

# Как и зачем мы изучаем транскрипцию стрессоустойчивых бактерий

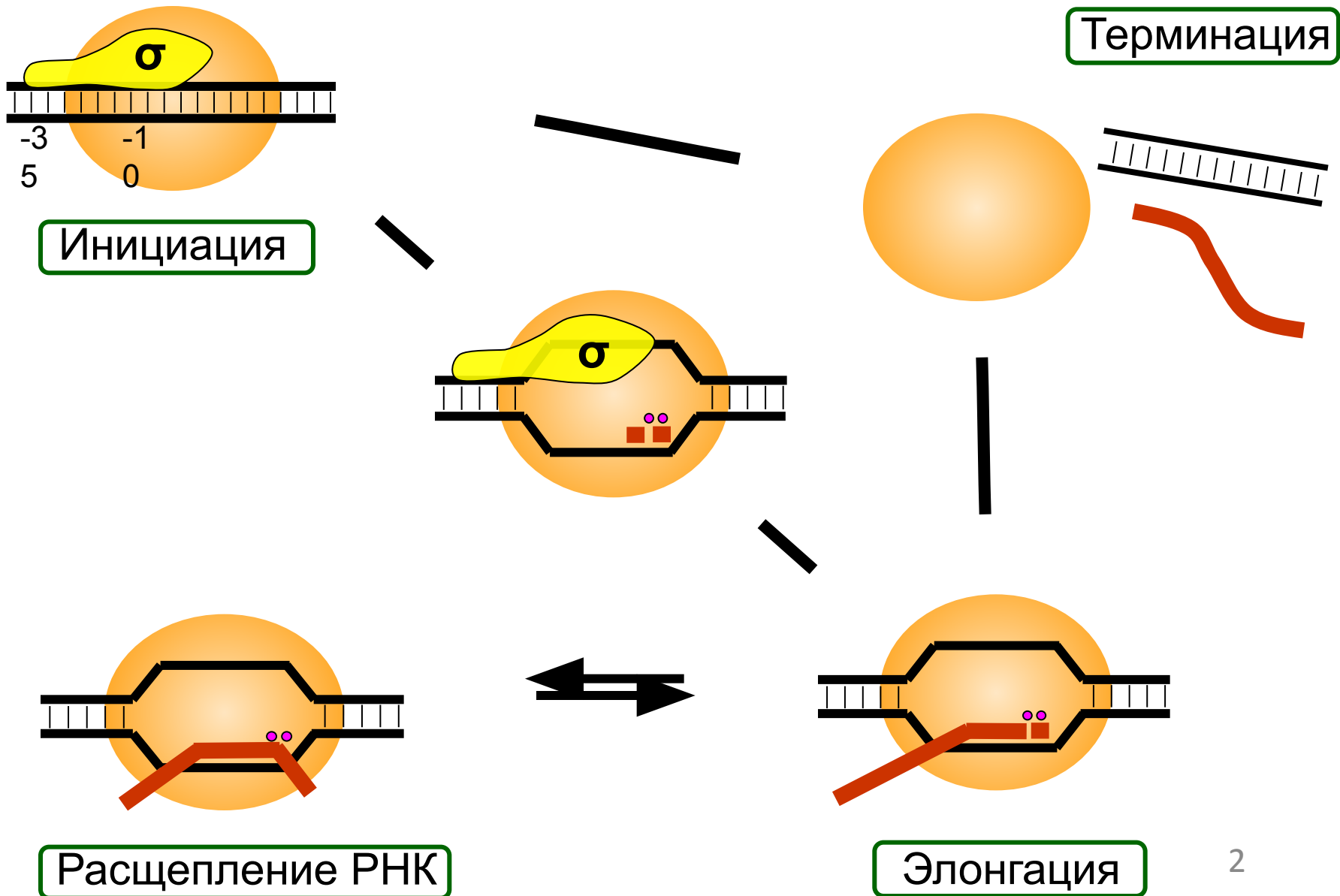
- *Бактериальная транскрипция. Как её исследуют*
- *Природа радиоустойчивости *Deinococcus radiodurans**
- *Особенности транскрипции бактерий *Deinococcus**
- *Чем ещё занимаются в нашей лабе*

Алексей Агапов  
al.a.agarov@gmail.com

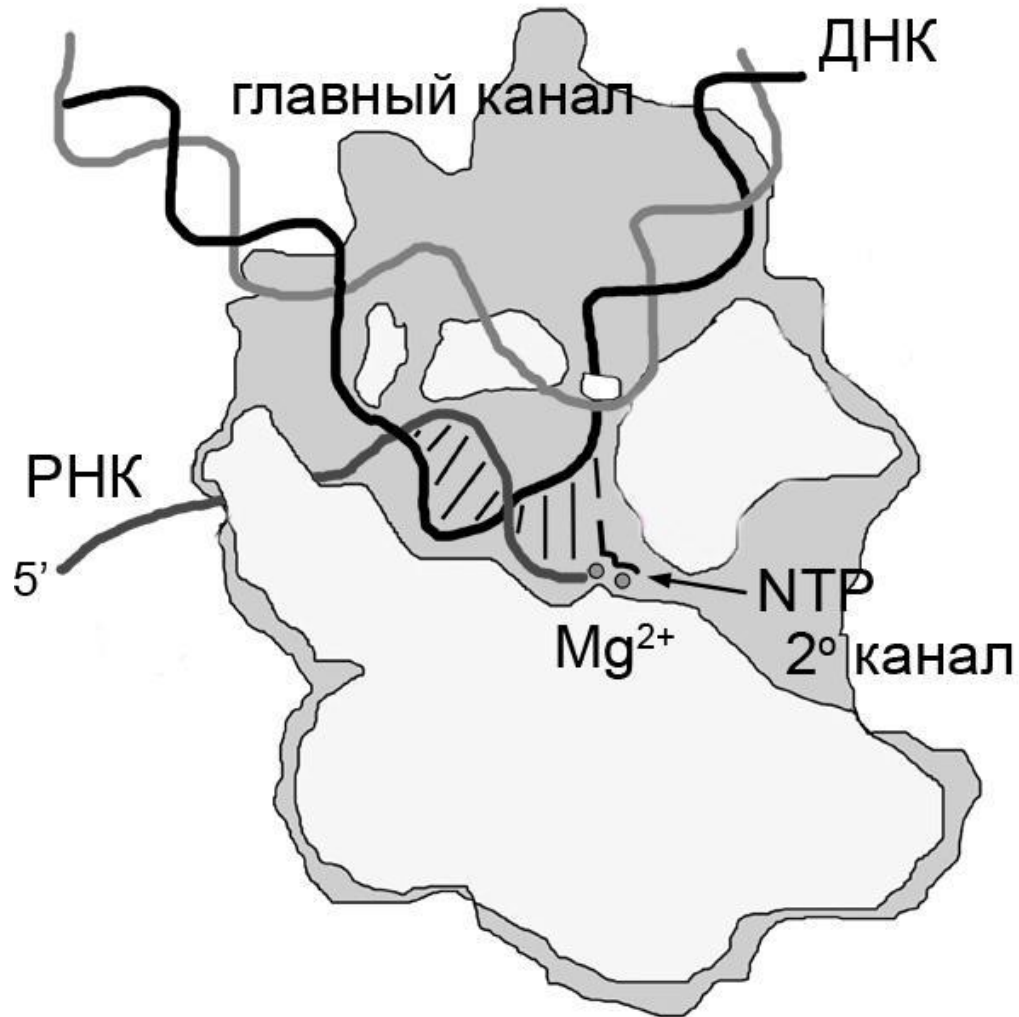


29 марта 2019 г.

