



Ступак Евгения Эдуардовна

**ИНДУКЦИЯ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ В ПОПУЛЯЦИИ
КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI*, СОДЕРЖАЩИХ ИСКУССТВЕННЫЕ
ЦИКЛИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ГЕНОВ**

03.00.15 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

УФА – 2006

Работа выполнена в лаборатории математической и молекулярной генетики
Института биологии Уфимского научного центра РАН

Научный руководитель	Доктор биологических наук, профессор Чураев Рустэм Нурович
Официальные оппоненты	Доктор биологических наук, профессор Чемерис Алексей Викторович Кандидат биологических наук, доцент Бабынин Эдуард Викторович
Ведущая организация	Федеральное государственное учреждение науки "Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"

Защита состоится «21» ноября 2006 г., в __ часов на заседании Регионального
диссертационного совета КМ 002.133.01 при Институте биохимии и генетики
Уфимского научного центра РАН.

Адрес: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Уфимского научного
центра РАН.

Автореферат разослан «__» октября 2006 г.

Ученый секретарь
Регионального диссертационного
совета, к.б.н.



Бикбулатова С.М.

2006A
21742

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Паттерн экспрессии генов определяет фенотип клетки. Наследуемые изменения уровней экспрессии генов в клетках лежат в основе таких процессов как: выбор между литическим и лизогенным путями развития у умеренных бактериофагов (Johnson et al., 1981); фазовые вариации у прокариот (van der Woude, Baumbler, 2004; van der Woude, 2005); клеточная дифференцировка эукариот (Latham, 1999; Kepes, 2005). Исследование механизмов возникновения дифференциальной активности генов в индивидуальных клетках клональной популяции - одно из наиболее актуальных направлений современной биологии. В большинстве случаев наследуемые в клеточных поколениях, но обратимые изменения генной активности являются результатом взаимосвязанных генетических (транспозиции, инверсии) и эпигенетических факторов (структура хроматина, модификации ДНК и ДНК-ассоциированных белков, переключение уровня синтеза транскрипционных факторов в циклических системах генов). Причем обратимые перестройки последовательности ДНК контролируются регуляторными белками (van der Woude, Baumbler, 2004).

Как было показано в ряде работ (Gardner et al., 2000; Tchuraev et al., 2000) циклические дигенные системы с отрицательными обратными связями (ЦДС⁽⁻⁾) могут поддерживать два альтернативных уровня экспрессии генов и, соответственно, два фенотипа клетки. В этом случае ЦДС⁽⁻⁾ является динамическим *эпигеном*, в котором часть наследственной информации хранится, кодируется и передается потомству вне первичной структуры молекул ДНК генома (Чураев, 1975). Использование при конструировании хорошо охарактеризованных генетических элементов, простая структура и наличие обратных связей, стабилизирующих систему, делают искусственные ЦДС⁽⁻⁾ удобным объектом для изучения основных закономерностей возникновения фенотипической гетерогенности в популяции генетически однородных клеток.



Цель работы – исследовать возможность индукции наследуемой эпигенетической гетерогенности в клональной популяции клеток *Escherichia coli*, содержащих искусственные циклические системы генов.

Задачи исследования:

1. Исследовать стабильность наследования каждого из альтернативных фенотипов клеток, содержащих циклические дигенные системы с отрицательными обратными связями в процессе роста периодической культуры.

2. Исследовать фенотипический состав популяции клеток, содержащих ЦДС⁽⁻⁾ и циклическую моногенную систему с отрицательной обратной связью в процессе роста периодической культуры.

3. Проверить возможность расщепления клональной популяции клеток *E. coli*, содержащих ЦДС⁽⁻⁾, на две фенотипически различающихся субпопуляции в отсутствие специфических индуцирующих факторов.

4. Поставить эксперимент по одновременному воздействию двух индуцирующих факторов на клетки, содержащие ЦДС⁽⁻⁾, для проверки гипотезы о существовании метастабильного состояния.

5. Исследовать влияние метаболизма клетки в момент воздействия индукторов на соотношение альтернативных субпопуляций клеток в дальнейшем.

Научная новизна исследования. Обнаружена возможность переключения функциональных состояний ЦДС⁽⁻⁾ изменением скорости роста культуры. Впервые установлено, что клетка, содержащая динамический эпиген, может при делении образовать дочерние клетки, детерминированные к альтернативному фенотипу. Экспериментально показано новое свойство динамического эпигена: возможность перехода в метастабильное состояние под воздействием внешних факторов. Впервые получена экспериментальная модель одного из молекулярных механизмов детерминации клеток к самодифференцировке.

Научно-практическая значимость работы. Исследование эпигенетических механизмов возникновения фенотипической гетерогенности в изначально гомогенной популяции создает основу для разработки систем управления клеточными процессами. В биотехнологии управление структурой популяции, т.е.

поддержание необходимых фенотипических разновидностей клеток в необходимых пропорциях, позволит контролировать скорость процесса и варьировать на разных этапах соотношение синтезируемых продуктов. Поскольку многие мультифакторные признаки с изменчивой пенетрантностью (частотой проявления признака), возможно, имеют эпигенетическую основу, понимание причин разного уровня экспрессии генов в генетически однородных клетках необходимо для достоверной интерпретации результатов генетического анализа.

Апробация работы. Результаты исследования были представлены на III съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Москва, 2004), международной научной конференции «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология» (Минск, 2005), 9 и 10 Пушкинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2005, 2006).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 работ.

Структура и объём диссертации. Работа изложена на 110 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания методов и материалов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 200 источников. Диссертация иллюстрирована 2 схемами, 14 графиками и 28 фотографиями.

