

# 1 Аннотация

Бактериофаги (фаги) - это вирусы, которые избирательно поражают бактериальные клетки. Такая специфика обусловлена зависимостью фага от клеточного механизма хозяина, который нужен фагу для репликации и синтеза вирусных компонентов. Пример такой зависимости можно наблюдать у фага T4 и E.coli [1] или цианобактерии с её фагом [2].

В этой работе мы предположили, что такого рода зависимость между фагом и бактерией-хозяином можно наблюдать на генетическом уровне. Поскольку во многих известных случаях атаки фагами бактерий начинаются с захвата РНК-полимеразы бактерии, мы искали общие мотивы на промоторных областях у фагов и бактерий.

В результате мы получили, что почти в половине случаев общие мотивы в этих областях у фагов и хостов есть. Также в большинстве случаев мы нашли общие мотивы между различными фагами, атакующими одних и тех же бактерий. Таким образом, при поиске наличия взаимодействий между фагом и бактерией, хорошим стартом будет поиск общих мотивов в промоторных областях фага и бактерии.

# Содержание

<b>1</b>	<b>Аннотация</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Введение</b>	<b>3</b>
2.1	Бактериофаги . . . . .	3
2.1.1	Использование бактериофагов . . . . .	4
2.1.2	Мотивы . . . . .	5
<b>3</b>	<b>Цель и задачи</b>	<b>7</b>
<b>4</b>	<b>Обзор литературы</b>	<b>8</b>
4.1	Взаимодействие фага T4 и E.coli . . . . .	8
4.1.1	Начало транскрипции E.coli . . . . .	9
4.1.2	Этапы транскрипции фага T4 . . . . .	9
4.2	Взаимодействие цианофага и цианобактерии . . . . .	11
4.2.1	Влияние интенсивности света на транскрипцию фага . . . . .	11
4.3	GeneMarkS-2 . . . . .	14
4.4	The MEME-Suite . . . . .	17
<b>5</b>	<b>Методы</b>	<b>19</b>
5.1	Программные средства . . . . .	19
5.2	Получение общих мотивов . . . . .	21
5.2.1	Выгрузка геномов . . . . .	21
5.2.2	Получение вышестоящих регуляторных регионов . . . . .	22
5.2.3	Поиск мотивов . . . . .	22
<b>6</b>	<b>Результаты и обсуждение</b>	<b>23</b>
6.1	Результат работы MEME-Suite . . . . .	23
6.2	Анализ полученных результатов . . . . .	24
6.2.1	Корреляционный анализ . . . . .	28
<b>7</b>	<b>Выводы</b>	<b>29</b>
	<b>Список литературы</b>	<b>30</b>

## 2 Введение

### 2.1 Бактериофаги

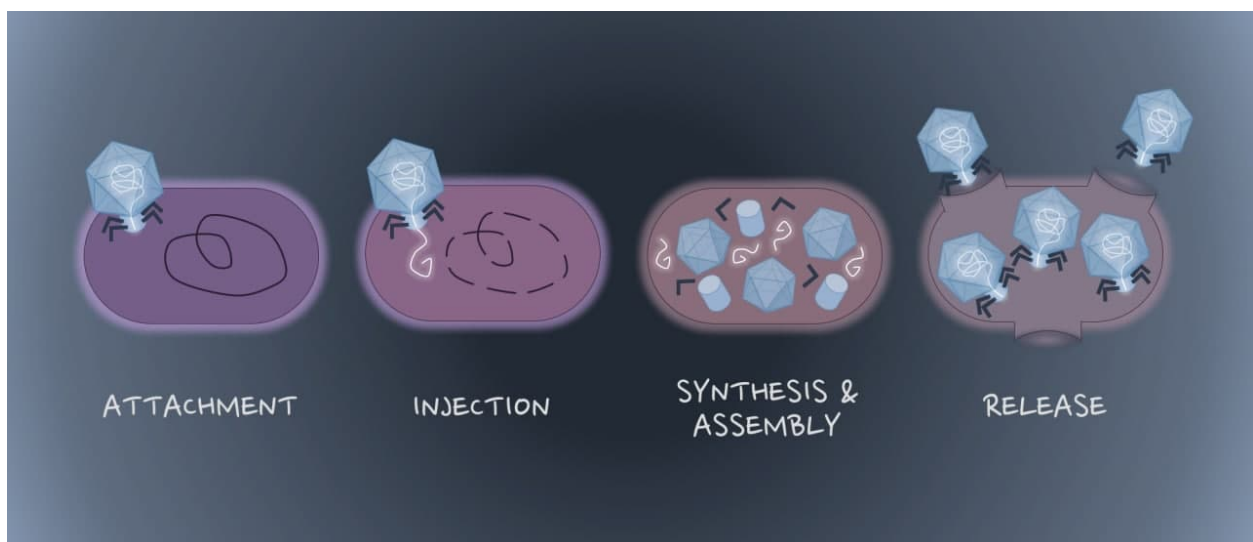


Рис. 1: *Жизненный цикл среднестатистического фага.* (1) Фаг сначала приземляется на бактерию. (2) Затем он вводит свою ДНК внутрь бактерий. (3) ДНК копируется и используется для изготовления капсидов для новых фагов. (4) Новые фаги собираются и взрывают бактерию, убивая её в процессе. [16]

Бактериофаги - это вирусы, которые заражают и размножаются внутри бактерий и архей. Бактериофаги, как правило, состоят из белковой оболочки и генетического материала. У них может быть одноцепочечная или двухцепочечная нуклеиновая кислота (ДНК или, реже, РНК). Фаги размножаются внутри бактерии после введения своего генома в ее цитоплазму. [13]

Более 90% бактериофагов имеют большие геномы в виде двухцепочечных ДНК. Они относятся к трем основным семействам бактериофагов: Myoviridae (с длинными, жесткими, сократительными хвостами), Siphoviridae (с длинными, гибкими хвостами) и Podoviridae (с короткими хвостами). [14]

Для бактерии исход заражения бактериофагом может быть разным. Некоторые бактериофаги вызывают лизис и в этом случае клетка погибает за очень малое количество времени. Как правило, это приводит к рождению сотен новых вирусов в течение нескольких минут или часов. Этот процесс может повторяться до тех пор, пока бактерии присутствуют в достаточном количестве для поддержки репликации. Многие бактериофаги ведут себя именно так (их называют вирулентными) и не способны вызывать какой-либо другой вид инфекции. Есть также умеренные бактериофаги, которые заражают клетки, а затем становятся спящими в латентном состоянии: реплицируются вместе с хромосомой хозяина и впоследствии передаются каждой дочерней клетке после деления. Однако эти дремлющие фаги могут быть активированы несколькими причинами, например повреждением ДНК. Для некоторых бактериофагов хромосомная ДНК хозяина может быть упакована в частицы бактериофага во время репликации бактериофага вместо генома бактериофага. Это может привести к высокому уровню горизонтального переноса генов в бактериальной популяции. [15]

### **2.1.1 Использование бактериофагов**

Использование бактериофагов в качестве специфичных антимикробных средств широко документировано в литературе. Их даже можно ис-

пользовать в качестве регулируемого терапевтического средства.

