

Транскрипция и последовательность ДНК - факторы, влияющие на активность ДНК-гиразы**Научный руководитель – Северинов Константин Викторович*****Сутормин Дмитрий Александрович****Студент (специалист)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: sutormin94@gmail.com

Отрицательная суперспирализация молекул ДНК необходима для протекания важнейших клеточных процессов [1]. Основным ферментом бактерий, создающим отрицательные супервитки, является топоизомераза класса II ДНК-гираза [2]. В представленной работе предложен высокопроизводительный метод поиска специфичных сайтов связывания ДНК-гиразы на основе явления стабилизации ковалентных комплексов ДНК с ферментом в результате действия ряда ингибиторов (Trap-Seq). Такие комплексы могут быть выделены и ДНК, входящая в их состав, секвенирована, что формирует сигнал, маркирующий точное место связывания белка на ДНК, а также позволяющий оценить активность фермента.

Применив Trap-Seq к *E. coli* DY330 и используя в качестве ингибитора антибиотик ципрофлоксацин, мы обнаружили 2900 сайтов связывания фермента, распределенных по геному бактерии со статистически значимым градиентом с максимумом в области макродомена ориджина репликации и минимумом в макродомине терминатора. Также мы показали, что сайты ДНК-гиразы ассоциированы с длинными и высоко экспрессируемыми транскрипционными единицами (ТЕ), что особенно значимо для нижележащих областей этих ТЕ. Для бактериальной культуры, предварительно обработанной ингибитором РНК-полимеразы рифампицином, мы зарегистрировали 1953 сайта, 600 из которых были найдены нами ранее. Уровень активности гиразы в воспроизведенных сайтах мог отличаться от такового для транскрипционно-активных клеток как в большую, так и в меньшую сторону. Кроме того, указанная ассоциация с активными ТЕ была нарушена, что говорит о транскрипции, как о важном факторе, определяющем связывание и активность фермента.

Дополнительные Trap-Seq эксперименты с другими ингибиторами гиразы (оксолиновая кислота, микроцин В17), также стабилизирующими комплексы ДНК-фермент, подтвердили найденные закономерности. Анализ последовательностей в областях сайтов связывания фермента выявил симметричный протяженный (128 нт) и вырожденный мотив, имеющий периодические регионы, напоминающие паттерн связывания нуклеосом. Сравнив мотивы связывания ДНК-гиразы, полученные для разных ингибиторов, мы выявили детерминанты, характерные для этих соединений, и сконструировали нативный мотив. Сканировав геном бактерии, геном бактериофага μ и несколько плазмид (pSC101, pBR322) соответственной позиционно-весовой матрицей (ПВМ), мы обнаружили, что известные из литературы сильные сайты связывания ДНК-гиразы [3][4][5] имеют наибольший вес. Ряд *in vitro* экспериментов с различными последовательностями ДНК выявил, что вес последовательности пропорционален сродству фрагмента ДНК к ДНК-гирaze. Все это позволяет говорить о последовательности ДНК, как о втором факторе, определяющем поведение фермента.

В дальнейшем мы планируем дополнить данные о распределении ДНК-гиразы данными Hi-C, что позволит уточнить роль топологии генома в определении поведения фермента. Разработанный нами метод может быть использован для картирования сайтов связывания других прокариотических и эукариотических топоизомераз. Кроме того, сравнение

мотивов, полученных с различными ингибиторами, может позволить обнаружить детерминанты последних и получить информацию о механизме их действия.

Источники и литература

- 1) Vos , Tretter , Schmidt & Berger (2015). All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2, 827–841.
- 2) Cozzarelli (1980). DNA gyrase and the supercoiling of DNA. Science 207, 953–960.
- 3) Pato, Howe & Higgins (1990). A DNA gyrase-binding site at the center of the bacteriophage Mu genome is required for efficient replicative transposition. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87, 8716–8720.
- 4) Wahle & Kornberg (1988). The partition locus of plasmid pSC101 is a specific binding site for DNA gyrase. EMBO J. 7, 1889–1895.
- 5) Lockshon & Morris (1985). Sites of reaction of Escherichia coli DNA gyrase on pBR322 in vivo as revealed by oxolinic acid-induced plasmid linearization. J. Mol. Biol. 181, 63–74.