

ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ МОДУЛЯЦИИ ДЕЙСТВИЯ РИБОПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЕЙ У ПРОКАРИОТ

А.С. Миронов, А.Л. Тимковский

Юбилейные рассуждения и фантазии

**Открытие нового механизма регуляции транскрипции генов –
связывание низкомолекулярных эффекторов
с лидерным участком («аптамером») мРНК**

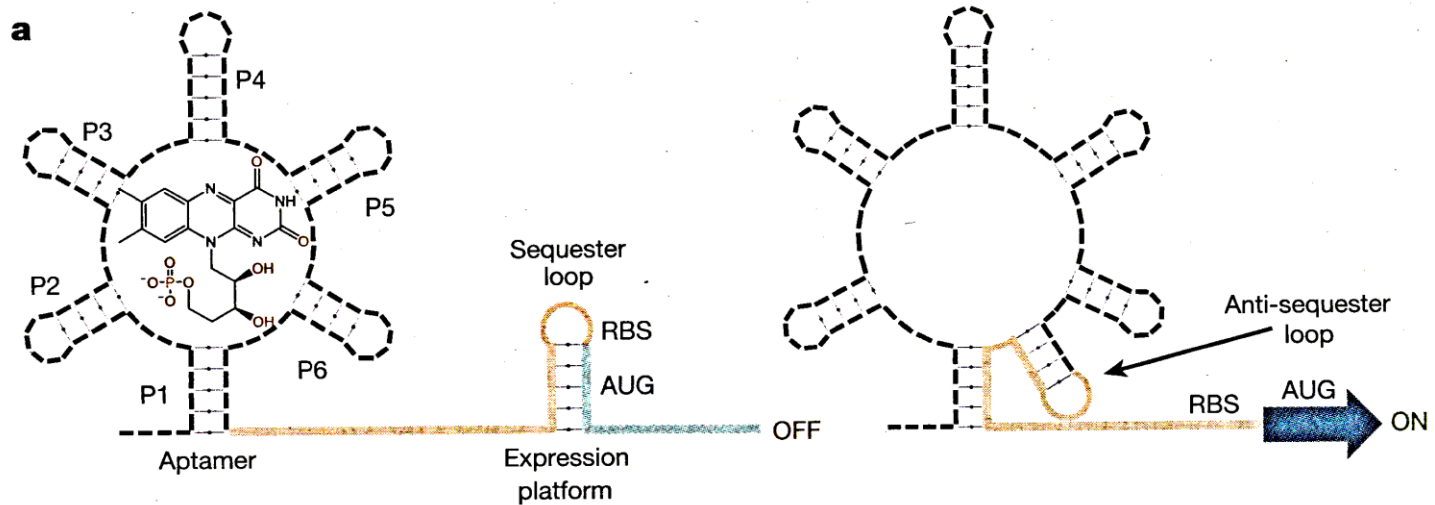
Mironov A.S., Gusarov I., Rafikov R., Errais L.L., Shatalin K., Kreneva R.A.,
Perumov D.A., & Nudler E. (2002) Sensing small molecules by nascent RNA:
a mechanism to control transcription in bacteria // *Cell*, **111**, 747-756

Kil Yu.V., Mironov V.N., Gorishin I., Kreneva R.A., & Perumov D.A. (1992) Riboflavin
operon of *Bacillus subtilis*: unusual symmetric arrangement of the regulatory region
(1992) // *Mol. Gen. Genet.*, **233**, 483-486

Gelfand M.S., Mironov A.A., Jomantas J., Kozlov Y.I. & Perumov D.A. (1999) A conserved
RNA structure element involved in the regulation of bacterial RF synthesis genes (1999)
Trends Genet., **15**, 439-442

