

ЗАГАЛЬНІ ТЕНДЕНЦІЇ ОРГАНІЗАЦІЇ ТА ЛОКАЛІЗАЦІЇ CRT-КЛАСТЕРІВ У ГЕНОМАХ СТРЕПТОМІЦЕТІВ

Л.В. ПОЛІЩУК, В.В. ЛУК'ЯНЧУК

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
Україна, 03143, Київ, вул. Заболотного, 154,
E-mail: LVPolishchuk@ukr.net

Мета роботи – виявити існування спільних принципів в організації crt-кластерів стрептоміцетів та локалізації їх в геномах; довести подібність організації crt-кластерів у філогенетично споріднених штамів. Нуклеотидні послідовності crt-кластерів 100 штамів стрептоміцетів аналізували за допомогою програм BLASTN. Визначено ряд схем організації crt-кластерів стрептоміцетів. Сформульовано низку основних тенденцій локалізації та організації стрептоміцетних crt-кластерів. Показано подібність організації crt-кластерів в геномах мікроорганізмів, що належать до різних штамів одного і того ж виду стрептоміцетів. Доведено можливість застосовувати інформацію про організацію crt-кластерів Streptomyces (на додаток до генетичних та фенотипових характеристик, які традиційно використовуються) при класифікації мікроорганізмів у межах таксонів нижчого порядку (клад, видів, підвидів).

Ключові слова: Streptomyces, crt-кластер, геном, схема організації кластера, BLASTN-аналіз.

Вступ. Починаючи з 1977 р. з дивовижним прогресом відбувається визначення первинної структури геномних ДНК організмів різної таксономічної приналежності (вірусів, бактерій, рослин, тварин, людини) (Langeveld et al, 1978). Різні бази даних містять інформацію про мільйони нуклеотидних послідовностей, як окремих генів, так і повних геномів. Наприклад, кількість визначених геномів стрептоміцетів скоро досягне 500. Багато лабораторій ретельно вивчають не тільки інформацію, що закодована в хромосомних та плазмідних ДНК мікроорганізмів, але і принципи будови їх геномів (Stackebrandt et al, 2002; Bentley et al, 2004; Labeda et al, 2012; Polishchuk et al, 2017; Polishchuk, 2018; Polishchuk, 2018a). Отримані дані важливі для досліджень молекулярної еволюції, як окремих видів, так і загалом усього царства Bacteria (Stackebrandt et al, 2002; Bentley et al, 2004).

Значні зусилля приділяються виявленню загальних тенденцій локалізації та організації, як хромосом, так і окремих їх елементів (генів, поліцистронів, оперонів). Закономірності, характерні для обов'язкових генів (housekeeping genes – таких, як *16S rRNA*, *gyrA* та ряду інших) досліджують першочергово і в багатьох лабораторіях (Stackebrandt et al, 2002; Bentley et al, 2004; Labeda et al, 2012). Однак ми вважаємо, що доцільним є і встановлення тенденцій локалізації та організації кластерів та генів, що визначають необов'язкові білки та синтез вторинних метаболітів (на прикладі crt-генів).

Актуальність представленого дослідження, визначається, по-перше, корисністю для класифікації стрептоміцетів та, по-друге, важливістю отриманих результатів для встановлення молекулярної еволюції організмів у цілому.

Раніше ми продемонстрували (на прикладі штамів видів *S. albus/albidoflavus*, *S. hygroscopticus*, *S. griseus* та деяких інших), що подібність схем організації crt-кластерів стрептоміцетів різних штамів одного виду корелює з гомологією первинної будови їх housekeeping генів та їх таксономією (Polishchuk et al, 2017; Polishchuk, 2018; Polishchuk, 2018a). Значущість роботи визначається і тим, що аналізуються розташування та будова crt-кластерів (на плазмідах та хромосомах) значної сукупності штамів стрептоміцетів – 100 штамів. Відбиралися штами, генетичні карти яких у базі даних NCBI представлено, як повністю встановлені (complete genome).

Мета представленого дослідження полягала у визначенні схем організації crt-кластерів у 100 штамів стрептоміцетів; встановленні основних тенденцій організації crt-кластерів та їх локалізації в геномі; виявленні кореляції особливостей організації crt-кластерів стрептоміцетів і їх таксономічним положенням.

Матеріали та методи. Нуклеотидні послідовності 100 штамів різних видів стрептоміцетів із бази даних GenBank (Nucleotide collection) на сервері NCBI (The National Center for Biotechnology Information Бетесда, Меріленд, США) були проаналізовані програмами BLAST (blastn і bl2seq) з цього ж сервера. Інформація про первинні структури ДНК та генетичні карти геномів стрептоміцетів (106 хромосомні та 2 плазмідні) 100 стрептоміцетів різних видів були проаналізовані під час цього дослідження. Рівні складання їхніх геномів – Complete genome. Як, референсні у дослідженнях використовували нуклеотидні послідовності *crt*-кластерів штамів *S. griseus* (X95596.1), *S. avermitilis* (AB070934.1), *S. globisporus* (KM349312.1), *S. argillaceus* (LT989886.1).

