

ПОЛІЩУК Л. В.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
Україна, 03143, м. Київ, вул. Заболотного, 154, e-mail: LVPolishchuk@ukr.net, (066) 641-97-01

## ВІДМІННІСТЬ СИКВЕНСІВ ГЕНОМІВ ШТАМУ *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* ТА 2 ЙОГО МУТАНТІВ

**Мета.** Метою роботи було виявити відмінності у визначених нуклеотидних послідовностях геномних ДНК 2 мутантів та вихідного штаму. Wild-тип штаму *Streptomyces globisporus* 1912 виділено у 1967 році зі зразка ґрунту сільськогосподарських угідь (Вірменія). Отримано 2 його мутанти з різними фенотиповими характеристиками (1912-2 та 1912-4Crt). Визначено нуклеотидну послідовність 19 генів вихідного штаму та до 90 % послідовності геномів його мутантів. **Методу.** Програми BLASTN використовували під час порівняння первинних структур ДНК. **Результати.** BLAST-аналіз сиквенсів мутантів *S. globisporus* 1912-2 та 1912-4Crt виявив їх ідентичність на 99,99 %. Покриття (Query cover) гомологічних послідовностей мутантів 1912-4Crt та 1912-4Crt становило 95 %. Було встановлено, що багато контигів мутантів (як 1912-2, так і 1912-4Crt) є унікальними – їх послідовності абсолютно відмінні від послідовностей контигів іншого варіанта. **Висновки.** Проведене визначення послідовностей геномів 3 варіантів одного мікроорганізму є корисним для побудови єдиної генетичної карти *S. globisporus* 1912. Крім того, завдяки порівняльному аналізу сиквенсів мутантів одного штаму виявляється генетичний базис фенотипових змін.

**Ключові слова:** BLAST-аналіз, первинна структура, геном, кластер, ген, ідентичність, покриття.

Починаючи з 1977 р., активно проводиться визначення первинних структур ДНК організмів (вірусів, мікроорганізмів, рослин, тварин, людини). Різні бази даних містять інформацію про мільйони нуклеотидних послідовностей як окремих генів, так і повних геномів. Наприклад, кількість визначених повних геномів стрептоміцетів незабаром досягне 500. Зараз вже немає потреби доводити необхідність сиквенування геномів та значення всебічного їх вивчення. Всім відома корисність таких досліджень для розвитку науки та практики [1–5].

Метою представленої роботи є виявити

відмінності у визначених первинних структурах контигів геномних ДНК двох мутантів та окремих генів вихідного штаму.

### Матеріали і методи

**Штаму.** Вихідний штаму *S. globisporus* 1912 виділено із зразка культивованого ґрунту, який було відібрано у 1967 році на березі озера Севан (Вірменія: Кавказькі гори). Приналежність штаму до виду *S. globisporus* визначено у 1988 році професором Кузнєцовим (Інститут мікробіології Академії наук, Москва). Встановлено, що штаму належить до *S. albovinaceus* субгрупи *S. griseus* клади [6].

Стрептоміцет зберігається в Українській Колекції Мікроорганізмів в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАНУ як штаму *Streptomyces globisporus* Ac-2098 [http://www.imv.kiev.ua/images/doc/catalog/UCM\_catalog.pdf].

Нами отримано похідні варіанти *S. globisporus* 1912 з різними фенотиповими характеристиками [7]. Початковий штаму *S. globisporus* 1912 та його варіанти продукують біологічно активні метаболіти: антибіотики (ландоміцини А, D, Е), регулятори (А-фактор, (L)-N-метилфенілаланіл-дегідробутирин дикетопіперазин), каротиноїди (бета-каротин, лікопін), ферменти (бета-галактозидаза) [7–12].

**Методу.** Програми BLAST (blastn, bl2seq) використовували під час порівняння первинних структур ДНК [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast].

### Результати та обговорення

У представленому дослідженні, крім послідовностей 19 генів вихідного штаму *S. globisporus* 1912, аналізувалися послідовності геномів двох його мутантів (1912-2 та 1912-4Crt) (табл. 1).

