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.agapov@gmail.com

29 марта 2019 г.

Транскрипционный цикл

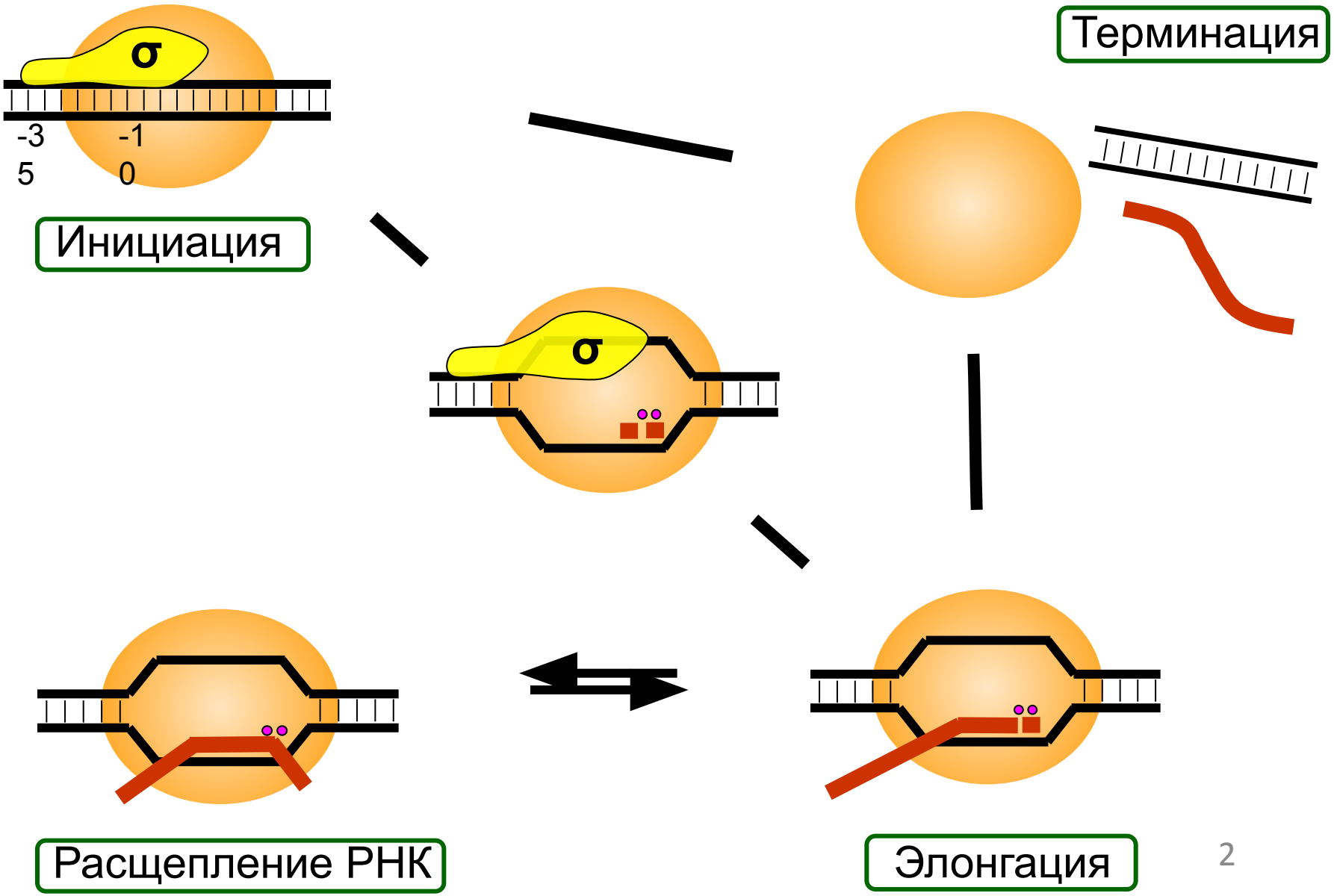
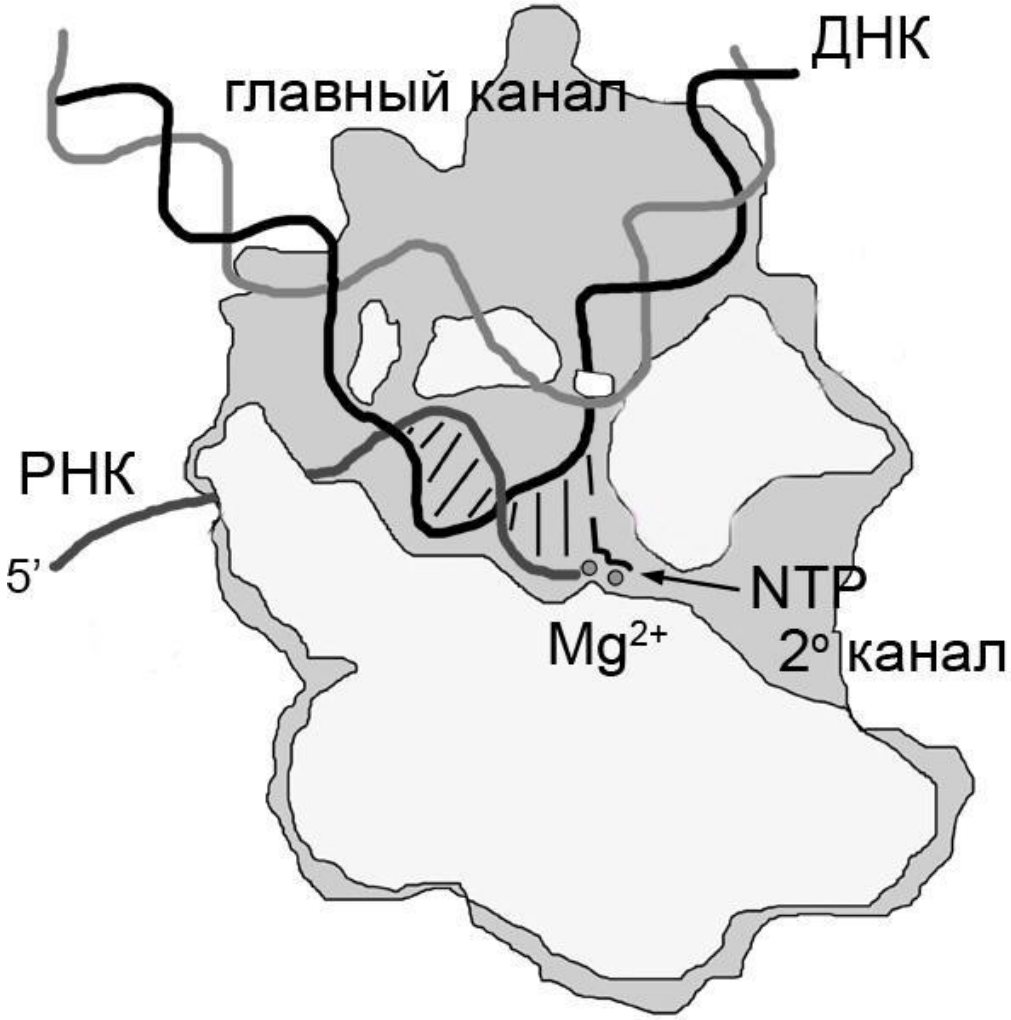
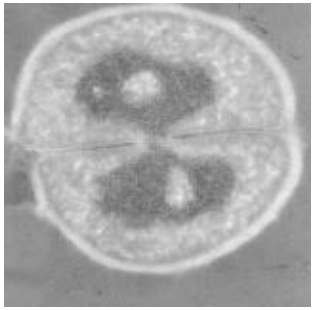