Благодарности. Считаю своей приятной обязанностью выразить признательность моему научному руководителю д.б.н. проф Чураеву Р.Н., сотрудникам института биологии н.с. Ступак И.В., к.б.н. Галимзянову А.В., к.б.н. Галимзяновой Н.Ф., к.б.н. Миграновой И.Г., м.н.с. Тропыниной Т.С.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Исследования проводились на клетках *E.coli* штамма JC158 (*Hfr P01, thi1, serA6, lacI22, relA1*) (Murphy, Pembroke, 1995), трансформированных плазмидами pCIK3 и/или pLACI. Плазмида pCIK3 (предоставлена Дж. Коллинзом (J.J. Collins, Boston University, USA)) содержит ЦДС⁽⁻⁾ (рис. 1А), плазмида pLACI - ЦМС⁽⁻⁾ (рис. 1Б).

Методы исследования. Клетки культивировали в богатой среде LB или в минимальной среде M9 с казаминовыми кислотами и 40мМ источником

углерода (глюкоза, ацетат натрия) с добавлением необходимых для поддержания плазмид антибиотиков, при 30°C или 42°C (Миллер, 1976). Логарифмическую фазу роста поддерживали периодическими разведениями свежей средой, оптическая плотность культуры составляла 0.04-0.4 ед. при длине волны 600нм (D_{600}). Рост клеток в периодической культуре исследовали на протяжении 24 часов, начиная с $D_{600} = 0,04-0,08$. Для индукции экспрессии с P_{lac} -промотора использовали изопропил- β -D-тиогаляктозид (ИПТГ) в концентрации 1мМ. Бактериальные клетки синтезирующие β -галактозидазу выявляли на чашках Петри со средой LB, содержащей 40 мкг/мл хромогенного субстрата X-Gal (Миллер, 1976). Активность β -галактозидазы оценивали при помощи хромогенного субстрата о-нитрофенил- β -D-галактозида (ОНФГ) и вычисляли в условных единицах по следующей формуле: $1000 \cdot D_{400} / (t \cdot v \cdot D_{600})$, где D_{400} - измеренные значения для реакционной смеси, D_{600} отражает плотность клеточной суспензии перед определением, t - время реакции в мин и v - объем пробы культуры, взятой для определения, в мл (Миллер, 1976). Полученная величина пропорциональна увеличению количества о-нитрофенола в минуту на одну бактериальную клетку. Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса (Харди, 1990). Трансформацию проводили по оригинальной методике, основанной на прописях, предложенных в работах Ханаана (1988) и Perbal (1988).

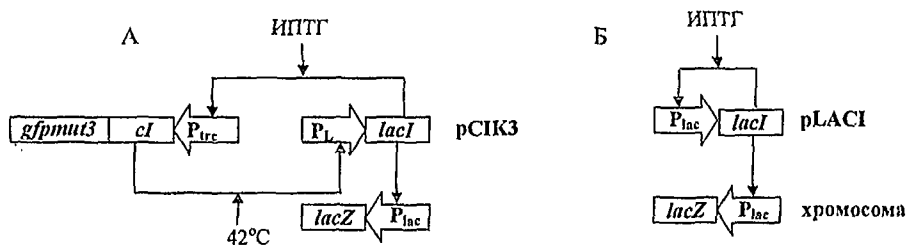


Рис. 1. Схемы искусственных генных сетей, используемых в работе.

А. Сеть, состоящая из циклической дигенной системы с отрицательными обратными связями, локализованной на плазмиде pCIK3 и маркерного гена *lacZ* на хромосоме. Б. Циклическая моногенная система с отрицательной обратной связью, локализованная на плазмиде pLACI.

Статистический анализ. Статистическую обработку проводили в программе Microsoft Excel. На графиках приведены средние данные из серии однотипных экспериментов (не менее трех повторностей). Принадлежность данных, полученных в экспериментах серии, к одной генеральной совокупности проверяли по критерию χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Циклическая дигенная система с отрицательными обратными связями (ЦДС⁽⁻⁾), локализованная на плазмиде pCIK3 (рис. 1А), содержит ген *lacI* *E.coli* под контролем модифицированного промотора P_L фага λ (Gardner et al., 2000) и ген *cI*₈₅₇ термочувствительного репрессора бактериофага λ под контролем промотора P_{trc}, являющегося синтетическим аналогом P_{lac}. Эти гены кодируют регуляторные белки LacI и CI. Так как CI репрессирует P_L промотор, а LacI репрессирует P_{trc} промотор, ЦДС⁽⁻⁾ может находиться в двух стабильных функциональных состояниях: в одном высокий уровень экспрессии гена *cI* и низкий уровень экспрессии гена *lacI* (эпигенотип *lacI*⁰*cI*¹), в другом высокий уровень экспрессии гена *lacI* и низкий - гена *cI* (эпигенотип *lacI*¹*cI*⁰). Система переключается между устойчивыми эпигенотипами внешними метаболическим (ИПТГ) и температурным (42°C) индукторами.

Клетки *E. coli* штамма JC158, синтезируют функционально неактивный репрессор лактозного оперона (LacI), поэтому в клетках JC158(pCIK3) репрессия гена *LacZ* происходит только за счет Lac-репрессора, синтезируемого с плазмиды: клетки с эпигенотипом *lacI*⁰*cI*¹ образуют синие колонии, *lacI*¹*cI*⁰ – белые. Рассевом клеток, находившихся под действием одного из индуцирующих факторов, на чашки с X-Gal без ИПТГ с последующей инкубацией при 30°C было показано: 1) приобретенный под действием индуцирующих факторов эпигенотип поддерживается в процессе роста колонии; 2) при экспоненциальном росте культуры в жидкой среде в отсутствие

индуцирующих факторов, клетки стабильно поддерживают эпигенотип, приобретенный ранее.

