

Якунина Мария Вячеславовна

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
НЕВИРИОННОЙ МНОГОСУБЪЕДИНИЧНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ
БАКТЕРИОФАГА РНКZ**

Специальность 03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

Кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2016

Работа выполнена в Лаборатории молекулярной микробиологии Научно-исследовательского комплекса «Нанобиотехнологии» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого».

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Северинов Константин Викторович
заведующий лабораторией молекулярной микробиологии ФГАОУ ВО «СПбПУ», Санкт-Петербург

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Барлев Николай Анатольевич
Заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

доктор химических наук, кандидат биологических наук
Мирошников Константин Анатольевич
Заведующий лабораторией молекулярной биоинженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина Российской академии наук

Защита диссертации состоится «23» декабря 2016 года в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.230.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института цитологии Российской академии наук по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте института по адресу <http://www.cytspb.rssi.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат биологических наук

Каминская Е.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы.

Вирусы бактерий, бактериофаги, широко распространены на земле, их численность на порядок превышает численность бактерий [1]. Бактериофаги представляют собой крайне разнообразную группу вирусов, различаясь между собой по типу нуклеиновой кислоты, использующейся для хранения генетического материала, структуре и составу фаговой частицы (вириона), а также механизмами, задействованными в развитии инфекции клеток-хозяев. В развитие инфекции клеток большинством известных бактериофагов выделяют три стадии. На ранней стадии происходит синтез фаговых белков, функция которых заключается в перепрограммировании системы транскрипции и трансляции клетки с экспрессии генов хозяина на экспрессию генов фага. На средней стадии синтезируются белки, необходимые для репликации фагового генома. На поздней стадии экспрессируются гены, кодирующие белки фаговой частицы, упаковки ДНК и лизиса клеток. Для эффективного развития фаговой инфекции необходима точная регуляция перехода с одной стадии на другую, что обеспечивается за счет скоординированной во времени транскрипции генов разных классов. Транскрипция осуществляется ДНК-зависимой РНК-полимеразой (РНКП). Все известные фаги (за исключением фага PBS2 [2, 3]) хотя бы на одной из стадий инфекции используют для транскрипции своего генома РНКП клетки-хозяина. Некоторые бактериофаги кодируют свои собственные РНКП. Известны два класса РНКП: односубъединичные (осРНКП) и многосубъединичные (мсРНКП). Данные классы отличаются по аминокислотным последовательностям, консервативным мотивам, трехмерной структуре, и эволюционно не родственны друг другу. ОсРНКП найдены в митохондриях и хлоропластах. Также к данному классу относятся практически все ранее изученные РНКП бактериофагов. МсРНКП транскрибируют гены бактерий, архей и эукариот и состоят из нескольких (от 5 до 14) субъединиц. Простейшей мсРНКП является РНКП бактерий, включающая каталитически активный блок (кор), состоящий из пяти субъединиц (β' , β , α димера и ω), и σ фактора, определяющего промоторную специфичность. Каталитический центр мсРНКП образуется двумя “double-psi beta-barrel” (DPBB) доменами, располагающимися на β/β' -подобных субъединицах [4, 5]. Один из DPBB доменов содержит универсальный мотив с тремя остатками аспарагиновой кислоты, принимающими непосредственное участие в координации двух ионов Mg^{2+} необходимых для катализа [6, 7]. Для мсРНКП данный мотив представлен консервативной последовательностью NADFDGD, которая находится на β' -подобных субъединицах.

Недавно, с помощью методов биоинформатики в некоторых организмах и фагах были предсказаны необычные мсРНКП, для которых характерна крайне ограниченная область

гомологии с известными мсРНКП в районе активного центра [8]. В геномах гигантских ϕ KZ-подобных бактериофагов было найдено 6 генов, кодирующих белки гомологичные фрагментам каталитических (β и β') субъединиц бактериальных РНКП. Данные β/β' -подобные белки, предположительно, соответствуют субъединицам двух фаговых мсРНКП [9]. При этом в геномах гигантских ϕ KZ-подобных фагов не было обнаружено гомологов α субъединицы, ответственной за сборку полимеразы, или фактора промоторной специфичности σ . Вероятно, произошедя от бактериальных полимераз, РНКП ϕ KZ-подобных фагов в ходе своей эволюции сохранили в основном только те структуры, которые абсолютно необходимы для катализа ДНК-зависимого синтеза РНК.

Задачей данной работы является изучение функциональной активности одной из двух мсРНКП бактериофага ϕ KZ и ее роли в транскрипции фагового генома. Результаты этих исследований внесут существенный вклад в понимание механизмов транскрипции и будут востребованы в работах по исследованию эволюции класса мсРНКП в целом.

Цели и задачи

Целью настоящей работы было изучить функциональную активность и биохимические свойства многосубъединичной РНКП бактериофага ϕ KZ, и определить ее роль в транскрипции генома фага.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Изучить временную регуляцию экспрессии генов фага ϕ KZ: определить временные классы генов и нуклеотидные мотивы, ассоциированные с промоторами всех временных классов.
2. Исследовать зависимость транскрипции генов фага ϕ KZ разных временных классов от транскрипционного и трансляционного аппарата клетки-хозяина.
3. Разработать схему очистки до гомогенности РНКП бактериофага ϕ KZ.
4. Охарактеризовать функциональную активность и промоторную специфичность фаговой РНКП.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость

Научная новизна данной работы и теоретическая значимость.

Впервые исследована транскрипция группы гигантских бактериофагов, кодирующих два набора генов гомологичных каталитическим субъединицам мсРНКП. На примере бактериофага ϕ KZ показано, что в отличие от подавляющего большинства ранее известных бактериофагов транскрипция генома ϕ KZ не зависит от РНКП клетки-хозяина и осуществляется исключительно собственными уникальными мсРНКП [10]. Впервые выделена одна из мсРНКП

бактериофага ϕ KZ, и частично охарактеризована ее функциональную активность и взаимодействие с промотором [11]. Изучение транскрипционной активности фаговой мсРНКП и сравнительный анализ с известными полимеразами бактерий и эукариот позволит расширить наши знания о том, как возникли и эволюционировали эти ферменты.

Практическая значимость данной работы.