Мутант *S. globisporus* 1912-2 був виділений за дії п-метил-н'-нітро-н-нітрозогуанідину на спори *S. globisporus* 1912 [7]. Він продукує ландоміцин Е та новий регулятор транскрипції біосинтезу антибіотиків і морфогенезу у стреп-

томіцетів дикетопіперазинового характеру [7, 11, 12]. Мутант *S. globisporus* 1912-4Crt - спонтанний мутант *S. globisporus* 1912, що продукує бета-каротин та лікопін [10,12].

Сиквенувано 19 генів вихідного штаму *S. globisporus* 1912 та 85 % – 90 % геномів його мутантів (1912-2 та 1912-Crt4) (табл. 1). Інформацію про нуклеотидну послідовність отримано з баз даних NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/]. Сиквенування ДНК геному мутантів 1912-2 та 1912-4Crt проводили у BaseClear B.V., Leiden, Нідерланди [7, 10, 12].

Первинні структури 19 генів вихідного штаму *S. globisporus* 1912 були визначені частково або повністю. Часткова послідовність (464 п. н.) гена 16S рРНК, дві часткові послідовності полікетидсинтаз типу I (glo1, 333 п. н.) та (glo2, 425 п. н.), 16 часткових або повних послідовностей lnd-генів було додано до NCBI: AY443343.1, AY443344.1, AY443345.1, Y523868.1, AY528820.1, AY608714.1, AY608715.1, AY640377.1, AY662671.1, AY659997.1, AY659998.1, DQ139409.1, DQ275159.1, EU128492.2, HM204451.1, KJ701191.1.

Результат сиквенування послідовності тотальної ДНК мутанта 1912-Crt4 (whole genome shotgun sequence) був доданий (25.08.2013) у базу даних (the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline). Послідовність геному мутанта 1912-Crt4 отримана у вигляді 466 послідовностей (contigs) (NZ\_QWFA01000001 - NZ\_QWFA01000466).

Первинна структура тотальної ДНК мутанта 1912-2 була визначена у 2014 році. Сиквенси ще не депоновані у бази NCBI. Послідовність геному мутанта 1912-2 складається з 1438 контигів. У NCBI були додані повні послідовності лише двох кластерів із геному мутанта 1912-2: lndE-кластер – 37416 т. п. н. та crt-cluster – 10020 т. п. н. Локалізація 2 gvr-кластерів була визначена на контигах мутантів 1912-2: Contig\_264 (1582 п.н. – 7132 п. н.), Contig\_756 (2889 п. н. – 5821 п. н.), Contig\_781 (303 п. н. – 2519 п. н.) [15]; рРНК-кластер був локалізований на його Contig\_207 (10000 п. н. – 15184 п. н.) [14].

Молекулярні розміри контигів мутанта 1912-2 становили від 358 п. н. (Contig\_1421) до 75588 п. н. (Contig\_2), а розміри контигів варіанта 1912-4Crt варіювали від 306 п. н. (NZ\_QWFA01000466.1) до 124967 п. н.

(NZ\_QWFA01000001.1).

Ми припускаємо, що сиквенувані послідовності становлять 85 % – 90 % геномів мутантів *S. globisporus* 1912.

Вирівнювання первинних структур тотальної ДНК мутантів *S. globisporus* 1912-2 та 1912-4Crt виявило, що вони ідентичні (99,99 %). Покриття гомологічних первинних структур (Query cover) 1912-4Crt та 1912-4Crt становило 95 %.

Було встановлено, що деякі контиги мутантів (як 1912-2, так і 1912-4Crt) були абсолютно негомологічними структурами послідовностям іншого варіанта.

21 контиг мутанта 1912-4Crt мав структури, негомологічні структурам контигів 1912-2. Наприклад, Contig\_98 (15006 п.н.) мутанта 1912-2 мав таку негомологічну структуру.