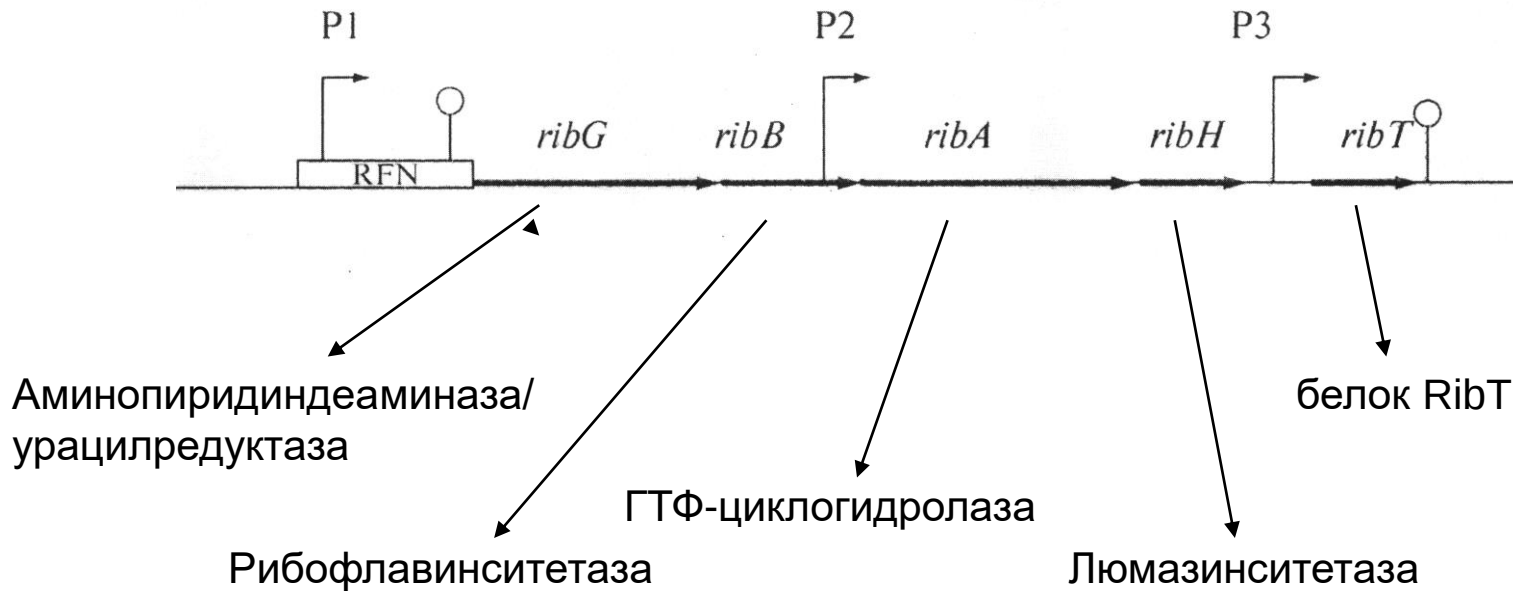
Serganov A. & Nudler E. (2013) A decade of riboswitches // *Cell*, **152**, 17-24

Рибопереклюатель с ФМН-эффектором



Такой тип регуляции характерен не только для *rib*-оперона,
но и для других участков генома *B. subtilis*
(Склярова С.А., Миронов А.С. (2014) Механизм регуляции гена *uraA* *Bacillus subtilis*
с участием ФМН-связывающей сенсорной РНК // Генетика, 50, 1-5),
не говоря уже о других микроорганизмах

rib-оперон *Bacillus subtilis*



Оперон содержит основной промотор P1 и два дополнительных промотора P2 и P3

Относительная функциональная активность этих промоторов различна!

P3 > P1 >> P2

При этом **только экспрессия P1** (но не P2 и P3) **регулируется флавинами**

(Склярова С.А., Кренева Р.А., Перумов Д.А., Миронов А.С. (2012) Характеристика внутренних промоторов оперона биосинтеза рибофлавина у *Bacillus subtilis*

// *Генетика*, **48**, 1-10)

Особенности транскрипции *rib*-оперона

Транскрипция всего оперона идёт под контролем основного промотора P1,
все элементы оперона транскрибируются согласованно
в полицистронную мРНК

(Mironov V.N., Kraev A.S., Chikindas M.L., Chernov B.K., Stepanov A.L., Skryabin K.G.
(1994) Functional organization of the riboflavin biosynthesis operon from *Bacillus subtilis*
// *Mol. Gen. Genet.*, **242**, 201–208)

До сих пор неясна функция гена *ribT* и его продукта RibT
в биосинтезе рибофлавина

Какова логика присутствия этого гена в опероне?

Предполагаемая функция продукта гена *ribT*

- 1) Инактивация гена *ribT* в штаммах-продуцентах снижает выход рибофлавина, но не приводит к ауксотрофии по рибофлавину:

Perkins J.B., Sloma A., Hermann et al. (1999) // *Industr. Microbiol. & Biotechnol.*, **22**, 8–18

- 2) Опубликованы свидетельства того, что с лидерной последовательностью мРНК способны взаимодействовать флавины лишь в окисленной форме:

Serganov A., Huang L., Patel D.J. (2009) Coenzyme recognition and gene regulation by a flavin mononucleotide riboswitch // *Nature*, **458**, 233-237

Д.А. Перумов (предположение):

Белок RibT является ацетил-трансферазой, которая может осуществлять в клетке ацетильное восстановление синтезированных флавинов. Это препятствует взаимодействию флавинов с сенсорной мРНК и способствует продолжению активной транскрипции

Экспрессия гена *ribT*

Якимов А.П., Серегина Т.А., Холодняк А.А., Кренева Р.А., Миронов А.С.,
Перумов Д.А., Тимковский А.Л. (2014) Возможная функция гена *ribT* *Bacillus subtilis*:
теоретическое предсказание, клонирование и экспрессия
// Acta Naturae, 6, 66-69