Результати та обговорення. Здатність стрептоміцетів синтезувати ряд каротиноїдів (такі, як лікопін, каротин та інші) давно відома (Waksman, 1940; Conn et al, 1941, Nefelova et al, 1976; Kosyritzkaaya et al, 1984). Було встановлено, що 15 % досліджених культур стрептоміцетів синтезують каротиноїди (Schumann et al, 2006). Стрептоміцети (дикі типи та мутанти), що продукують каротиноїди належать до видів *S. chrysomallus*, *S. mediolani*, *S. nehpitigulosus*, *S. coelicolor*, *S. citrius*, *S. avermitilis*, *S. setonii*, *S. canus*, *S. griseus*, *S. globisporus*, *S. rimosus* (Bianchi et al, 1970; Kato et al, 1989; Kato et al, 1995; Krugel et al, 1999; Schumann et al, 2006; Takano et al, 2006; Wang et al, 2009; Abdel-Haliem et al, 2013; Becerril et al, 2018). Але криптичні кластери *crt*-генів були виявлені в геномах ще багатьох інших стрептоміцетів (Schumann et al, 2006, Becerril et al, 2018).

Шлях біосинтезу стрептоміцетами каротиноїдів повністю встановлений (Krugel et al, 1999; Umeno et al, 2005; Takano et al, 2006) (рис. 1). Виявлено, що каротиногенез у них здійснюється продуктами (ферментами) п'яти генів *crtE*, *crtI*, *crtB*, *crtY* і *crtU*.

Традиційно вважається, що «класичні» *crt*-кластери стрептоміцетів об'єднують сім генів, які організовані в два оперони (*crtEIBV* і *crtUTY*) (Umeno et al, 2005; Takano et al, 2006). Однак, участі у каротеногенезі продукти генів *crtV* та *crtT* (метилтрансферази) не приймають (Umeno et al, 2005; Takano et al, 2006).

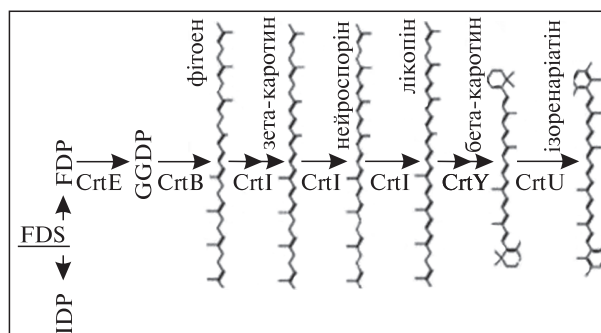


Рис. 1. Шлях біосинтезу каротиноїдів у *Streptomyces* (Kato et al, 1995; Schumann et et, 2006; Abdel-Haliem et al, 2013). IDP – ізопентаніл діфосфат, FDS – фарнетил дісульфат синтаза, FDP – фарнетил дісульфат, GGDP – геранілгераніл дісульфат, CrtE – геранілгераніл дісульфат синтаза, CrtI – фітоен дегідрогеназа, CrtB – фітоен синтаза, CrtY – лікопін циклаза, CrtU – бета-каротин дегідрогеназа

Встановлено, що оперони в *crt*-кластерах стрептоміцетів можуть мати конвергентну (*crtEIBV*><*crtUTY* – у штаму *S. coelicolor* A3(2)) чи дивергентну (<*crtEIBV crtUTY*> – у штаму *S. avermitilis* MA-4680) орієнтації (Umeno et al, 2005; Takano et al, 2006).

Функціонування *crt*-кластерів ряду штамів (*S. griseus* NBRC 13350, *S. coelicolor* A3(2), *S. albus* J1074, *S. collinus* Tu365 та *S. argillaceus* ATCC12956) було доведено за допомогою генно-інженерних технологій (Omura et al, 2001; Myronovskiy et al, 2013; Iftime et al, 2016; Becerril et al, 2018).

108 генетичних карт (106 хромосомні та 2 плазмідні з рівнем складання геному «Complete genome») стрептоміцетів різних видів бази даних GenBank на сервері NCBI були проаналізовані при проведенні представленого дослідження. Встановлено, що молекулярні розміри хромосомної ДНК досліджуваних стрептоміцетів становлять від 6287975 п.н. (*Streptomyces* sp. SCSIO 03032, CP021121.1) до 12700734 п.н. (*S. rapamycinicus* NRRL 5491, CP006567.1). Однак хромосоми більшості штамів (45,5 %) даної сукупності з 100 штамів мають молекулярні розміри 7,0–8,0 м.п.н.

У результаті нашого аналізу організації 108 хромосомних і плазмідних *crt*-кластерів стрептоміцетів було визначено ряд загальних схем їх будови (рис. 2).

