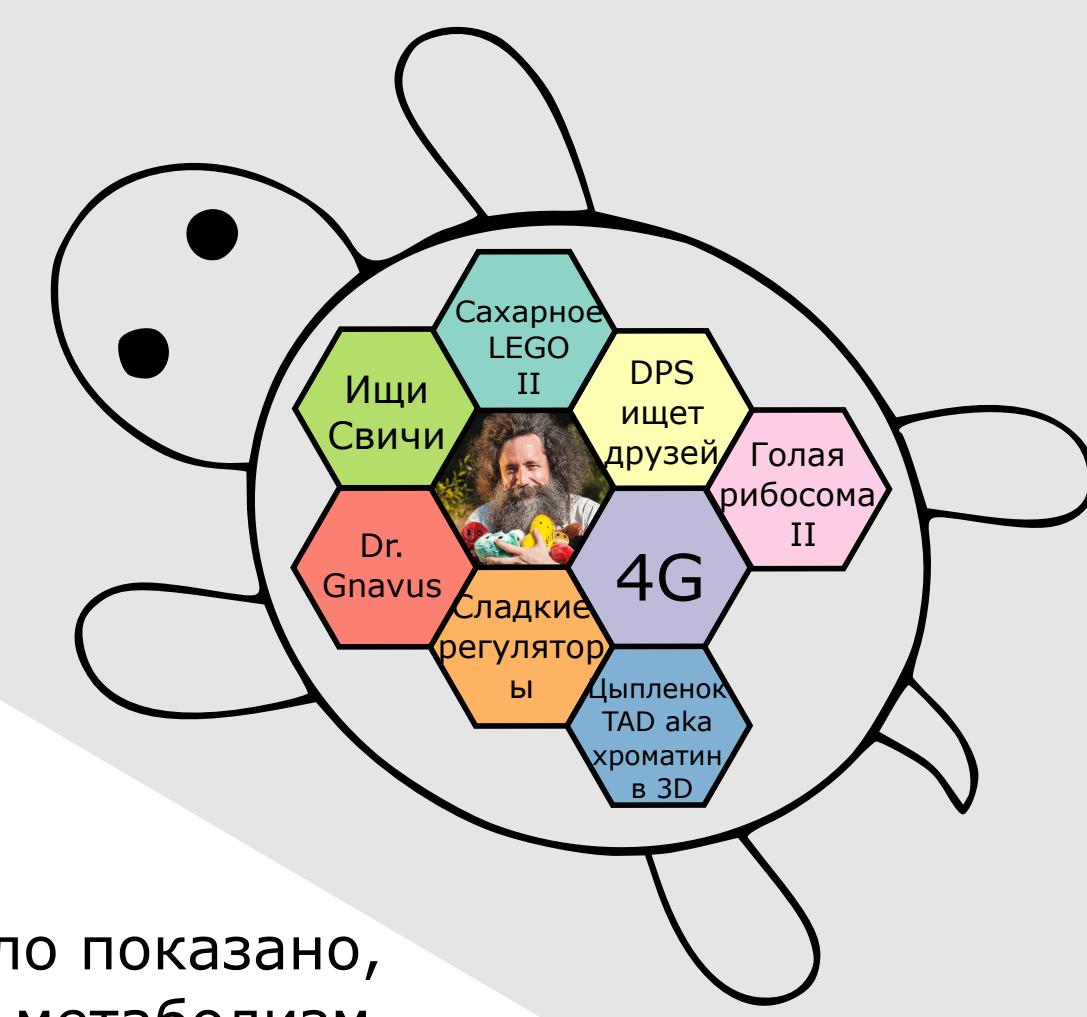




Династия



Сахарное Лего II



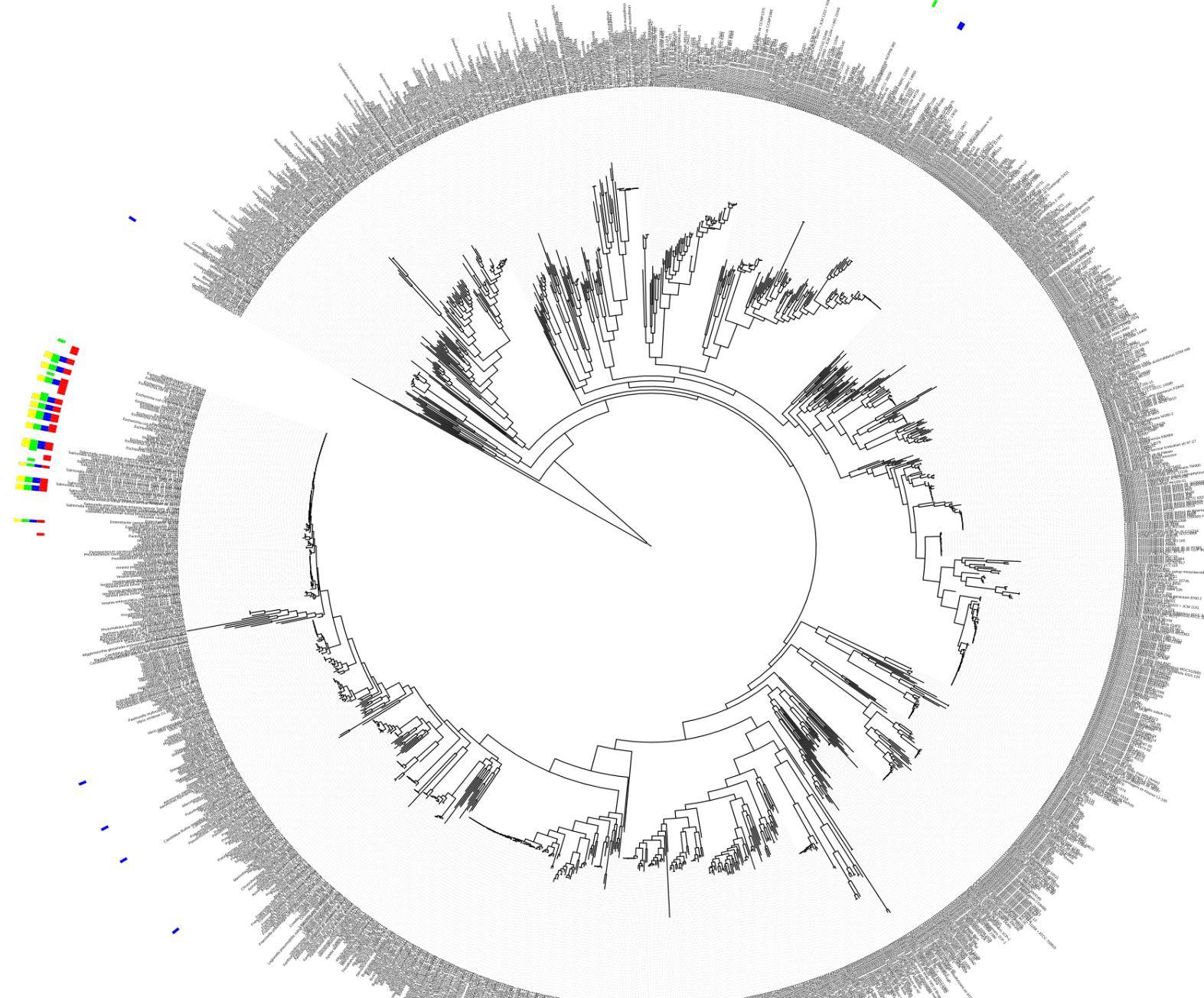
Введение

Во время работы на прошлой школе было показано, что кассета генов E.coli, отвечающая за метаболизм сульфоглюкозы*, также предположительно участвует в метаболизме лактозы. Мы проверили эту гипотезу, используя как биоинформационные методы, так и экспериментальные.

* "Sulphoglycolysis in Escherichia coli K-12 closes a gap in the biogeochemical sulphur cycle" (Nature, 2014)

Цель

Анализ вовлеченности генов кассеты yihQRSTUVW E.coli в метаболизм лактозы.



Co-location cases of orthologs of three genes from the analyzed cassette (kinase, isomerase, aldolase) is shown on the phylogenetic tree. Kinase and isomerase pair seems to be the most conserved combination. All three are only found together in close relatives of E. coli.

Red – isomerase/ aldolase, blue – kinase/isomerase, green – aldolase/kinase, yellow - isomerase/aldolase/kinase.

