

ГЕНОМНЫЙ КАСКАД ПРОМОТОРОВ БАКТЕРИОФАГА T7: УЧАСТИЕ ВЫЗВАННОЙ СУПЕРСПИРАЛЬНОСТЬЮ ДЕСТАБИЛИЗАЦИИ ДУПЛЕКСА ДНК (SIDD)

Орлов М.А., Дজেядин Т.Р., Сорокин А.А.

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФГУБН «ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»

ул. Институтская, 3, г. Пушино, 142290, РФ; e-mail: orlovmikhailanat@gmail.com

Поступила в редакцию: 11.07.2020

Аннотация. В данной работе рассмотрено значение вызванной суперспиральностью дестабилизации дуплекса ДНК (Stress-induced Duplex Destabilization, SIDD) промоторов бактериофага T7 в регуляции экспрессии его геномного каскада. Ранее для этого физического параметра ДНК показано участие в функционировании ряда областей геномной регуляции, включая промоторы T7. Действительно, исключительно короткие (~20 нуклеотидов) последовательности нативных промоторов T7 не могут объяснить высокоспецифичное настраиваемое (изменяется со сменой фаз жизненного цикла) связывание этих промоторов T7-РНК-полимеразой. Они слишком близки по последовательности - в ряде случаев и вовсе совпадающей. Естественно предполагать дополнительное участие другого типа кодирования такого молекулярного узнавания - физическими свойствами ДНК. Такие свойства напрямую определяют взаимодействия биомолекул и косвенно кодируются первичной структурой ДНК (что затрудняет их однозначное отнесение к фенотипу либо генотипу). Здесь мы применили расчет с последовательным изменением параметров (температура, ионная сила и суперспиральной плотности) профиля SIDD для всего генома бактериофага T7. Показано, что промоторные области более ранних областей геномного каскада более легкоплавки, что может служить для регуляции экспрессии генов и дифференциального узнавания разных промоторов.

Ключевые слова: геномика, физика ДНК, SIDD, промотор, бактериофаг T7.

Транскрипция прокариотических геномов (включая бактериофаги) сравнительно проста и служит хорошей моделью для изучения общих закономерностей. Как транскрипция, так и инициация - ее первая стадия - включают несколько этапов (посадка РНК-полимеразы на область промотора, формирование закрытого комплекса, его перевод в открытый и т.д.) Такие разнородные взаимодействия биологических макромолекул (включая молекулярное узнавание) не могут определяться только их пространственной структурой или аминокислотными/нуклеотидными последовательностями: существенна роль так называемого непрямого кодирования (“indirect readout”) за счет физических свойств участвующих молекул. Это определяет необходимость учета различных физических параметров дуплекса ДНК, которые могут иметь электростатическую, пространственную, термодинамическую и т.д. природу. Так, на этапе молекулярного узнавания до сближения РНК-полимеразы с ДНК их взаимодействия может определять только электростатический потенциал. Далее существенна их пространственная структура и способность к деформациям. На более поздних стадиях, при плавлении промоторной ДНК и переходом к открытому комплексу на первый план выходят термодинамические свойства дуплекса, в частности уровень суперспиральной дестабилизации при наложении суперспиральности (Stress-Induced Duplex Destabilization, SIDD). Неравнозначность отдельных параметров дуплекса характеризует и различные в функциональном отношении группы промоторов. Следует отдельно отметить теоретическое затруднение при отнесении физики дуплекса как признака генома к генотипу либо фенотипу. Подобные трудности связаны с тем, что с одной стороны, такие свойства ДНК обладают эволюционной и адаптивной значимостью. Как следствие, они могут быть отнесены к отбираемым в ходе эволюции признакам, т.е. фенотипу. С другой стороны, они определяются исключительно нуклеотидной последовательностью ДНК, подобно тому как это имеет место в случае кодирующих областей генов, т.е. генотипа [1].

Пара T7-РНК-полимераза/нативный промотор (узнаваемый ей, а не клеточной полимеразой сигма-70) представляет исключительно ценный объект исследования промоторно-полимеразного (и в целом молекулярного) узнавания в силу их малости, односубъединичности полимеразы, а также высокой специфичности и процессивности. В связи с данными качествами эта система нашла очень широкое применение в биотехнологии и геномной инженерии. Ранее нами показана значимость паттернов электростатических профилей (как первой дальнедействующей силы, определяющей взаимодействия РНК-полимеразы с ДНК) для дифференциального узнавания промоторов разных временных классов [2]. Такие паттерны характеризуют промоторы класса II и класса III, соответственно - общие для этих групп и сильно различаются у промоторов из разных групп. Такие профили соответствуют протяженности противоположно (положительно) заряженных участков поверхности полимеразы, что определяет их притяжение. Далее мы рассматривали SIDD, рассчитывая этот параметр по методике предложивших его авторов [3]. Для данного параметра показано участие в функционировании регуляторных областей разного типа, прежде всего - промоторов. Дестабилизация при

