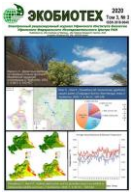
ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru



IN SILICO АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ МОДИФИКАЦИЙ В КОНСЕРВАТИВНЫХ САЙТАХ MRS У РОДСТВЕННЫХ ПЛАЗМИД

Ясаков Т.Р.*, Жарикова Н.В., Коробов В.В., Журенко Е.Ю.

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа
*E-mail: iasakovtimur@gmail.com

В данной работе проведен сравнительно-структурный *in silico* анализ двух родственных плазмид ColE1-типа - pCS36-4CPA и pRHBSTW-00138_7. На уровне нуклеотидной последовательности их идентичность составила около 82,2%. В плазмиде pRHBSTW-00138_7 были выявлены модули репликации, распространения, стабильности, а также грузовой модуль. Она была идентифицирована как представитель семейства ColE1. Модуль стабильности был представлен сайтом разрешения множественных форм плазмидной ДНК (mrs). На нуклеотидном уровне mrs обеих плазмид имели идентичность 61,3%. В структуре mrs pRHBSTW-00138_7, несмотря на высокую идентичность pCS36-4CPA, были обнаружены значительные структурные модификации. Среди них изменение вторичной структуры РНК-транскрипта Rcd. Полученные результаты указывают на то, что mrs обеих плазмид хоть и имеют принципиально сходную структуру, но, вероятно могли были получены ими независимо от разных предковых плазмид.

Ключевые слова: плазмида, модуль, структура, mrs, сайт

IN SILICO ANALYSIS OF STRUCTURAL MODIFICATIONS IN CONSERVED MRS SITES OF THE RELATED PLASMIDS

Yasakov T.R. *, Zharikova N.V., Korobov V.V., Zhurenko E.I.

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa
*E-mail: iasakovtimur@gmail.com

In this work, a comparative structural *in silico* analysis of two related ColE1-type plasmids, pCS36-4CPA and pRHBSTW-00138_7, was provided. At the nucleotide sequence level, their identity was about 82.2%. In the plasmid pRHBSTW-00138_7, modules of replication, propagation, stability, as well as a cargo module were identified. The plasmid was identified as a member of the ColE1 family. The stability module was provided by the plasmid DNA multimer resolution site (mrs). At the nucleotide level, the mrs of both plasmids had a 61.3% identity. In the structure of mrs pRHBSTW-00138_7, despite the high identity of pCS36-4CPA, significant structural modifications were found. Among them, the change in the secondary structure of the RNA transcript Rcd. The results obtained indicate that, although the mrs of both plasmids have a fundamentally the same structure, they probably could have been obtained by them independently of different ancestral plasmids.

Keywords: plasmid, module, structure, mrs, site

Поступила в редакцию: 24.09.2020

DOI: 10.31163/2618-964X-2020-3-3-346-350

ВВЕДЕНИЕ

Плазмиды как внехромосомные элементы генома бактерий имеют в своем составе системы, регулирующие их репликацию, передачу между бактериальными клетками, стабильность и другие функции. Данные системы отличаются своей консервативностью, и могут быть организованы локально в определенной части последовательности, образуя так называемые модули.

У плазмид семейства ColE1 система ответственная за стабильность представлена системой mrs (multimer resolution site) – сайтом разрешения множественных форм плазмидной ДНК. Функция этого сайта состоит в предотвращении неконтролируемой мультимеризации молекул плазмид, и предотвращению распространения бесплазмидных

клеток бактерий. Мультимеризация, в свою очередь, может приводить «димерной катастрофе» и потере плазмид клетками. В составе сайта есть несколько последовательностей связывания с белками XerC, XerD, ArgR и Fis, ответственными за процесс сайт-специфической рекомбинации для предотвращения мультимеризации, а также последовательность, кодирующая короткий РНК-транскрипт – Rcd. Некодирующий РНК-транскрипт Rcd посредством механизма стимуляции образования индола контролирует клеточное деление, тем самым подавляя деление бесплазмидных клеток (Gaimster, Summers, 2015). Данные последовательности локализованы компактно и образуют модуль стабильности плазмид семейства ColE1.

Считается, что обмен плазмидными модулями между плазмидами способствует их адаптации и эволюции. Поэтому сравнительный анализ строения модулей и их изменений вносит вклад в представление о мобильной компоненте бактериального генома.

