

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-265

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАГОВЫХ DGR-КАССЕТ НА ПРИМЕРЕ ФАГА LMMB^{*}
ANALYSIS OF PHAGE DGR CASSETTES ON THE BASIS OF THE EXAMPLE OF PHAGE LMMB

Е. А. Панина, И. В. Бабкин, В. А. Федорец, Н. В. Тикунова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

E. A. Panina, I. V. Babkin, V. A. Fedorets, N. V. Tikunova

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ e.panina@g.nsu.ru

Аннотация

DGR-кассеты — это ретроэлементы, генерирующие разнообразие (DGR), недавно открытый класс ретроэлементов, которые используют обратную транскрипцию для создания огромного количества вариантов последовательностей в конкретных генах-мишенях. В лаборатории молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН при исследовании образца вирома человека был обнаружен новый crAss-подобный геном, содержащий генерирующий разнообразие ретроэлемент.

Abstract

DGR cassettes are Diversity Generating Retroelements (DGRs), a recently discovered class of retroelements that utilize reverse transcription to generate a huge number of sequence variants in specific target genes. In the Laboratory of Molecular Microbiology of ICBFM SB RAS, a new crAss-like genome containing a diversity-generating retroelement was discovered during the study of a sample of human virome.

Исследование DGR-кассет является актуальным и представляет интерес как практический, так и фундаментальный, так как механизмы их работы все еще остаются недостаточно изученными. Стоит отметить, что наряду с исследованием механизмов приспособления фагов, несущих в себе эту структуру, к новым хозяевам возможно создание лабораторных систем направленной и ускоренной молекулярной эволюции, подобных «дисплейным».

Функциональная архитектура исследуемого нами фага LMMB отличается от строения DGR-кассеты, первоначально описанного в литературе фага BPP-1. Мы решили проверить, насколько распространена функциональная дифференциация среди фаговых DGR-кассет в целом. Так как лаборатория молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН располагает обширной коллекцией кишечных виромов человека, полученных из фекальных образцов здоровых доноров, мы исследовали данные, полученные после секвенирования всех полногеномных образцов из этой коллекции с помощью программного обеспечения MyDGR с целью обнаружить новые фаговые геномы, несущие в себе DGR-кассеты. В результате нашего исследования были обнаружены 14 последовательностей, определенных как DGR-кассеты. Функциональная архитектура этих кассет имеет видимые различия (см. таблицу), такие как:

1) наличие гена, кодирующего белок предполагаемой детерминанты связывания, — почти в половине последовательностей этот ген либо отсутствует, либо не может быть обнаружен, как и в изучаемой DGR-кассете фага LMMB;

2) расположение гена, кодирующего предполагаемую детерминанту связывания — если данный ген присутствует в последовательности, то, в соответствии с полученными данными, располагаться он может как перед геном, кодирующим обратную транскриптазу, так и после него. В DGR-кассете фага LMMB — после;

3) количество VR-зависимых таргетных генов — некоторые последовательности несут в себе два таргетных гена. DGR-кассета фага LMMB — один;

4) наличие шпилечных структур. В DGR-кассете фага LMMB они отсутствуют, как и во многих других кассетах.

^{*} Исследование выполнено в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 122110700002-2.
© Е. А. Панина, И. В. Бабкин, В. А. Федорец, Н. В. Тикунова, 2024

Характеристика обнаруженных DGR-кассет

Фаг	avd	Шпилька	Особенности
Vir14_NODE_1	-	-	
Vir26_NODE_4	-	-	
Vir14_NODE_2	+ (после RT) (CH_1)	-	
Vir22_NODE_5	+ (после RT) (CH_1)	-	
Vir19_NODE_8	+ (после RT) (PAG_1)	-	Два таргетных гена
Donor5_NODE_3	-	-	
Vir26_NODE_9	-	-	
Vir32_NODE_2	-	-	
Vir38_NODE_2	-	-	
Vir19_NODE_3	-	-	
Vir48_NODE_3	-	-	
Vir23_NODE_13	+ (после RT) (PAG_3)	+	Два таргетных гена
Vir29_NODE_64	+ (перед RT) (PAG_2)	+	
Vir28_NODE_8	+/- (после RT)	+	Два таргетных гена

Исходя из полученных данных, можно заключить, что фаговые DGR-кассеты обладают заметным структурным разнообразием.

Чтобы проверить особенности работы DGR-кассеты фага LMMB, были получены основные элементы DGR-кассет: 1) обратная транскриптаза (RT); 2) последовательность РНК, содержащая области TR и IMH (область инициации мутагенного хоминга); 3) РНК-праймер, комплементарный области IMH; 4) Белок HP (предполагаемая детерминанта связывания). Ранее на примере фага BPP-1 было показано, что связывание РНК-TR-последовательности с ревертазой обеспечивается специальной связывающей детерминантой (avd), белком, бочкообразной структуры. Без нее мутагенный ретрохominг у фага BPP-1 невозможен. Предположение о том, что HP является детерминантой связывания, мы выдвинули на основании его конформации, которую составляют α -спирали, как и у белка avd. После получения всех необходимых элементов DGR-кассеты, мы провели эксперименты, позволяющие установить функциональные характеристики ревертазы фага LMMB. Для этого провели реакцию обратной транскрипции на четырех различных смесях. Все смеси содержали IMH РНК, РНК-праймер, dNTP и буфер. Полученные в результате ампликоны мы подвергли электрофоретическому анализу. Смеси, содержащие ревертазу, как с HP, так и без показали одинаковый выход кДНК, в то время как смеси без ревертазы показали отрицательный результат. Исходя из полученных данных, мы сделали вывод, что реакция обратной транскрипции идет независимо от наличия в смеси белка HP, что предполагает возможность фага LMMB вести «avd-независимый» ретрохominг.