Как уже было сказано, в большинстве случаев, бактериофаги не дают бактерии размножаться. Вместо этого на свет появляются новые фаги. В то время, когда по каким-либо причинам химические антибиотики могут не сработать, фаги могут быть хорошей заменой для них [14]. Преимущества включают снижение побочных эффектов и снижение риска развития резистентности бактерии. Недостатки включают трудность поиска эффективного фага для конкретной инфекции. [16]

Фаги применяются не только в медицине. Они могут использоваться в пищевой промышленности, их используют в качестве противодействия биологическому оружию и токсинам, в диагностике (например, для поиска стафилококка в крови), в молочной промышленности. Бактериофаги также широко используются в разных биологических исследованиях [13]

### **2.1.2 Мотивы**

Мотив последовательности ДНК, РНК или белка - это короткий паттерн, который сохраняется во время эволюции. Мотивом в ДНК может быть сайт связывания белка; в белках мотив может быть активным сайтом фермента или структурной единицей, необходимой для правильного сворачивания белка. Мотивы в последовательностях являются одними из основных функциональных единиц молекулярной эволюции.

Многие геномы фагов кодируют небольшие белки, которые специфически изменяют РНК-полимеразу (RNAP) бактериального хозяина, ингибируя транскрипцию бактериальной ДНК и способствуя регулируемой транскрипции фаговой ДНК.

Транскрипция E.coli начинается со связывания  $\sigma$ -фактора с каталитическим “ядром” RNAP. Начальный  $\sigma$ -фактор,  $\sigma^{70}$ , специфично связывается с отдельными нуклеотидными последовательностями (мотивами) в промоторе. Фаги развили механизмы, которые модифицируют  $\sigma^{70}$  и перенаправляют бактериальную RNAP на транскрипции генов фага.

### 3 Цель и задачи

Как было показано, фаги имеют широкое применение в самых разных областях. Понимание устройства фагов в природе и принципов их работы может упростить и/или улучшить способы их использования. В этой работе мы постарались улучшить понимание взаимодействия между бактериофагами и бактериями. Мы хотим обнаружить общие мотивы у фагов и бактерий, которых они атакуют, в промоторных участках их последовательностей ДНК.

Также нам интересно исследовать наличие общих мотивов в промоторных последовательностях между фагами. Мы хотим проверить, является ли наличие общих мотивов в промоторных областях фагов свидетельством их родства. Также фаги с общими мотивами могут иметь схожих бактерий-хозяев.

## 4 Обзор литературы

### 4.1 Взаимодействие фага T4 и E.coli

Экспрессия генома T4 - это строго регулируемый процесс, который начинается сразу после заражения хозяина. Основной контроль над этой экспрессией происходит на уровне транскрипции. T4 не кодирует свою собственную РНК-полимеразу (RNAP), а вместо этого кодирует множество факторов, которые служат для изменения специфичности полимеразы хозяина по мере развития инфекции. Изменения полимеразы хозяина сопровождаются с тремя последовательными этапами транскрипции фага: ранней, промежуточной и поздней. Ранняя и промежуточная РНК (РНК, образовавшаяся при ранней и промежуточной транскрипции) обнаруживается дорепликативно [26, 27], в то время как поздняя транскрипция сопровождается репликацией T4. Ранние транскрипты T4 генерируются из ранних промоторов (P<sub>e</sub>), которые активны сразу после инфицирования. Промежуточные транскрипты T4 генерируются примерно через 1 минуту после заражения при 37°C и требуют синтеза белка фага. Промежуточная РНК синтезируется двумя способами: 1) активация промежуточных промоторов (P<sub>m</sub>) и 2) расширение транскриптов P<sub>e</sub> из ранних генов в нижестоящие средние гены.



### 4.1.1 Начало транскрипции E.coli

E. coli RNAP холофермент, как и все бактериальные RNAP, состоит из ядра субъединиц ( $\beta, \beta', \alpha_1, \alpha_2$  и  $\omega$ ), которое содержит активный сайт для синтеза РНК, и фактора специфичности  $\sigma$ , который распознает промоторы в ДНК и устанавливается на начальный сайт для транскрипции. Первичный  $\sigma$ ,  $\sigma^{70}$  в E. coli, используется во время экспоненциального роста; альтернативные факторы  $\sigma$  направляют транскрипцию генов, необходимых в различных условиях роста или во время стресса [17]

Для начала транскрипции части RNAP должны сначала распознать и связаться с двухцепочечными (ds) элементами распознавания ДНК, присутствующими в промоторе [18]. Каждый из С-концевых доменов  $\alpha$ -субъединиц ( $\alpha$ -CTDS) может взаимодействовать с вышестоящим элементом, А/Т богатыми последовательностями, присутствующими между позициями -40 и -60. Части  $\sigma^{70}$ , присутствующие в RNAP, могут взаимодействовать с тремя различными элементами dsDNA: с элементом -35, с последовательностью -15TGn-13 (TGn) и с позициями -12/-11 элемента -10. Как правило, промотор должен содержать только два из трех  $\sigma^{70}$ -зависимых элементов для активности; таким образом, промоторы E. coli могут быть свободно классифицированы как -35/-10 (основной класс), TGn/-10 (также называемый расширенным -10) или -35/TGn [18].

### 4.1.2 Этапы транскрипции фага Т4

Т4 заражает E.coli только во время экспоненциального роста. Транскрипция ранних генов Т4 начинается сразу после заражения. Таким образом, для эффективной инфекции фаг должен быстро перенаправить  $\sigma^{70}$ -

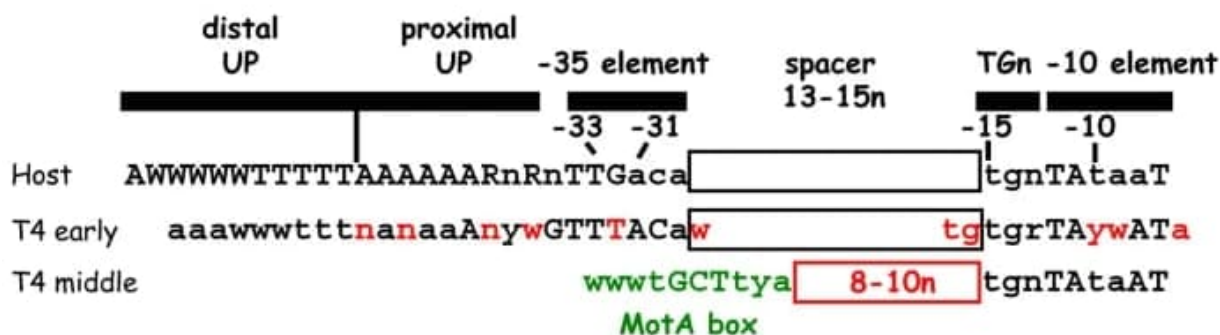


Рис. 2: Сравнение последовательностей хоста *E. coli*, раннего *T4* и промежуточного промоторов *T4*. Сверху показаны последовательности и положения элементов распознавания промотора хозяина для  $\sigma^{70}$ -RNAP (UP, -35, TGn, -10)[18]. Ниже аналогичные последовательности, обнаруженные в ранних [19] и промежуточных [20] промоторах *T4*, сходства выделены черным цветом, а различия-красным. W = A или T; R = A или G; Y = C или T, n = любой нуклеотид; заглавная буква представляет собой более высоко консервативное основание. [1]

ассоциированный RNAP, который активно участвует в транскрипции генома хозяина, на ранние промоторы *T4*. Такое немедленное перенаправление часто происходит успешно отчасти потому, что большинство ранних промоторов *T4* содержат такие же элементы распознавания  $\sigma^{70}$ -RNAP (-35, TGn и -10 элементов) и элементы  $\alpha$ -CTD UP (списки известных последовательностей ранних промоторов *T4* в [19]). Тем не менее, выравнивание последовательностей ранних промоторов *T4* показало дополнительные области совпадения, и есть предположение, что они содержат и другие последовательности, которые могут оптимизировать взаимодействие RNAP хозяина с элементами промотора *T4*. Следовательно, в отличие от большинства промоторов хозяина, которые относятся к классам -35/-10, TGn/-10 или -35/TGn, ранние промоторы *T4* могут быть описаны как “супер” UP/-35/TGn/-10 промоторы [1]. Действительно, большинство ранних промоторов *T4* очень хорошо конкурируют с промоторами хозяина за доступную RNAP [21].

