

На правах рукописи

Фисунов Глеб Юрьевич

**СИСТЕМНЫЙ АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ
КООРДИНАЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ
В МИНИМАЛЬНОЙ КЛЕТКЕ
НА МОДЕЛИ БАКТЕРИЙ КЛАССА МОЛЛИКУТ**

1.5.3 – Молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины Роспотребнадзора»

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор, академик РАН Говорун Вадим Маркович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор, член-корр. РАН
Разин Сергей Владимирович, Институт биологии гена РАН,
г.н.с., руководитель отдела клеточной геномики, заведующий
лабораторией структурно-функциональной организации хромосом

доктор биологических наук, профессор, член-корр. РАН
Сергиев Пётр Владимирович, НИИ ФХБ им. Белозёрского МГУ
имени М.В. Ломоносова, директор

доктор биологических наук, профессор,
Чернов Владислав Моисеевич, Казанский институт биохимии
и биофизики КазНЦ РАН, руководитель института

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Защита состоится «12» ноября 2025 г. в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук» (ГНЦ ИБХ РАН) по адресу: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНЦ ИБХ РАН и на сайте ГНЦ ИБХ РАН ibch.ru.

Автореферат разослан _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета


д.ф.-м.н. **В.А.Олейников**

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ	4
Актуальность исследования	4
Цели и задачи исследования	6
Научная новизна.	7
Теоретическая и практическая значимость	8
Методология и методы исследования	9
Основные положения, выносимые на защиту.	10
Степень достоверности и апробация результатов.	11
Личный вклад автора	12
Структура и объём работы	13
СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ	14
Сравнительный анализ организации промоторов и систем регуляции экспрессии генов среди Молликут	15
Консервативное ядро ТФ у Молликут	21
Кладоспецифичные регуляторы у <i>M. gallisepticum</i>	28
Эвристический подход к изучению систем регуляции экспрессии генов у Молликут	30
Идентификация новых транскрипционных регуляторов у <i>M. gallisepticum</i>	35
Структура и состав нуклеоида <i>M. gallisepticum</i> .	44
Транскрипционно-трансляционная координация у <i>M. gallisepticum</i>	46
ВЫВОДЫ	49
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	51

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Минимальная клетка – теоретическая модель в молекулярной биологии. Она представляет собой клетку, содержащую минимально возможное количество генов и, соответственно, кодируемых ими белков или функциональных РНК. Между ними может быть перекрытие по функции. В то же время функции ряда структурных РНК заменить нечем, например рРНК и тРНК. Теоретические модели минимальной клетки рассмотрены во многих работах. Важный вопрос в контексте минимальной клетки – нужны ли ей какие-либо механизмы для регуляции экспрессии генов или достаточно конститутивной экспрессии при условии точно подобранных по силе промоторов, сайтов связывания рибосомы, стабильности мРНК и белков и т.д. В качестве экспериментальной модели минимальной клетки нередко рассматриваются бактерии класса Молликут (*Mollicutes*), также собирательно называемые «микоплазмами». В качестве модельных организмов они были выбраны в связи с тем, что способны расти на искусственной питательной среде, и при этом имеют существенно редуцированные геномы. Размеры геномов микоплазм варьируют от примерно 500 тысяч до полутора миллионов пар оснований. Представитель Молликут *Mycoplasma genitalium* – обладатель минимального генома среди бактерий, способных расти на питательной среде. Таким образом, теоретический вопрос об устройстве минимальной клетки оказывается тесно связанным с вопросами физиологии микоплазм.

Филогенетически Молликуты родственны Грам-положительным бактериям с низким ГЦ-составом геномов, в частности, Фирмикутам (*Firmicutes*). В 1898 году Нокардом и Ру был выделен первый представитель Молликут *Mycoplasma mycoides* – возбудитель плевропневмонии быков. Спустя столетие этот вид Молликут станет первой бактерией, чей геном был успешно искусственно синтезирован и пересажен в донорскую цитоплазму. Большинство

Молликут, в частности, микоплазмы являются облигатными паразитами или комменсалами животных (включая человека) и растений, чем, по-видимому, обусловлена редукция их геномов.

Важной проблемой в контексте минимальной клетки является как структура, так и сама необходимость аппарата регуляции экспрессии генов. Для микоплазм ряд работ демонстрирует предельную редукцию систем регуляции экспрессии генов как на уровне представленности гомологов известных регуляторов, так и на уровне фактически наблюдаемого изменения экспрессии генов в пертурбационных моделях. Результаты этих подходов согласуются друг с другом. Сравнительный геномный анализ показывает, что гомологов регуляторов в геномах микоплазм чрезвычайно мало – как правило, не более десятка (часто меньше). Функциональный анализ показывает, что экспрессия генов в Молликутах мало изменяется в спектре условий, причём изменения малы как по количеству вовлечённых генов, так и по амплитуде изменения, которая редко превышает два раза. Таким образом, можно, казалось бы, заключить, что регуляция экспрессии генов в минимальной клетке не важна.

Развитие методов синтетической биологии уже сейчас позволяет создавать полностью искусственные бактериальные геномы и даже отдельные эукариотические хромосомы. Наиболее успешная попытка создать существенно модифицированный бактериальный геном, предпринятая группой К. Вентера, привела к тому, что порядка 30% генов полученного минимизированного генома (*Mycoplasma mycoides* JCV Syn 3.0) не имеют понятной функции. Необходимо отметить, что К. Вентер и соавторы при создании синтетического минимального генома (*Mycoplasma mycoides* JCV Syn 3.0) использовали межгенные области дикого типа, т.е. попытка задать уровень экспрессии генов рациональным способом даже не проводилась.

В настоящей работе проведена попытка дать ответ на три вопроса: (1) как задать конститутивный уровень активности промотора на модели *Mycoplasma gallisepticum* с помощью рационального дизайна его последовательности; (2) зачем нужны оставшиеся консервативные регуляторы экспрессии генов; (3) как показать исчерпывается ли регуляторный репертуар только гомологами уже известных белков и регуляторных РНК. В отсутствие

ответа на эти вопросы переход к инженерной биологии невозможен, т.к. оказывается невозможна такая задача, как рациональный дизайн промоторов синтетического генома.

В настоящей работе в качестве основной экспериментальной модели была использована *Mycoplasma gallisepticum* S6. Размер генома *M. gallisepticum* составляет порядка 1 миллиона пар оснований, что несколько больше как размера генома *M. genitalium* (580 тысяч п.о.), так и минимального синтетического генома (531 тысяча п.о.) примерно в два раза. Среди геномов микоплазм, геном *M. gallisepticum* имеет средний размер. Как впрочем, и геномы других популярных моделей: штаммов *M. mycoides* (1 миллион п.о.) и *M. pneumonia* (816 тысяч п.о.) дикого типа. Для *M. gallisepticum* был получен большой набор мультиомиксных данных, что даёт возможность системного подхода. Также в настоящей работе в качестве дополнительных объектов использовались *Acholeplasma laidlawii* PG-8A и *Spiroplasma melliferum* KC-3.

Цели и задачи исследования

Цель исследования:

Провести системный анализ организации транскрипционного аппарата и регуляции транскрипции минимальной природной клетки на модели бактерий класса Молликут.

Задачи исследования:

1. Разработать метод измерения транскрипционной активности геномов Молликут с использованием методов нормализации библиотек кДНК и высокопроизводительного секвенирования.
2. Провести сравнительный анализ консервативных механизмов регуляции экспрессии генов у бактерий класса Молликут. Провести сравнительный анализ структуры промоторов и строения регуляторных сетей для трёх представителей класса Молликут: *Acholeplasma laidlawii*, *Spiroplasma melliferum*, *Mycoplasma gallisepticum*. Провести для этих видов высокопроизводительное картирование

точек инициации транскрипции методом 5'-концевого обогащённого секвенирования. Определить консервативное ядро регуляторов, гомологи которых представлены у всех или почти всех Молликут. Определить функции этих гомологов на модели *M. gallisepticum*. Для этого получить их в рекомбинантном виде и показать активность *in vitro* или исследовать их функцию методом генетического нокдауна с помощью CRISPR-интерференции.

3. Разработать эвристический метод поиска неконсервативных систем регуляции экспрессии генов, не проявляющих себя в стандартных пертурбационных моделях на основе машинного обучения. Экспериментально верифицировать обнаруженные новые регуляторы на модели *M. gallisepticum*. Для новых белков-регуляторов провести их аффинное выделение, далее показать их активность в рекомбинантном виде или с помощью генетического нокдауна. Для рибосwitchей и белков также показать их активность в репортерных конструкциях *in vivo*.
4. Исследовать глобальные механизмы регуляции экспрессии генов на уровне сопряжения транскрипции и трансляции, а также на уровне структуры нуклеоида на модели *M. gallisepticum*. Для этого провести количественное транскрипционное и протеомное профилирование рибосомной фракции *M. gallisepticum*. Также провести выделение нативного нуклеоида *M. gallisepticum*, исследование его структуры методом атомно-силовой микроскопии и исследование содержания белков методом количественного протеомного анализа.

Научная новизна

Группа Л. Серрано провела ряд (серию) работ по изучению дифференциальной экспрессии генов *Mycoplasma pneumoniae* используя пертурбационные модели методом высокопроизводительного секвенирования. Этой же группой проведена работа по полногеномному картированию точек

связывания гомологов транскрипционных факторов, а также полногеномному картированию точек инициации транскрипции у *M. pneumoniae*. Также ими была проведена работа по исследованию структуры нуклеоида *M. pneumoniae* методом Hi-C.

Группа К. Вентера провела определения спектра жизненно-важных генов для *M. genitalium* (минимальный геном среди бактерий, способных расти на искусственной среде) и *M. mycoides*. Этой группой был проведён синтез и успешное «оживление» минимального синтетического генома *Mycoplasma mycoides* JCV Syn 3.0.

В настоящей работе было впервые проведено комплексное исследование транскрипционной активности генома *M. gallisepticum*. Было описано отсутствие корреляции между изменением в представленности РНК и белка у *M. gallisepticum* при тепловом стрессе. На основе полученных данных и их анализа созданы синтетические промоторы с заданным уровнем экспрессии. Были детально исследованы оставшиеся консервативные для микоплазм регуляторы экспрессии генов. Впервые была разработана эвристическая оценка неизученного репертуара регуляторов без использования предварительных знаний о гомологии или дифференциальной экспрессии генов на основе комбинации транскриптомного анализа и машинного обучения. Были открыты новые регуляторы генов домашнего хозяйства у *M. gallisepticum*.

Теоретическая и практическая значимость

В ходе работы был охарактеризован ряд механизмов регуляции экспрессии генов у Молликут, как «глобальные», так и специфические. К глобальным относятся: (1) неспецифические детерминанты промотора и механизм «проскока через терминатор», которые обуславливают перестройку транскрипционного профиля с стрессе, (2) «рибосомный фильтр», т.е. отсутствие корреляции между транскрипцией и трансляцией в стрессе, (3) степень компактизации нуклеоида и перераспределение РНК-полимеразы между нуклеоидом и цитоплазмой в разных фазах роста. Среди специфических механизмов регуляции экспрессии генов были

определены и исследованы ряд консервативных для Молликут регуляторов (в скобках их мишени) – MraZ (гены DCW кластера), WhiA (гены рибосомных белков), SpxA (гены белков, поддерживающих гомеостаз окислительно-восстановительного потенциала). Также был исследован ряд видоспецифичных регуляторов *Mycoplasma gallisepticum*: Fur (транспортёр металлов) и HsdC (система рестрикции-модификации). Был найден новый уникальный регулятор оперона генов белков инициации репликации ДНК (DnaA-ParA). Было показано, ряд генов домашнего хозяйства у *M. gallisepticum*, несмотря на общую редукцию генома и систем регуляции его экспрессии, регулируется на уровне транскрипции с динамическим диапазоном от порядка и выше.

В ходе работы был разработан набор генно-инженерных методов для *M. gallisepticum* включая: (1) вектор и метод трансформации, (2) систему для сверхэкспрессии генов, (3) систему для генного нокдауна. Был разработан метод нормализации библиотек кДНК для высокопроизводительного секвенирования с помощью дуплекс-специфической нуклеазы (DSN). Был разработан метод для полногеномного картирования точек инициации транскрипции. Был разработан метод предсказания сила промотора *M. gallisepticum* исходя из его последовательности. Было создано программное обеспечение (BAC-browser) для визуализации данных геномики и транскриптомики, и для генной инженерии, в частности для дизайна олигонуклеотидов для ПЦР, ДНК-микроматриц и разбиения последовательности ДНК на олигонуклеотиды для последующего химико-ферментативного синтеза генного блока.

Методология и методы исследования

Методы, использованные при выполнении настоящей работы включают: культивирование *Acholeplasma laidlawii*, *Spiroplasma melliferum* и *Mycoplasma gallisepticum* в разных условиях, генная инженерия *M. gallisepticum* (трансформация, сверхэкспрессия, нокдаун, флуоресцентные репортеры), получение рекомбинантных белков в *E. coli*, анализ связывания белков с ДНК методами

торможения в геле, капиллярного термофореза, гель-фильтрации, анализ мембранных комплексов методом blue-native электрофореза, ОТ-ПЦР в реальном времени, капельно-цифровая ОТ-ПЦР, транскриптомный анализ методами высокопроизводительного секвенирования и гибридизации на ДНК-микроматрицах, полногеномное картирование точек инициации транскрипции, выделение рибосомной фракции *M. gallisepticum*, рибосомное профилирование, выделение нуклеоидной фракции *M. gallisepticum*, атомно-силовая микроскопия, аффинная хроматография, протеомный анализ методом ВЭЖХ-МС, локализационная микроскопия с субдифракционным разрешением.