Представители группы гигантских бактериофагов, кодирующих мсРНКП, инфицируют широкий спектр бактерий, в том числе и клинически важные патогены *Pseudomonas*, *Yersinia* и *Salmonella*, которые часто представлены антибиотико-устойчивыми штаммами [12]. В связи с этим, ϕ KZ и родственные ему фаги рассматриваются как возможные компоненты фаговых коктейлей для лечения инфекций, вызванных этими бактериями [13-15], а также как перспективный источник фаговых белков-ингибиторов специфически влияющих на бактерий-хозяев [16, 17]. Полученные в диссертационной работе данные о регуляции экспрессии генов этих фагов позволят разработать новые антимикробные препараты, используя знания об особенностях развития инфекций бактерий ϕ KZ-родственными фагами.

Методология и методы работы

Работа выполнена на современном оборудовании с использованием методов молекулярной биологии, микробиологии, биохимии и биоинформатики.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В геноме фага ϕ KZ идентифицированы гены трех временных классов: ранние, средние и поздние. Определены нуклеотидные мотивы, ассоциированные с промоторами всех классов генов.
2. РНКП клетки-хозяина не участвует в развитии инфекции клеток фагом ϕ KZ. Транскрипция всех фаговых генов осуществляется двумя фаговыми РНКП.
3. Невирионный набор белков фага ϕ KZ образует нвРНКП. В состав нвРНКП также входит пятая субъединица, функция которой не известна.
4. НвРНКП *in vitro* осуществляет специфическую транскрипцию с поздних промоторов фага ϕ KZ и является устойчивой к воздействию рифампицина.
5. Для транскрипции поздних промоторов абсолютно необходимы все четыре нуклеотида мотива поздних промоторов, а также последовательность после точки старта транскрипции.

Публикации и апробация работы

Работа прошла апробацию на межлабораторных семинарах в НИК «Нанобиотехнологии» Санкт-Петербургского политехнического университета имени Петра Великого и Институте цитологии РАН. Результаты работы были представлены на пяти научных конференциях и опубликованы в трех статьях в рецензируемых научных журналах (см. перечень работ в разделе «Список работ, опубликованных по теме диссертации»).

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, а также результатов и выводов, приложения, благодарностей и списка литературы. Работа изложена на 85 страницах машинописного текста, включая 28 рисунков, 3 таблицы и 1 приложение. Список цитируемых литературных источников включает 124 наименования.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В геномах 14 гигантских фагов, в том числе и в геноме бактериофага ϕ KZ, были обнаружены 8 генов, кодирующих белки гомологичные фрагментам каталитических (β и β') субъединиц бактериальных РНКП [10]. Данная группа фагов была обозначена как ϕ KZ-родственные бактериофаги. Она включает в себя как ранее описанные ϕ KZ-подобные фаги, инфицирующие бактерии рода *Pseudomonas*, так и бактериофаги, инфицирующие другие бактерии, вероятно, произошедшие от общего предка с группой ϕ KZ-подобных. Половина из предсказанных β/β' гомологов было обнаружено среди белков вирионов у всех фагов, для которых был ранее определен состав фаговых частиц [18-21]. На основании предположения, что гомологи вирионных β/β' -белков из других фагов также располагаются в вирионах, все РНКП-подобные фаговые белки были разделены на вирионный и невирионный наборы. Каждый набор состоит из двух гомологов N- и C-фрагментов β - и β' -субъединиц бактериальных РНКП (рисунок 1). Оба гомолога N-концевого фрагмента β' -субъединицы содержат в своей аминокислотной последовательности Mg^{2+} -связывающий мотив DxGDG, абсолютно необходимый для катализа во всех мсРНКП. Вероятно, каждый из двух белковых наборов соответствуют субъединицам двух независимых мсРНКП, участвующих в транскрипции фаговых геномов.

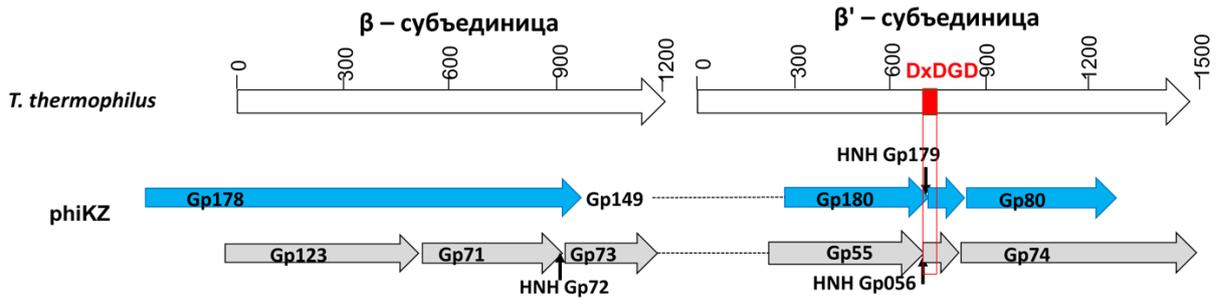


Рисунок 1. β/β' – подобные субъединицы, закодированные в геноме бактериофага phiKZ. Субъединицы бактериальных РНКП представлены в масштабе, в соответствии с размерами каталитических субъединиц *T. thermophilus*. Синим цветом обозначены фаговые белки, найденные в составе вирионов. Серым цветом обозначены белки невирионного набора. Красным прямоугольником отмечено положение Mg^{2+} -связывающего мотива. Вертикальными стрелками отмечена локализация предполагаемых интронов между кодирующими последовательностями открытых рамок считывания. HNH-эндонуклеазы, кодируемые интронами, указаны рядом со стрелками.

Для экспериментального исследования свойств мсРНКП phiKZ-родственных фагов был выбран бактериофаг phiKZ, инфицирующий *P. aeruginosa*. С целью изучения развития инфекции клеток *P. aeruginosa* бактериофагом phiKZ, были проведены эксперименты по секвенированию суммарной РНК (RNAseq), полученной из инфицированных фагом phiKZ клеток на разных минутах инфекции [10]. Анализ результатов RNA-seq показал, что гены бактериофага phiKZ разделяются на три классических временных класса: ранний, средний и поздний. Основываясь на данных RNAseq и результатов экспериментов, проведенных с помощью метода реакции удлинения праймера (РУП), были определены нуклеотидные мотивы, ассоциированные с фаговыми промоторами всех трех классов генов (рисунок 2).