Abstract

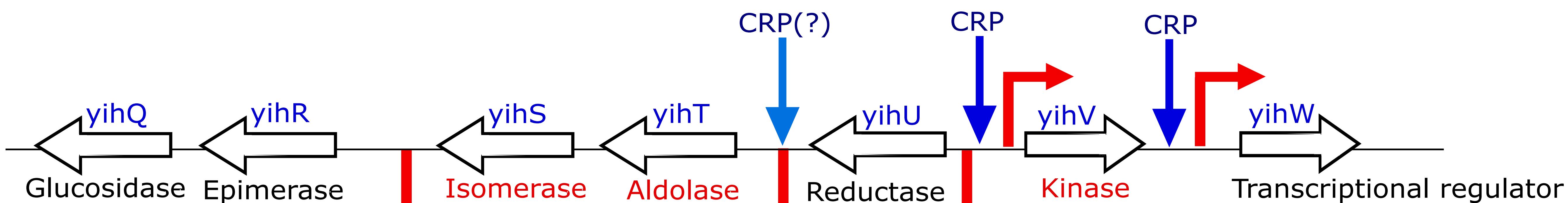
Previously (SMTB-2014) we* predicted that the gene cassette, described by Denger et al. (2014) as the "sulfoglucose cassette", might be involved in lactose metabolism. Here we used computational and experimental approaches to map promoters for the *yihW*, *yihU* and *yihR* genes. Further, we have demonstrated that the *yihTS* operon and the *yihV* gene are transcriptionally controlled by the global regulator cAMP-CRP. During growth on lactose as a sole carbon source, they were activated, and cAMP-CRP turned out to be essential for this activation. We also propose, based on comparative genomic analysis, that the *yihW* gene encodes transcriptional regulator from the DeoR family that, together with cAMP-CRP, may be involved in the regulation of *yihW*, *yihV* and possibly *yihT*.