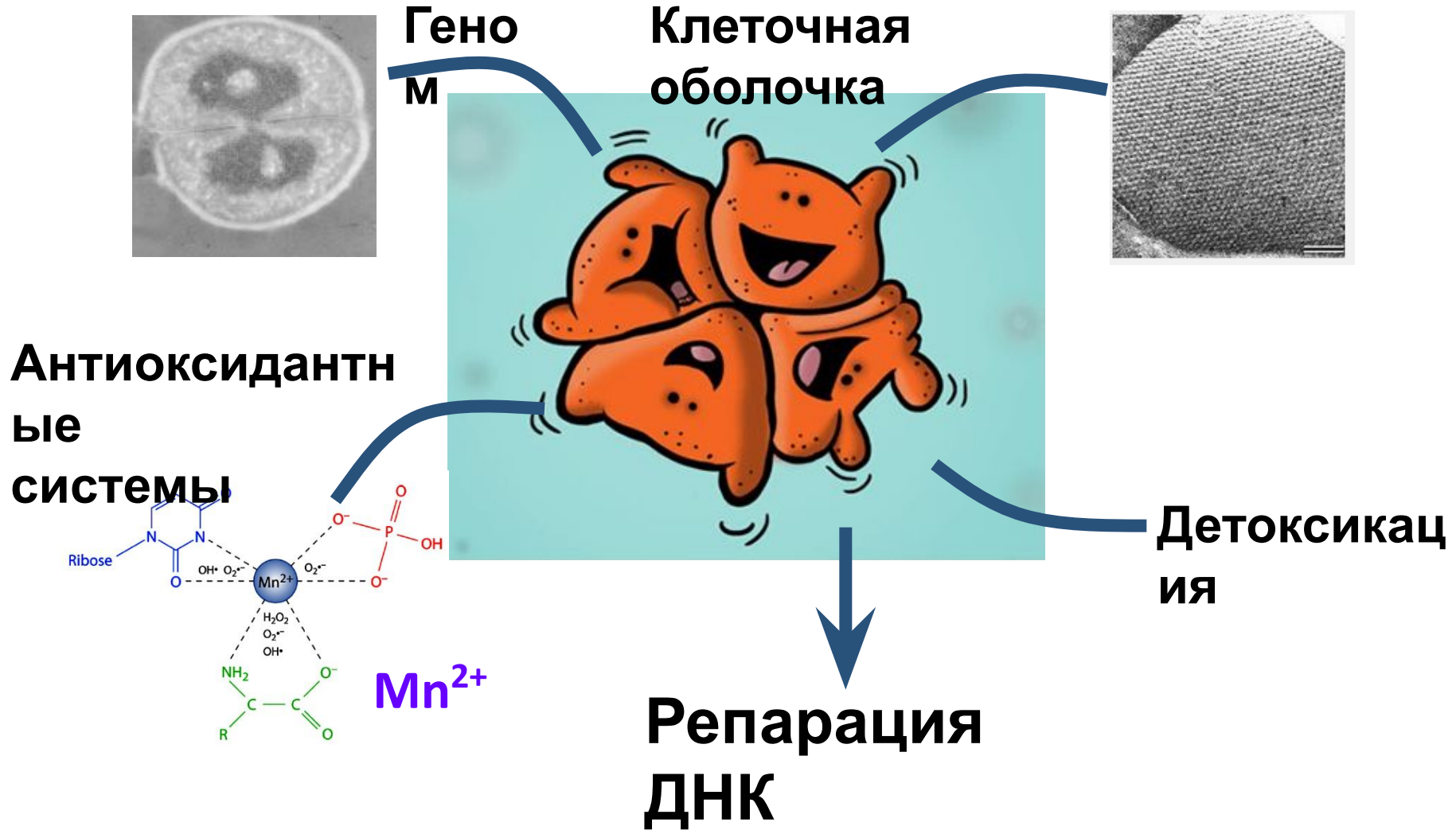
# Транскрипционный цикл



# Схема элонгационного комплекса бактериальной РНКП



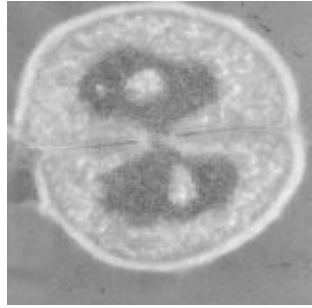
# Стрессоустойчивость *D. radiodurans*



# Стрессоустойчивость *D. radiodurans*

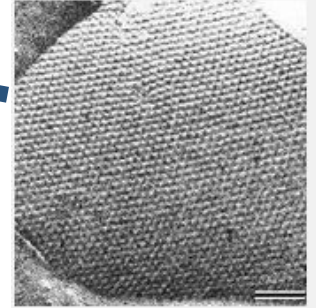
Компонент репарации	<i>E. coli</i>	<i>D. radiodurans</i>
Системы процессинга концов двунитевых разрывов	RecBCD RecFOR (RecQ, RecJ)	RecFOR (UvrD, RecJ) PprA (?)
Белки, связывающиеся с одноцепочечной ДНК	SSB, RecA	SSB*, RecA**, DdrA, DdrB
Основной путь репарации двунитевых разрывов	SDSA	ESDSA
Фотолиаза	+	—
NER	UvrABC	UvrABC, UvsE***
BER	8 ДНК-гликозилаз	12 ДНК-гликозилаз
MMR	+	+ (малоэффективна)
Dam-метилаза	+	—
SOS-репарация	+	—

# Стрессоустойчивость *D. radiodurans*

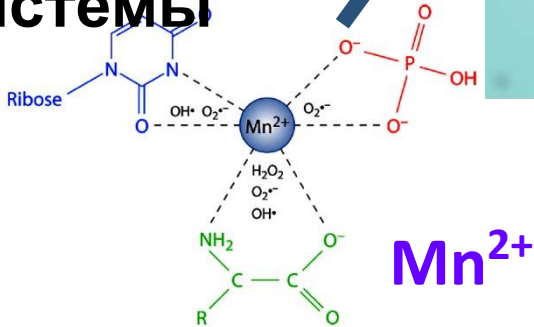


Гено  
М

Клеточная  
оболочка



Антиоксидантн  
ые  
системы



Детоксикац  
ия

Репарация  
ДНК  
Транскрипци  
я?