Схема элонгационного комплекса бактериальной РНКП

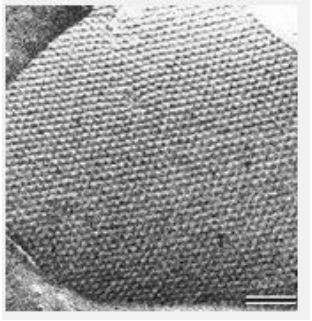


Стрессоустойчивость *D. radiodurans*

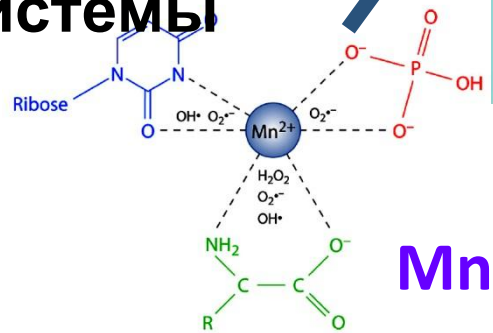


Геном

Клеточная оболочка



Антиоксидантные системы



Mn^{2+}

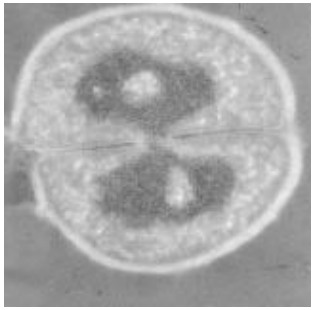
Репарация ДНК

Детоксикация

Стрессоустойчивость *D. radiodurans*

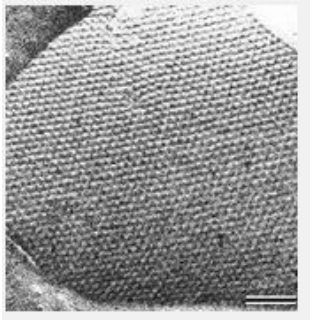
Компонент репарации	*E. coli*	*D. radiodurans*
Системы процессинга концов двунитевых разрывов	RecBCD RecFOR (RecQ, RecJ)	RecFOR (UvrD, RecJ) PprA (?)
Белки, связывающиеся с одноцепочечной ДНК	SSB, RecA	SSB*, RecA**, DdrA, DdrB
Основной путь репарации двунитевых разрывов	SDSA	ESDSA
Фотолиаза	+	–
NER	UvrABC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

Стрессоустойчивость *D. radiodurans*

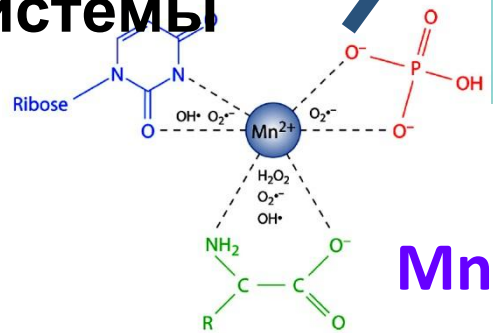


Геном

Клеточная оболочка



Антиоксидантные системы



Mn^{2+}

Детоксикация

Репарация ДНК

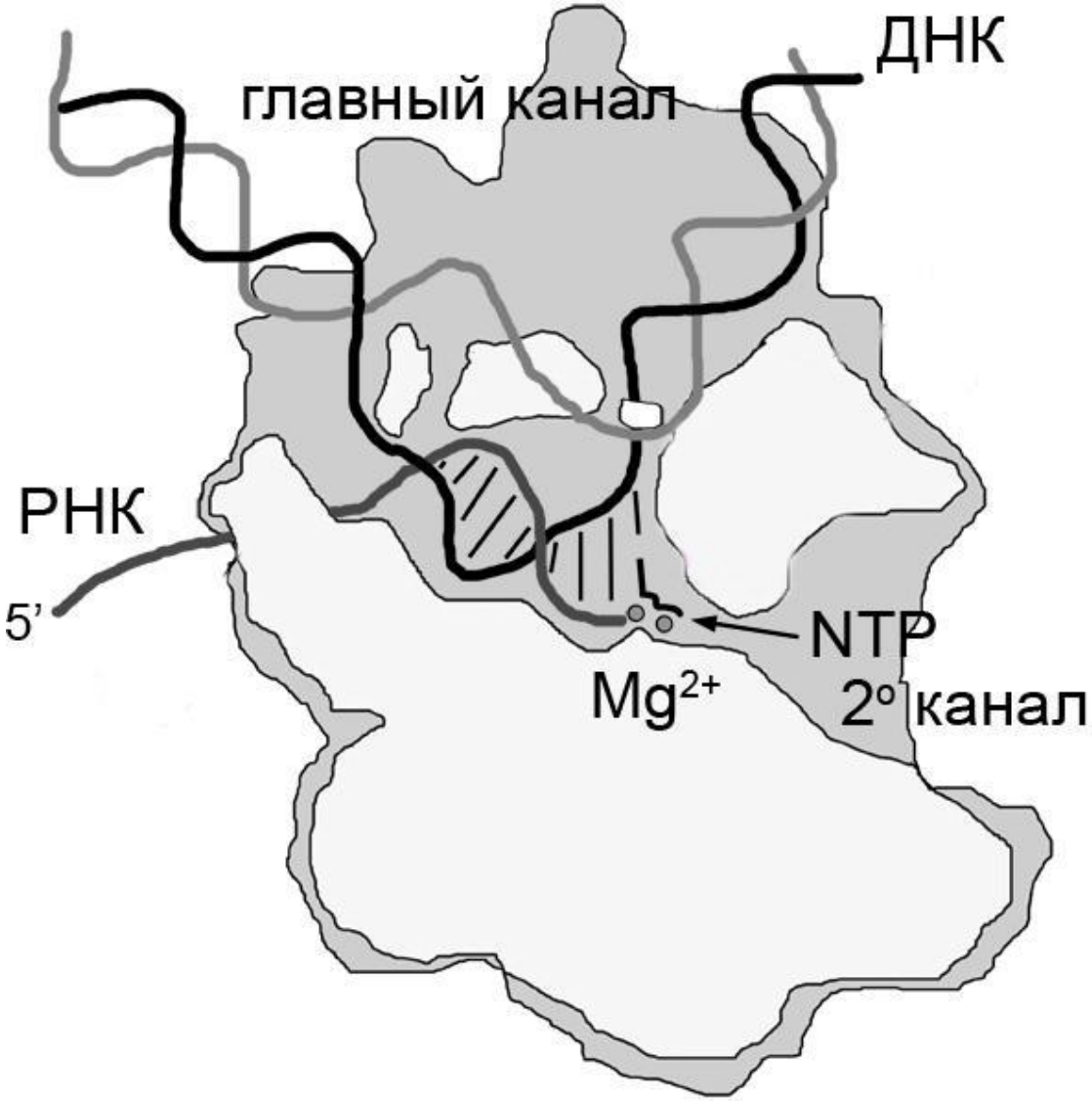
Транскрипция?