Основные положения, выносимые на защиту

- Проведён транскрипционный анализ и полногеномное картирование точек инициации транскрипции у *Acholeplasma laidlawii*, *Spiroplasma melliferum*, *M. gallisepticum*. Установлена структура промоторов и транскрипционных терминаторов.
- Проведено рибосомное профилирование *M. gallisepticum* в логарифмической фазе роста и тепловом стрессе. Показано, что корреляция между транскрипцией и трансляцией в тепловом стрессе исчезает на уровне связывания рибосом с мРНК («рибосомный фильтр»).
- Степень компактизации нуклеоида *M. gallisepticum* зависит от фазы роста и коррелирует с представленностью РНК-полимеразы во фракции нуклеоида. В стационарной фазе уровень компактизации нуклеоида выше и представленность РНК-полимеразы ниже.
- Идентифицированы консервативные и видоспецифичные транскрипционные регуляторы в пангеноме Молликут. Для консервативных регуляторов показано, что *MraZ* является активатором DCW кластера (*mraZ*, *mraW*, *ftsA*, *ftsZ*), *WhiA* является репрессором оперона (*rpsJ-map*), *SpxA* является

активатором генов *osmC*, *trxA2*. Для видоспецифичных регуляторов показано, что Fug является репрессором гена *zip*. HsdC является репрессором оперона РМ-системы MgaS61.

- Создана количественная модель промотора *M. gallisepticum* на основе машинного обучения. Показано, что экспрессия ряда генов домашнего хозяйства регулируется с помощью новых механизмов.
- Найден новый уникальный белок-репрессор оперона *dnaA-parA*. Найдены новые рибопереключателю оперонов *hatABC* и *infC*.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные положения диссертации докладывались на различных конференциях:

- «Природное редактирование ДНК для ухода от иммунного ответа у *Mycoplasma gallisepticum*», Вторая Всероссийская научная конференция с международным участием. Иркутск, 2022
- «Механизм вариабельности поверхностных гемагглютининов у *Mycoplasma gallisepticum*», VII Съезд биохимиков России. X Российский симпозиум «Белки и пептиды», VII Съезд физиологов СНГ. Москва, 2021
- «Тёмная материя регуляции экспрессии генов в минимальной клетке», II Объединённый научный форум VI Съезд физиологов СНГ VI Съезд биохимиков России IX Российский симпозиум «Белки и пептиды», Сочи-Дагомыс, 2019
- «Тёмная материя регуляции экспрессии генов в минимальной клетке», ПОСТГЕНОМ 2018, Казань
- «Identification of novel mechanisms of transcriptional regulation in reduced bacteria using machine learning and high-throughput identification of promoters», The FEBS Congress 2018, Прага, Чехия
- «Reconstruction of transcription control networks in Mollicutes by high-throughput identification of promoters», Moscow

Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB 2017)

- «Рибосомальное профилирование *Mycoplasma gallisepticum*», I Объединённый научный форум V Съезд физиологов СНГ V Съезд биохимиков России, Сочи-Дагомыс, 2016
- «Reconstruction of transcription regulation networks in genome-reduced bacteria (Mollicutes), International Conference on Systems Biology», 2016, Барселона, Испания
- «Стрессовый ответ у *Mycoplasma gallisepticum*: адаптивная реакция или сломанные тормоза?», ПОСТГЕНОМ 2014, Казань

Исследования по теме диссертации были поддержаны грантами РФФИ: 14-24-00159 «Системное исследование минимальной клетки на модели *Mycoplasma gallisepticum*» и 19-74-10105 «Роль структуры хроматина минимальной клетки в поддержании гомеостаза протеома домашнего хозяйства», государственным заданием № 122030900107-3 «Создание искусственных клеточных систем».

Все эксперименты проводились в нескольких повторях (три или более). Получаемые результаты валидировались несколькими независимыми методами. Результаты исследования опубликованы в ведущих рецензируемых журналах.

Личный вклад автора

Автором проводилось культивирование бактерий *Mycoplasma gallisepticum*, *Spiroplasma melliferum*, *Acholeplasma laidlawii*, *E. coli*. Автором проводилось выделение РНК и подготовка библиотек для 5'-концевого обогащённого секвенирования и их анализ. Автором проводился сравнительный анализ промоторов микоплазм для поиска возможных сайтов связывания транскрипционных регуляторов в рамках реконструкции транскрипционных сетей у Молликут. Автором проводилось создание генетических конструкций для экспрессии генов в *M. gallisepticum* и для получения рекомбинантных регуляторов в *E. coli*. Автором проводилась

(и была ранее разработана) методика генетической трансформации *M. gallisepticum*. Автором предложена методика эффективного синтеза генных блоков и проводился синтез генных блоков при необходимости.

Автором была предложена идея использования эвристического метода поиска новых регуляторов. Для этого было предложено использовать покрытие точек инициации транскрипции, полученного методом 5'-концевого обогащённого секвенирования, а также данных по активности библиотеки синтетических промоторов для создания расчётной модели транскриптома *M. gallisepticum*. Автором была предложена идея использовать отклонение экспериментально измеренной активности промоторов от их теоретически предсказанной активности для поиска регуляторного эффекта и, как следствие, новых регуляторов. Автором проводился поиск новых белков-регуляторов методом аффинной хроматографии в части выделения белков, связывающих определённые последовательности ДНК, а также анализ протеомных данных.

Автором разработана методика выделения рибосомной фракции *M. gallisepticum*. Автором проводилось выделение РНК и подготовка библиотек для транскриптного анализа рибосомной фракции *M. gallisepticum*. Автором предложена идея исследования структуры нуклеоида *M. gallisepticum* методом атомно-силовой микроскопии.

Автором проводилось планирование исследований и руководство их проведением, анализ результатов и подготовка публикаций.

Структура и объём работы

Диссертационная работа представлена на 239 страницах. Структура диссертации включает следующие разделы: Оглавление, Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Выводы, Список цитируемой литературы, включающий 266 источников. Диссертация содержит 86 рисунков и 24 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе **Введение** приводится краткий обзор известных систем регуляции экспрессии генов у бактерий. Поскольку тема весьма обширная, упор сделан на физико-химические принципы устройства, а не перечисление всех открытых систем. Кратко охарактеризованы транскрипционные факторы (ТФ) в рамках однокомпонентных и двухкомпонентных систем, альтернативные сигма-факторы, рибопереключателы и аттенуаторы, регуляторные РНК, структурные белки нуклеоида. Рассмотрены структурные вопросы устройства регуляторных сетей: иерархия регулонов, логика выбора позитивной или негативной регуляции в тех или иных условиях. Обобщены накопленные данные по эволюционной ценности выработки регуляторных механизмов и эволюционной пластичности регуляторных сетей у бактерий. Приведены известные регуляторные механизмы у Молликут, в том числе механизмы антигенной вариабельности. Детально разобраны известные регуляторные механизмы, сохранённые в минимальном синтетическом геноме *Mycoplasma mycoides* JCV Syn 3.0.

К настоящему времени открыто значительное количество механизмов регуляции экспрессии генов у бактерий. К ним относятся: транскрипционные факторы, альтернативные сигма-факторы, белки-модификаторы активности РНК-полимеразы, регуляторные РНК, структурные белки нуклеоида. Регуляторные сети у бактерий построены по иерархическому принципу. В основании регуляторной сети находятся локальные регуляторы, управляющие экспрессией одного или нескольких оперонов. На вершинах регуляторной сети находятся глобальные регуляторы, как влияющие на активность или экспрессию ряда локальных регуляторов, так и модулирующие экспрессию целых блоков генома за счёт изменения топологии ДНК.

В литературе сложилось представление, что регуляторные сети обладают пластичностью и достаточно легко перестраиваются в зависимости от занимаемой данным организмом ниши. В то же время литературные данные говорят о том, что редукция генома приводит

к редукции систем регуляции экспрессии генов. В результате единая регуляторная сеть последовательно распадается на набор изолированных подсетей, которые при дальнейшей редукции генома постепенно исчезают.

Ряд консервативных регуляторов оказалось невозможно удалить из минимального синтетического генома *Mycoplasma mycoides* JCV Syn 3.0. К ним относятся WhiA, Fur, RpiR, ТФ MMSYN1_0805 и альтернативный сигма-фактор. Несмотря на существенную дополнительную редукцию геном *M. mycoides* JCV Syn 3.0. содержит ряд генов, кодирующих белки с возможной ДНК-связывающей активностью, что может говорить о наличии новых неизвестных регуляторов.

Сравнительный анализ организации промоторов и систем регуляции экспрессии генов среди Молликут

Для сравнительно-геномного анализа была выбрана группа из 50 видов Молликут с полностью собранными геномами (*Рисунок 1*). В выборку были взяты представители следующих филогенетических групп: ахлеоплазмы, спироплазмы, микоплазмы+уреоплазмы, фитоплазмы. Исследованный пан-геном Молликут включал 92 консервативных ТФ. Большая часть из них обнаруживается в геномах ахлеоплазм, обладающих геномами наибольшего размера среди Молликут.

Молликуты в целом демонстрируют практически линейную зависимость между числом консервативных транскрипционных факторов и размером генома до достижения порога приблизительно в 1 миллион п.о. (*Рисунок 2*). После этого число консервативных ТФ стабилизируется на значении порядка 5–10 штук на геном. Среди ТФ, консервативных у более чем одной группы Молликут можно выделить всего 4 штуки. К ним относятся HrcA, MraZ, WhiA и YebC. HrcA является репрессором шаперонов и хорошо изучен у бактерий, в том числе Молликут. Функции оставшихся белков были изучены в настоящей работе. Также среди высоко консервативных регуляторов можно выделить белок SpxA. Он не является транскрипционным

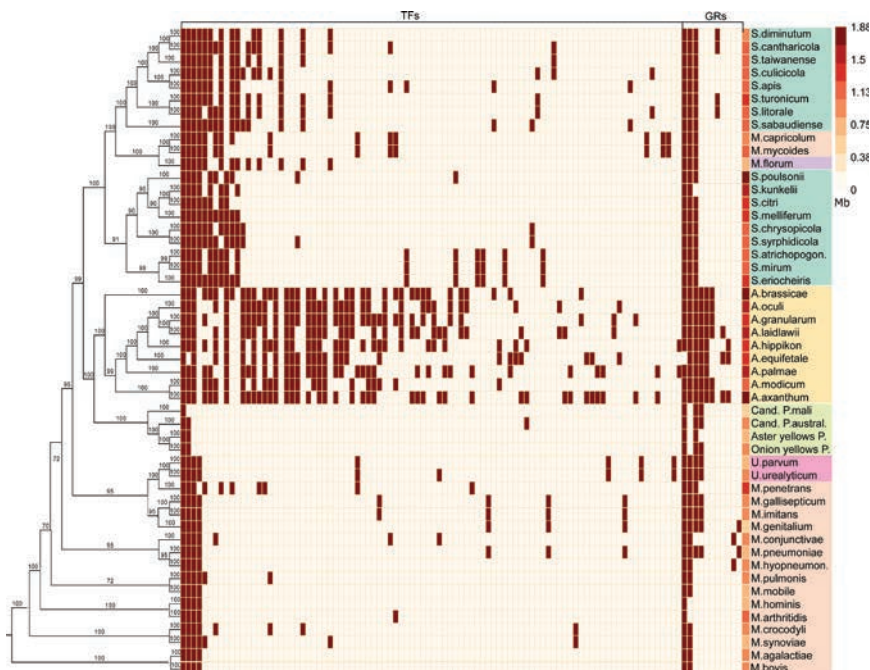


Рисунок 1. Распределение консервативных регуляторов в пангеноме Молликут.

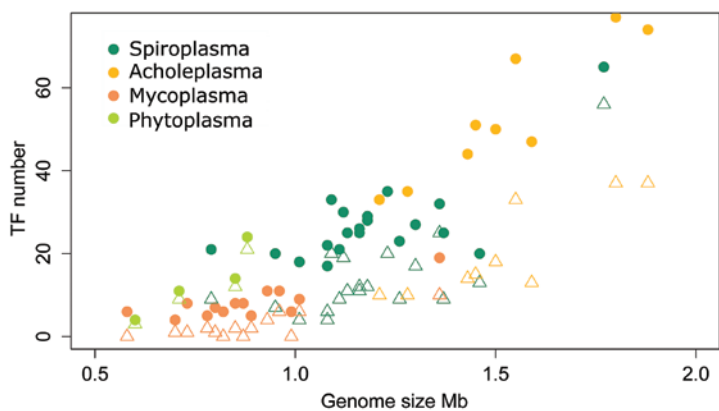


Рисунок 2. Зависимость числа консервативных регуляторов от размера генома у Молликут.

регулятором в классическом понимании, а представляет собой регуляторную субъединицу РНК-полимеразы.

Для дальнейшей работы было выбрано три представителя Молликут: *Acholeplasma laidlawii*, *Spiroplasma melliferum* и *Mycoplasma gallisepticum*. По одному представителю от каждой группы по степени редукции числа ТФ и размера генома. Для каждого представителя было проведено полногеномное картирование точек инициации транскрипции методом 5'-концевого обогащения и секвенирования РНК. В ходе исследования предполагалось решить следующие задачи: реконструировать сети транскрипционной регуляции, сравнить структуру промоторов и оценить уровень транскрипционного шума у представителей Молликут с разной степенью редукции генома. В результате было идентифицировано 607 точек инициации транскрипции для *A. laidlawii*, 240 для *S. melliferum* и 430 для *M. gallisepticum*.