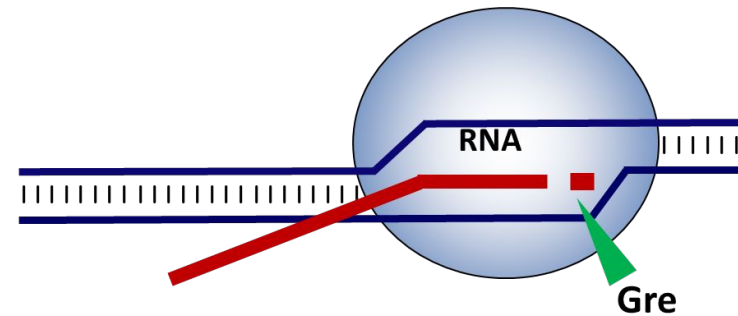
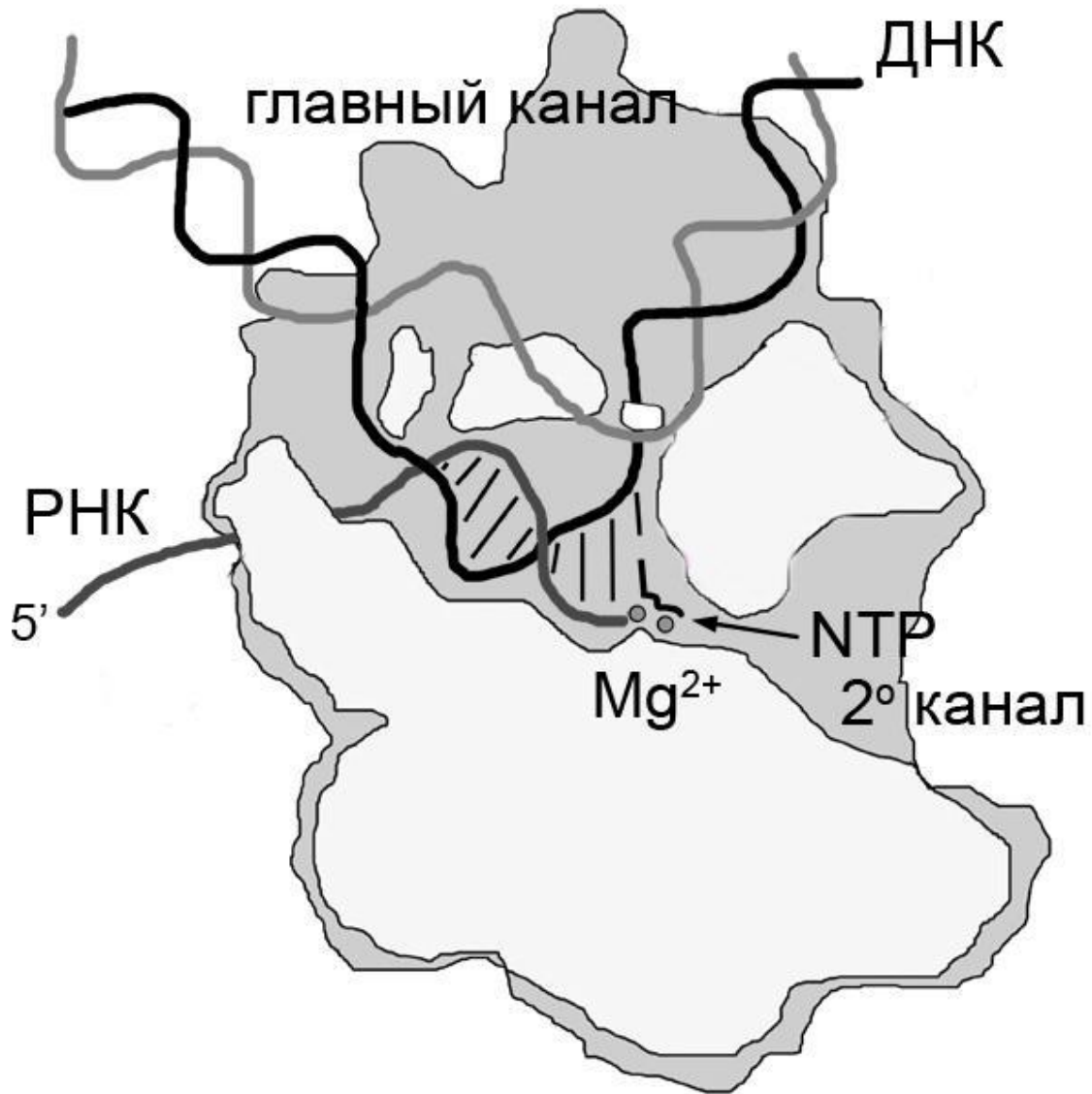
<b>Фактор</b>	<b>Функция</b>
DdrO	Репрессия оперонов, содержащих RDRM, в частности, генов <i>ddrA</i> , <i>ddrB</i> , <i>ddrD</i> (Wang <i>et al</i> , 2015)
PprI (IrrE)	Регуляция синтеза 31 белка, в том числе, активация некоторых белков репарации (Blanchard <i>et al</i> , 2017; Wang <i>et al</i> , 2015)
PprM	PprI-зависимая регуляция, подавление экспрессии <i>pprA</i> и, предположительно, других белков (Ohba <i>et al</i> , 2009; Jeong <i>et al</i> , 2016b)
DrRRA	Активация транскрипции десятков генов, в том числе, тех, продукты которых вовлечены в ответ на стрессовые условия (Wang <i>et al</i> , 2008)
OxyR	Активация и репрессия генов в зависимости от окислительно-восстановительного потенциала цитоплазмы (Chen <i>et al</i> , 2008)
IrrI (DR0171)	Активация более 100 белков, в том числе, вовлеченных в ответ на стрессовые условия (Lu <i>et al</i> , 2011)
DdrI	цАМФ-зависимый регулятор экспрессии сотен генов, в том числе тех, продукты которых участвуют в ответе на стресс (Meyer <i>et al</i> , 2018)
Mur	Активация транскрипции генов, продукты которых участвуют в транспорте ионов металлов через клеточную мембрану (Ul Hussain Shah <i>et al</i> , 2014)

# Стрессоустойчивость *D. radiodurans*

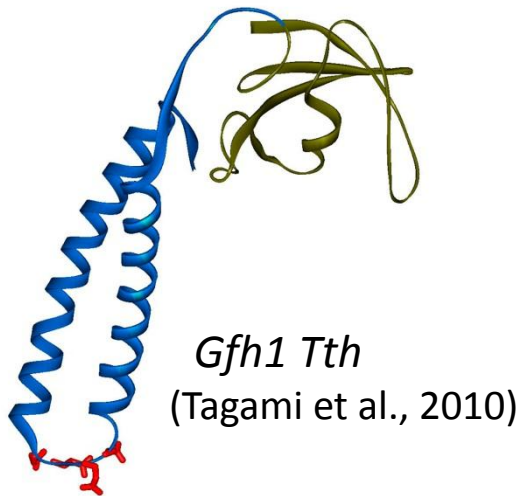
RecX	Подавление экспрессии генов, продукты которых участвуют в постиррадиационном восстановлении (Sheng <i>et al</i> , 2005, 2009)
LexA2	Подавление экспрессии <i>pprA</i> (Sato <i>et al</i> , 2006)
CsoR	Репрессия оперона, кодирующего гены устойчивости к ионам меди (Zhao <i>et al</i> , 2014)
HucR	Репрессия синтеза урат-оксидазы (Wilkinson & Grove, 2004)
HspR	Репрессия генов белков теплового шока (Schmid <i>et al</i> , 2005a)
Гистидиновые киназы, регулирующие транскрипционные факторы	Регуляция транскрипции генов, продукты которых задействованы в ответе на стресс (Im <i>et al</i> , 2013b)
NO	Стимуляция роста и деления клеток после облучения (Patel <i>et al</i> , 2009), участие в регуляции синтеза каротиноидов (Hansler <i>et al</i> , 2016)
FMN-рибопереключатель	Регуляция синтеза рибофлавина; участие в защите клеток от окислительного стресса (Yang <i>et al</i> , 2014)