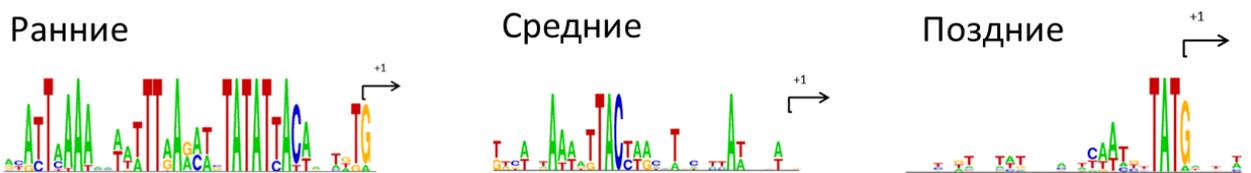


Рисунок 2. Нуклеотидные мотивы, ассоциированные с промоторами всех временных классов бактериофага phiKZ. Точка старта транскрипции, определенная методом РУП, обозначается +1. Высота каждой буквы соответствует степени ее консервативности.

Известно, что все изученные ранее бактериофаги для транскрипции своей ДНК используют РНКП клетки-хозяина на каком-либо этапе инфекции. Однако, в ходе изучения бактериофага ϕ KZ оказалось, что: а) мотивы всех его предполагаемых промоторов не похожи на основные σ^{70} бактериальные промоторы и б) фаг ϕ KZ, по-видимому, кодирует две собственные РНКП, что снижает вероятность использования фагом клеточной РНКП. Для ответа на вопрос, участвует ли бактериальная РНКП в транскрипции генов данного бактериофага, были проведены эксперименты с использованием антибиотика рифампицина, ингибирующего бактериальную РНКП. Показано, что добавление рифампицина к культуре клеток до начала инфекции никак не сказывается на размножении и формировании активных частиц бактериофага ϕ KZ (рисунок 3). В качестве контроля в данном эксперименте был использован фаг ϕ KMV, который также инфицирует *P. aeruginosa*, но в отличие от ϕ KZ нуждается в РНКП клетки-хозяина для транскрипции ранних генов [22, 23]. Как видно из рисунка 3 развитие инфекции клеток контрольным фагом не происходило при добавлении рифампицина до начала инфекции.

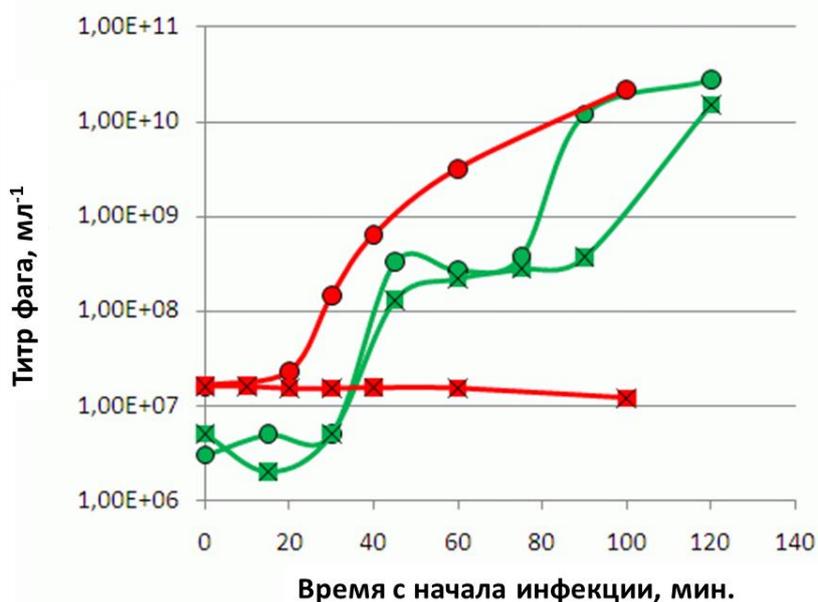


Рисунок 3. График изменения титра фагов в культуре клеток *P. aeruginosa*, инфицированных бактериофагами ϕ KZ (зеленые линии) и ϕ KMV (красные линии) в присутствии рифампицина (⊠) и без него (○).

С помощью метода РУП также было показано, что добавление рифампицина не влияет на формирование всех трех классов транскриптов фага ϕ iKZ. Полученные результаты указывают, что бактериальная РНКП не требуется для развития инфекции клетки-хозяина бактериофагом ϕ iKZ. Вероятно, все гены бактериофага ϕ iKZ транскрибируются двумя собственными рифампицин-устойчивыми РНКП. По-видимому, вирионный набор белков входит в состав одной из двух фаговых РНКП (вирионной РНКП/ вРНКП), которая попадает внутрь клетки вместе с ДНК фага в виде готового белкового комплекса. Невирионная РНКП (нвРНКП), включающая невирионный набор белков, в свою очередь, состоит из субъединиц, синтезируемых в клетке в ходе инфекции.

Чтобы определить классы генов, за транскрипцию которых отвечает предполагаемая вРНКП, была исследована зависимость образования транскриптов разных временных классов от синтеза новых фаговых белков в процессе инфекции (рисунок 4). Для этого на разных минутах инфекции к бактериальным клеткам был добавлен антибиотик хлорамфеникол, блокирующий трансляцию мРНК на бактериальных рибосомах. Контрольный опыт проводился без добавления хлорамфеникола. Также к культурам клеток до добавления фага был добавлен рифампицин, чтобы исключить транскрипцию бактериальных генов. Суммарная РНК, выделенная из инфицированных клеток, собранных на 2-ой, 5-ой, 10-ой, 15-ой, 20-ой и 30-ой минутах инфекции, была использована для анализа методом РУП фаговых транскриптов с промоторов разных классов: ранних - P54E и P53E, средних - P50M и поздних - P29L.