По результатам выравнивания последовательностей около обнаруженных точек инициации транскрипции можно заключить, что строение кор-промотора у всех Молликут в целом одинаково и соответствует таковому у бактерий вообще (Рисунок 3). Наиболее статистически представленным является -10-бокс, с последовательностью TAWAAT, где W = A или T. Далее важным элементом является нуклеотид в точке инициации транскрипции. Как правило, это пурин. Также статистически обнаруживаемым является EXT-элемент с последовательностью TRTG, где R это пурин.

У Молликут, согласно полученным данным наблюдается упрощение структуры промотора в соответствии с общей редукцией генома. У микоплазм единственным статистически значимым детерминантом промотора остаётся -10 бокс, который представляет из себя 6-значную последовательность, состоящую только из А и Т (TAWAAT, W = А или Т). При этом ГЦ-состав генома составляет всего 30%, что означает высокую вероятность образования -10-бокса в случайном месте и образованию шумового промотора. В соответствии с этими теоретическими соображениями число наблюдаемых шумовых (т.е. локализованных в кодирующих частях или в бессмысловой ориентации по отношению к кодирующей

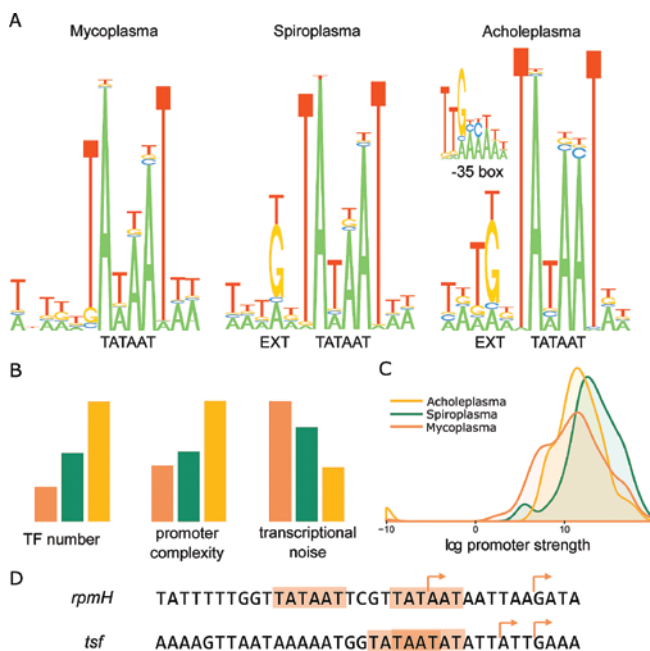


Рисунок 3. Сравнение строения промоторов у представителей разных филогенетических групп Молликут. **A** – сравнение структуры консервативных элементов в промоторах. **B** – Число ТФ, сложность промоторов (по структуре консервативных участков) и количество транскрипционного шума у представителей разных филогенетических групп Молликут. **C** – Динамический диапазон (распределение активности) промоторов у представителей разных филогенетических групп Молликут. **D** – Пример тандемных промоторов у *M. gallisepticum*.

части) промоторов увеличивается в ряду от *A. laidlawii* к *M. gallisepticum*. Т. е. можно сделать вывод, что редукция генома способствует редукции структуры промотора и увеличению транскрипционного шума.

Для оценки регуляторного потенциала у различных групп Молликут была проведена реконструкция систем регуляции транскрипции у исследуемых модельных организмов *A. laidlawii* (Рисунок 4, Рисунок 5), *S. melliferum* (Рисунок 6), *M. gallisepticum*

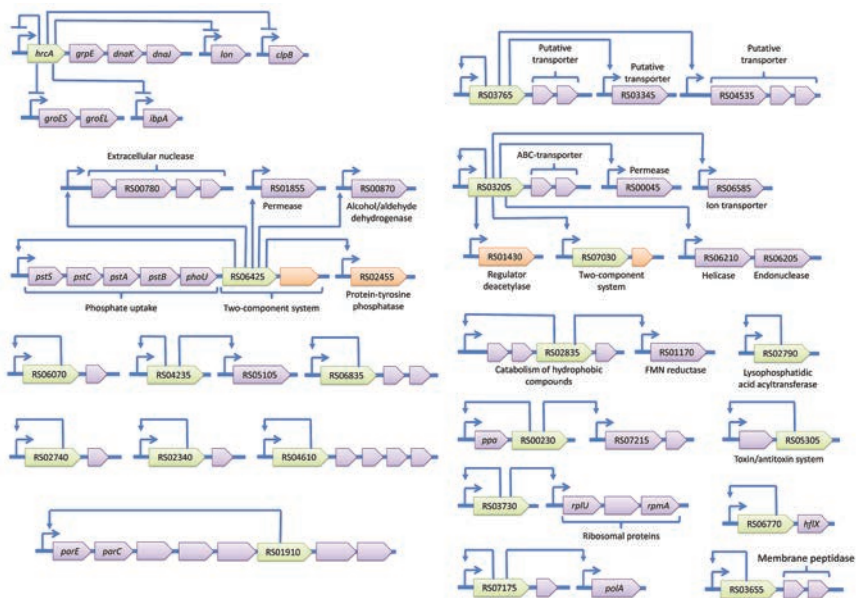


Рисунок 4. Реконструкция сетей ТФ у *A. laidlawii*.

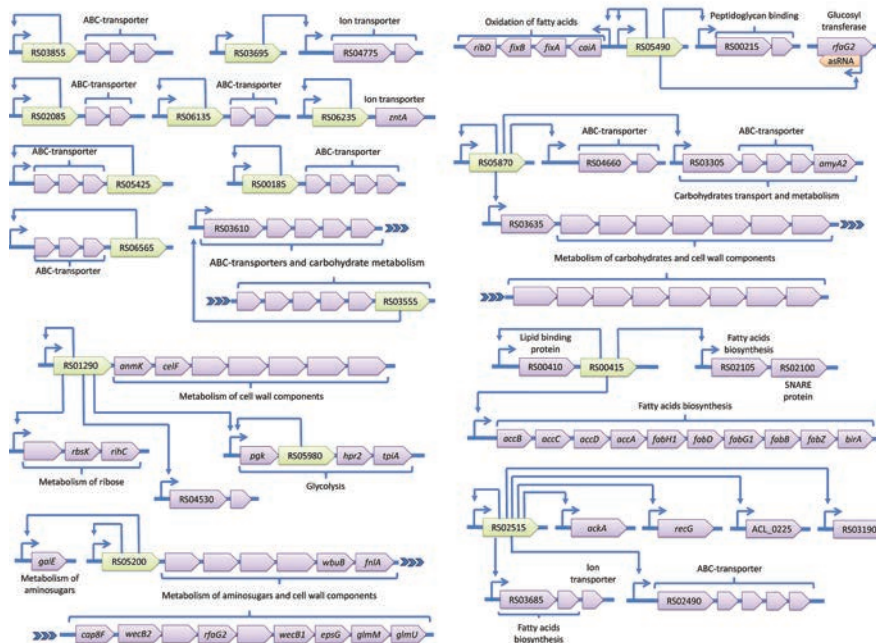


Рисунок 5. Реконструкция сетей ТФ у *A. laidlawii* (продолжение).

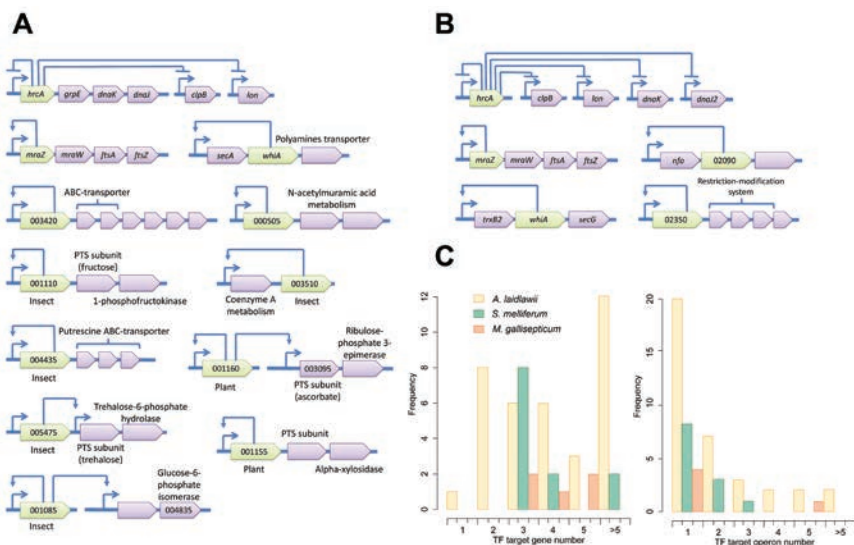


Рисунок 6. А – реконструкция сетей ТФ у *S. melliferum*, В – реконструкция сетей ТФ у *M. gallisepticum*, С – Количество генов и оперонов – мишеней ТФ у представителей разных филогенетических групп Молликут.

(Рисунок 6). Для этого был использован метод на основе анализа консервативности структур оперонов и анализа консервативности их промоторов. При этом позиция промотора уточнялась с помощью данных по картированию точек инициации транскрипции в референсных геномах *A. laidlawii* для ахолеплазм, *S. melliferum* для спироплазм и *M. gallisepticum* для микоплазм.

Сравнительный анализ транскрипционного аппарата в рассмотренном ряду представителей Молликут позволяет сделать следующие выводы. Редукция генома ведёт к потере транскрипционных регуляторов, связанных с регуляцией ответа на пертурбации внешней среды. Наиболее часто встречающимся типом таких регуляторов являются регуляторы экспрессии ферментов метаболизма. Редукция метаболических сетей ведёт и к редукции соответствующих регуляторов. Также можно сделать вывод о том, что редукция генома сопряжена с редукцией структуры промоторов

как таковых. Кроме того можно сделать вывод о том, что редукция генома ведёт к развитию паразитной шумовой транскрипции и, как следствие, может вести к возрастанию хаоса в клетке.

Консервативное ядро ТФ у Молликут

Как было продемонстрировано выше у большинства видов Молликут присутствуют 4 консервативных ТФ. К ним относятся HrcA, MraZ, WhiA и YebC, а также регулятор SpxA (Рисунок 7). Сайты связывания и мишени первых трёх консервативны как у бактерий, так и у Молликут в частности. HrcA является репрессором шаперонов, исследован у Молликут ранее. MraZ – регулятор транскрипции белков DCW кластера, WhiA – репрессор оперона рибосомных белков. Регулоны MraZ и WhiA изучены в настоящей работе. Для SpxA обнаружены мишени, но не найдены конкретные детерминанты в регулируемых промоторах. Точный сайт связывания, мишени и функция YebC пока не установлены, хотя показано, что он является участником ответа на окислительный стресс.

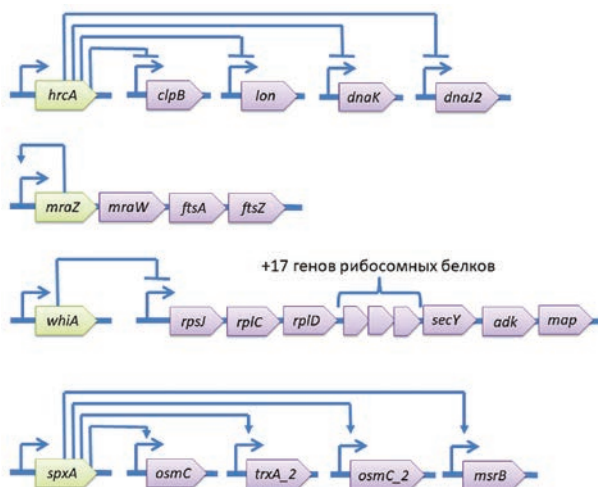


Рисунок 7. Найденные мишени консервативных ТФ у *M. gallisepticum*.