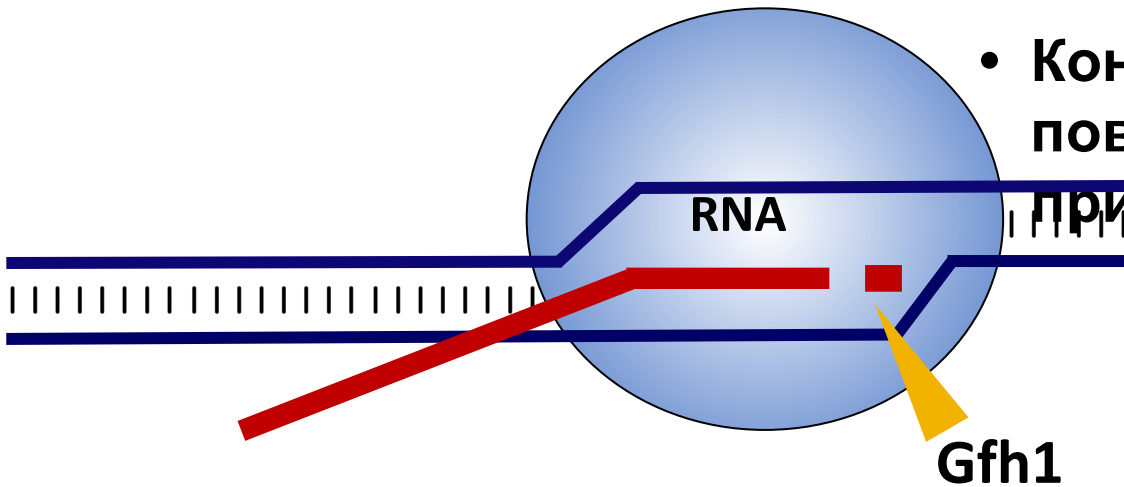
# Схема элонгационного комплекса бактериальной РНК-полимеразы



# Gfh-факторы (Gre factor homologs)

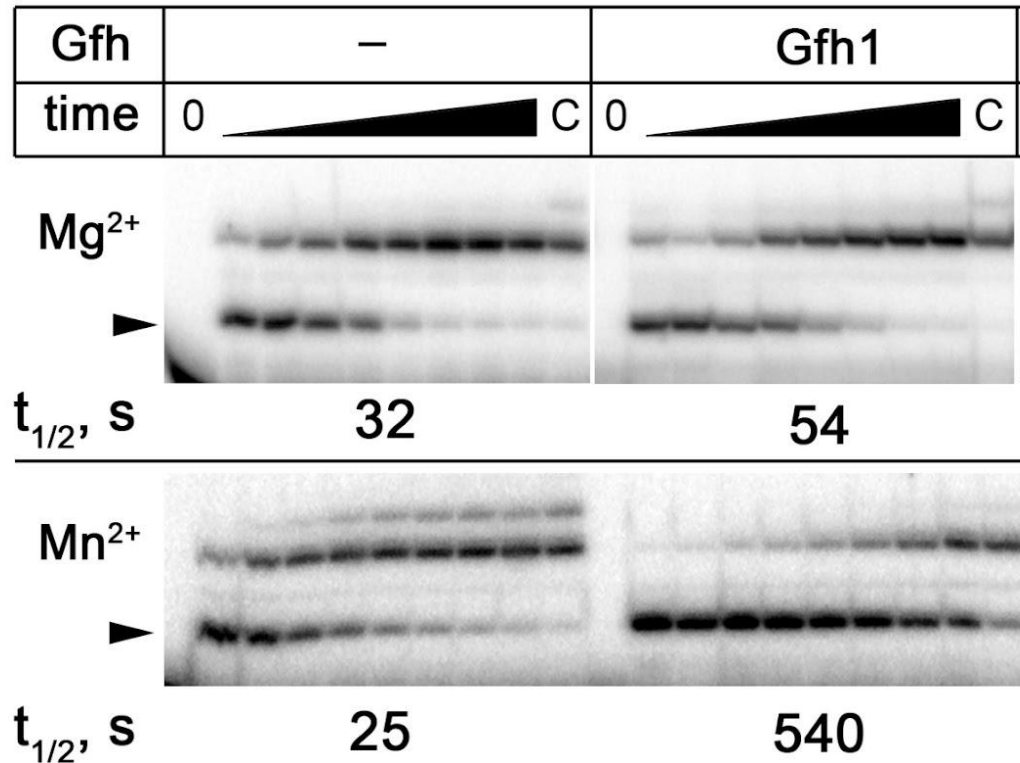
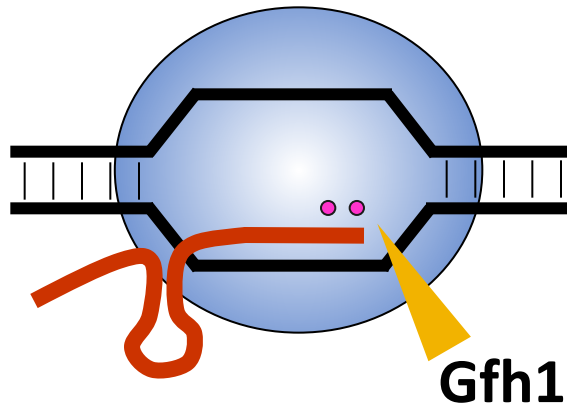


- Есть только у бактерий филума *Deinococcus-Thermus*
- В отличие от Gre-факторов не активируют расщепление РНК
- *Gfh1 Tth* ингибирует инициацию транскрипции
- Концентрация *Gfh1* повышается в клетках *Dra* при стрессе



