

УДК 577.873.71:577.113.3:004.9

ПОСЛІДОВНІСТЬ ХРОМОСОМИ *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-2, ГОМОЛОГІЧНА ГЕНУ *afsA* *S. GRISEUS NBRC 13350*

Л.В. ПОЛІЩУК

Інститут мікробіології і вірусології НАН України
Україна, МСП, ДОЗ680, Київ, вул. Акад. Заболотного, 154
e-mail: LVPolishchuk@ukr.net

Мета – виявити послідовність хромосоми *Streptomyces globisporus* 1912-2 гомологічної *afsA*-гену *S. griseus* NBRC 13350 та визначити *in silico* ступені подібності первинної будови визначеної послідовності і *afsA*-генів інших мікроорганізмів. **Методи**. Використовували ресурси сервера NCBI (BLAST: *blastx*, *discontiguous megablast*) для аналізу *in silico* бібліотеки контигів *S. globisporus* 1912-2 та Інтернет баз даних. **Результати**. Виявлено нуклеотидну послідовність *S. globisporus* 1912-2 (*afsA*-ген), що детермінує фермент AfsA, яка розташована на Contig 70 (5134–6078 п.н.). Встановлена значна гомологія (84 %) первинної будови аналогічних генів *S. globisporus* 1912-2 та *S. griseus* NBRC 13350. Тільки у семи штамів стрептоміцетів з 4 родів виявлено послідовності, гомологічні більш 80 % послідовності *afsA*-гену *S. globisporus* 1912-2 при ступені їх ідентичності більшій 75 %. **Висновки**. Встановлено наявність в хромосомі *S. globisporus* 1912-2 *afsA*-гена, що детермінує фермент (AfsA), який забезпечує синтез А-факторподібної речовини. Фермент AfsA *S. globisporus* 1912-2, має типову для ферментів Hot_dog-суперродини архітектуру: утворюються два «hotdog fold» домени з AfsA-родини.

Ключові слова: стрептоміцет, нуклеотидна послідовність, гомологія, ген, фермент.

Вступ. Як відомо, А-фактор – це низькомолекулярний ауторегулятор, який специфічно впливає на процеси цитодиференціації та метаболізму мікроорганізмів [1, 2]. Однією з перших таких сполук у прокариот було виявлено ауторегулюючий фактор (А-фактор) *Streptomyces griseus* 773 [3]. На даний час вже встановлені шлях біосинтезу А-фактора та механізм його дерепресії детермінант біосинтетичних процесів та цитодиференціації [4, 5]. Визначено, що ключовим ферментом синтезу означеного регулятора є AfsA. Цей фермент (дегідратаза) конденсує гліцерин і бета-кетокислоти з утворенням А-фактора (2-isosarcyloyl-3R-hydroxymethyl-γ-butyrolatone) [6]. Ген *afsA* *S. griseus* детермінує амінокислотну будову AfsA-протеїна.

Крім того, встановлено, що один і той же штам стрептоміцету може одночасно синтезувати ряд гама-бутиролактонів: наприклад, *S. coelicolor* A3(2) синтезує 6 А-фактороподібних речовин. Також встановлено, що штамми *S. griseus* синтезують, крім А-фактора, ще 2 близькі за будовою речовини [7].

Як показано, пептид AfsA накопичується в процесі росту. На ранній стадії, коли концентрація А-фактора ще не є достатньою, функціонування А-факторозалежного регулону (AfpA-регулону) блокується регулятором транскрипції AfpA. Однак накопичення критичної кількості А-фактора, розблоковує транскрипцію генів AfpA-регулону (рис. 1) [1, 7].

При подальших дослідженнях речовини, подібні за біологічною дією та хімічною будовою А-фактора, були виявлені у багатьох видів стрептоміцетів, актиноміцетів та грамнегативних бактерій [1, 3, 8–12].

