

УДК 577.214

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ МУТАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПРОМОТОРА T7: СВЯЗЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ И ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ДНК

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

*Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение
ФИЦ «Пуцинский научный центр биологических исследований РАН, Пуцдино, Россия*

Узнавание промотора РНК-полимеразой в процессе транскрипции является фундаментальной проблемой молекулярной генетики. Несмотря на длительный интерес исследователей, эта область продолжает развиваться. С ней напрямую связана задача биоинформатики – предсказание положений промоторных областей [1]. Для исследования данных проблем используются ряд модельных систем, среди которых особую ценность имеет пара РНК-полимераза / нативный промотор бактериофага T7. Ее привлекательность заключается в сочетании простоты организации и высокой специфичности. При этом несмотря на исключительно близкую последовательность нуклеотидов нативных промоторы генома T7 распознаются избирательно с переключением транскрипции между различными классами (соответствуют этапам жизненного цикла фага). Таким образом, значительная разница между функциональными свойствами промоторов T7 не может определяться единичными или даже отсутствующими заменами консенсусной последовательности. Объяснением может служить участие определяющих ДНК-белковые взаимодействия физико-химических свойств. Ранее показано, что профили электростатического потенциала (ЭП) имеют паттерны, отличающие временные классы (II и III) промоторов T7 [2]. Аналогичные результаты получены для SIDD (stress-induced destabilization of the duplex) – уровня дестабилизации ДНК при изменении суперспирализации [3].

В настоящее время методы высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS) предоставили возможность получить исчерпывающую информацию о связи первичной структуры, физико-химических свойств и промоторной активности ДНК. С этой целью проводят исчерпывающий мутационный анализ, как, например в работе [4].

Используя доступную и быструю методику на основе NGS, авторы получили 7847 вариантов консенсусного промотора T7. Такие промоторные варианты имели от 1 до 10 замен; для них была оценена промоторная активность (как соотношение уровней транскрипта РНК и ДНК). Полученные объемные данные подтвердили многие представления о значении отдельных положений промоторной последовательности и ее областей, которые ранее были получены трудоемкими исследованиями. В данной работе мы провели дальнейший анализ данных [4], выявив согласованность в изменениях отдельных пар оснований промоторных последовательностей и функциональных областей промотора T7. В частности, выявлена высокая согласованность мутаций (их совместное присутствие в отдельном промоторном варианте) для петли специфичности (specificity loop of binding region). Область инициации транскрипции (в которой происходит открытие дуплекса) характеризуется наименьшим количеством замен, которые при этом редко сочетаются между собой. Таким образом, внесенные замены отчетливо различаются между участками промотора, выполняющими различные роли. Далее при рассмотрении как положения, так и типа замены (учитывает, какой нуклеотид является исходным и на какой нуклеотид он заменен) выявлено, что замена N (любой другой нуклеотид) на A преобладают над другими и предпочтительны на всей длине промотора. Замены N на C предпочтительны только в петле узнавания области связывания (recognition loop of binding region), но не в известных низким содержанием GC-пар других регионах.

Далее полный набор из 7847 вариантов промоторов был разделен на группы в соответствии с тем, какие функциональные области затронуты изменениями. Рассмотрены следующие три группы с мутациями 1) исключительно в области связывания, 2) исключительно в области плавления и 3) одновременно в обеих. Установлено, что группа 2 включает исключительно малое число промоторных вариантов (46 против свыше тысячи и свыше шести тысяч в других). При этом все промоторы группы 2 характеризуются значительной активностью. При рассмотрении последовательностей этой группы выявлена ее неоднородность. Подгруппа 2a включает 14 промоторов и характеризуется консервативностью в большинстве положений, но не по -2 нуклеотиду. Данное положение у группы 2a представляется допускающим любой нуклеотид в названном положении. Активность группы очень велика: все эти 14 вариантов входят в число 75 наиболее активных из всех 7847 полного набора. Группа 2b интересна тем, что при существенной активности она имеет слабую консервативность большинства положений области плавления.

Рассмотрение группы 2a вызывает интерес к промоторным вариантам, имеющим точную консенсусную последовательность и случайный нуклеотид в положении -2. Все 4 таких варианта получены в [4] и высокоактивны. При расчете для таких последовательностей профилей электростатического потенциала [2] и склонностью к изгибам [5] установлены очень существенные изменения при замене в названной позиции. В случае электростатического потенциала замены T на A достаточно, чтобы характерный для промоторов класса II паттерн профилей перешёл в таковой для класса III (описаны ранее [2]). Замена на G, приводящая к изменению локального GC-состава, при этом не изменяет исходный профиль; замена на C даёт переходный случай. Профили склонности к изгибам при замене A на T инвертируются в области, прилегающей к положению -2 и имеют переходную форму в случае C и G в этом положении. Это указывает на возможную роль точечных замен по нуклеотиду -2 в специфическом узнавании промотора T7, что может иметь множество приложений в области синтетической биологии и биоинженерии.

ЛИТЕРАТУРА

- Ryasik A., Orlov M., Zykova E., et al. Bacterial promoter prediction: Selection of dynamic and static physical properties of DNA for reliable sequence classification // *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*. 2018. № 1 (16). С. 1840003.
- Kamzolova S.G., Beskaravainy P.M., Osypov A.A., et al. Electrostatic map of T7 DNA: comparative analysis of functional and electrostatic properties of T7 RNA polymerase-specific promoters // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2013. № 8 (32). С. 1184–1192.
- Орлов М.А., Камзолова С.Г., Рясик А.А., и др. Stress-induced duplex destabilization (SIDDD) profiles for T7 bacteriophage promoters // *Computer Research and Modeling*. 2018. № 6 (10). С. 867–878.
- Komura R., Aoki W., Motone K., et al. High-throughput evaluation of T7 promoter variants using biased randomization and DNA barcoding // *PLOS ONE*. 2018. № 5 (13). С. e0196905.
- Brukner I., Sánchez R., Suck D., et al. Trinucleotide Models for DNA Bending Propensity: Comparison of Models Based on DNase I Digestion and Nucleosome Packaging Data // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 1995. № 2 (13). С. 309–317.