# Gfh-факторы усиливают транскрипционные паузы

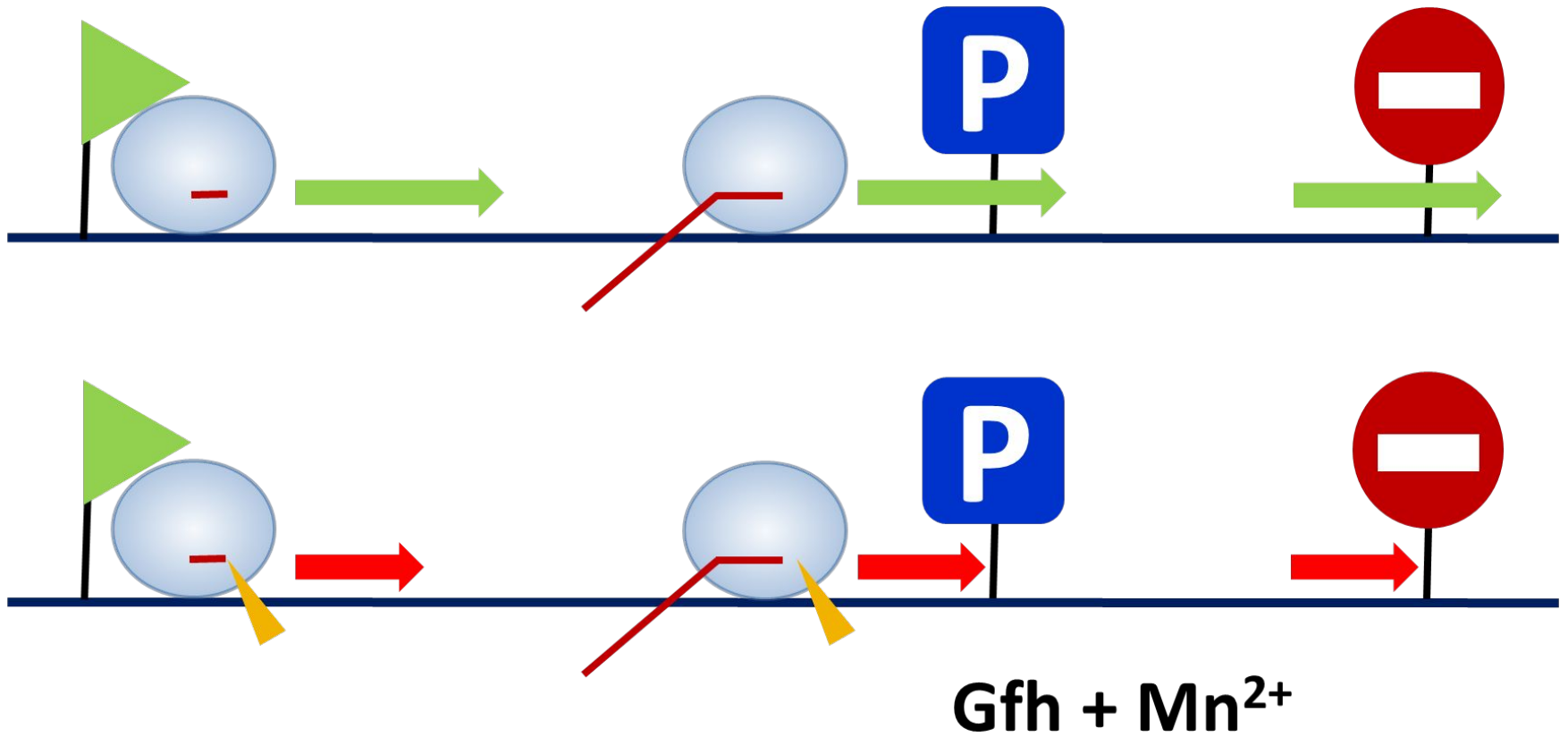
*hisP* –  
шпилькозависимая



Gfh-факторы Dra  
активируются в  
присутствии  $Mn^{2+}$

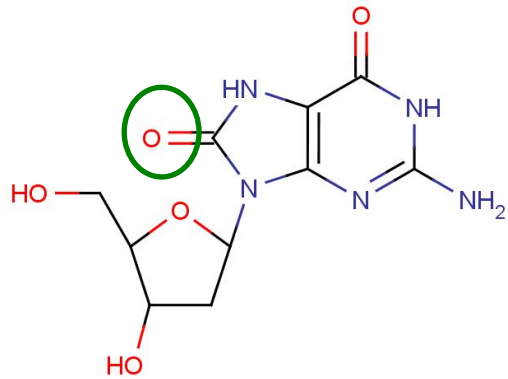
Esyunina et al., 2016

... и терминацию  
транскрипции

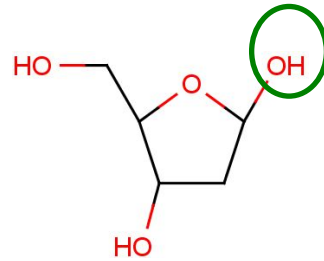


**Промоторы, паузы и терминаторы** транскрипции

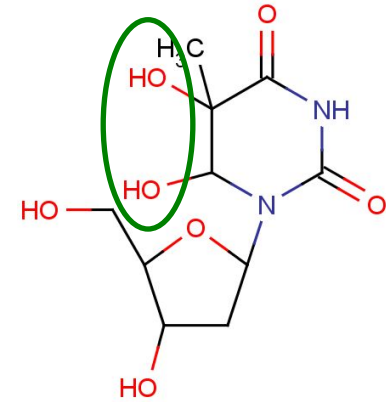
# Исследуемые повреждения в ДНК



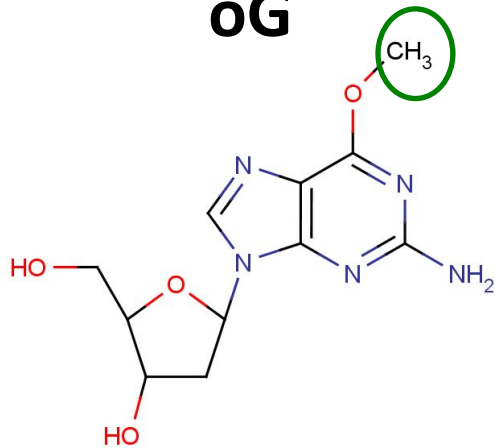
**8-ox  
oG**



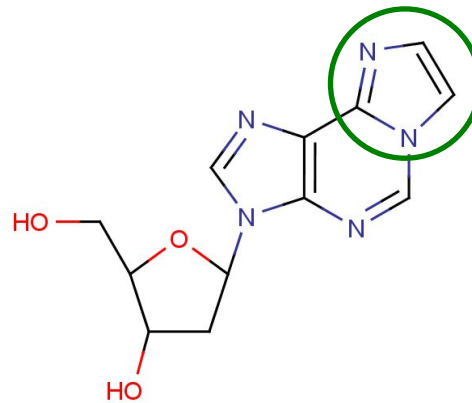
**AP-s  
ite**



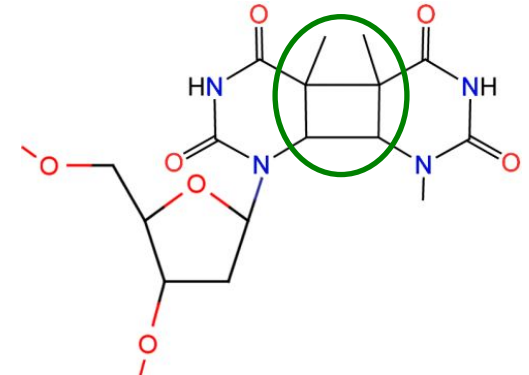
**thymine  
glycol**



