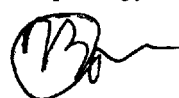


На правах рукописи



Ступак Игорь Валериевич

**ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ
В ПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI*,
СОДЕРЖАЩИХ ЦИКЛИЧЕСКИЕ ДИГЕННЫЕ СИСТЕМЫ**

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
Блинов Александр Геннадьевич

Ведущая организация: Казанский государственный университет

Защита состоится 5 июля 2006 г., в 16 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 3 июня 2006 г.

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



Бикбулатова С.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изменчивость является одной из фундаментальных характеристик живых систем. В последнее время, кроме наследственной и ненаследственной (модификационной) изменчивости стали выделять эпигенетическую изменчивость, объединяющую явления, основанные на различных механизмах и не укладывающиеся в традиционные представления. Возобновился интерес к, казалось бы, давно забытой проблеме наследования приобретённых признаков (Jablonka, Lamb, 1989; Landman, 1991; Голубовский, 2001); обсуждаются и необычные филогенетические феномены, такие как стресс-индуцируемая эволюция (Маркель, 2000). Более того, формируется новая ветвь генетики – *эпигenetика*, изучающая наследственные изменения генной экспрессии, которые происходят без изменения нуклеотидной последовательности ДНК (Riggs, Porter, 1996; Wolffe, Matzke, 1999).

Одним из механизмов эпигенетической изменчивости является наследование признаков, основанное на регуляторных взаимодействиях в циклических генных сетях. Гипотеза о существовании *эпигенов* – особых наследственных единиц, имеющих не менее двух режимов функционирования подчинённых им генов, способных сохранять каждый из режимов в последовательном ряду поколений, была выдвинута в 1975 году (Чураев, 1975). Существование эпигенов как наследственных единиц следующего уровня сложности, чем гены, было доказано в рамках теоретической математической модели системы управления онтогенезом общего вида (Tchuraev, 2000). Так же было показано наличие бистабильных генетических модулей, имеющих свойства эпигенов (Tchuraev, 2005) в генных сетях, управляющих ранним развитием *Drosophila*.

Одним из классов эпигенов являются циклические системы генов. Экспериментальное изучение функционирования искусственных циклических дигенных систем с отрицательными обратными связями (ЦДС⁽⁻⁾) в клетке, позволяет расширить представление об особенностях эпигенетической изменчивости и оценить влияние внешних и внутренних факторов на устойчивость наследования альтернативных фенотипических состояний.

Цель работы – изучение функционирования ЦДС⁽⁻⁾ в клетках *Escherichia coli*, по фенотипическим изменениям в бактериальных популяциях, подвергшихся действию различных индуцирующих факторов.

Задачи исследования:

1. Конструирование ЦДС⁽⁻⁾, содержащей ген *lacI* под контролем промотора P_L и ген *cI₈₅₇* термочувствительного репрессора бактериофага λ под контролем промотора P_{lac}.

2. Экспериментальное тестирование ожидаемых функциональных свойств полученной рекомбинантной плазмиды.

3. Сравнение свойств ЦДС⁽⁻⁾, отличающихся особенностями регуляторных районов или областями репликации плазмид-носителей.

4. Исследование функционирования ЦДС⁽⁻⁾ в составе трёхгенной системы.

5. Исследование устойчивости режимов работы ЦДС⁽⁻⁾ к стрессовым воздействиям среды.

Научная новизна исследования. Впервые: сконструирована особая наследственная единица (эпиген), которая может кодировать, хранить и передавать в ряду клеточных поколений изменения функционального состояния, вызванные внешними специфическими сигналами, без изменения ДНК-последовательностей входящих в систему генов; исследовано наследование и переключение фенотипов бактериальных клеток, содержащих ЦДС⁽⁻⁾, в процессе роста колонии на индикаторной среде в постоянных условиях; показана зависимость функционирования ЦДС⁽⁻⁾ от области репликации плазмиды носителя; экспериментально смоделировано изменение динамики функционирования генных сетей, при дупликации структурной части одного из генов ЦДС⁽⁻⁾; показано влияние стрессовых факторов на функциональные свойства ЦДС⁽⁻⁾.

Научно-практическая значимость работы. Результаты исследования способствуют пониманию возможной роли ЦДС⁽⁻⁾ в эпигенетической изменчивости, как структуры, реагирующей на внешние временные сигнальные воздействия переключением регуляторных режимов функционирования генов.

Также полученные результаты имеют значение для развития представления о взаимодействии бистабильных модулей клеточной памяти с регуляторными системами клетки. ЦДС⁽⁻⁾ могут быть использованы для управляемого биосинтеза и контроля клеточного роста в биотехнологии. Принимая во внимание, что такие генетические системы по существу представляют ячейку памяти, способную «запоминать» двоичные сигналы, в дальнейшем возможно использование ЦДС⁽⁻⁾ для создания искусственной генной памяти систем управления онтогенезом клетки, а также в генной терапии – для адресного воздействия и включения компенсаторных генов в нужный момент при лечении наследственных заболеваний.

Апробация работы. Результаты исследования были представлены на II (Санкт-Петербург, 2000) и III (Москва, 2004) съездах Вавиловского общества генетиков и селекционеров, 9 и 10 Пушкинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2005), международной научной конференции «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология» (Минск, 2005).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 работ.

Структура и объём диссертации. Работа изложена на 109 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания методов и материалов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 204 источника (47 работ отечественных и 157 работ зарубежных авторов). Диссертация иллюстрирована 2 таблицами, 4 схемами, 7 диаграммами и 23 фотографиями.