Целью данной работы является сравнительный *in silico* анализ структурных модификаций в консервативных последовательностях сайта разрешения мультимерных форм плазмидной ДНК (mrs) двух родственных плазмид и оценка влияния изменений на их стабильность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск родственных pCS36-4CPA плазмид осуществляли в базе данных GenBank [Benson et al., 2013]. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA7 [Kumar et al., 2016] с помощью метода ClustalW. Построение вторичной структуры РНК-транскрипта Rcd было сделано с помощью web-сервера Mfold при стандартных параметрах [Zuker, 2003].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В базе данных GenBank была обнаружена последовательность плазмиды pRHBSTW-00138_7 (депонирована 24.07.20, Shaw L.P.) (табл. 1), родственная ранее секвенированной и проанализированной плазмиде pCS36-4CPA, которая была выделена из штамма-деструктора ксенобиотиков. Методами сравнительной геномики в ее составе были обнаружены модули репликации, распространения, стабильности (сайт разрешения множественных форм плазмидной ДНК – mrs) и грузовой модуль. Множественное выравнивание последовательностей ДНК обеих плазмид показало, что на уровне нуклеотидной последовательности идентичность двух плазмид составила около 82,2%. Так же было установлено, что вероятные области нахождения mrs плазмид pRHBSTW-00138_7 и pCS36-4CPA имеют идентичность около 61,3%, что гораздо ниже идентичности в целом по последовательности плазмид.

Таблица 1. Плазмиды и их характеристики

Плазмида	**Класс-я, сем-во**	**Размер, пн**	**Бактериальный хозяин**	**Идент-р GenBank**	**Ссылка**
pCS36-4CPA	ColE1	5217	*Citrobacter* sp. 36-4CPA	KM373703	Zharikova et al., 2018
pRHBSTW-00138_7	ColE1	5665	*K. quasipneumoniae* RHBSTW-00138	CP058137	не опубликовано

В составе mrs pRHBSTW-00138_7 абсолютно идентичным остался только сайт связывания белка XerD (100%). Другой консервативный сайт связывания белка XerC имел идентичность около 72,8%. ArgR связывающий сайт имел идентичность около 68,8%, а Fis II связывающий сайт около 60%. Таким образом, структура mrs претерпела значительные изменения на нуклеотидном уровне.

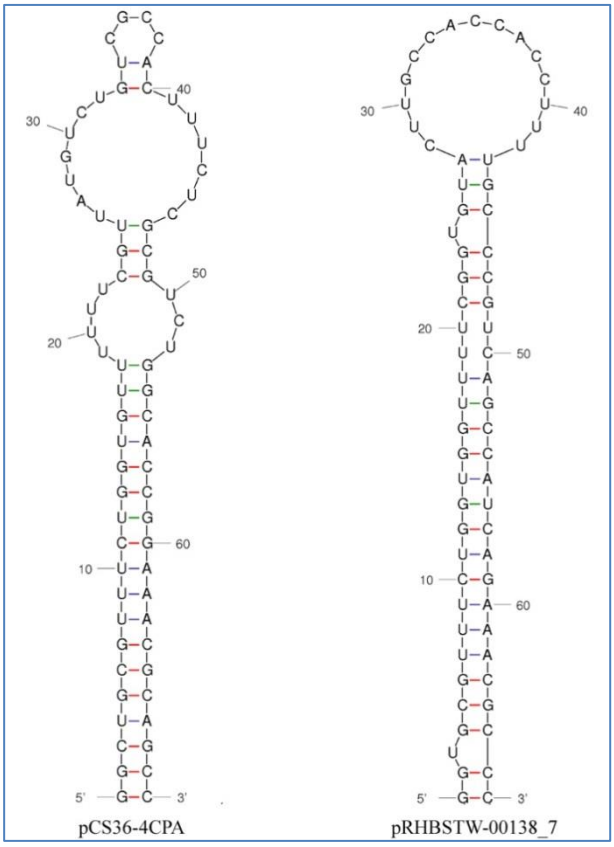


Рис. 1. Предсказанные вторичные структуры РНК-транскрипта Rcd плазмид pCS36-4CPA и pRHBSTW-00138_7.

Как было указано выше, стабильность плазмид также контролируется некодирующим РНК-транскриптом Rcd. Кодирующая его последовательность ДНК была обнаружена в составе mrs pRHBSTW-00138_7. На рис. 1 представлена вторичная структура РНК-транскрипта Rcd, которая также была изменена, однако все же формировала структуру типа "стебель-петля", хотя и отличную от таковой плазмиды pCS36-4CPA. В частности в структуре присутствовала одна петля, вместо трех. Уровень идентичности Rcd двух плазмид составил около 72%.

Таким образом, было показано, что уровни идентичности как полных последовательностей mrs обеих плазмид, так и отдельных последовательностей для ДНК-связывающих белков в их составе были у сравниваемых плазмид гораздо ниже чем в целом по их полным последовательностям плазмид. Также вторичная структура РНК-транскрипта Rcd имела значительные модификации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Обсуждая полученные результаты, следует отметить, что из ранее выделенных и охарактеризованных авторами плазмид pSM22 (Анисимова и др., 2009; Ясаков и др. 2019), pRP33-4ch, pRP36D (Жарикова и др., 2013) и pCS36-4CPA (Zharikova et al., 2018) только последняя была отнесена к семейству ColE1 для которых характерно наличие mrs.