**O<sup>6</sup>-meG**

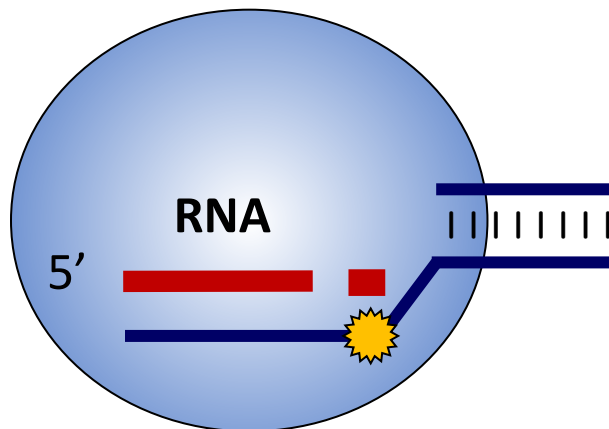


**1-N<sup>6</sup>-eth  
enoA**



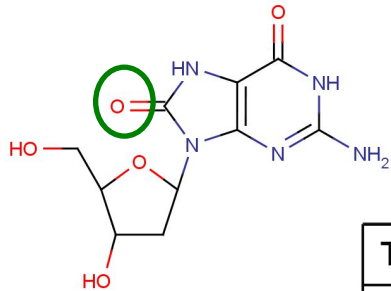
**thymine dimers  
(CPD)**

# Искусственные элонгационные комплексы

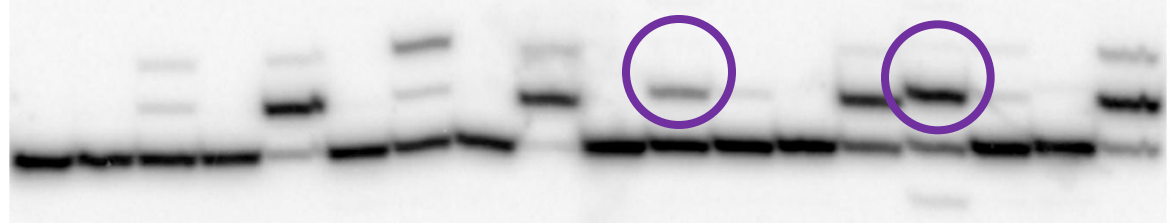


# Точность синтеза РНК на поврежденных матрицах

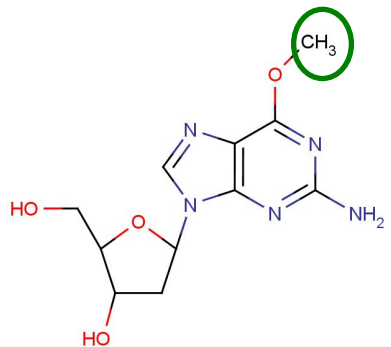
Template	Guanine				8-Oxoguanine			
		Mg	Mn		Mg	Mn		Mn
NTP	-	A U G C	A U G C	-	A U G C	A U G C	A U G C	A U G C



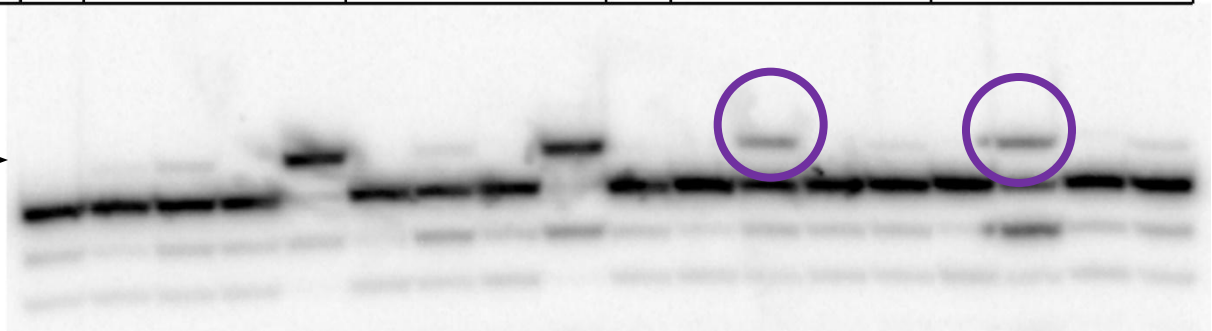
G →



Template	Guanine				O <sup>6</sup> -Methylguanine			
		Mg	Mn		Mg	Mn		Mn
NTP	-	A U G C	A U G C	-	A U G C	A U G C	A U G C	A U G C

