

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

ЕВСЮТИНА ДАРЬЯ ВИКТОРОВНА

**Регуляция передачи генетической информации у бактерий
с редуцированным геномом**

1.5.3 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА – 2022

Работа выполнена в Лаборатории протеомного анализа отдела молекулярной биологии и генетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства».

- Научный руководитель** – *Говорун Вадим Маркович, доктор биологических наук, профессор, академик РАН*
- Официальные оппоненты** – *Готтих Марина Борисовна, доктор химических наук, профессор, заведующий отделом химии нуклеиновых кислот, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова*
- Замятнин Андрей Александрович, доктор биологических наук, доцент, директор Института молекулярной медицины ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации*
- Лашин Сергей Александрович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник сектора биоинформатики и информационных технологий в генетике, ФГБУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»*

Защита диссертации состоится «08» декабря 2022 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.4 (МГУ.03.01) Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12, Биологический факультет, ауд. 389.

E-mail: mgu.03.01.dissovvet@gmail.com.

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/503463392/>

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Т.В. Комарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Передача генетической информации – один из центральных процессов в живых организмах, связывающий между собой ДНК, РНК и белки. Её регуляция обеспечивает пластичность живой системы и может осуществляться на разных этапах. Бактерии с редуцированным геномом, такие как представители класса Mollicutes, способны к самостоятельной репликации своего генетического материала на искусственных средах. Уменьшение размера генома у этих бактерий привело и к редукции репертуара регуляторов экспрессии генов, но, несмотря на это, Молликуты сохранили широкие адаптивные способности. Изучение регуляции передачи генетической информации у бактерий с редуцированным геномом представляет интерес как с фундаментальной (обеспечение стабильности клетки и процессов в ней при наличии малого числа известных регуляторов), так и с прикладной точек зрения (изучение правил, которые помогут создать искусственную клетку, с заданным набором свойств и функций).

Степень разработанности темы. Микоплазмы были одними из первых бактерий, чьи геномы были полностью секвенированы и со временем, как бактерии с редуцированным геномом, стали главными объектами системной биологии. Ученые полагали расшифровать основные принципы организации и функционирования бактериальной клетки на этих «просто устроенных» организмах. Однако, чем больше накапливалось мультиомиксных данных о микоплазмах, тем больше появлялось вопросов, в частности о том, как осуществляется регуляция процессов в отсутствие классических регуляторов, известных для модельных бактерий. В работах, опубликованных группой Л. Серрано, была предложена модель регуляции экспрессии генов, где основной вклад в регуляцию вносит пространственная организация ДНК, вторичные структуры РНК, малые РНК, а действием транскрипционных факторов может быть объяснена лишь малая доля изменений уровня мРНК. Описанные Л. Серрано с коллегами процессы действительно могут вносить свой вклад в регуляцию экспрессии генов. Однако в представленной работе мы попытались найти и охарактеризовать мишени как предсказанных транскрипционных факторов, так и новых, еще неизвестных, и выяснить их вклад в регуляцию транскрипции.

Цели и задачи исследования. Целью работы было выяснение механизмов регуляции передачи генетической информации у бактерий с редуцированным геномом на примере *Mycoplasma gallisepticum* S6.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Из всех генов *M. gallisepticum* S6 отобрать гены потенциальных факторов регуляции транскрипции (ТФ)
2. Провести поиск генов-мишеней потенциальных транскрипционных факторов
3. Экспериментально подтвердить сайты связывания ТФ-ов
4. Предложить способ валидации новых генов - мишеней регуляторов
5. Рассмотреть связывание рибосомы с мРНК как возможный механизм регуляции передачи информации от мРНК к белку. В качестве модели использовать ответ микоплазмы на тепловой стресс

Научная новизна работы. В результате проделанной работы описаны и охарактеризованы четыре новых транскрипционных фактора *M. gallisepticum* S6 – MraZ, Xre, WhiA и Fur. Найдены и экспериментально подтверждены их сайты связывания. Разработана и валидирована система для поиска мишеней регуляторов на транскрипционном уровне, а также найден новый регулятор - ParX. Удалось установить избирательность рибосом в отношении к мРНК при тепловом стрессе. Впервые показано, что адаптивный ответ микоплазмы на тепловой стресс состоит в изменении транскрипции генов, кодирующие шапероны, иммуноглобулин-связывающие белки, белки, участвующие в деление клетки и несколько белков с неизвестной функцией. Изменение экспрессии остальных генов, вероятно, представляет собой транскрипционный шум, поскольку не приводит к существенному изменению абсолютного содержания транскриптов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты вносят вклад в раскрытие регуляторных событий у бактерий с редуцированным геномом и могут быть использованы как для создания искусственных живых систем с заданными функциями, так и для поиска новых препаратов для борьбы с микоплазмами.

Методология и методы исследования. Работа выполнена с использованием стандартных молекулярно-биологических и биохимических методов. Для получения чистых препаратов потенциальных транскрипционных факторов были сконструированы вектора, содержащие гены интересующих белков. Генетический код микоплазм отличается от кода других бактерий. Так кодон TGA не является стоп-кодоном, а кодирует триптофан. Таким образом, для использования векторов в стандартной экспрессионной системе в *E. coli* необходимо было провести замену TGA кодонов в кодирующих последовательностях генов на TGG. Экспериментальное подтверждение ДНК-связывающих свойств белков-кандидатов оценивали с помощью электрофореза в нативных условиях. Для каждого белка были подобраны условия для его взаимодействия с субстратом – дцДНК. Анализ консервативности генов-регуляторов и их сайтов связывания проводили стандартными

биоинформатическими методами. В работе были созданы новые генетические конструкции для сверхэкспрессии генов в Молликутах. Такие суперпродуценты позволили выявить фенотипические эффекты действия новых транскрипционных факторов. Для поиска и подтверждения мишеней ТФ-ов была разработана система на основе CRISPR интерференции для подавления экспрессии целевых генов у *M. gallisepticum*. Для валидации новых генов - мишеней регуляторов - была разработана система оценки влияния вносимого генетического элемента на уровень транскрипции. В эту систему входит вектор на основе транспозона, который может быть использован для микоплазм. Вектор позволяет вносить желаемые генетические элементы (участки промотора, потенциальный сайт связывания ТФ-а) в промоторную область *egfp* и затем с помощью ПЦР в реальном времени оценить влияние элемента на экспрессию репортерного гена. Для анализа фракции мРНК, связанной с рибосомами, были выделены целые рибосомы, проведено секвенирование РНК, оценена дифференциальная экспрессия генов. Также в работе были использованы рутинные микробиологические и биохимические подходы, которые подробно описаны в разделе «Материалы и методы».

Положения, выносимые на защиту:

1. Используя базы данных функциональных доменов и аннотации, было предсказано 10 потенциальных факторов регуляции транскрипции у *M. gallisepticum* S6.
2. Белок MraZ связывает серию прямых повторов - AAAGTG[T/G], разделенных спейсером в три нуклеотида. MraZ активирует транскрипцию генов кластера деления. Сверхэкспрессия *mraZ* отражается на фенотипе клеток микоплазмы – клетки удлиняются, образуя филаменты.
3. Белок Xre (HsdC) связывает повторы вида - (GTGTTAN₅)₂. Xre выступает репрессором экспрессии генов одной из систем рестрикции-модификации.
4. Белки семейства FUR неравномерно распределены среди представителей семейства *Mycoplasmataceae*. Несмотря на консервативность оперона, содержащего *fur*, у трёх хорошо изученных видов микоплазм, ортологичные мишени ТФ-а не обнаружены. У *M. gallisepticum* сайт связывания Fur представляет собой инвертированные повторы (TTATTTWDAAWWTTHWAAATAA). Fur является репрессором гена *zip*, кодирующего мембранный белок - транспортер ионов металлов.
5. Ген, кодирующий транскрипционный фактор WhiA, консервативен среди грамположительных бактерий. WhiA связывается с последовательностью GATACACCN₇GTTGTC, расположенной в промоторной области генов рибосомных белков, подавляя их экспрессию.

6. Разработан вектор на основе транспозона Tn4001 для оценки влияния генетических элементов на экспрессию репортерного гена. С помощью данной системы найден набор генов *M. gallisepticum*, экспрессия которых зависит от влияния регуляторов. К таким генам относятся - *ivrB*, *parA*, *rplJ*. Был идентифицирован новый белок – ParX, способный связываться с промоторной областью гена *parA* и репрессировать его экспрессию.
7. При действии теплового стресса рибосомы проявляют избирательность в отношении к мРНК. Основываясь на абсолютной представленности транскрипта и изменении частоты связывания рибосомы с транскриптом при стрессе, ответ на стресс делится на две части. Первая часть – это шум. Вторая – адаптивный ответ. Рибосома избирательно транслирует мРНК, кодирующие шапероны, иммуноглобулин связывающие белки, белки, участвующие в делении клетки и несколько белков с неизвестной функцией.

