

**Тест-система для исследования транскрипции с конвергентных промоторов
Романенков Дмитрий Владимирович¹, Королева Ольга Николаевна², Друца
Валерий Львович³**

¹студент, ²старший научный сотрудник, к.х.н., ³ведущий научный сотрудник, к.х.н.

^{1,2}Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского, Москва, Россия

E-mail: ²koroleva@genebee.msu.su, ³drutsa@genebee.msu.su

Регуляция экспрессии генов происходит в основном на уровне транскрипции. Один из возможных типов регуляции, обнаруженный относительно недавно, это так называемая «транскрипционная интерференция», являющаяся результатом взаимодействия двух или более молекул РНК-полимеразы, стартовавших с близко расположенных промоторов, иницирующих транскрипцию в одном и том же направлении или навстречу друг другу.

Для изучения особенностей транскрипции при конвергентном расположении промоторов в настоящей работе создан ряд высококопийных плазмидных векторов, содержащих два направленных навстречу друг другу искусственных промотора, узнаваемых РНК-полимеразой *E.coli*. Конструкции различаются структурой и силой промоторов, а также расстоянием между точками инициации транскрипции. Особенностью полученных векторов является наличие в них серий достаточно протяженных обращенных повторов, которые в суперскрученных кольцевых ДНК (плаزمиды) могут формировать структуры типа «шпилек». Известно, что при работе с такими участками ДНК могут возникать трудности, например, при их копировании ДНК-полимеразами. В связи с этим была использована стратегия субклонирования отдельных участков конечных плазмид в небольшой вспомогательной плазмиде: все необходимые перестройки этих участков оказалось возможным и удобным делать методом ПЦР-копирования полноразмерной вспомогательной плазмиды. Конечную целевую конструкцию в каждом случае собирали из отдельных подготовленных во вспомогательном векторе блоков стандартными генно-инженерными приемами: расщепление вспомогательных плазмид рестриктазами, выделение фрагментов, последовательное встраивание их в целевой вектор с помощью ДНК-лигазы.

Взаимодействие РНК-полимеразы *E.coli* с полученными ДНК исследовали методами футпринтинга, торможения в геле и транскрипции *in vitro*. Показано, что мутация, лишь незначительно снижающая силу одного из промоторов, может приводить к его полной инактивации в составе конвергентной конструкции. Подобный эффект возможно указывает на прямое вытеснение молекул РНК-полимеразы из комплекса со слабым промотором другими такими же молекулами, ранее стартовавшими с более сильного промотора.