У якості прикладів негомологічних послідовностей 1912-4Crt можна навести контиги NZ\_QWFA01000419, 631 п. н.; NZ\_QWFA01000438, 806 п. н.; NZ\_QWFA01000466, 306 п. н. Сумарно, такі негомологічні структури *S. globisporus* 1912-4Crt мали молекулярний розмір у 9370 bp. Крім того, низка контигів обох мутантів була тільки частково негомологічною. Як приклади таких структур можна навести контиги: Contig\_4 (покриття = 66 %, ідентичність = 99,96 %), *S. globisporus* 1912-2, NZ\_QWFA01000454 (покриття = 28 %, ідентичність\_86,16 %) та багато інших.

Взаємодоповнення послідовностей мутантів (1912-2 та 1912-4Crt) корисне для побудови єдиної генетичної карти *S. globisporus* 1912. Прикладом такого використання можуть слугувати завершені послідовності lndE-кластера та рРНК-кластера штаму *S. globisporus* 1912 (рис. 1).

Наявність у GenBank часткових та повних послідовностей ряду генів (наприклад, 15 lnd-генів) вихідного штаму було корисним для локалізації унікального lndE-кластера на контигах *S. globisporus* 1912-2 та визначення первинної структури усіх 36 генів [10, 12]. Однак сиквенування ДНК мутанта 1912-4Crt дозволило підтвердити вірогідну послідовність у 6 п. н. між lndI та lndE генами [12].

Первинну структуру гена 16S рРНК *S. globisporus* 1912 було додано до GenBank, а первинні структури рРНК-кластера *S. globisporus* 1912-2 були ідентифіковані на Contig\_207 [14]. Визначено первинні структури 10 рРНК-генів 1912-4Crt, але вони не сформували жодного

повного кластера. Для 5S рРНК-гена 1912-4Crt було визначено тільки часткову послідовність (рис. 1).

Вихідний штам і його варіант *S. globisporus* 1912-2 не синтезують каротиноїди. Мутант 1912-4Crt є продуцентом каротиноїдів. Порівняння послідовностей їх crt-кластерів дозволяє визначити можливу причину накопичення лікопину мутантним 1912-4Crt. Вирівнювання послідовностей crt-кластера варіантів 1912-2 та

1912-4Crt виявило делецію 117 bp в гені crtY, що кодує лікопін-циклазу мутанта 1912-4Crt (рис. 2).

Розмір мутантного crtY-гена варіанта 1912-2 у межах криптичного кластера crt-генів становив 1239 п. н., тоді як у мутантів 1912-4Crt він зменшився до 1122 п. н. [14]. Можна також припустити, що мутант 1912-4Crt отримав ще хоча б одну мутацію регуляторного гена, яка призвела до дерегуляції синтезу каротиноїдів.

Таблиця 1. Деякі характеристики геномних послідовностей *S. globisporus* 1912 та двох його варіантів

Властивості послідовностей геномів	визначені нуклеотидні послідовності геномів досліджуваних культур		
	вихідний штам <i>S. globisporus</i> 1912	мутант 1912-2	мутант 1912-4Crt
Загальний розмір сиквенсів геному	N	7124636 п.н.	7365300 п.н.
Кількість контигів	N	1438	466
G/C вміст ДНК	N	71,43%	71,50%
Плазміди**	2 [13]	2	2
Загальна кількість генів	N	6706	6862
Загальна кількість РНК генів	N	67	75
Загальна кількість рРНК оперонів	N	1	0
Загальна кількість рРНК генів	1 частковий сиквенс 16S rRNA-гену AJ132630.1	3 rRNA гени [14]	13
Загальна кількість тРНК генів	N	64	62
Загальна кількість псевдогенів	N	N	422
Гени, що кодують протеїни	2 partial sequences AY655136.1; AY655137.1	6583* 2 gvp-кластер [15]	6345
Кластери генів вторинного метаболізму	IndE-кластер: 16 часткових та повних сиквенсів Ind-генів	IndE-кластер; KJ645792.1; crt-кластер; KM349312.1	-IndE-кластер; crt-кластер; -
Рівень сиквенсу ДНК	19 часткових та повних сиквенсів генів	whole genome shotgun sequence	whole genome shotgun sequence NZ_QWFA00000000.1

Примітки: N – ще визначено, \* – узагальнено кодуючі гени та псевдогени, \*\* – визначено аналітичним методом дослідження ДНК [16].