Наследование эпигенотипов клетками JC158(pCIK3) в периодической культуре в отсутствие индуцирующих факторов

При периодическом культивировании бактериальных клеток (культивирование в закрытой системе) скорость роста культуры после окончания экспоненциального роста постепенно уменьшается, снижаясь до нуля к стационарной фазе. Замедление скорости роста культуры приводит к увеличению в клетке концентрации как циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), так и белка-активатора катаболитных оперонов (БАК). Комплекс БАК-цАМФ активирует транскрипцию с *lac*-промотора дикого типа. Следовательно, при периодическом культивировании активность β -галактозидазы будет постепенно возрастать. Присутствие в среде культивирования глюкозы снижает концентрацию цАМФ в клетке, что приводит к падению уровня транскрипции с лактозного промотора.

Был поставлен следующий эксперимент. Культура JC158 или JC158(pCIK3) росла 14-16 часов на одной из сред: LB, M9 с глюкозой или M9 с ацетатом натрия. Штамм JC158(pCIK3) культивировался или при 42°C, или в присутствии ИПТГ при 30°C, для перевода клеток в соответствующий эпигенотип. Затем клетками засеивали свежую среду (50 мл) до $D_{600} = 0,002$. Культура росла при 30°C. Образцы для измерения оптической плотности и активности β -галактозидазы забирали каждый час, начиная с $D_{600}=0,04-0,08$, на протяжении 7 часов и через 24 часа после первой пробы. Клетки культуры JC158(pCIK3) высевали каждый час на чашки Петри с X-Gal с последующей инкубацией при 30°C. Результаты показали, что активность β -галактозидазы за исследованный период роста культуры в среде LB возрастает от 500 ± 50 до 6400 ± 500 ед. (рис. 2), в минимальной среде с глюкозой от 600 ± 100 до 1800 ± 300 ед. (рис. 3). В минимальной среде с ацетатом натрия от 3000 ± 100 до 7100 ± 300 ед. (рис. 4). В культуре JC158(pCIK3), предварительно индуцированной к

эпигенотипу $lacI^0cl^I$, на средах LB и M9 с глюкозой в экспоненциальной фазе роста в промежутке D_{600} 0,04 – 0,12 активность β -галактозидазы практически совпадает со значениями для культуры JC158. В последующем скорость накопления фермента уменьшается и максимальные значения активности β -галактозидазы в среде LB – 4300 ± 500 ед., в среде M9 с глюкозой – 800 ± 200 ед. При росте культуры JC158(pCIK3) в среде M9 с ацетатом натрия активность β -галактозидазы изменяется от 1000 ± 100 до 2500 ± 200 ед. Как показали рассевы клеток на чашки, эпигенотип $lacI^0cl^I$ стабильно поддерживается клетками на всем протяжении роста культуры. В культуре JC158(pCIK3), предварительно индуцированной к эпигенотипу $lacI^Icl^0$, активность β -галактозидазы увеличивалась за время культивирования от 1 до 10 ± 2 ед. на LB (рис. 2), до 6 ± 1 ед. – на M9 с глюкозой (рис. 3) и до 170 ± 30 ед. (рис. 4) – на среде M9 с ацетатом натрия.

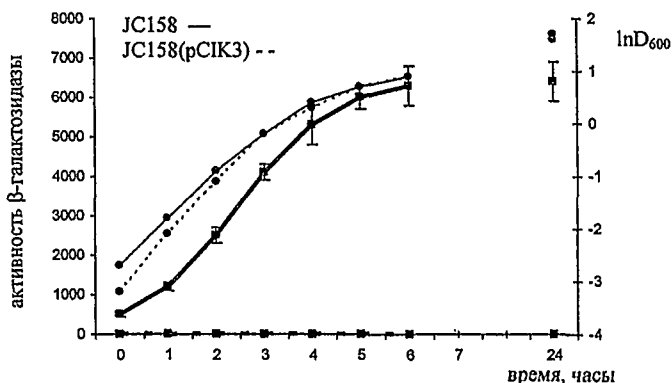


Рис. 2. Периодическая культура клеток JC158 и клеток JC158(pCIK3), с эпигенотипом $lacI^Icl^0$ в среде LB.

Кривые роста - тонкая линия, изменение активности β -галактозидазы - жирная линия.

При расसेве первых шести проб клеток (0 часов – 5 часов эксперимента), культивировавшихся в среде LB, появляются только белые колонии, при расसेве клеток пробы “6 часов” – 1% секторных колоний (состоящих из синих и

белых секторов), пробы "24 часа" – $30 \pm 5\%$ белых, $35 \pm 5\%$ синих и $35 \pm 5\%$ секторных колоний.

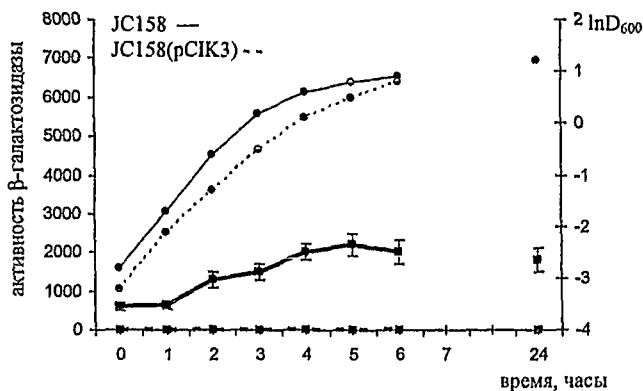


Рис. 3. Периодическая культура клеток JC158 и клеток JC158(pCIK3), с эпигенотипом *lacI' cl⁰* в среде M9 с глюкозой.

Кривые роста - тонкая линия, изменение активности β-галактозидазы - жирная линия.

