



УДК 57.086. 2

Г.Е. Побегалов¹, А.Н. Арсениев¹, М.В. Якунина¹, Л.С. Минахин²¹ Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, Россия² Институт Ваксмана, Ратгерский университет штата Нью-Джерси, США

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СИЛЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОМОТОРА С РНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* НА СТАДИИ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ

Одной из важнейших проблем современности является широкое распространение антибиотикоустойчивости у наиболее распространенных патогенных бактерий человека. В частности, одним из таких патогенов является грамотрицательная бактерия *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, синегнойная палочка), вызывающая широкий спектр нозокомиальных инфекций. Поиск новых эффективных способов борьбы с данным патогеном требует тщательного изучения жизнедеятельности этого организма. Особый интерес как мишени для воздействия представляют из себя ключевые ферменты клетки, одним из которых является ДНК-зависимая РНК-полимераза, отвечающая за первую стадию экспрессии генов – транскрипцию.

Применив метод оптической ловушки для изучения инициации транскрипции РНК-полимеразы модельного патогенного организма *P. Aeruginosa*, мы впервые измерили силу взаимодействия РНК-полимеразы этой бактерии с промоторным участком ДНК в ходе образования промоторного комплекса; она составила $13,1 \pm 2,8$ пН. Полученные данные можно использовать для поиска новых ингибиторов РНК-полимеразы *P. aeruginosa*.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA, ТРАНСКРИПЦИЯ, РНК-ПОЛИМЕРАЗА, ОПТИЧЕСКАЯ ЛОВУШКА.

Введение

Грамотрицательная бактерия *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, синегнойная палочка) является распространенным возбудителем различных инфекций у человека. Данная бактерия может вызывать инфекции дыхательной системы, мочеиспускательного тракта, мягких тканей, а также желудочно-кишечные инфекции, дерматиты и различные систематические инфекции у пациентов с ослабленным иммунитетом. На сегодняшний день патогенные штаммы *P. aeruginosa* все чаще оказываются устойчивыми ко многим антибиотикам. Изучение жизнедеятельности указанной бактерии как модельного патогена представляет большой интерес с точки зрения разработки более эффективных антибиотиков, действующих на данный тип бактерий.

Транскрипция – это первый шаг на пути преобразования информации, закодированной в последовательности ДНК, в белки,

необходимые для жизнедеятельности любых организмов. Известно, что специфическое подавление процессов транскрипции – распространенный механизм биологического действия антибиотиков на бактериальную мишень. Данный процесс осуществляется комплексным ферментом – РНК-полимеразой (РНКП). Первой и лимитирующей стадией для процесса транскрипции является инициация, которая в свою очередь включает в себя множество промежуточных стадий. В природе существует множество белков – факторов инициации, и, соответственно, механизмов регуляции, которые можно использовать для синтеза антибиотиков нового поколения.

Однако основная цель данной стадии – распознавание РНК-полимеразой специализированных последовательностей ДНК – промоторов, с которых в строго определенных местах начинается синтез молекулы РНК.

Все бактериальные промоторы генов,

работающих при росте и развитии бактериальной колонии в физиологических условиях, характеризуются ярко выраженными консервативными нуклеотидными последовательностями (промоторными элементами) и по этим признакам делятся на два основных класса. Промоторы основного (−10/−35)-класса имеют два консервативных района, находящихся на расстояниях −10 и −35 нуклеотидов от старта транскрипции +1 (районы ТАТААТ и ТТGACA, соответственно). Так называемые промоторы с удлинённым (−10)-районом характеризуются отсутствием (−35)-района и дополнительным TG-мотивом, расположенным непосредственно перед (−10)-районом.

Разнообразие биомеханических преобразований, возникающих в ходе транскрипции, а также огромное количество факторов, оказывающих влияние на работу РНКП на каждом этапе транскрипции, делает данный процесс особо интересным для изучения и поиска способов его регулирования. Биохимические исследования *in vitro* ранее позволили охарактеризовать важные аспекты активности РНКП, но многие детали остаются неизвестными из-за усреднения по тысячам молекул при использовании стандартных биохимических подходов. С этой точки зрения большой интерес представляет применение одномолекулярных методов для изучения функциональной активности и регулирования РНКП. Одномолекулярные методы, такие как атомно-силовая микроскопия, одномолекулярная флуоресцентная микроскопия, а также методы магнитной и оптической ловушек, позволяют проводить измерения на одиночных биологических молекулах [1, 2].

