

АННОТИРОВАННЫЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ОТЧЕТ
О РЕЗУЛЬТАТАХ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ РАБОТ, ВЫПОЛНЕННЫХ
НА ЭТАПЕ № 1

«Теоретические исследования и подготовительные работы»

Соглашение № 14.В37.21.0846 от 10.09.2012.

*Тема: «Транскрипционный контроль в ходе инфекции *Pseudomonas aeruginosa* гигантскими фагами типа фKZ»*

Исполнитель: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет» (ФГБОУ ВПО «СПбГПУ»)

Ключевые слова: регуляция транскрипции, неканонические РНК-полимеразы, развитие бактериофагов типа фKZ, временные классы генов, бактериальная ДНК-зависимая РНК-полимераза

1. Цель проекта

1.1. Формулировка задачи / проблемы, на решение которой направлен реализованный проект.

Гигантские бактериофаги типа фKZ представляют собой уникальную и малоизученную группу бактериофагов, являющихся перспективными участниками фаговых коктейлей, направленных на лечение инфекций, вызываемых *P. Aeruginosa*. Однако, как именно фKZ-подобные фаги «переключают» работу зараженной клетки на свои нужды в ходе инфекции, неизвестно. Основной задачей, решаемой в нашей работе, будет обнаружение белков фагов бактериофаги типа фKZ, оказывающих влияние на бактериальную ДНК-зависимую РНК-полимеразу (РНКП), определение механизма их действия и роли в регуляции транскрипции при заражении фагом бактерии-хозяина *P. aeruginosa*.

1.2. Формулировка цели реализованного проекта, места и роли результатов проекта в решении задачи / проблемы, сформулированной в п. 1.1.

Опираясь на то, что одной из главных мишеней для действия фаговых белков-регуляторов в клетке-хозяине на всех стадиях инфекции является бактериальная РНКП, будет изучено развитие инфекции *P. aeruginosa* бактериофагами фKZ-группы. В связи с этим основной целью проекта является изучение механизмов регуляции бактериальной ДНК-зависимой РНК-полимеразы (РНКП) фаговыми белками в ходе развития инфекции патогенной бактерии *P. aeruginosa* бактериофагами типа фKZ.

2. Основные результаты проекта

2.1. Краткое описание основных полученных результатов (основные теоретические и экспериментальные результаты, фактические данные, обнаруженные взаимосвязи и закономерности, характеристикисозданной научной продукции) / Указание основных характеристик созданной научной продукции (при наличии научной продукции).

- Был проведен анализ литературы по тематике заявленного проекта. Была выявлена уникальность и перспективность изучаемых объектов. Была отмечена важная роль проводимого исследования как для развития знаний о процессе транскрипции, так и существенная важность получаемых нами результатов для дальнейшего практического применения бактериофагов типа фKZ для фаговой терапии.
- С помощью предварительного анализ геномов типа фKZ комплексом биоинформатических методов было определено, что фаги типа фKZ кодируют две независимые неканонические РНКП – вирионную и невирионную, и, во-вторых,

- фаговые РНКП произошли от бактериальных РНКП, посредством двух независимых эволюционных событий. Также было показано, что, по-видимому, механистически фаговые неканонические РНКП могут отличаться от канонических РНКП.
- Биоинформатический поиск фаговых промоторов привел к идентификации вероятных ранних промоторов фага фKZ, отличающихся от типичных бактериальных промоторов последовательностями консервативных элементов. Также была построена предварительная карта генома данного бактериофага.
 - Был проведен экспериментальный поиск белков фага фKZ, связывающихся с РНКП клетки-хозяина. также Были обнаружены белки Orf14 и Orf284, данные белки возможно взаимодействуют с РНКП бактериальной клетки и регулируют ее активность. Также было выявлено, что белки, возможно являющиеся субъединицами фаговых РНКП, выделяются в условиях близких к условиям для выделения РНКП клетки-хозяина. Таким образом были выявлены белки, предположительно входящие в невирионную РНКП - Orf55, Orf68, Orf71-73, Orf74 и Orf123, и один из белков вирионной РНКП – Orf178.
 - Были созданы лабораторные образцы экспрессионных плазмид, содержащих фаговые гены *orf14*, *orf55* и *orf178* - pET19K-KZ178, pET19K-KZ55 и pET19K-KZ14 полностью удовлетворяющие требованиям технического задания.
 - Были созданы штамм продуцент рекомбинантного белка Orf178 - Rosetta(DE3)pET19K-KZ178, полностью удовлетворяющий заявленным требованиям: выход белка из 1 литра культуры равнялось примерно 3 мг.
 - Была разработана методика экспрессии и очистки рекомбинантного белка Orf178, позволяющая получать препарат белка чистотой 95%, что полностью соответствует требованиям технического задания