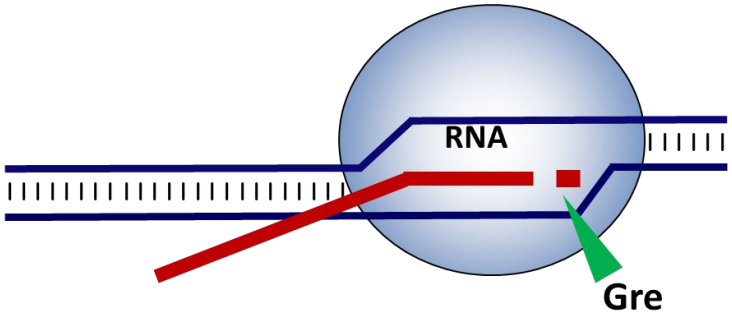
Фактор	**Функция**
DdrO	Репрессия оперонов, содержащих RDRM, в частности, генов *ddrA, ddrB, ddrD* (Wang *et al*, 2015)
PprI (IrrE)	Регуляция синтеза 31 белка, в том числе, активация некоторых белков репарации (Blanchard *et al*, 2017; Wang *et al*, 2015)
PprM	PprI-зависимая регуляция, подавление экспрессии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

Стрессоустойчивость *D. radiodurans*

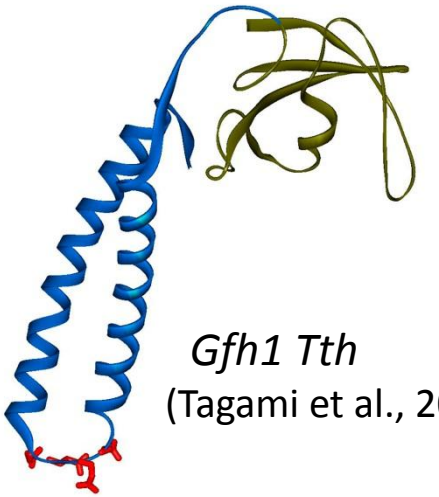
RecX	Подавление экспрессии генов, продукты которых участвуют в постиррадиационном восстановлении (Sheng *et al*, 2005, 2009)
LexA2	Подавление экспрессии *pprA* (Satoh *et al*, 2006)
CsoR	Репрессия оперона, кодирующего гены устойчивости к ионам меди (Zhao *et al*, 2014)
HucR	Репрессия синтеза урат-оксидазы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

Схема элонгационного комплекса бактериальной РНК-полимеразы



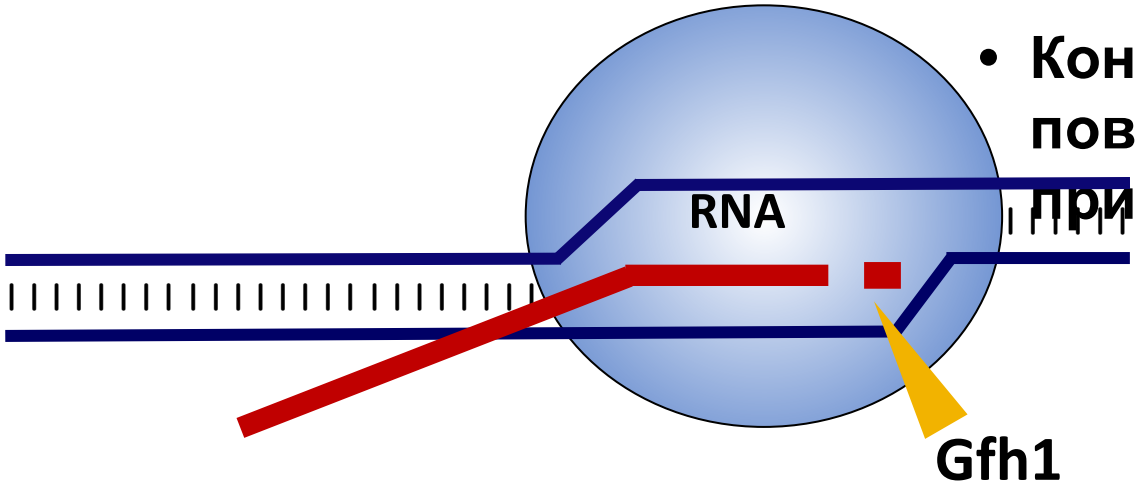


Gfh-факторы (Gre factor homologs)