Благодарности. Считаю своей приятной обязанностью выразить признательность моему научному руководителю д.б.н. проф Чураеву Р. Н., сотрудникам института биологии м.н.с. Ступак Е. Э., к.б.н. Галимзянову А. В., к.б.н. Галимзяновой Н. Ф., к.б.н. Миграновой И. Г., сотрудникам института Органической химии к.х.н. Астахову С. С., к.х.н. Алябьеву А. С.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Экспериментальную работу проводили на клетках *E.coli* штамма JC158 *Hfr P01, thi1, serA6, lacI22, relA1* (Murphy, Pembroke, 1995), содержащих циклическую дигенную систему с отрицательными обратными связями ($\text{ЦДС}^{(-)}$), локализованную на плаزمидях pCEPI (Tchuraev et al., 2000), pCIA2 или pCIK3 (предоставлены J.J. Collins, Boston University, USA). Для конструирования плазмиды pCEPI были использованы плазмиды pLACcI, pLACI, сконструированные на основе pUCBM 21 («Boehringer Mannheim», Германия), pET-15b («Novagene», США), pCP2 (Камалетдинова и др., 1990).

Методы исследования. Клетки культивировали в средах LB и M9 (Миллер, 1976), с добавлением необходимых для поддержания плазмид антибиотиков, при 30°C или 42°C. Логарифмическую фазу роста поддерживали периодическими разведениями свежей средой, оптическая плотность культуры составляла 0.02–0.3 ед. при длине волны 600 нм. Для индукции экспрессии с P_{lac} -промотора использовали изопропилтио- β -D-галактозид (ИПТГ) в концентрации 1 мМ. Бактериальные клетки, синтезирующие β -галактозидазу, выявляли на чашках Петри со средой LB, содержащей 40 мкг/мл хромогенного субстрата 5-бromo-4-хлоро-3-индолил- β -D-галактопиранозид (X-Gal). Флуоресценцию белка GFP (green fluorescent protein) измеряли на флуориметре MPF-4 фирмы Hitachi на длине волны 508 нм при длине волны возбуждающего света 430 нм.

Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса (Харди, 1990). Трансформацию проводили по оригинальной методике основанной на прописях предложенных в работах (Ханаан, 1988) и (Perbal, 1988). Гидролиз эндонуклеазами рестрикции и лигирование ДНК проводили согласно прописям фирмы-изготовителя ферментов. Одноцепочечные концевые участки фрагментов ДНК для получения тупых концов отщепляли нуклеазой S1 (Головин, 1990). Электрофорез фрагментов плазмидной ДНК проводили в 1% агарозном геле, содержащем 0,01% бромистый этидий (Маниатис и др., 1984). Извлечение ДНК из агарозных гелей проводили стандартным методом (Маниатис и др., 1984).

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили в программе Microsoft Office Excel. На диаграммах представлены 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

Конструирование плазмидных циклических дигенных сетей с отрицательными обратными связями

Для экспериментального исследования циклических дигенных сетей с отрицательными обратными связями (ЦДС⁽⁻⁾) была сконструирована векторная конструкция рСЕР1 (ori ColE1, Ap^r), содержащая ген *lacI* *E. coli* под контролем промотора P_L фага λ и ген *cI*₈₅₇ термочувствительного репрессора бактериофага λ (дальнейшее обозначение *cI*) под контролем промотора P_{lac} (рис. 1).

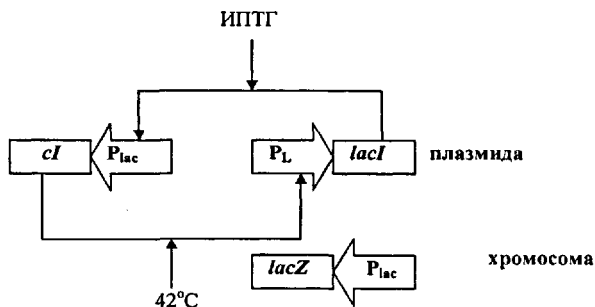


Рис. 1. Схема генной сети, состоящей из циклической дигенной системы с отрицательными обратными связями на плазмиде рСЕР1 и маркерного гена *lacZ* на хромосоме.

Термочувствительный репрессор *CI* подавляет транскрипцию *lacI* гена с P_L промотора и инактивируется температурным воздействием. Лас-репрессор подавляет транскрипцию *cI* гена с P_{lac} промотора и транскрипцию маркерного гена и инактивируется ИППГ

Тестирование функциональной активности плазмиды рСЕPI было проведено в клетках штамма JC158 *E.coli*: на индикаторной среде отбирали колонии трансформантов, устойчивых к ампициллину и имеющих фенотипы: Lac⁻ при 42°C, Lac⁺ при 30°C, Lac⁺ при 42°C с ИПТГ.

Согласно моделям циклической дигенной системы (Чураев, 1975) можно, применительно ЦДС⁽⁻⁾, локализованной на плазмиде рСЕPI, ожидать существование двух устойчивых эпигенотипов *lacI⁰cl¹* и *lacI¹cl⁰*, которые проявляются на чашках с X-Gal по экспрессии маркерного гена *lacZ*, как альтернативные фенотипы: Lac⁺ (синяя окраска колоний) и Lac⁻ (белая окраска колоний). Заметим, что эпигенотипом называется перечень генов с указанием их функционального состояния (Чураев, 1975). В данном случае: 1 – ген дерепрессирован, 0 – операторный участок гена связан с репрессором. Эпигенотипы *lacI⁰cl¹* и *lacI¹cl⁰* должны устойчиво наследоваться в ходе последовательных делений бактериальных клеток. Переключение одного эпигенотипа в другой осуществляется внешними метаболическими и температурными сигналами. Кроме того, возможны два нестабильных эпигенотипа *lacI⁰cl⁰* и *lacI¹cl¹*, которые в зависимости от условий переходят либо в эпигенотип *lacI⁰cl¹*, либо *lacI¹cl⁰*.

