

на правах рукописи

КЛИМУК ЕВГЕНИЙ ИВАНОВИЧ

**ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ
БАКТЕРИОФАГОВ ВО ВРЕМЯ ИНФЕКЦИИ ХОЗЯЙСКОЙ
КЛЕТКИ**

Специальность 03.01.03 – Молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА – 2013

Работа выполнена в Лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук.

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
Северинов Константин Викторович
доктор биологических наук, профессор
Гельфанд Михаил Сергеевич

Официальные оппоненты: Мирошников Константин Анатольевич,
кандидат биологических наук
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

Четверина Елена Владимировна,
доктор биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт белка Российской академии наук (ИБ РАН)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН)

Защита диссертации состоится “12” февраля 2013 г. в 11 час.00 мин. на заседании диссертационного совета Д 002.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии гена Российской академии наук по адресу: г. Москва, ул. Вавилова дом 34/5, первый этаж.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН).

Автореферат разослан “__” января 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат фармацевтических наук

Грабовская Любовь Сергеевна

Актуальность проблемы Различные литические бактериофаги в ходе своего развития в клетке бактерии-хозяина используют сходную стратегию развития. После проникновения в клетку фаговые белки выключают экспрессию бактериальных генов и запускают программу развития, которая включает несколько стадий, связанных с последовательной активацией и/или репрессией экспрессии временных классов генов фага. В регуляции транскрипции может быть задействовано как факторы, модифицирующие фермент транскрипции - РНК-полимеразу (РНКП) клетки-хозяина, так и РНКП, закодированные в геноме бактериофага. Детальное изучение конкретных каскадов регуляции в процессе инфекции различными бактериофагами позволит расширить наши представления как о механизмах временной регуляции экспрессии генов в целом и механизмах регуляции процесса транскрипции, так и о более общих процессах взаимодействия вирусов с клетками.

Цели работы Задача данной работы заключалась в исследовании механизмов регуляции транскрипции генов в ходе развития бактериофага T5 *Escherichia coli* и phiKMV-подобных бактериофагов бактерий рода *Pseudomonas*.

В литическом цикле развития фага T5 можно выделить три класса генов, различающихся по времени транскрипции: предранний, ранний и поздний. Транскрипция всех временных классов генов происходит с сильных σ^{70} -промоторов одним и тем же холоферментом РНКП. В связи с этим встает вопрос какие механизмы лежат в основе репрессии одних генов и активации других. На основании имеющихся данных можно предполагать, что они отличаются от тех механизмов, которые используют известные на сегодняшний день фаги, однако конкретные механизмы остаются неизвестными. В ходе работы предполагалось идентифицировать такие механизмы.

phiKMV-подобные фаги входят в суперсемейство T7-подобных бактериофагов, для которых характерно наличие закодированной в геноме собственной односубъединичной РНКП. Для осуществления общей для суперсемейства стратегии развития T7-подобным фагам необходимо наличие ингибиторов хозяйской РНКП. Для phiKMV-подобных бактериофагов таких ингибиторов известно не было и целью данной работы было идентифицировать и охарактеризовать фаговые ингибиторы РНКП бактерии-хозяина.

Научная новизна На классической модели бактериофага T5 обнаружены десятки промоторов, принадлежащих к различным временным классам экспрессии генов бактериофага T5 - предранним, ранним и поздним с максимальным уровнем транскрипции на 3-7 мин, 7-20 мин и 15-45 мин после заражения, соответственно. Биоинформатическим анализом в ранних промоторах выявлен мотив в «-10» элементе, который может быть ответственным за регуляцию ранней транскрипции.

Обнаружен новый белок, связанный с РНК-полимеразой в T5-инфицированных клетках, продукт гена *T5.026* (gp26). Локализован участок РНКП *E. coli*, с которым происходит связывание gp26. Показано значение gp26 для развития бактериофага T5 - амбер-мутация в гене *T5.026* приводит к изменению профиля транскрипции и задержке развития фага.

Предсказаны ортологи ингибитора хозяйской РНКП - белка gp2 фага T7 у нескольких phiKMV-подобных фагов: у LUZ19 - gp25.1, LKD16 - gp25.b, LUZ19 - gp25.1, у LKA1 – gp36. С целью проверки функциональной активности этих белков проведено клонирование кодирующих их генов в экспрессионные вектора. Протестирована способность gp2-подобных белков из phiKMV-подобных фагов взаимодействовать с РНКП *Pseudomonas* и *E. coli*, а также с мутантами, у которых отсутствует участок взаимодействия с gp2. Показано, что несмотря на низкий уровень аминокислотного сходства идентифицированные белки phiKMV-подобных фагов действительно являются функциональными аналогами белка gp2 фага T7.

Практическая значимость работы Полученные в работе результаты имеют в основном фундаментальное значение, однако некоторые из них могут найти и практическое применение. Изучение регуляции экспрессии генов бактериофагов во время их развития в клетке-хозяине расширяет наши представления о способах подавления жизнедеятельности бактериальных клеток, в частности за счет ингибирования транскрипции. В дальнейшем эти

знания могут быть использованы для создания противобактериальных препаратов, мишенью которых является бактериальная РНКП

Публикации и апробация работы Работа прошла апробацию на межлабораторных семинарах в МГУ им М.В. Ломоносова и Институте биологии гена РАН. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, включая 2 статьи в международных рецензируемых журналах. Результаты работы были представлены на 6 международных конференциях, в том числе на двух тематических международных конференциях “Viruses of Microbes” в разные годы и на FEMS конгрессе 2011 года.

Структура и объем диссертации Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, изложения результатов и их обсуждение, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 102 страницах машинописного текста, содержит 26 рисунков. Список литературы включает 122 источника.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Подтверждение функциональной активности *in vivo* промоторов фага T5, выявленных в искусственных системах.

Ранее в опытах *in vitro* в предранней области генома бактериофага T5 было идентифицировано два промотора - P_{D/E20} и P_{H22}¹. Еще несколько промоторов (перед генами *hegG* и *T5.011*) были предсказаны биоинформатически. Для подтверждения этих предсказаний и картирования новых промоторов фага мы провели ряд экспериментов по определению 5'-концов вирусных мРНК, выделенных из клеток во время инфекции бактериофагом T5, методом удлинения праймера с олигонуклеотидов-затравок 1-6 (рисунок 1Б). Для этого 5 мкг тотальной РНК инкубировали с ³²P-меченным по 5'-концу праймером в присутствии обратной транскриптазы. ПЦР-фрагмент, содержащий предполагаемую стартовую точку транскрипции, секвенировали с того же праймера, с которым проводили реакцию обратной транскрипции. Продукты обратной транскрипции и секвенирующих реакций анализировали электрофорезом в денатурирующих гелях с последующей визуализацией с помощью фосфоимиджера. В качестве примера на рисунке 1А представлены результаты определения 5'-концов мРНК T5 с праймеров 1 и 3. Всего же было выявлено и картировано 7 5'-концов, часть из которых соответствует стартовым точкам транскрипции с предсказанных ранее промоторов. При множественном выравнивании нуклеотидных последовательностей, расположенных выше выявленных 5'-концов T5 мРНК, нам не удалось выявить консервативных последовательностей. На основании этого нами был сделан вывод о том, что часть выявленных 5'-концов образовалась в результате процессинга и не соответствует стартовым точкам транскрипции.

С целью выявления точек начала транскрипции нами был использован метод "5'-RACE". Чтобы выявить точку начала транскрипции этим методом одна часть проб, содержащих мРНК, обрабатывается пирофосфатазой, а другая – нет. Затем обе пробы подвергаются лигированию с последующими обратной транскрипцией и ПЦР. Если 5'-конец РНК образовался в результате процессинга, то количество полученных продуктов в пробах, обработанных и необработанных пирофосфатазой, не будет различаться. В идеальном случае для истинной точки старта транскрипции в пробе, необработанной пирофосфатазой, не должно быть продукта. Однако в клетке происходит пирофосфоролиз, в результате которого трифосфаты, находящиеся на стартовом основании части РНК, преобразуются в монофосфаты. В связи с этим в пробах, необработанных пирофосфатазой табака, также наблюдаются продукты амплификации. Однако, количество этих продуктов в пробах, обработанных пирофосфатазой, увеличено. Использование этого подхода позволило нам показать, что промоторы P_{H22} и P₀₁₁ функционируют *in vivo* (рисунок 1В). Интересно, что имеются жизнеспособные делеционные мутанты фага T5, у которых отсутствует участок, содержащий промотор P_{H22}. По-видимому, в этих случаях функционирует промотор P_{D/E20}.

Использование метода удлинения праймера позволило нам показать функциональную активность *in vivo* ряда ранних промоторов. Среди них промоторы перед генами *pol*, T5.086, T5.047, T5.084, T5.076, RNAX и *rhoH*. Нами также идентифицированы поздние промоторы перед генами T5.139, C1 и N4.

Следующим шагом работы было исследование временной динамики активности идентифицированных промоторов *in vivo* (рисунок 2А). С этой целью выделяли суммарную РНК из клеток, находящихся на разных стадиях инфекции T5. Активность промоторов определяли методом удлинения праймера. Как видно из рисунка 2 этим методом удается надежно идентифицировать промоторы, соответствующие трем ранее определенным временным классам генов фага, которые исторически были названы предранние, ранние и поздние.

1 Gentz R, Bujard H. Promoters recognized by Escherichia coli RNA polymerase selected by function: highly efficient promoters from bacteriophage T5. J Bacteriol. 1985 Oct;164(1):70-77.