2.2. Описание новизны научных результатов.

Новизна полученных данных целиком обуславливается выбранной стратегией исследования, заключающейся в применении комплексного подхода для достижения поставленной цели. В ходе работы был применен не только набор стандартных биохимических методов, используемых для исследования транскрипционных факторов и механизмов, но и получающий все более широкое распространение биоинформатический анализ геномных последовательностей, а также новейшие физические, в том числе методы высокоразрешающей масс-спектрометрии, с помощью которых были идентифицированы фаговые белки-регуляторы. Описанный комплексный подход является чрезвычайно перспективным для выполнения поставленной задачи, так как он дает возможность взглянуть на объекты исследования с абсолютно разных точек зрения и, таким образом, получить полные и достоверные данные по изучаемому вопросу.

Используя выбранную стратегию, были получены уникальные данные, включающие в себя идентификацию двух наборов субъединиц для двух неканонических мультисубъединичных фаговых РНКП с помощью биоинформатических подходов, кроме этого экспериментально был определен возможный полный состав невирионной фаговой РНКП и обнаружены белки фага возможно взаимодействующие с бактериальной РНКП в процессе инфекции, а также впервые было показано, что мишенью мобильных интронов, кодирующих эндонуклеазы HNH семейства, являются субъединицы РНКП.

2.3. Сопоставление с результатами аналогичных работ мирового уровня.

Большинство существующих работ, посвященных бактериофагом типа фKZ, включает в себя данные секвенирования геномов новых бактериофагов данной группы и их первичному биоинформатическому анализу, а также определению белков, входящих в фаговые частицы и изучении структуры этих белков. Стоит отметить, что в работах посвященных фагам EL, ОВР, 201ф2-1 и фKZ ранее были сделаны попытки

биоинформатического предсказания специфических фаговых промоторов. В случае фагов ОВР и 201φ2-1 предполагаемые промоторы ранних генов были получены, данные приведенные для фагов EL и φKZ не были полными. В нашей работе за отчетный период были достоверно определены мотивы соответствующие ранним специфическим фаговым промотора фага φKZ, а также был проведен более глубокий биоинформатический анализ возможных фаговых РНКП.

В связи с тем, что есть все основания предполагать, что фаги типа φKZ используют некие новые, ранее неисследованные механизмы регуляции транскрипции, в литературе не раз подчеркивалась необходимость подробного изучения транскрипции данного класса бактериофагов. Однако экспериментальных данных по транскрипции геномов φKZ-подобных бактериофагов в течение инфекции до нашей работы получено не было.

3. Назначение и область применения результатов проекта

3.1. Описание областей применения полученных результатов (области науки и техники; отрасли промышленности и социальной сферы, в которых могут или уже используются полученные результаты или созданная на их основе инновационная продукция).

а) в науке и производстве - в результате разработки этого проекта будут получены важные данные как для дальнейшего изучения процесса транскрипции, так и для успешного применения фагов, исследуемой группы в борьбе с заболеваниями, вызванными *P. aeruginosa*. Стоит также отметить, что бактериальная РНКП является доказанной и одной из самых распространенных мишеней для действия антибиотиков. Идентификация сайтов связывания фаговых белков-ингибиторов транскрипции на хозяйской РНКП может послужить заделом для создания новых антибактериальных препаратов на их основе.