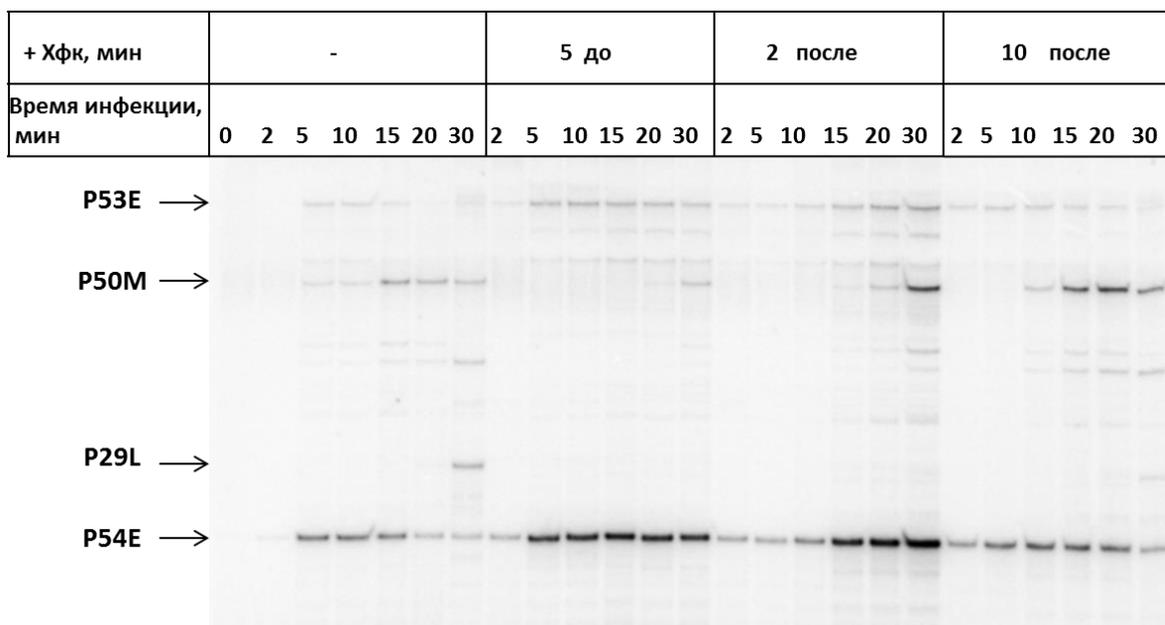


Рисунок 4. Результаты анализа влияния ингибирования белкового синтеза с помощью хлорамфеникола (Хфк) на транскрипцию фаговых генов разных временных

классов. Стрелками отмечены продукты РУП, соответствующие транскриптам с ранних промоторов P53E и P54E, среднего промотора P50M и позднего промотора P29L. Хфк (-) - контрольный опыт без добавления хлорамфеникола, Хфк (5 до) - опыт с добавлением хлорамфеникола к клеточной культуре за 5 минут до начала инфекции, Хфк (2 после) – через 2 минуты после начала инфекции, Хфк (10 после) – через 10 минут после начала инфекции.

Как видно из электрофореграммы, приведенной на рисунке 4, добавление хлорамфеникола не влияет на образование ранних фаговых транскриптов (P53E и P54E). Следовательно, для ранней транскрипции не требуется синтеза новых фаговых белков. В то же время для образования средних (P50M) и поздних (P29L) транскриптов необходимо участие белков, синтезируемых в процессе инфекции. Полученные данные позволяют предположить, что вРНКП попадает в клетку вместе с ДНК фага и транскрибирует ранние гены, в то время как нвРНКП транскрибирует средние и /или поздние гены фага.

С целью изучения нвРНКП был разработан метод выделения препарата этого белкового комплекса из инфицированных клеток и его очистки до гомогенности. Метод включает фракционирование осветленного лизата клеток с помощью полиэтиленимина (PEI), и последующих стадий аффинной и ионо-обменной хроматографии на гепарин-сефарозе и DEAE-сефарозе соответственно, высокоэффективной гель-фильтрации на Superdex 200 и завершающей ионо-обменной хроматографии на моноQ (рисунок 5 А). На каждом этапе очистки фракции анализировались с помощью белкового электрофореза в денатурирующих условиях с последующей масс-спектрометрической идентификацией белков. Критерием отбора фракций было наличие в них предполагаемых субъединиц нвРНКП Gr55 и Gr74. Масс-спектрометрический анализ препарата, полученного на последней стадии очистки (рисунок 4 А), показал, что кроме ранее предсказанных белков Gr55, Gr71-73, Gr74 и Gr123, в образце содержится белок Gr68, который не имеет гомологов в существующих базах данных, за исключением других ϕ KZ-родственных бактериофагов. Полученный белковый препарат образует одну зону при разделении в полиакриламидном геле при нативных условиях (рисунок 5 Б), что подтверждает наличие стабильного комплекса. Последующее разделение соответствующей зоны с помощью денатурирующего SDS-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) показало, что в состав этого комплекса входят все 5 белков: четыре субъединицы гомологичные большим субъединицам бактериальной РНКП и субъединица Gr68 с неизвестной функцией.