В последнее время метод оптической ловушки стал применяться для исследования транскрипции, в частности процесса элонгации, что открыло новые возможности:

наблюдать в режиме реального времени движение одной молекулы РНКП по ДНК;

измерять кинетику реакции;

наблюдать поведение РНКП на матрице;

измерять изменение параметров движения РНКП в зависимости от последовательности матрицы;

измерять силы, развиваемые данным ферментом, на уровне единиц пиконьютонов.

Основными объектами таких одномолекулярных исследований ранее выступали бактериальная РНКП из *Escherichia coli* [3], эукариотическая РНКП II [4, 5] из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и некоторые вирусные РНКП [6, 7].

В данной работе мы впервые применили одномолекулярный метод оптической ловушки для изучения инициации транскрипции РНКП модельного патогенного организма *P. aeruginosa*.

Схема эксперимента

В работе была использована уникальная установка «Лазерный пинцет» с двумя оптическими ловушками (НИК «НаноБио», СПбПУ) и четырехканальная микрофлюидная камера, описанные ранее [8, 9].

Схема эксперимента представлена в нижней части рис. 1. Микросфера диаметром 5 мкм, покрытая стрептавидином, закреплялась на поверхности покровного стекла микрофлюидной камеры. РНКП прикреплялась к поверхности микросферы благодаря наличию стрептага (streptag) на С-конце α -субъединицы, способного связываться со стрептавидином. Концы ДНК были модифицированы биотином и прикреплены к полистироловым микросферам диаметром 3 мкм, покрытым стрептавидином. Манипуляция микросферами осуществлялась при помощи двух оптических ловушек, в результате чего молекула ДНК распрямлялась и подносилась к поверхности микросферы с прикрепленной РНКП. При смещении пьезостолика микросфера, закрепленная на поверхности покровного стекла, смещалась относительно оптических ловушек. Таким образом осуществлялось перемещение молекулы РНКП вдоль выстроенной молекулы ДНК.

При связывании РНКП с промоторной последовательностью ДНК дальнейшее смещение пьезостолика приводило к возникновению силы, стремящейся сместить микросферу с закрепленной ДНК из оптической ловушки. При достижении порога-