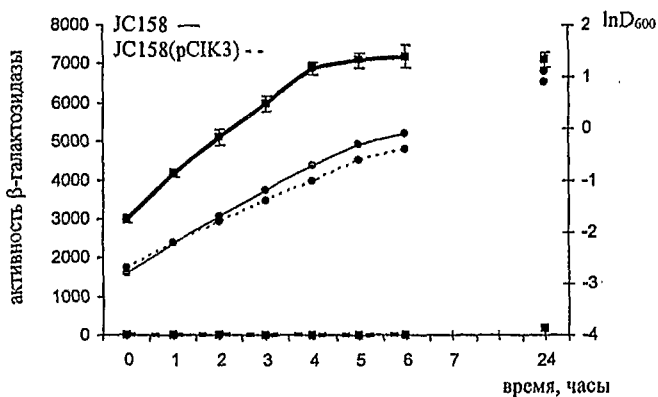


Рис. 4. Периодическая культура клеток JC158 и клеток JC158(pCIK3), с эпигенотипом *lacI' cl⁰* в среде M9 с ацетатом натрия.

Кривые роста - тонкая линия, изменение активности β-галактозидазы - жирная линия.

При периодическом культивировании на среде М9 с глюкозой клетки проб "0 – 5 часов" также дают начало белым колониям в 100%, а при рассеве пробы "6 часов" появляется 1% секторных колоний. Через 24 часа после начала эксперимента клетки периодической культуры образуют на чашках 95% белых и 5% синих и секторных колоний. В периодической культуре на среде М9 с ацетатом натрия уже через 2 часа после начала эксперимента появляются клетки, образующие на чашках синие (1%) и секторные колонии (5%). Через семь часов после начала эксперимента при посеве образуется $50 \pm 10\%$ синих, $10 \pm 5\%$ секторных и $40 \pm 10\%$ белых колоний; через 24 часа – $70 \pm 10\%$ синих, $5 \pm 2\%$ секторных и $25 \pm 10\%$ белых колоний.

Более низкие значения активности β -галактозидазы в клетках штамма JC158(pCIK3) с эпигенотипом $lacI^p cl^I$, вероятнее всего, объясняются наличием в клетках некоторого количества репрессора LacI, причем, как следует из графиков изменения активности, при замедлении скорости роста культуры его содержание в клетке увеличивается. Однако, как показывают рассевы, содержание репрессора в клетке не достигает значений, достаточных для изменения эпигенотипа. Изменения активности в клетках JC158(pCIK3) с эпигенотипом $lacI^p cl^p$ при росте на средах LB и М9 с глюкозой, в общем, соответствуют накоплению β -галактозидазы в клетках за счет активации транскрипции комплексом БАК-цАМФ. Поэтому можно предположить, что в жидкой культуре практически все клетки фенотипически однородны. С другой стороны, при расसेве на чашки проб 6ч и 24ч появляются секторные и синие колонии. Следовательно, к этому времени, несмотря на фенотипическую однородность, в части клеток периодической культуры изменилось соотношение молекул белков-репрессоров. Поскольку даже в клетках с эпигенотипом $lacI^p cl^I$ количество репрессора LacI в процессе роста периодической культуры увеличивается, то в данном случае соотношение белков изменяется за счет увеличения концентрации репрессора CI. При периодическом культивировании клеток JC158(pCIK3) на среде М9 с ацетатом натрия к стационарной фазе активность β -галактозидазы возрастает в 170 раз по сравнению с экспоненциальной фазой роста, что в 17 раз превышает

ожидаемое значение. Объяснить данные результаты можно только тем, что медленный рост в среде М9 с ацетатом натрия приводит к появлению клеток с альтернативным фенотипом в процессе роста культуры.

Рассев клеток на чашки позволяет непосредственно увидеть процессы, происходящие в бактериальной популяции. Очень интересны в этом отношении секторные колонии. Фенотипически различающиеся сектора соответствуют разным субпопуляциям в потомстве одной клетки (Олескин и др., 2000). В наших экспериментах сектора колоний образованы клетками с разными эпигенотипами: синие участки колоний – $lacI^Rcl^I$, белые участки – $lacI^Icl^R$. Следовательно, к моменту посева на агаризованную среду в клетке установилось такое соотношение репрессоров, что в результате случайного распределения молекул и флуктуаций в концентрации белков при последующих делениях появились дочерние клетки, детерминированные к альтернативным эпигенотипам, т.е. клетка находилась в метастабильном состоянии (Tchuraev, 2006).

Наследование эпигенотипов клетками JC158(pCIK3/pLACI) в периодической культуре в отсутствие индуцирующих факторов

В экспериментах была использована циклическая моногенная система с отрицательной обратной связью (ЦМС⁽⁻⁾), состоящая из гена *lacI*, помещенного под промотор лактозного оперона дикого типа (P_{lac}), т.е. белок LacI негативно регулирует транскрипцию своего гена (рис. 1Б). По литературным данным известно, что ЦМС⁽⁻⁾ образует авторегуляторную систему, предотвращающую сверхэкспрессию гена (Rosenfeld et al., 2002). В штамме JC158(pLACI) изменение скорости роста должно приводить к изменению скорости транскрипции как в лактозном опероне на хромосоме, так в ЦМС⁽⁻⁾ на плазмиде. Однако авторегуляция синтеза LacI в ЦМС⁽⁻⁾, должна стабилизировать содержание репрессора в клетке. Для проведения последующих экспериментов в штамм JC158(pCIK) котрансформировали плазмиду pLACI. При этом в клетке образуется искусственная генетическая сеть, состоящая из циклической дигенной системы с отрицательной обратной связью и ЦМС⁽⁻⁾.