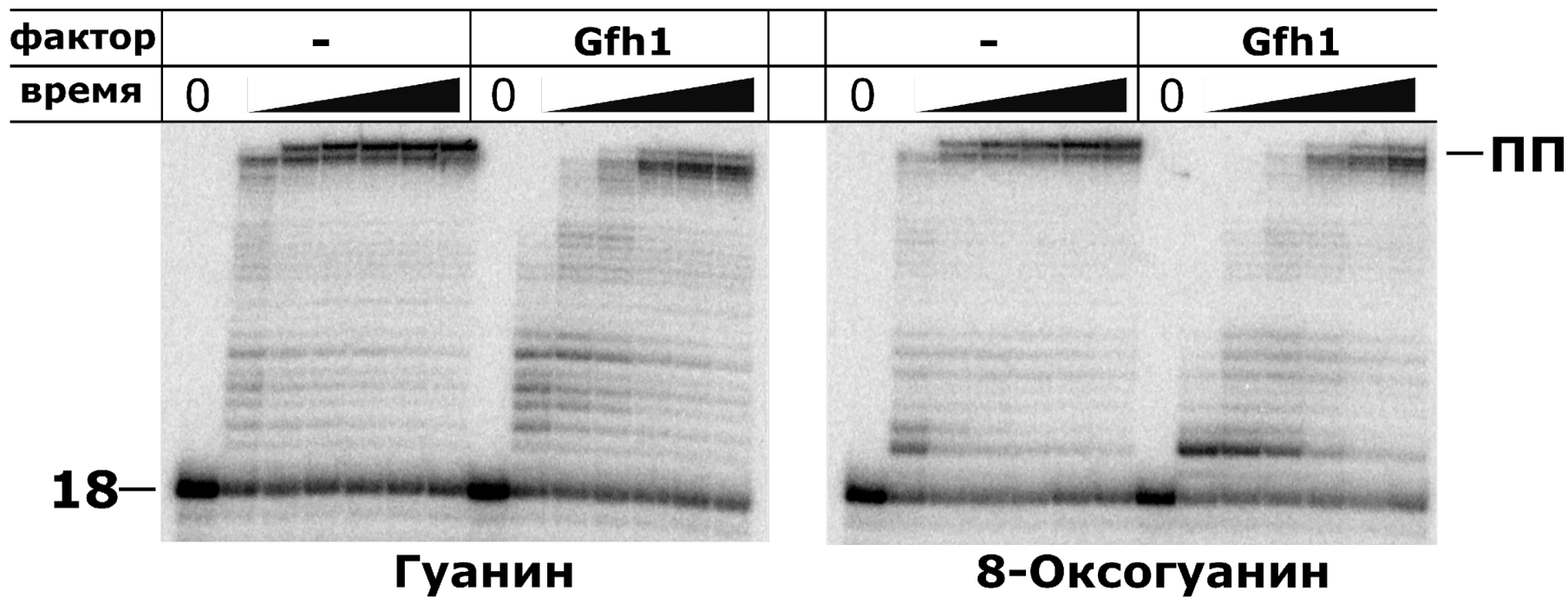


G →



**Эффективность и точность включения нуклеотидов напротив повреждений снижаются**

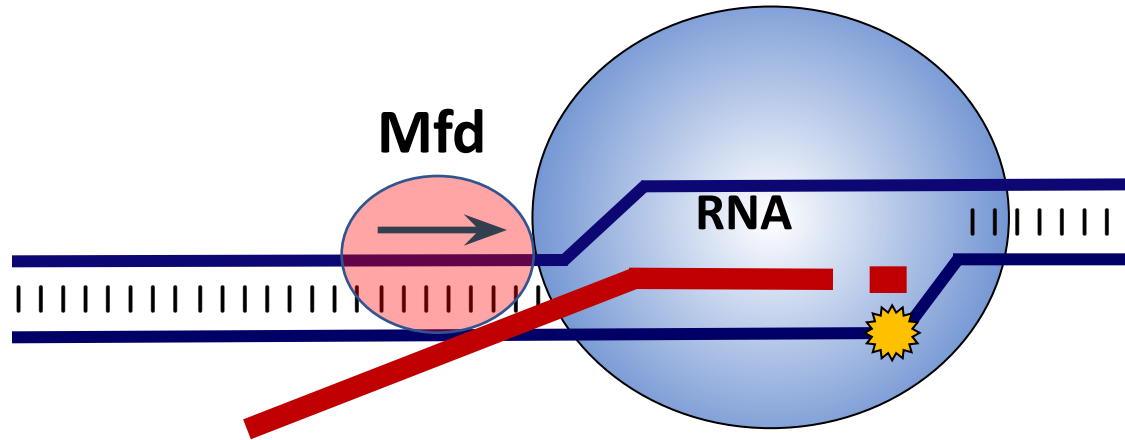
# Gfh1 *Dra* усиливает паузу на поврежденном нуклеотиде матрицы