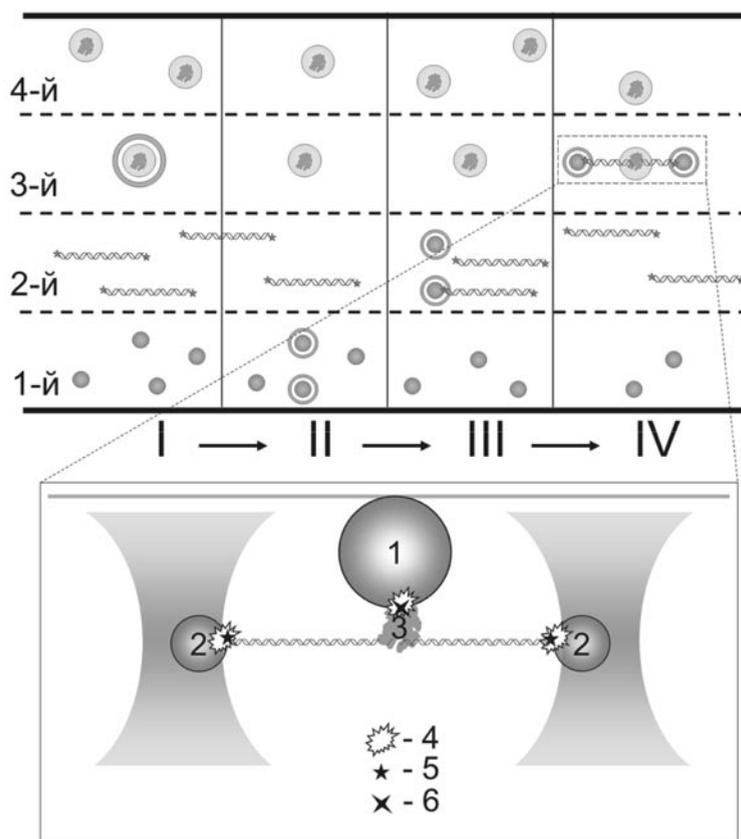


Рис. 1. Схема эксперимента: I – IV – формирование объекта исследования в четырехканальной (1-й – 4-й) микрофлюидной камере; внизу – измерение силы взаимодействия РНКП с промоторной последовательностью ДНК;

1 – полистироловая микросфера диаметром 5 мкм, закрепленная на покровном стекле;
 2 – полистироловые микросферы диаметром 3 мкм, удерживаемые в оптических ловушках; 3 – РНКП;
 4 – стрептавидин; 5 – биотин; 6 – strep-tag

вой силы связь между РНКП и ДНК разрывалась.

Сила взаимодействия ДНК и РНКП определялась максимальным смещением микросферы из центра оптической ловушки по формуле

$$F = k\Delta x_m,$$

где k – жесткость оптической ловушки [9], Δx_m – максимальное смещение микросферы.

Непосредственно перед проведением эксперимента внутренняя поверхность четырехканальной проточной камеры и трубок подвергалась очистке путем последовательного вмывания в каждый канал 100 мкл этанола, 300 мкл дистиллированной воды и 200 мкл буферного раствора (Tris-HCl

50 мМ, pH = 7,5; KCl 40 мМ; MgCl₂ 10 мМ; DTT 5 мМ).

Затем в камеру (см. рис. 1) при одинаковой скорости (1 мкл/мин) подавали следующие жидкости (по 200 мкл в каждый канал):

в 1-й канал – раствор, содержащий 0,01% микросфер диаметром 3 мкм, покрытых стрептавидином;

во 2-й канал – раствор биотинилированных молекул ДНК (15 нМ);

в 3-й канал – буферный раствор;

в 4-й канал – раствор, содержащий микросферы диаметром 5 мкм с поверхностью, модифицированной РНКП.

При указанных условиях эксперимента в микрофлюидной камере формировалось четыре ламинарных потока (см. рис. 1,

1-й – 4-й каналы). При помощи оптической ловушки микросфера с поверхностью, модифицированной РНКП, захватывалась в 4-м канале, переносилась в 3-й и закреплялась на поверхности покровного стекла (см. рис. 1, I)). Затем в 1-м канале осуществлялся захват двух микросфер при помощи оптических ловушек (см. рис. 1, II) Сдвигом микроскопного столика микросферы переносились через 2-й канал в 3-й. За время переноса в среднем одна молекула ДНК успевала закрепиться на одной из микросфер (см. рис. 1, III). Вторая микросфера прикреплялась к свободному концу ДНК, молекула ДНК выпрямлялась и подносилась к микросфере с поверхностью, модифицированной РНКП (см. рис. 1, IV).

Движением пьезостолика осуществлялось «сканирование» РНКП по ДНК. При узнавании промоторной последовательности ДНК РНКП связывалась с ДНК, и дальнейшее смещение пьезостолика приводило к натяжению участка ДНК, расположенного между промоторной последовательностью и концом ДНК, закрепленным на микросфере. По смещению микросферы диаметром 3 мкм из центра ловушки опре-

делялась сила натяжения участка ДНК. При достижении пороговой силы натяжения связь между РНКП и ДНК разрывалась.

Материалы и методы

В работе использовалась РНКП, выделенная из штамма *P. aeruginosa* PAO1RpoA::strep (получена из лаборатории генной технологии Католического университета Лувена, Бельгия). В этом штамме синтезируется геномная рекомбинантная α -субъединица РНКП, слитая с аффинным хвостом strep-tag, представляющим собой синтетический полипептид из восьми аминокислот (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys), способный специфически связываться с различными аффинными сорбентами на основе стрептавидина. Хроматографическое выделение и очистку РНКП проводили по стандартной методике [10]. Финальная очистка РНКП производилась на гель-фильтрационной колонке Superdex 200D до чистоты приблизительно 95 %, достаточной для проведения эксперимента (рис. 2).