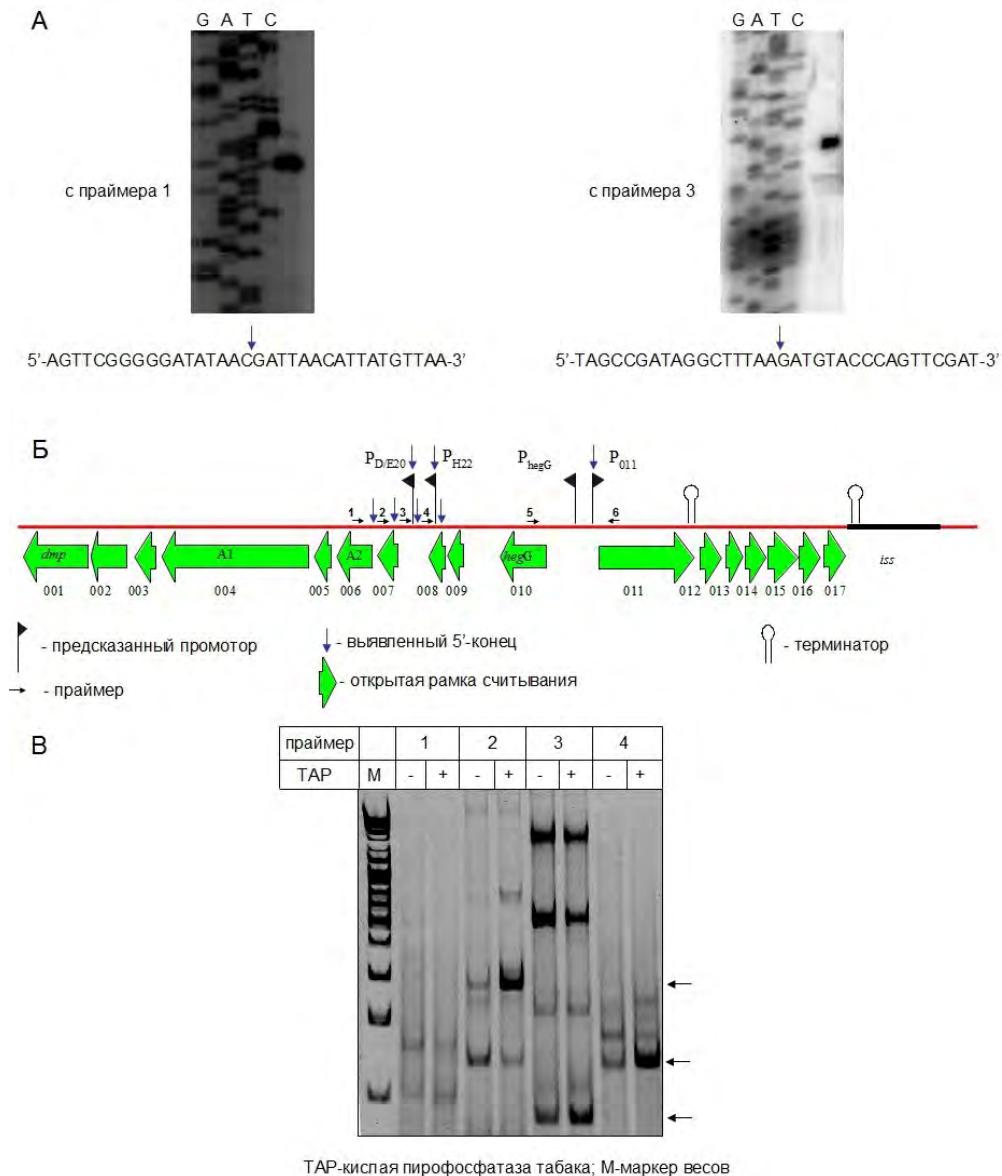


Рисунок 1. Определение 5'-концов предранних мРНК. А. Выявление 5'-концов мРНК методом удлинения праймера. Представлены радиоавтографы гелей, на которых рядом нанесены продукты реакций секвенирования (GATC) и удлинения праймера. Под радиоавтографами приведены последовательности с указанием расположения 5'-конца РНК. Б. Схематическое представление всех выявленных нами 5'-концов предранних мРНК T5. В. Выявление стартовых точек транскрипции T5 методом “5'-RACE” (описание в тексте).

Практически сразу после инфекции начинается транскрипция с предраннего промотора Р_{H22} (продукты транскрипции идентифицируются с праймеров 1 и 3). Продукты предранней транскрипции сохраняются на протяжении всей инфекции. Для того чтобы ответить на вопрос отражает ли такая динамика предранних продуктов активность промотора Р_{H22} или изменение стабильности этих транскриптов в ходе инфекции, на 5 минуте инфекции к клеткам был добавлен антибиотик рифампицин и проведен анализ изменений количеств предранних РНК на более поздних стадиях инфекции. Рифампицин блокирует транскрипцию бактериальной РНКП, что позволяет оценить скорость деградации предранних транскриптов в процессе инфекции. Из сравнения результатов, представленных на рисунке 2А и 2Б, видно что временная динамика предранних транскриптов не зависит от добавления рифампицина. На основании этих результатов можно сделать вывод о том, что после 5 минуты инфекции транскрипция предранних генов прекращается.

Через несколько минут после начала транскрипции предранних генов появляются ранние транскрипты, а затем и поздние. Ранее предполагали, что транскрипция с промотора перед геном *C1* происходит на ранней стадии. Однако, из представленных на рисунке 2 результатов видно, что транскрипция этого гена, а также расположенного за ним гена лизоцима, происходит на поздней стадии инфекции.

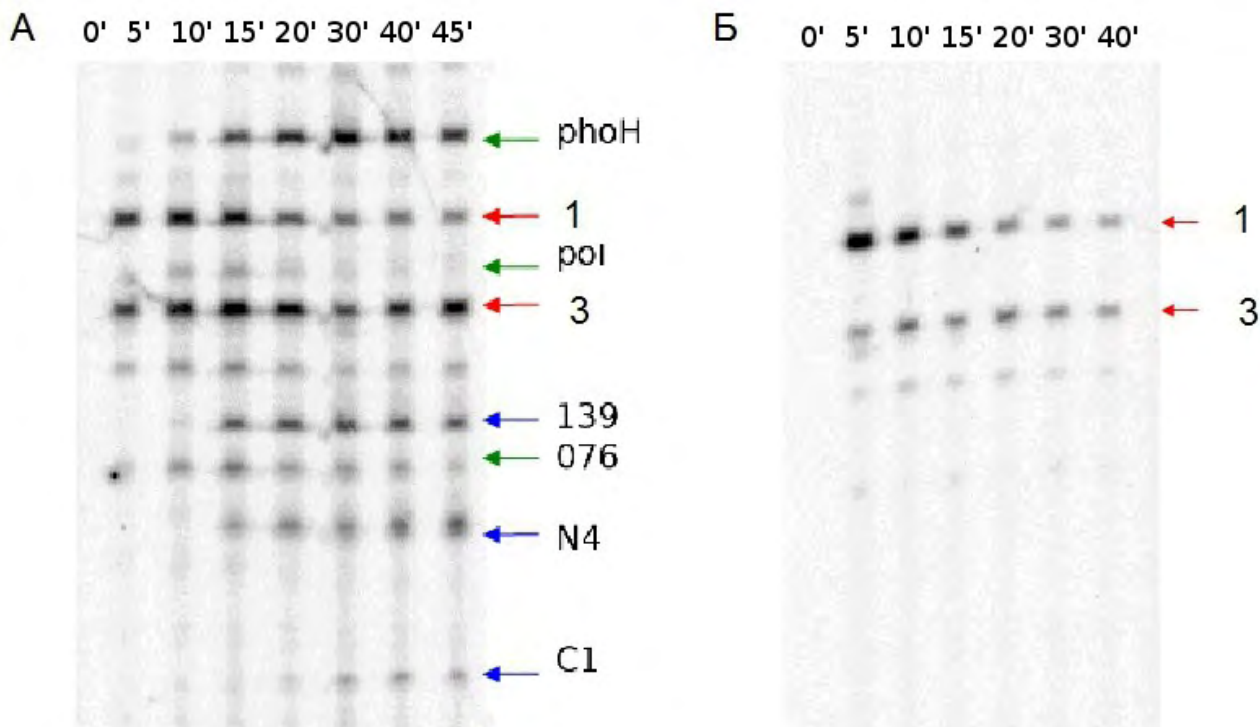


Рисунок 2. Анализ транскрипции генов разных временных классов фага T5 методом удлинения праймера. А. Анализ количества фаговых мРНК, соответствующих предранним (1, 3), ранним (*rhoH*, *pol*, 076) и поздним (139, N4, C1) генам, на разных стадиях инфекции. Б. Временная динамика разрушения продуктов предранних генов (1, 3) после добавления рифампицина на 5 минуте инфекции.

2. Биоинформатический анализ последовательностей промоторов T5, принадлежащих к разным временным классам.

С целью выявления консервативных последовательностей в обнаруженных промоторах фага проводили их множественное выравнивание. Как уже было сказано ранее, нами обнаружено только 2 предранних промотора. Этого количества недостаточно для проведения статистического анализа промоторных последовательностей. Можно лишь утверждать, что они содержат «-10» и «-35»-элементы, характерные для сильных σ^{70} -промоторов. Кроме того присутствует аденин-богатая последовательность, расположенная левее «-35»-элемента.

Из результатов множественного выравнивания промоторных последовательностей ранних генов видно, что, для всех этих промоторов также характерно присутствие «-10» и «-35»-элементов и аденин-богатая последовательность, расположенная «левее» «-35»-элемента (рисунок 3А). Кроме того, в промоторах генов *pol* и *rhoH* присутствует «удлиненная» (extended) последовательность -10-области TGnTATAAT (где n - любой нуклеотид). Интересно, что «правее» -10-элемента все выявленные ранние промоторы содержат идентичную последовательность 5'-АТАТТ-3'. Возможно, именно эта последовательность необходима для ко-регуляции включения-выключения транскрипции ранних генов.

При множественном выравнивании последовательностей поздних промоторов были обнаружены лишь «-10» и «35»-элементы промотора, а также аденин-богатая последовательность левее «-35»-последовательности (рисунок 3Б).

Таким образом, продукты генов D5, D15 и C2 не оказывают существенного влияния на транскрипцию фага T5, по крайней мере по отдельности.

4. Определение влияния мутаций в генах *A1* и *A2* фага T5 на транскрипцию генов разных временных классов.