Для клеток штаммов JC158(pLACI) и JC158(pCIK3/pLACI) был поставлен описанный выше эксперимент с использованием сред LB и M9 с глюкозой. Было показано, что в штамме JC158(pLACI) уровень активности β -галактозидазы в процессе роста периодической культуры на этих средах увеличивается в линейной фазе роста в 3 раза по сравнению с экспоненциальной и вновь опускается в стационарной фазе. Следовательно, в данном случае репрессор, негативно регулирующий собственный синтез, стабилизирует содержание в клетке продукта, регулируемого им гена, даже в присутствии активатора транскрипции. В культуре JC158(pCIK3/pLACI), предварительно индуцированной к эпигенотипу $lacI^0cl^1$ активность β -галактозидазы колеблется около 170 ед. на среде LB и около 140 ед. на среде M9 с глюкозой. В культуре, предварительно индуцированной к эпигенотипу $lacI^1cl^0$ активность β -галактозидазы возрастает от 2 до 15 ± 5 ед. на среде LB и от 10 ± 1 до 30 ± 5 ед., с последующим снижением в стационарной фазе до 10 ед., на среде M9 с глюкозой. При расसेве клеток периодической культуры, ранее индуцированных к эпигенотипу $lacI^0cl^1$ на всех фазах роста на чашках наряду с синими колониями образовывалось $10 \pm 5\%$ белых. При рассеве клеток периодической культуры, ранее индуцированных к эпигенотипу $lacI^1cl^0$ на всех фазах роста, на чашках образовывалось $45 \pm 20\%$ синих, столько же белых и $10 \pm 5\%$ секторных колоний.

Таким образом, в культуре JC158(pCIK3)(pLACI) при периодическом культивировании на всех фазах роста присутствуют клетки, детерминированные к альтернативным фенотипам. Вероятнее всего, последнее связано с увеличением частоты спонтанных переключений между эпигенотипами.

Изменение эпигенетического состава популяции клеток JC158(pCIK3) под действием индуцирующих факторов

Можно предположить, что в результате флуктуаций в концентрации регуляторных белков, клетки будут переключаться под действием индуцирующих факторов из одного стабильного эпигенотипа в другой не одновременно. И,

следовательно, при ограниченном времени воздействия индуцирующего фактора, популяция разделится на две субпопуляции.

Культуру подращивали 14-16 ч в условиях, необходимых для перевода клеток в эпигенотип $lacI^0cl^1$ или в эпигенотип $lacI^1cl^0$. Далее часть культуры переводили в экспоненциальную фазу, пересевом в свежую среду при тех же условиях на 2 часа. Затем клетки с эпигенотипом $lacI^0cl^1$ пересевались в среду без ИПТГ и росли при 42°C, а клетки с эпигенотипом $lacI^1cl^0$ пересевались в среду с ИПТГ и росли при 30°C. После пересева культуру поддерживали в экспоненциальной фазе. Клетки высевали на чашки из ночной культуры (чашка 0) и через 2, 4, 6 часов экспоненциального роста после пересева в свежую среду. На чашках колонии росли при 30°C без ИПТГ на протяжении 24 ч.

Были получены следующие результаты. При высеве на чашки клеток, находившихся в процессе переключения из $lacI^0cl^1$ в $lacI^1cl^0$, динамика изменения соотношения фенотипов колоний практически не зависела от фазы роста культуры, используемой для переключения (рис. 5).

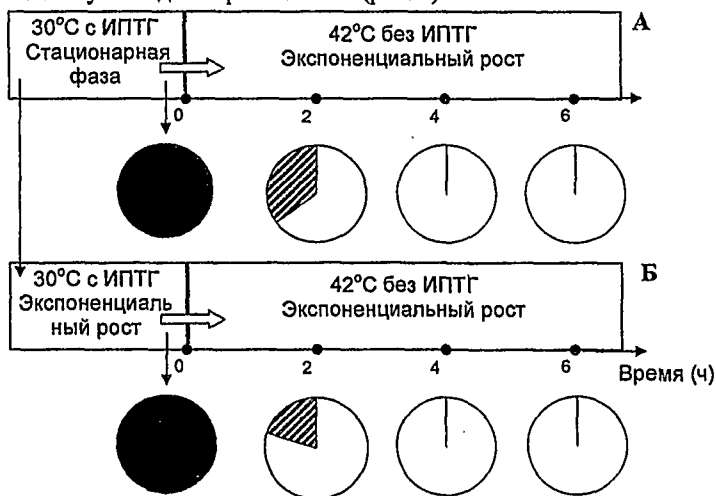


Рис. 5. Соотношение фенотипов колоний на чашке при переходе из эпигенотипа $lacI^0cl^1$ в эпигенотип $lacI^1cl^0$.

Клетки JC158 (рСИКЗ) были посеяны на чашки после указанного периода роста в жидкой культуре при 42°C без ИПТГ. Для переключения была использована культура в стационарной (А) или экспоненциальной фазе роста (Б). $\blacksquare$ - синие, $\square$ - секторные, $\square$ - белые колонии.

Через два часа экспоненциального роста при 42°C без ИПТГ при посеве на чашки клетки образуют белые и секторные колонии (секторных 30±10%, при использовании для переключения культуры *lacI⁰cl¹* в стационарной фазе роста; 20±5% при использовании культуры в экспоненциальной фазе). Через четыре часа все колонии белые.

Динамика переключения клеток с эпигенотипом *lacI¹cl⁰* в *lacI⁰cl¹* (рис. 6) зависела от фазы роста культуры, используемой для переключения. Если клетки были инокулированы в свежую среду (30°C с ИПТГ) непосредственно из 16 часовой культуры (42°C без ИПТГ), то через два часа экспоненциального роста при посеве на чашке образуются синие (20±5%), секторные (40±10%) и белые (40±10%) колонии; через четыре часа – секторные (5±2%) и синие (95±2%); через 6 часов роста – все колонии синие.