## 4.2 Взаимодействие цианофага и цианобактерии

В этой статье авторы интересовались изменением климата. Изучение этого вопроса требует детального знания о биологической трансформации углерода на Земле. Стало очевидно, что океан - это важный поглотитель атмосферного углекислого газа. В плане поглощения  $CO_2$  в открытом океане доминируют два организма: *Prochlorococcus* и *Synechococcus* [22, 23]. Эти организмы стали моделью для изучения потока углерода из  $CO_2$  в микробную жизнь [24]. Однако биологические потери (антагонистические взаимодействия, выпас скота, вирусный лизис) прохлорококка и синехокка мало изучены. У вирусов открывают новые гены, которые действуют для поддержания фотосинтеза во время инфекции [25], так что, несмотря на окончательную потерю фиксированного углерода в растворенном органическом веществе в результате лизиса, фиксация  $CO_2$  может поддерживаться временно в течение относительно длительных латентных периодов вируса. Было показано, что на самом деле цианофаг отключает  $CO_2$  инфекцию на ранних стадиях заражения, но при этом поддерживает реакции фотосинтеза [28].

### 4.2.1 Влияние интенсивности света на транскрипцию фага

Авторы обнаружили что скорость транскрипции фагов при сильном свете увеличивается, в то время, как репликации ДНК была такой же, как и при слабом. Также обнаружили, что скорость экспрессии только одного

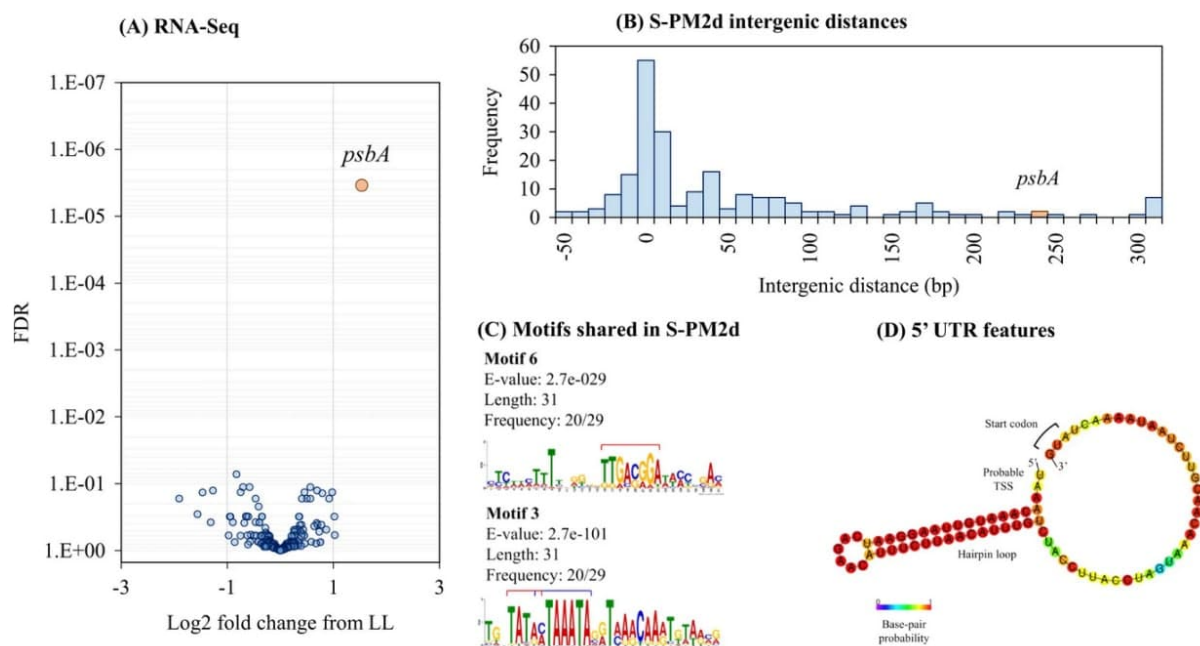


Рис. 3: Влияние интенсивности света на глобальную экспрессию генов. **а** Вулкано-плот с логарифмической шкалой, показывающий относительное изменение транскриптом (относительно воздействия слабого света). Ось у показывает скорректированное р-значение ложного обнаружения, рассчитанное с помощью edgeR. Оранжевый круг показывает статистически значимую дифференциальную экспрессию генов по edgeR. **б** Гистограмма длин вышестоящих межгенных последовательностей в геноме цианофага S-PM2d. Ячейка, содержащая *psbA*, показана оранжевым цветом. **с** Мотивы вышестоящих последовательностей ДНК, обнаруженных у цианофазовых PSBA. Красные полосы указывают на -35 и -10 элементы сайтов связывания  $\sigma^{70}$ , а синяя полоса показывает сайт связывания для  $\sigma$  Grp55. **д** Предсказываемая структура складывания петли шпильки S-PM2d *psbA* 5'-UTR [2]

гена цианофага была пропорциональна интенсивности света. Это был фотосинтетический AMG psbA, кодирующий полипептид D1, расположенный в ядре центра реакции PSII. *Synechococcus* также кодируют этот белок, но у них не было никаких увеличений в скорости транскрипции. [2]

Цианобактерии, включая морской *Synechococcus*, демонстрируют светозависимую транскрипцию psbAs [29, 30]. В модельной цианобактерии на светозависимое изменение транскриптов psbA влияют несколько факторов, включая альтернативные  $\sigma$ -факторы [37, 38]. Более того, продукты деградации D1 непосредственно связываются с вышележащими регионами последовательностей psbA, так что вызванное светом повреждение может положительно влиять на транскрипцию psbA. Авторы не смогли найти консервативные мотивы в вышележащих областях в последовательностях psbA S-PM2d, которые были бы общими с *Synechococcus*.

Межгенная вышестоящая регуляторная последовательность у psbA нехарактерно длинная у S-PM2d (232 пар нуклеотидов, по сравнению с медианой 6 по всему геному). Это также справедливо и для других цианофагов, где вышестоящие регуляторные области psbA варьируются в пределах 125-453 пн. Также с высокой степенью достоверности было обнаружено между рассмотренными фагами 6 общих мотивов в этих последовательностях [2]. Из них два присутствовали в S-PM2d. Эти два мотива - это -35 (мотив 6) и -10 (мотив 3) (рис. 3) элементы сайтов связывания фактора транскрипции  $\sigma^{70}$ , типичные для ранних генов Т4-подобных фагов [39]. К тому же, было обнаружено, что как и у Т4, мотив 3 содержит сайт для посадки позднего  $\sigma$ -фактора Grp55. Таким образом, у S-PM2d имеются мотивы, необходимые для скоординированной экспрессии psbA на начальной и поздней стадиях инфекции.

### 4.3 GeneMarkS-2

Для поиска прокариотических генов существует несколько инструментов (например GeneMarkS, Glimmer3, Prodigal), которые известны достаточно высокой точностью в предсказании белок-кодирующих ORF. В среднем эти инструменты способны найти более 97% генов в проверенном тестовом наборе с точки зрения правильного предсказания концов гена 3' [41]. Кроме того, точность определения стартов генов составляет в среднем 90% [41]. Но основная часть генов, которые не были обнаружены, принадлежали в основном к атипичной категории, т. е. гены с паттернами, не соответствующими видоспецифической натренированной модели, обученной на основной части генома [42]. Тем не менее авторы описали метод, с помощью которого можно получить более высокую точность в обнаружении генов. [3]

GeneMarkS-2 использует довольно сложную модель гена (рис. 4). Большинство белок-кодирующих областей в прокариотических геномах имеют видоспецифичные паттерны из нескольких олигонуклеотидов (например, кодонов) [43]. GeneMarkS-2 изучает эти паттерны и оценивает параметры типичной модели белок-кодирующих областей, трехпериодической цепи Маркова [44], итеративно самообучаясь на всем геноме.