Нами исследовано влияние мутации в предраннем гене *A1* на транскрипцию фага T5. В ранних работах было показано, что продукт этого гена - gpA1 вовлечен в ряд процессов в ходе развития фага T5. Этот белок необходим для инъекции второй части ДНК фага (SST-ДНК) в зараженную клетку, он участвует в деградации внутриклеточной ДНК и ингибирует синтез предранних белков^{5,6}. На рисунке 4 представлены результаты исследования влияния мутации в гене *A1* на транскрипцию предранних и ранних генов. Как видно, в отсутствие этого белка РНК ранних и поздних генов не наблюдается, что согласуется с тем, что gpA1 необходим для инъекции SST-ДНК, которая кодирует гены, принадлежащие к этим временным классам. С другой стороны, при инфекции в отсутствие этого белка наблюдается накопление мРНК предранних генов в количествах, значительно превышающих те, что наблюдаются в ходе инфекции фагом дикого типа. На основании этих результатов можно сделать два предположения о механизме регуляции транскрипции фага. Одно из них заключается в том, что при введении SST-ДНК возможно происходит пассивное перераспределение РНКП с предранних на ранние промоторы. Это может быть следствием того, что количество ранних промоторов по крайней мере в десять раз больше количества предранних промоторов, а последовательности ранних промоторов содержат «-10-» и «-35»-элементы промотора, более близкие консенсусной последовательности сигма 70-промоторов. Второе предположение заключается в том, что gpA1 может напрямую ингибировать транскрипцию предранних генов.

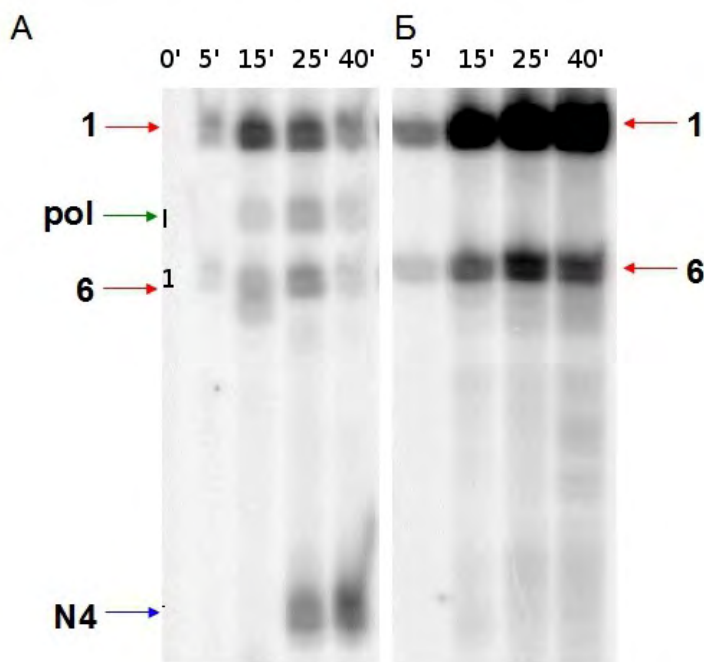


Рисунок 4. Анализ транскрипции в ходе инфекции фагом T5 дикого типа (А) и фагом с мутацией в гене *A1* (Б) методом удлинения праймера. Представлены радиоавтографы гелей, на которых нанесены продукты реакций удлинения праймера, соответствующие предранним (1, 6), ранним (pol) и поздним (N4) промоторам. Инфицированные фагом T5 клетки для выделения тотальной РНК отобраны на временных точках, отмеченных в верхней части рисунка.

5 Lanni, Y. T. (1968). First-step-transfer deoxyribonucleic acid of bacteriophage T5. *Bacteriol Rev* 32, 227-42.

6 McCorquodale DJ, Lanni YT. (1970). Patterns of protein synthesis in *Escherichia coli* infected by amber mutants in the first-step-transfer DNA of T5. *J Mol Biol.* 48, 133-143.

Мы также исследовали влияние мутации в гене *A2* на транскрипцию T5. Продукт этого гена (*grA2*), также как *grA1* необходим для введения SST-ДНК. Существуют также данные о том, что эти два белка взаимодействуют друг с другом, и что *grA2* обладает ДНК-связывающей активностью. Как видно из результатов, представленных на рисунке 5, в отсутствие *grA2* наблюдаемый профиль транскрипции очень похож на картину, наблюдаемую в клетках, инфицированных фагом с мутацией в гене *A1*. Во-первых, не происходит синтез ранних транскриптов и во-вторых, наблюдается накопление продуктов транскрипции предранних генов. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что оба белка *grA1* и *grA2* необходимы для выключения транскрипции предранних генов.

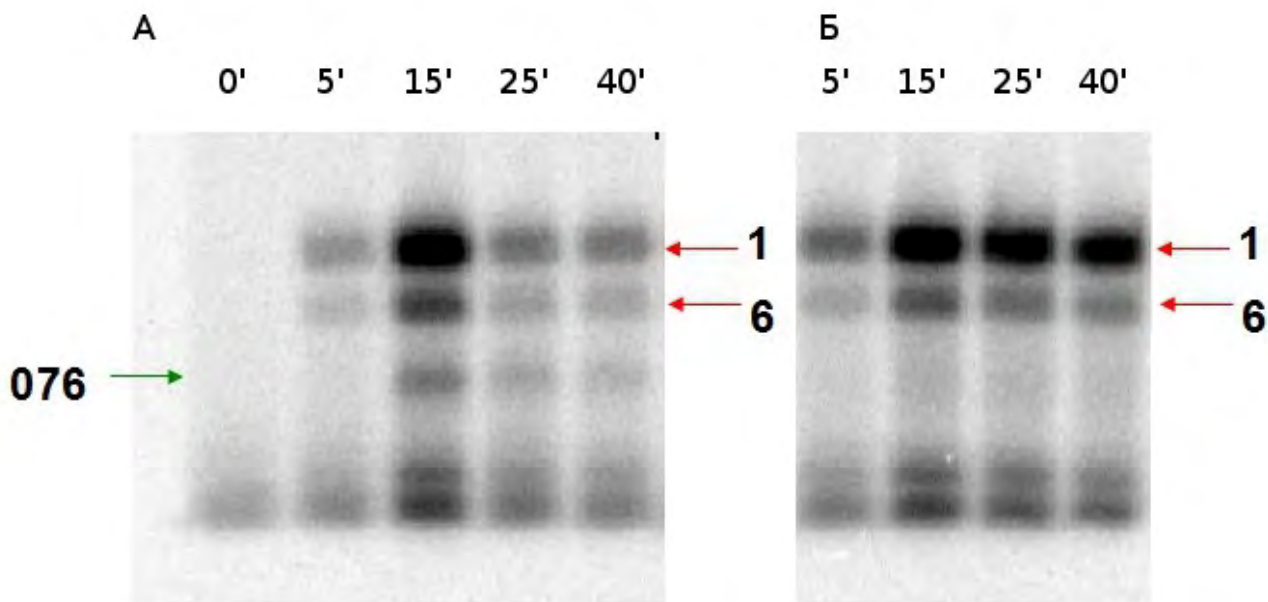


Рисунок 5. Анализ транскрипции фага T5 дикого типа (А) и фага T5 с мутацией в гене *A2* (Б) методом удлинения праймера. Представлены радиоавтографы гелей, на которых нанесены продукты реакций удлинения праймера, соответствующие предранним (1, 6), ранним (076) промоторам. Инфицированные фагом T5 клетки для выделения тотальной РНК отобраны на временных точках, отмеченных в верхней части рисунка.

5. Выявление и идентификация белков, связанных с кор-ферментом РНКП в инфицированных фагом T5 клетках

Регуляция транскрипции часто осуществляется с помощью белковых факторов, взаимодействующих с РНКП. С целью выявления таких транскрипционных факторов, кодируемых фагом T5, нами были получены препараты РНКП из неинфицированных клеток, а также из клеток, собранных на 3, 15 и 25 минут после инфекции (рисунок 6). Было выявлено 3 белка (обозначены на рисунке цифрами 1, 2 и 3), которые присутствовали только в препаратах РНКП, выделенных из инфицированных фагом клеток.

Белки 1, 2 и 3 были идентифицированы масс-спектрометрическим анализом как продукты генов *A1*, *D20-21* и *T5.026*, соответственно. Белок *grA1* упоминался выше. Он ранее обнаруживался в препаратах РНКП, выделенных из зараженных фагом клеток, и ему приписывают множество различных функций от деградации геномной ДНК клетки-хозяина до регуляции экспрессии ранних белков фага T5. Продукт гена *D20-21* – это основной белок головки *rb8*, представленный самым большим числом копий (730) в вирионе. Маловероятно, чтобы этот белок выступал и в качестве транскрипционного регулятора. Скорее всего, *rb8* неспецифически совыделяется с РНКП. Данных о *grT5.026* и его роли в развитии фага не имеется.