Для проверки наследования и переключения ожидаемых эпигенотипов нами был поставлен следующий эксперимент. Плазмиду рСЕPI трансформировали в клетки штамма JC158. Далее культуру JC158(рСЕPI) выращивали в 3 мл LB-среды при 30°C, рассеивали до единичных колоний на чашки Петри с LB-агаром и инкубировали 24 часа при 30°C. Образовавшиеся колонии переносили на чашки с ИПТГ и инкубировали при 30°C. В результате выросли синие колонии, имеющие эпигенотип *lacI⁰cl¹*. Далее колонии с каждой чашки Петри были пересеяны бактериальной петлей на свежие чашки согласно схеме, представленной на рис 2.

Наследование и переключение эпигенотипов *lacI¹cl⁰* и *lacI⁰cl¹* в эксперименте соответствовало теоретически предсказанным результатам. Появление синих колоний на чашке 3 (ИПТГ, 42°C) объясняется тем, что ИПТГ, инактивируя Lac-репрессор, снимает репрессию с генов *lacZ* и *cl*, а повышенная температура приводит к разрушению димеров нарабатывающегося белка CI, что соответствует не-

стабильному эпигенотипу $lacI^1cl^1$. Таким образом, экспериментально показано, что ЦДС⁽⁻⁾, локализованная на плазмиде рСЕPI, является элементарным эпигеном, т. е. может кодировать, хранить и передавать клеточному потомству вызванные внешними специфическими сигналами изменения функционального состояния без изменения ДНК-последовательностей, входящих в систему генов.

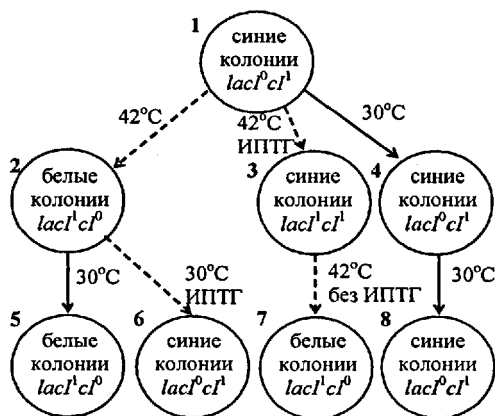


Рис. 2. Схема тестирования наследуемости функциональных состояний пересевом колоний клеток штамма JC158(pCEPI) на чашках с X-Gal. Колонии росли 24 часа при температурных условиях, указанных на схеме. Стрелками указана последовательность пересева. Обозначения:----- переключение, ——— наследование

Изучение функциональной активности циклических дигенных систем рассевом до единичных колоний

Для экспериментов по исследованию динамики наследования и переключения эпигенотипов использовалась методика посева культуры до единичных колоний, с последующим анализом фенотипов образующихся колоний. В данной работе были использованы культуры JC158 (pCIK3), JC158 (pCIA2) и JC158(pCEPI). Плазмиды pCIK3 (ori p15A, Km^r) и pCIA2 (ori ColE1, Ap^r) содержат генетический переключатель (toggle switch) из плазмиды pTAK (Gardner et al., 2000), представляющий собой ЦДС⁽⁻⁾ (рис. 3).

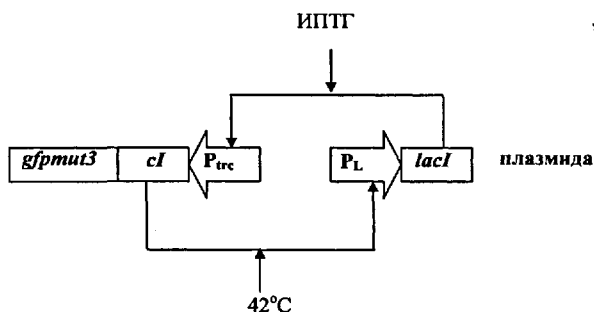


Рис. 3. Схема ЦДС⁽⁻⁾ на плаزمидах pCIK3 и pCIA2.

Отличия от ЦДС⁽⁻⁾ на плазмиде pCEPI заключаются в следующем: природный промотор *P_L* модифицирован; промотор *P_{lac}* заменен более сильным синтетическим промотором *P_{trc}*; за геном *cI* расположен ген *gfpmut3*, считывающийся с того же промотора *P_{trc}*. Работа блоков ЦДС⁽⁻⁾ на плазмидах pCIK3 и pCIA2 сбалансирована лучше, чем на pCEPI и, благодаря отсутствию в промоторе *P_{trc}* области связывания комплекса БАК-цАМФ (белок-активатор катаболических оперонов – циклический аденозинмонофосфат), не зависит от уровня и доступности источника углерода в среде.