EIBV><UTY	IBV>---UTY>	YTU>---<VBI---<E
<VBIE-YTU>EI	<VBIE---Y>-U>	<VBI-----YTU><E
BV>---<UTY	<VBI---Y>---U>	EIBV-><-UTY-----E>
IBV>---<UTY	EIBV>---<U---<Y	EIBV-><-UTY-----YU>
<VBI---YTU>	E>-----<UTY--IBV>	<U--<Y---EIBV>-----T>
<UY-EIBV>T>	E>-----<VBI--YTU>	

Рис. 2. Схеми організації *crt*-кластерів в геномах стрептоміцетів з сукупності досліджуваних штамів. Примітки: (-----) – нуклеотидні послідовності. Напрямок транскрипції оперонів, генів позначено як < та >. Позначення генів *crtE* – E, *crtI* – I, *crtB* – B, *crtV* – V, *crtU* – U, *crtT* – T, *crtY* – Y

Подібність первинної структури генів *crt*-кластерів в геномах стрептоміцетів визначали BLASTN-аналізом (megablast). Як референсні послідовності використовували послідовності кластерів ряду штамів стрептоміцетів у тому числі і *S. griseus* (X95596.1), *S. avermitilis* (AB070934), *S. globisporus* (KM349312.1), *S. argillaceus* (LT989886.1). На рисунку представлено частину результатів досліджень схожості нуклеотидних послідовностей генів *crt*-кластерів (рис. 3). На рисунку локалізація гомологічних первинних структур *crt*-кластерів зі ступенем ідентичності 73 % означено горизонтальними лініями (починаючи з 2). На рис. 3, а представлено результати вирівнювання первинних структур *crt*-кластерів з конвергентною орієнтацією оперонів з послідовністю *crt*-кластеру *S. griseus*; на рис. 3, б результати вирівнювання первинних структур *crt*-кластерів з дивергентною орієнтацією оперонів з послідовністю *crt*-кластеру *S. avermitilis*.

Первинні структури перших генів обох оперонів (*crtY* та *crtE*) в геномах стрептоміцетів у цілому (як в конвергентних, так і в дивергентних оперонах) демонструють меншу ступінь ідентичності між собою, ніж нуклеотидні послідовності інших (наприклад, *crtI*, *crtB*) (рис. 3).

Підсумувавши отриману інформацію про схеми будови кластерів *crt*-генів та їх розташування в хромосомах стрептоміцетів, було зроблено висновок щодо існування низки загальних принципів організації *crt*-кластерів стрептоміцетів та їх локалізації.

Аналізом геномів 100 штамів стрептоміцетів виявлено, що клітини 32 штамів стрептоміцетів містять позахромосомні ДНК (загалом 49 плазмід). В клітинах стрептоміцетів міститься

від 1 (як приклад, *S. cattleya* DSM 46488 = NRRL 8057 – pSCAT = pSCATT) до 4 плазмід (*Streptomyces sp.* WAC002880 – p1, p2, p3, p4). Штам *S. rochei* 7434AN4 містить 3 плазмід у тому числі і плазмиду pSLA2-L. Молекулярні розміри досліджуваних плазмід становлять pSLA2-L – 210,2 т.п.н., а плазмід pSCAT (pSCATT) – 1,8 м.п.н.

Раніше повідомлялося про синтенію в будові оперонів (*crtEIBV* і *crtUTY*), яка характерна для *crt*-кластерів, як з конвергентною, так і дивергентною орієнтацією оперонів (Lee et al, 2001; Schumann et al, 2006; Takano et al, 2006; Takano et al, 2016). Вказане явище характерне всім проаналізованим 108 *crt*-кластерам (як хромосомним, так і плазмідним) з сукупності досліджуваних штамів стрептоміцетів (рис. 2).

Нами встановлено, що фрагмент *crt*-кластерів, який складається з 3 генів (*crtV*, *crtB*, *crtI*), є найбільш стійкою конструкцією. Така комбінація генів присутня у всіх *crt*-кластерах стрептоміцетів досліджуваної сукупності штамів.

В більшості геномів стрептоміцетів міститься лише один *crt*-кластер (95 штамів). Однак, 2 або 3 *crt*-кластери представлені на генетичних картах хромосом 4 штамів стрептоміцетів, членів *S. griseus* клади (*S. griseus* NBRC 13350 (AP009493.1), *S. globisporus* C-1027 (CP013738.1), *S. globisporus* TFH56 (CP029361.1)) та штам *Streptomyces sp.* CCM_MD2014 (CP009754.1). На даний час повідомляється, що тільки геном *S. griseus* NBRC 13350 (AP009493.1) містить 3 «класичні» *crt*-кластери у конвергентній орієнтації (EIBV-><-UTY). BLASTN-аналізом первинних структур встановлено повну ідентичність кластерів *crt2* і *crt3* (Qc = 100 %, I = 100 %, M/G = 0/0), в той же час послідовності кластерів *crt2* і *crt3* мають меншу ступінь гомології послідовностям кластеру *crt1* (Qc = 97 %, I = 79,7 %, M/G = 1619/0). Хромосоми інших 3 штамів з *S. griseus* клади містять по 2 *crt*-кластери з оперонами, також розташованими у конвергентній орієнтації. Один з кластерів у кожному штамі має «класичну» організацію (EIBV-><-UTY), а у другому («додатковому») кластері делетований *crtT*-ген (EIBV><U<Y). Як приклад, послідовності 2 кластерів штаму *S. globisporus* C-1027 мають показники схожості їх первинних структур I = 73,4 %, Qc = 77 %, M/G = 1650/0. Водночас *crt*-кластери