Ген *mraZ* у бактерий входит в состав так называемого DCW кластера, оперона или кластера оперонов, гены которого связаны с цитокинезом и синтезом клеточной стенки. За неимением клеточной стенки DCW кластер у Молликут, как правило, сокращён до 4 генов: *mraZ*, *mraW*, *ftsA*, *ftsZ*. Белок MraZ из *M. gallisepticum* был получен в рамках настоящей работы в рекомбинантном виде для исследования его активности. Методом торможения в геле был показан его точный мотив узнавания. Это 7-членная последовательность AAAGTGK, где K это G или T (Рисунок 8). Далее было проведено детальное исследование образования комплекса MraZ с фрагментом ДНК, соответствующим области связывания MraZ в промоторе DCW-кластера *M. gallisepticum*. Этот фрагмент содержал три повтора. Методом гель-фильтрации было показано, что MraZ образует два основных комплекса, соответствующих 8 и 24 (3×8) мономерам белка на фрагмент ДНК с тремя повторами. При этом свободный MraZ из *M. gallisepticum* образует 12-мерный комплекс, как и MraZ из *E.*

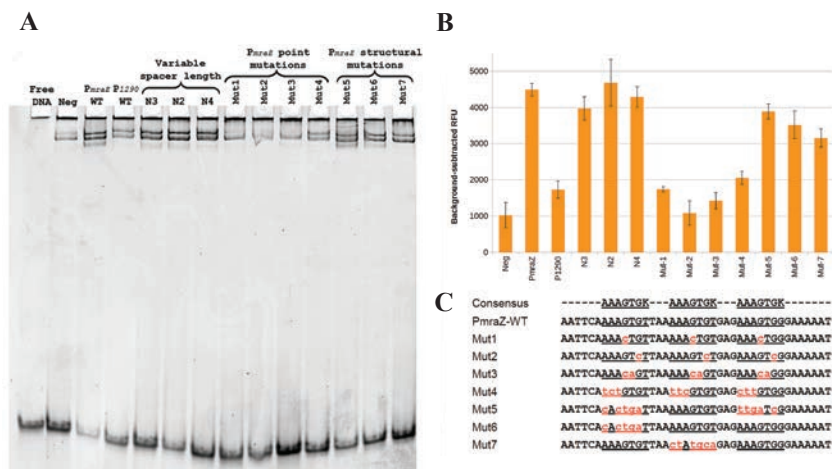


Рисунок 8. Определение сайта связывания MraZ из *M. gallisepticum* методом торможения в геле. А – Анализ связывания MraZ с 40-членным дц-олигонуклеотидом. Использовался набор олигонуклеотидов с различными вариантами последовательности. В – Количество связанного олигонуклеотида для каждого варианта. С – последовательности использованных олигонуклеотидов.

coli. Затем было проведено определение стехиометрии и константы связывания методом торможения в геле. В результате было показано образование октамерных комплексов с константой связывания 300 нМ. Таким образом, можно предположить, что MraZ в форме октамерного кольца связывает один повтор AAAGTGGK. В случае трёх повторов в промоторе DCW-кластера у *M. gallisepticum*, MraZ связывает три повтора в форме трёх октамерных колец. Именно такая форма активна в качестве транскрипционного фактора. Для проверки функции MraZ были получены штаммы *M. gallisepticum* с конститутивно повышенной (порядка 30 раз от дикого типа) экспрессией этого белка. В результате было показано, что MraZ у *M. gallisepticum* является транскрипционным активатором, т.к. транскрипция DCW-кластера в штаммах со сверхэкспрессией возрастает порядка 4 раз (Рисунок 9). Далее был

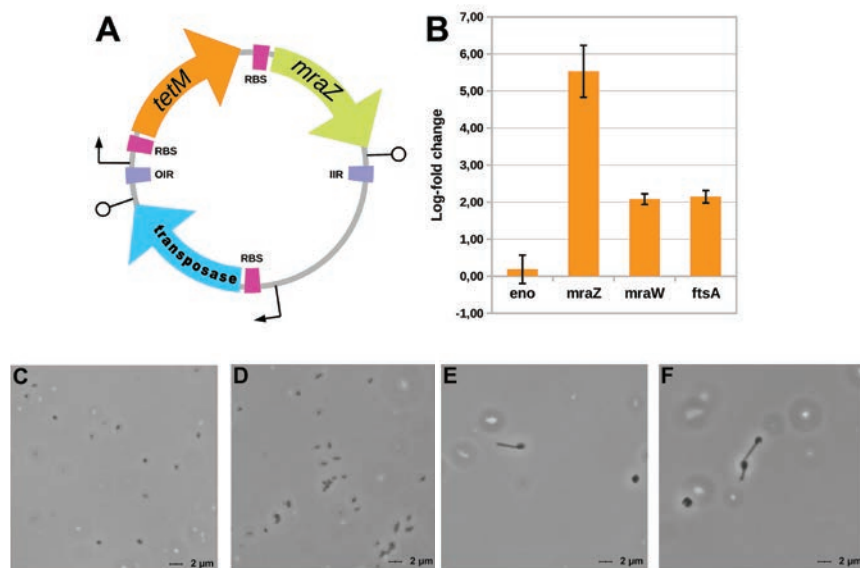


Рисунок 9. Влияние сверхэкспрессии MraZ (A) на экспрессию DCW кластера (B) и форму клетки *M. gallisepticum* (C-F). А – строение транспозонного вектора для сверхэкспрессии MraZ. В – эффект от сверхэкспрессии MraZ на экспрессию генов DCW кластера. С – Клетки *M. gallisepticum* дикого типа. D-F – клетки *M. gallisepticum* со сверхэкспрессией MraZ.

изучен фенотипический эффект сверхэкспрессии *MraZ* и активации DCW-кластера на *M. gallisepticum* с помощью фазово-контрастной микроскопии. Было показано, что клетки вытягиваются вдоль длинной оси так, как если бы был нарушен цитокinesis (Рисунок 9).

Белок WhiA встречается среди разных филогенетических групп, но наиболее часто представлен у Термотоговых, Актинобактерий, Фирмикут и Молликут. Пространственная структура WhiA была получена для белка из *Thermotoga maritima*. Этот белок представляет необычный пример слияния двух ДНК-связывающих доменов: НТН-домена, обычного для бактериальных ТФ и хоминг-эндонуклеазы (далее HEN-домен).

Анализ кросс-видовой консервативности оперонов у бактерий показал, что ген *whiA* наследуется сцеплено с последовательностью GAYACRCY (далее основной мотив) в промоторе оперона, кодирующего рибосомные и некоторые другие белки (далее оперон *rpsJ*, по названию первого гена). Найденная последовательность соответствует сайту связывания WhiA из *Streptomyces*.

Для проверки влияния WhiA из *M. gallisepticum* на экспрессию оперона *rpsJ* был получен ряд штаммов с искусственно увеличенной или уменьшенной экспрессией гена *whiA* (Рисунок 10). Были получены штаммы со сверхэкспрессией дополнительной копии гена *whiA*, размещённой на искусственном транспозоне, и с экспрессией гена *whiA*, сниженной с помощью технологии генного нокдауна с помощью белка dCas9. Было показано, что нокдаун гена *whiA* ведёт к дозо-зависимому увеличению транскрипции оперона *rpsJ* и представленности закодированных в нём белков по данным количественного протеомного анализа. Было показано, что нокдаун *whiA* ведёт к снижению скорости роста клеток после выхода из замораживания.

Для проверки ДНК-связывающей активности WhiA из *M. gallisepticum* (Рисунок 11) был получен в рекомбинантном виде. Связывание Mgal-WhiA с обнаруженной последовательностью исследовалось методом торможения в геле, методом термофореза и методом атомно-силовой микроскопии. Для этого использовался дц-олигонуклеотид размером 40 п.о. Было показано, что Mgal-WhiA узнаёт предсказанную последовательность GAYACRCY. Рядом

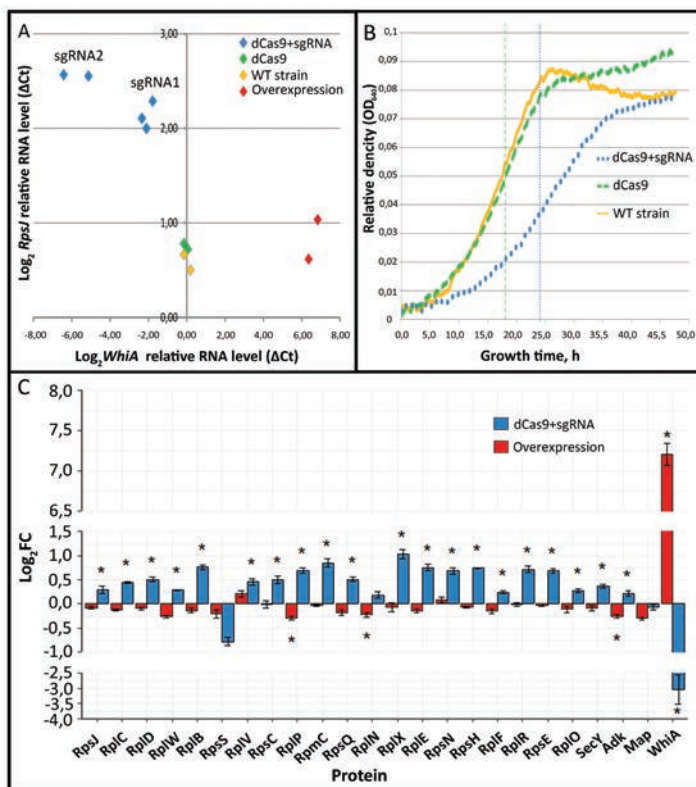


Рисунок 10. Влияние искусственного изменения экспрессии Mgal-WhiA на транскрипцию и трансляцию оперона *rpsJ*. А – зависимость между транскрипцией Mgal-WhiA и транскрипцией оперона *rpsJ*. В – Влияние нокдауна *whiA* на скорость роста *M. gallisepticum* после замораживания. С – влияние нокдауна гена *whiA* у *M. gallisepticum* на представленность рибосомных белков, закодированных в опероне *rpsJ*.

с основным мотивом у Фирмикут и Молликут была обнаружена другая консервативная последовательность: GTTGT у Молликут и TTGCCA у Фирмикут (дополнительный мотив). Константа связывания для основного мотива Mgal-WhiA составила 700 ± 80 нМ при измерении методом торможения в геле и 700 ± 100 нМ методом капиллярного термофореза. Для неспецифической ДНК константа составила > 5 мкМ по данным обоих методов. Для проверки роли

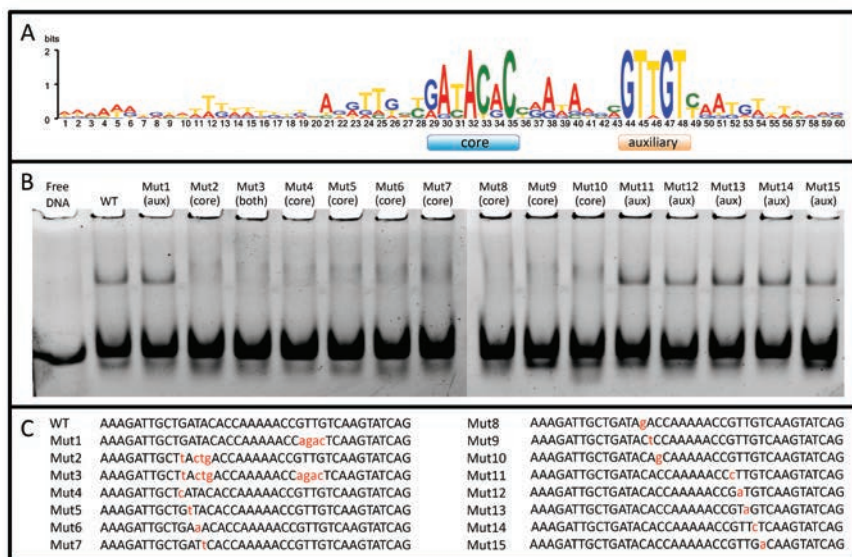


Рисунок 11. Проверка сайта связывания WhiA из *M. gallisepticum* методом торможения в геле. А – консервативность сайта связывания WhiA у Молликут. В – анализ связывания WhiA с различными дц-олигонуклеотидами. С – последовательность использованных олигонуклеотидов.

дополнительного мотива для регуляции транскрипции был получен набор штаммов *M. gallisepticum* с репортерными системами, в которых кодирующая последовательность EGFP экспрессировалась с одним из вариантов промотора оперона *rpsJ* из *M. gallisepticum* с сайтом связывания Mgal-WhiA. Варианты включали: 1) промотор дикого типа, 2) промотор в котором основной мотив имел замену, 3) промотор в котором дополнительный мотив имел замену. В результате было показано, что замена, как в основном, так и в дополнительном мотиве приводит к де-репрессии EGFP. Можно заключить, что основной и дополнительный мотив узнаются белком WhiA, и важны для его функционирования в качестве транскрипционного репрессора. Функция WhiA как транскрипционного репрессора также согласуется с увеличением транскрипции оперона *rpsJ* при нокдауне гена *whiA*. Исходя из

консервативной структуры оперона, в которую всегда входит аденилат-киназа, было сделано предположение, что лигандами WhiA могут быть нуклеотиды. Для этого ДНК-связывающая активность Mgal-WhiA была проверена методом торможения в геле в присутствии нуклеотидов. Для исследования была взята панель из моно-, ди- и трифосфатов всех нуклеозидов. В результате было показано, что в присутствии нуклеотидов происходит сдвиг равновесия между мономерной и димерной формой комплекса с 40-членным дц-олигонуклеотидом в сторону димерной формы. Таким образом, было показано, что АТФ является лигандом Mgal-WhiA.

Белок SpxA является регуляторной субъединицей РНК-полимеразы. Его наличие не обязательно для транскрипции, но если SpxA есть в составе РНК-полимеразы, то он может повышать аффинность РНК-полимеразы к определённым промоторам. В настоящей работе был получен набор штаммов с нокдауном гена *spxA*. Далее была измерена транскрипция ряда генов, которые потенциально могли бы быть мишенями SpxA (гены, кодирующие

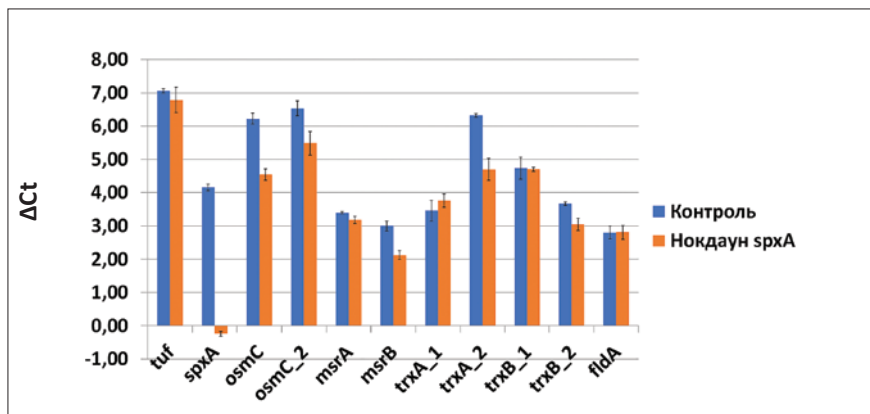


Рисунок 12. Влияние нокдауна гена *spxA* у *M. gallisepticum* на транскрипцию генов белков окислительного стресса. Гены: *tuf* – EF-Tu, *osmC* – пероксиредоксин, *osmC_2* – пероксиредоксин, *msrA* – метионин-S-сульфоксид редуктаза, *msrB* – метионин-R-сульфоксид редуктаза, *trxA_1* – тиоредоксин, *trxA_2* – тиоредоксин, *trxB_1* – тиоредоксин-редуктаза, *trxB_2* – тиоредоксин-редуктаза, *fldA* – флаводоксин.