В процессе изучения наследования и переключения эпигенотипов, были проведены эксперименты, в которых культура, инокулированная единичной колонией, 14 ч росла в условиях, необходимых для перевода клеточной ЦДС⁽⁻⁾ в соответствующий эпигенотип: *lacI⁰cI¹* – с ИПТГ, *lacI¹cI⁰* – при 42°C, *lacI¹cI¹* – при 42°C с ИПТГ. Затем бактериальные клетки жидкой культуры отмывали от остатков среды и переносили в свежую среду, изменяя условия культивирования. На чашки Петри клетки высевали из культуры с первоначальными условиями роста (чашка 0 ч) и далее каждые 2 часа роста в измененных условиях (чашки 2 ч, 4 ч, 6 ч). На чашках с X-Gal колонии росли при 30°C на протяжении 24 ч.

Тестирование способности клеток штамма JC158 (pCIK3) поддерживать каждый из двух альтернативных фенотипов показало, что клетки поддержива-

ют каждый из эпигенотипов по крайней мере в течение 8 часов роста в жидкой среде (13 поколений) + 24 часа роста на чашке. На всех чашках в 99,5–100% клетки давали начало колониям с ожидаемым фенотипом: синие из культуры $lacI^0cl^1$, белые из культуры $lacI^1cl^0$.

Для исследования переключения эпигенотипа $lacI^0cl^1$ в эпигенотип $lacI^1cl^0$, клетки культивировали 14 ч при 30°C в присутствии ИПТГ, а затем пересевали в среду без ИПТГ и инкубировали при 42°C. Результаты посевов на чашки Петри представлены на рис. 4. Секторными названы колонии, состоящие из белых и синих секторов (* * * * *).

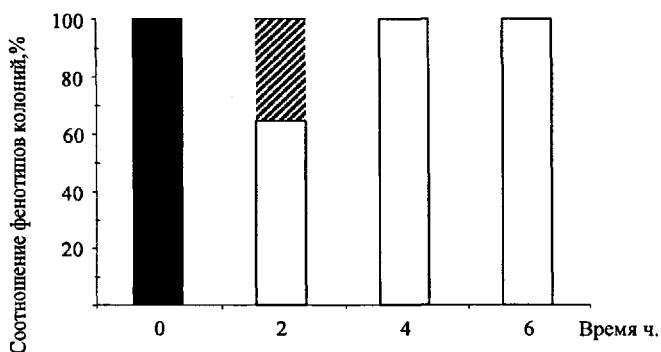


Рис. 4. Соотношение фенотипов колоний клеток JC158 (pCIK3) на чашке при переключении $lacI^0cl^1 \rightarrow lacI^1cl^0$.

Клетки были посеяны на чашки после указанного периода роста при 42°C без ИПТГ в жидкой среде.

■ — синие колонии, ▨ — секторные колонии, □ — белые колонии

Для исследования переключения эпигенотипа $lacI^1cl^0$ в эпигенотип $lacI^0cl^1$ клетки культивировали 14 ч при 42°C без ИПТГ, а затем пересевали в среду с ИПТГ и инкубировали при 30°C. Полученные результаты представлены на рис. 5.

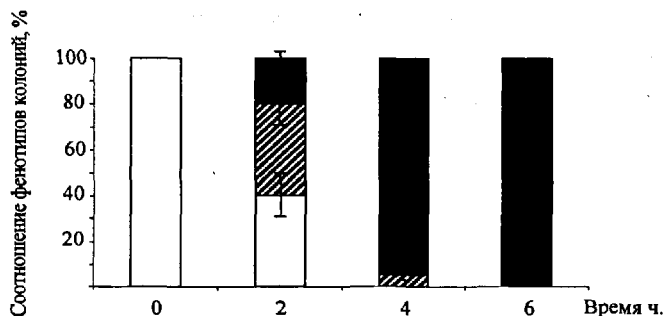


Рис. 5. Соотношение фенотипов колоний клеток JC158 (pCIK3) на чашке при переключении $lacI^+cI^0 \rightarrow lacI^0cI^+$.

Клетки были посеяны на чашки после указанного периода роста при 30°C с ИПТГ в жидкой среде.

■ – синие, ▨ – секторные, □ – белые колонии

Эксперименты по изучению динамики наследования и переключения эпигенотипов клетками штаммов JC158 (pCIA2) и JC158(pCERI) проводились так же, как для JC158 (pCIK3). Было показано, что эпигенотип $lacI^+cI^0$ наследуют 100% клеток. Экспериментальные результаты по наследованию эпигенотипа $lacI^0cI^+$, представлены в табл. 1.

Таблица 1

СООТНОШЕНИЕ ФЕНОТИПОВ КОЛОНИЙ JC158(pCIA2) И JC158(pCERI) В ПРОЦЕССЕ НАСЛЕДОВАНИЯ ЭПИГЕНОТИПА $lacI^0cI^+$

Фенотип колонии	Число колоний, %							
	JC158 (pCIA2)				JC158(pCERI)			
	0 ч	2 ч	4 ч	6 ч	0 ч	2 ч	4 ч	6 ч
○	0	1±0,5	14±4	39±10	7±4	68±10	90±5	95±2
⊕	9±4	13±5	64±11	56±13	42±13	27±9	6±4	5±2
⊗	72±11	80±13	22±6	5±2	50±16	3±1	4±2	0
⊙	18±5	5±3	0	0	0	2±1	0	0
●	1±0,5	1±0,5	0	0	1±0,5	0	0	0

○ – белые колонии, ● – синие колонии, ⊕ ⊗ ⊙ – секторные колонии.

