

Полногеномный поиск мотивов связывания и расщепления ДНК топоизомеразой I *E. coli* методами ChIP-Seq и Toro-Seq**Научный руководитель – Северинов Константин Викторович***Сутормин Д.А.¹, Галивонджян А.Х.²*

1 - Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия, *E-mail: sutormin94@gmail.com*; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия, *E-mail: a.galivondzhyan@yandex.ru*

Топоизомераза I бактерий необходима для релаксации отрицательной суперспирализации, возникающей в процессах транскрипции и репликации. В мутантных клетках *E. coli*, лишенных этого фермента, отрицательная суперскрученность ДНК аномально повышена, происходит накопление R-петель, возникает эктопическая репликация и активирован SOS-ответ [1]. Ранее с помощью ChIP-Seq экспериментов мы показали, что топоизомераза I ассоциирована с активными транскрипционными единицами. Для поиска сайтов активности данного фермента на геномной ДНК нами был разработан и проведен метод Toro-Seq.

Нами был сконструирован мутант топоизомеразы I, содержащий замены G116S и M320V. Мутант способен расщеплять ДНК и образовывать ковалентный комплекс с 5'-концом одностороннего разрыва, однако не проводит обратную реакцию лигирования разрыва. Фермент кратковременно экспрессировался с плазмиды, затем аддукты топоизомеразы с ДНК очищались аффинной хроматографией. Обогащенную ДНК секвенировали с использованием кита для цепь-специфичного секвенирования. В геноме *E. coli* мы обнаружили 262 позиции, значительно обогащенные одноцепочечными разрывами ДНК, маркирующими сайты активности топоизомеразы I с разрешением в один нуклеотид. Мы показали, что области генома, обогащенные разрывами, совпадают с пиками обогащения, обнаруженными ChIP-Seq (**Рис. 1А**). Количество сайтов расщепления повышено в вышележащих областях активных генов, что напрямую свидетельствует о вовлеченности топоизомеразы в процесс релаксации отрицательной суперспирализации, образованной РНК-полимеразой, в соответствии с двудоменной моделью (**Рис. 1В**) [2]. С помощью ChIP-Seq нами были обнаружены два несимметричных мотива связывания ДНК топоизомеразой I - мотивы 1 и 2 (**Рис. 1С**). В отличие от ChIP-Seq, Toro-Seq является цепь-специфичным методом. Мы установили, что топоизомераза распознает мотив 2 и производит расщепление цепи ДНК между нуклеотидами ТА, при этом в положении -4 относительно разрыва расположен консервативный нуклеотид С (**Рис. 1D**). Мотивы, обнаруженные с помощью ChIP-Seq и Toro-Seq, мы протестировали *in vitro* в экспериментах по расщеплению олигонуклеотидов ДНК под действием топоизомеразы I. Мы подтвердили, что только цепь мотива 2, содержащая динуклеотид ТА и С в -4 положении, эффективно расщепляется ферментом (**Рис. 1Е**). С помощью полногеномных методов картирования сайтов связывания и расщепления ДНК топоизомеразой I нами продемонстрирована вовлеченность фермента в релаксацию отрицательной суперспирализации, возникающей при транскрипции, а также обнаружен ДНК-мотив топоизомеразы.

Источники и литература

- 1) J. Brochu, E. Vlachos-Breton, S. Sutherland, M. Martel, and M. Drolet. Topoisomerases I and III inhibit R-loop formation to prevent unregulated replication in the chromosomal Ter region of *Escherichia coli* // PLoS Genet., no. September, pp. 1–25, 2018.

- 2) H. Y. Wu, S. Shyu, J. C. Wang, and L. F. Liu. Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template // *Cell*, vol. 53, no. 3, pp. 433–440, 1988.