Личный вклад автора. Автор принимал активное участие в постановке научных задач, проведении экспериментов по генной-инженерии *E. coli* и *M. gallisepticum*, оценке уровня экспрессии генов, биоинформатическому анализу данных, что вносило решающий вклад в исследование. Основные результаты, представленные в работе, получены лично автором. Текст диссертации написан самостоятельно. Порядок авторов, указанных в научных трудах, соответствует их вкладу. Вклад автора в научных трудах, где автор указан первым составляет 80%; вторым - 40%; третьим и последующим – до 20%. Планирование экспериментов было выполнено совместно с д.б.н. Говоруном В.М. и к.б.н. Фисуновым Г.Ю.. Выделение чистых препаратов белков и эксклюзионная хроматография выполнены совместно с к.б.н. Мануверой В.А. Микроскопия проводилась при участии Летарова А.В.. Подготовка библиотек кДНК для высокопроизводительного секвенирования проводилась совместно с к.х.н. Семашко Т.А. и к.б.н. Никитиной А.С.. Биоинформатический анализ выполнен совместно с Гараниной И.А.. Подготовка к публикации полученных результатов проводилась при участии всех соавторов.

Степень достоверности. Результаты были получены с применением классических методов молекулярной биологии, с использованием качественных реактивов. Работа выполнялась на современном оборудовании, изготовленном ведущими мировыми производителями. Все эксперименты были повторены несколько раз и хорошо воспроизводимы

Апробация результатов. По материалам диссертации опубликовано 8 статей в международных рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в

диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.3 (03.01.03) – Молекулярная биология. Также результаты были представлены на всероссийских и международных конференциях: XXVIII Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 2016 г.); Научная конференция молодых ученых по медицинской биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России (Москва, 2016 г.); The 7th EMBO Meeting (Мангейм, 2016 г.); V Съезд Биохимиков России (Сочи, 2016 г.); Systems Biology and Bioinformatics, The Ninth International Young Scientists School SBB-2017 (Ялта, 2017 г.); Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Ю. А. Овчинникова», VIII российский симпозиум «белки и пептиды» (Москва, 2017 г.); Итоговая научно-практическая конференции ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА (Москва, 2021 г.).

Структура и объём диссертации. Материалы диссертации изложены на 145 страницах текста, включают 50 рисунков и 6 таблиц. Диссертация состоит из разделов: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждения, заключение, выводы, список литературы и приложение.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Работа состоит из трех частей. В первой части мы охарактеризовали транскрипционные факторы, которые могут быть найдены с помощью сравнительно-геномного анализа последовательностей. Во второй части мы решали задачу поиска генов, экспрессия которых зависит от влияния регулятора, но регулятор неизвестен. В третьей части работы мы стремились выяснить правила, по которым рибосома проявляет избирательность по отношению к мРНК при тепловом стрессе.

1. Поиск и исследование потенциальных факторов регуляции транскрипции у *Mycoplasma gallisepticum* на основании сходства первичной структуры

На первом этапе был произведен биоинформатический поиск предполагаемых факторов регуляции транскрипции у *M. gallisepticum* S6. Согласно найденным доменам и аннотации 91 белок способен связываться с ДНК, отфильтровав белки с известной функцией, мы получили 10 потенциальных ТФ. Для найденных белков мы провели поиск ортологов у 50 видов бактерий класса Mollicutes. Представители класса отличаются по занимаемой экологической нише – часть Молликут патогены животных и растений, часть – сапрофиты. Среди предсказанных транскрипционных факторов только четыре белка – HrcA, MraZ, WhiA и YebC были представлены у более 70% видов. HrcA - единственный фактор регуляции транскрипции *M. gallisepticum* с известным механизмом действия. Этот регулятор связывается с CIRCE участком генов шаперонов, выступая в качестве репрессора. Сайты связывания MraZ, WhiA и YebC у Молликут оставались неизвестны. Для дальнейшей экспериментальной работы по поиску мишеней ТФ-ов мы выбрали консервативные белки MraZ и WhiA, а также специфические факторы регуляции транскрипции – Xre и Fur.

1.1 Белок MraZ – активатор генов кластера деления DCW

Ген *mraZ* консервативен у бактерий и, как правило, является первым геном в кластере деления DCW (Division and Cell Wall). Используя ранее полученные данные о сайте начала транскрипции, мы определили промоторную область генов DCW кластера *M. gallisepticum*, обнаружили три прямых повтора - AAAGTG[T/G], разделенных спейсером в три нуклеотида. С помощью метода торможения ДНК в полиакриламидном геле, мы показали, что белок MraZ связывается с дцДНК из промоторной области DCW кластера. Также, мы выявили, что длина спейсера между повторами в 2 и 4 п.н. (N2 и N4, соответственно) не влияет на эффективность связывания белка с ДНК, а наибольший вклад в специфичность взаимодействия вносит вторая тройка нуклеотидов повтора сайта связывания (рис. 1).

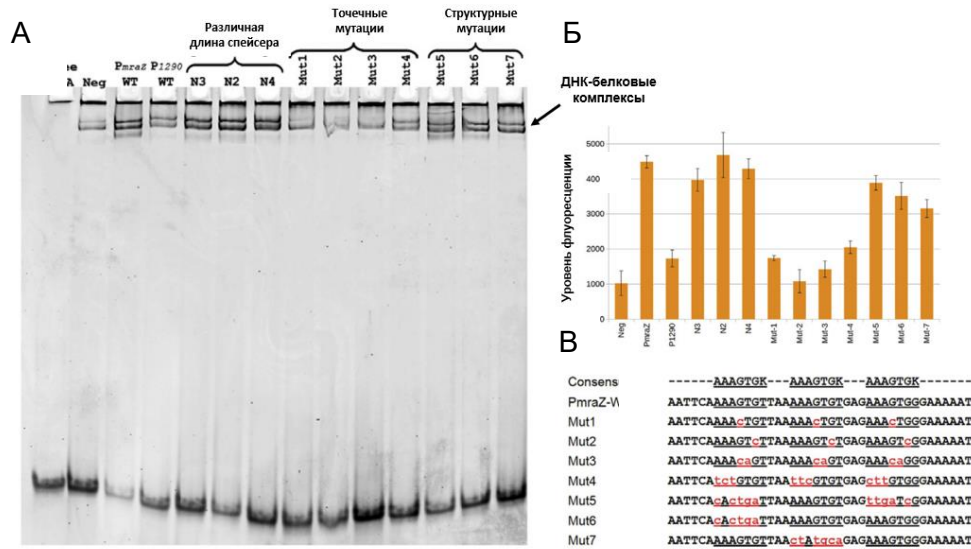


Рисунок 1. ДНК-связывающие свойства белка MraZ. А – Анализ эффективности связывания 500 нМ различных фрагментов дцДНК с 20 нМ белка MraZ методом торможения ДНК в 8% ПААГ в нативных условиях; P_{mraZ}_WT, P₀₁₂₉₀WT – фрагменты промоторных областей генов *mraZ* и *GCW_01290*, соответственно; Б – Нормализованные интенсивности флуоресценции ДНК и ДНК-белковых комплексов; В – Последовательности ДНК, использованные в эксперименте; нуклеотиды сайта связывания MraZ, подвергшиеся замене – выделены красным цветом.

Мы также показали, что повторы очень консервативны, они были обнаружены у всех представителей Mollicutes. Количество повторов, с которыми может связаться белок, расположение повторов относительно сайта начала транскрипции отличаются (рис. 2).

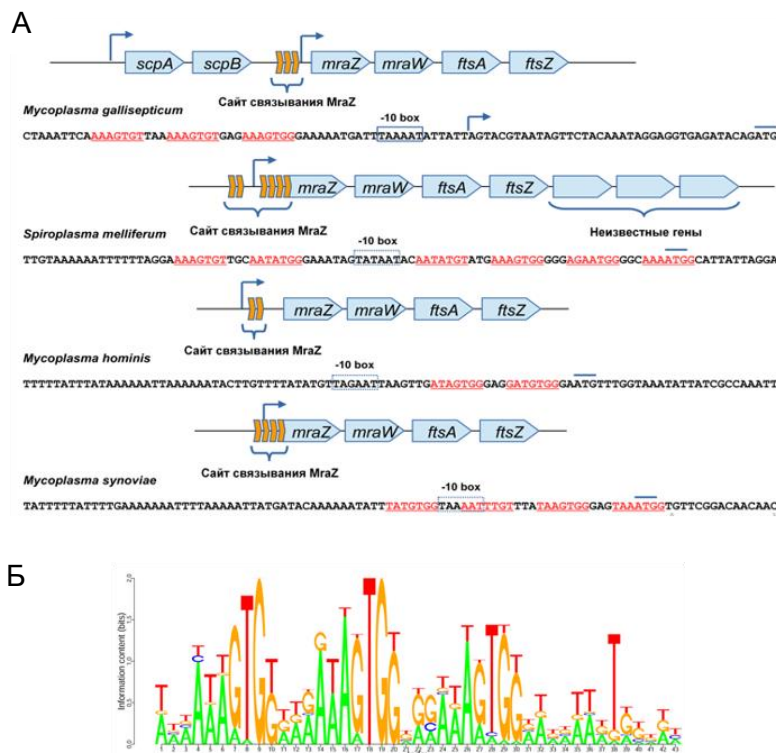


Рисунок 2. Структура и консервативность сайтов связывания MraZ. А – Структура DCW кластера у разных представителей класса молликут. Сайт связывания MraZ выделен красным цветом. Сплошной линией указан старт-кодон; Б – Лигатура (LOGO) для набора последовательностей промотора гена *mraZ* 30 видов молликут.