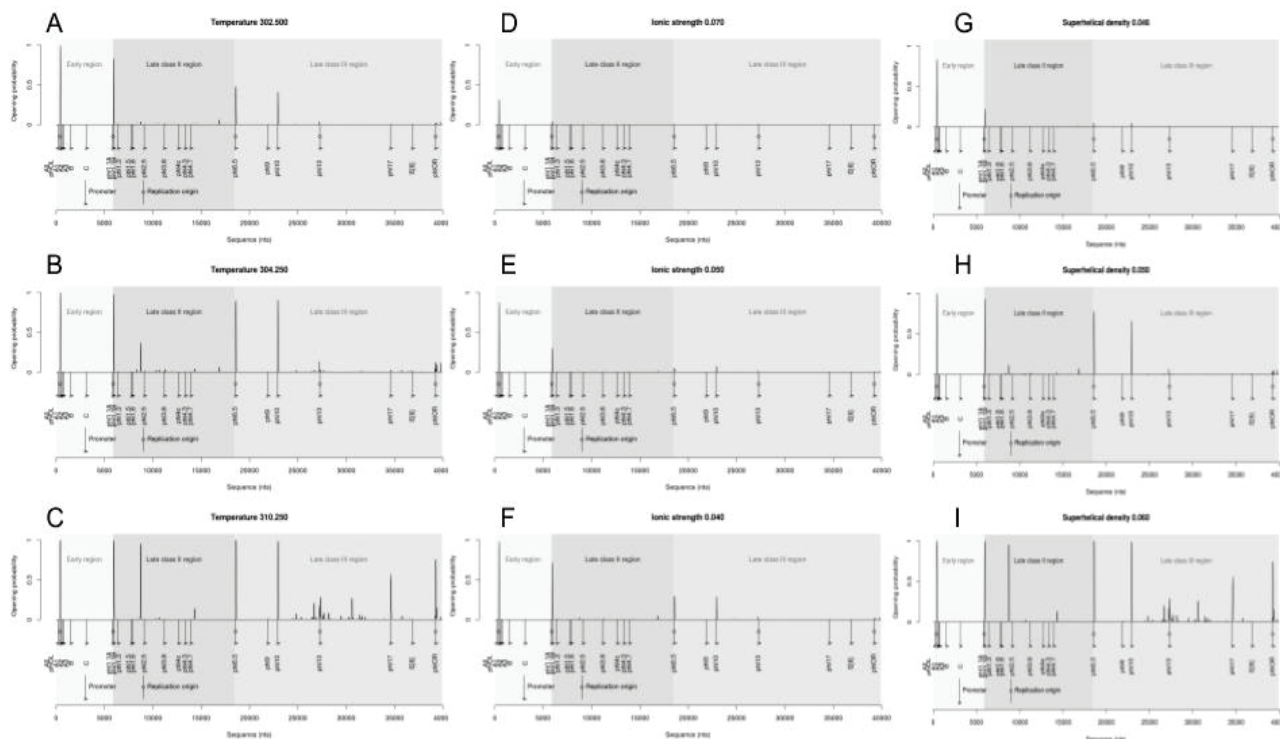


Рисунок 1. Профили SIDD для генома бактериофага T7 с обозначением положения областей геномного каскада (ранняя, генов II класса и III класса - слева направо), локализации промоторов (стрелки) и их отношения к репликации (кружок означает участие промотора в данном процессе). Приведены профили для последовательно изменяющихся значений температуры (A-C), ионной силы раствора (D-F) и суперспиральной плотности (G-I)

суперспиральном стрессе (возникающем при посадке ДНК-связывающих белков) способствует облегчению плавления (т.е. открывания дуплекса) ДНК, что важно на более поздних этапах инициации транскрипции. Образующиеся однонитевые участки и "пузыри транскрипции/репликации" позволяют белковой машинерии расположиться правильным образом, а транскрипции протекать с большей скоростью. При этом известно, что SIDD важен для активности части бактериальных промоторов и не вовлечен в работу других, т.е. служит для их функционального различия. Также этот параметр дуплекса успешно используется для автоматизированного предсказания положения промоторов [1, 3]. При этом нам удалось выявить значительное расхождение по уровню SIDD между классами II и III T7-промоторов. Класс III характеризуется гораздо большей дестабилизацией, в то время как класс II труднее плавится. Мы полагаем, что это позволяет единственной РНК-полимеразе фага различать эти промоторы; кроме того, такое различие согласуется с их разными требованиями к внутриклеточной среде, в которой они могут быть активны (такие условия меняются с течением инфекции) [4]. Подобные данные позволяют различать те промоторы, которые имеют дополнительную функцию ориджина репликации - они дестабилизированы сильнее [5].