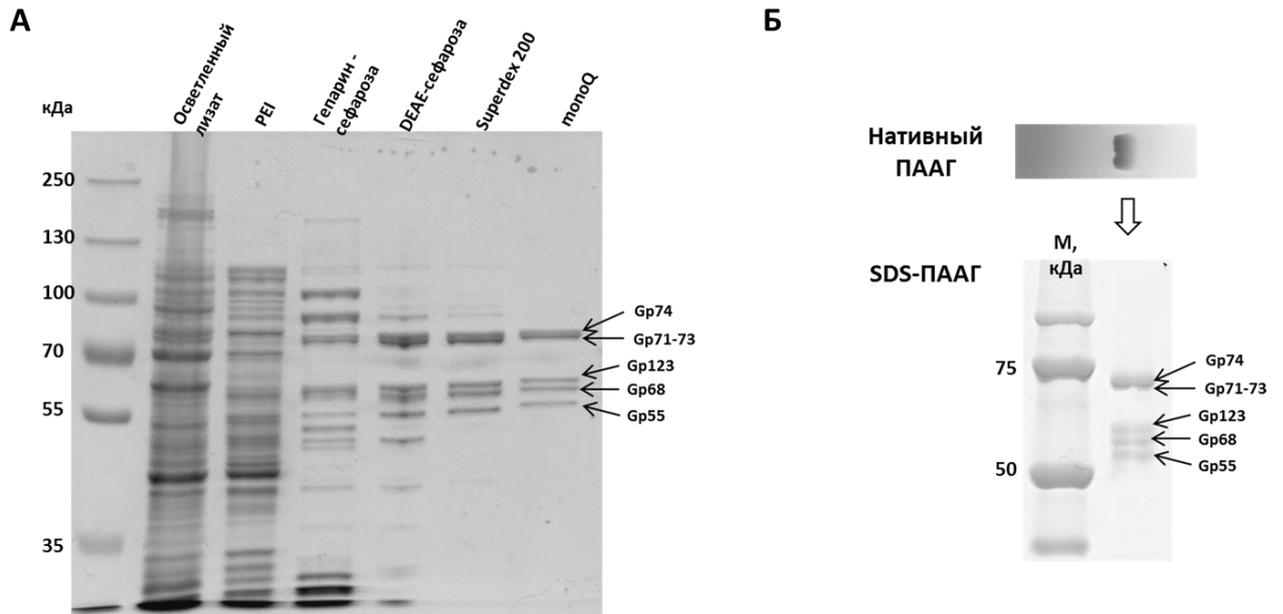


Рисунок 5. Анализ фракций при очистке нвРНКП из инфицированных ϕ iKZ клеток *P. aeruginosa*. А. Результаты денатурирующего SDS-электрофореза белковых фракций. Дорожки на геле обозначены в соответствии со стадиями процедуры очистки. Б. Результаты анализа полученного белкового комплекса с помощью электрофореза в нативном ПААГ и последующего электрофоретического разделения белковой зоны (указанной стрелкой) в денатурирующем SDS-ПААГ.

Для определения функциональной активности выделенного нами препарата нвРНКП фага и его специфичности к фаговым промоторам, он был протестирован на способность синтезировать РНК *in vitro*. В качестве ДНК матриц были использованы фрагменты ДНК, содержащие промоторы всех временных классов фага. Показано, что нвРНКП синтезирует РНК только с матриц, содержащих поздние промоторы фага ϕ iKZ (рисунок 6 А). Кроме того, в экспериментах по транскрипции *in vitro* было подтверждено ранее высказанное предположение, что нвРНКП устойчива к воздействию рифампицина в отличие от РНКП клетки-хозяина (рисунок 6 Б).

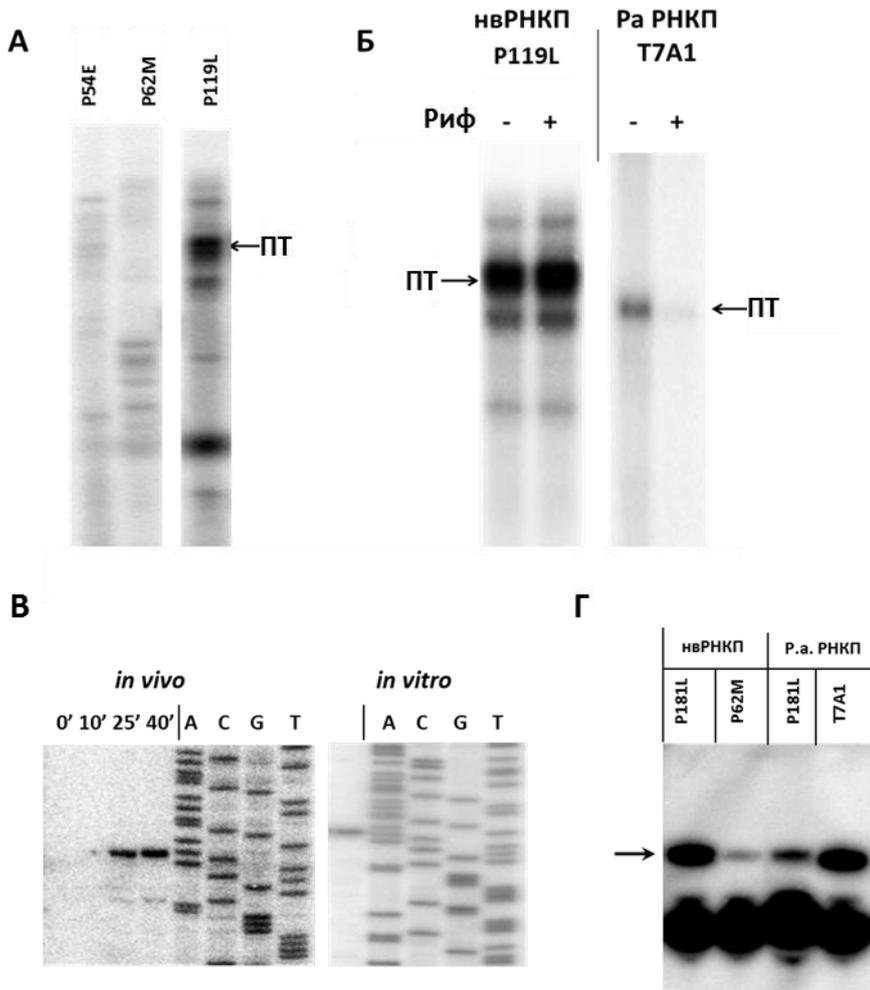


Рисунок 6. Анализ транскрипционной активности нвРНКП *in vitro*. **А.** Электрофореграмма РНК-продуктов *in vitro* транскрипции на промоторах *phiKZ* разных классов: P54E – ранний, P62M – средний и P119L – поздний промоторы. **Б.** Влияния рифампицина (Риф) на нвРНКП и клеточной РНКП бактерии *P. aeruginosa* (Pa РНКП). T7A1 – модельный бактериальный промотор содержащий консенсусные участки -10/-35. Обозначение «ПТ» в **А** и **Б** соответствует положению полноразмерного транскрипта. **В.** Результаты анализа *in vivo* и *in vitro* РУП для позднего промотора P119L. **Г.** Результаты abortивной транскрипции на ДНК-матрицах, содержащих средние (P62M) и поздние (P181L) фаговые промоторы, а также модельный бактериальный промотор (T7A1), с нвРНКП и бактериальной РНК полимеразой (Pa РНКП). Стрелкой обозначен синтезируемый тринуклеотид: для P181L – UpGrA, для P62M – UpGrU, для T7A1 – CpApU.