*Sugar Lego I project with A. Eremina

Sugar Lego II

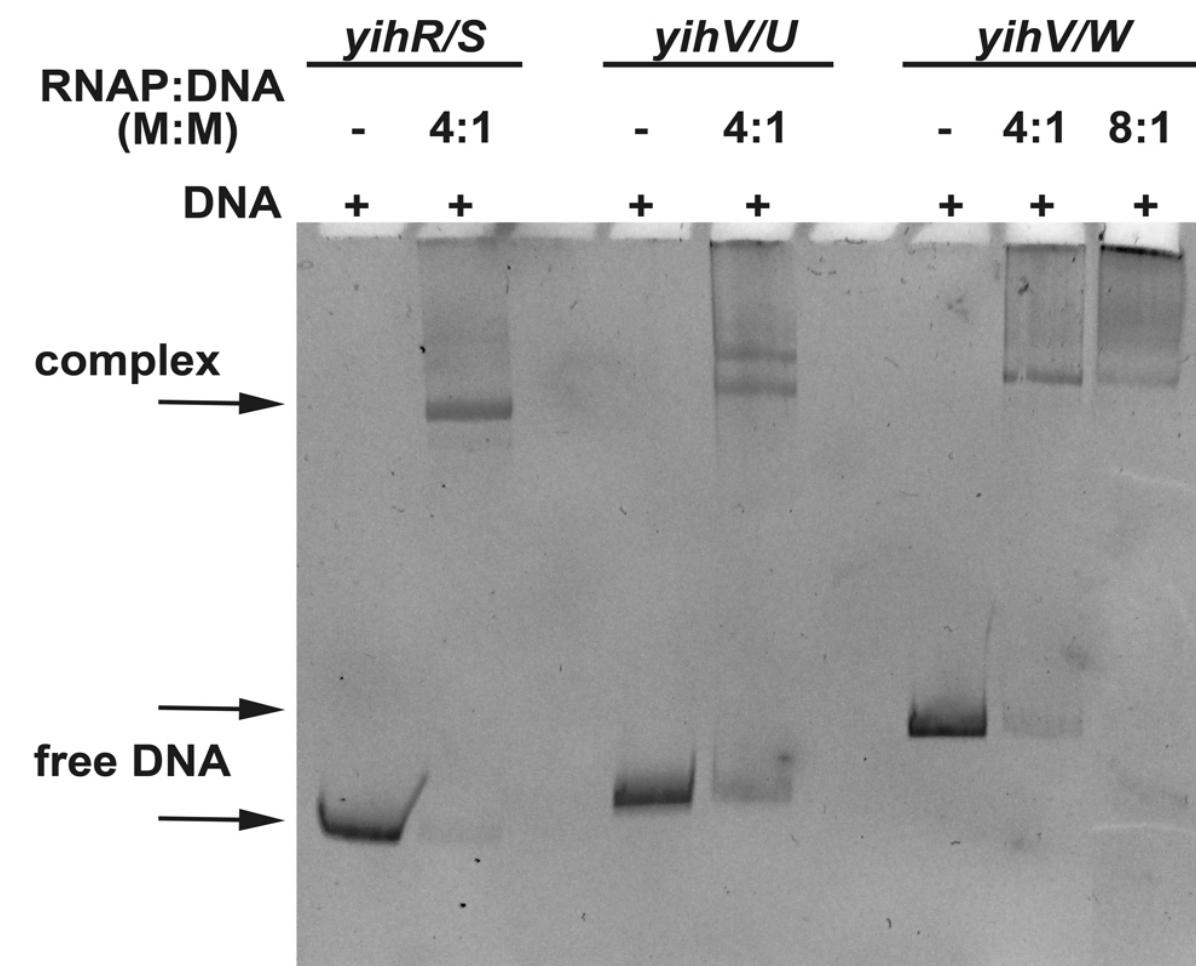
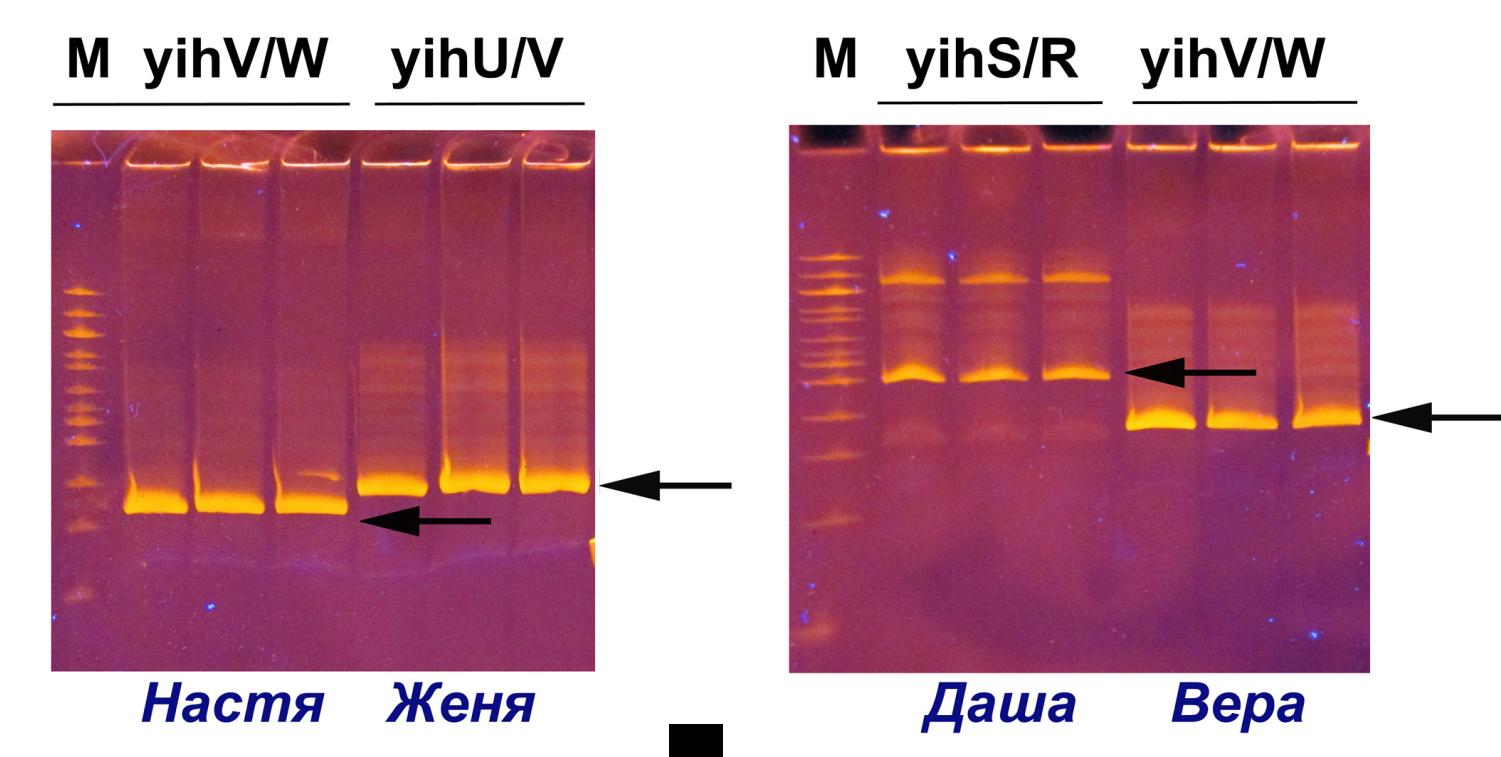
Е. Белоусова, Д. Быкова, В. Емельяненко, А. Коростелева, А. Казнадзей, М. Тутукина

E. Belousova, D. Bykova, V. Emelyanenko, A. Korosteleva, A. Kaznadzey, M. Tutukina



Поиск промоторов

1. Алгоритм поиска промоторов PlatProm. Множественное выравнивание - TCoffee и глаза.
2. Подбор праймеров с помощью Primer3 и глаз для наработки межгенных областей. ППР-амплификация межгенных областей и выделение полученных фрагментов ДНК из геля. Оценка связывания с РНК-полимеразой методом электрофореза с задержкой в геле (band-shift, EMSA)