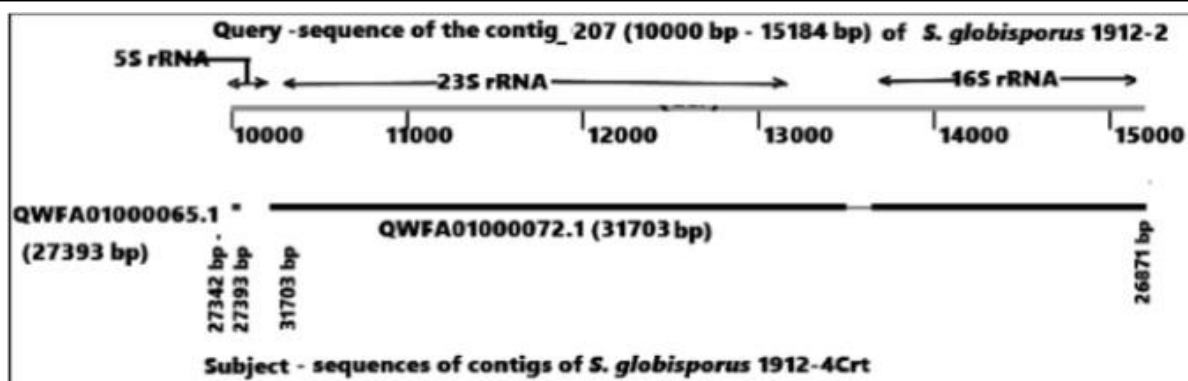


Рис. 1. Розташування гомологічних фрагментів контигів варіантів *S. globisporus* 1912 року в межах рРНК-кластера.

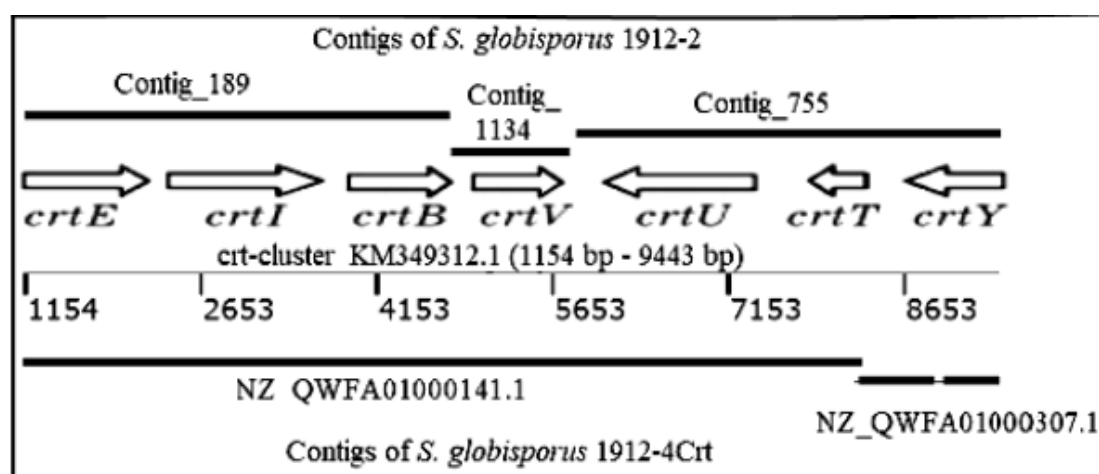


Рис. 2. Розташування гомологічних фрагментів контигів варіантів *S. globisporus* 1912 у межах *crt*-кластера.

## Висновки

Проведені визначення послідовностей генів 3 варіантів одного мікроорганізму будуть корисні для побудови єдиної генетичної карти *S.*

*globisporus* 1912. Крім того, під час порівняльного аналізу сиквенсів мутантів можна виявити генетичний базис фенотипових змін.