$Mn^{2+}$

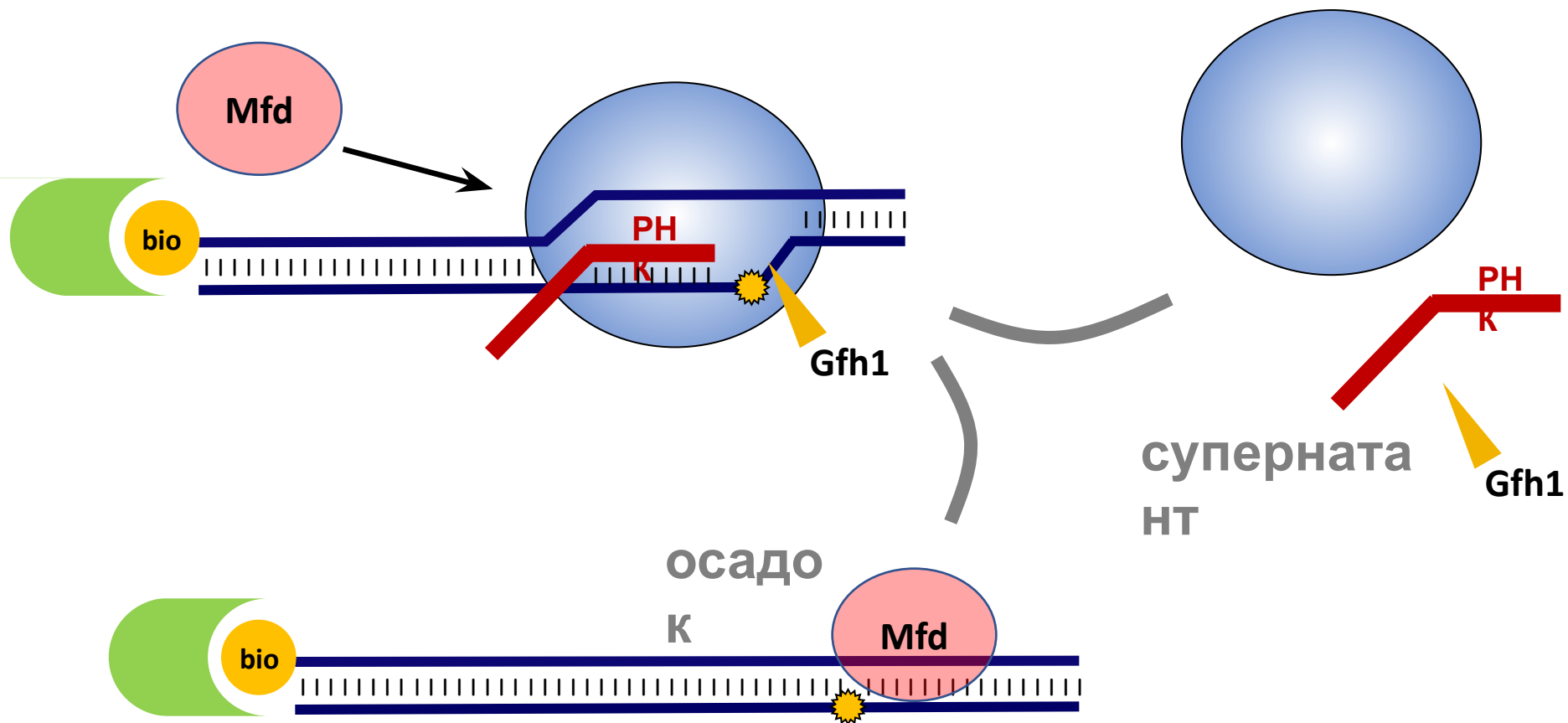


# Роль фактора Mfd в транскрипции



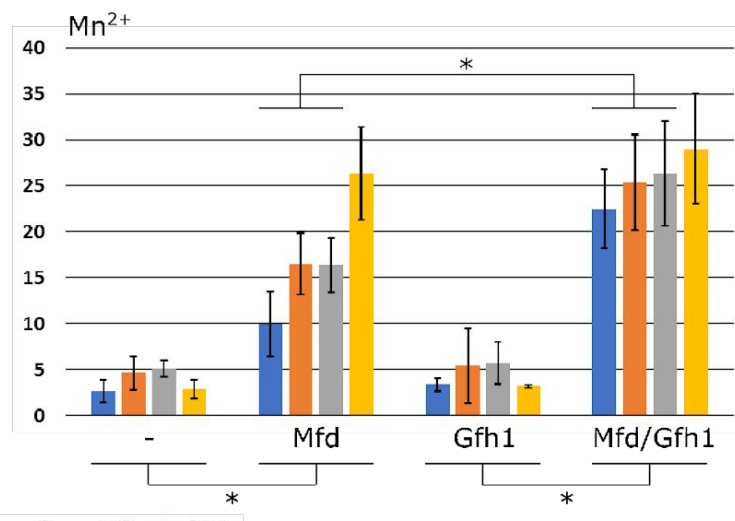
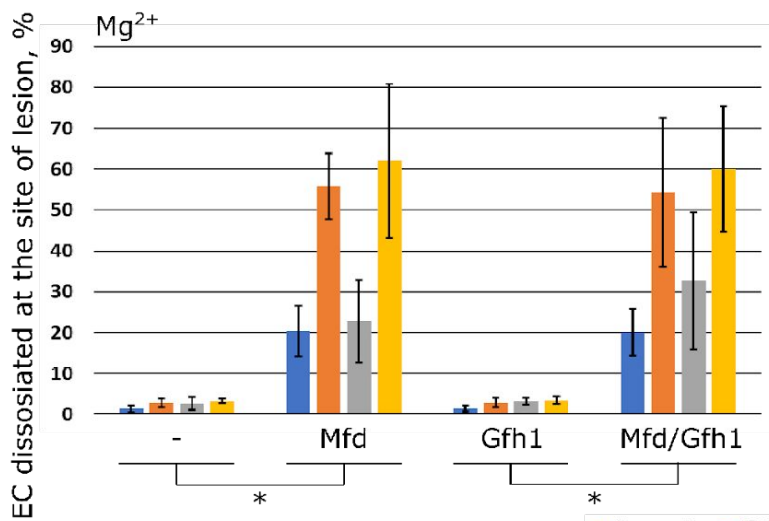
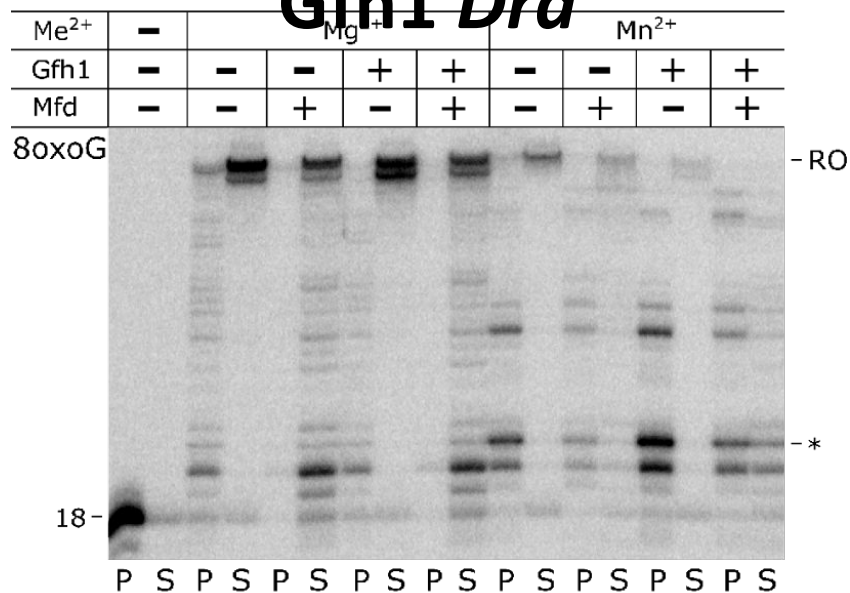
**Транслоказа Mfd у *E. coli* смещает остановленные транскрипционные комплексы с поврежденных участков ДНК**

# Действие Mfd и Gfh1 *Dra* на остановленные транскрипционные комплексы



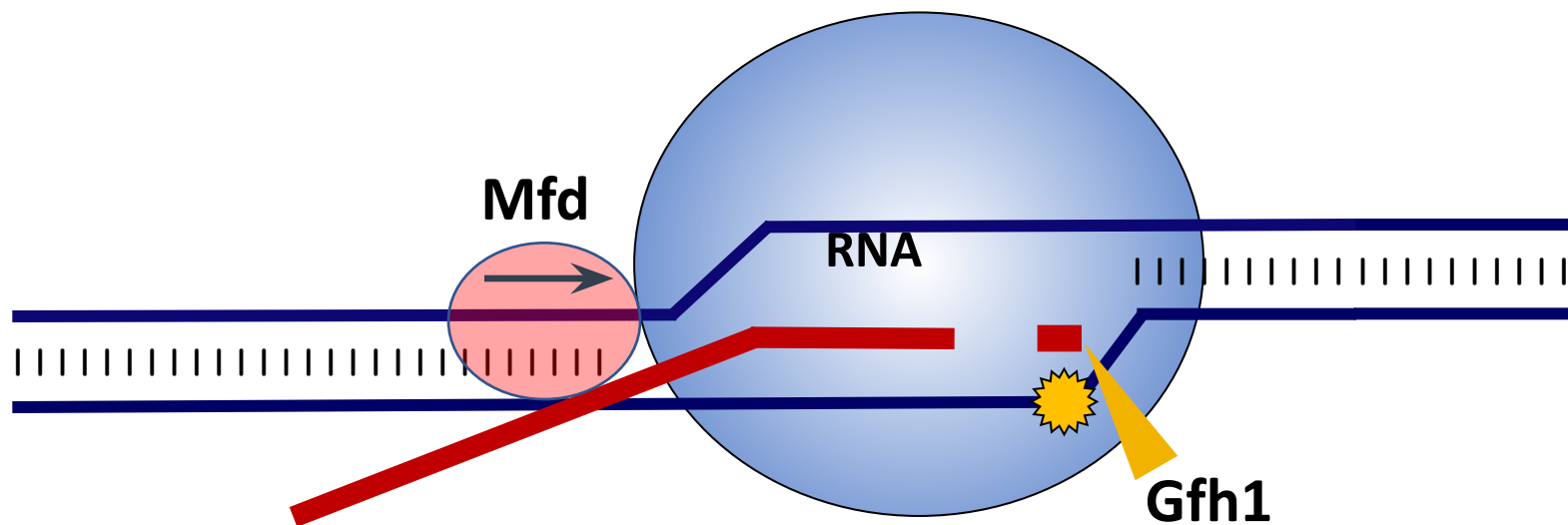
# Mfd действует на остановленные транскрипционные комплексы совместно с

## Gfh1 *Dra*



■ 8oxoG ■ O6meG ■ TG ■ CPD

# Предполагаемая роль Gfh-факторов



**Gfh ингибируют транскрипцию, стабилизируя неактивную конформацию РНКП**



**↓ транскрипция, ↑ диссоциация РНКП  
способствует процессам репарации и репликации?**

# Текущие исследования

- Анализ Gre-подобных факторов других бактерий: *D. gobiensis*, *D. peraridilitoris*, *Brevundimonas sp. leaf*
- Дальнейшее изучение механизма сопряжения транскрипции с эксцизионной репарацией нуклеотидов: сборка *in vitro* системы репарации NER *D. radiodurans*
- Поиск белков, ассоциированных с РНКП *D. radiodurans* в стрессовых условиях, методом pull-down и масс-спектрометрического анализа
- Изучение блокирования транскрипции белком dCas9 *in vitro*

# Чем ещё занимаются в (мета)лаборатории

- Инициацией транскрипции
- Эукариотическими ДНК-полимеразами (лаба А.В. Макаровой)
- Прокариотическими аргонавтами (мегагрант А.А. Аравина)
- Плазмидами с природной устойчивостью ко всему на свете (группа М.А. Петровой)