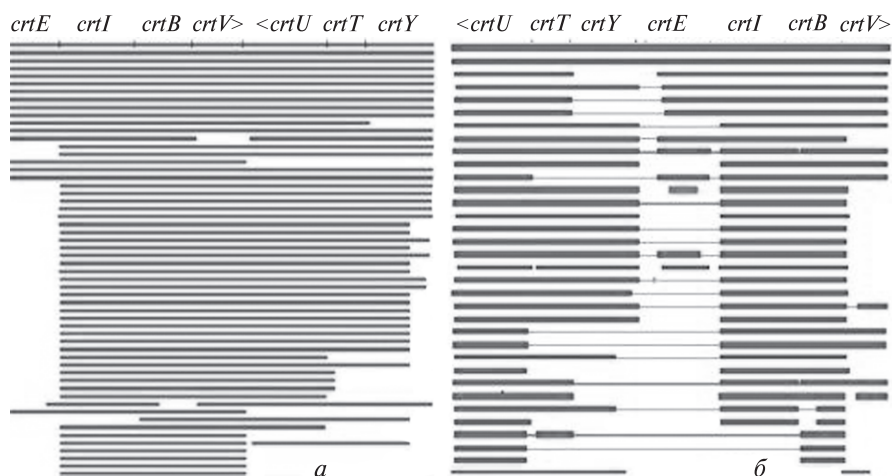


Рис. 3. Гомологія послідовностей *crt*-генів стрептоміцетів і послідовностей генів референсних *crt*-кластерів (BLASTN-аналіз). Верхня смуга з умовним розподіленням на гени *crt*-кластерів: *a* – *S. griseus* (X95596.1), *б* – *S. avermitilis* (AB070934.1). Горизонтальні смуги – ідентичні послідовності *crt*-кластерів інших стрептоміцетів. Напрямок транскрипції оперонів позначено як < та >

в геномі *Streptomyces sp.* CCM_MD2014 мають різну орієнтацію: перший (з повним набором генів) складається з конвергентних оперонів (EIBV-><-UTY), а другий – з 2 дивергентних фрагментів оперонів, що об'єднують тільки 5 *crt*-генів (<VBI-Y>-U>). У ряду стрептоміцетів присутні, на додаток до «головного» *crt*-кластера, окремі додаткові *crtV*, *crtI* (EIBV-><-UTY-----<YV> у *Streptomyces sp.* KPB2, CP034353) чи *crtE* (EIBV-><-UTY-----E> у *S. armeniacus* ATCC 15676, CP031320). Додаткові гени локалізовані на відстані від *crt*-кластера 6,77 та 5,98 м.п.н., відповідно.

Було встановлено, що в хромосомах більшості досліджених штамів стрептоміцетів (53 штамів) *crt*-кластери локалізуються в їх термінальних областях. Відповідно джерелам літератури, така синтенія характерна для локалізації в хромосомах мікроорганізмів не обов'язкових генів (inessential genes) та кластерів біосинтетичних генів, які кодують синтез вторинних метаболітів (Bentley et al, 2004; Young et al, 2006; Prozorov, 2007; Ravin et al, 2013). Однак виявлена локалізація *crt*-кластерів на генетичних картах хромосом 8 штамів в коровій зоні: *Streptomyces sp.* SCSIO 03032 (CP021121.1, 6287975 п.н.), *S. globosus* LZH-48 (CP030862.1, 6863360 п.н.), *S. xinghaiensis* S187 (CP023202.1, 7137891 п.н.), *S. lydicus* 103 (CP017157.1, 8201357 п.н.), *S. pristinaespiralis* HCCB 10218

(CP011340.1, 8532592 п.н.), *Streptomyces sp.* CNQ-509 (CP011492.1, 8039333 п.н.), *Streptomyces sp.* S10 (2016) (CP015098.1, 9083372 п.н.), *S. armeniacus* ATCC 15676 (CP031320.1, 8083249 п.н.). Цікаво, що *crt*-кластери кількох штамів з найменшими розмірами хромосом, локалізовані в їхніх корових областях: *Streptomyces sp.* SCSIO 03032 (2738366–3428544 п.н.) та *S. globosus* LZH-48 (3388640–3396936 п.н.). Але у штаму *Streptomyces sp.* S10 (2016), розмір хромосоми котрого 9,9 м.п.н, кластер також локалізований в області кору (5847066–5855312 п.н.).

Як відомо, *crt*-кластери стрептоміцетів складаються з 2 оперонів у конвергентній чи дивергентній орієнтаціях (Umeno et al, 2005; Takano et al, 2006). Наш аналіз організації 106 хромосомних *crt*-кластерів стрептоміцетів виявив, що більшість з них (71 *crt*-кластер) містили оперони у конвергентній орієнтації. Як конвергентна, так і дивергентна орієнтація оперонів притаманна і для плазмідних кластерів. Наприклад, *crt*-кластер плазміди (pSCAT – FQ859184.1) штаму *S. cattleya* DSM 46488 = NRRL 8057 об'єднує 2 конвергентні оперони (EIBV>-----<U-----<Y). Кластер *crt*-генів плазміди *S. rochei* (pSLA2-L – AB088224) складається з 2-х дивергентних оперонів (<-VBIE-----Y>--U->). Можливо припустити, що конвергентна орієнтація *crt*-оперонів у кластерах має певні переваги (наприклад у регуляції чи

транскрипції послідовностей). Слід зазначити, що *crt*-кластери, які організовані за «класичними» схемами з конвергентними оперонами, зустрічаються у більшості проаналізованих геномів стрептоміцетів. Відповідно до цієї «класичної» схеми, організовано 32 з 71 конвергентних *crt*-кластерів стрептоміцетів.