В данной работе рассчитаны полногеномные профили SIDD (Stress-induced Duplex Destabilization) для бактериофага T7 с пошаговым изменением параметров расчета. Температура, ионная сила и суперспиральная плотность (характеризует число самопересечений спирали) последовательно увеличивались либо уменьшались таким образом, чтобы увеличить механический стресс на ДНК. В результате установлена заметная склонность более ранних областей плавиться раньше. В соответствии с нашими предыдущими работами, промоторы, выполняющие дополнительную функцию ориджина репликации характеризуются более лёгким плавлением (Рисунок 1). Последнее существенно для этого паразитического генома, требующего активной репликации с одновременным участием многих точек репликации. Таким образом, выявлена четкая связь геномных координат, как следствие, функциональной роли и времени активности в жизненном цикле для нативных промоторов T7 и склонности к дестабилизации под воздействием суперспиральности. Данное наблюдение наряду с характерными паттернами электростатического потенциала, выявленными ранее в наших работах, свидетельствуют о важности физики ДНК для дифференциального распознавания промоторов данного генома. Действительно, очень малые размеры последовательностей нативных промоторов T7 на фоне очень близкой или даже идентичной нуклеотидной последовательности предполагает, что одной первичной структуры недостаточно для высокоспецифичной и оперативно переключаемой регуляции. Данные наблюдения целесообразно учитывать при получении рекомбинантных ДНК на основе промотора T7, т.к. изменение нуклеотидной последовательности (не только самого промотора, но также очень удаленных фланкирующих областей) могут резко изменить профили SIDD и, как следствие, уровень промоторной активности.

Список литературы / References:

1. Ryasik A., Orlov M., Zyкова E., Ermak T., Sorokin A. Bacterial promoter prediction: Selection of dynamic and static physical properties of DNA for reliable sequence classification. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 2018, vol. 16(1), p. 1840003. DOI: 10.1142/s0219720018400036.
2. Сорокин А.А., Дзелядин Т.Р., Орлов М.А., Зыкова Е.А., Камзолова С.Г. Пространственная организация электростатических взаимодействий T7 РНК-полимеразы с поздними промоторами T7 ДНК. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им Ю.А. Овчинникова*, 2016, т. 12, № 4, с. 64-71. [Sorokin A.A., Dzhelyadin T.R., Orlov M.A., Zyкова E.A., Kamzolova S.G. Prostranstvennaya organizaciya elektrostatičeskikh vzaimodejstvij T7 RNK-polimerazy s pozdnimi promotorami T7 DNK. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-himicheskoj biologii im JU. A. Ovchinnikova*, 2016, vol. 12, no. 4, pp. 64-71. (In Russ.)]
3. Zhabinskaya D., Madden S., Benham C.J. SIST: stress-induced structural transitions in superhelical DNA. *Bioinformatics*, 2014, vol. 31 (3), 421-422. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu657.
4. Орлов М.А., Камзолова С.Г., Рясик А.А., Зыкова Е.А., Сорокин А.А. Профили вызванной суперспирализацией дестабилизации дуплекса ДНК (SIDD) для промоторов бактериофага T7. *Компьютерные исследования и моделирование*, 2018, т. 10, № 6, с. 867-878. [Orlov M.A., Kamzolova S.G., Ryasik A.A., Zyкова E.A., Sorokin A.A. Profili vyzvannoj superspiralizaciej destabilizacii dupleksa DNK (SIDD) dlya promotorov bakteriofaga T7. *Kompyuternye issledovaniya i modelirovanie*, 2018, vol. 10, no. 6, pp. 867-878. (In Russ.)]
5. Orlov M.A., Ryasik A.A., Sorokin A.A. Destabilization of the DNA Duplex of Actively Replicating Promoters of T7-Like Bacteriophages. *Molecular Biology*, 2018, vol. 52(5), pp. 686-692. DOI: 10.1134/s0026893318050114.
6. Orlov M.A., Sorokin A.A. DNA sequence, physics, and promoter function: Analysis of high-throughput data On T7 promoter variants activity. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 2020, vol. 18 (2), p. 2040001. DOI: 10.1142/s0219720020400016.

GENOME CASCADE OF T7 BACTERIOPHAGE: STRESS-INDUCED DUPLEX DESTABILIZATION IMPLICATION (SIDD)

Orlov M.A., Dzhelyadin T.R., Sorokin. A.A.

Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences

3 Institutskaya str, Poushchino, 142290, Russia; e-mail: orlovmikhailanat@gmail.com

Abstract. Here we address Stress-Induced DNA Duplex Destabilization (SIDD) for T7 bacteriophage promoters genome cascade regulation. Earlier the DNA parameter was shown to affect functioning several kinds of regulatory regions including T7 promoters. Indeed, this rather short (ca. 20 nucleotides) sequences of native promoters in T7 genome cannot explain how exactly they are recognised by T7-RNA-polymerase in a highly specific and adjustable manner. They are not long enough and similar in sequence - that sometimes even shared. Reasonable explanation here is that some additional kind of coding, e.g. by DNA physical properties. These govern biomolecular interaction directly while also encoded by DNA primary sequence – fact posing question whether they are phenotype or genotype. Here we calculated whole-genome profiles for T7 bacteriophage with gradually changing parameters (temperature, ionic strength, and superhelical density). As a result we see that early regions of the genome are destabilized more easily which might be involved in regulation of gene expression as well as differential recognition of promoters.

Key words: genomics, DNA physics, SIDD, promoter, bacteriophage T7.