Полученные РНКП прикреплялись к полистироловым микросферам согласно следующему протоколу:

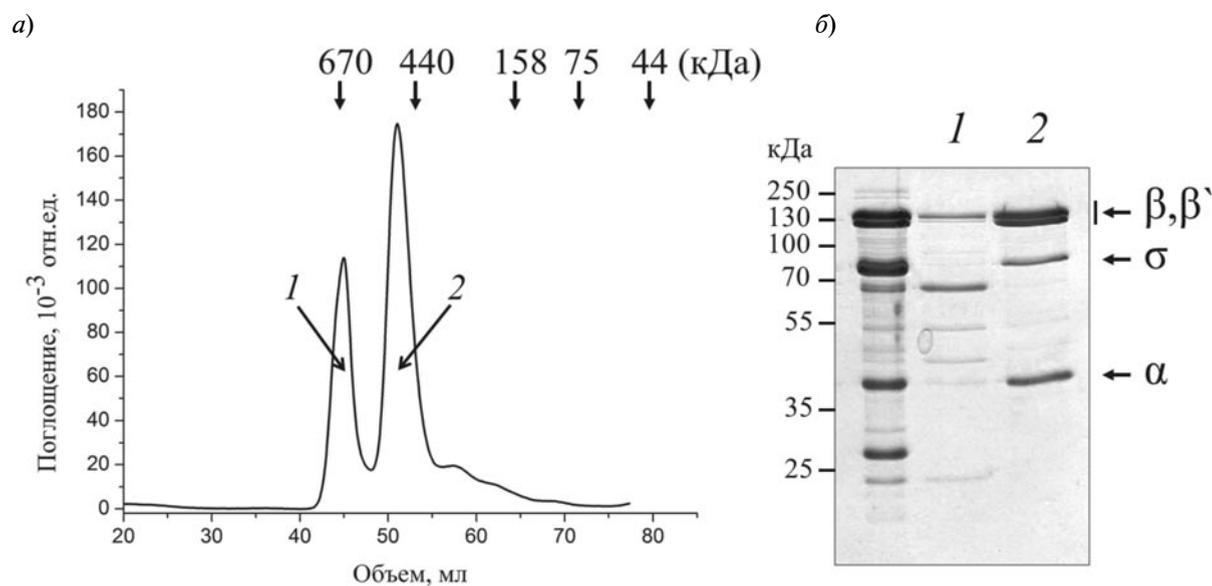


Рис. 2. Анализ эффективности очистки РНК полимеразы *P. aeruginosa* на гель-фильтрационной колонке: а – хроматограмма, б – электрофореграмма фракций.

Левый столбец на электрофореграмме – это суммарный препарат РНК-полимеразы до очистки при помощи гель-фильтрации, 1, 2 – очищенные препараты белков, соответствующие двум основным пикам на хроматограмме; α , β , β' , σ – субъединицы РНК-полимеразы

1. К 10 мкл раствора, содержащего 0,5 % полистироловых микросфер диаметром 5 мкм, покрытых стрептавидином (Spherotech), добавляли 90 мкл Tris-HCl 100 mM, pH = 7,5.

2. Раствор тщательно перемешивали и откручивали в микроцентрифуге на скорости 13 000 об/мин в течение 5 мин. В результате на дне пробирки образовался белый осадок микросфер.

3. Из раствора отбирали 99 мкл супернатанта и добавляли 99 мкл Tris-HCl 100 mM, pH = 7,5.

4. Повторяли откручивание и отбор супернатанта.

5. К микросферам добавляли 20 мкл раствора РНКП (700 нг/мкл).

6. Смесь инкубировали в течение 2 ч с периодическим мягким перемешиванием при помощи вортекса.