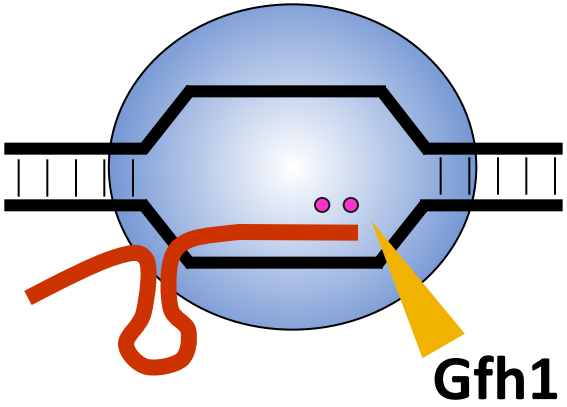
Gfh1 Tth
(Tagami et al., 2010)

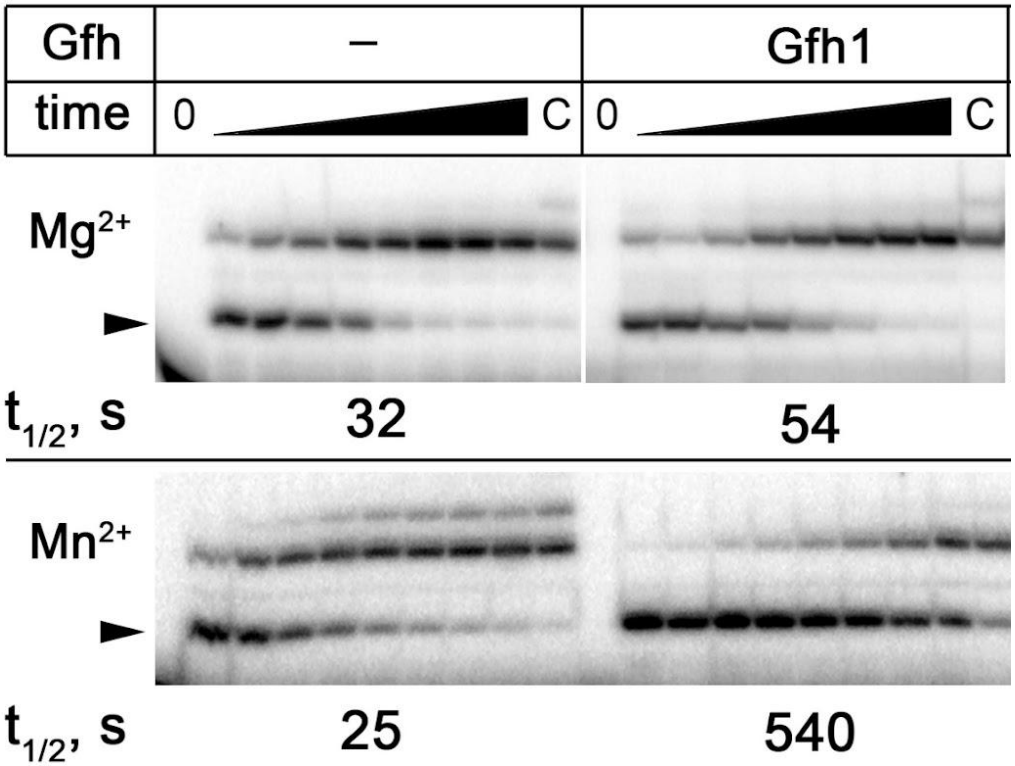
- **Есть только у бактерий филума *Deinococcus-Thermus***
- **В отличие от Gre-факторов не активируют расщепление РНК**
- **Gfh1 *Tth* ингибирует инициацию транскрипции**
- **Концентрация Gfh1 повышается в клетках *Dra* при стрессе**