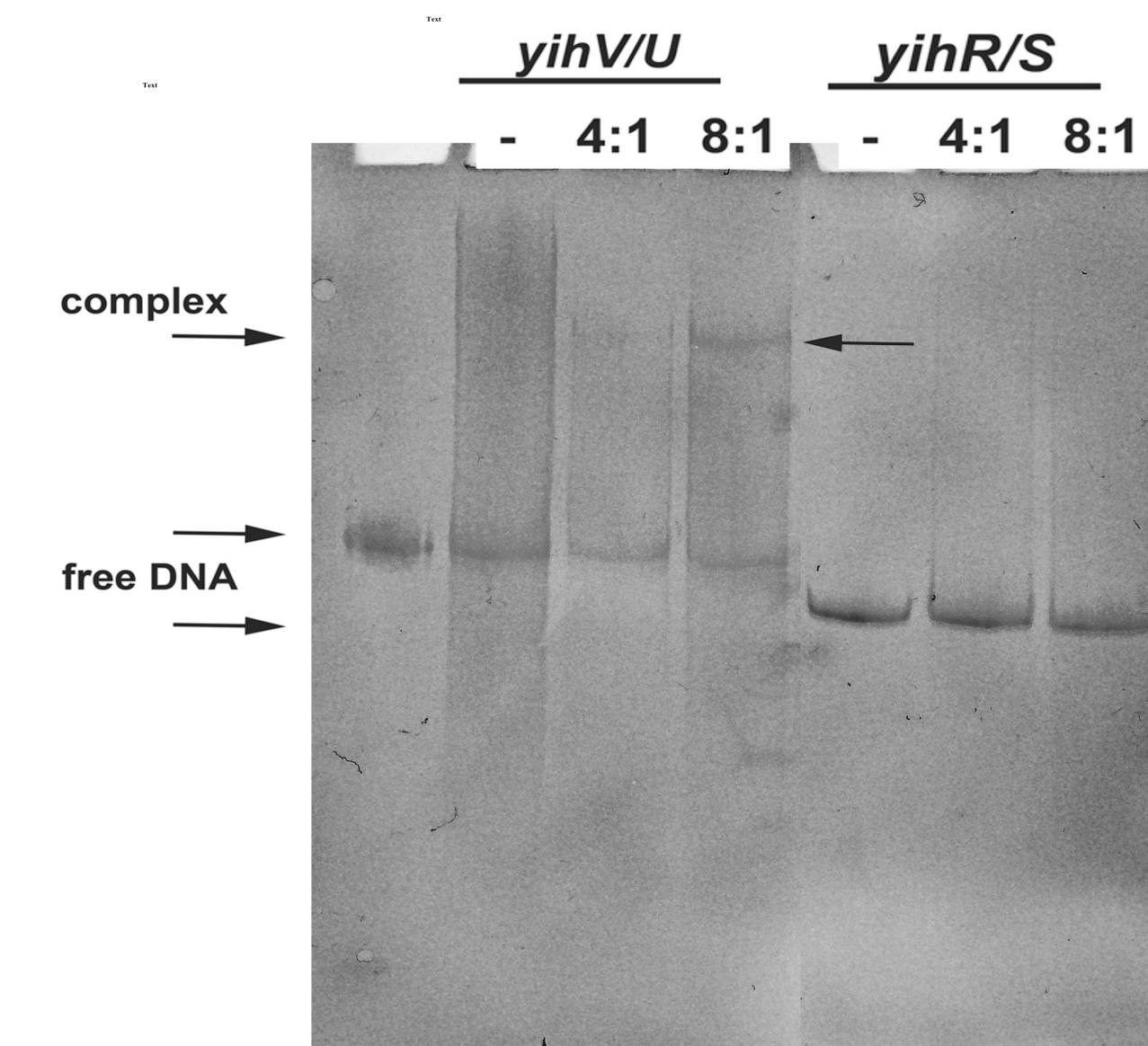
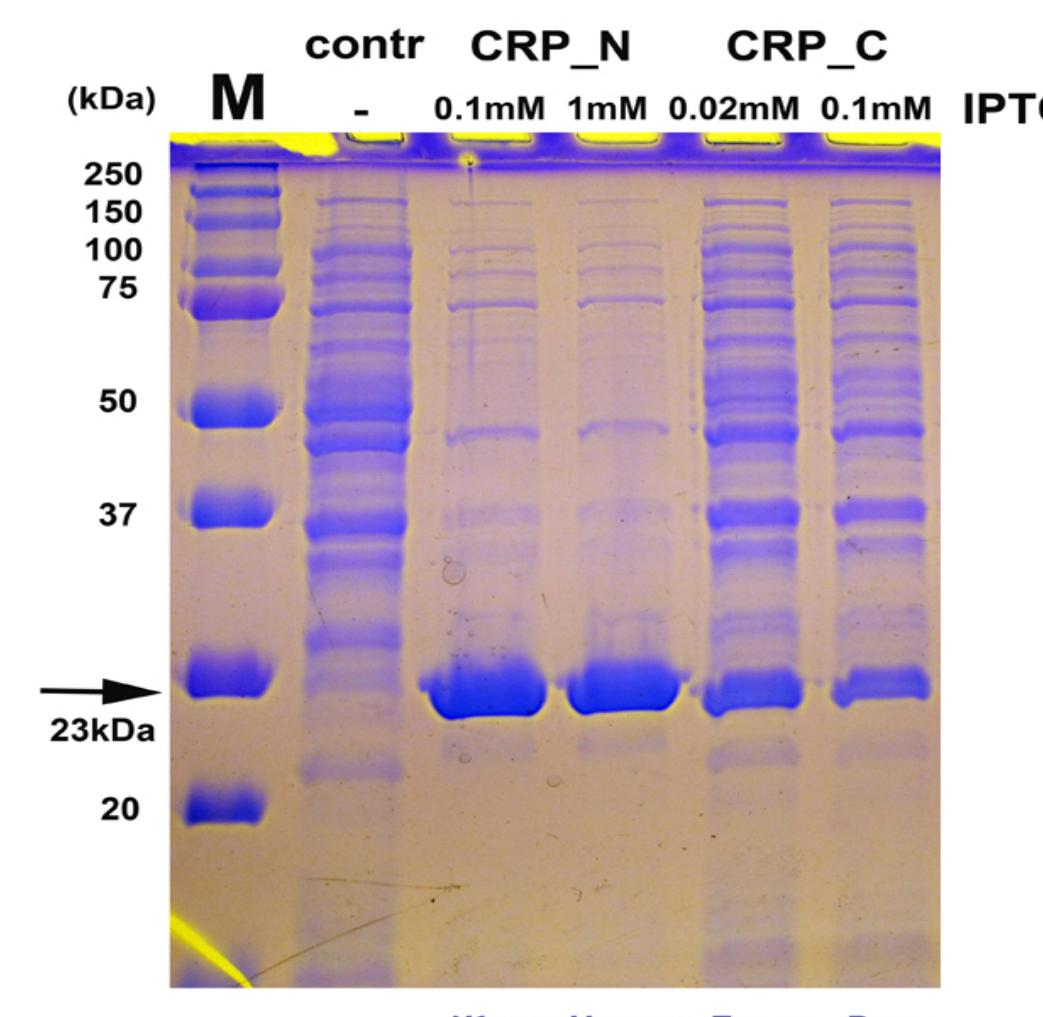