Метою даної роботи було визначення послідовності гомологічної *afsA*-гена *S. griseus* NBRC 13350 у бібліотеці контигів тотальної ДНК *S. globisporus* 1912-2. Буде також проведено

© Л.В. ПОЛІЩУК, 2015

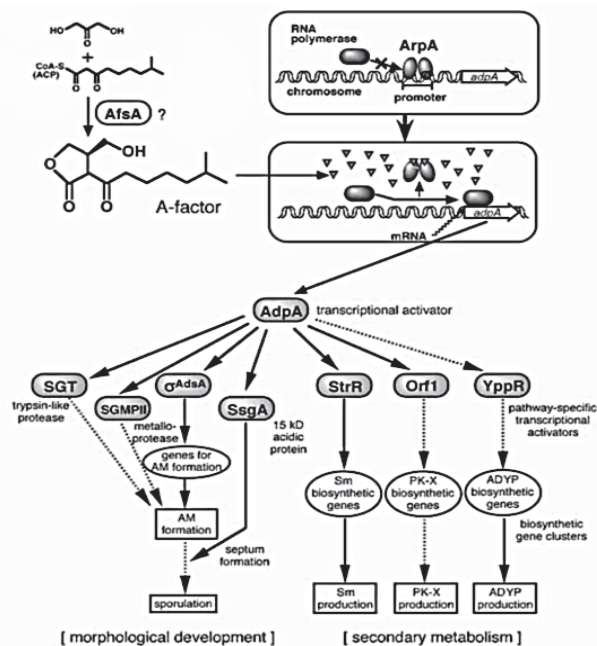


Рис. 1. Модель функціонування А-факторозалежного каскаду *S. griseus* [5]

in silico дослідження ступеня подібності первинної будови визначеної послідовності та *afsA*-генів інших мікроорганізмів.

Матеріали і методи

Досліджували *in silico* бібліотеку контигів, що містять інформацію про первинну будову 1438 фрагментів тотальної ДНК штаму *S. globisporus* 1912-2. Визначення нуклетидних послідовностей фрагментів ДНК стрептоміцета проведено акредитованою компанією «BaseClear» (Лейден, Нідерланди) у 2013 році. Використана інформація з Інтернет бази даних серверу NCBI «Nucleotide collection» [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/]. Аналіз *in silico* (метод попарного вирівнювання) нуклеотидної будови ДНК стрептоміцетів проводили за допомогою пакету програм BLASTN 2.2.31+:

discontiguous megablast, megablast [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi]. Використовували налаштування програми BLASTN за замовчуванням. В аналізі *in silico* бібліотеки контигів *S. globisporus* 1912-2 як реперної використано послідовність *afsA*-гену (8273444–8274388 п.н.) *S. griseus* NBRC 13350 (AP009493, GenBank). Вірогідну архітектуру вторинної будови молекули AfsA-ферменту *S. globisporus* 1912-2 будували з використанням ресурсу «Structure» [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi].

Результати та обговорення

Розроблено ряд методів, що дозволяють виявити синтез А-фактороподібних сполук культурами мікроорганізмів [1, 3]. Один із таких методів – це тест-система, що побудована на здатності штама-реципієнта *S. griseus* 1439 відновлювати функціонування А-факторозалежного регулону під дією екзогенного регулятора. За допомогою даної системи було встановлено, що штам *S. globisporus* 1912 та ряд його похідних продукують метаболіти, які відновлюють споруляцію та синтез стрептоміцину штамом *S. griseus* 1439 та було зроблено припущення, що штам-донор *S. globisporus* 1912-Б1 синтезує А-фактороподібний регулятор [13].

Завдяки прогресу у царині комп'ютерних технологій та методів визначення первинної будови хромосомної ДНК організмів стало можливим *in silico* будувати генетичну карту хромосом організмів; виявляти криптичні кластери генів, що детермінують синтез антибіотиків, протеїнів та ряд інших метаболітів. Крім того, таке дослідження нуклеотидної будови хромосом мікроорганізмів дозволить виявити взаємозв'язок окремих метаболічних шляхів.

