

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/nucleotide>] 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> GVA 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/].

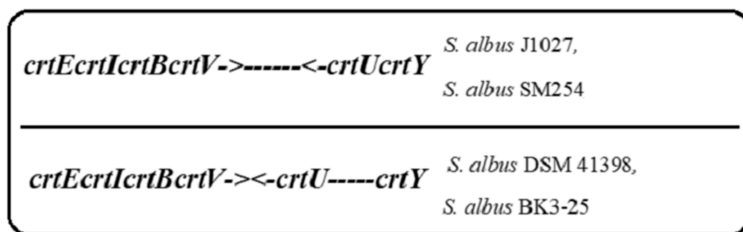


Рис. 1. Схемы организации *crt*-кластеров штаммов стрептомицетов признанных членом из *S. albus* клады

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 членом S. albus группы. В ходе представленного исследования проводили анализ структур *crt*-кластеров как штаммов, признанных членом *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).

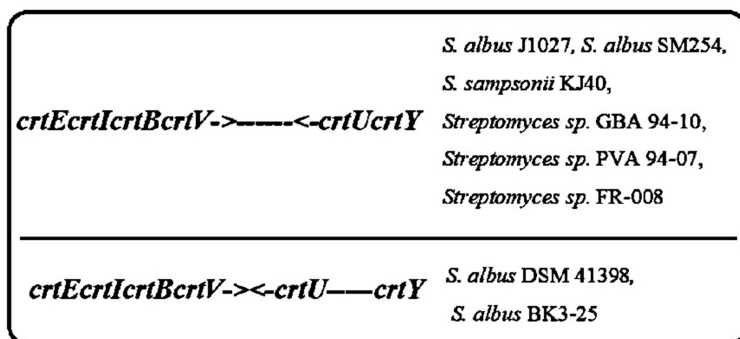


Рис. 2. Организация *crt*-кластеров штаммов *S. albus* группы

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)).

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>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>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=99,1%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=14/0 L=1541 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>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>сrtC</i>-гены						
I=70,8%, Qc=57,0%, Ev=8e-70, M/G=151/11 L=1179 п.н.	I=98,8%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=15/0, L=1239 п.н.	I=98,8%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=15/0, L=1239 п.н.	I=98,8%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=15/0, L=1239 п.н.	I=98,8%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=15/0, L=1239 п.н.	I=98,8%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=15/0, L=1239 п.н.	I=98,8%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=15/0, L=1239 п.н.
<i>сrtD</i>-гены						
I=75,1%, Qc=95,0%, Ev=0,0 M/G=336/18 L=1572 п.н.	I=99,1%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=14/0 L=1541 п.н.	I=99,1%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=14/0 L=1541 п.н.	I=99,1%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=14/0 L=1541 п.н.	I=99,1%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=14/0 L=1541 п.н.	I=99,1%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=14/0 L=1541 п.н.	I=99,1%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=14/0 L=1541 п.н.
<i>сrtE</i>-гены						
I=74,8%, Qc=91,0%, Ev=8e-164, M/G=211/8, L=996 п.н.	I=99,7%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=3/0 L=962 п.н.	I=99,7%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=3/0 L=962 п.н.	I=99,7%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=3/0 L=962 п.н.	I=99,7%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=3/0 L=962 п.н.	I=99,7%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=3/0 L=962 п.н.	I=99,7%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=3/0 L=962 п.н.
<i>сrtF</i>-гены						
I=73,3%, Qc=94,0%, Ev=9e-151, M/G=226/14 L=1011 п.н.	I=98,4%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=16/0 L=998 п.н.	I=98,4%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=16/0 L=998 п.н.	I=98,4%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=16/0 L=998 п.н.	I=98,4%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=16/0 L=998 п.н.	I=98,4%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=16/0 L=998 п.н.	I=98,4%, Qc=100%, Ev=0,0 M/G=16/0 L=998 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