Алгоритм обучения без учителя выполняет несколько двухэтапных итераций (рис. 5). Каждая итерация приводит к (1) сегментации генома на кодирующие белки (CDS) и некодирующие области (прогнозирование генов) и (2) переоценке параметров модели.

*На первой итерации* алгоритм Витерби вычисляет максимально вероятную последовательность скрытых состояний (рис. 5) вдоль генома. После первого запуска алгоритма Витерби все участки генома, помечен-

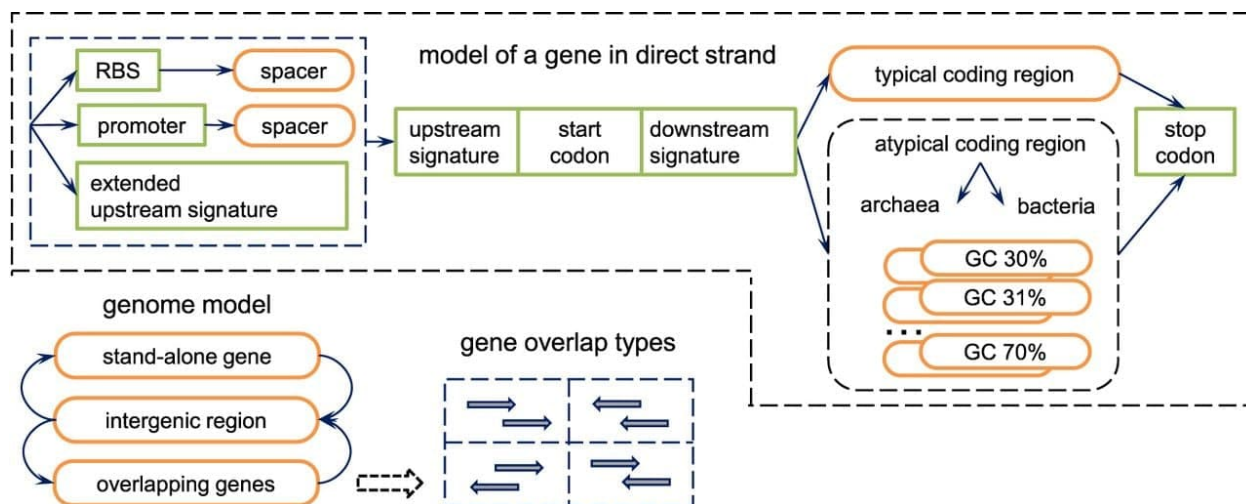


Рис. 4: *Модель гена в GeneMarkS-2*. Диаграмма основного состояния обобщенной скрытой марковской модели (ГНМ) геномной последовательности прокариот. Состояния, показанные на верхней панели, использовались для моделирования гена в прямом направлении. Гены в обратном направлении моделировались идентичным набором состояний (с обратными направлениями перехода). Различные состояния, моделирующие гены в прямых и обратных цепочках, были связаны через состояние межгенной области или же перекрывающимися участками в противоположных цепочках. [3]

ные как “белок-кодирующие”, собираются в обучающий набор для оценки параметров “типичной” (для данного генома) модели. Аналогично помеченные как “некодирующие” участки нужны для оценки параметров модели некодирования, которая строится в виде однородной цепи Маркова второго порядка.

На второй итерации модель уже выбирает последовательности, расположенные вокруг запусков генов, и выводит модели паттернов, кодирующих регуляцию транскрипции и/или трансляции. Третью итерацию и далее GeneMarkS-2 продолжает шаги предсказаний/оценок до тех пор, пока не будет выполнено условие сходимости (99% идентичности в гене начинается между последовательными итерациями).

Для нас было важно, что наблюдаемая частота ошибок GeneMarkS-2 составила 4,4%, за ней последовали Prodigal на уровне 6,1%, GeneMarkS

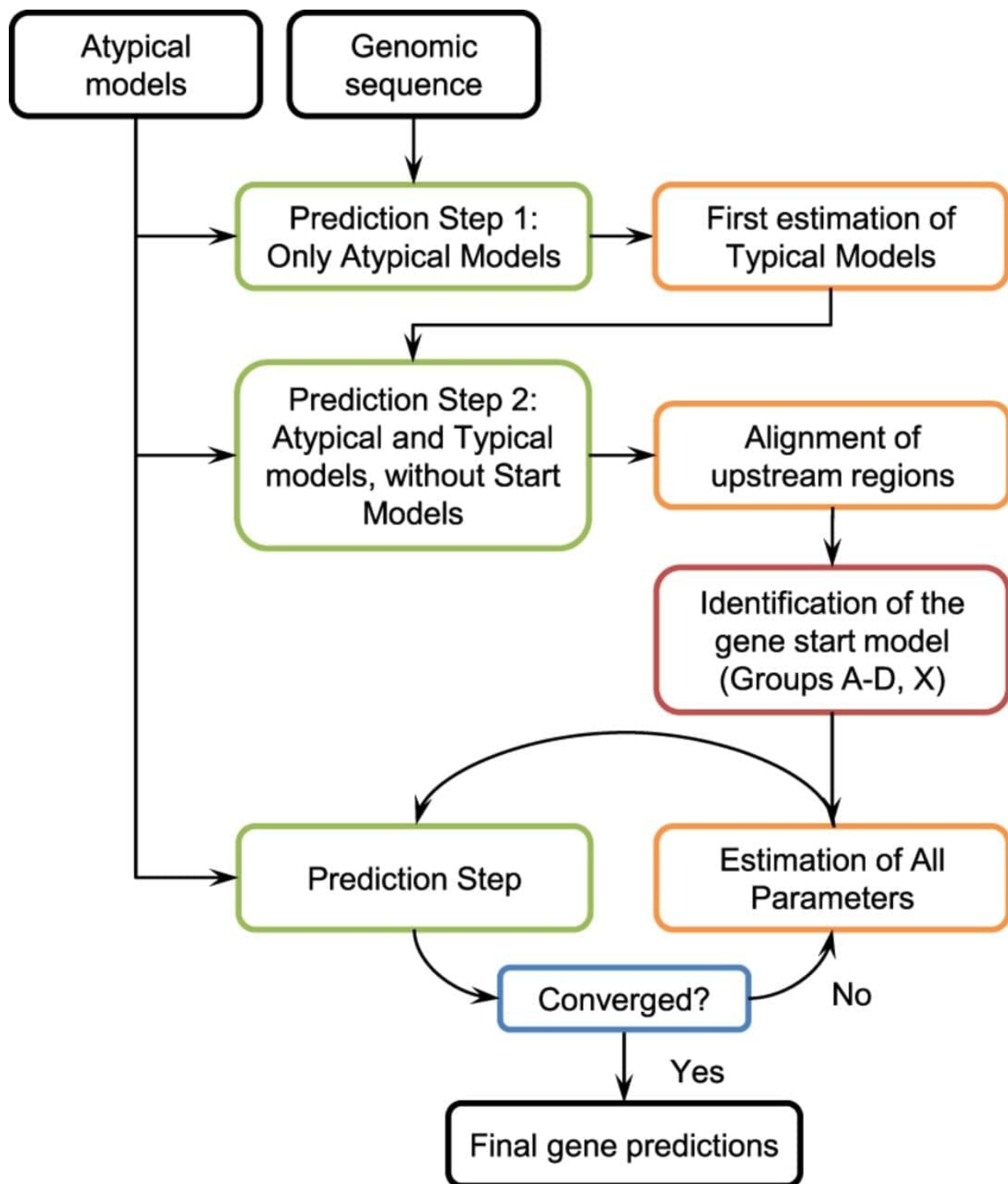


Рис. 5: Диаграмма обучения без учителя для GMS-2 [3]