б) образовательном процессе - в работе будут задействованы молодые ученые, аспиранты и студенты ФГБОУ ВПО «СПбГПУ», которые получают знания и ценный практический опыт по применению современных методов молекулярной биологии, геномной инженерии и новейших физических подходов к исследованию живых систем. По результатам проекта будет дополнен курс лабораторных работ для студентов ФГБОУ ВПО «СПбГПУ», физико-механический факультет, кафедра биофизики.

4. Перспективы развития исследований.

Краткая информация о перспективах развития выполненного в ходе выполнения проекта исследования.

1) Информация о том, насколько участие в ФЦП способствовало формированию новых исследовательских партнерств. Участвует ли научный коллектив в проектах по 7-й рамочной Программе Евросоюза (с указанием названия проектов и перечня партнеров по ним).

Участие в ФЦП в течение 2009-2012 гг. способствовало формированию новых исследовательских партнерств со следующими зарубежными научными коллективами

- Rutgers University, New Jersey (USA) в рамках текущего проекта
- Western Washington University, Washington State (USA) (Минобрнаука Соглашение № 14.В37.21.1230)
- CNRS-Université Paul-Sabathier, Toulouse, France (Минобрнаука ГК № 02.740.11.5223 и № 11.519.11.2002) и РФФИ 11-04-91085-НЦНИ_г
- New University of Lisbon Portugal (Минобрнаука ГК 02.740.11.5182 от 12.03.10)
- University of Uppsala Sweden Минобрнаука ГК 02.513.12.3089 от 01.10.2009)

По результатам сотрудничества с вышеупомянутыми коллективами подана заявка на грант Сколково в 2013 году, с участием шести зарубежных научных коллективов из Франции, США и Великобритании. Планируется подача заявки с теми же коллективами в рамочную Программу Евросоюза в 2013 году.

2) *Краткая информация о проектах научного коллектива по аналогичной тематике.*

- Проект «Роль доменов и междоменных линкеров в регуляции филаментов актина белками семейства виллина» (Минобрнаука Соглашение № 14.В37.21.1230)
- Проект «Исследование динамики конформационных изменений ДНК вызванных факторами структурной перестройки хроматина методами оптической ловушки («лазерный пинцет») и молекулярного моделирования» (Минобрнаука ГК № 02.740.11.5223)
- Проект «Исследование АТФ – зависимой динамики олигомеризации белков семейства ТР49 на индивидуальных молекулах ДНК» (Минобрнаука ГК № 11.519.11.2002).
- Проект «Исследования на одномолекулярном уровне свойств ДНК-субстрата при связывании с белками ТР49» (Грант РФФИ №12-04-32060)
- Проект «Исследование структур, формируемых белком FtsZ, в клетках *Mycoplasma hominis* методом локализационной микроскопии» (Грант РФФИ №12-04-31536)
- Проект «Изучение механизмов образования и взаимодействия внутри- и внеклеточных пулов ключевых NAD-метаболитов» (Грант РФФИ №12-04-31194)

3) *Информация о том, сотрудничество с какими странами и исследовательскими центрами может способствовать наибольшей отдаче для развития в России технологий в области исследования, а также для выхода российской продукции на региональные и глобальные рынки.*

Для развития исследований тонких механизмов транскрипции бактериофагов типа φKZ необходимо тесное сотрудничество с коллективами, являющимися мировыми лидерами в изучение транскрипции бактериофагов и принимающими активное участие в развитие фаговой терапии. Одним из таких коллективов, специализирующимся на исследование бактериофагов бактерий из рода *Pseudomonas*, является коллектив Лаборатории генетических технологий Католического университета Левена (Laboratory of Gene Technology, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium) под руководством Роба Лавиня (Rob Lavigne).