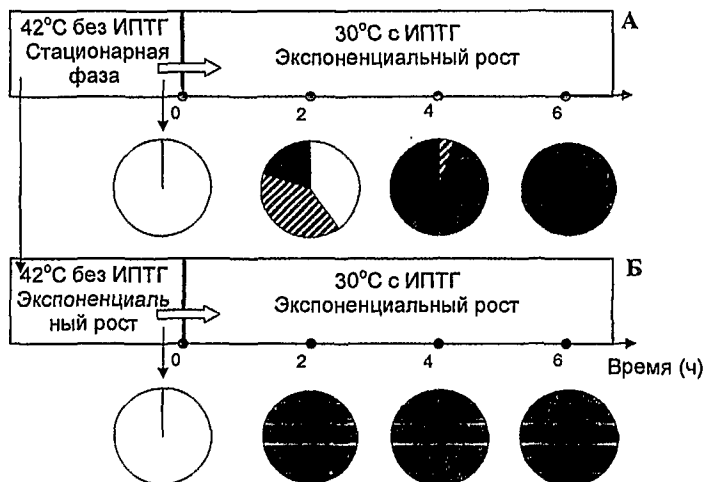


Рис. 6. Соотношение фенотипов колоний на чашке при переходе из эпигенотипа *lacI¹cl⁰* в эпигенотип *lacI⁰cl¹*.

Клетки культуры JC158 (pC1K3) были посеяны на чашки после указанного периода роста в жидкой культуре при 30°C с ИПТГ. Для переключения была использована культура в стационарной (А) или экспоненциальной фазе роста (Б). □ - синие, ▨ - секторные, □ - белые колонии.

Если клетки 16 часовой культуры (42°C без ИПТГ) разводили свежей средой и инкубировали 2 часа в тех же условиях (культура переходила в

экспоненциальную фазу роста), а затем пересевали в среду с ИПТГ и инкубировали при 30°C, то уже через два часа роста в измененных условиях 99,5-100% клеток при высеве на чашки образуют синие колонии.

Формирование на чашках, засеянных клетками JC158(pCIK3), культивировавшимися в присутствии индуцирующих факторов, колоний с разными фенотипами подтвердило предположение, что при переключении под действием индукторов существует период эпигенетической гетерогенности популяции клеток, содержащих ЦДС⁽⁺⁾. Появление секторных колоний при высеве культуры в процессе переключения свидетельствует о том, что клетки при смене эпигенотипа проходят через метастабильное состояние. Кроме того, было выявлено, что динамика изменения численности субпопуляций и влияние на нее фазы роста культуры, зависит от направления переключения эпигенотипа.

Для того, чтобы после устранения действия ИПТГ на клетки с первоначальным эпигенотипом $lacI^1cl^0$ ген *ci* продолжал экспрессироваться, концентрация связанного с ИПТГ Lac-репрессора к этому моменту должна разбавиться в ряду клеточных делений до значений ниже пороговых. То, что на переключение всех клеток популяции из эпигенотипа $lacI^1cl^0$ в $lacI^0cl^1$ требуется больше времени при использовании культуры в стационарной фазе роста, свидетельствует о более высоком содержании репрессора LacI в части клеток, по сравнению с экспоненциальной фазой роста. Наряду с этим, 20% клеток стационарной фазы переключаются так же, как клетки экспоненциальной фазы роста. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что в клетках стационарной фазы содержание Lac-репрессора существенно варьирует от клетки к клетке, что в свою очередь приводит к различиям в скорости переключения динамического эпигена в разных клетках. Исходя из этого можно отметить, что результаты данного эксперимента не только показали динамику изменения соотношения субпопуляций с разными эпигенотипами в процессе переключения, но и обнаружили, что ЦДС⁽⁺⁾ может использоваться для тестирования изменений клеточного метаболизма. То, что на изменение эпигенотипа $lacI^0cl^1$ на $lacI^1cl^0$ под действием температуры 42°C практически не влияет фаза роста культуры (рис. 5),

вероятно связано с механизмом данного переключения. Эпимутация в этом случае происходит в результате распада димеров температурочувствительного репрессора CI до мономеров и поэтому не зависит от концентрации белка CI в клетке. Таким образом, если время действия индуцирующего фактора недостаточно для полного переключения культуры, то популяция разделяется на две фенотипически различающихся субпопуляции, соответствующих эпигенотипам $lacI^0cl^1$ и $lacI^1cl^0$. Длительность периода эпигенетической гетерогенности популяции в процессе переключения из одного устойчивого эпигенотипа в другой, при воздействии индуцирующего фактора, определяется не только стохастическими процессами, но и характером индуктора.

Динамика перехода клеток, содержащих ЦДС^(с) из метастабильного состояния в стабильные

Для перевода клеток в метастабильное состояние выращивали культуру в среде с ИПТГ при 42°C 14-16 ч. При этом в клетке синтезируется как репрессор CI, так и репрессор LacI. Далее клетки экспоненциально росли в среде без ИПТГ при 30°C. Клетки высевали на чашки из 16 часовой культуры (чашка 0 ч) и затем каждые 2 часа после устранения индукторов (чашки 2ч, 4ч, 6ч). Были получены следующие результаты. Клетки 16 часовой культуры при посеве на чашки (0ч) дали начало секторным (15±5%) и белым (85±5%) колониям. Клетки, пересейанные в свежую среду без ИПТГ при 30°C, через два часа экспоненциального роста при посеве на чашки образовали 70±10% белых, 25±10% секторных и 5±2% синих колоний, через четыре часа 75±10% белых, 5±2% секторных и 20±10% синих, через 6 часов - 85±10% белых и 15±10% синих (рис. 7А). Этот же эксперимент был поставлен и в другом варианте. Культуру, с эпигенотипом $lacI^1cl^1$ сначала переводили в экспоненциальную фазу роста, пересевая 16 часовую культуру в свежую среду и 2 часа подращивая в тех же условиях и, лишь затем, пересевали клетки в среду без ИПТГ при 30°C. Эксперимент продолжали, как описано выше. При посеве на чашки клеток культуры, экспоненциально растущей при 42°C в присутствии ИПТГ, образуются белые (70±10%), секторные (20±10%) и синие (10±5%) колонии. После пересева культуры в среду без индукторов через 2 часа

роста при посеве на чашки $98 \pm 1\%$ колоний синие, $1 \pm 0,5\%$ белые, $1 \pm 0,5\%$ секторные, через 4 часа и через 6 часов 99,5-100% колоний синие (рис. 7Б).

