

ОРГАНИЗАЦИЯ CRT-КЛАСТЕРОВ ШТАММОВ ИЗ *STREPTOMYCES ALBUS* КЛАДЫ

Л.В. Полищук, В.В. Лукьянчук

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина
e-mail: LVPolishchuk@ukr.net

Цель данного исследования – определить сходство в организации crt-кластеров 8 штаммов, входящих в *S. albus* кладу. Показать возможность использования строения crt-кластеров для классификации стрептомицетов до таксонов низшей иерархии. **Методы.** Сравнительный анализ *in silico* первичных структур хромосомной ДНК ряда стрептомицетов из базы данных «Nucleotide collection» на сервере NCBI проводили с помощью программ *blastn* и *bl2seq* из пакета BLAST. **Результаты.** Установлено наличие сходств в строении crt-кластеров 8 штаммов (4 штаммов как признанных членов *S. albus* группы: J1074, DSM 41398, SM 254, BK3-25, так и 4 выбранных для исследований как вероятных ее членов: *S. sampsonii* KJ40, *Streptomyces* sp. GBA 94-10, *Streptomyces* sp. PVA 94-07, *Streptomyces* sp. FR-008). Показано, что все 8 crt-кластеров состоят из 2 конвергентных оперонов. Выявлено отсутствие в них crtT-генов. Во всех 8 кластерах обнаружены вставки из дополнительных генов, продукты которых не участвуют в синтезе каротиноидов. В кластерах 6 штаммов (из 8 изучаемых) они локализованы между оперонами, за исключением штаммов *S. albus* subsp. *albus* DSM 41398 и BK3-25, у которых дополнительные гены расположены между генами *crtY* и *crtU*. **Выводы.** Сделано предположение, что характерные особенности организации crt-кластеров стрептомицетов могут быть полезными в классификации микроорганизмов до таксонов низшей иерархии (клады, вида, подвида) в дополнение к уже используемым генетическим и фенотипическим характеристикам.

Ключевые слова: *Streptomyces*, анализ *in silico*, первичная структура, геном, кластер, ген, клада, гомология, перекрытие.

Каротиноиды – природные органические пигменты, которые синтезируются клетками как эукариот, так и прокариот. Такие организмы-продуценты окрашены в желтый, оранжевый или красный цвет. Как у фотосинтезирующих, так и у нефотосинтезирующих организмов главная функция каротиноидов – защита их от агрессивных условий окружающей среды (например, для нейтрализации вредных радикалов) [1].

Наличие каротиногенеза выявлено у 15 % исследованных культур стрептомицетов [2]. Синтезируют каротиноиды представители многочисленных видов стрептомицетов – *S. albus*, *S. coelicolor*, *S. griseus*, *S. setonii*, *S. mediolany*, *S. chrysomallus*, *S. chrestomyceticus*, *S. canarius*, *S. canus*, *S. avermitilis*, *S. parvullus* и ряда других [1, 2]. В клетках стрептомицетов синтезируется и накапливается ряд каротиноидов: бета-каротин, ликопин, изореноритин [1–3]. Установлено, что гены микроорганизмов, кодирующие ферменты, участвующие в каротиногенезе, образуют crt-кластеры [2–8].

Синтез каротиноидов у стрептомицетов, в основном, происходит индуцированно [1, 7-9]. Активация биосинтетических процессов у многих штаммов стрептомицетов осуществляется в ответ на стрессовые факторы, такие, как освещение светом с длиной волны $\lambda = 450-550$ нм, повышенная температура, наличие в среде окислителей или солей, изменение ее pH [1, 9, 10]. Однако у большинства стрептомицетов crt-кластеры находятся в криптическом состоянии [7, 10–14].

В отличие от множества стрептомицетов, синтезирующих каротиноиды после индукции, у штамма *S. albus* J1027 синтез каротиноидов происходит конститутивно [7].

Авторы, изолировавшие мутант (*S. albus* J1074) штамма *S. albus* G, высказывали предположение, что суперпродукция каротиноидов происходит вследствие амплификации crt-генов [4, 12]. В соответствии с данными литературы, клонирование дополнительной копии crt-кластера в *S. griseus* IFO13350 может привести к синтезу каротиноидов на визуально выявляемом уровне полученными трансформантами [4].

Для того, чтобы идентифицировать гены и механизмы, ответственные за дерепрессию синтеза каротиноидов (например, в *S. albus* J1074), специалисты должны знать как можно больше о наличии crt-кластеров в геномах родственных штаммов и об особенностях их организации.

Цель данного исследования – установить схемы организации crt-кластеров штаммов из *S. albus* группы, выявить сходства и различия в их строении, показать возможность использования организации crt-кластеров для классификации стрептомицетов до таксонов низшей иерархии.

Материалы и методы. Материалы. Первичные структуры 10 crt-кластеров стрептомицетов из Интернет базы данных «Nucleotide collection» на сервере NCBI (National Center of Biotechnological Information, Bethesda, MD, USA) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>] были использованы в данных исследованиях (табл. 1).