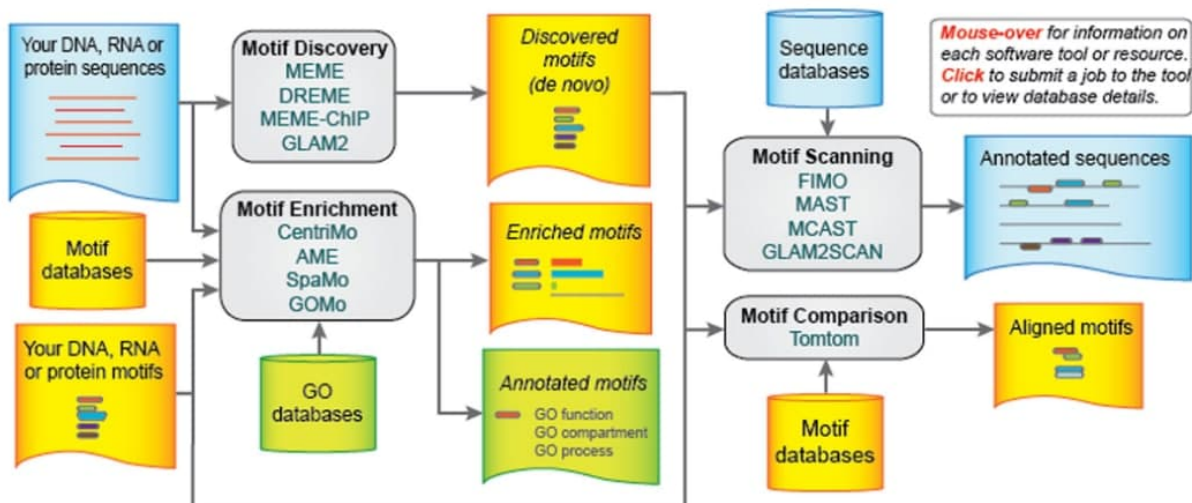


Рис. 6: Что умеет делать The MEME-Suite. Нам нужно находить новые мотивы в последовательностях - это указано сверху посередине. [4]

на уровне 10,2% и, наконец, Glimmer3 на уровне 13,2%. Таким образом, GeneMarkS-2 сделал наибольшее количество правильных прогнозов среди четырех искателей генов. [3]

## 4.4 The MEME-Suite

The MEME-Suite - это программируемый набор инструментов, которые анализируют мотивы последовательностей. Ядром набора является алгоритм обнаружения мотивов MEME, который находит мотивы в невыравненных последовательностях ДНК, РНК или белков [40]. Поисковик мотивов ищет *новые* мотивы в предоставленных последовательностях. Существует много инструментов, предназначенных для поиска мотивов только в ДНК; The MEME-Suite может искать мотивы и сканирование последовательностей ДНК, РНК и белков. [4]

Как было описано выше, алгоритм MEME, обнаруживает один или несколько мотивов в наборе последовательностей ДНК, РНК или белков,

используя метод максимизации математического ожидания для подгонки двухкомпонентной конечной модели к набору последовательностей. Путём подгонки модели к данным обнаруживается единичный мотив, дальше модель стирает вхождения максимально вероятного мотива, найденного таким образом и процесс повторяется. Таким образом ищется множество мотивов. У алгоритма два необходимых параметра - минимальная и максимальная ширина искомых мотивов. Он возвращает профиль каждого мотива и порог, которые вместе могут быть использованы в качестве байесовского оптимального классификатора для поиска вхождений мотива в других базах данных. Алгоритм оценивает, сколько раз каждый мотив встречается в каждой последовательности в наборе данных, и выводит частоту встречаемости этого мотива. [12]

## 5 Методы

### 5.1 Программные средства

- Virus-Host DB - База данных в которой содержится информация о взаимоотношениях между вирусами и их хозяевами, представленные в виде пар идентификаторов таксономии NCBI для вирусов и их хозяев. [31]
- GeneMarkS-2 - программное обеспечение для поиска генов в прокариотических геномах. [3]
- NCBI Entrez Programming Utilities - программное обеспечение, набор из восьми серверных программ, которые обеспечивают стабильный интерфейс с системой запросов и баз данных Entrez в Национальном центре биотехнологической информации (NCBI) [36]
- Biopython - набор инструментов для биологических вычислений, написанных на Python. [32]
- The MEME Suite - программное обеспечение для поиска новых, нераскрытых мотивов (повторяющихся паттернов фиксированной длины) в последовательностях. MEME разбивает паттерны переменной длины на два или более отдельных мотива. [4]
- Python 3.8.5 - среда для запуска скриптов формата \*.py [33]

- Jupyter Notebook - веб-приложение, которое позволяет создавать и обмениваться документами, содержащими живой код, уравнения, визуализации и повествовательный текст.[34]
- <https://github.com/poolsar42/phages-and-hosts> - GitHub репозиторий, в котором содержатся все нижележащие скрипты. [35]
- `Fasta_merge.ipynb` - скрипт для объединения регуляторных областей хозяина и его фагов в один файл.
- `Hosts_upstream_regions.ipynb` - скрипт для выделения регуляторных областей.
- `Proteins_formation.ipynb` - скрипт для сбора белковых последовательностей в один файл.
- `Searching_host_genomes.ipynb` - скрипт для загрузки необходимых к работе геномов хостов.
- `Unpacking.ipynb` - скрипт для распаковки загруженных геномов.
- `VH_tsv_writer.ipynb` - скрипт, выписывающий в файл ID хоста и ID прилежащих к нему фагов.
- `Virus_genes.ipynb` - скрипт для загрузки геномов фагов.
- `missing_phage_genomes.ipynb` - скрипт для поиска фагов, для которых GMS2 не находит гены.
- `proteins_convertation.ipynb` - скрипт для преобразования нуклеотидных в белковые.
- `regex_promoter.ipynb` - скрипт для анализа полученных результатов

- `run_gms2.py` - скрипт для поиска генов в геномах с помощью GeneMarkS-2
- `tsv_write.ipynb` - скрипт для выписывания информации о связи между хостами и фагами в один tsv-файл

## 5.2 Получение общих мотивов

### 5.2.1 Выгрузка геномов

- С FTP сервера Virus-Hist DB выгрузили файл `virushostdb.tsv` - в нём содержится информация о связи между фагами и их хостами.
- С помощью `tsv_write.ipynb` - выписали в удобном формате все взаимоотношения между фагами и хостами.
- С помощью `Virus_genes.ipynb` - выгрузили геномы фагов.
- Запустили `Searching_host_genomes.ipynb` - для выгрузки геномов хостов.
- И распаковали с помощью `Unpacking.ipynb`.