Gfh-факторы усиливают транскрипционные паузы

hisP – шпилькозависимая

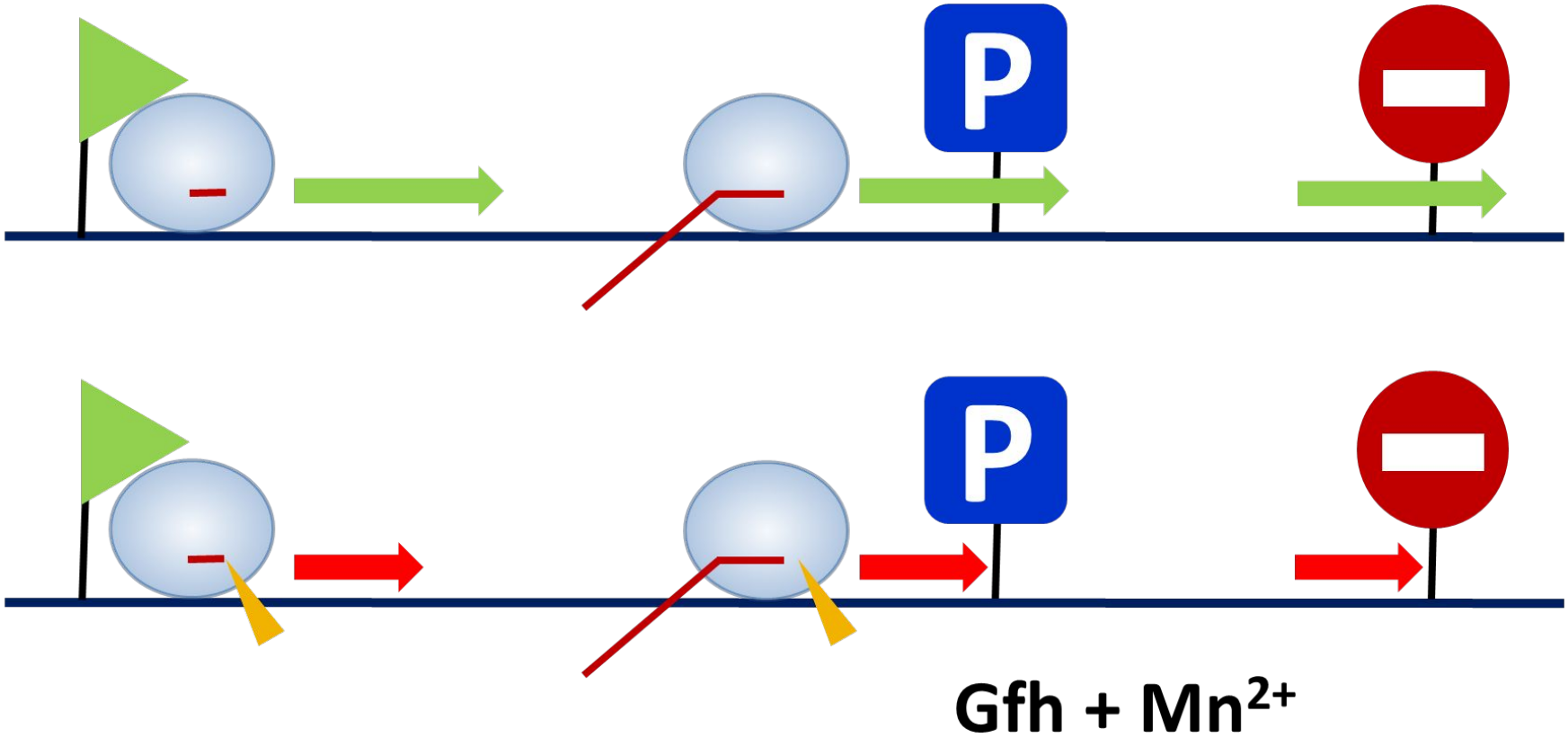




Gfh-факторы Dra активируются в присутствии Mn^{2+}

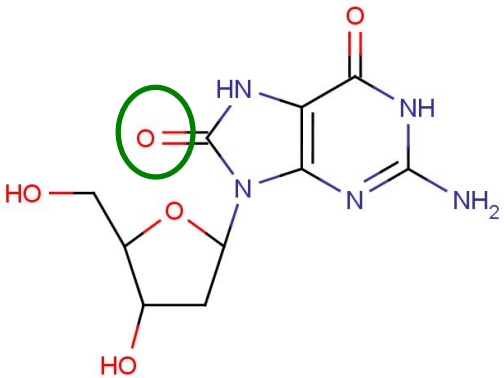
Esyunina et al., 2016

… и терминацию транскрипции

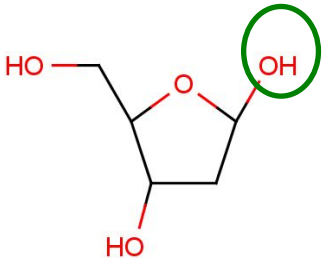


Промоторы, паузы и терминаторы транскрипции

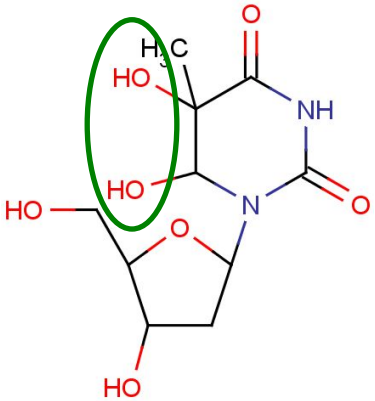
Исследуемые повреждения в ДНК



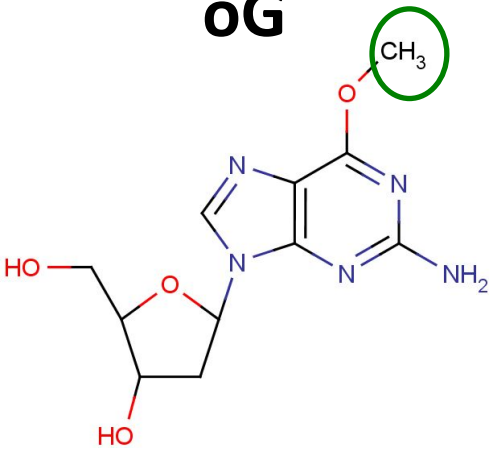
8-oxoG



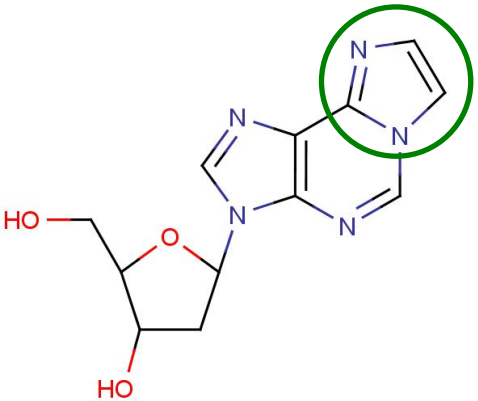
AP-site



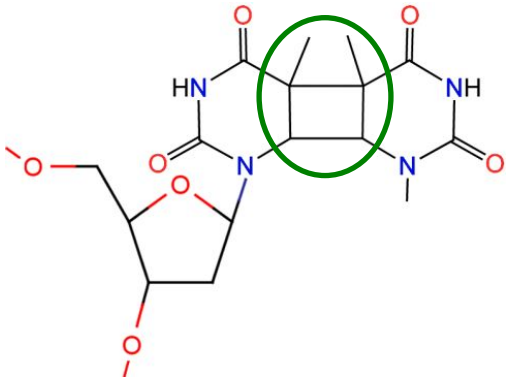
thymine glycol



O^6-meG

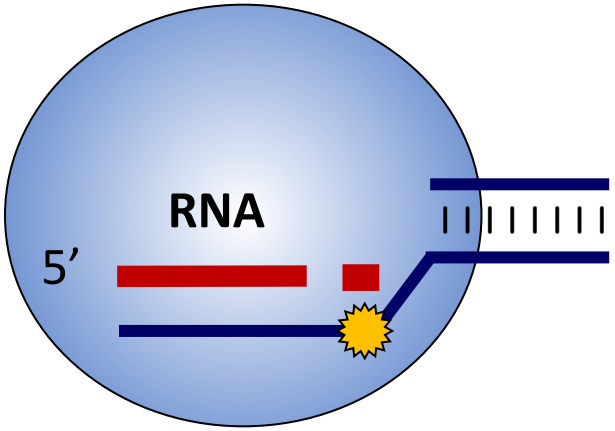


$1\text{-}N^6$-ethenoA



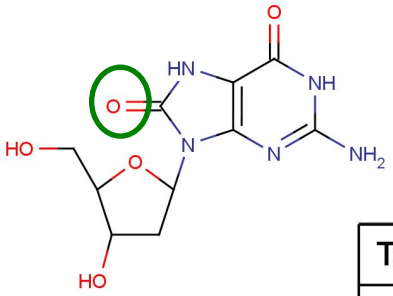
thymine dimers (CPD)