Методы. Сравнительный анализ *in silico* первичных структур ДНК проводили с помощью программ blastn и bl2seq из пакета BLAST на сервере NCBI [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]. Предложенные в программах BLAST основные параметры алгоритма поиска гомологий первичных структур ДНК были использованы без изменений. Анализом *in silico* (blastn) баз данных GenBank произвели отбор штаммов *Streptomyces*, родственных *S. albus* J1074. Выбор был основан на гомологии нуклеотидных последовательностей 16S рРНК-генов в геномах стрептомицетов первичной структуре 16S рРНК-гена (XNR_0741) штамма *S. albus* J1074. В анализе *in silico* первичных структур геномов стрептомицетов в качестве референсных использовали нуклеотидные последовательности 6 обязательных генов штамма *S. sampsonii* KJ40: *recA* (BEN82_RS24180, рекомбиназа RecA), *hrpA* (BEN82_RS29120, АТФ-зависимая геликаза HrpA), *gyrB* (BEN82_RS15080, субъединица В ДНК-изомеразы), *hrdB* (BEN82_RS24415, сигма фактор РНК-полимеразы), *groE* (BEN82_RS21720, сигма фактор RpoE РНК-полимеразы), *rnc* (BEN82_RS24025, 16S рРНК).

Исследуемые кластеры crt-генов штаммов стрептомицетов

Штаммы <i>Streptomyces</i>	Локус crt-кластера	Штаммы <i>Streptomyces</i>	Локус crt-кластера
<i>S. albus</i> J1074 (CP004370.1)*	6410041 п.н. - 6420092 п.н.	<i>S. albus</i> DSM 41398 (CP010519.1)	1529838 п.н. - 1537964 п.н.
<i>Streptomyces sp.</i> PVA 94-07 (CM002273.1)	6442939 п.н. – 6451129 п.н.	<i>Streptomyces sp.</i> FR-008 (CP009802.1)	6645852 п.н. – 6655171 п.н.
<i>S. albus</i> SM254 (CP014485.1)	6731461 п.н. - 6740031 п.н.	<i>S. sampsonii</i> KJ40 (NZ_CP016824.1)	540154 п.н. – 549472 п.н.
<i>S. albus</i> BK3-25 (CP016825.1)	1532223 п.н. - 1540349 п.н.	<i>S. coelicolor A 3(2)</i> (NC_003888.3)	174943 п.н.– 182038 п.н.
<i>Streptomyces sp.</i> GBA 94-10 (CM002271.1)	6434394 п.н. – 6442584 п.н.	<i>S. griseus</i> NBRC13350 (AP009493.1)	Кластер crt2: 65711 п.н. – 65425 п.н.

Примечание: * - идентификационный номер генома в GeneBank.

Результаты. Интернет база данных «Nucleotide collection» (NCBI) содержит информацию о первичной структуре хромосомных ДНК множества организмов (в том числе и тысяч штаммов стрептомицетов) разной степени сборки, включая последовательности как отдельных генов, так и целых геномов, а также аннотации их генетических карт. Например, представлены 14 сборок геномных ДНК 13 штаммов из *S. albus* клады, в том числе нуклеотидные последовательности полных геномов 4 штаммов вида *S. albus* (J1074, SM 254, DSM 41398, BK3-25). Однако самая большая группа (364 культуры) – это группа стрептомицетов с неопределенной видовой принадлежностью (Group of uncharacterized isolates), из них для 13 представлены полные нуклеотидные последовательности геномов.

Схемы организации crt-кластеров штаммов из S. albus клады. Проведенный анализ генетических карт 4 штаммов признанных членов *S. albus* клады: J1074 (CP004370.1), DSM 41398 (CP010519.1), SM254 (CP014485.1), BK3-25 (CP016825.1) выявил 2 схемы организации их crt-кластеров (рис. 1). Установлено, что их кластеры имеют общность в строении: все они состоят из 6 crt-генов, организованных в 2 конвергентных оперона, в кластерах отсутствуют crtT-гены. Активный каротиногенез у штамма *S. albus* J1027 служит подтверждением того, что продукты crtT-генов (метилтрансферазы) не участвуют в синтезе данных метаболитов [1, 6, 12].

Также в crt-кластерах всех 4 штаммов выявлено несколько дополнительных генов (от 1 до 4), продукты, кодируемые ими, не участвуют в каротиногенезе (табл. 2). Отличие в организации кластеров состоит в месте локализации этих дополнительных генов (рис. 1).

Необходимо отметить, что в соответствии с информацией базы данных «Taxonomy» сервера NCBI штаммы *S. albus* DSM 41398 и BK3-25 принадлежат к подвиду *Streptomyces albus* subsp. *albus* [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/].

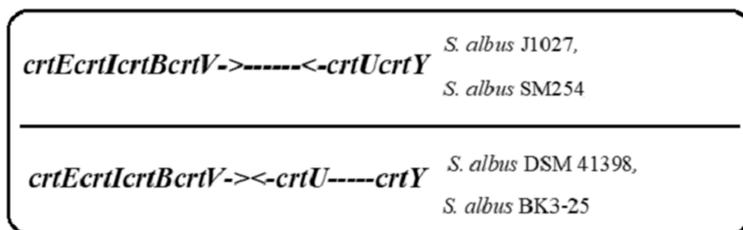


Рис. 1. Схемы организации *crt*-кластеров штаммов стрептомицетов признанных членов из *S. albus* клады

Таблица 2

Гены *crt*-кластеров стрептомицетов из *S. albus* клады

Штаммы <i>Streptomyces</i>	<i>crt</i> -гены стрептомицетов
<i>S. albus</i> J1074	XNR_5683, XNR_5684, XNR_5685, XNR_5686, (XNR_5687, XNR_5688, XNR_5689, XNR_5690)*, XNR_5691, XNR_5892.
<i>S. albus</i> DSM 41398	SLNWX_1099, SLNWX_1100, SLNWX_1101, SLNWX_1102, SLNWX_1103, (SLNWX_1104),SLNWX_1106
<i>S. albus</i> SM254	Salbus254_6049, Salbus254_6050, Salbus254_6051, Salbus254_6052, (Salbus254_6053, Salbus254_6054), Salbus254_6055, Salbus254_6056.
<i>S. albus</i> BK3-25	SLNHY_1099, SLNHY_1100, SLNHY_1101, LNHY_1102, SLNHY_1103, (SLNHY_1104), SLNHY_1106

Примечание: * – дополнительные гены в *crt*-кластерах.