Для подтверждения того, что нвРНКП *in vitro* транскрибирует поздние промоторы с той же специфичностью что и *in vivo* в отсутствие дополнительных фаговых и/или хозяйских белков, были проведены эксперименты РУП с РНК, полученной в ходе транскрипции нвРНКП

на матрицах ДНК с поздними промоторами *phiKZ* (рисунок 6 В). С помощью этой методики были протестированы транскрипты с 10 поздних промоторов, для которых ранее уже были определены точки старта транскрипции РНК в зараженных клетках (*in vivo*). Все определенные *in vitro* точки старта совпадали с точками старта, определенными *in vivo*. Для независимого подтверждения специфичности узнавания нвРНКП поздних промоторов были проведены эксперименты по abortивной транскрипции нвРНКП ПЦР-фрагментов, содержащих поздний промотор P181L и средний промотор P62M бактериофага *phiKZ* (рисунок 6 Г). Анализ коротких РНК продуктов (тринуклеотидов) позволяет оценить способность РНКП специфически инициировать транскрипцию с определенной последовательности ДНК независимо от эффективности перехода в стадию элонгации. В качестве контроля проводили реакцию abortивной транскрипции бактериальной РНКП на бактериальном промоторе T7A1 и позднем фаговом промоторе P181L. Как видно из рисунка 5 Г, нвРНКП инициирует транскрипцию только с позднего промотора.

Консенсусная последовательность мотива поздних промоторов включает только 4 нуклеотида $^{-3}\text{TATG}^{+1}$, где +1 соответствует точке начала транскрипции (рисунок 2). Значение данной последовательности для транскрипции с поздних промоторов было исследовано в реакции транскрипции *in vitro* с мутантных поздних промоторов (рисунок 6 А). Показано, что каждый из четырех нуклеотидов в последовательности мотива необходим для эффективного узнавания промотора нвРНКП.

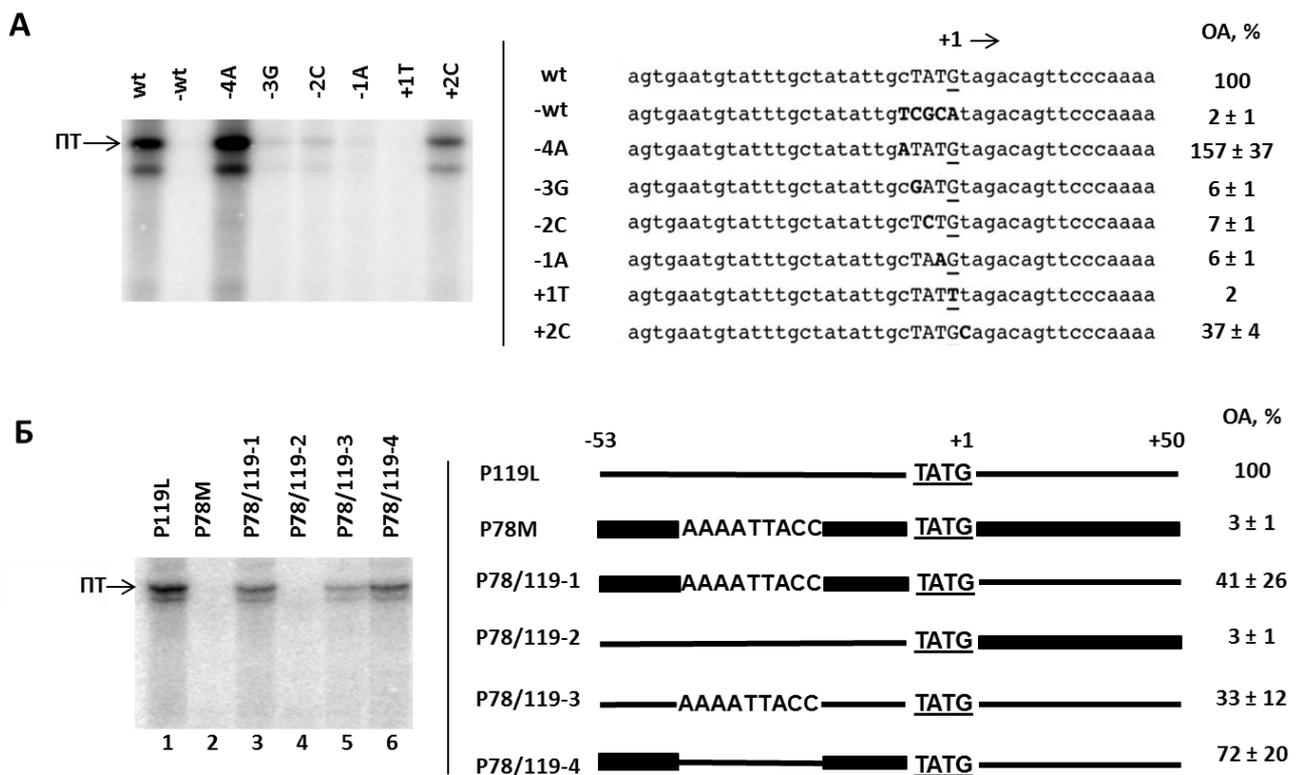


Рисунок 7. Анализ элементов поздних промоторов бактериофага phiKZ, необходимых для транскрипции нвРНКП. А. Результаты мутационного анализа позднего промотора P119L. На электрофореграмме (левая панель) показан результат разделения продуктов транскрипции с различных вариантов ДНК матриц (правая панель). «wt» - нативная последовательность, «-wt» - ДНК-матрица с полностью измененным консенсусом. Б. Результаты анализа гибридных промоторов. На электрофореграмме (левая панель) показан результат разделения продуктов транскрипции с промоторов P119L, P78M и их гибридных вариантов (правая панель). Тонкие линии соответствуют последовательностям позднего промотора, утолщенные – среднего промотора. ПТ соответствует положению полноразмерного транскрипта. ОА – относительная активность.