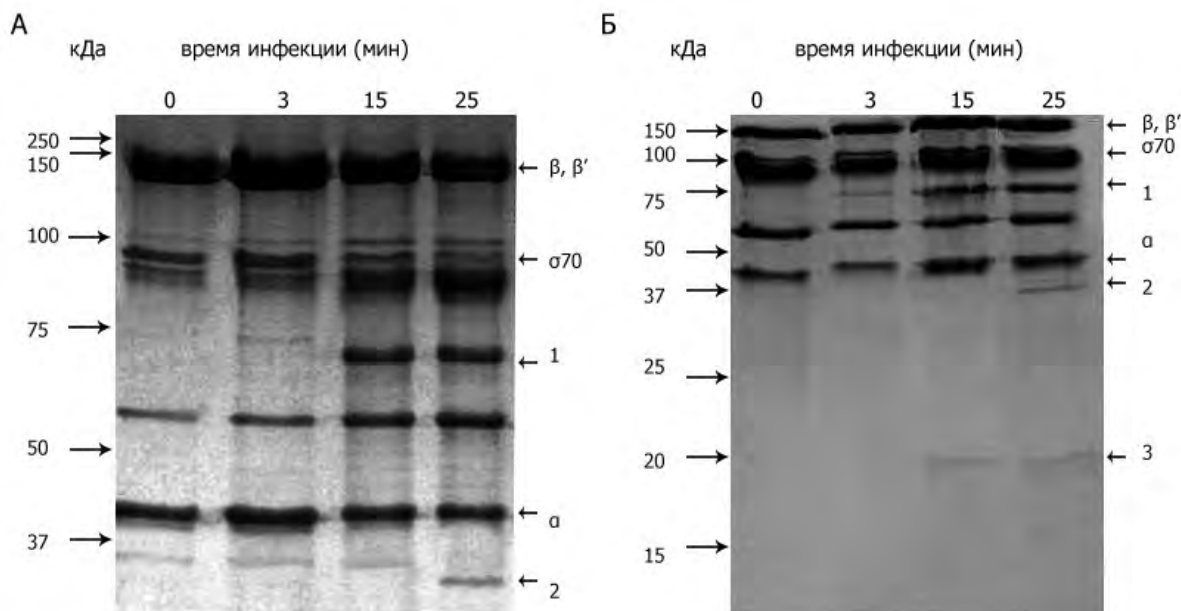


Рисунок 6. Выделение РНКП на разных стадиях инфекции *E. coli* F бактериофагом T5. Анализ препаратов РНКП проводили электрофорезом в 10% (А) и 17% (Б) ПААГ в денатурирующих условиях с последующим окрашиванием Кумаси G-250. Белки, которые присутствуют только в препаратах РНКП из инфицированных клеток, показаны стрелками с номерами 1, 2, 3 справа от рисунка. Слева рисунка указаны молекулярные массы белков-маркеров, справа – субъединицы РНКП.

6. Взаимодействие gpT5.026 с кор-ферментом РНКП

Взаимодействие gpT5.026 с кор-ферментом РНКП было подтверждено дот-фар-вестерн-анализом. С этой целью ген *T5.026* был клонирован в экспрессионный вектор и получен очищенный препарат этого белка с сайтом для ^{32}P -мечения белковой киназой А. Кор-ферменты РНКП из клеток *E. coli*, *Thermus thermophilus* и *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 наносили на нитроцеллюлозную мембрану и инкубировали с ^{32}P -меченым gpT5.026. Как видно из результатов, представленных на рисунке 7, этот белок взаимодействует только с кор-ферментом РНКП из клеток *E. coli*. Для того чтобы установить с какой из субъединиц РНКП осуществляется взаимодействие, ^{32}P -меченый gpT5.026 предварительно инкубировали с 10-кратным молярным избытком β- или β'-субъединиц *E. coli*, а затем с иммобилизованными РНКП на мембранах. Значительное уменьшение радиоактивного сигнала наблюдалось только при инкубации с β-субъединицей (рисунок 7).

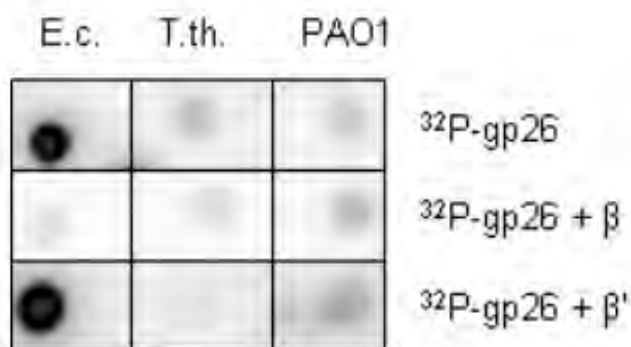


Рисунок 7. Анализ взаимодействия gpT5.026 с кор-ферментом РНКП методом «дот-фар-вестерн». Мембраны, содержащие кор-фермент РНКП *E. coli* (E. c.), *T. thermophilus* (T. th.) и *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (PAO1) инкубировали только с ^{32}P -меченым gpT5.026 (^{32}P -gpT5.026), а также в присутствии β (^{32}P -

grT5.026 + β) или β' -субъединиц (^{32}P -grT5.026 + β') РНКП *E. coli*. Визуализацию результатов проводили радиоавтографией с помощью фосфоимиджера.

По-видимому, grT5.026 связывается с β -субъединицей, что делает его недоступным для взаимодействия с кор-ферментом РНКП, иммобилизованным на мембране.

7. Локализация мест взаимодействия grT5.026 с кор-ферментом РНКП *E. coli*

Места связывания grT5.026 с субъединицами кор-фермента РНКП выявляли с помощью бактериальной двухгибридной системы. В этих экспериментах нами были использованы две совместимые плазмиды, одна из которых (pBR α LN-grT5.026) кодирует N-концевой домен и линкер α -субъединицы РНКП *E. coli*, слитый в одной рамке с grT5.026. В составе другой плазмиды закодирован полноразмерный белок CI (регулятор транскрипции фага λ), который был слит с рядом фрагментов β , β' или α -субъединиц. Гибридные белки совместно экспрессировали в штамме *E. coli*, содержащем эписому F' с репортерным геном *lacZ* под контролем *lac*-промотора и оператора O_{L2} фага λ . Гибрид из α -субъединицы и grT5.026 входит в состав холофермента РНКП, а гибридный белок из CI и фрагмента субъединиц связывается с оператором O_{L2}. Взаимодействие между grT5.026 и одним из фрагментов субъединиц способствует привлечению РНКП к *lac*-промотору, что приводит к увеличению экспрессии гена β -галактозидазы. Из гистограммы, представленной на рисунке 8, видно, что увеличение активности β -галактозидазы наблюдается только при слиянии белка CI с некоторыми фрагментами β -субъединицы, что подтверждает данные дот-фар-вестерн-анализа о взаимодействии grT5.026 с этой субъединицей. Активность β -галактозидазы увеличивается в присутствии плазмиды, кодирующей гибридный белок CI с 1-151 аминокислотными остатками (а. о.) β -субъединицы. Увеличение фрагмента β -субъединицы до 235 а. о. приводит к дальнейшему увеличению экспрессии β -галактозидазы, тогда как его усечение с N-конца (а. о. 151-451) приводит к падению активности до фонового уровня. В связи с этим можно предположить, что grT5.026 контактирует с аминокислотами β -субъединицы в составе фрагмента 1-151, а присутствие дополнительных аминокислот (до 235) способствует более правильному сворачиванию соответствующего участка β -субъединицы. Другой участок взаимодействия находится в центральной части молекулы (а. о. 703-795). Расширение указанного фрагмента в сторону N- и C-концов приводит к падению активности β -галактозидазы (650-950 а. о. и 665-798 а. о.). Это можно объяснить тем, что участок взаимодействия grT5.026 с β -субъединицей оказывается экранирован в составе более крупных фрагментов.

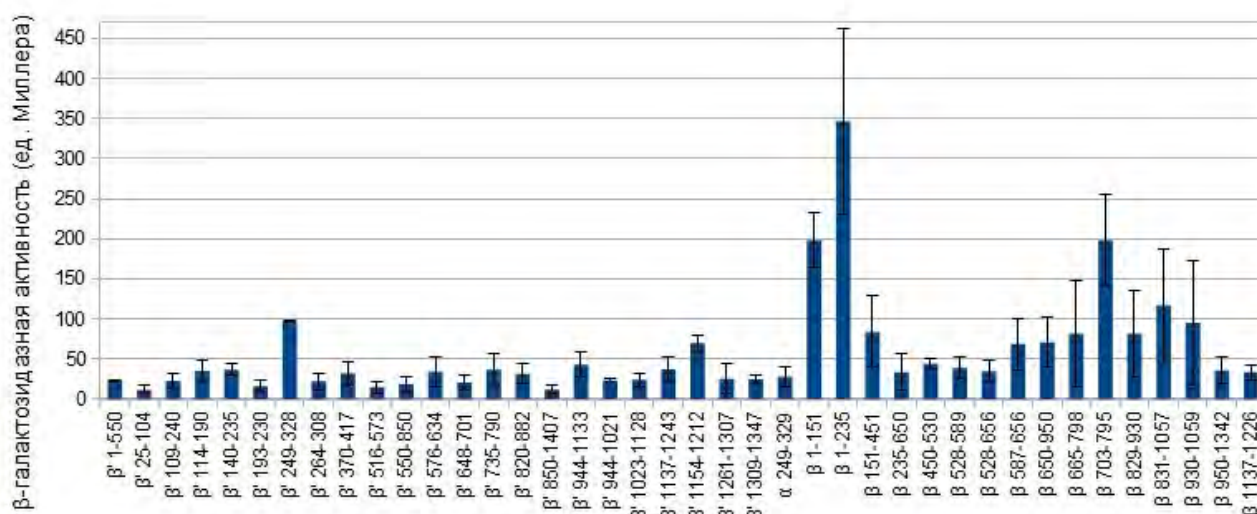


Рисунок 8. Выявление участков взаимодействия grT5.026 с субъединицами РНКП *E. coli* с помощью бактериальной двухгибридной системы. Активность β -галактозидазы измеряли в экстрактах клеток,

содержащих гибридные белки. Эксперимент проведен в трех повторах. Фоновый уровень равен 100 ед. Миллера.

Таким образом, на основании представленных выше данных можно заключить, что gpT5.026 связывается с β -субъединицей РНКП в двух участках 1-151 и 703-795. Интересно, что будучи удаленными друг от друга в первичной последовательности, эти участки расположены рядом в третичной структуре (рисунок 9).



Рисунок 9. Предполагаемое место связывания gpT5.026 с холоферментом РНКП. Кристаллическая структура холофермента РНКП *Thermus aquaticus* с ДНК с разрешением 6.5Å°. β' , две α и ω -субъединицы опущены из структуры для лучшего восприятия. Нематричная и матричная цепи ДНК окрашены соответственно в голубой и красный цвета; сигма-субъединица - в розовый цвет (районы 1.2 и 3.1 выделены соответственно бледно- и темно-розовым); β - в голубой цвет (1 – 151 а.о. (1-142 а.о. в Taq β -субъединице) и 703-795 а.о. (582-667 а.о. в Taq β -субъединице) выделены соответственно бледно- и темно-голубым цветом).