При переключении эпигенотипа $lacI^p cI^I$ в $lacI^I cI^p$ клетки штаммов JC158(pCIA2) и JC158(pCEPI) в 99% образуют белые колонии через два часа экспоненциального роста при 42°C вне зависимости от эпигенотипа колонии, используемой для инокуляции ночной культуры. Результаты переключения JC158 (pCIA2) и JC158(pCEPI) из $lacI^I cI^p$ в $lacI^p cI^I$, представлены в табл. 2. Эксперимент был продлен до 8 часов инкубирования в измененных условиях, так как до этого момента наблюдаемая картина постоянно изменялась.

Таблица 2

СООТНОШЕНИЕ ФЕНОТИПОВ КОЛОНИЙ В ПРОЦЕССЕ ПЕРЕКЛЮЧЕНИЯ
ЭПИГЕНОТИПА $lacI^I cI^p$ В ЭПИГЕНОТИП $lacI^p cI^I$

Фенотип колонии	Число колоний, %									
	JC158 (pCIA2)					JC158(pCEPI)				
	0 ч	2 ч	4 ч	6 ч	8 ч	0 ч	2 ч	4 ч	6 ч	8 ч
○	100	100	0	4±2	28±12	100	100	0	9±4	20±7
⊕	0	0	2±1	5±2	42±7	0	0	7±2	38±11	80±7
⊗	0	0	2±1	80±5	30±8	0	0	83±10	53±12	0
⊙	0	0	90±5	6±3	0	0	0	5±2	0	0
●	0	0	6±2	5±2	0	0	0	5±2	0	0

○ – белые колонии, ● – синие колонии, ⊕ ⊗ ⊙ – секторные колонии.

Наличие синих колоний на чашках говорит о том, что как минимум на протяжении роста колонии клетки JC158 (pCIA2) и JC158(pCEPI) способны наследовать эпигенотип $lacI^p cI^I$. Тестирование способности наследовать эпигенотип $lacI^p cI^I$ клетками образующихся при этом синих колоний даёт крайне неоднозначные результаты: поддерживать данный эпигенотип способны от 0 до 90% клеток колонии.

Несмотря на то, что плазмиды pCIA2 и pCIK3 содержат одинаковую ЦДС⁽⁻⁾, динамика наследования и переключения эпигенотипов у культур JC158 (pCIA2) и JC158(pCIK3) различна. Культура JC158(pCIK3) полностью переключается и стабильно наследует оба эпигенотипа, а культура JC158 (pCIA2) имеет дина-

мику наследования и переключения эпигенотипов сходную с JC158 (pCEPI), когда более устойчив эпигенотип $lacI^1cl^0$. Устойчиво переключается из $lacI^1cl^0$ в $lacI^0cl^1$ только часть клеток, причём при ограниченном времени воздействия ИПТГ. Максимум переключившихся клеток наблюдается при 4–6 часах воздействия ИПТГ. Длительное культивирование колоний на чашке с ИПТГ, также не приводит к устойчивому наследованию эпигенотипа $lacI^0cl^1$. При длительном воздействии ИПТГ (как в жидкой среде, так и на чашке) культура имеет эпигенотип $lacI^0cl^1$, но, как видно из табл. 1 по изменению фенотипа колоний, наследуется ограниченное число поколений.

Плазмиды (pCIA2) и (pCEPI) содержат одинаковую область начала репликации – ColE1 (50–70 копий на клетку), тогда как область начала репликации плазмиды pCIK3 – p15A (20–30 копий на клетку) (Lutz, Bujard, 1997). Можно предположить, из-за высокой копийности плазмиды (и, соответственно, гена *lacI*) для переключения культур JC158 (pCIA2) и JC158(pCEPI) недостаточно 1 мМ ИПТГ. Однако, увеличив концентрацию ИПТГ до 2 мМ, обнаружили, что при этом увеличивается скорость переключения, но не стабильность наследования.

Проведенные эксперименты показывают, что для стабильного наследования эпигенотипов недостаточно ввести в клетку ЦДС⁽⁻⁾ (даже с хорошо сбалансированными параметрами), необходимо подобрать ее копийность, а, возможно, и локализацию.

Моделирование дупликаций, изменяющих функциональную активность ЦДС⁽⁻⁾

При создании генных систем, имитирующих дупликации одного из генов входящих в ЦДС⁽⁻⁾, к плазмиде pCIK3 (Km^r, ori p15A), находящейся в штамме *E.coli* JC158, были котрансформированы плазмиды pLACcl (Ap^r, ori ColE1) или pLACl (Ap^r, ori ColE1), которые несут генные блоки P_{lac}cl и P_{lac}lacI, соответственно. По сути, в этом эксперименте имитировалась широко распространённая в бактериальном мире система горизонтального переноса, при этом ген P_{lac}cl, можно рассматривать как ортолог гена P_{lac}cl, а ген

$P_{lac}lacI$ как ортолог гена P_LlacI . С биплазмидными штаммами был проведён эксперимент по изучению наследования и динамики переключения эпигенотипов, описанный в предыдущем разделе.

В штамме JC158(pCIK3/pLACcI) образуется трёхгенная сеть, состоящая из циклической дигенной системы и гена $P_{lac}cI$. В результате введения дополнительного блока $P_{lac}cI$, произошло увеличение дозы гена, что привело к изменению не только особенностей наследования и переключения, но и к изменению фенотипа колоний соответствующих эпигенотипу $lacI^1cI^0$. Эпигенотип $lacI^0cI^1$ наследуется стабильно, эпигенотип $lacI^1cI^0$ в условиях эксперимента стабильно наследуют $10 \pm 5\%$ клеток культуры, подвергавшейся воздействию температуры 42°C в течение 14 ч. Из эпигенотипа $lacI^1cI^0$ в $lacI^0cI^1$ клетки полностью переключаются за 2 часа. Динамика переключения из эпигенотипа $lacI^0cI^1$ в $lacI^1cI^0$ представлена на рис. 6.