белки, участвующие в ответе на окислительный стресс). В результате было обнаружено, что нокдаун *spxA* в наибольшей степени влияет на транскрипцию генов *osmC* (пероксиредоксин) и *trxA_2* (тиоредоксин). Более слабый эффект обнаружен для генов *osmC_2* (пероксиредоксин) и *msrB* (метионин-R-сульфоксид редуктаза). Для *osmC* и *trxA_2* падение транскрипции составило порядка трёх раз и для *osmC_2* и *msrB* порядка двух раз (Рисунок 12). Можно заключить, что SpxA у *M. gallisepticum* является транскрипционным активатором, так же как и его гомологи из других бактерий.

Кладоспецифичные регуляторы у *M. gallisepticum*

Были обнаружены мишени двух кладоспецифичных ТФ у *M. gallisepticum*: гомологов HsdC и Fur. Было показано, что HsdC является репрессором оперона уникальной РМ-системы MgaS6I, а Fur является репрессором гена *zip*, кодирующего транспортёр металлов.

Системы рестрикции-модификации (РМ-системы) могут содержать также, помимо основных белков, регуляторный белок, который является транскрипционным фактором НТН-семейства. Эти регуляторные белки РМ-систем коллективно называются С-субъединицами, хотя, как минимум, их сайты связывания отличаются. Геном *M. gallisepticum* содержит ген С-субъединицы в составе оперона РМ-системы MgaS6I. Соответствующий белок является предельно коротким и представляет собой только НТН-домен. Поскольку НТН-домен с высокой долей вероятности говорит о функции данного белка в качестве ТФ, то HsdC был предсказан как кандидатный регулятор сразу после сборки и аннотации генома *M. gallisepticum* S6. Далее была проведена работа по получению рекомбинантного HsdC из *M. gallisepticum* и проверки его способности связывать предсказанный мотив GTGTTN₆GTGTT. Проверка проводилась методом торможения в геле. Можно заключить, что HsdC обладает высокой специфичностью к своему мотиву. Была определена константа связывания HsdC, которая составила 5×10^{-9} М. Также комплекс белка с ДНК, представляет,

согласно расчёту, тетрамер. Для того чтобы выяснить эффект HsdC на транскрипцию, в настоящей работе были получены репортерные конструкции, в которых ген EGFP экспрессировался с промотора оперона MgaS6I дикого типа или где сайт связывания HsdC был инактивирован точечной мутацией, не затрагивающей сам промотор. В результате инактивация сайта связывания HsdC приводила к активации транскрипции, что говорит о том, что HsdC – репрессор (Рисунок 13).

ТФ семейства Fug являются в целом консервативными у бактерий. Однако среди Молликут они отличаются существенной вариабельностью. Так геном *A. laidlawii* кодирует сразу три гомолога ТФ семейства Fug. При этом согласно проведённому анализу кросс-видовой консервативности оперонов только один из них связан с регуляцией транспорта металлов. У *M. gallisepticum* есть единственный гомолог Fug, который существенно отличается от классических представителей этого семейства. Для исследования его функции были получены штаммы *M. gallisepticum* с нокдауном

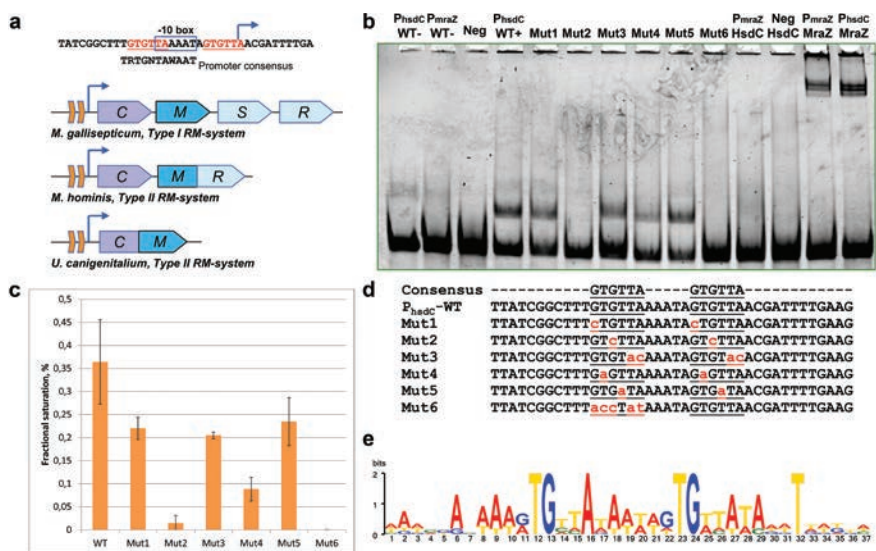


Рисунок 13. ДНК-связывающая активность HsdC из *M. gallisepticum*.

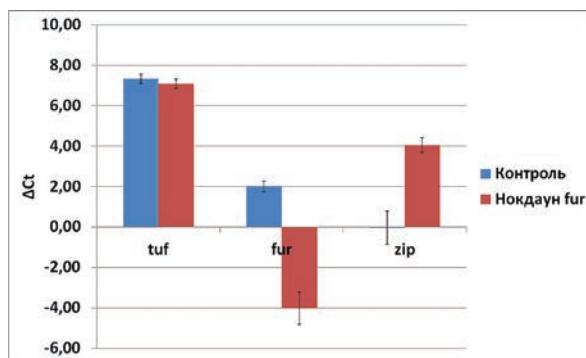


Рисунок 14. Влияние нокдауна гена *fur* на транскрипцию гена *zip*.

гена *fur*. В результате было показано, что нокдаун *fur* приводит к росту транскрипции гена *zip* (Рисунок 14). Таким образом, Fur из *M. gallisepticum* является транскрипционным репрессором. Анализ консервативности промотора гена *zip* у родственных микоплазм выявил сайт связывания Fur TTATTTAWAANNNTTWTAAATAA (жирным выделены нуклеотиды, по-видимому, составляющие основной мотив), характерный для *M. gallisepticum*, *M. imitans*, *M. tullyi* и *M. amphoriforme*.

Эвристический подход к изучению систем регуляции экспрессии генов у Молликут

В настоящей работе предложен новый метод поиска неизвестных регуляторов. Новый подход является эвристическим. Он не привязывается ни к гомологии ни к пертурбационным моделям. Суть метода такова: сила промотора, лишённый какого бы то ни было внешнего влияния определяется только детерминантами, определяющими взаимодействие с РНК-полимеразой (-10-бокс, -35-бокс, EХТ-элемент, UP-элемент, инициаторный нуклеотид и т.д.). Если на промотор оказывается какое-то внешнее влияние (связывается белок, складывается петля ДНК, образуется структура в мРНК и т.д.), то его наблюдаемая активность будет

отклоняться от силы, задаваемой детерминантами взаимодействия с РНК-полимеразой. Если известна сила всех промоторов в геноме в отсутствие внешних факторов, можно эти факторы обнаружить по отклонению силы промотора от его наблюдаемой активности. Если детерминанты силы промотора известны, можно построить теоретический транскриптом и сравнить его с наблюдаемым. По отклонению наблюдаемого транскриптома от теоретического можно выявить новые факторы, обуславливающие это отклонение.

Проверка метода проводилась на модели *A. laidlawii*. Это связано с тем, что у этого представителя Молликут представлен существенный репертуар ТФ, для которых с высокой надёжностью предсказаны мишени. Модель для предсказания силы промотора строилась на системе машинного обучения методом «случайный лес» (random forest). В качестве исходных данных для обучения модели использовалась выборка промоторов, положение и активность которых были измерены в нашей работе. В них не вошли промоторы, для которых было предсказано возможное наличие регуляторов. Последовательности картированных промоторов были извлечены из последовательности генома, разделены на детерминанты и для каждой из детерминант был рассчитан вес на основе позиционно-весовой матрицы (PWM, ПВМ). Веса в ПВМ брались из статистически построенных матриц для сильных промоторов *A. laidlawii*. Затем набор весов детерминант для каждого промотора и значение его измеренной активности использовались для обучения модели. После этого модель использовалась для предсказания активности промоторов *A. laidlawii*. Для этого последовательности картированных промоторов также извлекались из последовательности генома, делились на детерминанты и их вес определялся согласно построенным ПВМ. На основе набора весов для каждого промотора происходило предсказание его активности. При этом модель рассчитывала не единственное значение активности промотора, а возможный диапазон разброса активности. Таким образом, модель выдавала три значения – максимальную ожидаемую активность, минимально ожидаемую активность и среднюю ожидаемую активность. Далее вычислялось отклонение реальной наблюдаемой активности промотора от предсказанной

активности. В результате были обнаружены промоторы, активность которых как соответствовала предсказанной, так и существенно отклонялась от неё.

Согласно полученной модели наблюдаемая активность промоторов оперонов домашнего хозяйства почти не отклоняется от предсказанной. Активность промоторов оперонов, для которых предсказаны регуляторы, существенно отклоняется (Рисунок 15). Таким образом, можно заключить, что разработанный эвристический подход к поиску новых регуляторов экспрессии генов работоспособен.

После того, как концепция метода была успешно продемонстрирована на модели *A. laidlawii*, он был применён для *M. gallisepticum*. Для *M. gallisepticum* веса ПБМ, и набор детерминант подбирался эмпирически, так, чтобы рассчитываемый транскрипционный профиль наиболее соответствовал наблюдаемому. В качестве обучающей выборки были использованы данные,

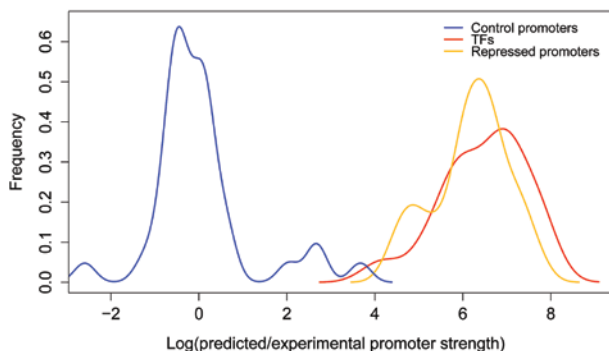


Рисунок 15. Распределение отклонения логарифма предсказанной силы промотора от логарифма наблюдаемой активности для *A. laidlawii*. Синим показано распределение для промоторов генов белков гликолиза, рибосомных белков и факторов трансляции (контрольная группа, для которой предполагается отсутствие регуляции). Красным показано распределение для промоторов, для которых были предсказаны регуляторы методом кросс-видового анализа консервативности промоторов. Жёлтым показано распределение для промоторов, для которых модель предсказывает отклонение активности в сторону репрессии.

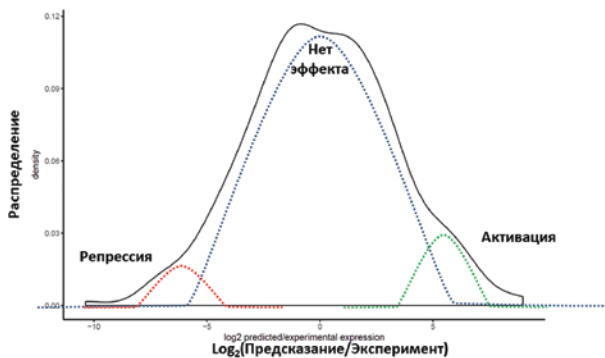


Рисунок 16. Распределение отклонения логарифма предсказанной силы промотора от логарифма наблюдаемой активности для *M. gallisepticum*. Сплошная линия – распределение предсказанных сил промоторов у *M. gallisepticum*.

полученные для массива синтетических промоторов, активность которых измерялась в репортерной конструкции. Также для *M. gallisepticum* метод был расширен, и предсказание промоторной силы проводилось не для отдельных выделенных промоторных участков, а для всего генома. Для этого геном был разбит на К-меры со сдвигом в 1 нуклеотид. Для каждого К-мера рассчитывалась промоторная сила таким образом, чтобы наблюдаемое распределение локализации и активности промоторов приближалось к реально наблюдаемой картине. Такой подход позволял не привязываться к заранее картированным промоторам, а, например, видеть промоторы сильные, но молчащие по какой-то причине или по всем признакам неработоспособные, но высокоактивные (Рисунок 16).

Далее было проведено клонирование ряда промоторов в репортерную конструкцию с геном EGFP с целью верификации наблюдаемого эффекта. Далее создавалась серия конструкций с вариантами исследуемого промотора для точного определения участка ДНК, опосредующего наблюдаемый эффект. Промоторы выбирались по следующим критериям: предсказанная сила и наблюдаемая активность различались на порядок и более, и которые относились к генам домашнего хозяйства. В Таблице 1

приведены промоторы для которых удалось найти соответствующие последовательности. В целом, активность большей части промоторов соответствует предсказанию. При этом существуют группы как более активных, так и менее активных промоторов. Промоторы из этих отклоняющихся групп – кандидаты на наличие новых неизвестных факторов регуляции экспрессии генов.

Таблица 1. Влияние соседних последовательностей на активность промоторов *M. gallisepticum*. В таблице приведены только крайние значения: кор-промотора и расширенного промотора, при котором влияние окружения максимально. При этом промотор может содержать несколько детерминант, градуально меняющих его активность. Для сравнения приведена активность оптимального промотора.