Совместно с Мануера В.А. (лаб. генной инженерии ФНКЦ ФХМ при ФМБА России) была определена стехиометрия ДНК-белкового комплекса с использованием

эксклюзионной хроматографии. Оказалось, что с участком в 40 п.н., связывается 24 мономера белка MraZ. Используя полученную в 2004 году структуру MraZ *Mycoplasma pneumoniae*, мы представили гипотетическую схему взаимодействия белка MraZ с дцДНК (рис. 3). Мономеры ТФ образуют кольцо из восьми субъединиц на каждом повторе сайта связывания, диаметр полости в кольце - 3,4 нм, сопоставим с диаметром дцДНК – 2 нм.

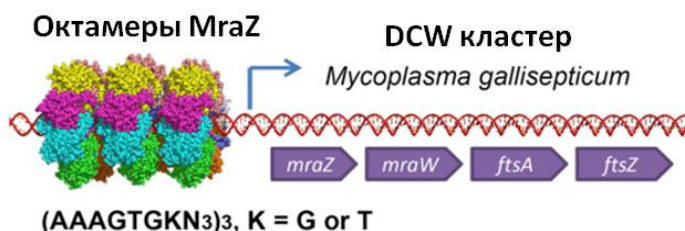


Рисунок 3. Предполагаемая схема взаимодействия MraZ с дцДНК. Расположение комплекса MraZ-дцДНК; вид вдоль цепи ДНК. Отмечена консенсусная последовательность сайта связывания и состав оперона DCW кластера. Синяя стрелка указывает направление синтеза мРНК.

Для подтверждения влияния белка MraZ на экспрессию генов DCW кластера и выявления фенотипических эффектов, были получены трансформанты *M. gallisepticum* со сверхэкспрессией гена *mraZ*. Уровень экспрессии оценивали методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. В трансформантах со сверхэкспрессией гена *mraZ*, уровень мРНК *mraZ* был в 40 раз выше, чем у клеток дикого типа. У трансформантов уровень экспрессии остальных генов DCW кластера увеличился в 4 раза, а представленность транскриптов генов «домашнего хозяйства» во всех типах клеток была одинакова (рис. 4А). Фенотипически, супер-продукция белка MraZ микоплазмы ведет к удлинению клеток (рис. 4Б, В). Микроскопия выполнена совместно с Летаровым А.В. (ФИЦ Биотехнологии РАН).

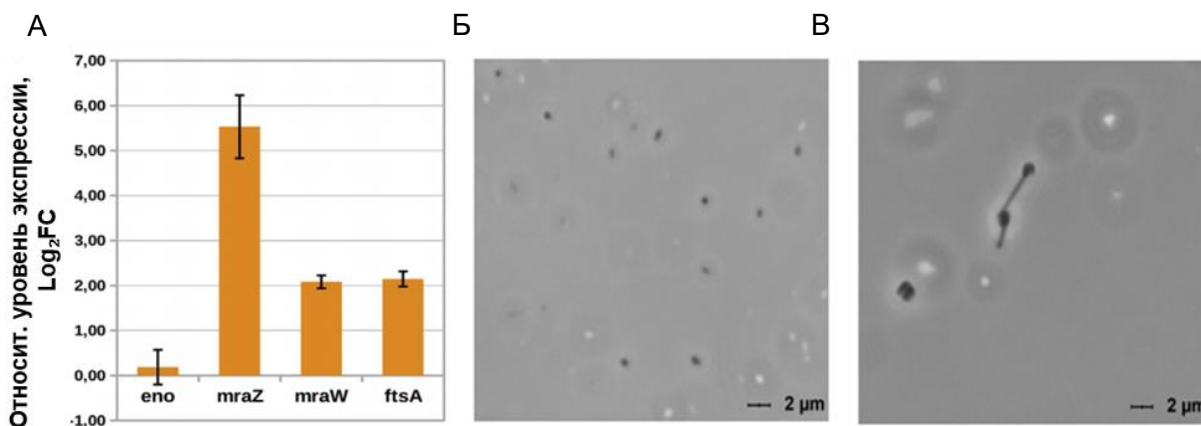


Рисунок 4. Эффект сверхэкспрессии *mraZ* в клетках *M. gallisepticum*. А – Влияние сверхпродукции MraZ на транскрипцию генов DCW кластера, измеренное с помощью ПЦР в реальном времени. Ген енолазы (*eno*) приведен в качестве контроля; Б, В - Фазово-контрастные микрофотографии клеток *M. gallisepticum* дикого типа и со сверхэкспрессией *mraZ*, соответственно.

1.2 HsdC – репрессор оперона генов системы рестрикции-модификации

Вторым транскрипционным фактором, который мы охарактеризовали стал - Xre (GCW_02350/ HsdC). Ген *xre* входит в оперон *hsd*, содержащий гены системы рестрикции-

модификации (P-M). У некоторых бактерий системы P-M имеют специальный фактор регуляции транскрипции - С-белок, мы предположили, что HsdC – С-белок. Среди Молликут гомологи белка HsdC встречается у разных семейств, однако сходство последовательностей не высоко – от 40 до 60%. Все идентифицированные гены С-белков Молликут ассоциированы с P-M системами первого, либо второго типов. Гены регуляторов либо входят с генами P-M систем в один оперон, либо стоят отдельно, либо слиты с другими генами системы P-M (рис. 5).

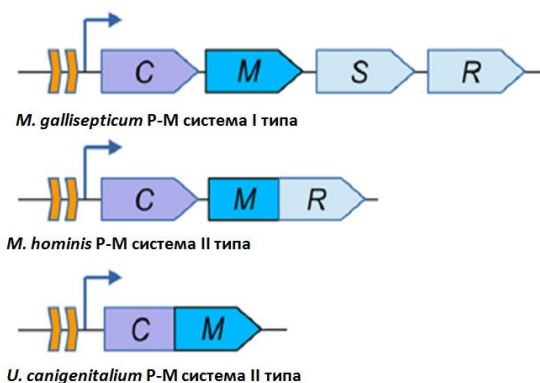


Рисунок 5. Варианты расположения гена С-белка (*xre*) у некоторых представителей молликут. М – ген, кодирующий сайт-специфическую ДНК-метилтрансферазу; R – ген, кодирующий сайт-специфическую эндонуклеазу; S – сайт-специфический ДНК – связывающий белок. Оранжевые сегменты – консервативные повторы, возможный сайт связывания белка С.

В промоторных областях генов С-белков, мы обнаружили консервативные области – возможные сайты связывания. Мотивы этих сайтов отличаются, и могут быть представлены как прямыми, так и инвертированными повторами. Экспериментально мы продемонстрировали способность HsdC/Xre связывать предсказанный нами сайт (рис. 6). Сайт связывания белка Xre *M. gallisepticum* S6 - (GTGTTAN₅)₂, схож с сайтом связывания белка MraZ - (AAAGTG[T/G]N₃)₃, где наибольший вклад в ДНК-белковое взаимодействие вносила последовательность GTG[T/G]. Поэтому мы также проверили, способен ли С-белок связываться с промоторной областью генов DCW кластера. Оказалось, С-белок связывается с промотором гена *xre* (*hsdC*), но не связывает P_{mraZ}_WT. В то время как белок MraZ связывал оба типа промотора, но P_{hsdC}_WT менее эффективно (рис. 6). Эти данные указывают, что Xre (HsdC) избирателен к длине спейсера, и при уменьшении его длины даже на один нуклеотид, Xre становится неспособен связать ДНК. Внося мутации в разные позиции сайта и оценивая эффективность связывания белка Xre (HsdC) с субстратом, мы показали, что наибольший вклад во взаимодействие вносят TG нуклеотиды сайта. При введении мутаций в такие положения сайта (Mut2, Mut4), эффективность связывания падала в 15 и 4,5 раза, соответственно. В отличие от MraZ, HsdC связывает дцДНК специфично. Потеря одного из повторов сайта драматически сказывается на способности белка связывать субстрат (Mut6) (рис. 6).