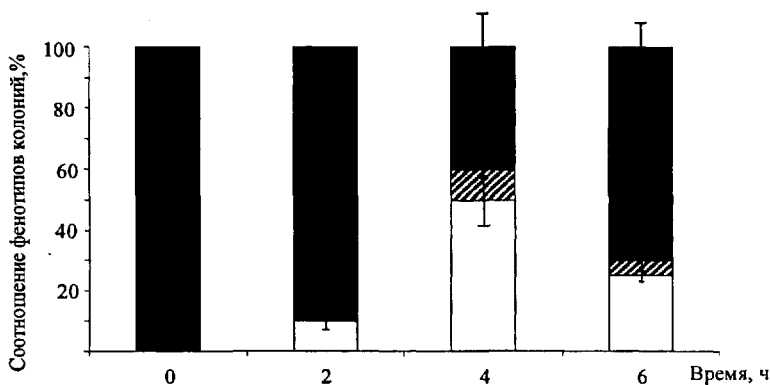


Рис. 6. Соотношение фенотипов колоний штамма JC158 (pCIK3/pLACcI) на чашке при переключении $lacI^0cI^1 \rightarrow lacI^1cI^0$.

Клетки были посеяны на чашки после указанного по оси абсцисс периода роста в жидкой среде при 42°C без ИППТ.

■ – синие колонии, ▨ – секторные колонии, □ – белые колонии

Трёхгенная система в штамме JC158(pCIK3/pLACI) состоит из ЦДС⁽⁻⁾ и искусственного генного блока P_{lac}*lacI*, который является авторегулируемым (Rosenfeld, 2002), в связи с чем, при избытке Lac-репрессора в клетке можно ожидать снижение уровня экспрессии данного гена, а при низком уровне Lac-репрессора в клетке – повышение экспрессии. Высев культуры бактериальных клеток на чашки Петри показал, что уровень синтеза β-галактозидазы в клетках JC158(pCIK3/pLACI) с эпигенотипом *lacI⁰cl¹* значительно ниже, чем в клетках JC158(pCIK3/pLACcl) и JC158(pCIK3). Характер наследования и переключения, в общем, соответствует JC158(pCIK3), но полностью из одного эпигенотипа в другой культура не переключается – приблизительно 10±5% клеток образуют колонии, соответствующие противоположному эпигенотипу или секторные (рис. 7, 8). Можно предположить, что стабилизирующее влияние генного блока P_{lac}*lacI* на уровень Lac-репрессора в клетке приводит, в части клеток, к увеличению частоты переключения эпигенотипов без индукции и, соответственно, фенотипическому разнообразию.

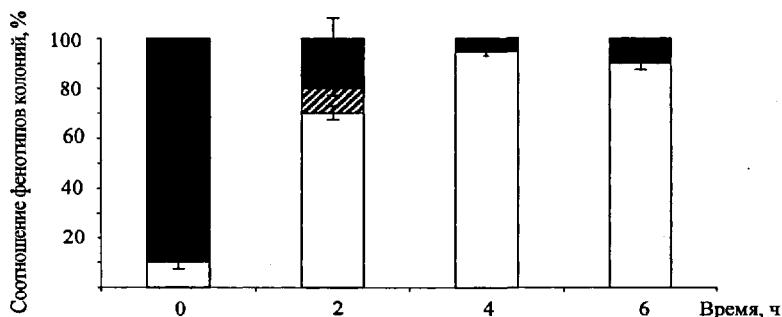


Рис. 7. Соотношение фенотипов колоний штамма JC158 (pCIK3/pLACI) на чашках при переключении *lacI⁰cl¹* → *lacI¹cl⁰*.

Клетки были посеяны на чашки после указанного по оси абсцисс периода роста в жидкой среде при 42°C без ИПТГ.

■ – синие колонии, ▨ – секторные колонии, □ – белые колонии.

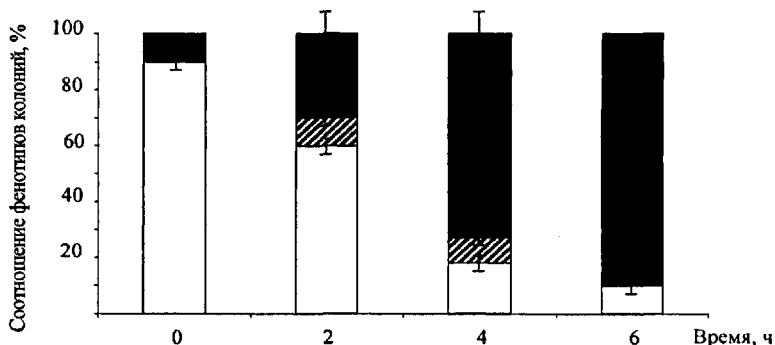


Рис. 8. Соотношение фенотипов колоний штамма JC158 (pCIK3/pLACI) на чашках при переключении $lacI^+cl^0 \rightarrow lacI^0cl^+$.

Клетки были посеяны на чашки после указанного по оси абсцисс периода роста в жидкой среде при 30°C с ИПТГ.