Промотор	Базовая активность (pEGFP)	Аттенюированная активность (pEGFP)	Предсказанная активность (5'-ERS)	Наблюдаемая активность (5'-ERS)
<i>Оптимальный синтетический</i>	7,59			
<i>infC</i>	6,80	2,75	9220	30166
<i>parA</i>	4,91	2,27	1295	99
<i>uvrB</i>	4,44	1,82	1834	5
<i>hatA</i>	3,81	-0,07	1150	11
<i>rpmH</i>	5,65	4,60	399	123
<i>nfo</i>	1,93	0,03	85	14
<i>tuf</i>	2,20	4,19	381	4001
<i>dps_P2</i>	-0,96	3,73	70	1046
<i>sufC</i>	-0,07	6,02	39	1389
<i>rplJ</i>	0,49	6,99	151	7429
<i>nusA</i>	-0,18	7,12	77	2412
<i>trxA_1</i>	-0,24	7,22	83	1227
<i>gapd</i>	2,73	7,99	84	15406

Идентификация новых транскрипционных регуляторов у *M. gallisepticum*

Разработанный нами эвристический метод выявления отклонения наблюдаемой силы промотора от предсказанной позволяет выявить промоторы, на которые действуют некие регуляторные факторы. При этом их молекулярная природа и биологический смысл остаются неизвестными. Далее для поиска молекулярных механизмов, обуславливающих воздействие, нами проводился комплекс исследований. На первой стадии проводилась верификация отклонения силы промотора в искусственной репортерной конструкции с геном EGFP и поиск участков в составе промотора, наличие которых обуславливает наблюдаемое отклонение активности.

В ходе работы были предсказаны рибопереклюатели в оперонах *hatA* и *infC*. Оперон *hatA* кодирует мембранный транспортёр. Его рибопереклюатель был клонирован и проверен с репортером EGFP в *E. coli*. Было показано, что этот рибопереклюатель чувствителен к тиамину. При культивировании *E. coli* с репортерной системой на среде с добавлением тиамина флуоресценция клеток существенно снижалась (Рисунок 17).

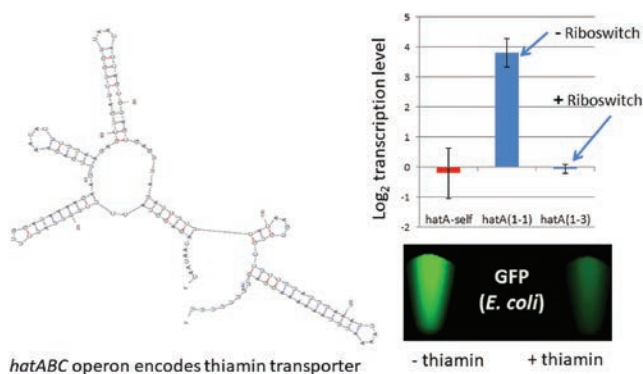


Рисунок 17. Тиаминовый рибопереклюатель в опероне *hatABC* у *M. gallisepticum*.

Рибопереклюатель оперона *infC* имеет гомологию с известным рибопереклюателем, связывающим рибосомный белок L20, который у *M. gallisepticum* закодирован в том же опероне. Промотор оперона *infC* демонстрирует сложное поведение. В репортерной системе добавление рибопереклюателя к кор-промотору однозначно снижает транскрипцию на порядок (Рисунок 18). При этом кор-промотор с рибопереклюателем демонстрируют транскрипционную активность намного ниже, чем такая же комбинация в геноме. Можно предположить, что на данный промотор влияет ещё какой-то активатор. Однако добавление в репортерную систему протяжённого участка на 5'-конце промотора не привело к его активации. Таким образом, можно предположить, что на активность промотора оперона *infC* влияет также локальная топология ДНК.

Вышеописанные «классические» рибопереклюатели имеют протяжённую длину (сотни нуклеотидов) и сложную вторичную структуру. Кроме них были обнаружены простые структуры в 5'-нетранслируемых областях мРНК. Такие структуры состоят только из шпильки и поли-Т тракта, т.е. воспроизводят структуру Rho-независимого транскрипционного терминатора. Были клонированы два промотора, содержащих такие структуры: оперонов *rpmH* и *fur* (Рисунок 18). Удаление шпилек из промоторов приводило к росту транскрипционной активности в 2–4 раза.

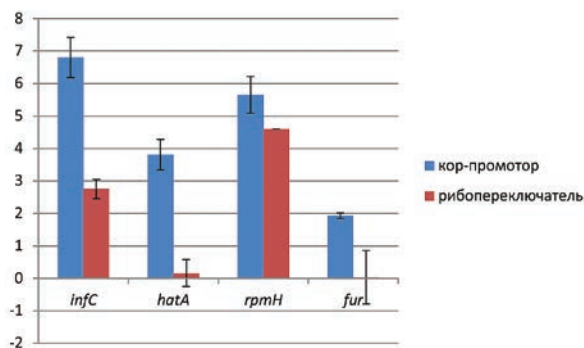


Рисунок 18. Влияние структур в 5'-НТР на представленность соответствующих мРНК.

Таким образом, подобные структуры действительно работают как слабые транскрипционные терминаторы, однако их роль и способ модуляции их активности остаются неизвестными.

Для поиска новых белковых регуляторов был использован метод «фишинга», т.е. аффинного выделения комплексов промоторов со связанными белками. Для этого были получены биотинилированные фрагменты ДНК, соответствующие исследуемым промоторам. Далее был получен клеточный экстракт *M. gallisepticum*. Затем экстракт инкубировался с фрагментами ДНК, которые улавливались из раствора магнитными частицами с иммобилизованным стрептавидином. Связавшаяся фракция белков подвергалась полуколичественному протеомному анализу. В качестве метрики представленности белков использовалось число обнаруженных пептидов. Параллельно проводился протеомный анализ фракции экстракта, с которой проводилось связывание. В одном эксперименте использовался массив разных промоторных последовательностей. Далее по результатам протеомного анализа определялись кандидаты в регуляторы по следующим критериям: белок должен иметь высокую абсолютную представленность в ДНК-связанной фракции, белок должен быть обогащён в ДНК-связанной фракции по сравнению с парной фракцией экстракта, белок должен быть селективно обогащён только с одной из исследуемых промоторных последовательностей. Если находится белок, соответствующий этим критериям, то далее он или получается в рекомбинантном виде и проводится анализ его связывания с ДНК *in vitro* или получается мутант *M. gallisepticum* с нокдауном соответствующего гена и измеряется транскрипционная активность предполагаемой мишени. Побочным результатом экспериментов по аффинному выделению белков стало обнаружение неспецифической ДНК-связывающей активности у ряда белков, для которых она не ожидалась. Ярким примером является енолаза.

Теоретическая модель промотора *M. gallisepticum* предсказала наличие репрессора для оперона *parA-dnaA*. Позиция сайта связывания репрессора была установлена с помощью репортерной системы путём клонирования различных вариантов промотора. Кандидатный белок, названный нами ParX, был выделен с

помощью аффинной хроматографии и полуколичественного протеомного анализа. Далее белок был получен в рекомбинантном виде. ДНК-связывающая активность была проверена методом торможения в геле с различными олигонуклеотидами, включая сайт связывания дикого типа, оптимизированный сайт связывания и различные варианты замен в сайте связывания. В результате было показано, что ParX специфически связывает обнаруженный сайт связывания (Рисунок 19). Элементарный сайт связывания ParX – палиндром ААТАТТ. При этом в промоторе *parA* такие мотивы образуют систему повторов типа ААТАТТN₅ААТАТТ. Всего таких повторов четыре. Далее было изучено распределение таких повторов в геноме *M. gallisepticum*. Оказалось, что они концентрируются в двух локусах: ориджине репликации и в локусе, для которого чаще чем в среднем наблюдается интеграция транспозонного вектора и который обогащён экзогенной ДНК (в основном из *M. synoviae*). У Молликут имеют место два типа ориджин репликации: богатые консервативными мотивами DnaA и богатые мотивами ParX. Причём

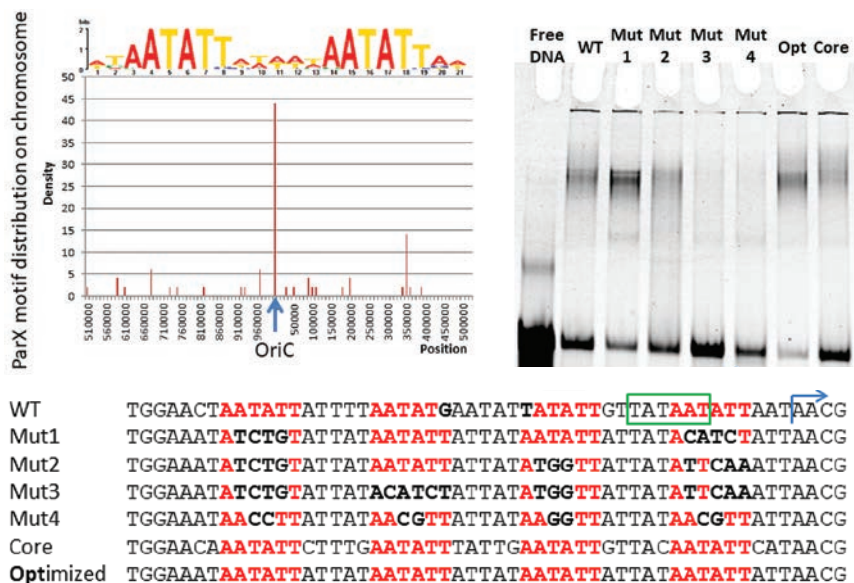


Рисунок 19. Новый транскрипционный регулятор ParX из *M. gallisepticum*.

обогащение является взаимоисключающим. Таким образом, можно предположить, что функция ParX более многогранна, чем просто ТФ. Он участвует в репликации ДНК и каким-то образом влияет на её топологию, делая её более доступной или менее защищённой. Далее был проведён поиск гомологов ParX у других организмов. В результате оказалось, что этот белок уникален для узкой группы микоплазм, известной как группа *Pneumonia*. Сюда входят близкие родственники *M. pneumoniae*, включая *M. gallisepticum* и *M. genitalium*. Таким образом, можно сделать вывод, что такая консервативная функция как инициация репликации ДНК может регулироваться абсолютно неконсервативным способом.

Оперон *rplJL* у *M. gallisepticum* кодирует три рибосомных белка, в том числе два жизненно важных: L10 и L7/12, а также белок L32 (*rpmF*). Активность промотора этого оперона на два порядка превышает собственную активность кор-промотора, что свидетельствует о наличии неизвестного механизма активации этого промотора. Сам кор-промотор, фактически, является очень слабым вследствие мутации в -10-боксе. В промоторе оперона *rplJ* можно выделить три зоны, обуславливающих повышенную активность промотора: 1, 2 и 3 (Рисунок 20).

Для системы активации транскрипции оперона *rplJL* была проведена проверка наличия петли обратной связи. Гипотеза состояла в том, что лигандами для этой системы являются сами рибосомные белки из этого оперона. Аналогичные системы регуляции экспрессии генов рибосомных белков хорошо известны, но в модельных организмах они построены исключительно на рибопереключателях и негативной регуляции транскрипции. Для этого была получена конструкция (и соответствующие рекомбинантные штаммы *M. gallisepticum*), содержащая оперон *rplJ-rplL* из *A. laidlawii* под сильным конститутивным промотором. В результате экспрессия собственного оперона *rplJL* в штаммах-трансформантах снизилась порядка шести раз. Таким образом, показано, что система активации транскрипции оперона *rplJL* в действительности работает не конститутивно, а обеспечивает необходимый баланс продукции рибосомных белков L10 и L7/12 в клетке в зависимости от их текущей представленности.



Рисунок 20. Промоторная активность различных вариантов промотора оперона *rplJ*. Схема расположения вариантов показана зелёными стрелками. Промоторная активность вариантов в единицах ΔCt относительно гена *epo* указана на самих стрелках (в скобках – название варианта). Консервативные зоны обозначены оранжевыми стрелками и цифрами 1, 2 и 3. Консервативность в зоне 1 по геномам *M. gallisepticum*, *M. imitans* и *M. tullyi*, в зоне 2 по всем микоплазмам группы *Pneumonia*, в зоне 3 по *M. gallisepticum*, *M. imitans*, *M. tullyi*, *M. pirum* и *M. alvi*.

Ген *dps* кодирует защитный белок Dps, который имеет как минимум две функции: связывание железа (т.е. работает как аналог ферритина) и защита ДНК при неблагоприятных условиях. Ген *dps* у *M. gallisepticum* имеет два промотора, один из которых сильный консенсусный (TGTGATAAAATN₆A), но малоактивный, а другой имеет набор инактивирующих мутаций (TAAGCTN₆A), но высокоактивный (Рисунок 21). Разница в транскрипционной активности между ними составляет порядок по ранее полученным данным 5'-ERS. Различны варианты промоторов гена *dps* были проверены в репортерной системе с EGFP.

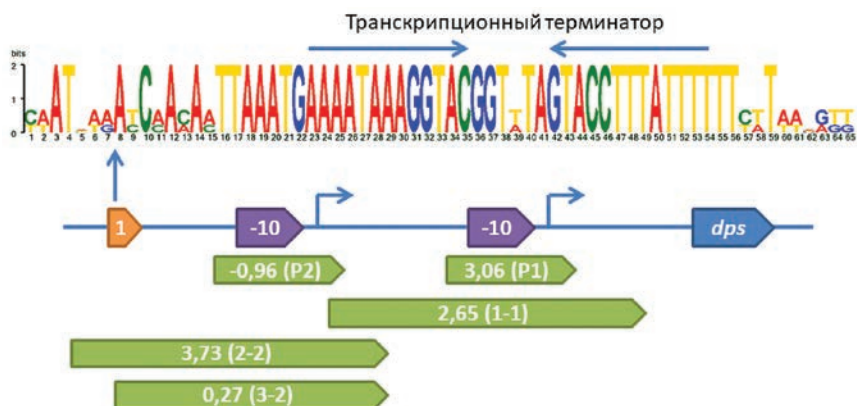


Рисунок 21. Промоторная активность различных вариантов промотора оперона *dps*.

