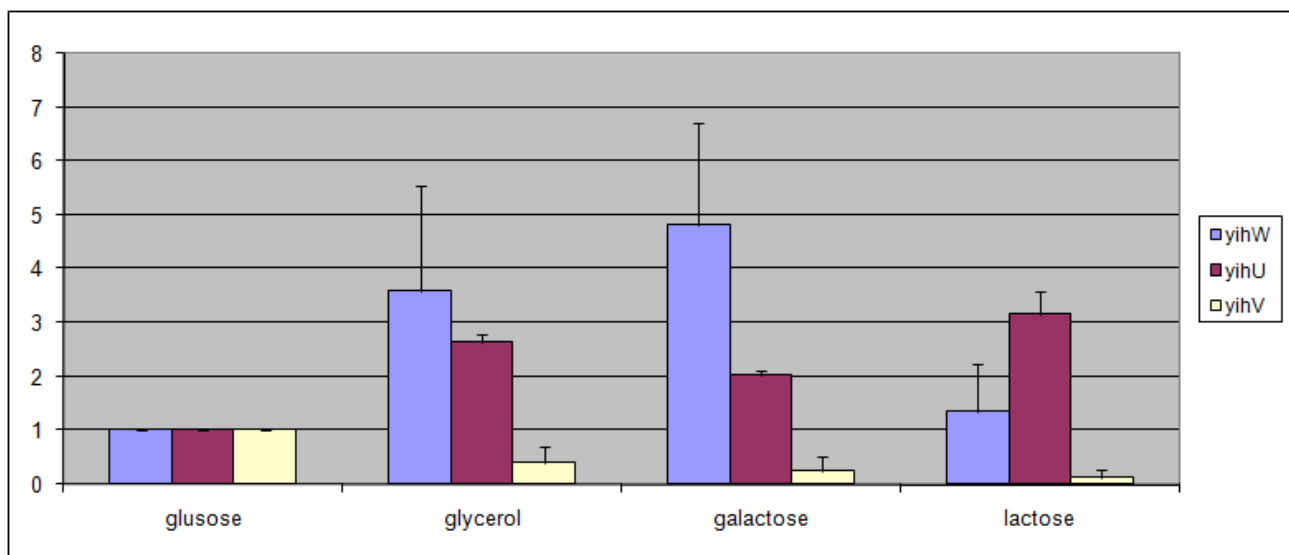


График 2.



В рамках проведенного эксперимента можно заключить, что YihW является репрессором для гена *yihU*, который, предположительно, кодирует редуктазу - потому что при росте клеток на глицерине и галактозе уровень транскрипции *yihW* – высокий, а *yihU* – низкий, а при лактозе – наоборот. Насчет *yihV* в рамках проведенного эксперимента можно заключить, что если *yihW* и является регулятором его транскрипции, то приводит к её сильному угнетению. Хотя, конечно, какая-либо связь между *yihV* и *yihW* менее очевидна, чем между *yihU* и *yihW*.

Для дальнейшего изучения этого явления необходимо провести эксперимент с мутантной по гену *yihW* линией клеток, а также провести биоинформатическую работу по поиску сайтов связывания этого регулятора. В идеале было бы неплохо получить чистый белок YihW и оценить эффективность его связывания с регулируемыми участками с помощью band-shift, а также распределение сайтов его связывания в геноме с помощью иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием.

## **6. Выводы.**

1. Было показано, что между генами кассеты *yih*, до настоящего времени считавшейся опероном, присутствуют функциональные промоторы, обеспечивающие дифференциальную регуляцию находящихся в ней генов.
2. YihW - транскрипционный регулятор, который с высокой вероятностью участвует в регуляции транскрипции таких генов *E. coli*, как *yihU* и *yihV*.
3. По-видимому, YihW является репрессором транскрипции *yihU* и *yihV*, но это утверждение требует дальнейшей проверки.

## **7. Заключение.**

На сегодняшний день изучение регуляции сахарного метаболизма на различных уровнях является важной задачей молекулярной биологии. С целью выявления взаимодействий генов с белками-регуляторами строятся метаболические карты, которые затем дополняются в течение десятилетий. Для того, чтобы исследовать влияние белка – регулятора на конкретный ген, необходимо точно знать расположение промотора и старта (или стартов) транскрипции данного гена. Поэтому одной из основных задач современной транскриптомики является поиск промоторов и идентификация точек инициации транскрипции. По накопленным данным о бактериальных промоторах и особенностях их взаимодействия с РНК-полимеразой написаны уже несколько алгоритмов для поиска промоторов в бактериальных геномах.

Изучение тонкостей регуляции транскрипции бактерий находит применение не только в медицине, но и дает исследователям возможность составить более полное представление о направлении эволюции этих элементарных, но, в то же время, весьма сложных биологических систем.

## 8. Список литературы.

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. (1984) Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование, М.: Мир, 479.
2. Покусаева В.О., Антипов С.С., Швырева У.С., Тутукина М.Н., Озолин О.Н. (2012) Суперпродукция, выделение и очистка функционально-активного бактериоферритина *DpsE.coli*, Сорбционные и хроматографические процессы, 12(6): 1011-1017
3. Azam T.A., Ishihama A. (1999) Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*, *J Biol Chem*, 274(46):33105-33113
4. Denger K. et al. Sulphoglycolysis in *Escherichia coli* K-12 closes a gap in the biochemical sulphur cycle // *Nature*.-2014.-Т. 507. - № 7490. – С. 114-117.
5. Shimada T. et al. Novel roles of cAMP receptor protein (CRP) in regulation of transport and metabolism of carbon sources // *PLoS One*. – 2011. – Т. 6.- № 6. С. e20081-e20081.
6. Grainger D.C., Busby S.J. Global regulators of transcription in *Escherichia coli*: mechanisms of action and methods for study // *Adv. Appl. Microbiol.* 2008. V. 65. P. 93–113.
7. Shavkunov K.S., Masulis I.S., Tutukina M.N., Deev A.A., Ozoline O.N. Gains and unexpected lessons from genome-scale promoter mapping // *Nucl. Acids Res.* 2009. V.37. P. 4919–4931.
8. Huerta A.M., Collado-Vides J. Sigma70 promoters in *Escherichia coli*: specific transcription in dense regions of overlapping promoter-like signals // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 333. P. 261–278.
9. Salgado H., Peralta-Gil M., Gama-Castro S., Santos-Zavaleta A., Muñoz-Rascado L., García-Sotelo J.S., Weiss V., Solano-Lira H., Martínez-Flores I., Medina-Rivera A., Salgado-Osorio G., Alquicira-Hernández S., Alquicira-Hernández K., López-Fuentes A., Porrón-Sotelo L., Huerta A.M., Bonavides-Martínez C., Balderas-Martínez Y.I., Pannier L., Olvera M., Labastida A., Jiménez-Jacinto V., Vega-Alvarado L., Del Moral-Chávez V., Hernández-Alvarez A., Morett E., Collado-Vides J. RegulonDB v8.0: omics data sets, evolutionary conservation, regulatory phrases, cross-validated gold standards and more // *Nucl. Acids Res.* 2013. V.41. P. D203–D213.