Однако, наличие консенсусной последовательности ($^{-3}\text{TATG}^{+1}$) не является достаточным условием для обеспечения специфического узнавания поздних промоторов нвРНКП в геноме phiKZ. В нескольких промоторах средних генов рядом с точкой старта также находится последовательность 5'-TATG, но в условиях транскрипции *in vitro* нвРНКП не синтезирует РНК с подобных матриц. Для исследования возможного вклада последовательностей ДНК, находящихся вблизи консенсуса $^{-3}\text{TATG}^{+1}$, в узнавание поздних промоторов нвРНКП были созданы гибридные промоторы на основе позднего (P119L) и среднего (P78M) промотора. Результаты анализа транскрипции с гибридных промоторов *in vitro* приведены на рисунке 7 Б. Показано, что последовательность ДНК после точки старта транскрипции (инициаторная последовательность, +2 - +50) поздних промоторов, также как и консенсус, необходима для эффективной транскрипции нвРНКП. Последовательность перед мотивом позднего промотора не играет значительной роли, но увеличивает эффективность транскрипции с поздних промоторов. По всей видимости, в инициации транскрипции на поздних промоторах важны не только специфические ДНК-белковые взаимодействия с промоторным консенсусом, но и общая структура ДНК в области промотора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. В геноме фага phiKZ идентифицированы гены трех временных классов: ранние, средние и поздние. Определены нуклеотидные мотивы, ассоциированные с промоторами всех классов генов.
2. Показано, что РНКП клетки-хозяина не участвует в развитии инфекции клеток фагом phiKZ. Вероятно, транскрипция всех фаговых генов осуществляется двумя фаговыми РНКП.

3. Была разработана схема очистки до гомогенности нвРНКП бактериофага phiKZ. Показано, что нвРНКП состоит из четырех субъединиц гомологичных каталитическим субъединицам бактериальной РНКП и пятой субъединицы с неизвестной функцией.

4. Показано, что нвРНКП *in vitro* осуществляет специфическую транскрипцию с поздних промоторов фага phiKZ и является устойчивой к воздействию рифампицина.

5. Показано, что для транскрипции поздних промоторов абсолютно необходимы все четыре нуклеотида мотива поздних промоторов, а также область после точки старта транскрипции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в научных журналах:

1. Якунина М.В., Воронцова Д.Н., Минахин Л.С. Неканонические РНК-полимеразы гигантских бактериофагов типа phiKZ // Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. – 2013. - №1(165) - С.120-126

2. Ceysens P.J., Minakhin L., Van den Bossche A., Yakunina M., Klimuk E., Blasdel B., De Smet J., Noben J.P., Bläsi U., Severinov K., Lavigne R. Development of giant bacteriophage phiKZ is independent of the host transcription apparatus // Journal of Virology – 2014. – Vol. 88. – P. 10501-10510.

3. Yakunina M, Artamonova T, Borukhov S, Kira S. Makarova, Severinov K, Minakhin, L. A non-canonical multisubunit RNA polymerase encoded by a giant bacteriophage // Nucleic Acids Research. - 2015. - Vol. 43. – P. 10411-10420.

Материалы конференций:

1. Якунина М.В., Воронцова Д.Н., Ходорковский М.А. Развитие инфекции патогенной бактерии *Pseudomonas aeruginosa* бактериофагом phiKZ // Сборник материалов III Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ – ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО». – 2013. - С. 139-140.

2. Воронцова Д.Н., Якунина М.В., Ходорковский М.А. Предполагаемая вирионная РНК-полимераза бактериофага phiKZ // Студенты и молодые ученые – инновационной России: материалы работ молодежной научной конференции. – 2013.- С. 134.

3. Yakunina M., Vorontsova D., Artamonova T., Khodorkovskiy M., Severinov K., Minakhin L. Two non-canonical RNA polymerases encoded by phiKZ-like giant phages // FEBS Journal – 2013 – Vol. 280 (Suppl. 1). –P. 101.

4. Maria Yakunina, Leonid Minakhin, Tatyana Artamonova, Maria Sokolova, Mikhail Khodorkovskiy, Konstantin Severinov Unusual multisubunit RNA polymerases encoded by the PhiKZ phage // Total Transcription – 2014, 1-5 September, Cambridge, UK, Poster Abstracts, P. 46

5. Maria Yakunina, Leonid Minakhin, Tatyana Artamonova, Maria Sokolova, Mikhail Khodorkovskiy, Konstantin Severinov. Non-canonical multisubunit RNA polymerases encoded by the phiKZ phage // Наука будущего: материалы конференции - 2014.

БЛАГОДАРНОСТИ

Прежде всего выражаю благодарность своему научному руководителю Константину Викторовичу Северинову за возможность работы над интересным проектом, ценные критические замечания и широкие возможности для саморазвития. Хочу также поблагодарить директора НИК «Нанобиотехнологии» Михаила Алексеевича Ходорковского за обеспечения наилучших условий для работы в лаборатории, ценные советы и моральную поддержку; Минахина Леонида Станиславовича и Борухова Сергея Ивановича за помощь в освоении методов, планировании экспериментов и интерпретации полученных результатов; Артамонову Татьяну Олеговну за помощь в проведении масс-спектрометрических исследований; Климука Евгения Ивановича, Лавыш Дарью Геннадиевну, Соколову Марию Леонидовну, Сабанцева Антона Владимировича – за ценные замечания при обсуждении результатов. Также благодарю весь коллектив Лаборатории молекулярной микробиологии и НИК «Нанобиотехнологии» СПбПУ за их поддержку моей работы.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение номер No 14.B37.21.0846 и договор No14.B25.31.0004).