В результате было показано, что слабый промотор показывает низкую активность, а сильный высокую (в геноме наоборот). При расширении промоторной зоны в районе промотора P2 (вариант 2–2) его промоторная активность резко возросла. Эта последовательность представляет собой транскрипционный терминатор предыдущего гена. Также на его 5'-конце находится последовательность не образующая шпильку (TTAAATG). При удалении этой последовательности (вариант 3–2) происходит резкое падение транскрипционной активности. Можно предположить, что сайт связывания активатора пересекается с транскрипционным терминатором и, возможно эти последовательности входят друг в друга. Таким образом, в клетке слабый промотор оттягивает на себя РНК-полимеразу от сильного промотора, расположенного рядом, за счёт активатора. Причины появления такого механизма остаются неизвестными.

Регуляция экспрессии генов гемагглютининов *vlhA* у *M. gallisepticum* являет собой пример сочетания большого динамического диапазона, высокого уровня транскрипции в активированном состоянии, околонулевого уровня «шумовой» транскрипции и крайне необычной структуры промотора

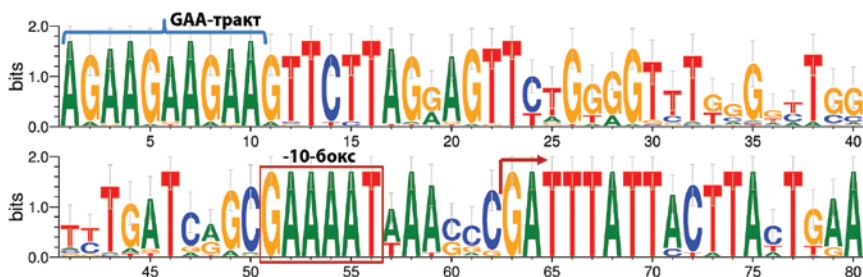


Рисунок 22. Строение промотора гена *vlhA*. Консервативные области между GAA-трактом и промотором.

(Рисунок 22). Для них характерно наличие консервативного -10-элемента GAAAAT. Кроме того перед -10-боксом располагается зона, содержащая GAA-повторы (GAA-тракт). Число повторов может варьировать от нескольких штук до порядка 20. При этом большинство GAA-трактов имеют 8–12 повторов. Далее была получена библиотека вариантов промоторов *vlhA* GAAAAT-типа с различными вариациями (Рисунок 23).

В результате было показано, что активная транскрипция имеет место, только если число повторов равно 12. Также было показано, что мутации перед GAA-трактом сильно снижают транскрипционную активность. Мутации после GAA-тракта снижают её незначительно. Перестановка нуклеотидов в составе 12-членного GAA-тракта приводит к потере активности промотора. При замене промотора с GAAAAT на сигма-70 тип происходила потеря GAA-зависимой регуляции транскрипции. Вариант с сильным сигма-70 промотором (TATAAT) демонстрирует высокую активность независимо от длины GAA-тракта, а слабый сигма-70 промотор (TAAAAT) демонстрирует низкую активность также независимо от длины GAA-тракта.

Далее было проведено аффинное выделение регуляторов промоторов *vlhA*. В результате было обнаружено два кандидатных белка: GCW_03165 и GCW_03170. Это белки с неизвестной функцией и гомологи друг друга. Для подтверждения их функции были получены четыре варианта конструкций для нокдауна: гРНК

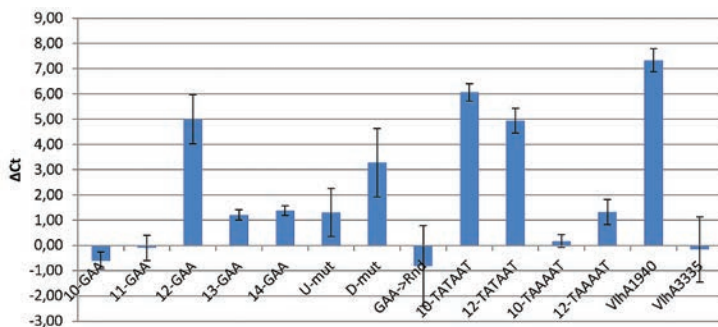


Рисунок 23. Транскрипционная активность вариантов промотора *vlhA* (базовый промотор – промотор гена GCW_01940). 10-GAA – 14-GAA варианты с разным числом GAA повторов, от 10 до 14. U-mut и D-mut – варианты с мутациями в консервативном мотиве до и после GAA-тракта соответственно. GAA->Rnd – вариант с переставленными нуклеотидами в составе GAA-тракта. Длина и ГЦ состав при этом сохранены. 10-TATAAT – вариант с заменой -10-бокса на -10-бокс сигма-70 типа, сильный, в GAA тракте 10 повторов. 12-TATAAT – вариант с заменой -10-бокса на -10-бокс сигма-70 типа, сильный, в GAA тракте 12 повторов. 10-TAAAAT – вариант с заменой -10-бокса на -10-бокс сигма-70 типа, слабый, в GAA тракте 10 повторов. 12-TAAAAT – вариант с заменой -10-бокса на -10-бокс сигма-70 типа, слабый, в GAA тракте 12 повторов. VlhA 1940 – транскрипционная активность гена GCW_01940 (мажорного) в геноме. VlhA 3335 – транскрипционная активность гена GCW_03335 (минорного, следующего в виртуальной очереди на переключение, см. следующую главу) в геноме.

против GCW_03165 с сильным промотором, со слабым промотором, гРНК против GCW_03170 также с сильным и слабым промотором. В результате первые три варианта оказались летальными. Клоны удалось получить только с применением гРНК против GCW_03170 со слабым промотором. В результате удалось добиться снижения транскрипции GCW_03170 на порядок, что привело к снижению транскрипции мажорных *vlhA* (GCW_01940 и GCW_03350) в 4 раза. Таким образом, GCW_03170 и GCW_03165 являются активаторами *vlhA* как и было предсказано (Рисунок 24).

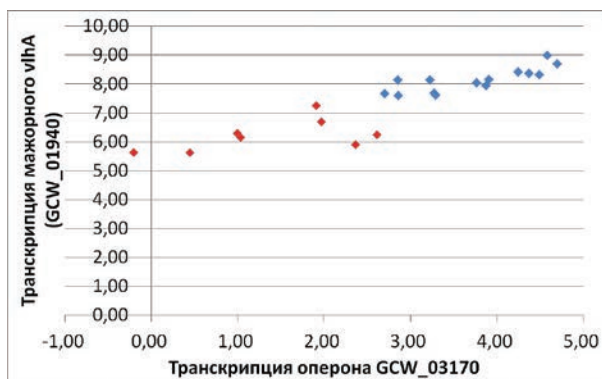


Рисунок 24. Зависимость транскрипции мажорного *vhlA* GCW_01940 от транскрипции активатора GCW_03170 в клонах дикого типа и с нокдауном GCW_03170. Красным показаны штаммы, экспрессирующие гРНК против GCW_03170. Синим показаны штаммы дикого типа.

Структура и состав нуклеоида *M. gallisepticum*

Наблюдаемое несоответствие фактической активности промоторов и их последовательности может быть обусловлено особенностями структуры хромосомы (нуклеоида), а именно наличием топологически изолированных доменов, внутри которых поддерживается отличный от среднего уровень суперспирализации или с которым связаны специфические структурные белки, влияющие на транскрипцию. Кроме того, протеомное профилирование хромосомы может выявить новые как структурные белки нуклеоида, так кандидаты в новые специфические регуляторы. Для этого было проведено выделение нуклеоида *M. gallisepticum* с помощью центрифугирования в сахарозном градиенте. Получаемые образцы исследовались с помощью атомно-силовой микроскопии. Для сравнительного анализа фракция нуклеоида была выделена из клеток в логарифмической и стационарной фазах роста (Рисунок 25). Видно, что нуклеоид *M. gallisepticum* имеет «классическую» структуру плектонемы (особенно в логарифмической фазе роста) с плотным центральным белковым каркасом и расходящимися из

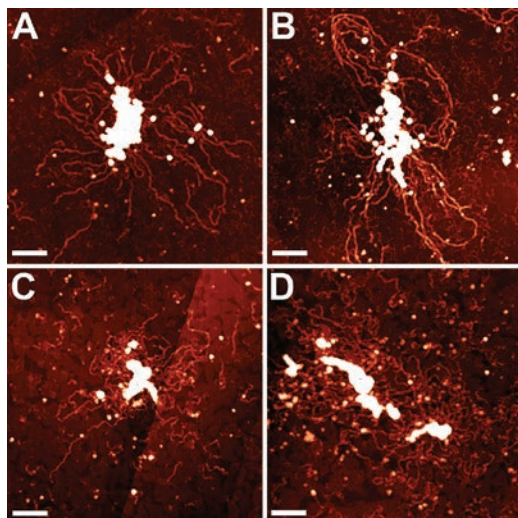


Рисунок 25. Структура нуклеоида *M. gallisepticum* в логарифмической (А, В) и стационарной (С, D) фазах роста. Бар = 100 нм.

него хромосомными петлями, свободными от белков. Структурный анализ позволил определить размер хромосомных петель в разных фазах роста. В логарифмической фазе она составила 200–600 нм (1–2 Кб), а в стационарной 100–200 нм. Можно сделать вывод, что в стационарной фазе нуклеоид компактизуется. Размер хромосомной петли сопоставим с размером одного гена в логарифмической фазе, а в стационарной фазе даже меньше. Таким образом, стабильно топологически изолированные домены, вероятно, не могут содержать более одного гена среднего размера. В стационарной фазе роста уровень компактизации, по-видимому, мешает транскрипции, т.к. для считывания среднего гена РНК-полимеразе необходимо несколько раз преодолевать белковые сшивки между петлями.

Далее был проведён количественный протеомный анализ выделенных фракций. В качестве контроля использовался тотальный клеточный лизат. Анализ данных проводился в двумерной шкале: абсолютная представленность белка во фракции нуклеоида и относительная представленность по сравнению с лизатом. Было

обнаружено, что в стационарной фазе драматически снижается представленность РНК-полимеразы среди белков, ассоциированных с нуклеоидом. Это согласуется с наблюдаемой глобальной супрессией транскрипции в стационарной фазе. На основе структурных данных можно предположить, что первичной является компактизация хромосомы, а РНК полимеразы уходит из нуклеоида вследствие затруднения доступа к ДНК и затруднения движения по ДНК.

Транскрипционно-трансляционная координация у *M. gallisepticum*

Ранее мы применили модель сублетального стрессового воздействия для исследования регуляции экспрессии генов у Молликут. В качестве объекта были выбраны *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*. *A. laidlawii* демонстрирует в тепловом стрессе ожидаемый ответ, как по репертуару дифференциально экспрессирующихся генов, так и по динамическому диапазону ответа. У *A. laidlawii* происходит активация транскрипции генов шаперонов в диапазоне 1–2 порядков относительно контроля, что намного превосходит ответ любых других генов. *M. gallisepticum* в тепловом стрессе демонстрирует множественные изменения транскрипции, причём как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения. При этом диапазон изменений составляет 2–4 раза. Максимальное наблюдаемое изменение – увеличение транскрипции гена шаперона *clpB* в 10 раз. Сопоставление ответа на уровне транскрипции с ответом на уровне белка у *M. gallisepticum* показывает, что наблюдаемые изменения на уровне транскрипции не отражаются на протеоме. Для того чтобы выяснить на каком этапе происходит «фильтрация» происходящих изменений представленности мРНК у *M. gallisepticum*, было проведено рибосомальное профилирование.

Полученные данные демонстрируют, что в отсутствии стресса представленность мРНК в тотальной фракции РНК и в рибосомально-связанной фракции РНК коррелирует с коэффициентом корреляции 0,87 по Спирману (Рисунок 26). При этом в тепловом стрессе корреляция снижается до порядка 0,5. Напротив, представленность

мРНК в рибосомально-связанной фракции в тепловом стрессе остаётся такой же, как и при отсутствии стресса (Рисунок 26). Таким образом, происходит своего рода, «фильтрация» изменений на уровне транскриптома с помощью рибосом. На уровне транскрипции происходят множественные изменения, но далее на уровень трансляции наблюдаемые множественные изменения не передаются. Из полученных данных видно, что фильтрация осуществляется уже на уровне связывания с рибосомами. При этом есть ряд транскриптов, изменения которых всё-таки передаются на уровень трансляции.