Последовательность гена *ribT* амплифицировали из хромосомы *B. subt.*, клонировали
в мультикопийный экспрессионный вектор рЕТ15b, содержащий индуцибельный
промотор фага Т7 и проводили экспрессию в *E.coli* BL21(DE3)

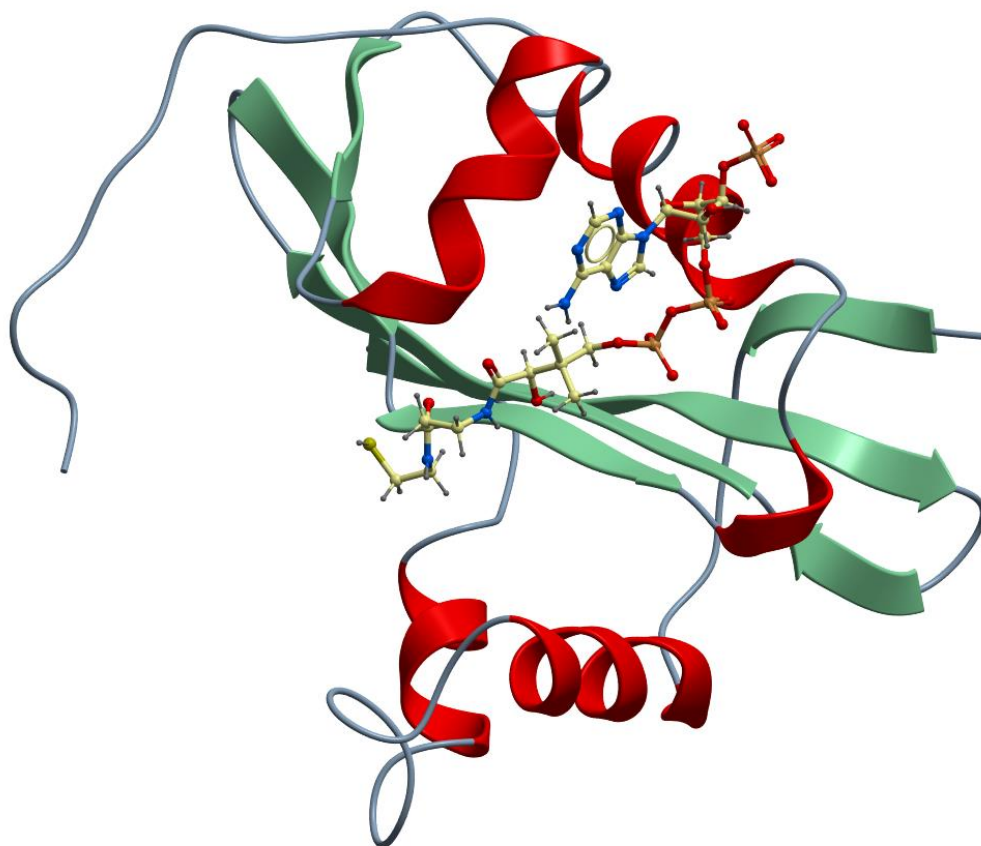
При электрофорезе клеточного лизата обнаружена зона белка с молекулярной массой
около 14,5 кДа, что соответствует расчёту первичной а. к. последовательности на
основании нуклеотидной последовательности структурного гена

Расчётная а. к. последовательность была подвергнута структурному анализу.

Получено предсказание участков, с большой вероятностью образующих элементы
вторичной структуры.

Осуществлён поиск гомологий среди белков, для которых известны структуры в банке
PDB, по гомологии была построена гипотетическая трехмерная структура белка.

Гипотетическая трехмерная структура белка RibT



Основания для оптимизма

- 1) Большинство из белков-гомологов являются ацетил-трансферазами
- 2) В некоторых кристаллических структурах белков-гомологов присутствует ацетил-СоА, поэтому был произведен докинг данного лиганда в нашу гипотетическую структуру:
Ацетил-СоА способен быть донором ацетильных групп для флавинов

Необходимо прямое экспериментальное исследование белка, полученного в препаративных количествах

Наготове: рентгеновская кристаллография, ЯМР-мониторинг продуктов реакции, ...)

Возможные итоги:

Частный: Белок RibT предназначен для поддержания экспрессии *rib*-оперона в клетках *B. subtilis*, но может обладать более широкой функцией коррекции внутриклеточной концентрации флавинов

Более общий:

Это может стать доказательством наличия вспомогательного механизма в регуляции транскрипции рибопереклювателями, обеспечивающего коррекцию внутриклеточной концентрации активных эфффекторов

Благодарю за внимание !