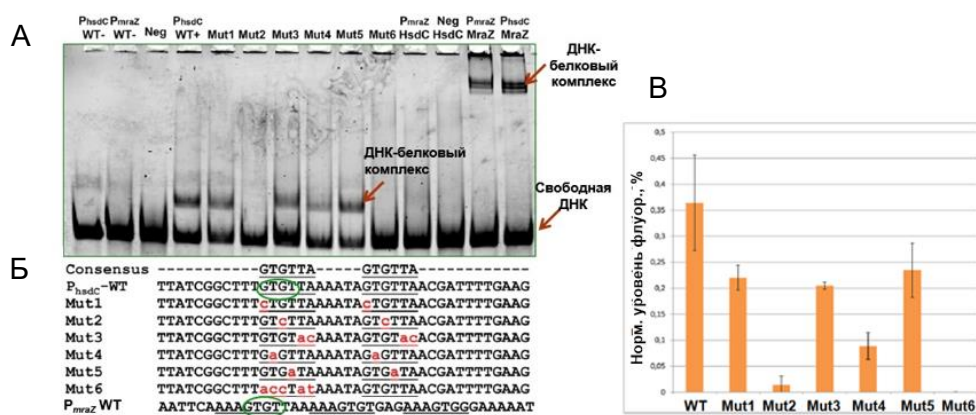


Рисунок 6. ДНК-связывающие свойства С-белка (Хге). А – Анализ эффективности связывания 500 нМ различных дцДНК фрагментов 1000 нМ белка Хге методом торможения ДНК в 8% ПААГ в нативных условиях; *PbsdC*-WT, *PmraZ*-WT – фрагменты промоторных областей генов *hsdC* и *mraZ*, соответственно; Neg – фрагмент дцДНК, не содержащий предсказанный сайт связывания; Б – Последовательности ДНК, использованные в эксперименте; сайт связывания подчеркнут; В – Нормализованные значения интенсивности флуоресценции ДНК и ДНК-белковых комплексов.

Мы провели поиск сайтов связывания белка HsdC в промоторных областях всех генов *M. gallisepticum* S6. Мы рассматривали только те промоторы, где сайт связывания находился в окрестностях -10 бокса или перекрывался с TSS (transcriptional start site). Сайты связывания HsdC были обнаружены в промоторных областях оперона, состоящего из генов тРНК (первый ген - *trnM*, *GCW_00940*) и гена шаперона *ClpB* (*GCW_02785*). В обоих случаях сайт связывания перекрывался с -10 боксом. С помощью метода торможения ДНК, мы показали, что белок HsdC связывается с найденными сайтами с такой же силой, что и с промотором оперона *hsd*. Участок связывания Хге в промоторе *clpB* перекрывается с последовательностью CIRCE – местом связывания HrcA. Такое пересечение усложняет регуляторную сеть шаперонов – единственную из описанных ранее. Промоторные области *clpB* и *trnM* у *M. gallisepticum* S6 и *M. gallisepticum* R(low) не отличаются, однако в геноме штамма S6 содержится ген *xre*, а у R(low) – нет. Это означает, что способность связывать новую мишень, не относящуюся на прямую к системе Р-М, была приобретена и закреплена у штамма S6.

1.3 Реконструкция регулона белка семейства FUR

Белки FUR (ferric uptake regulator) представляют собой распространённое семейство прокариотических регуляторов транскрипции. Это разнообразная группа регуляторов, специализирующихся на контроле метаболизма железа (Fur), цинка (Zur), марганца (Mur), никеля (Nur), меди (BosR), гема (Irr), а также реакции на окислительный стресс (PerR). Из 160 видов бактерий семейства *Mycoplasmataceae* только 17 видов имели гомологи белка семейства FUR *Mycoplasma gallisepticum*. Эти 17 видов являются представителями

кластеров *Pneumoniae* или *Mycoides*. Белки семейства FUR не обнаружены у представителей кластеров *Homnis* и *Mesoplasma*. Согласно нашим ранее полученным данным о позиции сайта начала транскрипции, у *M. gallisepticum fur* входит в состав оперона вместе с *nfo*, кодирующим АП-эндонуклеазу IV и геном *GCW_02095*, кодирующим белок с неизвестной функцией, но содержащим консервативный домен DUF3196. Анализ геномного окружения позволил выделить ортологичные группы и показал консервативность оперона внутри кластера *Pneumoniae*. Среди представителей кластера *Mycoides*, у близкородственных видов, наблюдается неоднородность FUR-кодирующего локуса, вероятно, за счет горизонтального переноса генов (рис. 7).

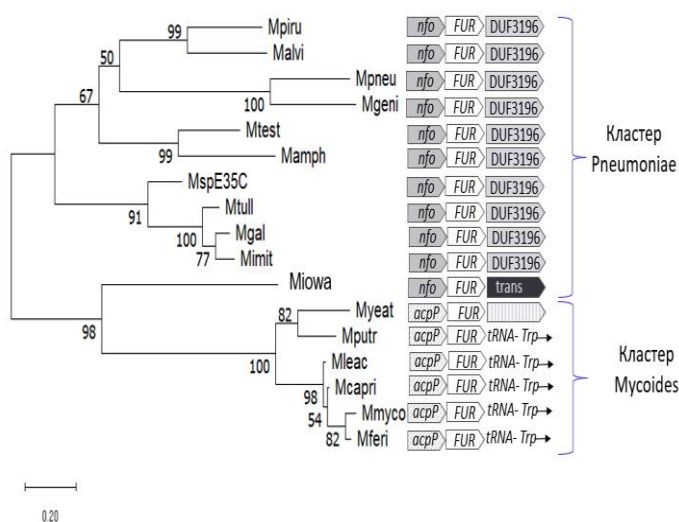


Рисунок 7. Филогенетическое дерево максимального правдоподобия для всех проанализированных гомологов белков семейства FUR Mycoplasmataceae. Уровни бутстрэп поддержки указаны числами у каждого узла. На правой панели указан геномный контекст генов, кодирующих белки семейства FUR. *nfo* – ген, кодирующий эндонуклеазу IV; DUF3196 – ген, кодирующий белок с неизвестной функцией; *trans* – ген, кодирующий транспозазу; *acpP* – ген, кодирующий ацилпереносающий белок; tRNA-Trp – ген тРНК^{Trp}.

Консервативность ортологичных групп у представителей кластера *Pneumoniae* позволила использовать методы сравнительной геномики для анализа транскрипционных регулонов белка семейства FUR *M. gallisepticum*. Ранее проведенные работы по реконструкции регуляторных сетей у *M. pneumoniae* и *M. genitalium* выявили потенциальные мишени Fur. Все четыре мишени *M. genitalium* (в том числе оперон *cbiMNQO*, кодирующий субъединицы транспортера металлов) имели ортологи среди предсказанных мишеней *M. pneumoniae*. Мы не обнаружили у *M. gallisepticum* гомологов генов двух мишеней *M. genitalium* (MG149 и *cbiQ*). То есть в группе родственных бактерий, принадлежащих одному кластеру внутри семейства *Mycoplasmataceae*, при сохранении гена-регулятора внутри оперона, не происходит сохранение всех ортологичных генов-мишеней. Общая консенсусная последовательность сайта связывания транскрипционного фактора Fur у *M. pneumoniae* и *M. genitalium* представляет собой А/Т-богатый палиндром вида ТТАТТТWКААААWТТMWАААТАА. Мы обнаружили точное вхождение сайта в промоторной области гена *zip* *M. gallisepticum*. Промоторные области генов *GCW_01010*, *GCW_02500*, *GCW_01865*, *rpsF*, *asnA*, *GCW_00535* содержали этот сайт, но с несколькими

заменами. Для того, чтобы экспериментально проверить, регулируются ли отобранные нами мишени белком Fur у *M. gallisepticum*, с помощью CRISPR интерференции были получены трансформанты микоплазмы, где экспрессия *fur* была в среднем ниже в 43 раза, по сравнению с экспрессией этого гена в штамме микоплазмы, экспрессирующем *dcas9*, но не экспрессирующем гидовую РНК, нацеленную на *fur*. Обозначим такие трансформанты *fur_sg2*. Далее мы оценили влияние нокдауна *fur* на уровень мРНК предполагаемых генов-мишеней. Экспрессию генов-мишеней внутри каждого образца нормализовали на уровень *tuf*. Изменение экспрессии генов рассчитано относительно образцов мРНК трансформантов *M. gallisepticum*, не экспрессирующих гидовую РНК (рис. 8А, Б). Обозначим такие трансформанты Mga_dcas9.