В геномах багатьох досліджених стрептоміцетів були виявлені *crt*-кластери, що мали певні відмінності будови в порівнянні з «класичними» схемами організації *crt*-кластерів (рис. 2). Важливо зазначити, що вставки послідовностей, що негомологічні первинним структурам генів *crt*-кластерів є мажорним типом виявлених відмінностей в організації кластерів. Інсерції між дивергентними оперонами в кластерах, як правило, набагато більші ніж між конвергентними. Навіть в «класичних» схемах (*S. avermitilis* MA-4680, (AB070934.1) між дивергентними оперонами є більше ніж 250 п.н., які розділяють перші гени (*crtE* та *crtY*) дивергентних оперонів *crt*-кластера. Вставками між *crt*-оперонами можуть бути від кількох сотень нуклеотидів (*S. avermitilis* MA-4680) до кількох генів (наприклад 4 гени у *S. spongilora* MJM4426, CP017316.1). Ген *crtV*, продукт якого не бере участі у синтезі каротиноїдів, можна також вважати найчастішою вставкою між оперонами. Інсерції містяться не тільки між оперонами, але і між генами одного оперону. Послідовності між *crt*-генами можуть мати молекулярний розмір до десятків нуклеотидів (*Streptomyces* sp. CNQ-509, CP011492), так і їх сотні тисяч (1,01 м.п.н. у *S. niveus* SCSIO 3406, CP018047 - <UTY-IBV>-----E>). В хромосомах ряду штамів виявлено транслокацію *crtT* та *crtE* генів: у штаму *Streptomyces* sp. 4F (CP013142.1) ген *crtE* локалізований на відстані 261,6 т.п.н. від гена *crtU* (E>-----<UTY-IBV>), *crtT*-ген штаму *S. hygrosopicus* TL01 (CP003720.1) розташований на відстані 7,7 м.п.н. (T>-----<VBI--YTU>). У ряду стрептоміцетних *crt*-кластерів встановлено делеції генів *crtT* чи *crtE*. Показано, що 8 хромосомних і всі плазмідні *crt*-кластери не містять *crtT*-генів. Такі делеції в *crt*-кластерах виявлені, наприклад у штамів видів *S. albidoflavus* J1074 і SM254, *S. globisporus* C-1027 і TFH56 («додаткові» кластери) (EIBV>--<U-->----Y) та *S. pluripotens* MUSC137 і MUSC135 (<VBIE--Y>-U>). У 12 кластерах *crtE* гени бу-

ли відсутні (IBV>---<UTY) наприклад, *crt*-кластери штамів *Streptomyces* sp. SAT1 (CP015849), *S. olivaceus* KLBMP5084, (CP016796). Плазміда pSCAT (EIBV>--<U-->Y) не містить *crtE*-гена, але ген *crtE* наявний у геномі штаму-господаря плазміди *S. cattleya* DSM 46488 (CP003219.1).

BLASTN-аналізом первинних структур *crt*-генів штамів з досліджуваної сукупності стрептоміцетів встановлено, що первинні структури *crtE* та *crtY*-генів в геномах досліджених стрептоміцетів (як в конвергентних, так і в дивергентних оперонах) менш подібні між собою, ніж нуклеотидні послідовності інших *crt*-генів (наприклад, *crtI*). В той час, як послідовності *crtI*, *crtB*, *crtV* чи *crtU*-генів більшості стрептоміцетів подібні послідовностям аналогічних генів референсних кластерів на 75 %, послідовності *crtE*-генів тільки кластерів споріднених штамів (наприклад, штамів з одних клад чи видів) мають значний ступінь (більше 75 %) подібності. Крім того, показано вірогідність існування ізоферментів CrtE. Наприклад, первинні структури *crtE*-генів штамів з *S. griseus* клади не мають гомології з послідовностями *crtE*-генів штамів *S. venezuelae* ATCC14585 (ген DEJ49_83915), *S. antibioticus* DSM 41481 (ген HCX60_01615), *Streptomyces* sp. S10(2016) (ген A4E84_26120), *S. scabiei* 87.22 (ген *crtE*) та *crtE*-генів ряду інших стрептоміцетів.

Виявлено ряд спонтанних та експериментальних мутантів стрептоміцетів, мутації в яких супроводжуються появою здатності синтезувати каротиноїди (Nefelova et al, 1976; Krugel et al, 1999, Nakano et al, 2006; Schumann et al, 2006; Matselyukh et al, 2013; Myronovskiy et al, 2013; Ravin et al, 2013). Так значна делеція термінальної області у штаму *S. albus* G1 призвела до активізації *crt*-кластера і появи суперпродукуючого варіанту *S. albus* J1074 (Myronovskiy et al, 2013). В наслідок UF-мутації, мутант Fc' штаму *S. rimosus* Fc отримав здатність синтезувати каротиноїди в значній кількості (Becerril et al, 2018). У нашій лабораторії раніше отримали мутант *S. globisporus* 1912-4Crt QWFA00000000.1), який накопичує лікопін (Matselyukh et al, 2013; Matselyukh, 2019). BLASTN-вирівнювання послідовностей хромосомних *crt*-кластерів варіантів *S. globisporus* 1912-2 (KM349312) та *S. globisporus* 1912-4Crt (contig QWFA01000466, 5108 п.н.) виявило делецію 117 п.н. у послі-