Иллюстрации

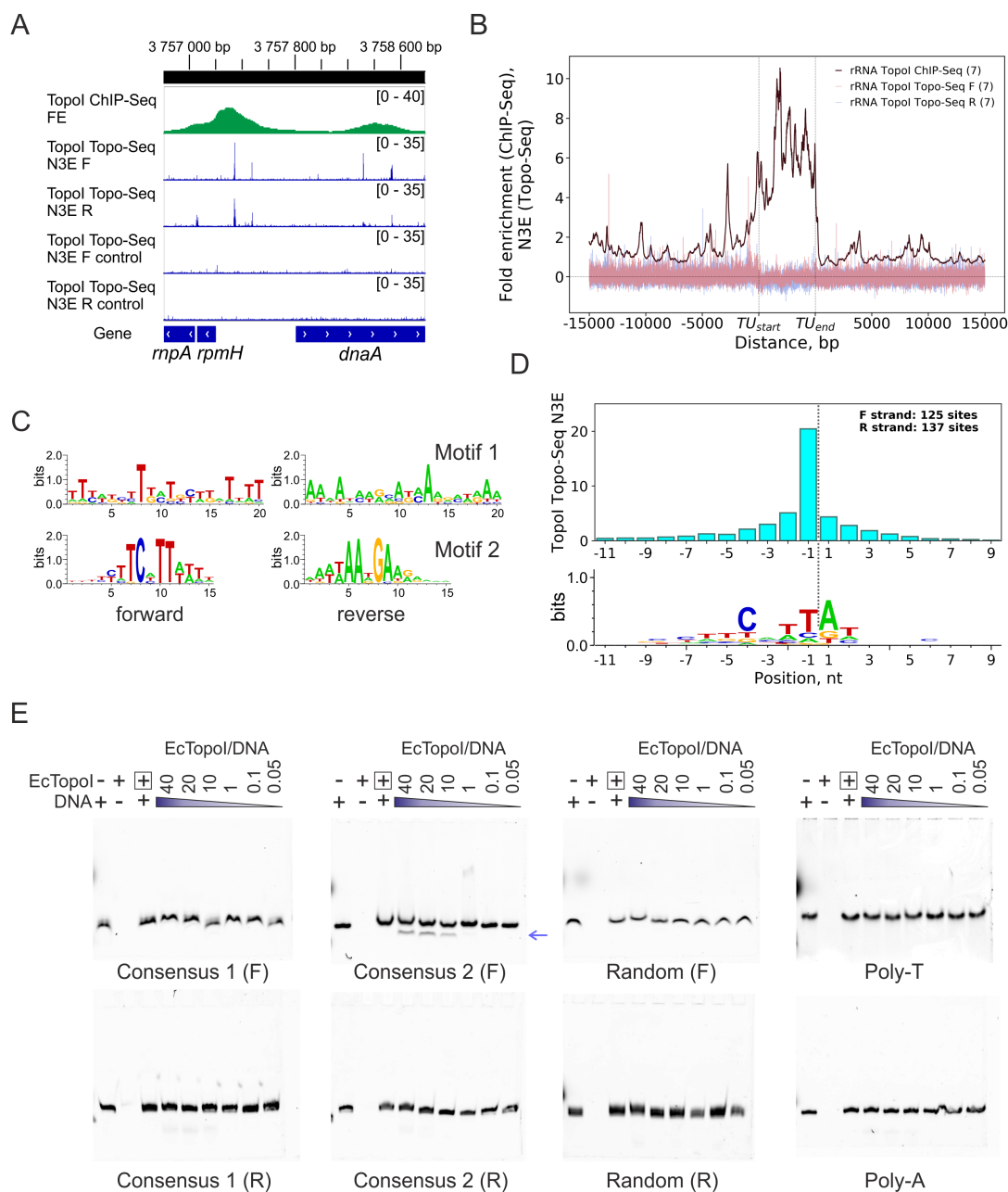


Рис. 1. (А) Репрезентативный участок генома *E. coli*, показывающий соответствие между пиками обогащения топоизомеразы I, полученными методом ChIP-Seq, и сайтами расщепления ДНК топоизомеразой I по данным Топо-Seq. Сигнал расщепления ДНК является цепь-специфичным и показан для прямой (F) и обратной цепей (R) по-отдельности. В контрольном эксперименте Топо-Seq не проводилась индукция экспрессии мутантной топоизомеразы I. (В) Усредненное обогащение топоизомеразы I вокруг семи рРНК-оперонов *E. coli* (черная кривая) и наложение треков расщепления ДНК под действием топоизомеразы I (красная кривая – для прямой цепи, синяя кривая – для обратной цепи). (С) Мотивы связывания ДНК топоизомеразой I обнаруженные ChIP-Seq. (D) Мотив расщепления ДНК под действием топоизомеразы I (внизу) и соответствующий сигнал расщепления (вверху). Сайт расщепления ДНК показан пунктирной линией. (E) Расщепление олигонуклеотидов ДНК, меченных Су5, под действием топоизомеразы I *in vitro*. Продукты расщепления показаны синей стрелкой.