## References

- Doroghazi J.R., Albright J.C., Goering A.W., Ju K.S., Haines R.R., Tchalukov K.A., Labeda D.P., Kelleher N.L., Metcalf W.W. A roadmap for natural product discovery based on large-scale genomics and metabolomics. *Nat Chem Biol.* 2014. Vol. 10, № 11. P. 963–968. <http://doi: 10.1038/nchembio.1659>.
- Harrison J., Studholme D.J. Recently published *Streptomyces* genome sequences. *Microb Biotechnol.* 2014. Vol. 7, № 5. P. 373–380. <http://dx.doi.org/ 10.1111/1751-7915>.
- Fournier P.E., Suhre K., Fournous G., Raoult D. Estimation of prokaryote genomic DNA G+C content by sequencing universally conserved genes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006. Vol. 56, № 5. P. 1025–1029. <http://dx.doi.org/10.1099/ij.s.0.63903-0>.
- Wang L., Wang S., He Q., Yu T., Li Q., Hong B. Draft genome sequence of *Streptomyces globisporus* C-1027, which produces an antitumor antibiotic consisting of a nine-membered enediyne with a chromoprotein. *J. Bacteriol.* 2012. Vol. 194, № 15. P. 41–44. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00797-12>.
- Myronovskiy M., Tokovenko B., Manderscheid N., Petzke L., Luzhetskyy A. Complete genome sequence of *Streptomyces fulvissimus*. *J Biotechnol.* 2013. Vol. 168, № 1. P. 117–118. <http://dx.doi.org/0.1016/j.jbiotec.2013.08.013>.
- Polishchuk L.V., Lukyanchuk V.V. Identification of consanguinity of the strain *Streptomyces globisporus* 1912-2. *Mikrobiol. z.* 2017. Vol. 79, № 4. P. 10–16. [in Russian] / Определение близкородственных связей штамма *Streptomyces globisporus* 1912-2. *Микробиол. ж.* 2017. Т. 79, № 4. С. 10–16. <https://doi.org/10.15407/microbiolj79.04.053>.
- Matselyukh B.P., Polishchuk L.V., Lukyanchuk V.V. Complete sequence of landomycin E biosynthetic gene cluster from *Streptomyces globisporus* 1912. *Mikrobiol. z.* 2015. Vol. 77, № 1. P. 33–38. <https://doi.org/10.15407/microbiolj77.01.033>.
- Polishchuk L.V., Hanusevych I.I., Matseliukh B.P. The antitumor action of antibiotics produced by *Streptomyces globisporus* 1912 studied in a model of Guerin's carcinoma in rats. *Mikrobiol. z.* 1993. Vol. 58, № 2. P. 55–58. [in Ukrainian] / Поліщук Л.В.,