Мы собрали геномы всех фагов, которые находятся в базе данных Virus-Host DB, там для каждого фага также был указан или были указаны хосты, к которым он может прикрепиться. Их RefSeq ID. Мы всё выгрузили с FTP сервера. Геномы хостов затем выгрузили с базы данных RefSeq NCBI

### 5.2.2 Получение вышестоящих регуляторных регионов

- Запустили скрипт `run_gms2.py` ждя поиска генов во всех имеющихся геномах
- И далее запустили `Hosts_upstream_regions.ipynb` для выделения областей длиной 50 нуклеотидов перед точкой начала транскрипции у каждого найденным геном

Гены мы находили с помощью GeneMarkS-2. GeneMarkS-2 также дал позицию каждого гена в геноме. Каждому гену посчитали его транслирующийся белок, также с помощью GeneMarkS-2. После этого для каждого гена нашли вышестоящие регуляторные области, длиной в 50 нуклеотидов. Это наша оценка расстояния, на котором должны быть общие мотивы, кроме -35 и -10 элементов.

### 5.2.3 Поиск мотивов

- Подготовкой файлов данных помогла программа: `Fasta_merge.ipynb`. Она создаёт файл, в котором хранятся вышестоящие области бактерии и всех прилежащих к ней фагов. Такой формат файла подходит для запуска MEME Suite.
- Запустили MEME Suite с получившимися файлами.

## 6 Результаты и обсуждение

### 6.1 Результат работы MEME-Suite

На вход в MEME-Suite был подан 461 файл. В каждом файле находились промоторные области бактерии-хозяина и промоторные области всех известных [31] фагов, атакующих эту бактерию. В общей сложности было найдено 1946 мотивов в 426 исходных файлов.

Для каждого мотива также были получены следующие файлы:

- Логотип мотива. Логотип последовательностей представляет собой графическое представление информационного содержимого, хранящегося в системе множественного выравнивания последовательностей (MSA), и обеспечивают компактное и интуитивно понятное представление специфичного для положения нуклеотидного состава связывающих мотивов, активных сайтов и т.д. в биологических последовательностях.
- Матрица частоты нуклеотидов (PFM). Эта матрица считается как отношение числа вхождений каждого нуклеотида в каждой позиции к полному числу мотивов.
- Матрица оценки для конкретной позиции (PSSM, Position-Specific Scoring Matrices) - нужна для использования программами поиска в базе данных, такими как MAST. Эта матрица представляет собой

матрицу логитов, которые считаются стократным взятием логарифма по основанию 2 от отношения  $p$  в каждой позиции мотива и чего-то еще [5], где  $p$ -вероятность конкретной буквы в этой позиции мотива. В данной работе мы не использовали эти матрицы.

В совокупности эти данные получились большими, чтобы включать их в приложение. В качестве примера я приложу все три файла для отдельного массива. Они доступны по ссылке: [https://github.com/poolsar42/BachelorThesis/tree/main/results\\_example](https://github.com/poolsar42/BachelorThesis/tree/main/results_example)

## 6.2 Анализ полученных результатов

Для каждого мотива мы нашли его локализацию и добавили в таблицу результатов отдельную колонку “location”. В этой колонке присутствуют значения “BOTH” - если мотив был найден и у бактерии и у фага, “PHAGE” - если мотив был найден только у фага или “HOST”, если мотив был найден только у бактерии. К нашему удивлению некоторые мотивы не были найдены нигде - для таких мы в этой колонке выписали “NOT FOUND”.

91 мотив был общим только у фагов, поражающих одну бактерию, но не был найден в самих бактериях, эти мотивы были найдены в 53 исходных файлах. 858 мотивов было найдено внутри самих бактериальных промоторных областях, но они не были найдены у фагов, поражающих эти бактерии. Они были найдены в 329 исходных файлах. И, наконец, 727 мотивов были общими для бактерий и некоторых фагов, которые их поражают, они были найдены в 195 исходных файлах. Оставшиеся 270 найденных мотивов не были найдены ни в каких промоторных областях в своих файлах.

Также, мы знаем, что у бактерии и у хоста могут часто повторяются -35 и -10 промоторные элементы. Нам они не были интересны. Мы нашли



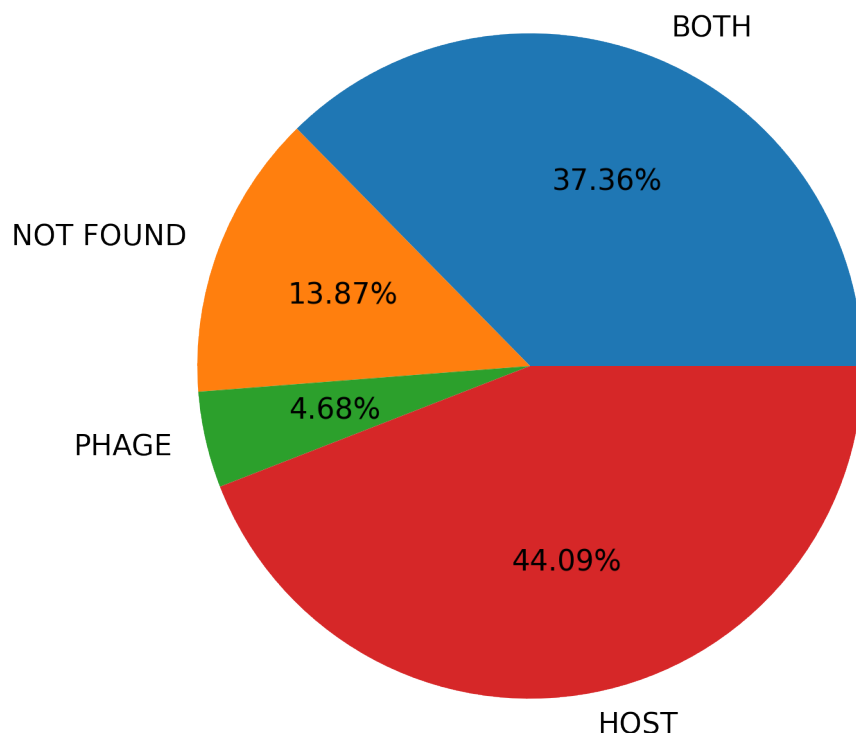


Рис. 7: *Результат поиска мотивов по файлам без удаления -35 и -10 элементов. В процентном соотношении от 1946 мотивов.*

возможные последовательности для -35 и для -10 участков [6, 7, 8] и удалили их из нашего набора данных с помощью регулярных выражений [9]. В оставшейся таблице было 1344 мотива из 362 исходных файлов. Из них:

- 63 мотива были общими только среди фагов в 39 файлах.
- 624 мотива были найдены только среди областей бактериальных промоторов в 261 файле.
- 533 мотива были общими у хозяев и их фагов в 153 файлах.
- Также осталось 124 мистических мотива, которые не принадлежали ни фагам, ни бактериям в 104 файлах.

Нам было интересно положение мотивов относительно начала тран-

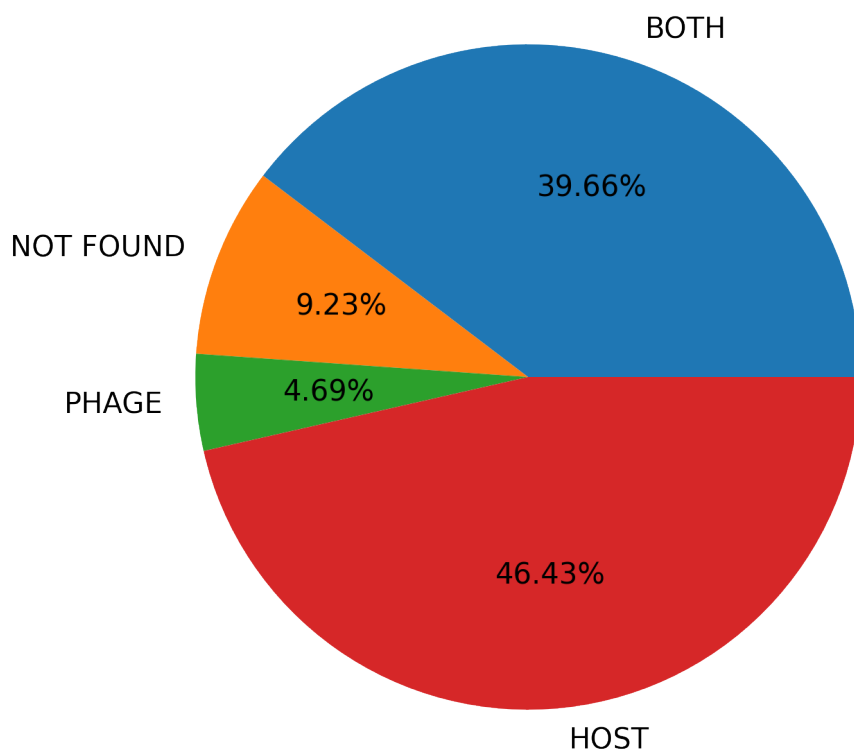


Рис. 8: *Результат поиска мотивов по файлам после удаления -35 и -10 элементов. В процентном соотношении от 1344 мотивов.*

