

Изучение роли сигнальной молекулы ppGpp и факторов, действующих через вторичный канал РНК-полимеразы, в сопряжении транскрипции и репарации ДНК

Научный руководитель – Прошкин Сергей Александрович

Афанасьева Елена Геннадьевна

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра молекулярной биологии, Москва, Россия

E-mail: Lenkaffa@yandex.ru

Изучение роли сигнальной молекулы ppGpp и факторов, действующих через вторичный канал РНК-полимеразы, в сопряжении транскрипции и репарации ДНК

Афанасьева Е.Г.^{1,2}

Студент

¹Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, кафедра молекулярной биологии, ²Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва

Lenkaffa@yandex.ru

Сигнальная молекула гуанозин-5'-дифосфат-3'-дифосфат (ppGpp), действуя синергетично с транскрипционным фактором DksA, изменяет свойства инициаторного комплекса РНК-полимеразы при ответе бактериальной клетки на стресс. Недавно была установлена новая роль этого алармона в элонгации транскрипции и сопряжении транскрипции с репарацией ДНК. В основе предложенного механизма защиты ДНК от генотоксичных агентов лежит возвратное смещение РНК-полимеразы против хода транскрипции (backtracking), которое стимулируется фактором UvrD.

Ранее было описано несколько сайтов связывания ppGpp с РНК-полимеразой и установлены те, что участвуют в регуляции инициации транскрипции. Чтобы определить мишень ppGpp на РНК-полимеразе, играющую ключевую роль в репарации и поддержании целостности ДНК, нами были получены мутанты *Escherichia coli* с аминокислотными заменами, инактивирующие два потенциальных сайта связывания ppGpp: «сайт 1» и «сайт 2». Редактирование генома *E. coli* осуществили с использованием системы [U+FO6C]-Redрекомбинации для интеграции в хромосому донорной ДНК с мутациями и системы CRISPR/Cas9 для негативной селекции против клеток дикого типа. Несмотря на значимость исследуемых сайтов для ответа клетки на аминокислотное голодание, мы не обнаружили заметного изменения чувствительности полученных мутантов к генотоксичным агентам по сравнению со штаммом дикого типа. В тоже время, штаммы с нарушенным синтезом ppGpp или инактивированным геном *dksA* проявляют повышенную чувствительность к мутагенам. Вполне вероятно, что характер взаимодействия ppGpp с элонгационным комплексом и инициаторным комплексом РНК-полимеразы может быть различным.

Фактор TraR, кодируемый конъюгативной плазмидой F, имеет структурное сходство с DksA. Он оказывает подобный DksA эффект на инициацию транскрипции, но его действие не зависит от ppGpp. Для установления роли TraR в элонгации транскрипции и ее сопряжении с репарацией ДНК мы клонировали ген *traR* в экспрессионный вектор pZE21 под контроль промотора P_{LtetO-1}, регулируемого тетрациклиновым репрессором. Полученная генно-инженерная конструкция была протестирована в штаммах *E. coli* дикого типа, а

также штаммах с нарушенным синтезом ppGpp и инактивированным геном *dkkA*. Выяснилось, что экспрессия гена фактора TraR делает клетки значительно более устойчивыми к генотоксичным агентам. По-видимому, TraR вызывает в РНК-полимеразе те же конформационные изменения, что происходят и при синергетическом действии ppGpp и DksA. Такое взаимодействие понижает энергетический барьер для обратного смещения РНК-полимеразы и облегчает репарацию ДНК.

Работа поддержана Программой фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы (тема № 01201363822).