Отбор стрептомицетов как возможных членов S. albus группы. В ходе представленного исследования проводили анализ структур *crt*-кластеров как штаммов, признанных членов *S. albus* клады, так и ряда других. Отбор последних проводили с помощью анализа базы данных NCBI «Genome (chromosome)». Последовательность 16S рНК-гена штамма *S. albus* J1027 была использована как референсная для отбора из базы данных штаммов *Streptomyces*, наиболее близких к нему.

В соответствии с данными литературы пороговое значение идентичности первичных структур 16S рНК-генов, используемое для выявления родственных штаммов, не ниже 98,7 % при показателе средней идентичности структур (ANI) не менее 94% [15]. В соответствии с принятыми стандартами штаммы стрептомицетов, имеющие такую степень идентичности нуклеотидных последовательностей их 16S рНК-генов, составляют одну кладу [16].

По результатам *in silico* анализа было отобрано четыре штамма (*S. sampsonii* KJ40, *Streptomyces sp.* GBA 94-10, *Streptomyces sp.* PVA 94-07, *Streptomyces sp.* FR-008), у которых первичная структура их 16S рНК-генов имела необходимую степень идентичности референсному гену *S. albus* J1074 (XNR_0741). У генов, кодирующих 16S рНК штаммов *Streptomyces sp.* GBA 94-10 (B591_r04794) и *Streptomyces sp.* PVA 94-07 (B590_r04894), показатель идентичности структуре референсного гена

равен 99,6% с максимальным перекрытием (100%). Последовательности (показатель перекрытия – 100%) генов штаммов *Streptomyces sp.* FR-008 (SFR_Sf16SE) и *S. sampsonii* KJ40 (*rrnA*) были идентичны на 99,9% референсному гену *S. albus* J1074. Первичная структура 16S рРНК-гена *S. griseus* NBRC13350 (*rrnA1*) имеет степень гомологии со структурой референсного гена *S. albus* J1074, равную 95,8%.

Изучение генетических карт штаммов *S. sampsonii* KJ40, *Streptomyces sp.* GBA 94-10, *Streptomyces sp.* PVA 94-07, *Streptomyces sp.* FR-008, *S. albus* J1074 и *S. albus* SM254 выявило в их геномах по 7 кластеров рРНК-генов, в то время как в геномах штаммов *S. albus* BK3-25, *S. albus* DSM 41398, *S. griseus* NBRC13350 и *S. coelicolor* A3(2) – по 6 рРНК-кластеров.

Схемы организации crt-кластеров 4 стрептомицетов, вероятных членов S. albus клады. Результаты изучения организации *crt*-кластеров 4 штаммов стрептомицетов, отобранных как вероятные члены *S. albus* группы, представлены в таблице 3.

Наше исследование строения *crt*-кластеров штаммов стрептомицетов, отобранных нами как вероятных членов *S. albus* клады, показало, что все они организованы по схеме кластера, характерной для штамма *S. albus* J1027 (рис. 1). Организация их *crt*-кластеров имеет те же особенности строения, что и кластер в геноме штамма *S. albus* J1027: кластеры состоят из 2 конвергентных оперонов, образованных 6 генами; в них отсутствуют *crt*Г-гены; *crt*-кластеры всех 4 штаммов содержат, как выявлено, несколько дополнительных генов (табл. 3).

Таблица 3

Гены *crt*-кластеров стрептомицетов вероятных членов *S. albus* группы

Штаммы <i>Streptomyces</i>	Гены в <i>crt</i> -кластерах стрептомицетов
<i>Streptomyces sp.</i> GBA 94-10	B591_28444, B591_28449, B591_28454, B591_28459, (B591_28464, B591_28469)*, B591_28474, B591_28479.
<i>Streptomyces sp.</i> PVA 94-07	B590_28294, B590_28299, B590_28304, B590_28309, (B590_28314, B590_28319), B590_28324, B590_28329.
<i>Streptomyces sp.</i> FR-008	SFR_6593, SFR_6594, SFR_6595, SFR_6596, (SFR_6597, SFR_6598, SFR_6599), SFR_6601, SFR_6600.
<i>S. sampsonii</i> KJ40	BEN82_RS01795, BEN82_RS01790, BEN82_RS01785, BEN82_RS01780, (BEN82_RS01775, BEN82_RS30435), BEN82_RS01765, BEN82_RS01760.

Примечание: * – дополнительные гены в *crt*-кластерах.