скрипции. Как уже было сказано, мы выделили 50 нуклеотидов - перед стартом транскрипции. Опять же, с помощью регулярных выражений, мы нашли положение мотива в каждом 50-нуклеотидном регионе, в котором он встречается. Для каждого мотива мы посчитали среднее значение для его левого конца относительно начала транскрипции, для его правого конца и среднеквадратичную ошибку для обоих концов. Всё это зафиксировали в таблице результатов. Таблица получилась большой, чтобы включить её в приложение. Она доступна по ссылке: <https://raw.githubusercontent.com/poolsar42/BachelorThesis/main/results.tsv>

Также, как я уже написал выше, мы удивились, когда обнаружили, что некоторые мотивы не были найдены ни в каком из представленных вышестоящих регуляторных регионах. Также во многих мотивах можно

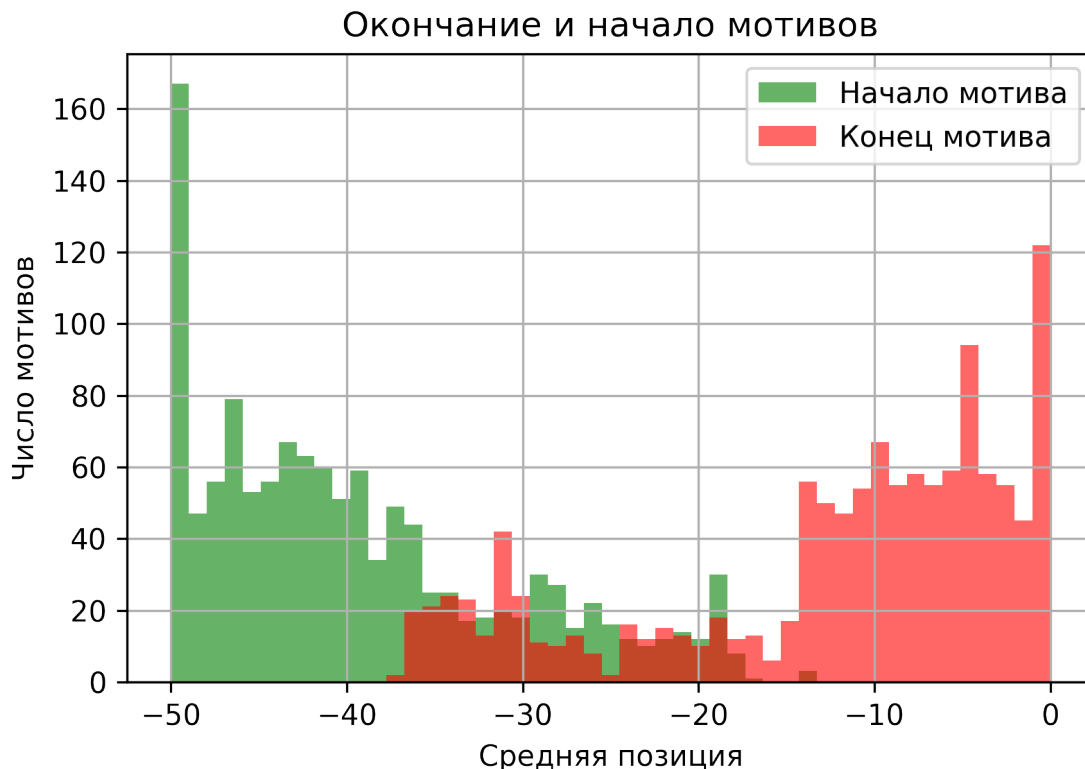


Рис. 9: Усреднённые для каждого мотива позиции его начала(зелёная гистограмма) и конца(красная) относительно точки старта транскрипции.

заметить большое количество букв W, N, Y и ещё некоторых, которые не входят в состав привычных нам A, T, G и C для нуклеотидов. Дело в том, что на одном месте в мотиве в разных последовательностях могут стоять разные нуклеотиды. И для таких двойственных мест MEME-Suite использует специальный алфавит, в котором одна буква заменяет все возможные на данной позиции [10].

Но когда мы начали анализировать эти последовательности, мы заметили, что некоторые регулярные выражения и двойственные буквы, которые должны им соответствовать, не совпадают с теми, которые даны в алфавите [10].

В нашем поиске мотивов минимальная ширина искомых мотивов бы-

ла 10 нуклеотидов. Ширина нескольких известных мотивов (-35, -10 etc.) колеблется в районе от 6 до 10 нуклеотидов. К тому же, межгенного расстояния в 50 нуклеотидов не всегда достаточно для поиска общих мотивов. Точка начала транскрипции также не всегда находилась верно. Учитывая это, в 42% случаях общие мотивы между фагами их хозяевами были найдены. В 54% случаях общие мотивы были обнаружены только между фагами. Мы считаем эти первичные для данной задачи результаты вполне обнадеживающими. Процентные соотношения здесь не относительно общего числа мотивов, а относительно общего числа файлов (видов бактерий).

### 6.2.1 Корреляционный анализ

Нам также стало интересно, коррелируют ли как-то между собой мотивы бактериофагов, которые атакуют одну бактерию, а также есть ли корреляция между мотивами бактериофагов из одной таксономической категории. Для начала мы хотели посчитать корреляцию Пирсона между PFM этих мотивов. Но PFM - двумерный массив; мы не обнаружили в известных библиотеках Python подходящей функции для подсчёта корреляции между 2D-массивами. Мы позаимствовали скрипт для предварительного подсчёта такой корреляции `preliminary_correlation.py`, используя трюки отсюда [11]. Для каждого файла с мотивами была посчитана корреляция. Пример найденной корреляции можно найти по ссылке: [https://github.com/poolsar42/BachelorThesis/blob/main/MEME\\_0\\_1115\\_motif.tsv](https://github.com/poolsar42/BachelorThesis/blob/main/MEME_0_1115_motif.tsv). Первый аргумент в каждой позиции этой матрицы - подсчитанный коэффициент корреляции Пирсона. На данном этапе результаты трудно интерпретировать.

## 7 Выводы

- Наличие общих мотивов в регуляторных элементах бактериофагов и бактерий позволяет определить степень их взаимоотношений.
- Наличие общих мотивов в регуляторных элементах между различными бактериофагами позволяет определить степень родства этих бактериофагов.