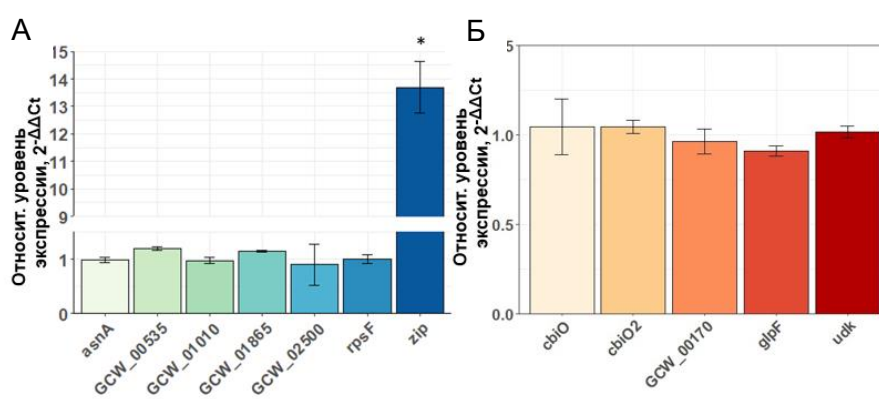


Рисунок 8. Влияние нокдауна *fur* на экспрессию предполагаемых генов-мишеней. А – Относительный уровень мРНК генов *M. gallisepticum*, в промоторной области которых обнаружен предполагаемый сайт связывания Fur; Б - Относительный уровень мРНК генов *M. gallisepticum fur_sg2*, ортологичных генам-мишеням Fur *M. pneumoniae* и *M. genitalium*. Приведено среднее не менее 3 независимых экспериментов со стандартным отклонением. * - $p < 0,05$ согласно ранговому непарному критерию Вилкоксона.

Среди проверенных предполагаемых мишеней, только уровень мРНК *zip* значительно увеличился в 13 раз при репрессии *fur* у *M. gallisepticum*. Белки семейства ZIP участвуют в транспорте катионов металлов, что функционально объединяет их с CbiMNQO - мишенями Fur *M. pneumoniae* и *M. genitalium*. Металлы являются кофакторами белков семейства FUR, которые в апо-форме или в комплексе с катионом металла ингибируют или активируют транскрипцию генов-мишеней. Мы сравнили уровни экспрессии *fur*, *zip* и *cbiO* у трансформантов микоплазмы с нокдауном по *fur*, сверхэкспрессией, а также клеток дикого типа в условиях истощения среды культивирования по Fe²⁺. Для этого к клеткам микоплазмы добавляли 3 мМ 2, 2'-дипиридила и инкубировали в течение 30 мин. Экспрессию генов внутри каждого образца нормализовали на уровень *tuf*. Изменение уровня мРНК рассчитано относительно образцов мРНК трансформантов *M. gallisepticum*, экспрессирующих *dcas9*, но не экспрессирующих гидовую РНК, нацеленную на *fur* в нормальных условиях (рис. 9).

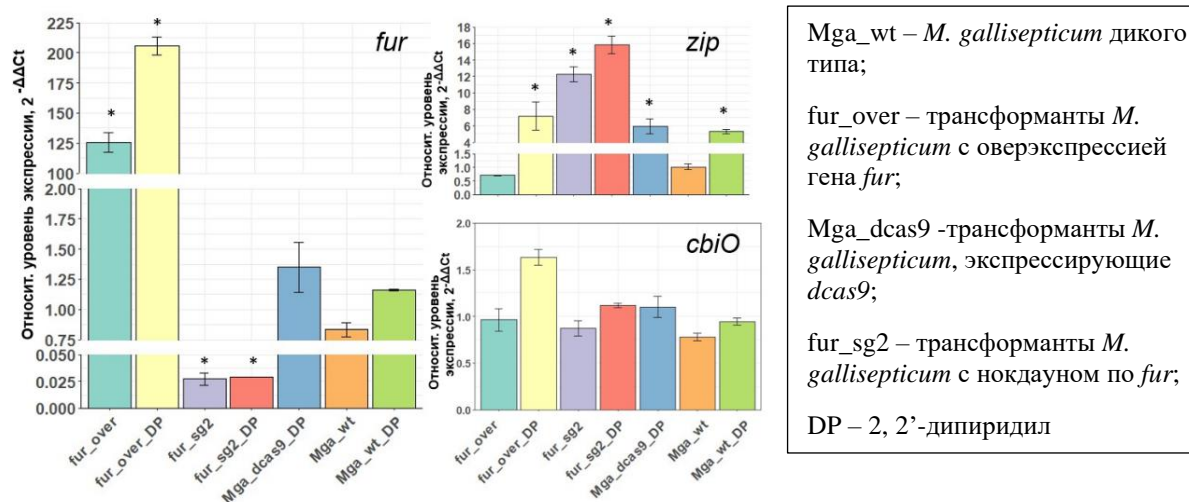


Рисунок 9. Анализ влияния дефицита железа на экспрессию *fur*, *zip*, *cbfO* *M. gallisepticum*. Относительный уровень мРНК генов *fur*, *zip* и *cbfO* у разных штаммов *M. gallisepticum* при нормальных условиях и в условиях хелатирования железа (DP) измерен методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. Приведено среднее не менее 3 независимых экспериментов со стандартным отклонением. * - $p < 0,05$ согласно ранговому непарному критерию Вилкоксона. На панели справа дана расшифровка легенды гистограммы.

Уровень экспрессии *zip* в клетках Mga_wt, Mga_dcas9 увеличился в 5-6 раз в ответ на добавление 2, 2'-дипиридила. При этом уровень *fur* не менялся. В трансформантах со сверхэкспрессией *fur* при базальном высоком уровне регулятора (в 125 раз выше, чем в трансформантах Mga_dcas9), дипиридил несущественно влиял на уровень ТФ-а, представленность мРНК *zip* возросла в 7 раз. При репрессии экспрессии *fur* хелатирование железа ведет к незначительной активации транскрипции гена транспортера. Уровень транскрипции другого предполагаемого транспортера – CbfO – не менялась как у разных трансформантов, так и при добавлении 2, 2'-дипиридила. В совокупности эти результаты подтверждают классическую модель работы белков семейства FUR. Дефицит металла – кофактора ТФ-а - ведет к диссоциации ДНК-белкового комплекса, при это активируется экспрессия гена экспортера катионов металла.

1.4 WhiA – регулятор экспрессии генов рибосомного оперона

Ген *whiA* консервативен у грамположительных бактерий. Кристаллическая структура белка WhiA *Thermatoga maritima* была расшифрована в 2009 году, было показано, что белок имеет два домена - N-концевой домен хоминг-эндонуклеазы семейства LAGLIDADG (HEN домен) и C-концевой домен спираль-поворот-спираль (НТН). Эндонуклеазный домен утратил свою активность вследствие замены аспарагиновой кислоты активного сайта на аланин, однако сохранил способность связывать ДНК. Функция WhiA у представителя класса Mollicutes - *Mycoplasma pneumoniae* - была предложена Эйлерсом в кандидатской диссертации. Он показал, что инактивация *whiA* путем

транспозонного мутагенеза приводит к повышению экспрессии одного из рибосомных оперонов (первый ген - *rpsJ*). Мы проверили предположение Эйлера. Проведя сравнительный анализ upstream областей рибосомного оперона *rpsJ* и состава самого оперона у разных представителей грамположительных бактерий, мы показали, что у большинства видов upstream область имеет консервативную последовательность с ядром (core) - GAYACRCY, где Y = C или T, R = A или G. Помимо core мотива у некоторых групп бактерий выделяется другой консервативный мотив, например, у Mollicutes – GTTGT, последовательность схожа с каноническим -35 боксом бактериальных промотора, будем называть этот мотив – дополнительным (aux). Мы подтвердили способность WhiA связываться с upstream областью оперона *rpsJ*. Для изучения специфичности связывания WhiA мы использовали набор фрагментов дцДНК длиной 40 п.н. с точечными мутациями в мотивах (рис. 10). В результате белок WhiA связывал все фрагменты дцДНК, но только с теми, где мутация не затронула core мотив, WhiA образовывал комплекс с большей электрофоретической подвижностью. Любая мутация в core мотиве мешала образованию этого ДНК-белкового комплекса. Было показано для WhiA *Streptomyces*, что с мотивом GACAC (core) связывается НТН-домен белка, в тоже время, с помощью биоинформатических методов предсказано сохранение ДНК-связывающей активности для HEN домена, однако последовательность, с которой связывается HEN домен WhiA неизвестен.