Гомология первичной структуры crt-генов штаммов из S. albus группы. Сравнительный анализ *in silico* первичной структуры 6 *crt*-генов 8 изучаемых кластеров позволил определить значительную идентичность последовательностей у 4 штаммов вероятных членов *S. albus* группы (более 95%) последовательностям *S. albus* J1027 и *S. albus* SM254 (табл. 4). В качестве фоновых использовали структуры *crt*-генов штаммов, принадлежащих к другим таксономическим группам: *S. griseus* NBRC 13350 (*S. griseus* клады) и *S. coelicolor* A3(2) (*S. albidoflavus* клады).

У 5 стрептомицетов (*S. albus* SM254, *S. sampsonii* KJ40, *Streptomyces* sp. GBA 94-10, *Streptomyces* sp. PVA 94-07, *Streptomyces* sp. FR-008) была выявлена значительная гомология первичных структур отдельных crt-генов и аналогичных референсных генов *S. albus* J1074 (табл. 4). Например, у них установлена полная идентичность структур crtI-генов (100%) с перекрытием гомологичных последовательностей более 99,1%. В то же время crt-гены штаммов *S. albus* DSM 41398 и BK3-25 имели показатели идентичности их первичных структур и аналогичных генов *S. albus* J1074 на уровне показателей гомологии ДНК штамма *S. griseus* NBRC 13350, принадлежащего к другой кладе. Как пример: идентичность первичных структур их crtI-генов – 74,7% (DSM 41398), 74,6% (BK3-25) и 77,3% (*S. griseus* NBRC 13350) последовательности аналогичному референсному гену *S. albus* J1074.

Дополнительные гены в crt-кластерах стрептомицетов. В crt-кластерах всех 8 штаммов (4 признанных членов *S. albus* клады и 4 ее вероятных членов) присутствуют дополнительные гены, не входящие в классические наборы crt-генов (табл. 2 и 3).

В crt-кластерах было выявлено наличие от 1 до 4 дополнительных генов. Например, crt-кластер *S. albus* J1074 включал 4 дополнительных гена (2579 п.н.), аналогичный кластер штамма *Streptomyces* sp. FR-008 содержал 3 дополнительных гена (1947 п.н.), а у штамма *S. sampsonii* KJ40 в crt-кластере присутствуют 2 таких гена (1748 п.н.). Был выявлен только один дополнительный ген (590 пар оснований) между генами crtY и crtU в кластерах *S. albus* DSM 42398 и *S. albus* BK3-25. Все вышеупомянутые гены кодировали или белки с неустановленными функциями, или ферменты, не участвующие в каротиногенезе (например, деацетилазу).

Анализ *in silico* нуклеотидных последовательностей дополнительных ДНК показал идентичность (99% – 100%) их структур у пар штаммов *S. albus* BK3-25 и *S. albus* DSM 41398; *S. albus* SM254 и *S. albus* J1074; *Streptomyces* sp. GBA 94-10 и *Streptomyces* sp. PVA 94-07; *Streptomyces* sp. FR-008 и *S. sampsonii* KJ40. Например, у штамма *S. albus* SM254 выявлены нуклеотидные последовательности (гены Salbus254_6053 и Salbus254_6054), гомологичные структуре 2 дополнительных генов (из 4 имеющихся) crt-кластера *S. albus* J1074 XNR_5687 и XNR_5690. Аналогичные гены Salbus254_6053 и XNR_5687 кодируют транспортные протеины, а гены Salbus254_6054 и XNR_5690 – регулятор транскрипции.

Однако последовательности генов BEN82_RS30435 и SFR_6598 в crt-кластерах, соответственно штаммов *Streptomyces* sp. FR-008 и *S. sampsonii* KJ40 оказались гомологичными фрагментам последовательностей (в 256 п.н.) crt-кластеров *S. albus* SM254 и *S. albus* J1074 с показателями идентичности в 97% и гомологичными на 90% структуре фрагментов в 128 п.н. в crt-кластерах *Streptomyces* sp. GBA 94-10 и *Streptomyces* sp. PVA 94-07.

Гомология первичных структур 6 housekeeping генов S. sampsonii KJ40, S. coelicolor A3(2) и S. albus J1027. В соответствии с информацией, представленной на сервере NCBI (база данных “Taxonomy”) штамм *S. sampsonii* KJ40 принадлежит к *S. albidoflavus* кладе (как и штамм *S. coelicolor* A3(2)). Нами был проведен сравнительный *in silico* анализ (bl2seg: megablast) первичной структуры 6 жизненно важных генов

(housekeeping genes) штаммов *S. sampsonii* KJ40 с нуклеотидными последовательностями соответствующих генов *S. coelicolor* A3(2) и *S. albus* J1027. Проводили попарное выравнивание нуклеотидных последовательностей мультилокуса из 6 генов *hscA*, *hrpA*, *gyrB*, *hrdB*, *groE* и *rrnC*.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей таких генов штаммов *S. coelicolor* A3(2), *S. albus* J1027 и *S. sampsonii* KJ40 показал бóльшую гомологию первичной структуры этих генов *S. sampsonii* KJ40 со структурой генов *S. albus* J1027, чем с первичной структурой генов штамма *S. coelicolor* A3(2) (табл. 5). Так, нуклеотидная последовательность *hrpA* (BEN82_RS29120) штамма *S. sampsonii* KJ40 гомологична на 79,5% аналогичному гену (SCO5920) *S. coelicolor* A3(2) и на 98,8% гену XNR_0050 *S. albus* J1027. Обнаружено 212 нуклеотидных остатков в последовательности *hrpA* гена *S. coelicolor* A3(2), негомологичных первичной структуре соответствующего гена *S. sampsonii* KJ40, в то время как в структуре гена *S. albus* J1027 выявлено только 17 таких остатков.