8. Влияние gpT5.026 на взаимодействие РНКП с промотором

Как было показано выше, gpT5.026 связывается с РНКП *E. coli*. На основании этих результатов можно было предположить, что этот белок мог бы влиять на синтез РНК в ходе развития фага T5. С целью проверки этого предположения нами было проверено влияние этого белка на транскрипцию *in vitro* с охарактеризованных промоторов A1 фага T7 и *rrnB* P1. Однако gpT5.026 не влиял на транскрипцию с этих промоторов (данные не представлены). Кроме того, нами было также проверено влияние gpT5.026 на транскрипцию *in vitro* с промоторов фага T5, относящихся к разным временным классам. В этих экспериментах нами также не было выявлено существенного эффекта. Тот факт, что gpT5.026 не оказывает видимого влияния на транскрипцию *in vitro*, согласуется с местом его

связывания на РНКП - на внешней стороне вдали от каталитического центра фермента. Участок β -субъединицы, с которым связывается grT5.026, также удален от ДНК и от районов σ^{70} -субъединицы, участвующих во взаимодействии с основными промоторными элементами. С другой стороны в холоферменте РНКП участок связывания grT5.026 находится вблизи участка 3.1 σ^{70} -субъединицы, который хоть и не оказывает прямого влияния на взаимодействие РНКП холофермента с промоторной ДНК, может модулировать взаимодействие РНКП с некоторыми промоторами.

Для выявления более тонких эффектов grT5.026 нами был использован более чувствительный метод молекулярных маячков ("beacon assay"), недавно разработанный в нашей лаборатории. Этот метод использует σ^{70} -субъединицу, флуоресцентно меченую в районе 2.3, расположенном вблизи участка, участвующего в узнавании «-10»-элемента промотора. РНКП, содержащая меченую субъединицу, обладает незначительной способностью к флуоресценции, так как ароматические аминокислоты самой σ^{70} -субъединицы гасят сигнал. После взаимодействия такой РНКП с «-10»-элементом промотора происходит значительное увеличение флуоресцентного сигнала, так как разрушаются связи, гасящие флуоресценцию. Этот подход позволяет как оценить константу связывания лиганда с РНКП, так и установить элемент промотора («-10», «-35»-элементом или дискриминаторным участком) на взаимодействие с которым влияет изучаемый лиганд или транскрипционный фактор. В этих экспериментах мы использовали олигонуклеотид 5'-ТАТААТАГАТТСАТ-3', последовательность которого соответствует позициям с «-12» по «+2» нематричной цепи раннего промотора N25 фага T5. Как показано на рисунке 10 grT5.026 уменьшает сродство РНКП к этому олигонуклеотиду в 8 раз. В то же время grT5.026 не оказывал влияния на связывание более короткого фрагмента ДНК, соответствующего положениям от «-12» до «-6» нематричной цепи промотора. Из этих результатов следует, что grT5.026 уменьшает эффективность взаимодействия РНКП с одноцепочечным участком промотора, содержащим последовательность от -5 до +2 (этот район промотора носит название "дискриминатор" и важен для активности ряда клеточных промоторов).

Ингибирование связывания олигонуклеотида «-12/+2» может быть использовано для оценки константы диссоциации (Кд) grT5.026 с РНКП. С этой целью проводили измерение интенсивности флуоресценции 1 нМ РНКП в присутствии 300 нМ олигонуклеотида без grT5.026 и при добавлении 100 нМ, 20 нМ и 5 нМ grT5.026. Как видно из результатов, представленных на рисунке 11, интенсивность сигнала достигает равновесного значения через 3 часа независимо от концентрации grT5.026. Это означает, что 5 нМ концентрация grT5.026 достаточна для полного насыщения РНКП. На основании этих результатов можно предположить, что grT5.026 образует очень прочные комплексы с РНКП, характеризующиеся Кд менее 1 нМ.

9. Роль grT5.026 в регуляции транскрипции *in vivo* и развитии фага.

Для выяснения роли grT5.026 в регуляции транскрипции *in vivo* нами получен амбер-мутант фага T5 по гену *T5.026* (*T5amT5.026*). На первом этапе был исследован одиночный инфекционный цикл («one-step growth») этого мутанта в сравнении с фагом дикого типа. Из графиков, представленных на рисунке 12, видно, что латентный период во обоих случаях составляет около 50 минут, но выход частиц фага *T5amT5.026* происходит медленнее. Количество фаговых частиц (ф.ч.), вышедших из одной инфицированной клетки («burst size»), в случае амбер-мутанта в 5 раз меньше (24 ф.ч.), чем у фага дикого типа (120 ф.ч.).

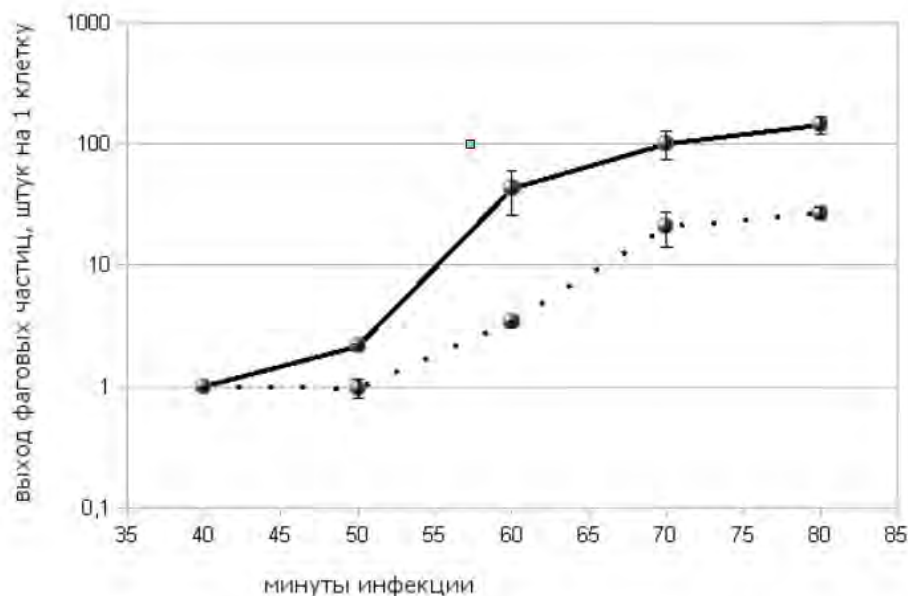


Рисунок 12. Одиночный цикл развития фагов T5 и *T5amT5.026*. Культуру клеток *E. coli* JF238 инфицировали фагами T5 и *T5amT5.026*, образцы зараженных культур отбирали в указанные времена после начала инфекции и высевали в мягкий агар для определения количества инфекционных центров (ИЦ). По оси ординат приведено отношение количества ИЦ на соответствующей минуте инфекции к количеству ИЦ на 40 минуте инфекции. Количество ИЦ остается постоянным до 40 минуты (данные не представлены). Эксперимент повторяли три раза. Непрерывной и пунктирной линиями изображено изменение относительного количества ИЦ в ходе инфекции соответственно фагами T5 и *T5amT5.026*.

Транскрипционную активность T5 промоторов в ходе развития бактериофагов дикого типа и мутанта оценивали с помощью метода удлинения праймера. С этой целью были выбраны несколько из ранее описанных промоторов фага. В экспериментах в одной реакционной смеси присутствовало шесть ^{32}P -меченых праймеров, позволяющих следить за мРНК, синтезируемых с шести отдельных промоторов. Из сравнения транскрипционных профилей фагов T5 и *T5amT5.026* видно, что в отсутствие grT5.026 уровень транскрипции с ранних промоторов P_{15A} и P_{pol} существенно увеличивается (рисунок 13). Менее значительные изменения наблюдаются также в активности промоторов других временных классов: транскрипция с предранних промоторов P_{11} и P_{H22} - увеличивается, тогда как с поздних P_{G25} и P_{J5} - уменьшается в несколько раз. Таким образом, присутствие grT5.026 понижает транскрипцию ранних и, в меньшей степени, предранних генов и, в то же время, стимулирует синтез поздних транскриптов.

In vitro grT5.026 не влиял на активность холофермента РНКП с указанных промоторов фага. Можно предположить, что для действия grT5.026 необходимы другие фаговые и/или бактериальные белки, топология ДНК, или условия среды, отличающихся от стандартных условий *in vitro* транскрипции. Несмотря на то, что последствия делеции гена T5.026 относительно невелики, они высоко воспроизводимы. Возможно именно понижение уровня

транскрипции поздних генов и приводят к существенному падению количества фаговых частиц, образующихся в ходе инфекции мутантным фагом.