Ранее мы показали, что последовательность Шайна-Дальгарно у микоплазм длиннее обычного консенсуса AGGAGG и представляет собой последовательность GAAAGGAGG. Также мы проанализировали частоту встречаемости нуклеотидов у мРНК в районе 5'-нетранслируемой области у мРНК, перепредставленных в рибосомально-связанной фракции. В результате был найден

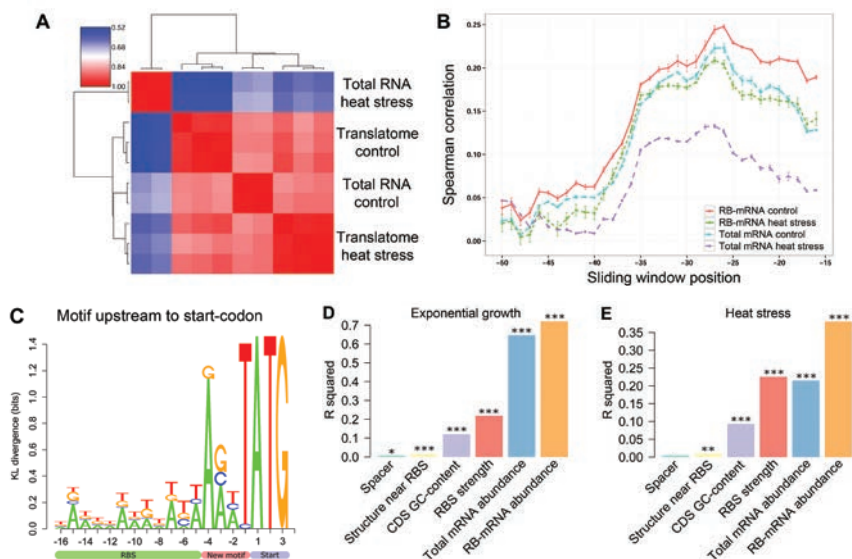


Рисунок 26. «Рибосомный фильтр» и вклад детерминант трансляции в представленность мРНК в рибосомально-связанной фракции.

дополнительный слабый мотив, расположенный между последовательностью Шайна-Дальгарно и старт-кодоном (Рисунок 26). Для оценки влияния вторичной структуры на представленность мРНК в рибосомально-связанной фракции dG вторичной структуры рассчитывалось в скользящем окне длиной 30 нт в районе -50-+14 относительно старт-кодона. Далее рассчитывалась корреляция между представленностью мРНК и dG. В регионе -26-+4 наблюдался всплеск корреляции (Рисунок 26). Чем менее стабильна вторичная структура в 5'-НТР мРНК, тем лучше она транслируется.

Далее совокупность детерминант, а именно представленность мРНК в тотальном транскриптом, вес расширенной последовательности Шайна-Дальгарно, вес дополнительного мотива и энергию образования вторичной структуры в районе старт-кодона были использованы для предсказания представленности мРНК в рибосомально-связанной фракции с помощью машинного обучения. В результате полученная модель смогла предсказать 72% дисперсии в логарифмической фазе роста и 38% при тепловом стрессе. Был рассчитан вклад каждой из детерминант на представленность мРНК в рибосомальном пуле в логарифмической фазе роста и тепловом стрессе. В логарифмической фазе роста главным детерминантом является общее количество мРНК (Рисунок 26). Остальные детерминанты вносят небольшой, хотя и статистически значимый вклад. В тепловом стрессе ситуация кардинально меняется. Вклад последовательности Шайна-Дальгарно вносит вклад даже несколько больший, чем общая представленность мРНК (Рисунок 26). Вклад тотальной представленности мРНК при этом снижается примерно в три раза, а вклад остальных детерминант не меняется.

ВЫВОДЫ

1. Разработан и использован мультиомиксный подход для изучения особенностей регуляции транскрипционной активности геномов Молликут. Для трёх бактерий класса Молликут (микоплазм) с разной степенью редукции генома *Acholeplasma laidlawii* (1,5 млн. п.о.), *Spiroplasma melliferum* (1,3 млн. п.о.) и *Mycoplasma gallisepticum* (1 млн п.о.) картированы промоторы с разрешением в один нуклеотид.
2. С использованием ряда пертурбационных моделей (тепловой, окислительный гиперосмотический стресс, экспоненциальная и стационарная фазы роста) показано, что системный транскрипционный ответ у *M. gallisepticum* на стресс может быть неадаптивным. В частности при тепловом стрессе происходит изменение транскрипции 430 генов. При этом на уровне белка происходят изменения представленности всего нескольких штук белков: ClpB, DnaK, OsmC. Было определено, что при тепловом стрессе фракция рибосомно-связанных мРНК меняется незначительно, по сравнению с фракцией тотальной РНК. Таким образом, происходит «фильтрация» неадаптивного транскрипционного ответа на уровне связывания мРНК с рибосомами.
3. На основе полученных данных об организации промоторов и сайтов связывания рибосомы у *M. gallisepticum* создан вектор для генетической трансформации этой бактерии более эффективный, чем созданные ранее (позволяет снизить количество трансформируемой ДНК в 1000 раз). Созданное семейство векторов позволяет проводить транспозонный мутагенез, экспрессию и нокдаун генов (с помощью системы dCas9).
4. Показано, что у бактерий класса Молликут деградация систем регуляции транскрипции сопряжена с потерей

метаболических путей. При редукции генома у Молликут остаётся консервативное ядро из нескольких регуляторов: **WhiA**, **HrcA**, **MraZ**, **YebC**, **SpxA**. Для регуляторов WhiA, HrcA, MraZ, SpxA обнаружены гены-мишени и определены функции у *Mycoplasma gallisepticum*. HrcA является транскрипционным репрессором генов шаперонов *clpB*, *dnaK*, *lon*, *dnaJ2*. WhiA является транскрипционным репрессором оперона рибосомных белков (оперон *rpsJ*). MraZ является транскрипционным активатором оперона белков клеточного деления (DCW-кластера). SpxA является транскрипционным активатором генов тиоредоксина и пероксиредоксина.

5. Создана количественная модель промотора *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*. Обнаружен ряд промоторов *M. gallisepticum*, активность которых существенно отличается от предсказанной. Для этих промоторов найдены геномные детерминанты, обуславливающие наблюдаемое отклонение. В частности, найден ряд РНК-структур, влияющих на транскрипцию генов у *M. gallisepticum*, такие как тиаминовый рибопереклюатель в опероне *hatABC* и рибопереклюатель в опероне *infC-rpmI-rplT*. Найден новый транскрипционный репрессор (ParX) оперона *dnaA-parA*, не относящийся к известным семействам транскрипционных факторов. Показано что для ряда генов домашнего хозяйства используются комбинации слабых промоторов с дополнительными механизмами активации транскрипции.
6. Показано, что в стационарной фазе нуклеоид *M. gallisepticum* претерпевает компактизацию, которая сопряжена со снижением представленности РНК-полимеразы и глобальным падением транскрипции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Fisunov G.Y.**, Tsvetkov V.B., Tsoy E.A., Evsyutina D.V., Vedyaykin A.D., Garanina I.A., Semashko T.A., Manuvera V.A., Varizhuk A.M., Kovalchuk S.I., Zubov A.I., Barinov N.A., Pobeguts O.V., Govorun V.M. WhiA transcription factor provides feedback loop between translation and energy production in a genome-reduced bacterium. // **Frontiers in Microbiology**. 2024. Vol. 15. P. 1–20.
2. Evsyutina D.V., **Fisunov G.Y.**, Pobeguts O.V., Kovalchuk S.I., Govorun V.M. Gene Silencing through CRISPR Interference in Mycoplasmas. // **Microorganisms**. 2022. Vol. 10 № 6. P. 1159.
3. Evsyutina D.V., Semashko T.A., Galyamina M.A., Kovalchuk S.I., Ziganshin R.H., Ladygina V.G., **Fisunov G.Y.**, Pobeguts O.V. Molecular Basis of the Slow Growth of *Mycoplasma hominis* on Different Energy Sources. // **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2022. Vol. 12. P. 918557.
4. **Fisunov G.Y.**, Pobeguts O.V., Ladygina V.G., Zubov A.I., Galyamina M.A., Kovalchuk S.I., Ziganshin R.K., Evsyutina D.V., Matyushkina D.S., Butenko I.O., Bukato O.N., Veselovsky V.A., Semashko T.A., Klimina K.M., Levina G.A., Barhatova O.I., Rakovskaya I.V. Thymidine utilisation pathway is a novel phenotypic switch of *Mycoplasma hominis*. // **Journal of Medical Microbiology**. 2022. Vol. 71, № 1. P. 001468.
5. **Fisunov G.Y.**, Zubov A.I., Pobeguts O.V., Varizhuk A.M., Galyamina M.A., Evsyutina D.V., Semashko T.A., Manuvera V.A., Kovalchuk S.I., Ziganshin R.K., Barinov N.A., Klinov D.V., Govorun V.M. The Dynamics of *Mycoplasma gallisepticum* Nucleoid Structure at the Exponential and Stationary Growth Phases. // **Frontiers in Microbiology**. 2021. Vol. 12, № 1. P. 753760.
6. Галямина М.А., Зубов А.И., Ладыгина В.Г., Ли А.В., Матюшкина Д.С., Побегуц О.В., **Фисунов Г.Ю.** Сравнительный протеомный анализ фракции нуклеоида *Mycoplasma gallisepticum* до и после

- инфекции. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2021. Vol. 172, № 9. P. 336–340.
7. Зубов А.И., Ладыгина В.Г., Галямина М.А., Побегуц О.В., **Фисунов Г.Ю.** Выделение фракции нуклеоида из клеток *Mycoplasma gallisepticum* с синхронизированным клеточным делением. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2021. Vol. 171, № 6. P. 760–763.
 8. Rumyantseva N.A., Vedyaykin A.D., Khodorkovskii M.A., Vishnyakov I.E., **Fisunov G.Y.** Analysis of stochasticity of gene expression in single cells of *Mycoplasma gallisepticum*. // **Journal of Physics: Conference Series**. 2019. Vol. 1400, № 3. P. 033020
 9. Garanina I.A., **Fisunov G.Y.**, Govorun V.M. BAC-BROWSER: The Tool for Visualization and Analysis of Prokaryotic Genomes. // **Frontiers in Microbiology**. 2018. Vol. 9, № 1. P. 2827.
 10. Orlov M., Garanina I., **Fisunov G.Y.**, Sorokin A. Comparative Analysis of *Mycoplasma gallisepticum* *vlhA* Promoters. // **Frontiers in Genetics**. 2018. Vol. 9, № 1. P. 569
 11. Butenko I., Vanyushkina A., Pobeguts O., Matyushkina D., Kovalchuk S., Gorbachev A., Anikanov N., **Fisunov G.**, Govorun V. Response induced in *Mycoplasma gallisepticum* under heat shock might be relevant to infection process. // **Scientific Reports**. 2017. Vol. 7, № 1. P. 11330.
 12. **Fisunov G.Y.**, Evsyutina D. V., Manuvera V.A., Govorun V.M. Binding site of restriction-modification system controller protein in Mollicutes. // **BMC Microbiology**. 2017. Vol. 17, № 1. P. 26.
 13. **Fisunov G.Y.**, Evsyutina D. V., Garanina I.A., Arzamasov A.A., Butenko I.O., Altukhov I.A., Nikitina A.S., Govorun V.M. Ribosome profiling reveals an adaptation strategy of reduced bacterium to acute stress. // **Biochimie**. 2017. Vol. 132. P. 66–74.
 14. Butenko I., Pobeguts O., Matyushkina D., Kovalchuk S., Anikanov N., **Fisunov G.**, Govorun V. Data-independent proteome profile of *Mycoplasma gallisepticum* under normal conditions and heat stress. // **Data in Brief**. 2017. Vol. 16. P. 700–704.
 15. Matyushkina D., Pobeguts O., Butenko I., Vanyushkina A., Anikanov N., Bukato O., Evsyutina D., Bogomazova A., Lagarkova M., Semashko T., Garanina I., Babenko V., Vakhitova M., Ladygina V.,

- Fisunov G.**, Govorun V. Phase Transition of the Bacterium upon Invasion of a Host Cell as a Mechanism of Adaptation: a *Mycoplasma gallisepticum* Model. // **Scientific Reports**. 2016. Vol 6. P. 35959.
16. **Fisunov G.Y.**, Evsyutina D. V., Semashko T.A., Arzamasov A.A., Manuvera V.A., Letarov A.V., Govorun V.M. Binding site of MraZ transcription factor in Mollicutes. // **Biochimie**. 2016. Vol. 125. P. 59–65.
17. **Fisunov G.Y.**, Garanina I.A., Evsyutina D. V., Semashko T.A., Nikitina A.S., Govorun V.M. Reconstruction of Transcription Control Networks in Mollicutes by High-Throughput Identification of Promoters. // **Frontiers in Microbiology**. 2016. Vol. 7, №1, P. 1977.
18. Semashko T.A., Arzamasov A.A., **Fisunov G.Y.**, Govorun V.M. Transcription profiling data set of different states of *Mycoplasma gallisepticum*. // **Genomic Data**. 2016. Vol. 11, №1, P. 49–54.
19. **Fisunov G.Y.**, Evsyutina D.V., Govorun V.M. Data on translational analysis of *Mycoplasma gallisepticum*. // **Data in Brief**. 2016. Vol. 9. P. 422–424.
20. Matyushkina D., Pobeguts O., Garanina I., Babenko V., Vakhitova M., **Fisunov G.**, Govorun V. Data on genome analysis of *Mycoplasma gallisepticum* during intracellular infection. // **Data in Brief**. 2016. Vol. 10. P. 264–268
21. **Fisunov G.Y.**, Evsyutina D. V., Arzamasov A.A., Butenko I.O., Govorun V.M. Profiling of *Mycoplasma gallisepticum* ribosomes. // **Acta Naturae**. 2015. Vol. 7, № 4(27). P. 107–112.
22. Mazin P.V., **Fisunov G.Y.**, Gorbachev A.Y., Kapitskaya K.Y., Altukhov I.A., Semashko T.A., Alexeev D.G., Govorun V.M. Transcriptome analysis reveals novel regulatory mechanisms in a genome-reduced bacterium. // **Nucleic Acids Research**. 2014. Vol. 42, № 21. P. 13254–13268.
23. Vanyushkina A.A., **Fisunov G.Y.**, Gorbachev A.Y., Kamashev D.E., Govorun V.M. Metabolomic analysis of three Mollicute species. // **PLoS One**. 2014. Vol. 9, № 3. P. e89312.