5. Опыт закрепления молодых исследователей – участников проекта (этап проекта) в области науки, образования и высоких технологий

Закреплены следующие специалисты:

1. Афанасьева Арина Сергеевна, 22.11.1988 года рождения, зачислена в очную аспирантуру ФГБОУ ВПО «СПбГПУ»;
2. Ливинская Вероника Алексеевна, 29.10.1989 года рождения, принята на работу на должность инженера ФГБОУ ВПО «СПбГПУ»;
3. Никифоров Андрей Анатольевичу, 08.08.1977 года рождения, принят на работу на должность ведущего инженера ФГБОУ ВПО «СПбГПУ».

6. Вклад приглашенного руководителя в проект (этап проекта)

Опыт взаимодействия научного коллектива с приглашенным руководителем является исключительно положительным. Он внес существенный вклад в научный задел по данному проекту. Фактически им была поставлена задача проекта, так как основным научным интересом Л.С. Минахина является комплексный структурно-функциональный анализ механизмов регуляции прокариотической транскрипции и, в частности, регуляция транскрипции бактериофагами, заражающими различные группы бактерий. Следует отметить, что за последние несколько лет его научной группой получены новые данные, касающиеся транскрипции и структурно-функционального анализа транскрипционных

механизмов, используемых различными фагами, инфицирующими *Escherichia coli*, *Bacillus anthrax*, *Thermus thermophilus*. Данная работа его группы поддерживалась несколькими грантами, включая НИН (2007-2010) и госконтракт Федерального агентства по науке и инновациям (2010-2011).

Вклад Л.С.Минахина в получение научных результатов и повышение научного уровня членов коллектива заключались генерации новых знаний в руководимом коллективе; расширение доступа коллектива к информационным ресурсам через прокси сервер университета Ратгерса (США); обучению новым методикам работы и проведения исследования; управление исследовательской работой как во время пребывания в России, так и в удаленном режиме через электронные средства информации. Им запланировано участие членов руководимого коллектива в исследованиях в его лаборатории в США в течение трех месяцев в 2013 году, за счет его заработной платы в рамках этого гранта. Также в ходе работы над этапом руководителем проекта Л.С. Минахином проведен семинар по теме: «Механизмы регуляции транскрипции белками бактериофага».

Аннотация семинара

Семинар состоялся 16 ноября 2012 г. в НИИ «Нанобиотехнологии» ОНТИ СПбГПУ, количество участников семинара – 29, из них 16 – исполнители НИР, руководителем семинара выступал Л.С. Минахин. На семинаре обсуждались известные стратегии регуляции транскрипции фагового генома и экспериментальные методы исследования. Руководитель семинара Л.С. Минахин сделал доклад по теме «Механизмы регуляции транскрипции белками бактериофага». Доклад руководителя семинара включал вводный рассказ о бактериофагах и стадиях транскрипции у бактерий, после чего докладчик непосредственно сделал обзор известных механизмов регуляции бактериальной транскрипции на разных стадиях (инициация, элонгация, терминация) с помощью фаговых белков. В настоящее время известны механизмы действия примерно десятка белков бактериофагов на бактериальную РНКП и транскрипцию, в ходе доклада были рассмотрены примеры фаговых белков, подавляющих инициацию, элонгацию и терминацию в бактериальной транскрипции. Кроме того, было рассказано о биоинформатических подходах в изучении транскрипции фаговых генов на примере фагов фYS40 и P23-45. Внимание было также уделено экспериментам, в ходе которых доказывался тот или иной механизм действия фаговых белков. После завершения доклада Минахин Л. С. провел обсуждение результатов, полученных в ходе выполнения отчетного этапа проекта, и плана дальнейших исследований.

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВПО «СПбГПУ»

Д.Ю. Райчук

2012 г.



Заместитель руководителя работ
Вед. н.с., к.ф.-м.н.

М.А.Ходорковский