yihV/yihW – 1 промотор
yihU/yihV – 2 промотора
yihR/yihS – 1 промотор

Band-shift with RNA-polymerase for *yihV/yihW*, *yihU/yihV*, *yihR/yihS*. Single promoters were shown for *yihV/yihW* and *yihR/yihS*, and divergent promoters – for *yihU/yihV*.

Поиск сайтов регуляции транскрипции

1. Последовательности межгенных областей – MicrobesOnLine. Потенциальные сайты транскрипционных факторов - Virtual Footprint. Множественное выравнивание – TCoffee и глаза.
2. Экспериментальная проверка: Трансформация клеток E. coli BL 21*(DE3) плазмидами pGEM_CRP, суперпродуцирующими CRP с N- и C-концевым His-тагом. Подбор условий, оптимальных для суперпродукции белка CRP. Приготовление клеточного лизата и оценка связывания исследуемых областей с CRP методом EMSA. Подтверждение специфичности комплексов с помощью western-blot с anti-his и anti-CRP (T14) антителами.

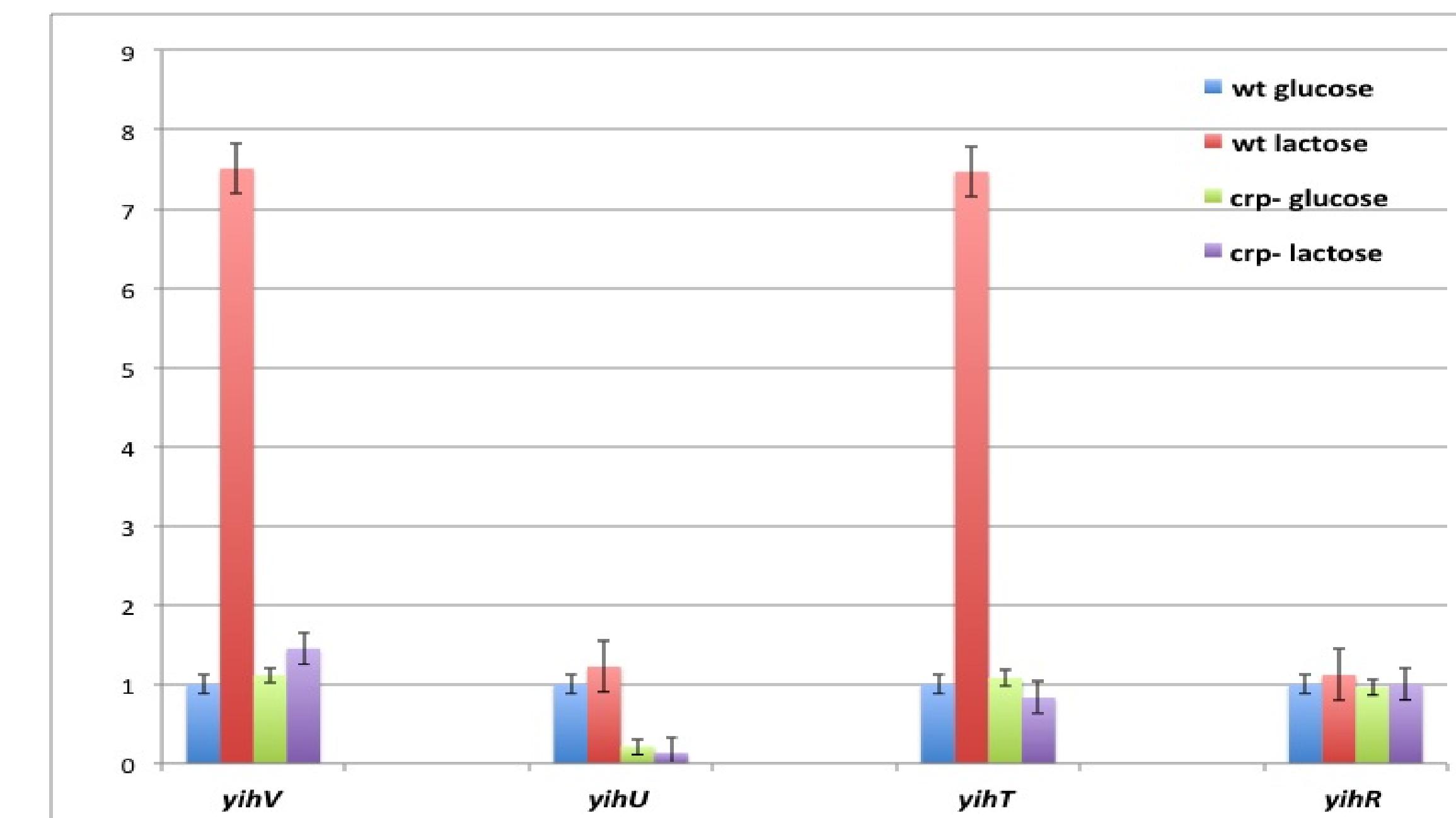
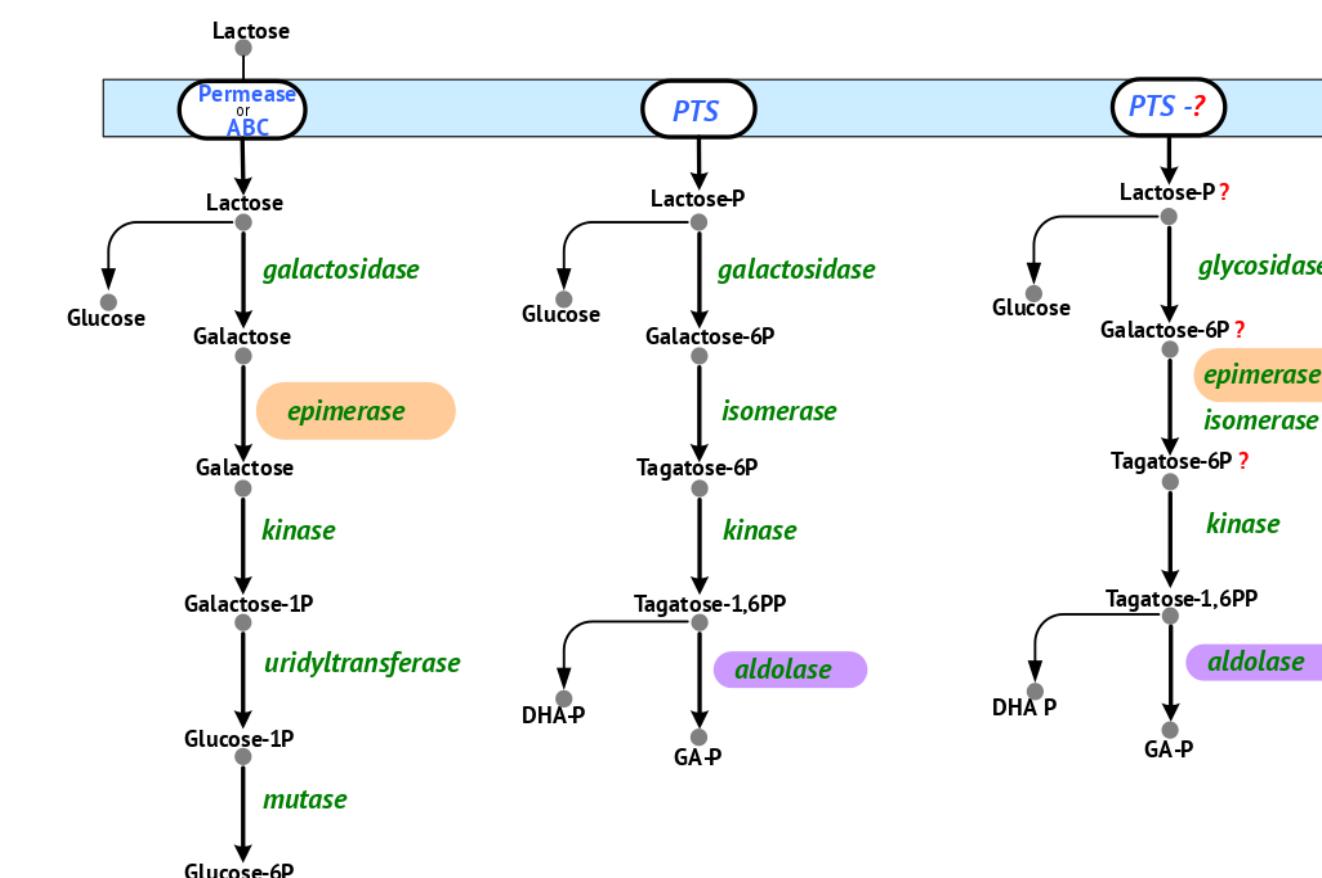