Показатели идентичности первичных структур 16S рРНК гена *S. sampsonii* KJ40 и структурам соответствующих генов 16S рРНК штаммов *S. coelicolor* A3(2) и *S. albus* J1027 – 97,7 % и 99,9% соответственно.

Таблица 5

**Показатели гомологии первичных структур ряда генов
2 штаммов стрептомицетов и референсных генов *S. sampsonii* KJ40**

Референсные гены <i>S. sampsonii</i> KJ40	Показатели идентичности последовательностей 6 обязательных генов <i>Streptomyces</i>	
	<i>S. albus</i> J1027	<i>S. coelicolor</i> A3(2)
	<i>hscA</i> (L=1125 п.н.) BEN82_RS24180	XNR_1090 (L=1125 п.н.) I=99,8%; Qc=100%; Ev=0,0; M/G=2/0
<i>hrpA</i> (L=1437 п.н.) BEN82_RS29120	XNR_0050 (L=1437 п.н.) I=98,8%; Qc=100%; Ev=0,0; M/G=17/0	SCO5920 (L=1497 п.н.) I=79,5%; Qc=78,7%; Ev=0,0; M/G=212/22
<i>gyrB</i> (L=2106 п.н.) BEN82_RS15080	XNR_3019 (L=2106 п.н.) I=99,6%; Qc=100%; Ev=0,0; M/G=8/0	SCO3874 (L=2160 п.н.) I=89,6%; Qc=96,8%; Ev=0,0; M/G=212/0
<i>hrdB</i> (L=1533 п.н.) BEN82_RS24415	XNR_1043 (L=1533 п.н.) I=99,9%; Qc=100%; Ev=0,0; M/G=1/0	SCO5820 (L=1536 п.н.) I=89,2%; Qc=100%; Ev=0,0; M/G=119/26
<i>groE</i> (L=846 п.н.) BEN82_RS21720	XNR_1584 (L=846 п.н.) I=99,8%; Qc=100%; Ev=0,0; M/G=2/0	SCO5216 (L=684 п.н.) I=91,4%; Qc=65,0%; Ev=0,0; M/G=48/0
<i>rrnC</i> (L=1515 п.н.) BEN82_RS24025	XNR_1121 (L=1515 п.н.) I=99,9%; Qc=100%; Ev=0,0; M/G=1/0	<i>rrnB</i> (L=1528 п.н.) I=97,7%; Qc=99,6%; Ev=0,0; M/G=28/12

Примечания: L – молекулярный размер гена, I – идентичность, M (Mismatches) – количество неидентичных оснований, G (Gaps) – количество разрывов, Q.c. (Query cover) – перекрытие гомологичных последовательностей, Ev (E-value) – достоверность данного выравнивания.

Обсуждение. Как и у преимущественного большинства стрептомицетов, в геномах изучаемых 8 штаммов (признанных и вероятных членов *S. albus* клады: *S. albus* J1027, *S. albus* SM254, *S. albus* DSM 41398, *S. albus* BK3-25, *S. sampsonii* KJ40, *Streptomyces sp.* GBA 94-10, *Streptomyces sp.* PVA 94-07 и *Streptomyces sp.* FR-008) содержится по 1 *crt*-кластеру.

У всех 8 вышеуказанных штаммов соблюдается синтения как в локализации *crt*-кластеров в терминальных отделах хромосом, так и порядок 6 *crt*-генов в кластерах.

Анализом полученных результатов проведенных исследований генетических карт 8 штаммов стрептомицетов из *S. albus* клады выявлено 2 схемы организации их *crt*-кластеров (рис. 2).

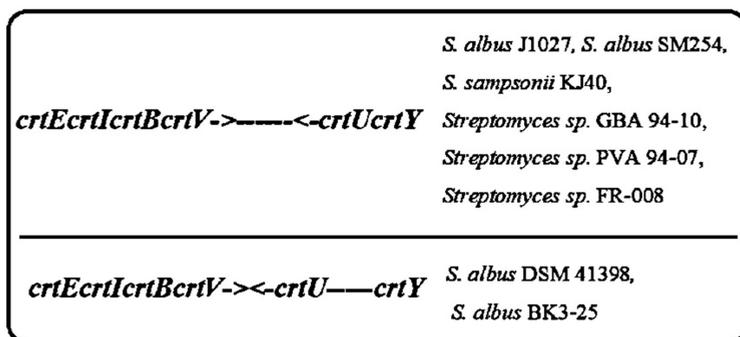


Рис. 2. Организация *crt*-кластеров штаммов *S. albus* группы

Гены *crt*-кластеров штаммов *S. albus* J1027, *S. albus* SM254, *S. sampsonii* KJ40, *Streptomyces sp.* GBA 94-10, *Streptomyces sp.* PVA 94-07 и *Streptomyces sp.* FR-008 не только организованы в оперонах по одной схеме, но и имеют значительную степень гомологии (идентичность – более 95%, перекрытие – 100%) их нуклеотидных последовательностей и первичных структур соответствующих генов *S. albus* J1074 (рис.2, табл. 4). В то время как нуклеотидные последовательности *crt*-генов штаммов *S. albus* DSM 41398 и BK3-25 имели показатели идентичности первичных структур их *crt*-генов и соответствующих генов *S. albus* J1074 на уровне показателей гомологии генов штамма *S. griseus* NBRC 13350, принадлежащего к другой кладе, например, идентичность первичных структур *crtI*-генов – 74,7% (DSM 41398), 74,6% (BK3-25) и 77,3% (*S. griseus* NBRC 13350). Эти 2 штамма входят в подвид *S. albus* *subsp. albus*.