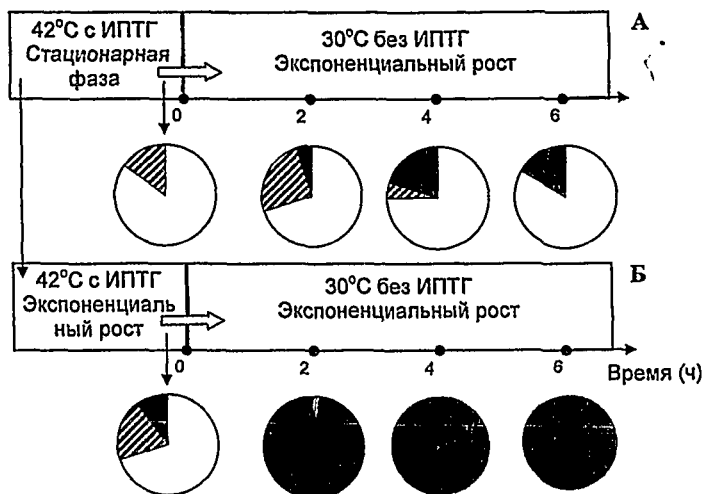


Рис. 7. Соотношение фенотипов колоний на чашке при переходе из неустойчивого эпигенотипа $lacI^+cl^+$, через метастабильный эпигенотип $lacI^0cl^0$, в стабильные состояния.

Клетки JC158 (рСІК3) были посеяны на чашки после указанного периода роста в жидкой культуре при 30°C без ИПТГ. Для переключения была использована культура в стационарной (А) или экспоненциальной фазе роста (Б). ■ - синие колонии, ▨ - секторные колонии, □ - белые колонии.

Эксперименты выявили влияние фазы роста культуры на соотношение субпопуляций фенотипически различающихся клеток после устранения индуцирующих факторов. Если культура в момент устранения индуцирующих факторов находилась в стационарной фазе роста, то на всех чашках при посеве присутствовали как белые, так и синие клетки (синие клетки на чашке 0ч находятся в секторных колониях). Клетки, способные давать начало секторным колониям, исчезают из популяции лишь спустя 6 часов роста в жидкой среде в отсутствие индукторов, значит, все это время в популяции присутствуют клетки с неустойчивым эпигенотипом. Если культура в момент устранения индуцирующих факторов находилась в экспоненциальной фазе роста, то синие колонии появляются наряду с секторными и белыми уже на чашке 0ч. В результате

дальнейшего роста в жидкой среде без индукторов, до 100% клеток приобретает эпигенотип $lacI^0cl^1$. Эти данные показывают, что на соотношение субпопуляций после устранения действия индукторов влияет не только фаза роста культуры, но и последующие условия роста. Рост в жидкой среде после устранения воздействия температуры 42°C и ИПТГ на культуру, находящуюся в экспоненциальной фазе роста, приводит к тому, что через 4 часа клетки переходят в практически однородную популяцию с эпигенотипом $lacI^0cl^1$. А при высеве клеток той же культуры на агаризованную среду без индукторов образуется две субпопуляции клеток: $lacI^1cl^0$ и $lacI^0cl^1$.

Зависимость соотношения фенотипов клеток от фазы роста культуры на момент устранения действия индукторов

Было исследовано, как время экспоненциального роста в присутствии ИПТГ при 42°C, после пересева клеток из 16 часовой культуры с теми же условиями, влияет на соотношение эпигенотипов клеток в популяции при последующем росте в жидкой культуре в отсутствие индуцирующих факторов. Клетки 16 часовой культуры (42°C, ИПТГ) отмывали и разводили свежей средой с ИПТГ. Далее культура росла экспоненциально 35, 70, 105 или 140 мин при температуре 42°C. Клетки каждого варианта переносили в среду без ИПТГ и 6 часов поддерживали экспоненциальный рост при 30°C. Через 6 часов клетки высевали на чашки (ИПТГ, 30°C). Результаты представлены на рис. 8. Эксперименты показали, что чем больше делений проходит после пересева клеток из 16 часовой культуры в свежую среду в присутствии двух индуцирующих факторов, тем больше клеток с эпигенотипом $lacI^0cl^1$ окажется в популяции через 6 часов роста в жидкой среде после устранения индукторов.

При пересеве клеток стационарной фазы в свежую среду, метаболизм клетки активизируется и после непродолжительной лаг-фазы начинается экспоненциальный рост. При этом клетка претерпевает столь разнообразные изменения, что синхронность процессов в разных клетках невозможна и, в результате, концентрации белков существенно варьируют от клетки к клетке. Это приводит к различному соотношению регуляторных белков CI и $LacI$ в каждой

отдельной клетке. Полученные нами результаты позволяют предположить, что эпигенетические системы (в частности ЦДС⁽⁻⁾) могут обеспечивать фенотипическое разнообразие в генетически однородной популяции, закрепляя флуктуации в количестве регуляторных белков, вызванные изменениями условий существования клетки.

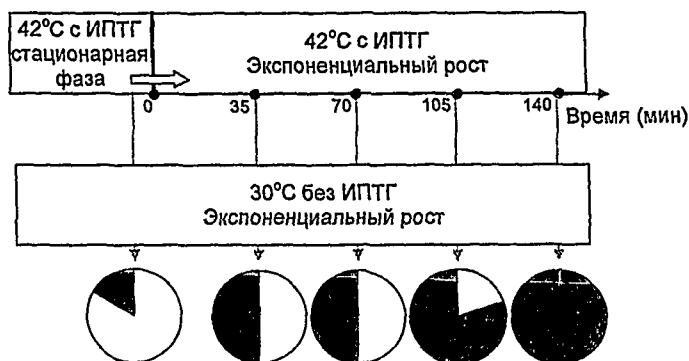


Рис. 8. Зависимость между соотношением белых и синих колоний JC158 (pCIK3) и временем культивирования в свежей среде с ИПТГ при 42°C.