■ – синие колонии, ▨ – секторные колонии, □ – белые колонии

Таким образом, проведённые эксперименты показали возможность изменения динамики функционирования генных сетей по механизму дупликации одного из компонентов сети. Продемонстрирована принципиальная возможность существования системных мутаций в генных сетях с отрицательными обратными связями, которые приводят к устойчивым фенотипическим изменениям. Показано, что для бактерий «закрепление» в результате добавления генного блока $P_{lac}cl$, или «ослабление» при добавлении $P_{lac}lacI$ режимов функционирования ЦДС⁽⁻⁾ в клетках JC158(pCIK3) может иметь адаптивное значение в изменяющихся условиях окружающей среды.

Влияние аминокислотного голодания на работу ЦДС⁽⁻⁾

В природных условиях бактериальным клеткам необходимо уметь приспосабливаться к неблагоприятным изменениям окружающей среды. Адаптация достигается скоординированным изменением уровня экспрессии генов, как

в отдельных генных сетях, отвечающих за определённую функцию, так и всего набора генов клетки. Первичной реакцией бактериальных клеток на воздействие стрессовых факторов окружающей среды является остановка клеточного роста. Прекращение деления позволяет клеткам перестроить работу на генетическом, биохимическом и физиологическом уровнях. Нами была изучена функциональная активность ЦДС⁽⁻⁾ в экспоненциально растущей культуре бактериальных клеток, поэтому целесообразно исследовать особенности функционирования ЦДС⁽⁻⁾ в условиях стазиса. Для дальнейшего исследования влияния стрессовых условий (голодания) на работу ЦДС⁽⁻⁾ были проведены эксперименты с использованием штаммов JC158 (pCIK3) и JC158(pCIK3/pLACI).

В процессе эксперимента ночная культура инокулировалась клетками белой колонии и росла при 42°C. Далее клетки из ночной культуры были посеяны в колбы со средой M9 с глюкозой, но без казаминовых кислот. В данном питательном субстрате штамм JC158, как ауксотрофный мутант по синтезу серина (*serA6*), не способен поддерживать рост. Оптическая плотность разведённой в колбах культуры при длине волны 600нм (D_{600}) составила 0,1. Через 3, 6 и 9 суток из колб производили отбор проб для посева на чашки Петри с LB-агаром, которые инкубировали при 30°C. Одновременно забирали образцы для определения оптической плотности культуры и флуориметрического определения содержания белка GFP, ген которого считывается с того же промотора P_{ucd} , что и ген *cI*. Полученные данные представлены на рис. 9.

За время проведения эксперимента оптическая плотность культур снизилась в 2 раза, что может указывать на активацию программ апоптоза, когда часть клеток бактериальной популяции подвергается автолизу, позволяя выжить остальным клеткам в условиях недостатка питательных веществ. В тоже время, несмотря на уменьшение числа жизнеспособных клеток, относительное содержание GFP (ед. флуоресценции/ D_{600} пробы) выросло в 5 раз. Причем, как видно из рис. 9 динамика накопления GFP в клетках штаммов JC158 (pCIK3) и JC158(pCIK3/pLACI) совпадает. Можно предположить, что увеличение содержания GFP в клетках является результатом активации большего числа генных блоков P_{ucdI} , чем это было до голодания. Эти данные совпадают с резуль-

татами рассева голодающих клеток на чашки Петри с богатой средой, где клетки культуры JC158 (pCIK3) в 70±10% случаев меняют эпигенотип $lacI^lcl^0$ на $lacI^0cl^l$. Клетки голодающей культуры JC158 (pCIK3/pLACI) образуют синие колонии различных оттенков.

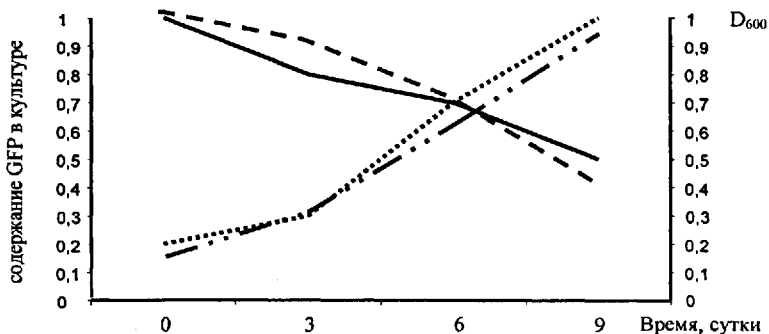


Рис. 9. Изменение оптической плотности (D_{600}) и количества белка GFP в процессе аминокислотного голодания культур JC158(pCIK3) и JC158(pCIK3/pLACI).

D_{600} и количество белка GFP указаны по оси ординат в относительных единицах, за единицу приняты: D_{600} — начальная D_{600} , GFP — количество белка (показания флуориметра/ D_{600} пробы) на 9-е сутки.

Обозначения: --- D_{600} штамма JC158(pCIK3), — D_{600} штамма JC158(pCIK3/pLACI),
 содержание GFP в культуре JC158(pCIK3),
 -.-. содержание GFP в культуре JC158(pCIK3/pLACI).