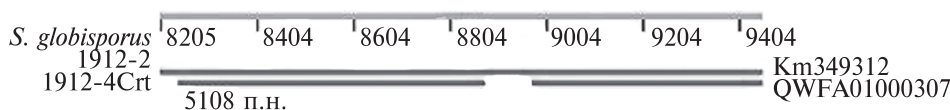


Рис. 4. Гомологія послідовностей генів *crtY* варіантів *S. globisporus* 1912 (1912-2 та 1912-4Crt). Верхня смуга – структура гена *crtY* з *crt*-кластера (KM349312.1) *S. globisporus* 1912-2

довності гена *crtY* останнього (рис. 4). Ген *crtY* кодує фермент лікопінциклазу, що здійснює перетворення лікопіна в каротин. Таким чином, делеція фрагмента послідовності гена *crtY*, призводить до значного накопичення лікопіну міцелієм мутанту 1912-4Crt (Matselyukh et al, 2013; Matselyukh, 2019). У результаті збільшення кількості копій *crt*-генів можуть бути отримані каротинсинтезуючі трансформанти. Наприклад, клонуванням додаткового *crtS*-гена *S. setonii* ISP5395 було індуковано синтез каротину трансформованими клітинами (Kato et al, 1995; Krugel et al, 1999; Schumann et al, 2006). Раніше нами було виявлено подібність в організації *crt*-кластерів штамів стрептоміцетів, що належать до клади *S. griseus*, видів *S. albus*, *S. hygrosopicus* (Polishchuk et al, 2017; Polishchuk, 2018; Polishchuk, 2018a). Було показано, що в межах окремого таксону нижчої ієрархії схожість схем організації кластерів штамів стрептоміцетів корелює з ідентичністю нуклеотидних послідовностей їх housekeeping генів (рекомбінази *recA*, гелікази *hprA*, гірази *gyrB*, полімерази *rpoH*, полімерази *rpoE*, *16S pPHK*). Базуючись на отриманих даних, нами було висловлено припущення про необхідність перегляду таксономічної приналежності ряду стрептоміцетів з клади *S. albus* (Polishchuk, 2018a). Представлене дослідження підтверджує на значно більшій сукупності стрептоміцетів раніше зроблені припущення для окремих груп штамів, що подібність структур *crt*-кластерів

корелює з їх таксономічною приналежністю. На прикладі організації хромосомних *crt*-кластерів різних штамів з 7 видів показано подібність організації *crt*-кластерів в геномах мікроорганізмів, що належать до різних штамів одного і того ж виду стрептоміцетів (таблиця).

Встановлено, що каротиногенез широко поширений у стрептоміцетів низки видів (Bianchi et al, 1970; Kato et al, 1989; Kato et al, 1995; Krugel et al, 1999; Schumann et al, 2006; Takano et al, 2006; Wang et al, 2009; Abdel-Haliem et al, 2013; Becerril et al, 2018). Але криптичні кластери *crt*-генів були виявлені в геномах ще багатьох інших стрептоміцетів (Schumann et al, 2006, Becerril et al, 2018). Однак, первинна структура носіїв спадковості визначена не для всіх каротинсинтезуючих стрептоміцетів. Організація та функціональна спроможність *crt*-кластерів ряду штамів: *S. griseus* NBRC 13350 – (YTU><VBIE), *S. coelicolor* A3(2) (YTU><VBIE), *S. avermitilis* MA4680 (<VBIE YTU>), *S. albus* J1074 (YU>---<VBIE, *S. collinus* Tu365 (<VBIE-YTU>), *S. argillaceus* ATCC12956 (<VBIE-YTU>) було доведено за допомогою генно-інженерних технологій (Omura et al, 2001; Myronovskiy et al, 2013; Iftime et al, 2016; Becerril et al, 2018). Як видно з представлених схем організації *crt*-кластерів, всі 6 *crt*-кластери містять всі гени, продукти яких необхідні для здійснення каротиногенезу. Кластери містять оперон <VBIE «класичної» організації. Одночасно можлива делеція *crtT*-гена, яка не призводить

Схеми організації хромосомних *crt*-кластерів штамів 7 видів стрептоміцетів

Вид стрептоміцета	Штами виду	Організація <i>crt</i> -кластеру
<i>S. ambofaciens</i>	ATCC23899, DSM40697	<VBI-----YTU>-<E),
<i>S. lydicus</i>	103, GS93, WYEC108	EIBV><UTV
<i>S. fradiae</i>	NKZ-259, DSM 40063	YTU><VBIE
<i>S. griseorubiginosus</i>	3E-1, BTU6	YTU>--<VBIE
<i>S. pluripotens</i>	MUSC135, MUSC1370	VBIE-=Y>--U>
<i>S. rimosus</i>	R6-500, ATCC10970, WT5260	YU>--<VBIE
<i>S. venezuelae</i>	ATCC14585, ATCC14583, ATCC14584	YU>---<VBIE

до порушення синтезу каротиноїдів. Важливо, що і вставка в 2 т.п.н. між оперонами не є критичною для експресії генів кластера. Але криптичні кластери *crt*-генів були виявлені в геномах ще багатьох інших стрептоміцетів (Schumann et al, 2006; Becerril et al, 2018). Відповідно до наших представлених досліджень, тільки у частини (67 %) з досліджуваної сукупності стрептоміцетів, в наслідок делеції чи транслокації *crtE*-гена, вірогідно може бути індукований синтез каротиноїдів. Можливо стверджувати, що зміни у організації кластерів, що детермінують синтез вторинних метаболітів у стрептоміцетів є проявом еволюції геномів. Представлена інформація, яка була отримана при вивченні кластерів *crt*-генів стрептоміцетів (схем організації та їх локалізації в хромосомах та плазмідах), демонструє можливість використовувати необов'язкові гени при дослідженні молекулярної еволюції, як окремих видів, так і загалом усього царства *Bacteria*.