Искусственные элонгационные комплексы



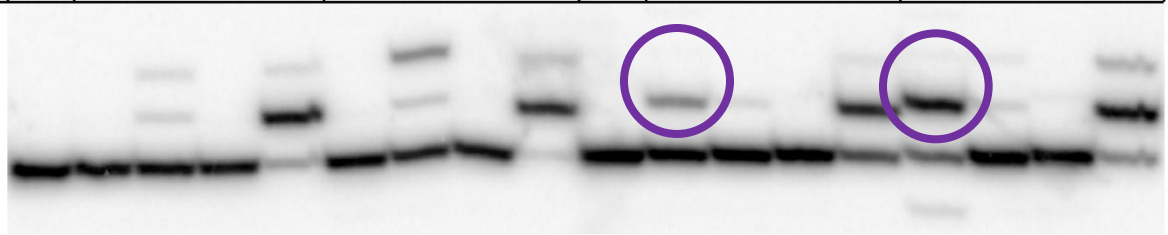

```
                    5’-GTTACTTGAGCTGCCC
                       |||||||||||||||||
3’-TTACTGGTCCGG X CAATGAACTCGACGGG
        |||||||||
5’-UUCGACCAGGCC
```

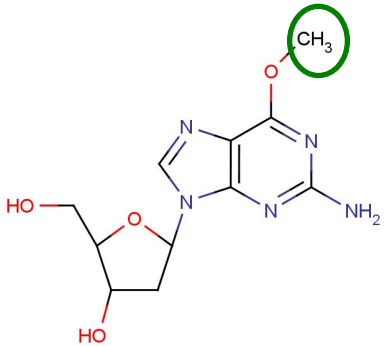
Точность синтеза РНК на поврежденных матрицах



G →

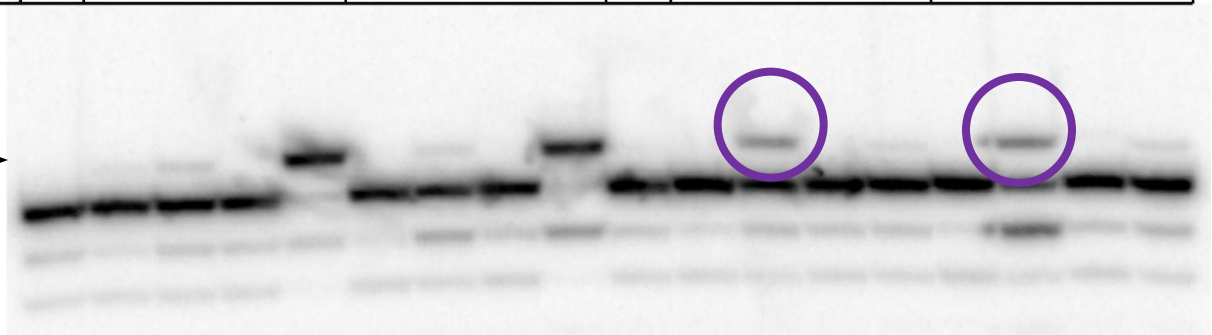
Template	Guanine									8-Oxoguanine								
Ion		Mg				Mn					Mg				Mn			
NTP	-	A	U	G	C	A	U	G	C	-	A	U	G	C	A	U	G	C





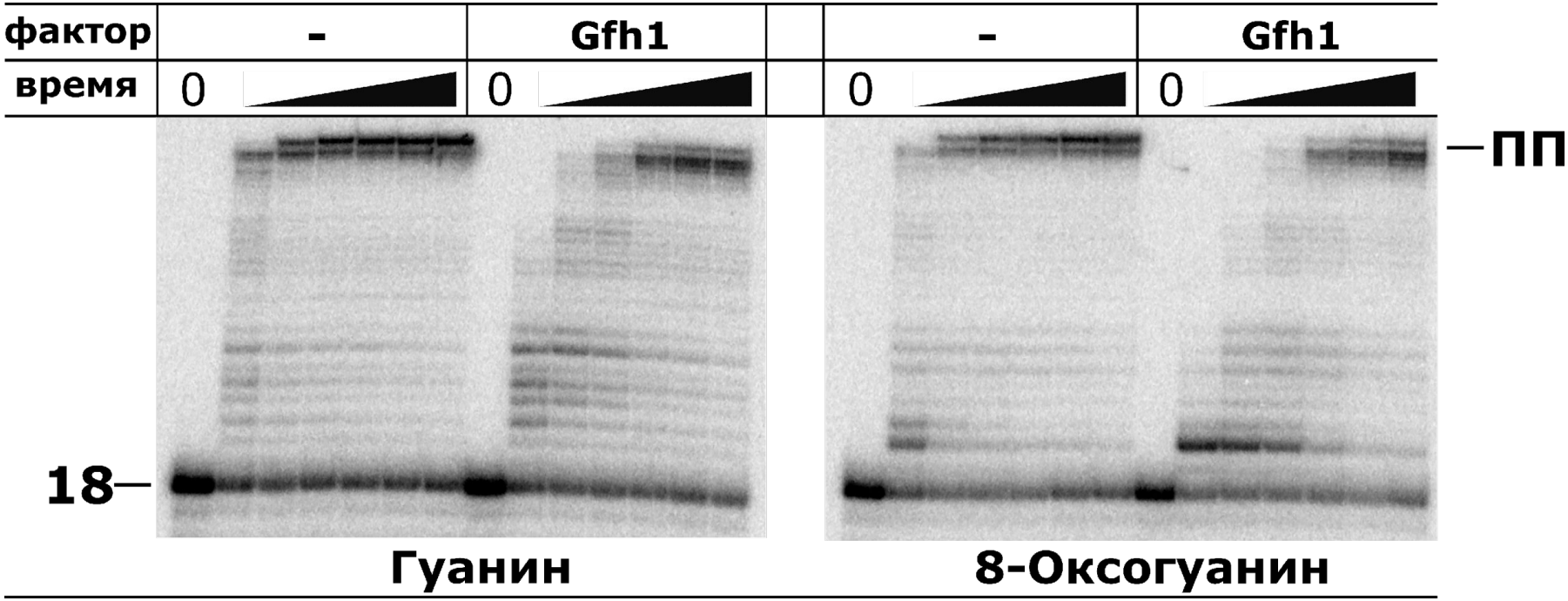
G →

Template	Guanine									O⁶-Methylguanine								
Ion		Mg				Mn					Mg				Mn			
NTP	-	A	U	G	C	A	U	G	C	-	A	U	G	C	A	U	G	C