yihV/yihW – 2 сайта CRP.
yihU/yihV – 1 сайт CRP (не тот, который в Shimada et al., PlosOne 6, 2011)
yihR/yihS – нет сайта CRP.
Фактор транскрипции YihW принадлежит семейству DeoR, похож на GlpR, является авторегулятором и, по-видимому, работает вместе с CRP (методы сравнительной геномики).

Band-shift with CRP for *yihV/yihW*, *yihU/yihV*, *yihR/yihS*. Single CRP-binding site was shown for *yihU/yihV* (not the one from Shimada et al., PlosOne 6, 2011), double CRP-binding site – for *yihV/yihW*, no CRP-binding sites in *yihR/yihS* intergenic region. Transcription factor YihW from the family DeoR, similar to GlpR, is self-regulating and seems to be working together with CRP (methods of comparative genomic).

Исследование путей лактозного метаболизма

1. Выделение тотальной мРНК . Условия: E. coli K12 MG1655 и E. coli K12 MG1655Δcrp, среда Minimal Salts+5%LB+0.2% glucose/lactose, 4.5 часа роста.
2. Обратная транскрипция с праймерами к исследуемым генам 3.qRT-PCR (с кdНК).



yihV и *yihT* активированы при росте бактерий на лактозе, что, по-видимому, опосредовано cAMP-CRP. Экспрессия *yihR* и *yihU* на глюкозе и лактозе не отличается. cAMP-CRP является неспецифическим активатором *yihU* и не влияет на *yihT*.

qRT-PCR under different growth conditions. The *yihTS* operon and the *yihV* gene are activated on lactose, with cAMP-CRP being vital for this activation. The *yihU* and *yihR* genes are not activated on lactose. cAMP-CRP does not affect expression of *yihR*, being non-specific activator for *yihU*.

Acknowledgments: to Sasha Eremina for previous year's work, to Mila Zudina and Karen Sarkisyan for bringing us primers, to Pasha Shelyakin for several bioinformatic tools and to the Dynasty foundation and everybody involved.