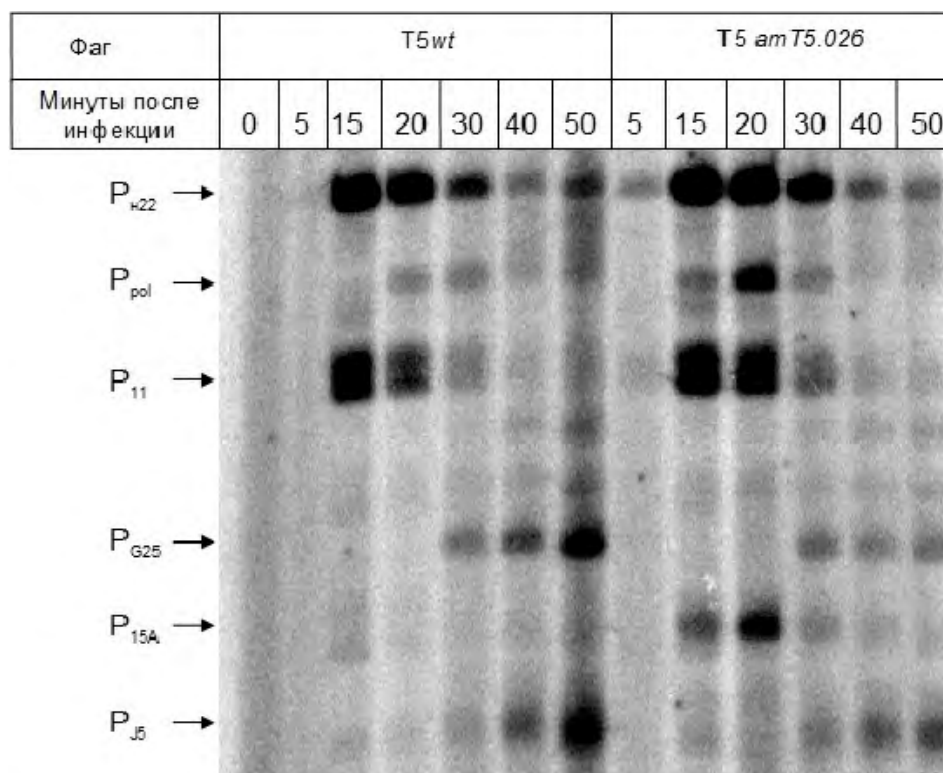


Рисунок 13. Анализ транскрипции фагов T5 и T5*am*T5.026 *in vivo*. РНК выделяли из неинфицированных (0) и инфицированных клеток на 5, 15, 20, 30, 40 и 50 минутах после инфекции. Выявление транскриптов с промоторов разных временных классов проводили методом удлинения праймера в мультиплексном режиме с использованием смеси 32 P-меченых праймеров. Продукты реакций разделяли в 6% денатурирующем ПААГе с последующей визуализацией с помощью фосфоимиджера. Продукты реакции удлинения праймера указаны стрелками с обозначением промотора, с которого был синтезирован соответствующий транскрипт.

10. Идентификация белков, кодируемых phiKMV-подобными бактериофагами, связывающимися с РНК-полимеразами бактерий-хозяев.

Многие бактериофаги кодируют факторы, ингибирующие активность бактериальной РНКП. В таком случае, в геноме бактериофага должны быть свои гены, продукты которых будут способны осуществлять транскрипцию генов бактериофага. К таким фагам относятся фаги обширной группы T7-подобных фагов, входящих в семейство Podoviridae. Основополагающим признаком этой группы является наличие T7-подобной РНКП, закодированной в геноме бактериофага. Среди фагов этой группы выделяют несколько подгрупп или родов близкородственных вирусов, например, Xp10-, N4-, phiKMV-подобных фагов, а также T7-подобных фагов *sensu stricto*. T7 и phiKMV – подобные роды близки друг другу и относятся к одному подсемейству *Autographivirinae*. Фаг N4 использует хозяйскую РНКП на поздней стадии инфекции, что отличает его от других T7-подобных фагов. Его особенностью является также то, что он кодирует две собственные РНКП. Фаги T7 и phiKMV используют хозяйскую РНКП на начальных этапах инфекции и кодируют только одну собственную РНКП.

На ранней стадии инфекции фага T7 хозяйская РНКП транскрибирует ранние вирусные гены, среди которых находится и ген вирусной РНКП (T7РНКП). Транскрипция средних и поздних генов осуществляется T7РНКП. Очевидно, что необходимы механизмы, которые предотвращали бы взаимное влияние хозяйской и вирусной РНКП. В противном случае, например, более медленно движущаяся РНКП бактерии тормозила бы транскрипцию вирусной РНКП. Паузирование T7РНКП, вызванное столкновениями с хозяйской РНКП

также может приводить к неправильной инициации упаковки вирусных геномов, которое в норме происходит в специальных местах останковки транскрипции вирусным ферментом. Одним из первых продуктов средних генов бактериофага Т7 и его ближайших родственников (например, Т3) является белок *gp2*, который связывается с хозяйской РНКП и эффективно ингибирует ее активность. На сегодняшний день известно, что *gp2* связывается с районом “челюсть” β -субъединицы РНКП и ингибирует формирование открытых комплексов с промоторной ДНК. Показано, что существенную роль в ингибировании играют семь отрицательно-заряженных аминокислот, которые образуют своего рода тяж на одной из сторон *gp2*. Ген, кодирующий *gp2*, является существенным для развития фага: при его отсутствии нарушается упаковка геномной ДНК фага в частицы за счет индуцированного паузирования Т7РНКП, упомянутого выше. Биологически значимая роль Т7 *gp2* сводится к ингибированию транскрипции только с одного из трех ранних промоторов фага – промотора А3.

В группу *phiKMV* – подобных фагов в настоящее время входят *phiKMV*, LUZ19, LKD16, LUZ19, PT2, PT5, LKA1 и *phi2*, инфицирующие различные штаммы бактерий рода *Pseudomonas*, а также фаг КР34 *Klebsiella pneumoniae*. Эта группа фагов известна относительно недавно: геном фага *phiKMV* - первого представителя этой группы - был определен в 2003 году, а КР34 - только в 2011. Организация генома поздних генов *phiKMV*-подобных фагов очень похожа на организацию соответствующих генов фага Т7. Среди ранних и средних генов, однако, наблюдаются значительные различия. В частности, если ген РНКП у фага Т7 находится в области ранних генов, то у *phiKMV* и близких фагов – среди средних генов (рисунок 14). Тем не менее, логично было предположить, что при развитии *phiKMV*-подобных фагов также необходимо предотвратить транскрипцию хозяйской РНКП с ранних фаговых промоторов, т.е. можно ожидать наличие кодируемых этими фагами ингибиторов хозяйской РНКП. Однако, явных гомологов белка *gp2* в геномах *phiKMV*-подобных фагов обнаружить до сих пор не удалось.

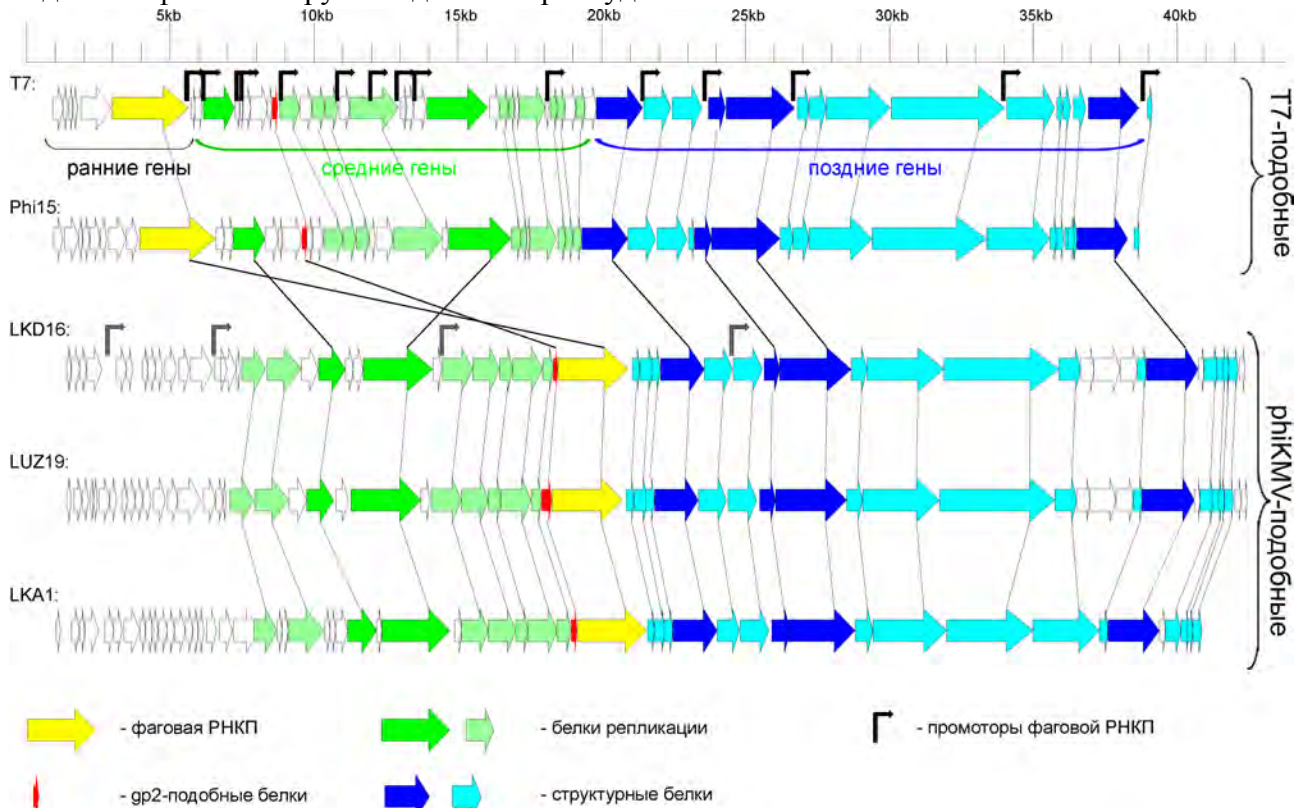


Рисунок 14. Сравнение организации геномов *phiKMV*-подобных и Т7-подобных фагов.

В конце 2011 года был опубликован геном бактериофага *Pseudomonas phi15*, который содержит аннотированный гомолог белка *gp2* фага Т7, ингибирующего хозяйскую РНКП. Анализ генома *phi15* показывает, что этот фаг относится к собственно Т7 фагам, а не к

phiKMV-подобным фагам. Интересно, что если в качестве основы для биоинформатического поиска гомологичных белков использовать gp2-подобный белок из фага phi15, то удается обнаружить несколько потенциальных гомологов у представителей phiKMV-подобных фагов: у LUZ19 - gp25.1, LKD16 - gp25.b, LUZ19 - gp25.1, PT2 и PT5 – gp25.1, LKA1 – gp36 (Рисунок 16).