# Список литературы

- [1] Hinton D.M. Transcriptional control in the prereplicative phase of T4 development // Virology journal. 2010. V. 7. P. 289. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-289>
- [2] Puxty, R.J., Evans, D.J., Millard, A.D. et al. Energy limitation of cyanophage development: implications for marine carbon cycling // ISME J. 2018, 12, 1273–1286. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0043-3>
- [3] Lomsadze, A., Gemayel, K., Tang, S., and Borodovsky, M. Modeling leaderless transcription and atypical genes results in more accurate gene prediction in prokaryotes Genome research, 2018. 28(7), 1079–1089. <https://doi.org/10.1101/gr.230615.117>
- [4] Timothy L. Bailey, James Johnson, Charles E. Grant, William S. Noble, The MEME Suite, Nucleic Acids Research, Volume 43, Issue W1, 1 July 2015, Pages W39–W49, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv416>
- [5] [https://kodomofbb.msu.ru/~partyhard/term4/pr9/meme\\_out\\_oops/meme.html#pssm1](https://kodomofbb.msu.ru/~partyhard/term4/pr9/meme_out_oops/meme.html#pssm1)
- [6] <https://www.addgene.org/mol-bio-reference/promoters/>
- [7] Chang-Hui Shen // Gene Expression: Transcription of the Genetic Code // Diagnostic Molecular Biology, 2019 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802823-0.00003-1>
- [8] [https://en.wikipedia.org/wiki/Promoter\\_\(genetics\)#Bacterial](https://en.wikipedia.org/wiki/Promoter_(genetics)#Bacterial)
- [9] <https://docs.python.org/3/library/re.html#module-re>
- [10] [https://meme-suite.org/meme/doc/alphabet-format.html#standard\\_DNA](https://meme-suite.org/meme/doc/alphabet-format.html#standard_DNA)
- [11] <https://stackoverflow.com/questions/30143417/computing-the-correlation-coefficient-between-two-multi-dimensional-arrays>

- [12] Bailey TL, Elkan C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol. 1994;2:28-36. PMID: 7584402.
- [13] <https://en.wikipedia.org/wiki/Bacteriophage>
- [14] Monk, A., Rees, C., Barrow, P., Hagens, S. and Harper, D. (2010), Bacteriophage applications: where are we now? Letters in Applied Microbiology, 51: 363-369. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02916.x>
- [15] David R. Harper, Benjamin H Burrowes, Elizabeth M. Kutter (15 August 2014) Bacteriophage: Therapeutic Uses, Letters in Applied Microbiology. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020000.pub2>
- [16] <https://sitn.hms.harvard.edu/flash/2018/bacteriophage-solution-antibiotics-problem/>
- [17] Paget, M.S., Helmann, J.D. The *sigma*<sup>70</sup> family of sigma factors. Genome Biol 4, 203 (2003). <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-1-203>
- [18] Hook-Barnard IG, Hinton DM: Transcription Initiation by Mix and Match Elements: Flexibility for Polymerase Binding to Bacterial Promoters. Gene Regulation and Systems Biology 2007. [http://la-press.com/article.php?article\\_id=481:275-293](http://la-press.com/article.php?article_id=481:275-293)
- [19] Miller ES, Kutter E, Mosig G, Arisaka F, Kunisawa T, Ruger W: Bacteriophage T4 genome. Microbiol Mol Biol Rev 2003, 67: 86-156. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.1.86-156.2003>
- [20] Stoškiene, G., Truncaite, L., Zajančauskaite, A. and Nivinskas, R. (2007), Middle promoters constitute the most abundant and diverse class of promoters in bacteriophage T4. Molecular Microbiology, 64: 421-434. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05659.x>
- [21] Wilkens K, Ruger W: Characterization of bacteriophage T4 early

- promoters in vivo with a new promoter probe vector. *Plasmid* 1996, 35: 108-120. <https://doi.org/10.1006/plas.1996.0013>
- [22] Zwirgmaier K, Jardillier L, Ostrowski M, Mazard S, Garczarek L, Vault D, et al. Global phylogeography of marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* reveals a distinct partitioning of lineages among oceanic biomes. *Environ Microbiol.* 2008;10:147–161.
- [23] Bouman HA, Ulloa O, Scanlan DJ, Zwirgmaier K, Li WKW, Platt T, et al. Oceanographic basis of the global surface distribution of *Prochlorococcus* ecotypes. *Science*. 2006;312:918–921.
- [24] Scanlan DJ, Ostrowski M, Mazard S, Dufresne A, Garczarek L, Hess WR, et al. Ecological genomics of marine picocyanobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009;73:249–299.
- [25] Mann NH, Cook A, Millard AD, Bailey S, Clokie M. Bacterial photosynthesis genes in a virus. *Nature*. 2003;424:741–742.
- [26] Stitt B, Hinton DM: Regulation of middle-mode transcription. In *Molecular biology of bacteriophage T4*. Edited by: Karam JD, Drake J, Kreuzer KN, Mosig G, Hall D, Eiserling F, Black L, Spicer E, Kutter E, Carlson K, Miller ES. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1994:142-160
- [27] Brody E, Rabussay D, Hall D: Regulation of transcription of prereplicative genes. In *Bacteriophage T4*. Edited by: Mathews CK, Kutter EM, Mosig G, Berget PB. Washington, D. C.: American Society for Microbiology; 1983:174-183
- [28] Puxty RJ, Millard AD, Evans DJ, Scanlan DJ. Viruses inhibit  $CO_2$  fixation in the most abundant phototrophs on Earth. *Curr Biol.* 2016;26:1585–1589.
- [29] Garczarek L, Dufresne A, Blot N, Cockshutt AM, Peyrat A, Campbell DA, et al. Function and evolution of the *psbA* gene family in marine



- Synechococcus: *Synechococcus* sp. WH7803 as a case study. *ISME J.* 2008;2:937–953.
- [30] Mulo P, Sakurai I, Aro EM. Strategies for *psbA* gene expression in cyanobacteria, green algae and higher plants: From transcription to PSII repair. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2012;1817:247–257.
  - [31] <https://www.genome.jp/virushostdb/>
  - [32] <https://biopython.org/>
  - [33] <https://docs.python.org/3/>
  - [34] <https://jupyter.org/>
  - [35] <https://github.com/poolsar42/phages-and-hosts>
  - [36] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK25501/>
  - [37] Imamura S, Yoshihara S, Nakano S, Shiozaki N, Yamada A, Tanaka K, et al. Purification, characterization, and gene expression of all sigma factors of RNA polymerase in a cyanobacterium. *J Mol Biol.* 2003;325:857–872.
  - [38] Imamura S, Asayama M, Shirai M. In vitro transcription analysis by reconstituted cyanobacterial RNA polymerase: roles of group 1 and 2 sigma factors and a core subunit, RpoC2. *Genes Cells.* 2004;9:1175–1187.
  - [39] Miller ES, Kutter E, Mosiq G, Arisaka F, Kunisawa T, Rüger W. Bacteriophage T4 genome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67:86–156.
  - [40] Altman, R, Brutlag, D, Karp, P, Lathrop, R, & Searls, D. Proceedings: Second international conference on intelligent systems for molecular biology. United States.
  - [41] Hyatt D, Chen GL, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. 2010. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11: 119
  - [42] Borodovsky M, McIninch JD, Koonin EV, Rudd KE, Medigue C, Danchin

- A. 1995. Detection of new genes in a bacterial genome using Markov models for three gene classes. *Nucleic Acids Res* 23: 3554–3562.
- [43] Fickett JW, Tung CS. 1992. Assessment of protein coding measures. *Nucleic Acids Res* 20: 6441–6450
- [44] Borodovsky M, Sprizhitskii Y, Golovanov E, Aleksandrov A. 1986b. Statistical patterns in primary structures of the functional regions of the genome of *Escherichia coli*. Computer recognition of coding regions. *Mol Biol* 20