Синтез каротиноїдів у стрептоміцетів, здебільшого відбувається індуковано. Активіація біосинтетичних процесів у багатьох штамів стрептоміцетів відбувається у відповідь на фактори стресу, такі як освітлення, підвищена температура, наявність окислювачів або солей у середовищі, зміна його рН (Kato et al, 1995; Schumann et al, 2006; Takano et al, 2006; Wang et al, 2009; Aldel-Haliem et al, 2013; Takano et al, 2016; Becerril et al, 2018). П'ять генів (*litQ litR litS litA litB*) *S. coelicolor* A3 (2) оточують його *crt*-кластер з 2 боків. Цей штам синтезує каротиноїди після індукції за допомогою світла з довжиною хвилі $\lambda = 450\text{--}550$ нм (Takano et al, 2006; Takano et al, 2016). Встановлено, що експресія *crt*-кластерів в геномі штаму *S. griseus* NBRC 13350 індукуються продуктами *crtS*-гена (SGR_6652) (Kato et al, 1995; Umeno et al, 2005). Локалізований *crtS*-ген на відстані 260 т.п.н. від найближчого *crt*-кластера.

Висновки. Визначено схеми організації 108 *crt*-кластерів стрептоміцетів (хромосомних та плазмідних). Сформульовано ряд основних тенденцій локалізації та організації *crt*-кластерів в геномах стрептоміцетів. На прикладі організації хромосомних *crt*-кластерів різних штамів з видів *S. ambofaciens*, *S. lydicus*, *S. fradiae*, *S. griseorubiginosus*, *S. pluripotens*, *S. rimosus*, *S. venezuelae* показано подібність організації *crt*-кластерів в геномах мікроорганізмів, що належать

до різних штамів одного і того ж виду стрептоміцетів. Доведена можливість застосовувати організацію *crt*-кластерів стрептоміцетів для їх класифікації у межах таксонів нижчого порядку.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить результатів будь-яких досліджень з використанням людей і тварин в якості об'єктів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність будь-якого конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження не отримувало гранту від фінансових установ державного, комерційного чи некомерційного секторів.

GENERAL TRENDS IN ORGANIZATION AND LOCALIZATION OF *CRT*-CLUSTERS IN STREPTOMYCETES GENOMES

L.V. Polishchuk, V.V. Lukyanchuk

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine,
03143, Kiev, st. Zabolotny, 154, Ukraine
E-mail: LVPolishchuk@ukr.net

The purpose of the work is to identify the existence of general principles in organization of *crt*-clusters of streptomycetes and their localization in genomes; to prove similarity in the organization of *crt*-clusters in phylogenetically related strains. The nucleotide sequences of *crt*-clusters of 100 strains of streptomycetes were analyzed using BLASTN programs. A number of schemes for organizing *crt*-clusters in streptomycetes were found. Several main trends in localization and organization of streptomycete *crt*-clusters were formulated. The similarity of *crt*-cluster organizations in genomes of microorganisms belonging to different strains of same species of streptomycetes was shown. The ability to apply the organization of *crp*-clusters of *Streptomyces* (as an application to the genetic and phenotypic characteristics that are traditionally used) in the classification of microorganisms within taxa of a lower order (clades, species, subspecies).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Abdel-Haliem ME, Sakr AA, Ali MF et al (2013) Characterization of *Streptomyces* isolates causing colour changes of mural paintings in ancient Egyptian tombs. *Microbiol Res.* doi: 10.1016/j.micres.2013.02.004
- Becerril A, Alvarez S, Braca AF et al (2018) Uncovering production of specialized metabolites by *Streptomyces argillaceus*: Activation of cryptic biosynthesis gene clusters using nutritional and genetic approaches. *PLoS One.* doi: 10.1371/journal.pone.0198145.
- Bentley SD, Parkhill J (2004) Comparative genomic structure of prokaryotes. *Annu Rev Genet.* <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.094318>