Клетки 16 часовой культуры (42 °C, ИПТГ) пересевали в свежую среду с ИПТГ и культивировали при 42 °C от 0 до 140 мин. Затем клетки были переселены в свежую среду без ИПТГ (30°C) и спустя 6 часов посеяны на чашки. □ - синие колонии, ■ - белые колонии.

Заключение

В присутствии двух индуцирующих факторов (42°C и ИПТГ) циклическая дигенная система с отрицательными обратными связями (ЦДС⁽⁻⁾), состоящая из блоков $P_L lacI$ и $P_{lac} cI$, обеспечивает одновременный синтез репрессоров LacI и CI. Устранение индуцирующих факторов приводит к появлению в культуре двух субпопуляций клеток с разным уровнем синтеза β -галактозидазы, что свидетельствует о прохождении ЦДС⁽⁻⁾ метастабильного состояния, из которого циклическая система может перейти в каждый из двух устойчивых эпигенотипов - $lacI^l cI^0$ и $lacI^0 cI^l$. Существование метастабильного состояния наглядно демонстрируется секторными колониями, являющимися результатом появления

дочерних клеток, детерминированных к разным фенотипам за счет флуктуаций количества регуляторных белков при делении клетки. Секторные колонии можно наблюдать не только при посеве культуры, подвергшейся одновременному воздействию двух индуцирующих факторов, но и при посеве культуры, индуцированной к переключению в альтернативный эпигенотип. Следовательно, клетка, содержащая ЦДС⁽⁻⁾, в процессе переключения из одного эпигенотипа в другой проходит метастабильное состояние. Перевести клетки в метастабильное состояние можно и без воздействия специфических индуцирующих факторов - изменением скорости роста культуры, что также приводит к изменению соотношения белков-репрессоров, кодируемых ЦДС⁽⁻⁾. В результате фенотипически однородные клетки при последующем пересеве в свежую среду образуют фенотипически различающиеся дочерние клетки.

Таким образом, во всех случаях возникновение гетерогенности популяции связано со стохастическими процессами, приводящими к несколько различающимся концентрациям белков-репрессоров в отдельных клетках, и с флуктуациями в распределении белков при делении клетки, находящейся в метастабильном состоянии. Соотношение численности субпопуляций клеток определяется условиями роста культуры в момент перехода из метастабильного состояния в устойчивые эпигенотипы. Так, проведенные эксперименты показали, что при росте на агаризованной среде и при росте в жидкой культуре устанавливается разное соотношение субпопуляций, кроме того, соотношение зависит от фазы роста культуры в момент устранения индукторов.

Введение в клетку, содержащую ЦДС⁽⁻⁾, циклической моногенной системы с отрицательной обратной связью приводит к изменению как базального, так и максимального уровня репрессоров LacI и CI в клетке, что поддерживает фенотипическую гетерогенность, увеличивая частоту спонтанных переключений.

Выводы

1. Расщепление популяции клеток *E.coli*, содержащих циклическую дигенную систему с отрицательными обратными связями (ЦДС⁽⁻⁾), на две фенотипически различающихся субпопуляции индуцируется одновременным воздействием двух специфических индуцирующих факторов или непродолжительным воздействием одного, а также изменением скорости роста культуры.

2. Возникновение двух субпопуляций в потомстве одной клетки *E.coli*, содержащей ЦДС⁽⁻⁾, является результатом перехода циклической системы в метастабильное состояние в присутствии двух репрессоров.

3. На соотношение субпопуляций влияют фаза роста культуры *E.coli* в момент перехода клеток в метастабильное состояние и последующие условия роста.

4. Так как две субпопуляции появляются в отсутствии внешнего воздействия, то этот процесс является экспериментальной моделью одного из возможных молекулярных механизмов детерминации клеток к самодифференцировке.

5. Введение в клетку *E.coli*, содержащую циклическую дигенную систему, циклической моногенной системы, обеспечивающей стабильный уровень одного из белков-репрессоров, изменяет соотношение репрессоров, во всех эпигенотипах и поддерживает фенотипическую гетерогенность культуры.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ступак И.В., Ступак Е.Э., Чураев Р.Н. Анализ функциональных состояний векторной эпигенной конструкции. // Материалы 3 съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. – Москва, 2004. – С. 411.
2. Ступак Е.Э., Ступак И.В. Влияние особенностей синтеза репрессора на уровень экспрессии контролируемого им гена в периодической культуре *E. coli* // Биология – наука XXI века. 9 Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых. Сб. тезисов. – Пушино, 2005. – С. 55.

3. Ступак Е.Э., Ступак И.В. Искусственные генетические триггеры // Материалы международной научной конференции «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология». Т.1. – Минск, 2005. – С. 114.
4. Чураев Р.Н., Ступак Е.Э., Ступак И.В., Галимзянов А.В. Новое свойство эпигенов: метастабильные эпигенотипы // ДАН.–2006.–Т. 406, № 4.–С. 570-573.
5. Stupak E.E., Stupak I.V. Inheritance and state switching of genetic toggle switch in different culture growth phases // FEMS Microbiol Lett.– 2006.– V. 258.– P. 37–42.
6. Ступак Е.Э., Ступак И.В. Управление соотношением численности субпопуляций клеток *E.coli*, содержащих циклическую дигенную систему // Биология – наука XXI века. 10 Пущинская школа-конференция молодых ученых. Сб. тезисов. – Пущино, 2006.



Отпечатано с готовых диапозитивов в ООО «Принт+»,
заказ № 83 , тираж 100 шт, 450054, пр. Октября, 71

2006A
21742

221742