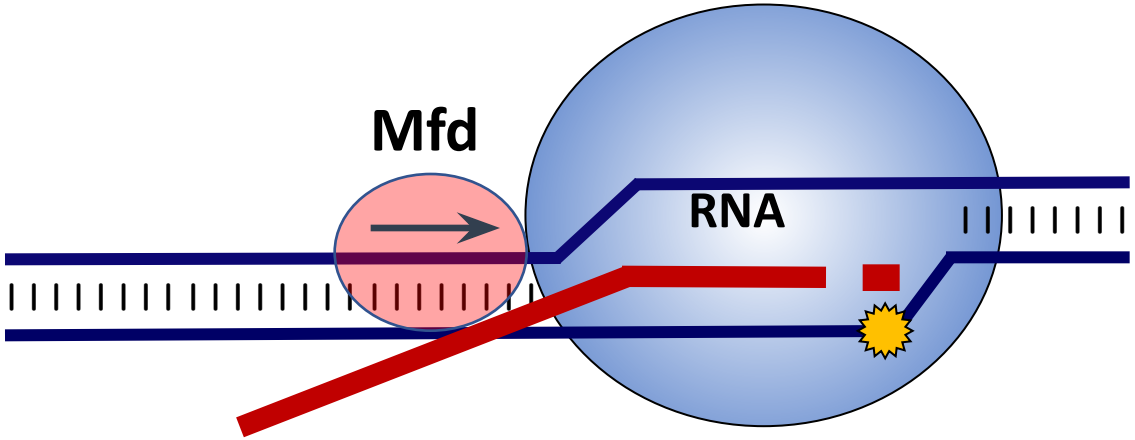
Эффективность и точность включения нуклеотидов напротив повреждений снижаются