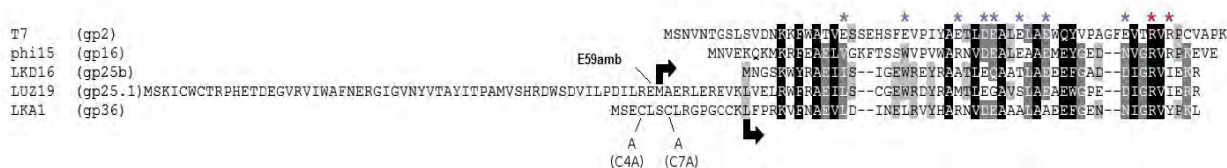


Рисунок 15. Множественное выравнивание последовательности T7 gp2 с возможными гомологами из подгруппы phiKMV-подобных фагов. Последовательность T7 gp2 представлена в верхней части, гомологичные последовательности из фагов (названия указаны слева) под ней. Выравнивание сделано с использованием программного обеспечения GENEDOC. Интенсивность фона соответствует степени консервативности. Для гомологов из LUZ19 и LKA1, стрелки указывают позиции, с которых начинаются короткие версии этих белков (см. текст). Также обозначены положение амбер-кодона в удлиненной версии gp25.1, и мест аминокислотных замен в цистеинах N-концевой части gp36 (см. текст ниже).

11. Проверка функциональной активности gp2-подобных белков phiKMV-подобных фагов *in vivo*.

Все различающиеся потенциальные гомологи T7 gp2 были клонированы в вектор pET19 под контроль промотора T7 РНК-полимеразы. Полученные генетические конструкции были протестированы на способность комплементировать амбер-мутацию в гене 2 фага T7. Как известно, бактериофаг T7 с амбер-мутацией в гене 2 не образует бляшек на газонах клеток *E. coli* MG1655 дикого типа из-за сильно сниженного количества вирулентных дочерних частиц (Таблица 1). Мутантный фаг образует нормальные бляшки на газонах с клетками амбер-супрессорного штамма *E. coli* IJ511 (Таблица 1). Если клетки *E. coli* MG1655 содержат копии гена 2 фага T7 на плазмиде (например, pET19), формируются бляшки нормального размера (Таблица 1). Супрессия происходит за счет того, что T7 РНКП, произведенная на ранней стадии инфекции, транскрибирует плазмидный ген, в результате чего синтезируется недостающий gp2, который ингибирует клеточную РНКП и обеспечивает продуктивную инфекцию

Штамм, формирующий газон	Е.О.Р.	Размер негативных колоний
IJ511 (Su)	1	+++
MG1655 (wt)	0	-
MG1655 + pET33-gp2 (T7)	~1	+++
MG1655 + pET19-gp16 (phi15)	~1	+++
MG1655 + pET19-gp25b (LKD16)	~1	+++
MG1655 + pET19-gp25.1 (LUZ19)	~1	+++
MG1655 + pET19-gp25.1 short (LUZ19)	~1	+++
MG1655 + pET19-gp25.1 SC (LUZ19)	0	-
MG1655 + pET19-gp36 (LKA1)	0	-
MG1655 + pET19-gp36short (LKA1)	~0.5	+
MG1655 + pET19-gp36 C4A (LKA1)	~0.5	+
MG1655 + pET19-gp36 C7A (LKA1)	~0.5	+
MG1655 + pET19-gp36 C4A C7A (LKA1)	~0.5	+

Таблица 1. Комплементация амбер-мутации в гене 2 бактериофага T7 закодированными на плаزمидях T7 gr2 и gr2-подобными белками phiKMV-подобных бактериофагов. Около 200 бляшкообразующих единиц амбер-мутанта T7 по гену 2 высевали на газон с разными штаммами *E. coli*, содержащих указанные плазмиды (колонка 1), затем после роста в течение ночи при комнатной температуре фиксировали количество (колонка 2) и размер (колонка 3) фаговых бляшек. "-" Указывает на отсутствие видимых бляшек, "+" означает, что бляшки менее 1 мм в диаметре, "+ + +" означает, что бляшки диаметром более 3 мм.

Результаты, представленные в Таблице 1, показывают, что клетки, несущие плазмиду с генами, гомологичными гену 2 из фага T7, из фагов phi15, LKD16 и LUZ19, но не из LKA1, обеспечивают рост мутантного фага. Результаты таким образом показывают, что продукты этих генов из фагов phi15, LKD16 и LUZ19 могут выступать в качестве ингибиторов РНКП *E. coli*. Результат с белком из фага phi15 предсказуем, так как этот белок очень похож на gr2-подобный белок из фага gh-1, ингибирующее действие которого было показано в нашей лаборатории ранее. Результаты с белками фагов LKD16 и LUZ19 дают основание полагать, что фаги подгруппы phiKMV также кодируют ингибитор хозяйской РНКП. Этот вывод, однако, не согласуется с тем, что белок gr36 фага LKA1, который, безусловно, гомологичен белкам фагов LUZ19 и LKD16, не комплементирует дефект T7 мутанта. Анализ последовательности белка gr36 из фага LKA1 показывает наличие короткого N-концевого участка, который отсутствует в других белках этой группы. Мы предположили, что этот дополнительный участок может влиять на способность C-концевой части белка ингибировать РНКП бактерии-хозяина. Чтобы проверить это предположение, была создана плаزمида pET19, экспрессирующая укороченный вариант gr36 (начинается с метионина, соответствующего Leu16 в полной копии белка). Клетки, содержавшие такую плазмиду частично комплементировали отсутствие gr2 фага T7 (амбер мутант по гену 2 фага T7 образовывал бляшки <1 мм в диаметре по сравнению с > 3 мм в диаметре для бляшек, которые образуются в клетках, экспрессирующих T7 gr2). Анализ N-концевого домена gr36 выявил четыре остатка цистеина, которые могли бы связывать ионы металла, формируя структуру типа цинкового пальца, который может взаимодействовать с ДНК и таким образом участвовать в регуляции транскрипции. Для проверки важности N-концевых цистеиновых остатков были созданы плазмиды, экспрессирующие версии gr36 с заменами остатков цистеина на аланин (C4A, C7A и двойной мутант C4A C7A) и проведены комплементационные тесты (Таблица 1). Как видно, клетки, несущие мутантный gr36 комплементируют мутацию в гене 2 фага T7 в той же степени, как и клетки, экспрессирующие усеченный вариант белка. Таким образом, можно сделать вывод, что N-концевой домен gr36 модулирует его способность ингибировать хозяйскую РНКП и эта модуляция, возможно, зависит от способности gr36 хелатировать ионы металлов.

Если N-концевой домен влияет на способность белка gr36 ингибировать бактериальную РНКП, то необходимо обратить внимание на N-концевую часть gr25.1 из фага LUZ19, которая гораздо длиннее, чем у gr36. Не исключено, что наблюдаемая нами полная комплементация при использовании клеток, экспрессирующих gr25.1, вызвана синтезом более короткого белка, который может синтезироваться с внутреннего сайта инициации трансляции. Действительно, клетки несущие плазмиду с C-концевой частью gr25.1 ("gr25.1 короткий", аминокислоты 60-121) в полной мере комплементируют рост мутантного по гену 2 фага T7 (Таблица 1). Для определения того, является ли краткий вариант gr25.1 действительно ответственным за комплементацию развития мутантного фага T7 в клетках, содержащий плазмиду для экспрессии полной версии белка gr25.1, была создана плаزمида, содержащая полную рамку считывания гена 29 LUZ19 и амбер-кодон вместо кодона 59. Стоп-кодон должен предотвратить синтез длинного полипептида gr25.1, но не должен оказывать влияния на синтез короткой версии белка, если такая версия существует. Как видно из Таблицы 1, наличие такой плазмиды не комплементирует рост мутантного фага T7. Таким образом, именно полная версия gr25.1 ответственна за наблюдаемую комплементацию. Результат также указывает, что несмотря на свою значительную длину, N-концевая часть gr25.1 сама по себе не влияет на способность

ингибировать хозяйскую РНКП. Это соображение подтверждает идею о том, что модуляция ингибирующего действия gp36 происходит именно за счет образования специальной структуры, для поддержания которой необходимы остатки цистеина.

12. Функциональная активность gp2-подобных белков phiKMV-подобных фагов *in vitro*.

Результаты экспериментов *in vivo* подтверждают биоинформатическое предсказание гомологии белков phiKMV-подобных бактериофагов белку gp2 фага T7. Однако, комплементация роста амбер-мутанта фага T7 по гену 2 может быть достигнута добавлением любого ингибитора хозяйской РНКП в конце ранней стадии инфекции, поэтому ингибирование хозяйской РНКП белками из phiKMV-подобных бактериофагов может происходить по механизму, отличному от механизма ингибирования РНКП белком gp2. Для проверки механизма ингибирования белками из phiKMV-подобных бактериофагов было протестировано влияние очищенных препаратов этих белков на реакцию abortивной инициации транскрипции, катализируемой РНКП *E. coli* или *P. aeruginosa* (рисунок 16).