В качестве ДНК, содержащей промоторную последовательность, использовалась ДНК бактериофага λ (48 502 пары оснований). Для манипуляции при помощи оптических ловушек концы геномной ДНК модифицировались биотином согласно следующему протоколу:

1. 13 мкл воды, очищенной при помощи системы Milli-Q, смешивали с 2 мкл MgCl₂ 25 mM, 2,5 мкл 10X Taq Buffer (Fermentas),

0,4 мкл dATP 2,5 mM, 0,4 мкл dCTP 2,5 mM, 0,4 мкл dTTP 2,5 mM (Beagle), 1 мкл biotin-11-dGTP 1 mM (Perkin Elmer). Раствор перемешивали на вортексе.

2. Добавляли 4 мкл ДНК бактериофага λ (0,3 мг/мл) и перемешивали раствор легким встряхиванием.

3. Добавляли 0,6 мкл Taq ДНК-полимеразы (1 ед/мкл, Fermentas).

4. Пробирку с полученным раствором инкубировали в термоциклере при температуре 72 °C в течение 30 мин. Температура крышки термоциклера устанавливали равной 80 °C.

5. Раствор охлаждали до 4 °C.

6. Избыточные нуклеотиды выводили из раствора путем фильтрации через спин-колонку MicroSpin S-400 HR, GE Healthcare (центрифугирование 850g, 5 мин).

Результаты

Сила взаимодействия РНКП с ДНК определялась как максимальная сила, достижимая в ходе натяжения ДНК при увеличении расстояния между микросферой с поверхностью, модифицированной РНКП, связанной с промотором, и микросферой с закрепленным концом ДНК.

Увеличение расстояния между микросферами осуществлялось при помощи пьезостолика; он смешал микрофлюидную камеру с закрепленной на покровном стекле микросферой относительно лазерного луча. С помощью последнего удерживались микросферы, используемые для манипуляции ДНК. На рис. 3 представлена типичная зависимость силы натяжения участка ДНК, расположенного между промотором и концом ДНК, от смещения пьезостолика.

Геном λ -фага — модельного фага, заражающего *E. coli*, — содержит несколько промоторов, узнаваемых бактериальной хозяйской РНКП и регулирующих развитие фага в ходе инфекции. Известно, что промоторы в *E. coli* (и, соответственно, в λ -фаге) и в *P. aeruginosa* имеют очень похожие консенсусы [11]. Известно также, что наиболее сильных промоторов, к тому же образующих стабильные комплексы с РНКП, в геноме всего два: это ранние промоторы P_L и P_R . Измеренная сила взаимо-

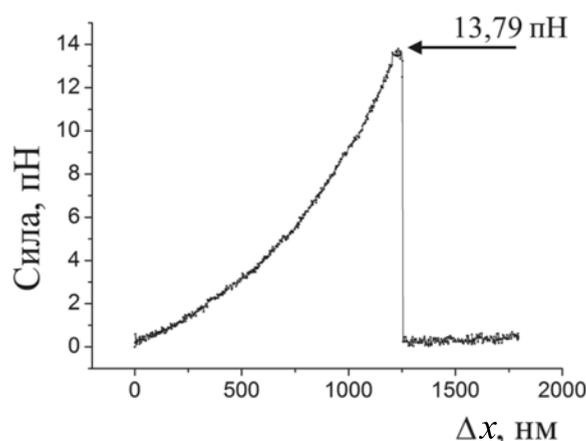


Рис. 3. Зависимость силы натяжения участка ДНК, расположенного между промоторной последовательностью и концом ДНК, закрепленном на микросфере, от смещения пьезостолика.

При достижении силы в 13,79 пН связь между РНК-полимеразой *P. aeruginosa* и ДНК разрывалась

действия РНКП *P. aeruginosa* с промотором составила $13,1 \pm 2,8$ пН. Судя по небольшому разбросу полученных значений силы взаимодействия, РНКП в ходе эксперимента преимущественно связывалась с одним из этих промоторов. В ходе дальнейших экспериментов планируется провести более детальные исследования для определения силы взаимодействия с каждым из промоторов.

Заключение

В рамках проведенных исследований впервые была измерена сила взаимодействия РНКП *P. aeruginosa* с промоторным участком ДНК в ходе образования промоторного комплекса.

