

Новый конвергентный промотор As3 системы рестрикции-модификации II типа EcoRI играет ключевую роль в регуляции экспрессии гена эндонуклеазы рестрикции

Казанцева О.А., Нагорных М.О., Захарова М.В.

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;
Olesyakazantseva@bk.ru

Исследования полных транскриптомов выявили, что в некоторых видах бактерий антисмысловые транскрипты встречаются у большинства аннотированных генов [Georg J., 2011]. Так, в случае *E. coli* были идентифицированы более 1000 антисмысловых транскриптов [Dornenburg J.E., 2010]. Даже учитывая то, что часть этих транскриптов может быть результатом транскрипционного шума, остальная значительная часть указывает на дополнительный пласт регуляции экспрессии генов [Нао N., 2017]. Существует два общих механизма обоюдного влияния двух направленных друг против друга (конвергентно) транскрипционных единиц: а) через антисмысловые РНК (асРНК), которые могут действовать как *in cis*, так и *in trans*; б) через транскрипционную интерференцию (ТИ) *in cis*. Однако часто эти два механизма могут дополнять друг друга и осуществлять более эффективную регуляцию генов.

Системы рестрикции-модификации (СРМ) широко распространены в царстве прокариот. Классические СРМ состоят из двух генов: гена метилтрансферазы (*met*) и гена эндонуклеазы рестрикции (*res*). Основной функцией СРМ является защита бактериальной клетки от проникновения чужеродной ДНК (например, ДНК бактериофага) и обеспечение, таким образом, стабильности генетического материала бактериального хозяина [Vasu K. 2013]. Для успешного установления СРМ в новой клетке бактериального хозяина необходимо, чтобы экспрессия гена *met* происходила раньше, а ген *res* экспрессировался с задержкой, позволяя ферменту ДНК-метилтрансферазе закончить модификацию ДНК хозяйской клетки, перед накоплением активного фермента эндонуклеазы рестрикции. Именно поэтому СРМ должны иметь очень тонкую и четкую регуляцию экспрессии генов. СРМ имеют огромное разнообразие по структурно-генетическому устройству. Регуляция в них осуществляется также разными способами, в основном на уровне транскрипции: во многих СРМ роль регулятора несет на себе сама метилтрансфераза [Protsenko A. 2009, Zakharova M. 2004]; иногда СРМ содержат дополнительные рамки считывания, кодирующие особый регуляторный белок [Semenova E. 2005]. Однако остается группа СРМ (например, EcoRI, Eco29KI), регуляция которых предположительно осуществляется на транскрипционном и/или пост-транскрипционном уровне, где решающую роль могут играть антисмысловые регуляторные элементы.

Данное исследование посвящено изучению механизмов регуляции экспрессии гена *res* СРМ EcoRI. СРМ EcoRI – это линейная СРМ II типа, которая состоит из 2-ух последовательно и однонаправлено расположенных генов: гена *res* и гена *met*.

Ранее в СРМ EcoRI были обнаружены два перекрывающихся антисмысловых промотора (As1 и As2), расположенные внутри структурной части гена *res* на расстоянии приблизительно 400 нуклеотидов от стартового кодона гена *res* и предположительно связанные с негативной регуляцией этого гена на уровне транскрипции по неустановленному механизму [Liu Y., Kobayashi I. 2007]. С помощью биоинформатического анализа с использованием приложения BPROM (Prediction of bacterial promoters) SoftBerry был детектирован дополнительный антисмысловый промотор, названный As3, располагающийся внутри структурной части гена *res* в 174 нуклеотидах от стартового кодона гена *res*. Методом транскрипции *in vitro* было экспериментально показано наличие дополнительной +1 точки в антисмысловом направлении на расстоянии

примерно 168 нуклеотидов от стартового кодона гена *res*, что подтверждает наличие биоинформатически предсказанного промотора, с которым могла связываться РНК-полимераза и осуществлять транскрипцию в условиях реакции *in vitro*. Для определения точной позиции стартовой точки транскрипции с промотора As3 использовали 5'-RACE метод. Анализ результатов 5'-RACE по определению 5'-концов РНК-транскриптов, синтезируемых с антисмыслового промотора As3 в условиях *in vivo* выявил наличие +1 на расстоянии 170 нуклеотидов от стартового кодона гена *res*, что подтверждает полученные ранее данные биоинформатического анализа и метода транскрипции *in vitro* для промотора As3. Дальнейшее клонирование антисенс-промоторного региона As3 в вектор, содержащий беспромоторный репортерный ген *galk* и выращивание штамма *E. coli* HB101, содержащего полученную конструкцию, на селективной среде МакКонки приводило к окрашиванию колоний, что указывает на эффективную транскрипцию с As3 промотора в условиях *in vivo*. Кроме того, для исследования транскрипционной активности антисенс-промотора As3 была создана конструкция As3:*galk* с мутацией в -10 области промотора inAs3:*galk* (TTATACT->ACTGCAG). Присутствие мутации приводило к потере окрашивания колоний на селективной среде МакКонки по сравнению с клетками *E. coli* HB101, содержащих конструкции As3:*galk* с нативным промотором, что согласуется с ранее полученными данными относительно наличия и локализации антисенс-промотора As3 в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. При сравнительном анализе относительного уровня транскриптов конструкций As3:*galk* и inAs3:*galk* с помощью метода RT-qPCR выявлено, что введение мутации в -10 область As3 приводит к резкому снижению относительного уровня транскриптов примерно в 30 раз. Таким образом, был обнаружен и охарактеризован с помощью методов *in vitro* и *in vivo* новый антисмысловый промотор, As3 в системе EcoRI.