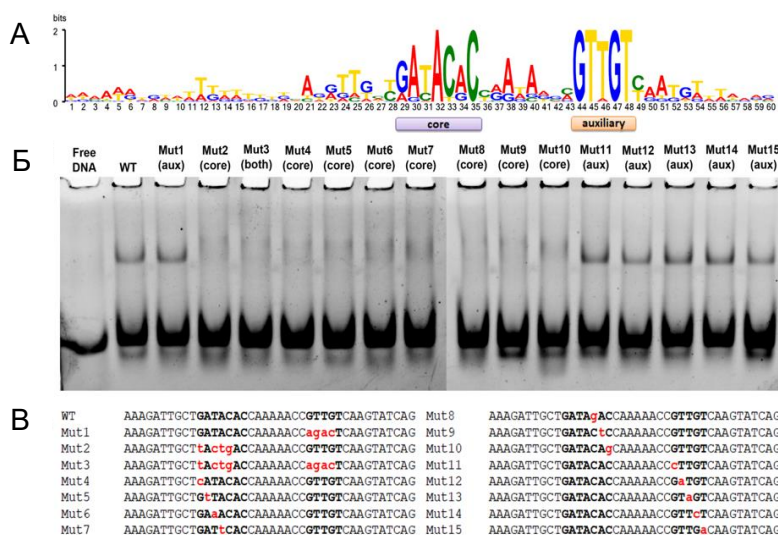


Рисунок 10. Анализ ДНК-связывающих свойств WhiA. А - лигатура (LOGO) для набора промоторных последовательностей оперона *rpsJ* Mollicutes. Б - оценка влияния мутаций в core и aux мотивах на связывание WhiA с дцДНК; WT - фрагмент промоторной области *rpsJ*; В - последовательности ДНК, использованные в эксперименте; нуклеотиды, подвергшиеся замене выделены красным

Для некоторых хоминг эндонуклеаз семейства LAGLIDAG показана их способность гидролизовать АТФ, а также показано влияние кофакторов на эту способность и на специфичность связывания и расщепления ДНК. Помимо этого, ген, кодирующий аденилаткиназу (фермент, который превращает АТФ и АМФ в АДФ и наоборот) является консервативным компонентом оперона *rpsJ*. Принимая во внимание эти два факта, мы

предположили, что HEN домен WhiA может иметь АТФ-азную, АТФ-связывающую или АДФ-связывающую функцию и может представлять собой сенсор концентрации АТФ/АДФ в клетке. Добавление АДФ не влияло на связывание WhiA с ДНК, как со специфическим (*rpsJ* WT), так и с неспецифическим ДНК-субстратом, однако при высоких концентрациях АДФ, белок агрегирует и не подвергается разделению в геле. При добавлении АТФ, напротив, происходит перестройка ДНК-белкового комплекса, если в качестве субстрата выступал фрагмент дцДНК *-rpsJ* WT. Эта перестройка проявлялась в разной подвижности молекул в геле (рис. 11).

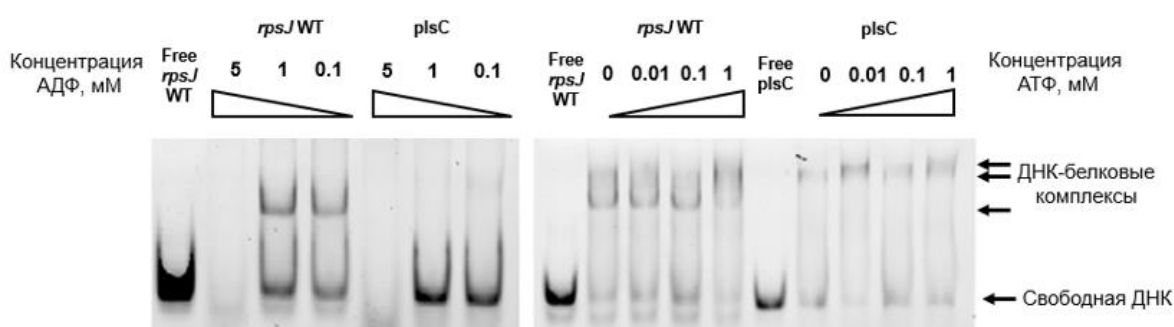


Рисунок 11. Влияние АТФ и АДФ на способность WhiA связывать ДНК. Анализ связывания 600 нМ WhiA с 250 нМ *rpsJ*_WT (ДНК-субстрат, соответствующий промоторной области *rpsJ*) и *plsC* 9ДНК-субстрат, не содержащий сайты связывания WhiA) методом торможения ДНК в 8% ПААГ в нативных условиях при добавлении возрастающей концентрации АТФ и АДФ.

Возможно, функция WhiA заключается в регуляции экспрессии генов рибосомного оперона в зависимости от концентрации АТФ, таким образом связывая процесс транскрипции и трансляции с энергетическим статусом клетки. Это предположение требует дополнительной проверки.

Таким образом, среди 10 найденных согласно функциональным доменам и аннотации потенциальных факторов регуляции транскрипции *M. gallisepticum* S6, нам удалось подробно охарактеризовать 4 из них, представив экспериментальные доказательства их мишеней. Консервативные ТФ-ы, такие как MraZ и WhiA регулируют гены, которые поддерживают основные клеточные функции – деление и синтез белка. Приобретенная штаммом S6 система рестрикции-модификации, содержащая С-белок (Xre), вероятно, усложняет регуляторную сеть этого штамма вследствие наличия в геноме микоплазмы дополнительных мишеней, которые могут распознаваться этим ТФ-ом. Белок В нормальных условиях Fur репрессирует транскрипцию *zip*. Дефицит железа – кофактора ТФ-а - ведет к диссоциации ДНК-белкового комплекса, и активации транскрипции *zip*, чей белковый продукт обеспечивает экспорт железа.

Применение системы для валидации генов – мишеней регуляторов

Несколько лет работы над изучением транскрипции у представителей класса Mollicutes в нашей лаборатории показали, что у микоплазм структура промотора упрощена, по сравнению с промоторами других представителей класса. В структуре промотора микоплазм можно выделить единственный консервативный элемент -10 бокс. Несмотря на это, согласно ранее полученным данным, при воздействии стрессов на *M. gallisepticum* изменяется экспрессия до половины генов. Мы считаем, что существуют новые неизвестные механизмы контроля экспрессии генов у микоплазм. В нашей лаборатории для *M. gallisepticum* была построена модель, которая по последовательности промотора предсказывает его «силу». Эта модель построена с помощью методов машинного обучения (алгоритм random forest), было использовано несколько характеристик промотора, оценивающих соответствие оптимальной последовательности, оптимальным расстояниям между различными детерминантами промотора и нуклеотидный состав спейсеров между детерминантами. Соответствие оптимальным последовательностям детерминант промотора выражалось через вес выравнивания последовательности с позиционной весовой матрицей оптимального мотива. Модель для каждого промотора *M. gallisepticum* сообщает предсказанную «силу». Сравнивая теоретическую (предсказанную моделью) и экспериментально измеренную «силу» промотора (данные 5'-концевого секвенирования РНК) можно определить набор промоторов (генов), которые находятся под регуляцией (т.е. активированы или репрессированы). Применяя этот подход, было предсказано, что 40% генов *M. gallisepticum* S6 находятся под регуляцией, из них экспрессия двух третей подавлена репрессорными механизмами (неопубликованные данные). Для того чтобы валидировать модель и подтвердить ее результаты, нами был создан вектор на основе транспозона Tn4001, который позволяет вносить желаемые генетические элементы (участки промотора, потенциальный сайт связывания ТФ) в промоторную область гена *egfp*, и затем с помощью ПЦР в реальном времени оценить влияние элемента на экспрессию репортерного гена. Промоторные области интересующих нас генов были разбиты на перекрывающиеся участки. Помимо экспрессии *egfp*, мы также отслеживали экспрессию генов «домашнего хозяйства» и генов-интереса. Корректная работы системы была подтверждена на известной паре регулятор-мишень – оперон *hsd*.

1.5 Влияние разных элементов промотора на экспрессию репортерного гена *egfp* у *M. gallisepticum*

Используя нашу систему, мы проверили влияние консенсусных элементов промотора (-35 бокс и extended мотив -10 бокса), которые узнаются основным сигма-

репортерным геном, мы показали, что разница в экспрессии *egfp* может достигать 95,5 раз. Такая разница была между трансформантами *rplJ_mini* и *rplJ1-2* (рис. 13).