- Bianchi ML, Grein A, Julita P et al (1970) *Streptomyces mediolani* (Arcamone et al.) emend. Bianchi et al. and its production of carotenoids. Z Allg Mikrobiol. doi: 10.1002/jobm.3630100402.
- Conn, HJ, Conn JE (1941) Value of pigmentation in classifying Actinomycetes. J Bacteriol. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.094318>
- Iftime D, Kulik A, Hurtner T et al (2016) Identification and activation of novel biosynthetic gene clusters by genome mining in the kirromycin producer *Streptomyces collinus* Tu 365. J Industrial Microbiol and Biotechnol. doi: 10.1007/s10295-015-1685-7
- Kato F., Akazai M., Tanaka M. et al. (1989) Mechanism of photo chromogenicity in *Streptomyces canus* ISP5017. Actinomycetology. https://doi.org/10.3209/saj.3_35
- Kato F, Hino T, Nakaji A et al (1995) Carotenoid synthesis in *Streptomyces setonii* ISP5395 is induced by the gene *crtS*, whose product is similar to a sigma factor. Mol. Gen Genet. doi: 10.1007/bf00293207
- Kosyritzka WE, Andreyuk EI (1984) Production of lipids and carotinoids by yellow *Streptomyces*. Acta Biotechnologica. doi.org/10.1002/abio.370040111
- Krugel H, Krubasik P, Weber K et al (1999) Functional analysis of genes from *Streptomyces griseus* involved in the synthesis of isorenieratene, a carotenoid with aromatic end groups, revealed a novel type of carotenoid desaturase. Biochim Biophys Acta. doi: 10.1016/s1388-1981(99)00075-x
- Labeda DP, Goodfellow M, Brown R (2012) Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae. Antonie Van Leeuwenhoek. doi: 10.1007/s10482-011-9656-0
- Langeveld SA, van Mansfeld AD, Baas PD et al (1978) Nucleotide sequence of the origin of replication in bacteriophage phiX174 RF DNA. Nature. doi: 10.1038/271417a0.
- Lee HS, Ohnishi Y, Horinouchi S. (2001) A sigma B-like factor responsible for carotenoid biosynthesis in *Streptomyces griseus*. J Mol Microbiol Biotechnol 3(1):95–101
- Matselyukh BP, Matselyukh DYa, Golembiovskaya SL et al (2013) Isolation of *Streptomyces globisporus* and *Blakeslea trispora* mutants with increased carotenoid content. Mikrobiol. Z. http://nbuv.gov.ua/UJRN/MicroBiol_2013_75_6_3
- Matselyukh BP (2019) Identity of carotenoid biosynthetic genes of *Streptomyces* and their activation in *S. globisporus* 1912-4Crt. J Genet Genom 3(1):122–126
- Myronovskiy M, Tokovenko B, Brötz E et al (2013) Genome rearrangements of *Streptomyces albus* J1074 lead to the carotenoid gene cluster activation. Appl Microbiol Biotechnol. doi: 10.1007/s00253-013-5440-6
- Nefelova MV, Sverdlova AN, Feofilova EP et al (1976) Carotenoids synthesized by a culture of a mutant actinomycete strain. Mikrobiologiya. 45(2):306–309.
- Omura S, Ikeda H, Ishikawa J et al (2001) Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. Proc Natl Acad Sci USA. <https://doi.org/10.1073/pnas.211433198>
- Polishchuk LV (2018) Similarity and difference in *crt*-cluster organizations of strains from *Streptomyces hygroscopicus* clade. Slovak Interl Sci J 1(22):9–12.
- Polishchuk LV (2018a) Organization of *crt*-clusters of 8 of strains of *Streptomyces albus* clade. Sci method. 1(24):40–43
- Polishchuk LV, Lukyanchuk VV (2017) Organization of *crt*-clusters of strains from the *Streptomyces griseus* group. Paper presented at the 10th congress of UTGiS «Factors of experimental evolution of organisms», Instit Mol Biol Genet NASU, Uman, 2–6 october 2017 <https://doi.org/10.7124/FEE0.v20.790>
- Prozorov AA (2007) Regularities of the location of genes having different functions and of some other nucleotide sequences in the bacterial chromosome. Microbiology, doi: 10.1134/s0026261707040017
- Ravin NV, Shestakov SV (2013) The genomes of prokaryotes. Vavilov J Genet Breed 17(4):972–984.
- Schumann G, Nurnberger H, Sandmann G et al (2006) Activation and analysis of cryptic *crt*-genes for carotenoid biosynthesis from *Streptomyces griseus*. Mol Gen Genet doi: 10.1007/bf02173971
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. Intern J Syst Evol Microbiol. doi.org/10.1099/00207713-52-3-1043.
- Takano H, Asker D, Beppu T et al (2006) Genetic control for light-induced carotenoid production in non-phototrophic bacteria. J Ind Microbiol Biotechnol. doi: 10.1007/s10295-005-0005-z
- Takano H (2016) The regulatory mechanism underlying light-inducible production of carotenoids in nonphototrophic bacteria. Biosci Biotechnol Biochem. doi: 10.1080/09168451.2016.1156478
- Umeno D1, Tobias AV, Arnold FH (2005) Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by directed evolution. Microbiol Mol Biol Rev. doi: 10.1128/MMBR.69.1.51-78.2005
- Wang M, Yang H, Gao J-l et al (2009) Breeding of high-yield lycopene producing strains of *Streptomyces rimosus* and studies on its flask culture conditions. China Biotechnology. <http://manu60.magtech.com.cn/biotech/Y2009/V29/I12/64>
- Waksman SA (1940) On the Classification of Actinomycetes. J Bacteriol. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.39.5.549-558>
- Young JP, Crossman LC, Johnston AW (2006) The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. Genome Biol. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-4-r34>

Надійшла в редакцію 18.03.20
Після доопрацювання 26.10.20
Прийнята до друку 18.03.21