Таким образом, показано, что знание об организации *crt*-кластеров штаммов может быть полезным при классификации в пределах клады.

Штамм *S. sampsonii* KJ40 – это один из отобранных нами стрептомицетов как вероятный член *S. albus* клады. Отбор произведен на основании идентичности (99,9%) первичной структуры его 16S рПНК-гена (BEN82_RS24025) последовательности референсного гена (XNR_1121) *S. albus* J1027. Этот штамм в соответствии с базой данных “Taxonomy” принадлежит к *S. albidoflavus* кладе (как и штамм *S. coelicolor* A3(2)).

Таблица 4

Показатели гомологии первичных структур *сrt*-генов 9 стрептомицетов и референсных генов

Показатели гомологии нуклеотидных последовательностей <i>сrt</i> -генов стрептомицетов								
<i>S. griseus</i> NBRC13350	<i>S. albus</i> SM254	<i>S. albus</i> BK3-25	<i>S. albus</i> DSM 41398	<i>S. sp.</i> FR-008	<i>S. sp.</i> GBA 94-10	<i>S. sp.</i> PVA 94-04	<i>S. sampsonii</i> KJ40	<i>S. coelicolor</i> A3(2)
<i>сrtE</i>-гены								
I=69,7%, Qc=53,0%, Ev=2e-74, M/G=164/18 L=1278 п.н.	I=99,3%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=9/0 L=1239 п.н.	I=69,4%, Qc=90,0%, Ev=2e-61, M/G=153/10 L=1137 п.н.	I=69,3%, Qc=89,0%, Ev=2e-61, M/G=155/10 L=1137 п.н.	I=99,0%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=13/0, L=1239 п.н.	I=96,0%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=43/1, L=1233 п.н.	I=96,0%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=43/1, L=1233 п.н.	I=98,8%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=15/0, L=1239 п.н.	I=70,8%, Qc=57,0%, Ev=8e-70, M/G=151/11 L=1179 п.н.
<i>сrtI</i>-гены								
I=77,3%, Qc=95,0%, Ev=0,0 M/G=313/15 L=1524 п.н.	I=99,3%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=11/0 L=1542 п.н.	I=74,6%, Qc=99,0%, Ev=0,0 M/G=343/16 L=1569 п.н.	I=74,7%, Qc=99,0%, Ev=0,0 M/G=345/16 L=1569 п.н.	I=99,2%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=12/0 L=1542 п.н.	I=99,4%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=55/0 L=1542 п.н.	I=99,4%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=55/0 L=1542 п.н.	I=99,1%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=14/0 L=1541 п.н.	I=75,1%, Qc=95,0%, Ev=0,0 M/G=336/18 L=1572 п.н.
<i>сrtB</i>-гены								
I=74,4%, Qc=92,0%, Ev=4e-159, M/G=206/13 L=1029 п.н.	I=100%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=0/0 L=963 п.н.	I=76,6%, Qc=95,0%, Ev=0,0 M/G=204/12 L=996 п.н.	I=76,7%, Qc=95,0%, Ev=0,0 M/G=205/12 L=996 п.н.	I=99,5%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=5/0 L=1963 п.н.	I=97,2%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=27/0 L=963 п.н.	I=97,2%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=27/0 L=963 п.н.	I=99,7%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=3/0 L=962 п.н.	I=74,8%, Qc=91,0%, Ev=8e-164, M/G=211/8, L=996 п.н.
<i>сrtV</i>-гены								
I=73,9%, Qc=93,0%, Ev=2e-162, M/G=228/10 L=1017 п.н.	I=99,0%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=10/0 L=999 п.н.	I=74,0%, Qc=99,0%, Ev=2e-162, M/G=218/13 L=1008 п.н.	I=74,1%, Qc=99,0%, Ev=2e-160, M/G=218/13 L=1008 п.н.	I=99,0%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=10/0 L=999 п.н.	I=95,2%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=48/0 L=999 п.н.	I=95,2%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=48/0 L=999 п.н.	I=98,4%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=16/0 L=998 п.н.	I=73,3%, Qc=94,0%, Ev=9e-151, M/G=226/14 L=1011 п.н.