Следует также отметить, что в системе Eco29KI (структурная организация генов аналогична EcoRI), обнаруженные ранее два перекрывающихся антисмысловых промоторов локализованы также на расстоянии в 200 нуклеотидов от стартового кодона гена *res* [Nagornykh, 2011], что предположительно указывает на схожую регуляцию экспрессии генов *res* в СРМ Eco29KI и EcoRI.

Для подтверждения участия As3 в регуляции экспрессии гена *res* EcoRI была проведена серия клонирований фрагментов ДНК разной длины, содержащих рестриктазный промотор PR в плазмиду с репортерным геном *galk*. Сравнительный анализ колоний штамма *E. coli* HB101, содержащего различные плазмидные конструкции, выявил, что присутствие As3 промотора, влияет на экспрессию репортерного гена *galk* и приводит к полной потере окрашивания колоний на селективной среде МакКонки. При сравнительном анализе относительного уровня транскриптов этих конструкций с помощью метода RT-qPCR выявлено, что присутствие As3 промотора приводит к резкому снижению относительного уровня транскриптов примерно в 6 раз. При чем, стоит отметить, что обнаруженные ранее антисмысловые промоторы As1 и As2 [Liu Y., Kobayashi I. 2007] не оказывают значимого эффекта на транскрипцию с промотора PR как As3.

В результате исследования был экспериментально установлен новый антисмысловый промотор As3 (расположенный в структурной части гена *res*, с +1 точкой на расстоянии 170 н.п. от стартового кодона гена *res*), присутствие As3 значительно снижает транскрипцию с рестриктазного промотора PR, что указывает на его ключевую роль в регуляции экспрессии гена *res* СРМ EcoRI.

Литература

1. Dornenburg J.E., Devita A.M., Palumbo M.J., Wade J.T. Widespread antisense transcription in *Escherichia coli*. // MBio. 2010 May 18;1(1).
2. Georg J., Hess W.R. Cis-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria // Microbiol Mol Biol Rev. 2011 Jun;75(2):286-300. doi: 10.1128/MMBR.00032-10.

3. Hao N., Palmer A.C., Dodd I.B., Shearwin K.E. Directing traffic on DNA-How transcription factors relieve or induce transcriptional interference // *Transcription*. 2017 Mar 15;8(2):120-125. doi: 10.1080/21541264.2017.1285851.
4. Hoffmann S.A., Hao N., Shearwin K.E., Arndt K.M. Characterizing Transcriptional Interference between Converging Genes in Bacteria // *ACS Synth Biol*. 2019 Mar 15;8(3):466-473.
5. Liu Y., Kobayashi I. Negative regulation of the EcoRI restriction enzyme gene is associated with intragenic reverse promoters // *J. Bacteriol.* — 2007. — Vol. 189, № 19. — P. 6928–6935.
6. Protsenko A, Zakharova M, Nagornykh M, Solonin A, Severinov K. Transcription regulation of restriction-modification system Ecl18kI // *Nucleic Acids Res.* — 2009. — V. 37. — P. 5322–5330.
7. Semenova E., Minakhin L., Bogdanova E., Nagornykh M., Vasilov A., Heyduk T., Solonin A., Zakharova M., Severinov K. Transcription regulation of the EcoRV restriction-modification system // *Nucleic Acids Res.* — 2005 — V. 33. —P. 6942–6951.
8. Shearwin K.E., Callen B.P., Egan J.B. Transcriptional interference--a crash course // *Trends Genet*. 2005 Jun;21(6):339-45.
9. Vasu K., Nagaraja V. Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense // *Microbiol Mol Biol Rev.* — 2013. — Vol. 77, № 1. — P. 53–72.
10. Zakharova M., Minakhin L., Solonin A., and Severinov K. Regulation of RNA polymerase promoter selectivity by covalent modification of DNA // *J. Mol. Biol.* — 2004. — Vol. 335. — P. 103–111.