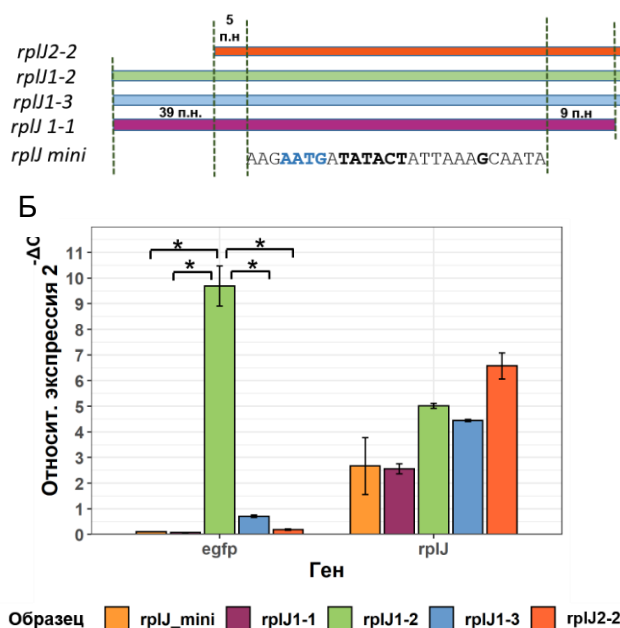


Рисунок 13 Анализ влияния последовательностей промоторной области гена *rplJ* на экспрессию репортерного гена *egfp*. **А** - Последовательности промоторной области гена *rplJ*, внесенные в конструкцию; -10 бокс промотора и инициаторный нуклеотид выделены черным цветом жирным шрифтом; последовательность EХТ выделена синим цветом жирным шрифтом; мутации, внесенные в природную последовательность выделены красным; **Б** - Уровни экспрессии генов *egfp* и *rplJ* в трансформантах *M. gallisepticum* S6.

Регуляция транскрипции *rplJ* организована сложно. При добавлении длинных последовательностей только в до или только после промотора, не ведет к значимому изменению экспрессии репортерного гена (трансформанты *rplJ1-1* и *rplJ2-2*). Однако, если расширять эти области в обе стороны, наблюдается увеличение экспрессии гена *egfp* (трансформанты *rplJ1-3* и *rplJ1-2*). Возможно, участки до и после промотора гена *rplJ* содержат сайты связывания активатора, который действует как энхансеры у эукариот.

1.7 Пример репрессии

Как пример промотора, находящегося под репрессией, мы приводим промотор оперона, содержащего ген *parA*, ген с неизвестной функцией и ген *dnaA* – инициатор репликации ДНК. Используя наш вектор, мы показали, что, находясь под регуляцией А .ко промотора гена *parA*, состоящего из консенсусной последовательности -10 бокса и extended элемента (*parA_mini*), экспрессия *egfp* в 72 раза больше, чем экспрессия природного гена *parA M. gallisepticum*. Добавляя 20 п.н.от последовательности *parA_mini* в противоположную сторону, удалось снизить экспрессию репортерного гена в 5,4 раза (рис. 14). Изучая промоторные области гена *parA* у разных микоплазм мы обнаружили консервативные мотивы с несовершенными повторами. Фисуновым Г. Ю. совместно с Побегутц О. В. был выполнен эксперимент по обогащению фракции растворимых белков *M. gallisepticum* белками, способными связываться с этой областью.

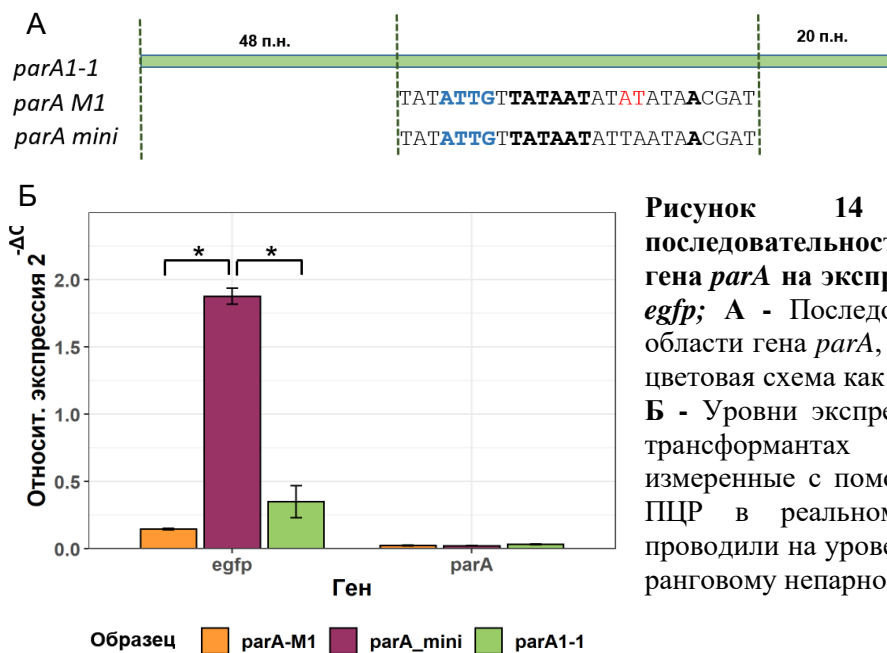


Рисунок 14 Анализ влияния последовательностей промоторной области гена *parA* на экспрессию репортерного гена *egfp*; **А** - Последовательности промоторной области гена *parA*, внесенные в конструкцию; цветовая схема как и на предыдущем рисунке; **Б** - Уровни экспрессии генов *egfp* и *parA* в трансформантах *M. gallisepticum* S6, измеренные с помощью количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. Нормировку проводили на уровень *tuf*; * - $p < 0,05$ согласно ранговому непарному критерию Вилкоксона

Среди самых обогащенных в связанной с ДНК фракцией белков, относительно белков тотального лизата, оказался белок с неизвестной функцией, чей ген располагается после гена *parA* в одном с ним опероне, что характерно для гена *parB*. Мы назвали этот ген с неизвестной функцией – *parX*. Используя метод сдвига электрофоретической подвижности, мы проверили способность ParX связываться с промоторной областью собственного оперона, а также оценили влияние мутаций в этой последовательности на аффинность белка к ДНК (рис. 15).

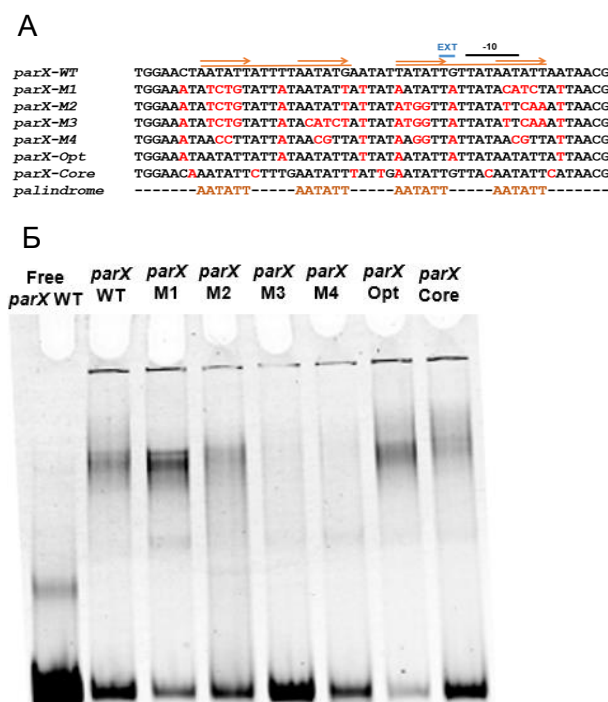


Рисунок 15 Оценка способности ParX связывать промоторную область гена *parA*. **А** - Последовательности фрагментов дцДНК, используемые в эксперименте; *parX-WT*– фрагмент промоторной области гена *parA* дикого типа; M1-M4 – варианты последовательности, содержащие нуклеотидные замены в различных позициях повторов; **Б** - Анализ связывания белка ParX с различными фрагментами дцДНК; проведен с помощью метода торможения ДНК в 6% ПААГ

С помощью нашего вектора, мы проверили влияние мутации в одном из палиндромных участков обнаруженного нами мотива на экспрессию репортерного гена *egfp* (рис. 14) – последовательность *parA_M1*. Нарушение палиндрома с сохранением содержания количества АТ оснований во вносимом в вектор участке снижало экспрессию гена *egfp* в 12,8 раз, по сравнению с экспрессией этого гена, где вносимый участок содержал «природную» последовательность - *parA_mini* (рис. 14). Вероятно, ParX является репрессором оперона *parA-parX-dnaA*, что не исключает его роли в сегрегации ДНК, аналогично белку ParB других бактерий.

2. Анализ фракции мРНК, связанной с рибосомами

В живых организмах основной функциональный ответ осуществляют белки. Многие работы, направленные на изучение взаимосвязи уровня мРНК и белка в клетках как эукариот, так и прокариот, указывают на отсутствие корреляции между этими уровнями. Ранее в нашей лаборатории было показано, что при тепловом стрессе, ответ на уровне транскрипции – колоссальный, что не отражается на представленности соответствующих белков. Используя модель теплового стресса и профилирование рибосом, мы исследуем механизмы регуляции передачи генетической информации от мРНК к белку.