- Ганусевич І.І., Мацелюх Б.П. Вивчення протипухлинної дії антибіотиків, що продукуються *Streptomyces globisporus* 1912, на моделі карциноми Герена шурів. *Мікробіол. ж.* 1993. Vol. 58, № 2. С. 55–58.
9. Lutchenko V.A., Polishchuk L.V. Beta-galactosidase activity of mutants *Streptomyces globisporus* 1912. *Prospective enzyme preparations and biotechnological processes in food and food technologies*: abstract of VI International Scientific and Practical Symposium (Moscow, 25–26 April 2012). Moscow: ARRIFBT, 2012. P. 44–48. [in Russian] / Лутченко В.А., Полищук Л.В. Бета-галактозидазная активность мутантов *Streptomyces globisporus* 1912. *Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов*: тезисы VI Международного научно-практического симпозиума (Москва, 25–26 апреля 2012). М.: ARRIFBT, 2012. С. 44–48.
  10. Matselyukh B.P., Polishchuk L.V., Lukuanchuk V.V., Golembiovska S.A., Lavrenchuk V.Y. Molecular mechanism of the carotenoid biosynthesis activation in the producer *Streptomyces globisporus* 1912. *Biotechnologia Acta*. 2014. Vol. 7, № 6. P. 69–74. <http://doi.org/10.15407/biotech7.04.049>.
  11. Matselyukh B., Mohammadipanah F., Laatsch H., Rohr J., Efremenkova O., Khilya V. N-methylphenylalanyl-dehydrobutyryne diketopiperazine, an A-factor mimic that restores antibiotic biosynthesis and morphogenesis in *Streptomyces globisporus* 1912-B2 and *Streptomyces griseus* 1439. *J Antibiot (Tokyo)*. 2015. Vol. 68, № 1. P. 9–14. <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2014.86>.
  12. Matselyukh B.P., Polishchuk L.V., Lukuanchuk V.V., Golembiovska S.A., Lavrenchuk V.Y. Sequences of landomycin E and carotenoid biosynthetic gene clusters, and molecular structure of transcriptional regulator of *Streptomyces globisporus* 1912. *Mikrobiol. z.* 2016 Vol. 78, № 6. P. 60–70. <https://doi.org/10.15407/microbiolj78.06.060>.
  13. Matselyukh B.P., Lukuanchuk V.V., Polishchuk L.V., Matselyukh A.B., Rohr J. Isolation and restriction analysis of two plasmids from *Streptomyces globisporus* 1912. *Biopolym. Cell*. 1998. Vol. 14, № 3. P. 238–241. [in Ukrainian] / Мацелюх Б.П., Лук'янчук В.В., Полищук Л.В., Мацелюх А.Б., Рор Ю. Виділення і рестрикційний аналіз двох плазмід *Streptomyces globisporus* 1912. *Біополімери та клітина*. 1998. Т. 14, № 3. С. 238–241. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0004D3>.
  14. Polishchuk L.V., Matselyukh B.P. rRNA-genes of Actinomycetes, which are homologous to *Streptomyces globisporus* 1912-2 rRNA-cluster. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. К., 2014. Vol. 14. P. 129–133. [in Russian] / Полищук Л.В., Мацелюх Б.П. рРНК-гены актиномицетов, гомологичнык генам рРНК-кластера *Streptomyces globisporus* 1912-2. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. К., 2014. Т. 14. С. 129–133.
  15. Polishchuk L.V. *In silico* seaching of *Streptomyces globisporus* 1912-2 gvp-clusters. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. К., 2015. Vol. 17. P. 325–329. [in Ukrainian] / Полищук Л.В. *In silico* пошук gvp-кластерів *Streptomyces globisporus* 1912-2. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. К., 2015. Т. 17. С. 325–329.
  16. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*. 1984. Vol. 12, № 1. P. 19–36. [http://doi.org/10.1016/0147-619x\(84\)90063-5](http://doi.org/10.1016/0147-619x(84)90063-5).

#### POLISHCHUK L.V.

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NASU,

Ukraine, MSP, D03680, Kyiv, acad. Zabolotny str., 154, e-mail: LVPolishchuk@ukr.net

#### DIFFERENCE IN SEQUENCES OF THE *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912 AND 2 ITS MUTANTS

**Aim.** The wild-type strain *Streptomyces globisporus* 1912 was isolated in 1967 from a sample of farmland (Armenia). Two mutants with different phenotypic characteristics were obtained (1912-2 and 1912-4Crt). The nucleotide sequences of 19 genes of the original strain and up to 90% of the genome sequence of its 2 mutants were determined. The aim of the study was to identify differences in the identified sequences of genomic DNA contigs of 2 mutants and individual genes of the original strain. **Methods.** BLASTN programs were used when comparing the DNA sequences. **Results.** BLAST analyzes of the sequences of 2 mutants *S. globisporus* (1912-2 and 1912-4Crt) revealed that they were identical (99.99%). Query cover of homologous sequences of mutants 1912-4Crt and 1912-4Crt was 95%. It was found that a number of mutant contigs (both 1912-2 and 1912-4Crt) were unique - their sequences were completely dissimilar to the sequences contigs of another variant. **Conclusions.** The determined sequences of genomes of 3 cultures will be useful in the construction of the genetic map of *S. globisporus* 1912. In addition, the comparative analysis of sequences of mutants can reveal the genetic basis of phenotypic changes.

**Keywords:** BLAST analysis, sequences, genome, cluster, gene, identity, overlap.