Учитывая высокий уровень идентичности обеих плазмид на нуклеотидном уровне, авторы предположили сохранение высокой консервативности модуля стабильности у pRHBSTW-00138_7, контролирующего ключевые механизмы поддержания плазмид в клетках бактерий-хозяев. Однако, сравнительно более низкий уровень идентичности между mrs обеих плазмид по сравнению с таковым их полных последовательностей (82,2% и 61,3%, соответственно) может быть обусловлен тем, что их mrs получены от разных плазмид семейства ColE1-типа и, возможно, имеют полифилетическое происхождение. Так как общеизвестно, что плазмиды могут передавать свои модули посредством генетической рекомбинации. Для плазмиды pCS36-4CPA ранее уже было показано, что гомологичные ей mrs находятся в составе других плазмид у бактерий разных родов семейства Enterobacteriaceae, и могут иметь полифилетическое происхождение (Ясаков и др., 2018). Также полифилетическое происхождение возможно предположить у областей репликации (*ori*) плазмид семейства ColE1 исходя из представленного филогенетического анализа в работе Ясакова и др. (2013).

Авторы считают, что, несмотря на то, что структурно РНК-транскрипт Rcd у плазмиды pRHBSTW-00138_7 претерпел изменения, тем не менее, свое участие в обеспечении стабильности он принимает. Во-первых, он сохранил структуру типа "стебель-петля", необходимую для сохранения функции. А наиболее исследованные плазмиды семейства ColE1 также могут иметь разные вторичные структуры Rcd (Zharikova et al., 2018). Во-вторых, плазмида pRHBSTW-00138_7 не элиминировала вследствие "димерной катастрофы" о чем говорит сам факт того, что она была обнаружена и секвенирована.

Таким образом, в данной работе впервые было показано, что даже у родственных малых плазмид типа ColE1 с высоким уровнем идентичности, могут быть в составе консервативные модули, имеющие происхождение от разных плазмид семейства ColE1.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках Государственного задания (№ гос. регистрации АААА-А18-118022190098-9).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимова Л.Г., Ясаков Т.Р., Жарикова Н.В., Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Кураков А.В., Маркушева Т.В. Штамм бактерии Serratia marcescens с плазмидой, ответственной за деградацию хлорароматических пестицидов // Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический. 2009. Т. 114. № 3 S1-2. С. 27-31.
2. Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Ясаков Т.Р., Коробов В.В., Маркушева Т.В. Сравнительный структурно-функциональный анализ плазмид штаммов-деструкторов 2,4,5-Т рода *Raoultella* // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. 2013. № 2 (26). С. 13-15.
3. Ясаков Т.Р., Анисимова Л.Г., Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Маркушева Т.В. Эволюция и сравнительная геномика плазмиды pSM22 группы IncF/MOB_{F12} // Молекулярная биология. 2019. Т. 53(4). С. 600-612. DOI: 10.1134/S0026898419040177
4. Ясаков Т.Р., Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Маркушева Т.В. Особенности филогении последовательностей сайтов разрешения мультимерных

форм плазмидной ДНК (mrs) гомологичных mrs плазмиды pCS36-4CPA // Известия Уфимского научного центра Российской академии наук. 2018. №2, С. 14-18. DOI: 10.31040/2222-8349-2018-0-2-14-18

5. Ясаков Т.Р., Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Маркушева Т.В. Анализ областей репликации плазмид ColE1-типа у бактерий рода *Citrobacter* // Известия Уфимского научного центра РАН. 2013. № 3. С. 19-21.
6. Benson D.A., Cavanaugh M., Clark K., et al., GenBank // Nucleic acids research. 2013. V. 41 (Database issue). D36–D42. DOI: 10.1093/nar/gks1195
7. Gaimster H., Summers, D. Plasmids in the driving seat: the regulatory RNA Rcd gives plasmid ColE1 control over division and growth of its *E. coli* host // Plasmid. 2015. V. 78. P. 59–64. DOI: 10.1016/j.plasmid.2014.11.002
8. Kumar S., Stecher G., and Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // Molecular Biology and Evolution. 2016. V. 33. P. 1870-1874. DOI: 10.1093/molbev/msw054
9. Zharikova N., Iasakov T., Bumazhkin B., Patutina E., Zhurenko E., Korobov V., Sagitova A., Kuznetsov B., Markusheva T. Isolation and sequence analysis of pCS36-4CPA, a small plasmid from *Citrobacter* sp. 36-4CPA // Saudi Journal of Biological Sciences. 2018. V. 25 (4). P. 660-671. DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.02.014
10. Zuker M.. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // Nucleic Acids Research. 2003. V.31 (13). P. 3406-15. DOI: 10.1093/nar/gkg595