Представленность всех транскриптов, выраженная в нормализованных значениях RPKM (reads per kilobase per million of mapped reads — число прочтений на тысячу нуклеотидов на миллион картированных прочтений) была получена для образцов суммарной цитоплазматической фракции мРНК и связанной с рибосомами фракции мРНК в двух состояниях *M. gallisepticum* – логарифмический рост и после теплового стресса. В экспоненциальной фазе роста содержание мРНК, связанной с рибосомами, имело высокий коэффициент корреляции по Спирмену с общим пулом РНК, и составлял 0,87. При тепловом стрессе это значение составило 0,58.

Используя метод множественной регрессии, совместно с Гараниной И. А. была построена модель, предсказывающая связывание рибосомы с РНК (представленность мРНК в рибосомльно-связанной РНК). В качестве предикторов мы использовали представленность тотальной мРНК, силу сайта связывания рибосомы (РБС), стабильность вторичной структуры 5'-области, ГЦ состав. Наша модель объясняет 72% представленности мРНК при нормальных условиях и 38% при тепловом стрессе. Лучшим предиктором для экспоненциальной фазы является количество тотальной мРНК, а для теплового стресса – сила РБС (рис. 16).

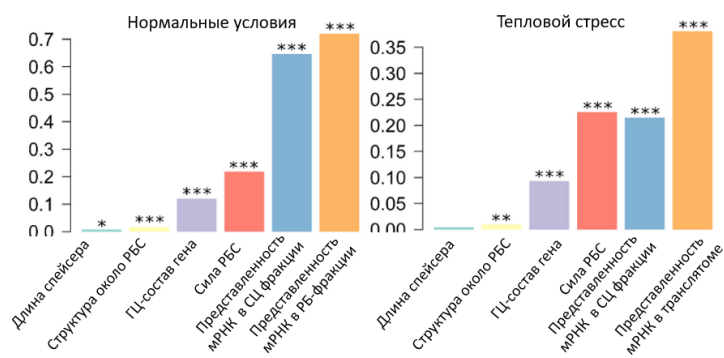


Рисунок 16. Предсказание представленности мРНК во фракции, связанной с рибосомами, с помощью множественной регрессии при нормальных условиях и при тепловом стрессе. Звездочки показывают статистическую значимость соответствующего фактора (предиктора), *** - p-value <0.01, ** - p-value <0.05

Тепловой стресс значительно влияет на представленность мРНК как в суммарной-цитоплазматической фракции (СЦ), так и во фракции мРНК, связанной с рибосомами (РБ). При проведении эксперимента, мы использовали сублетальные значения стрессового воздействия, то есть такого при котором не меняется количество жизнеспособных клеток. Для микоплазм показано, что количество копий мРНК в клетке большинства белков не превышает нескольких штук. Мы предположили, что для сохранения популяции, при изменении внешних условий все клетки должны адаптироваться, то есть белки, необходимые для адаптации должны быть экспрессированы во всех клетках во время стресса. Используя ранее полученные данные цифровой ПЦР в капле об абсолютной представленности мРНК в клетках *M. gallisepticum*, мы произвели калибровку покрытия, выраженного в RPKM в количество копий мРНК на клетку (рис. 17 Б). И далее рассматривали транслятом в контексте копий на клетку (рис. 17 В).

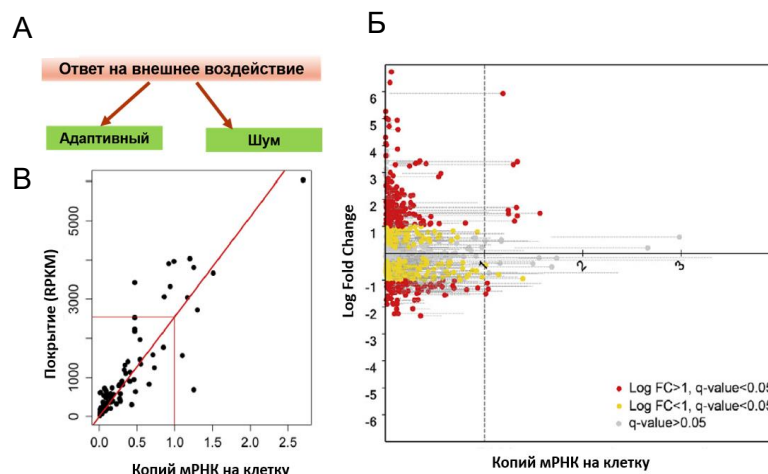


Рисунок 17 Анализ данных эксперимента по профилированию рибосом. А - предположительное деление ответа клетки на стресс; Б - связь покрытия (RPKM) с представленностью транскрипта в клетке – калибровочная кривая; В - изменение представленности пула рибосомально-связанной мРНК на клетку при тепловом стрессе; Красные круги – транскрипты, чья представленность изменилась в два и более раза, желтые круги – менее двух раз; серые – измерены не достоверно; серыми пунктирными линиями показано исходное значение представленности мРНК в экспоненциальной фазе роста

Основываясь на абсолютной представленности транскрипта и изменении частоты связывания рибосомы с транскриптом при тепловом стрессе, мы смогли разделить ответ на стресс на две части (рис. 17 А). Первая часть – это шум. Вторая – адаптивный ответ - транскрипты, чья представленность увеличивается до одной копии на клетку и более. При тепловом стрессе рибосома избирательно транслирует мРНК, кодирующие шаперон *clpB*; 3 иммуноглобулин связывающих белка; белки, участвующие в деление клетки *MraZ*, *MraW*, *FtsZ*, несколько белков с неизвестной функцией *GCW_03070*, *GCW_02935*.

ВЫВОДЫ

1. На основании аннотированных функциональных доменов белков *M. gallisepticum*, обнаружено 10 потенциальных факторов регуляции транскрипции.
2. Установлен сайт связывания белка *MraZ*, состоящий из серии прямых повторов - AAAGTG[T/G]. *MraZ* активирует транскрипцию генов кластера деления. Сверхэкспрессия *mraZ* приводит к филаментации клеток.
3. Найден и подтвержден сайт связывания белка *Xre* (*HsdC*) - повторы вида (GTGTTAN₅)₂. *Xre* выступает репрессором генов одной из систем рестрикции-модификации.
4. Найдена мишень белка *Fur* *M. gallisepticum*. На примере регулона *Fur* показано, что ортологичные регуляторы даже внутри одного семейства бактерий могут иметь разные мишени, но сохранять мотив сайта связывания. При этом функции мишеней в клетке остаются схожими.
5. Охарактеризован ассиметричный сайт связывания белка *WhiA*, состоящий из последовательности GATACACCN₇GTTGTC, расположенной в промоторной области генов рибосомных белков. В нормальных условиях *WhiA* является репрессором.
6. Экспериментально подтверждено, что экспрессия генов *uvrB*, *parA*, *rplJ* зависит от действия регуляторов. Найден новый белок *ParX*, который, регулирует экспрессию *parA*.
7. Тепловой стресс вызывает значительное увеличение транскрипционного шума в популяции *M. gallisepticum*, при этом транслируются преимущественно мРНК, кодирующие белки, обеспечивающие адаптивный ответ на стресс.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Fisunov G.Y., **Evsyutina D.V.**, Arzamasov A.A., Butenko I.O., Govorun V.M. Profiling of *Mycoplasma gallisepticum* Ribosomes // *Acta Naturae*. 2015 Oct-Dec;7(4):107-12. IF 1.360 (Web of Science 2020)
2. 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 Jun;125:59-65. Epub 2016 Mar 2. IF 3.413 (Web of Science 2020)
3. Fisunov G.Y., **Evsyutina D.V.**, Govorun V.M. Data on translome analysis of *Mycoplasma gallisepticum* // *Data in Brief*. 2016 Sep 7;9:422-424. eCollection 2016 Dec.
4. 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 Jan;132:66-74. doi: 10.1016/j.biochi.2016.10.015. Epub 2016 Oct 27. IF 3.413 (Web of Science 2020)
5. 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 Dec 6;7:1977. doi: 10.3389/fmicb.2016.01977. eCollection 2016. IF 4.235 (Web of Science 2020)
6. 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 Jan 31;17(1):26. IF 2.989 (Web of Science 2020)
7. 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 Nov 18;12:753760. IF 4.235 (Web of Science 2020)
8. **Evsyutina D.V.**, Fisunov G.Y., Pobeguts O.V., Kovalchuk S.I., Govorun V.M. Gene Silencing through CRISPR Interference in Mycoplasmas // *Microorganisms*. 2022 10(6):1159. IF 4.152 (Web of Science 2020)