Таким образом, работа ЦДС⁽⁻⁾, как регуляторной системы управляющей клеткой, не является жёстко детерминированной. Это связано со сложностью организации живых систем. Такая интегрированность регуляторных механизмов позволяет клеткам поливариантно реагировать на множественные внешние стимулы, что в свою очередь увеличивает шансы бактерии на выживание в изменяющихся условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На современном этапе развития молекулярной генетики одной из важнейших проблем является расширение представлений о наследственности и изменчивости. В данной работе экспериментально смоделирован один из возможных механизмов эпигенетического наследования признаков. Используя генно-инженерные методы, мы получили векторную конструкцию рСЕPI, несущую циклическую дигенную систему с отрицательными обратными связями (ЦДС⁽⁻⁾). Проверка ожидаемых функциональных свойств полученной рекомбинантной плазмиды, показала возможность наследования двух альтернативных эпигенотипов *lacI⁺cl⁰* и *lacI⁰cl⁺*, а также переключение из одного состояния в другое внешними температурными и метаболическими воздействиями.

Исследование свойств ЦДС⁽⁻⁾, содержащих природные (рСЕPI) и синтетические (рCIK3, рCIA2) регуляторные элементы, показало зависимость стабильности наследования эпигенотипов от плазмиды носителя. Было выявлено, что даже для сбалансированных по параметрам ЦДС⁽⁻⁾ при повышении их копиности с 20-30 копий на клетку (ori p15A) до 50-70 копий на клетку (ori ColE1) более устойчив эпигенотип *lacI⁺cl⁰*, альтернативный эпигенотип *lacI⁰cl⁺* наследуется ограниченное число поколений.

Исследование функционирования ЦДС⁽⁻⁾ в составе трехгенной сети, где третий компонент системы представляет собой дубликацию структурной части одного из генов ЦДС⁽⁻⁾, показывает возможный механизм обратимого изменения в функционировании управляющих генных сетей бактериальной клетки, без изменения структуры ЦДС⁽⁻⁾. Учитывая распространённость горизонтального переноса генов у бактерий, такой механизм может рассматриваться как один из путей повышения фенотипического разнообразия в популяции. В плане исследования искусственных генных систем, подобный модульный подход позволяет конструировать и изучать генные системы произвольного уровня сложности.

Было обнаружено, что в условиях голодания может происходить спонтанное переключение эпигенотипов, что, вероятно, связано с изменением функ-

циональных параметров ЦДС⁽⁻⁾ при включении генетических систем ответа на стресс и экспрессии генов, характерных для стационарной фазы, а также со снижением общего уровня синтеза белка в стационарной фазе.

ВЫВОДЫ

1. Сконструирована рекомбинантная плазида рСЕР1, содержащая циклическую дигенную систему с отрицательными обратными связями (ЦДС⁽⁻⁾). Экспериментально показано, что эта система является эпигеном.

2. Выявлена зависимость устойчивого наследования и переключения эпигенотипов клетками *Escherichia coli* от области репликации плазмиды носителя ЦДС⁽⁻⁾.

3. Экспериментально смоделированы дупликации структурной части генов, входящих в ЦДС⁽⁻⁾ и изучено изменение динамики функционирования ЦДС⁽⁻⁾ в составе образующейся трёхгенной сети.

4. Обнаружено влияние стрессовых условий культивирования клеток *Escherichia coli* на функционирование искусственной циклической дигенной сети.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Тропынина Т. С., Голубев О. В., **Ступак И. В.**, Чураев Р. Н. // Материалы II съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. – СПб., 2000. – Т. 2. – С. 91–92.

2. Tchuraev R. N., **Stupak I. V.**, Tropynina T. S., Stupak E. E. Epigenes: design and construction of new hereditary units // FEBS Letters. – 2000. – V. 486. – P. 200–202.

3. Чураев Р. Н., **Ступак И. В.**, Тропынина Т. С., Ступак Е. Э. Сконструирован двухкомпонентный эпиген с наперед заданными свойствами // ДАН. – 2001. – Т. 378, № 6. – С. 837–840.

4. **Ступак И. В.**, Ступак Е. Э., Чураев Р. Н. Анализ функциональных состояний векторной эпигенной конструкции. // Материалы 3-го съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. – Москва, 2004. – С. 411.

5. **Ступак И. В., Ступак Е. Э.** Стационарность и нестационарность режимов функционирования плазмидных эпигенетических конструкций в популяции клеток *E.coli* // Материалы 9-ой Международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых. Биология – наука XXI века. – Пушкино, 2005. – С. 55.

6. **Ступак И. В., Ступак Е. Э., Чураев Р. Н.** Экспериментальное моделирование мутаций, изменяющих функциональную активность искусственной генной сети в клетках *E.coli* // Материалы международной научной конференции «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология». Минск, 2005. – Т.1.– С. 115.

7. **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.

8. **Ступак И. В., Ступак Е. Э.** Сравнительное изучение функциональной активности циклических дигенных систем в клетках *E.coli* // Материалы 10-ой Пушкинской школы-конференции молодых ученых. Биология – наука XXI века. – Пушкино, 2006. – С. 53.

СТУПАК Игорь Валериевич

**ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ
В ПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI*,
СОДЕРЖАЩИХ ЦИКЛИЧЕСКИЕ ДИГЕННЫЕ СИСТЕМЫ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Издательская лицензия № 06788 от 01.11.2001 г.
ООО «Издательство «Здравоохранение Башкортостана»
450077, РБ, г. Уфа, Ул. Ленина, 3, тел. (3472) 72-73-50.

Подписано к печати 30.05.2006 г.
Формат 60x84 1/16. Гарнитура Times New Roman.
Бумага офсетная. Отпечатано на ризографе.

Усл. печ. л. 1,4. Уч.-изд. л. 1,5.

Тираж 100 экз. Заказ № 287.