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hendrix R.W. Bacteriophages: evolution of the majority // *Theor Popul Biol.* - 2002. - Vol. 61. - P. 471-480.
2. Price A.R., Frabotta M. Resistance of bacteriophage PBS2 infection to rifampicin, an inhibitor of *Bacillus subtilis* RNA synthesis // *Biochem Biophys Res Commun.* - 1972. - Vol. 48. - P. 1578-1585.
3. Price A.R., Hitzeman R., Frato J., Lombardi K. Rifampicin-resistant bacteriophage PBS2 infection and RNA polymerase in *Bacillus subtilis* // *Nucleic Acids Res.* - 1974. - Vol. 1. - P. 1497-1502.
4. Lane W.J., Darst S.A. Molecular evolution of multisubunit RNA polymerases: sequence analysis // *J Mol Biol.* - 2010. - Vol. 395. - P. 671-685.
5. Iyer L.M., Koonin E.V., Aravind L. Evolutionary connection between the catalytic subunits of DNA-dependent RNA polymerases and eukaryotic RNA-dependent RNA polymerases and the origin of RNA polymerases // *BMC Struct Biol.* - 2003. - Vol. 3. - P. 1.
6. Sosunov V., Zorov S., Sosunova E., Nikolaev A., Zakeyeva I., Bass I., Goldfarb A., Nikiforov V., Severinov K., Mustaev A. The involvement of the aspartate triad of the active center in all catalytic activities of multisubunit RNA polymerase // *Nucleic Acids Res.* - 2005. - Vol. 33. - P. 4202-4211.
7. Vassylyev D.G., Vassylyeva M.N., Perederina A., Tahirov T.H., Artsimovitch I. Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase // *Nature.* - 2007. - Vol. 448. - P. 157-162.
8. Ruprich-Robert G., Thuriaux P. Non-canonical DNA transcription enzymes and the conservation of two-barrel RNA polymerases // *Nucleic Acids Res.* - 2010. - Vol. 38. - P. 4559-4569.
9. Mesyanzhinov V.V., Robben J., Grymonprez B., Kostyuchenko V.A., Bourkaltseva M.V., Sykilinda N.N., Krylov V.N., Volckaert G. The genome of bacteriophage phiKZ of *Pseudomonas aeruginosa* // *J Mol Biol.* - 2002. - Vol. 317. - P. 1-19.
10. Ceysens P.J., Minakhin L., Van den Bossche A., Yakunina M., Klimuk E., Blasdel B., De Smet J., Noben J.P., Blasi U., Severinov K., Lavigne R. Development of giant bacteriophage varphiKZ is independent of the host transcription apparatus // *J Virol.* - 2014. - Vol. 88. - P. 10501-10510.
11. Yakunina M., Artamonova T., Borukhov S., Makarova K.S., Severinov K., Minakhin L. A non-canonical multisubunit RNA polymerase encoded by a giant bacteriophage // *Nucleic Acids Res.* - 2015. - Vol. 43. - P. 10411-10420.
12. Nathwani D., Raman G., Sulham K., Gavaghan M., Menon V. Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis // *Antimicrob Resist Infect Control.* - 2014. - Vol. 3. - P. 32.
13. Golshahi L., Lynch K.H., Dennis J.J., Finlay W.H. In vitro lung delivery of bacteriophages KS4-M and PhiKZ using dry powder inhalers for treatment of *Burkholderia cepacia* complex and *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis // *J Appl Microbiol.* - 2011. - Vol. 110. - P. 106-117.
14. Henry M., Lavigne R., Debarbieux L. Predicting in vivo efficacy of therapeutic bacteriophages used to treat pulmonary infections // *Antimicrob Agents Chemother.* - 2013. - Vol. 57. - P. 5961-5968.
15. Matinkhoo S., Lynch K.H., Dennis J.J., Finlay W.H., Vehring R. Spray-dried respirable powders containing bacteriophages for the treatment of pulmonary infections // *J Pharm Sci.* - 2011. - Vol. 100. - P. 5197-5205.
16. Briers Y., Volckaert G., Cornelissen A., Lagaert S., Michiels C.W., Hertveldt K., Lavigne R. Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages phiKZ and EL // *Mol Microbiol.* - 2007. - Vol. 65. - P. 1334-1344.
17. Walmagh M., Briers Y., dos Santos S.B., Azeredo J., Lavigne R. Characterization of modular bacteriophage endolysins from Myoviridae phages OBP, 201phi2-1 and PVP-SE1 // *PLoS One.* - 2012. - Vol. 7. - P. e36991.
18. Lecoutere E., Ceysens P.J., Miroshnikov K.A., Mesyanzhinov V.V., Krylov V.N., Noben J.P., Robben J., Hertveldt K., Volckaert G., Lavigne R. Identification and comparative analysis of the structural proteomes of phiKZ and EL, two giant *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages // *Proteomics.* - 2009. - Vol. 9. - P. 3215-3219.

19. Thomas J.A., Weintraub S.T., Wu W., Winkler D.C., Cheng N., Steven A.C., Black L.W. Extensive proteolysis of head and inner body proteins by a morphogenetic protease in the giant *Pseudomonas aeruginosa* phage phiKZ // *Mol Microbiol.* - 2012. - Vol. 84. - P. 324-339.
20. Thomas J.A., Weintraub S.T., Hakala K., Serwer P., Hardies S.C. Proteome of the large *Pseudomonas myovirus* 201 phi 2-1: delineation of proteolytically processed virion proteins // *Mol Cell Proteomics.* - 2010. - Vol. 9. - P. 940-951.
21. Skurnik M., Hyytiainen H.J., Happonen L.J., Kiljunen S., Datta N., Mattinen L., Williamson K., Kristo P., Szeliga M., Kalin-Manttari L., Ahola-Iivarinen E., Kalkkinen N., Butcher S.J. Characterization of the genome, proteome, and structure of yersiniophage varphiR1-37 // *J Virol.* - 2012. - Vol. 86. - P. 12625-12642.
22. Klimuk E., Akulenko N., Makarova K.S., Ceysens P.J., Volchenkov I., Lavigne R., Severinov K. Host RNA polymerase inhibitors encoded by varphiKMV-like phages of *Pseudomonas* // *Virology.* - 2013. - Vol. 436. - P. 67-74.
23. Lavigne R., Burkal'tseva M.V., Robben J., Sykilinda N.N., Kurochkina L.P., Grymonprez B., Jonckx B., Krylov V.N., Mesyanzhinov V.V., Volckaert G. The genome of bacteriophage phiKMV, a T7-like virus infecting *Pseudomonas aeruginosa* // *Virology.* - 2003. - Vol. 312. - P. 49-59.