<i>S. griseus</i> NBRC13350	<i>S. albus</i> SM254	<i>S. albus</i> BK3-25	<i>S. albus</i> DSM 41398	<i>S. sp.</i> FR-008	<i>S. sp.</i> GBA 94-10	<i>S. sp.</i> PVA 94-04	<i>S. sampsonii</i> K140	<i>S. coelicolor</i> A3(2)
сrTY-гены								
I=73,3%, Qc=97,0% Ev=0,0 M/G=387/10 L=1248 п.н.	I=99,0%, Qc=100% Ev=0,0 M/G=15/0 L=1560 п.н.	I=74,6%, Qc=98,0% Ev=0,0 M/G=343/18 L=1554 п.н.	I=74,6%, Qc=98,0% Ev=0,0 M/G=345/18 L=1554 п.н.	I=98,9%, Qc=100% Ev=0,0 M/G=17/0 L=1560 п.н.	I=96,6%, Qc=100% Ev=0,0 M/G=53/0 L=1560 п.н.	I=96,6%, Qc=100% Ev=0,0 M/G=53/0 L=1560 п.н.	I=98,7%, Qc=100% Ev=0,0 M/G=21/0 L=1559 п.н.	I=72,9%, Qc=97,0% Ev=0,0 M/G=362/24, L=1569 п.н.
сrTI-гены								
L=617 п.н.	-	-	-	-	-	-	-	L=741 п.н.
сrTU-гены								
I=70,1%, Qc=95,0% Ev=1e-128, M/G=290/35 L=1566 п.н.	I=98,6%, Qc=100% Ev=0,0 M/G=17/0 L=1209 п.н.	I=72,3%, Qc=99,0% Ev=3e-110, M/G=189/7 L=1224 п.н.	I=72,5%, Qc=99,0% Ev=3e-110, M/G=190/7 L=1224 п.н.	I=99,0%, Qc=100% Ev=0,0 M/G=12/0 L=1209 п.н.	I=95,5%, Qc=100% Ev=0,0 M/G=55/0 L=1209 п.н.	I=95,5%, Qc=100% Ev=0,0 M/G=55/0 L=1209 п.н.	I=98,2%, Qc=100% Ev=0,0 M/G=22/0 L=1208 п.н.	I=68,5%, Qc=95%, Ev=5e-104, M/G=303/32, L=1218 п.н.

Примечания: L – молекулярный размер гена, I – идентичность, M (Mismatches) – количество неидентичных оснований, G (Gaps) – количество разрывов, Q.c. (Query cover) – перекрытие гомологичных последовательностей, Ev (E-value) – достоверность данного выравнивания.

Однако нуклеотидная последовательность 16S рРНК-гена (*rrnC*) штамма *S. sampsonii* KJ40 гомологична на 97,7% аналогичному гену *S. coelicolor* A3(2). Кроме того, *crt*-кластер штамма *S. coelicolor* A3(2) состоит из 7 генов (включая и *crtT*-ген), организованных в 2 конвергентных оперона.

Выявленная в результате *in silico* анализа значительно бóльшая идентичность нуклеотидных последовательностей 6 housekeeping генов штаммов *S. sampsonii* KJ40 и *S. albus* J1027 (более 98,8%), чем первичных структур этих генов штаммов *S. sampsonii* KJ40 и *S. coelicolor* A3(2) (79,5%), подтвердила наш вывод о возможной принадлежности штамма к *S. albus* группе (табл. 5).

Можно сделать предположение, что штамм *S. sampsonii* KJ40 может быть отнесен в *S. albus* кладу. Этот вывод основан на выявленной схожести схем организации их *crt*-кластеров; на значительной гомологии первичных структур отдельных как *crt*-генов (более 98,2%), так и housekeeping генов штаммов *S. sampsonii* KJ40 и *S. albus* J1027 (более 98,8%) (рис. 2 и табл. 4, 5).

Таким образом, выявлено 2 схемы организации *crt*-кластеров у 8 стрептомицетов из *S. albus* клады; установлен ряд сходств и отличий в организации *crt*-кластеров штаммов из *S. albus* клады как признанных членов, так и отобранных вероятных членов этой клады.

Показана возможность задействовать организацию кластеров, кодирующих синтез вторичных метаболитов (на примере *crt*-кластеров), в дополнение к уже используемым генетическим и фенотипическим характеристикам в классификации стрептомицетов до таксонов низшей иерархии (клады, вида, подвида).

ОРГАНІЗАЦІЯ CRT-КЛАСТЕРІВ ШТАМІВ ІЗ *STREPTOMYCES ALBUS* КЛАДИ

Л.В. Поліщук, В.В. Лук'яничук

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного 154, Київ, 03143, Україна

Резюме

Мета даного дослідження - виявити подібність в організації *crt*-кластерів 8 штамів, що відносяться до *S. albus* клади, показати можливість використання організації *crt*-кластерів для класифікації стрептомицетів до таксонів нижчої ієрархії. **Методи.** Порівняльний аналіз *in silico* первинних структур геномів з бази даних «Nucleotide collection» на сервері NCBI проводили за допомогою програм blastn і bl2seq із пакету BLAST. **Результати.** Встановлено ряд подібностей в будові *crt*-кластерів, відібраних для досліджень 8 штамів (4 штамів як визнаних членів з *S. albus* групи: J1074, DSM 41398, SM 254, BK3-25, так і 4 вірогідних її членів: *S. sampsonii* KJ40, *Streptomyces* sp. GBA 94-10, *Streptomyces* sp. ПВС 94-07, *Streptomyces* sp. FR-008). Встановлено, що всі 8 *crt*-кластерів складаються з 2 конвергентних оперонів. Виявлено відсутність в них *crtT*-генів. У всіх 8 *crt*-кластерах присутні вставки з додаткових генів, продукти яких не беруть участі у синтезі каротиноїдів. В кластерах 6 штамів вони локалізовані між оперонами, винятком є штами *S. albus* DSM 41398 і BK3-25, у яких додаткові гени знаходяться між генами *crtY* і *crtU*. **Висновки.** Зробле-

но припущення, що характерні особливості організації crt-кластерів стрептоміцетів можуть бути корисними в класифікації мікроорганізмів до таксонів нижчої ієрархії (клади, виду, підвиду) додатково до генетичних та фенотипових характеристик, що вже використовуються.