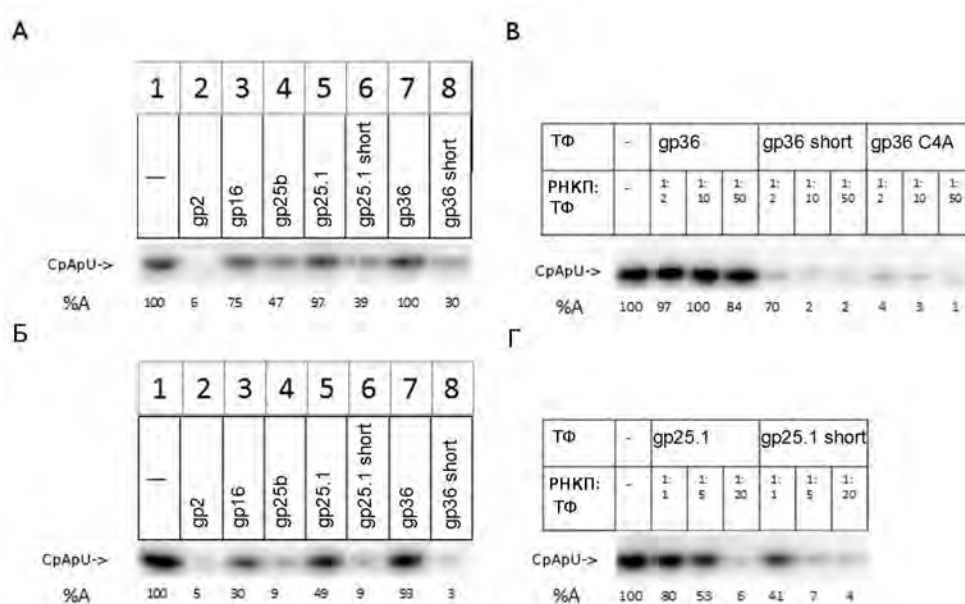


Рисунок 16. Ингибирование транскрипции белком gp2 фага T7 и белками phiKMV-подобных бактериофагов. Кор-ферменты РНКП *E. coli* (А) или *PAOI* (Б) преинкубировали в течение 10 минут при 37 °С в присутствии *E. coli* σ^{70} -субъединицы и 5-кратного избытка указанных фаговых белков. После этого в реакционную смесь добавляли фрагмент ДНК, содержащий промотор T7 A1, и субстраты для инициации abortивной транскрипции (СрА и γ^{32} P-УТР). Реакционную смесь наносили на денатурирующий ПААГ. Остаточная активность РНКП указана снизу в % (100% - активность в отсутствии фаговых белков). На панелях В и Г представлены результаты ингибирования фаговыми белками при повышении их концентрации в реакционной смеси. Условия проведения реакции и анализ полученных результатов проводили, как описано выше.

Полученные результаты, представленные на рисунке 16, можно резюмировать следующим образом. Во-первых, gp2 фага T7 эффективно ингибирует транскрипцию, осуществляемую и РНКП *E. coli*, и РНКП *P. aeruginosa* PAOI (рисунок 16 АБ, дорожки 1 и 2). gp25 фага LKD16, а также короткие версии белков gp25.1 (фаг LUZ19) и gp36 (LKA1) эффективно (менее 10% остаточной активности) ингибируют транскрипцию, осуществляемую РНКП PAOI (рисунок 16Б, дорожки 4, 6 и 8, соответственно). Эти белки оказались менее эффективными ингибиторами РНКП *E. coli* (> 30% остаточной активности, рисунок 16А), что согласуется с уже опубликованными данными, полученными с гомологом gp2 из фага gh1, который взаимодействует с РНКП *Pseudomonas* сильнее, чем с ферментом из *E. coli*. В условиях проведения эксперимента длинные версии белков gp25.1 и gp36 не ингибируют РНКП *E. coli* (рисунок 16А, 5 и 7 дорожки, соответственно), но частично ингибируют РНКП PAOI. Несколько неожиданно, что gp16 (фаг phi15), который наиболее

похож на gp2 фага T7, относительно слабо ингибирует обе РНКП (рисунок 16 АБ, дорожка 3).

При более высоких концентрациях полноразмерного gp25.1 было достигнуто полное ингибирование РНКП *PAO1* (рисунок 16В). Увеличение концентрации полноразмерного gp36 до 50-кратного избытка над РНКП не приводило к заметному ингибированию транскрипции (рисунок 16Г). При этом короткая версия gp36, а также С4А мутант были активными.

Чтобы доказать, что gp2-подобные белки из phiKMV-подобных бактериофагов связываются с тем же участком РНКП, что и gp2, была получена версия белка gp25 (фаг LKD16), содержащая сайт для протеин-киназы А на N-конце. Связывание gp25 с РНКП *PAO1* подтверждается образованием малоподвижной радиоактивно меченной полоски при анализе реакционной смеси, содержащей радиоактивно меченный gp25 и РНКП *PAO1* при помощи не денатурирующего ПААГ (рисунок 17, полоса 2). Подобный продукт не образуется, если реакционная смесь содержит только радиоактивно меченный gp25 (дорожка 1). Если в реакционную смесь помимо gp25 и РНКП *PAO1* добавить 5-кратный избыток немеченных gp2-подобных белков, ингибирующих эту РНКП в реакции инициации abortивной транскрипции (T7 gp2, phi15 gp16, или LKD16 gp25), то количество малоподвижного комплекса уменьшается и снова появляется радиоактивная полоса, соответствующая несвязанному белку gp25 (дорожки 3-5, соответственно). Этот результат показывает, что связывание этих трех белков происходит в одном месте, так как они конкурируют друг с другом. В условиях эксперимента, полноразмерные gp25.1 и gp36 неспособны конкурировать с радиоактивно меченным gp25 (дорожки 6 и 8, соответственно), что согласуется с результатами по ингибированию abortивной транскрипции *in vitro*. Однако, короткие версии этих белков способны вытеснять меченный gp25 из комплексов с РНКП не хуже, чем T7 gp2, phi15 gp16, или LKD16 gp25 (дорожки 7 и 9). В связи с этим, мы делаем вывод, что gp2-подобные белки из phiKMV-подобных бактериофагов связываются с РНКП в том же месте, что и gp2 бактериофага T7.

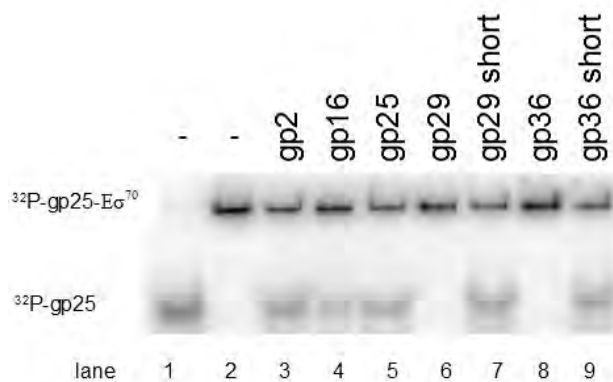


Рисунок 17. Связывание gp2-подобных белков с РНКП *PAO1*. ³²P-меченный gp25 (дорожка 1) разгоняли на ПААГ в нативных условиях в присутствии РНКП *P. aeruginosa* PAO1 (дорожки 2-9). В дорожках 3-9 нанесены реакционные смеси, содержащие обозначенные в верхней части рисунка немеченные фаговые белки в 5-кратном избытке по отношению к ³²P-меченному gp25.

ВЫВОДЫ

1) Показана функциональная активность *in vivo* трех временных классов промоторов бактериофага T5. Идентифицировано два промотора, активных на предранней стадии инфекционного цикла, восемь ранних промоторов и три поздних промотора. Показано, что ранние промоторы бактериофага T5 содержат идентичную последовательность 5'-АТАТТ-3' между «-10»-элементом и стартовой точкой транскрипции.

2) Показано, что мутации в генах *D5*, *D15* и *C2* бактериофага T5 не влияют на профиль транскрипции генов фага. Продукты генов *A1* и *A2* необходимы для ингибирования транскрипции предранних генов.

3) В препаратах РНКП, выделенных из клеток, инфицированных фагом T5, обнаружен белок gpT5.026. GpT5.026 прочно связывается с РНКП *E. coli* ($K_d < 1$ нМ). Взаимодействие с РНКП происходит за счет связывания с участками β -субъединицы, расположенными между аминокислотными остатками 1-151 и 703-795. GpT5.026 ингибирует взаимодействие σ^{70} -холофермента РНКП с дискриминаторным участком промотора. В ходе инфекции gpT5.026 необходим для оптимального ингибирования транскрипции ранних и, в меньшей степени, предранних генов и стимуляции синтеза поздних транскриптов.

4) У phiKMV-подобных бактериофагов *Pseudomonas* биоинформатически предсказаны гомологи ингибитора бактериальной РНКП - белка gp2 бактериофага T7. Функциональный анализ *in vivo* и *in vitro* подтвердил гомологию gp2-подобных белков phiKMV-подобных бактериофагов и белка gp2 бактериофага T7.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Тезисы конференций:

- 1) Климук Е.И. Изучение регуляции экспрессии генов бактериофагов E.coli T5 и phiEco32 для поиска антибактериальных препаратов. Научно-техническая конференция «Биотехнологические аспекты фундаментальной науки. БиоНаноскопия». УРАН ИБГ РАН, Москва 2010.
- 2) E. Klimuk, N. Akulenko and K. Severinov. Regulation of gene expression of bacteriophage T5 revisited. International conference “Viruses of Microbes”, 2010, Paris, France.
- 3) E. Klimuk, N. Akulenko and K. Severinov. Regulation of gene expression of bacteriophage T5. International conference “Microbial Viruses: Genomics, Evolution and Applications in Ecology, Biotechnology and Medicine”, 2011, Belfast, UK.
- 4) E. Klimuk, N. Akulenko and K. Severinov. Regulation of gene expression of bacteriophage T5. FEMS Congress'11, 2011, Geneva, Switzerland.
- 5) E. Klimuk, N. Akulenko, K. Makarova, K. Severinov. Identification and characterization of host RNA polymerase inhibitors encoded by phages of phiKMV-group. International conference “Viruses of Microbes”, 2012, Brussels, Belgium.
- 6) E. Klimuk, K. Severinov. Identification and characterization of host RNA polymerase inhibitors encoded by phages of phiKMV-group. International conference “Postgenome 2012”, 2012, Kazan, Russia.

Публикации в журналах:

- 7) Pavlova, O., Lavysh, D., Klimuk, E., Djordjevic, M., Ravcheev, D. A., Gelfand, M. S., Severinov, K., Akulenko, N., Temporal regulation of gene expression of the Escherichia coli bacteriophage phiEco32. J Mol Biol, 2012. 416(3): p. 389-99.
- 8) Evgeny Klimuk, Natalia Akulenko, Kira S Makarova, Pieter-Jan Ceysens, Ivan Volchenkov, Rob Lavigne, Konstantin Severinov. Host RNA polymerase inhibitors encoded by phiKMV-like phages of Pseudomonas. Virology 436 (2013), pp. 67-74