Разработанный метод исследования РНК полимеразы *P. aeruginosa* с примени-

ем оптических ловушек и полученные с его помощью данные полезны для дальнейшего анализа влияния различных регуляторов на процесс транскрипции в данной бактерии как в модельном патогенном организме.

Следующим шагом планируется изучение влияния белка – регулятора инициации транскрипции – на формирование РНК-полимеразой промоторного комплекса. Для этого будет использоваться ДНК, модифицированная подобным же образом, имеющая один сильный промотор и лишенная других сигналов транскрипции (элонгационных пауз, терминаторов, других промоторов), а также белок – регулятор инициации транскрипции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках Соглашения № 14.В37.21.0846.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neuman K., Nagy A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy // *Nature Methods*. 2008. No. 5, pp. 491-505.
2. Wang F., Greene E. Single molecule studies of transcription: from one RNA polymerase at a time to the gene expression profile of a cell // *J. Mol. Biol.* 2011. Vol. 412. No. 5, pp. 814-831.
3. Abbondanzieri E., Greenleaf W., Shaevitz J., Landick R., Block S. Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase // *Nature*. 2005. Vol. 438. No. 7067, pp. 460-465.
4. Dangukwanich M., Ishibashi T., Liu S., Kireeva M., Lubkowska L., Kashlev M., Bustamante C. Complete dissection of transcription elongation reveals slow translocation of RNA polymerase II in a linear ratchet mechanism // *Elife*. 2013; 2:e00971.
5. Zhou J., Schweikhard V., Block S. Single-molecule studies of RNAPII elongation // *J. Biochim. Biophys. Acta*. 2013. Vol. 1829. No. 1, pp. 29-38.
6. Skinner G., Baumann C., Quinn D., Molloy J., Hoggett J. Promoter binding, initiation, and elongation by bacteriophage T7 RNA polymerase. A single-molecule view of the transcription cycle // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. No. 5, pp. 3239-3244.
7. Skinner G., Kalafut B., Visscher K. Downstream DNA tension regulates the stability of the T7 RNA polymerase initiation complex // *Biophys. J.* 2011. Vol. 100. No. 4, pp. 1034-1041.
8. Сабанцев А.В., Побегалов Г.Е., Мурашов С.В., Мельников А.С., Ходорковский М.А. Модернизация флуоресцентного микроскопа для исследования биологических структур с субдифракционным разрешением // *Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки*. 2012. № 2(146). С. 94–99.
9. Побегалов Г.Е., Арсениев А.Н., Ведяйкин А.Д., Соколова М.Л., Федорова Я.В., Сабанцев А.В. Изменение механических свойств молекулы ДНК при взаимодействии с интеркалирующим красителем YOYO-1 // *Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки*. 2013. № 1(165). С. 136–143.
10. Helmann D. Purification of *Bacillus subtilis* RNA polymerase and associated factors // *Methods in Enzymology*. 2003. Vol. 370, pp. 10-24.
11. Gragerov A., Chenchik A., Aivasashvili V., Beabealashvili B., Nikiforov V. *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida* RNA polymerases display identical contacts with promoters // *Mol. Gen. Genet.* 1984. Vol. 195. Iss. 3, pp. 511-515.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

ПОБЕГАЛОВ Георгий Евгеньевич – аспирант кафедры биофизики ИФНиТ Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
lwdrums@gmail.com

АРСЕНИЕВ Анатолий Николаевич – аспирант НИК «Нанобиотехнологии» Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
arsenievanatoly@gmail.com

ЯКУНИНА Мария Вячеславовна – аспирантка кафедры биофизики ИФНиТ Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
yakuninam@gmail.com

МИНАХИН Леонид Станиславович – доцент Института Ваксмана, Ратгерс, Университета штата Нью Джерси, США.

190 Frelinghuysen Rd, Piscataway, NJ 08854, USA
minakhin@waksman.rutgers.edu

Pobegalov G.E., Arsenyev A.N., Yakunina M.V., Minakhin L.S. THE DETERMINATION OF BINDING FORCE BETWEEN PROMOTER AND PSEUDOMONAS AERUGINOSA RNA POLYMERASE DURING TRANSCRIPTION INITIATION.

Gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* is a wide-spread cause of different infections that is often found to be resistant to many different antibiotics. Detailed knowledge of these bacteria vital processes can facilitate the development of new effective antibiotics. RNA polymerase is one of the most common targets for antibiotics in bacteria.

In this work optical trapping is used for the first time in order to study transcription initiation in model pathogenic organism *P. aeruginosa*. Three beads configuration have been chosen as an optimal scheme for trapping experiments in this study. The binding force between *P. aeruginosa* RNA polymerase and promoter region in DNA has been measured for the first time, during the assembly of promoter complex. The measured force was 13.1 ± 2.8 pN. These results could be used to search for new *P. aeruginosa* RNA polymerase inhibitors.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA, TRANSCRIPTION, RNA-POLYMERAZE, OPTICAL TRAPPING.

REFERENCES

1. Neuman K., Nagy A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nature Methods*, 2008, No. 5, pp. 491-505.
2. Wang F., Greene E. Single molecule studies of transcription: from one RNA polymerase at a time to the gene expression profile of a cell. *J. Mol. Biol.*, 2011. Vol. 412. No. 5, pp. 814-831.
3. Abbondanzieri E., Greenleaf W., Shaevitz J., Landick R., Block S. Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase. *Nature*, 2005. Vol. 438. No. 7067, pp. 460-465.
4. Dangkulwanich M., Ishibashi T., Liu S., Kireeva M., Lubkowska L., Kashlev M., Bustamante C. Complete dissection of transcription elongation reveals slow translocation of RNA polymerase II in a linear ratchet mechanism. *Elife*, 2013; 2:e00971.
5. Zhou J., Schweikhardt V., Block S. Single-molecule studies of RNAPII elongation. *J. Biochim. Biophys. Acta*, 2013, Vol. 1829, No. 1, pp. 29-38.
6. Skinner G., Baumann C., Quinn D., Molloy J., Hoggett J. Promoter binding, initiation, and elongation by bacteriophage T7 RNA polymerase. A single-molecule view of the transcription cycle. *J. Biol. Chem.*, 2004, Vol. 279, No. 5, pp. 3239-3244.
7. Skinner G., Kalafut B., Visscher K. Downstream DNA tension regulates the stability of the T7 RNA polymerase initiation complex. *Biophys.*, 2011, Vol. 100, No. 4, pp. 1034-1041.
8. Sabantsev A.V., Pobegalov G.E., Murashov S.V., Mel'nikov A.S., Khodorkovskij M.A. The fluorescent microscope upgrading to investigate biological structures with subdiffractional resolution. *St. Petersburg State Polytechnical University Journal: Physics and Mathematics*, 2012, No. 2(146), pp. 94-99.
9. Pobegalov G.E., Arseniev A.N., Vedyaykin A.D., Sokolova M.L., Fedorova Ya.V., Sabantsev A.V. Changing of DNA molecule mechanical properties during interaction with YOYO-1 intercalating dye. *St. Petersburg State Polytechnical University Journal: Physics and Mathematics*, 2013, No. 1(165), pp. 136-143.

10. **Helmann D.** Purification of *Bacillus subtilis* RNA polymerase and associated factors. *Methods in Enzymology*, 2003, Vol. 370, pp. 10-24.

11. **Gragerov A., Chenchik A., Aivasashvili V.,**

Beabealashvili B., Nikiforov V. *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida* RNA polymerases display identical contacts with promoters. *Mol. Gen. Genet.*, 1984, Vol. 195, Iss. 3, pp. 511-515.

THE AUTHORS

POBEGALOV Georgiy E.

St. Petersburg Polytechnic University

29 Politekhnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia

lwdrums@gmail.com

ARSENIEV Anatoly N.

St. Petersburg Polytechnic University

29 Politekhnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia

arsenievanatoly@gmail.com

YAKUNINA Maria V.

St. Petersburg Polytechnic University

29 Politekhnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia

yakuninam@gmail.com

MINAKHIN Leonid S.

Waksman Institute of Microbiology, Rutgers, The State University of New Jersey.

190 Frelinghuysen Rd, Piscataway, NJ 08854, USA

minakhin@waksman.rutgers.edu