Ключові слова: *Streptomyces*, аналіз *in silico*, первинна структура, геном, кластер, ген, клада, гомологія, перекриття.

ORGANIZATION OF CRT-CLUSTERS OF STRAINS FROM THE *STREPTOMYCES ALBUS* CLADE

L.V. Polishchuk, V.V. Lukyanchuk

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Akad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

Summary

The purpose of this study was to define the organization of crt-clusters of 8 strains from the *S. albus* clade. Show the possibility to use the organization of crt-clusters for classification of streptomycetes to taxons of lower hierarchy. **Methods.** Comparative analysis *in silico* of the primary structures of Streptomycetes genomes included in “Nucleotide collection” database on NCBI server was performed using programs (blastn and bl2seq) of the BLAST software package. **Results.** A number of similarities in organization of crt-clusters of the 8 strains selected for the study, both recognized members of the *S. albus* group (J1074, DSM 41398, SM254, BK3-25), and related strains (*S. sampsonii* KJ40, *Streptomyces sp.* GBA 94-10, *Streptomyces sp.* PVA 94-07, *Streptomyces sp.* FR-008) were found. It was shown that all 8 crt-clusters consist of 2 convergent operons. They all do not maintain crtT-genes. All 8 clusters had inserts of additional genes whose products are not involved in carotenoid synthesis. They are usually located between operons. Exceptions are the crt-clusters of strains *S. albus* DSM 41398 and *S. albus* BK3-25, in which the additional genes are located between crtY and crtU genes. **Conclusions.** It is assumed that the characteristic features of *Streptomyces* crt-cluster organization can be useful (in addition to the genetic and phenotypic characteristics already used) in microorganism classification to the taxa of the lower hierarchy (clades, species, subspecies).

Keywords: *Streptomyces*, *in silico* analysis, primary structure, genome, cluster, gene, clade, homology, overlap.

1. Takano H, Obitsu S, Beppu T, Ueda K. Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. J Bacteriol. 2006; 187(5):1825–1832.
2. Kato F, Hino T, Nakaji A, Tanaka M, Koyama Y. Carotenoid synthesis in *Streptomyces setonii* ISP5395 is induced by the gene crtS, whose product is similar to a sigma factor. Mol Gen Genet. 1995; 247:387–390.
3. Krugel H, Krubasik P, Weber K, Saluz HP, Sandmann G. 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. 1999; 1439(1):57–64.

4. Lee HS, Ohnishi Y, Horinouchi S. A sigma B-like factor responsible for carotenoid biosynthesis in *Streptomyces griseus*. J Mol Microbiol Biotechnol. 2001; 3(1):95–101.
5. Matselyukh BP, Matselyukh DY, Golembiovska SL, Polishchuk LV, Lavrinchuk VY. Isolation of *Streptomyces globisporus* and *Blakeslea trispora* mutants with increased carotenoid content. Mikrobiol. Z. 2013; 75(6):10–16.
6. Myronovskiy M, Tokovenko B, Brutz E, Ruckert C, Kalinowski J, Luzhetskyy A. Genome rearrangements of *Streptomyces albus* J1074 lead to the carotenoid gene cluster activation. Appl Microbiol Biotechnol. 2014; 98(2):795–806.
7. Schumann G, Nurnberger H, Sandmann G, Krugel H. Activation and analysis of cryptic crt genes for carotenoid biosynthesis from *Streptomyces griseus*. Mol Gen Genet. 2006; 252(6):658–666.
8. Takano H, Asker D, Beppu T, Ueda K. Genetic control for light-induced carotenoid production in non-phototrophic bacteria. J Ind Microbiol Biotechnol. 2006; 33(2):88–93.
9. Abdel-Halim ME, Sakr AA, Ali MF, Ghaly MF, Sohlenkamp C. Characterization of *Streptomyces* isolates causing color changes of mural paintings in ancient Egyptian tombs. Microbiol Res. 2013; 168(7):428–437.
10. Kato F, Akazai M, Tanaka M, Koyama Y. Mechanism of photochromogenicity in *Streptomyces canus* ISP5017. Actinomycetology. 1989; 3:35–40.
11. Myronovskiy M, Tokovenko B, Manderscheid N, Petzke L, Luzhetskyy A. Complete genome sequence of *Streptomyces fulvissimus*. J Biotechnol. 2013; 168(1):117–118.
12. Zaburannyi N, Rabyk M, Ostash B, Fedorenko V, Luzhetskyy A. Insights into naturally minimized *Streptomyces albus* J1074 genome. BMC Genomics. 2014; 15:97.
13. Bentley SD, Chater KF, Cerdeco-Tarraga AM, Challis GL, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature. 2002; 417(6885):141–147.
14. Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, et al. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. J Bacteriol. 2008; 190(11):4050–4060.
15. Shneyer S. On the species-specificity of DNA: fifty years later. Biochemistry (Mosc.). 2007; 72(12):1377–1384.
16. Goodfellow M, Kumar Y, Labeda DP, Sembiring L. The *Streptomyces violaceusniger* clade: a home for *Streptomyces* with rugose ornamented spores. Antonie Van Leeuwenhoek. 2007; 92(2):173–199.
17. Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol Rev. 1996; 60(2):407–438.

Отримано 15.08.2017