Gfh1 *Dra* усиливает паузу на поврежденном нуклеотиде матрицы



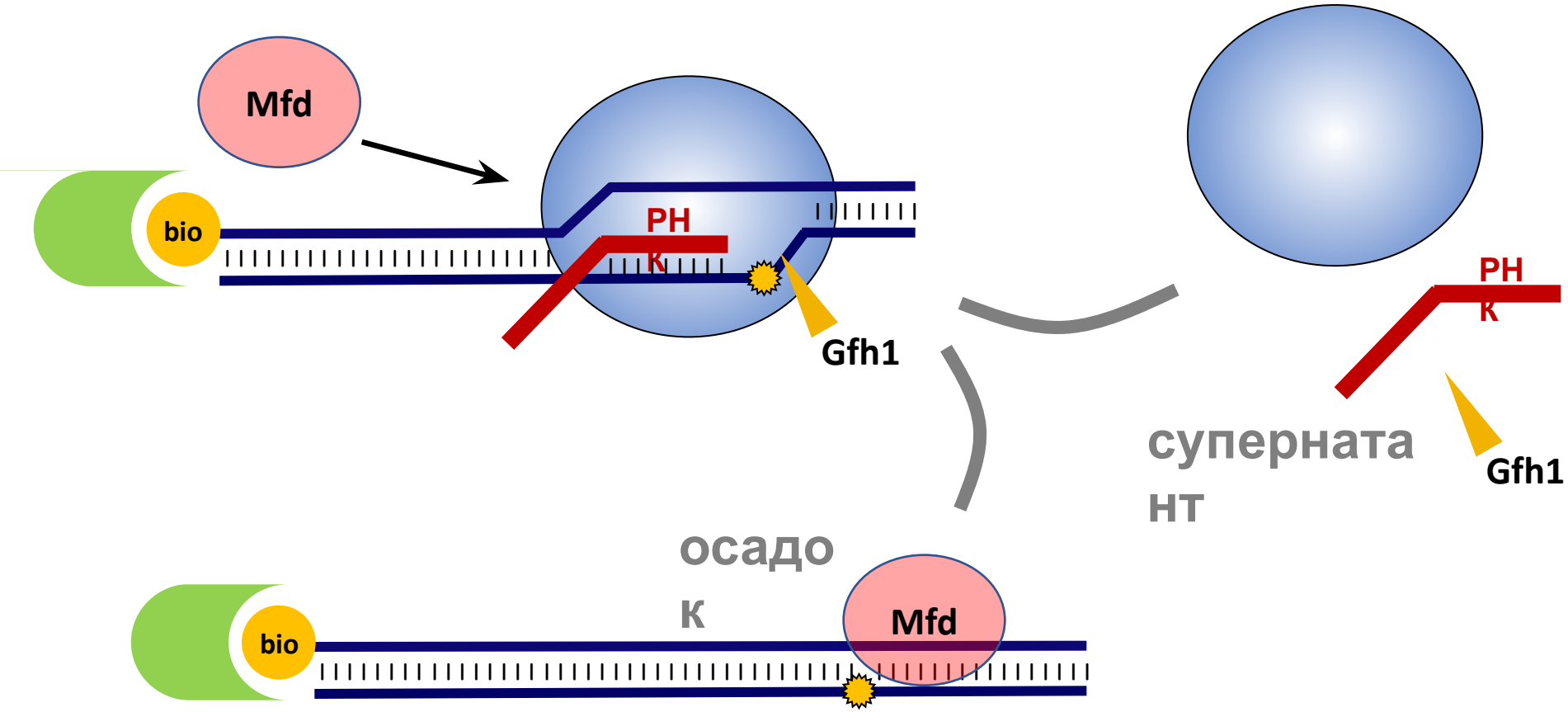
Mn^{2+}

Роль фактора Mfd в транскрипции

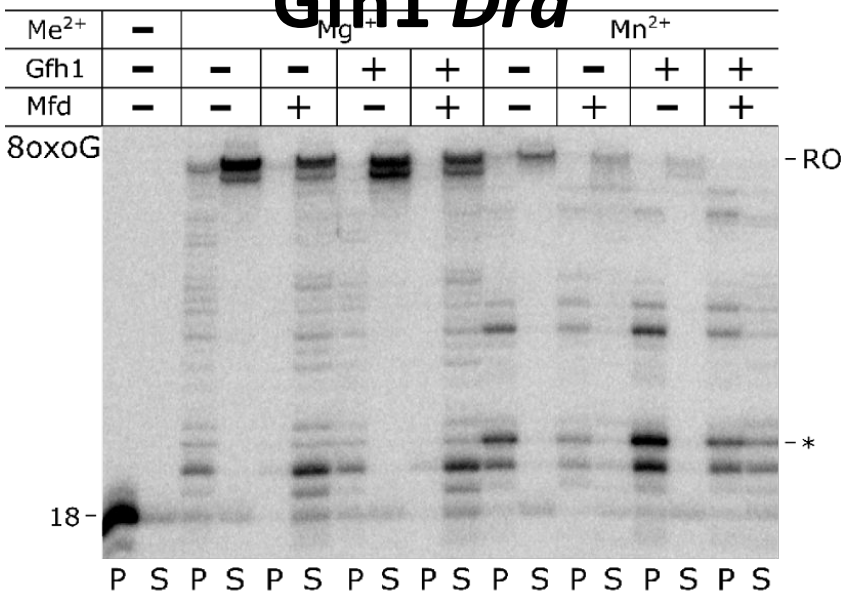


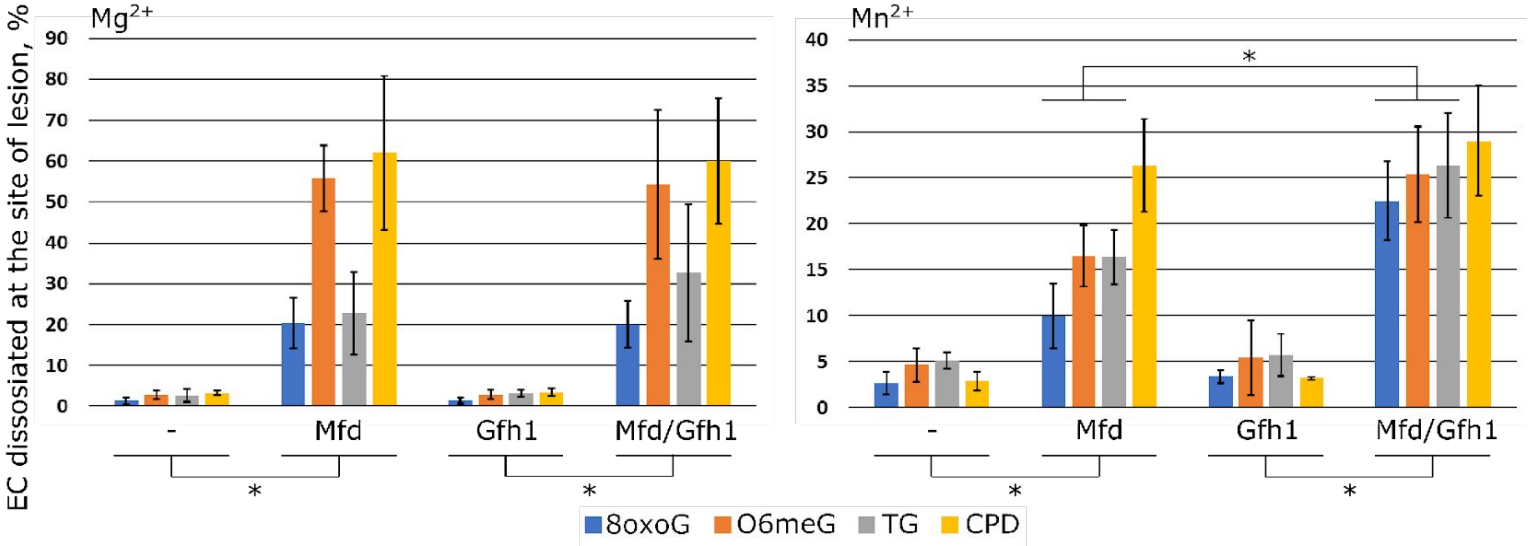
Транслоказа Mfd у *E. coli* смещает остановленные транскрипционные комплексы с поврежденных участков ДНК

Действие Mfd и Gfh1 *Dra* на остановленные транскрипционные комплексы

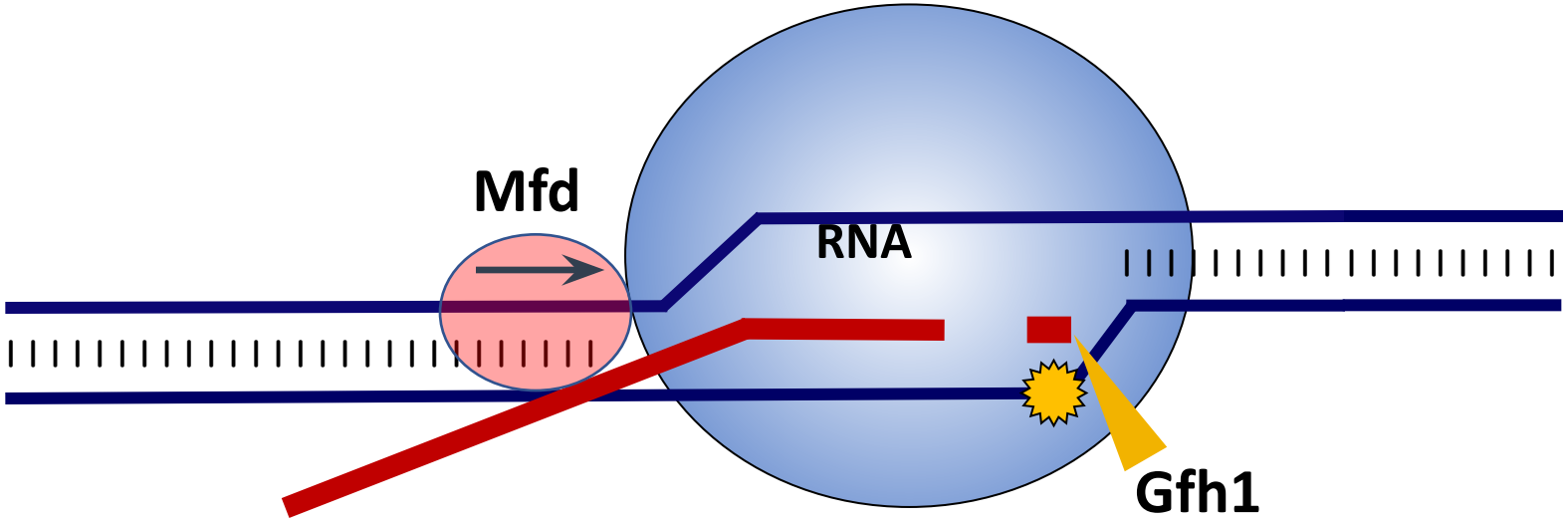


Mfd действует на остановленные транскрипционные комплексы совместно с Gfh1 *Dra*





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)