Був проведений *in silico* аналіз бібліотеки контигів тотальної ДНК штаму *S. globisporus* 1912-2 за допомогою програми BLASTN (megablast) з використанням реперної послідовності фрагмента (*afsA*-

Таблиця 1. Характеристики послідовності *S. globisporus* 1912-2, гомологічної *afsA*-гена *S. griseus*

Ген <i>S. griseus</i> NBRC 13350 та положення в геномі (AP009493)	Локалізація гомологічних послідовностей та показники їхньої ідентичності	
	<i>S. griseus</i> NBRC 13350	<i>S. globisporus</i> 1912-2
<i>afsA</i> 8273444–8274388 п.н., (фермент синтезу А-фактора)	8273444 – 8274388 п.н.	Contig 70 5134–6078 п.н. I – 83,5 % Q.c. – 100 %, 158 ¹ /0 ² E-value – 0

Примітки. ¹ – кількість негомологічних основ (mismatches); ² – кількість розривів (gaps); I – ідентичність, %, Q.c. (Query cover) – покриття гомологічних послідовностей, %, E-value – достовірність даного вирівнювання.

ген, 906 п.н.) хромосоми *S. griseus* NBRC 13350 та виявлено послідовність *S. globisporus* 1912-2, гомологічної за первинною будовою ланцюга ДНК реперному гену (табл. 1).

Дослідження сотень штамів стрептоміцетів, які належать до різних видів роду *Streptomyces* виявило, що до 45 % досліджуваних культур продукують А-фактороподібні речовини [1, 8]. Крім того, А-фактороподібні сполуки були знайдені у представників інших родин актиноміцетів. Встановлено, що грамнегативні мікроорганізми також синтезують ендогенні регулятори (N-ацетил-гомосерин-лактони), які мають в будові молекули лактонове кільце [9].

Проведено дослідження *in silico* бази даних «Nucleotide collection» за допомогою програми BLASTN (megablast) з використанням як реперу2 послідовність *S. globisporus* 1912-2 (Contig 70: 5134–6078 п.н.). Метою цього пошуку було виявлення нуклеотидних послідовностей організмів, гомологічних вірогідному *afsA*-гену *S. globisporus* 1912-2, визначення ступеня їхньої подібності та аналіз функцій, детермінованих ними продуктів.

Гомологічні реперу2 послідовності знайдено тільки у 33 мікроорганізмів (з 19 мільйонів організмів із різних таксономічних груп, послідовності яких внесені до бази даних «Nucleotide collection»): 27 штамів видів родини *Streptomycetaceae* (20 видів *Streptomyces*, 1 вид *Kitasatospora*), 3 види інших класів актиноміцетів (клас *Actinobacteria*: види *Nocardia*, *Frankia*, клас *Thermoleophilia*: вид *Conexibacter*) та 3 види домена *Bacteria* (клас

α -Proteobacteria: види *Azospirillum*, *Sphingomonas*, клас γ -Proteobacteria: вид *Enterobacter*).

У 32 мікроорганізмів гомологічні послідовності виявлено в хромосомній ДНК, у той час як у штаму *S. aureofaciens* CCM3239 *afsA*-ген – на плазміді рSA3239 (241077 п.н., KJ396772.1).

Було визначено у різних мікроорганізмів послідовності, гомологічні від 100 % до 3 % довжини (покриття) вірогідного *afsA*-гена *S. globisporus* 1912-2. Ступінь їхньої ідентичності був від 100 % до 65 %. Достовірність попарних вирівнювань (E-value) становила від 0 до 3,2.

Більшість виявлених послідовностей культур мікроорганізмів (із показниками покриття більшими 20 %), гомологічних *afsA*-гену *S. globisporus* 1912-2 є фрагментами генів, які детермінують ферменти, що задіяні в синтезі гама-бутиролактонів. Як приклад: 29 % послідовності *afsA*-гена (KJ192367.1) штаму *Streptomyces* sp. YN86 є ідентичними на 71 % *afsA*-гену *S. globisporus* 1912-2. Згадана послідовність *afsA*-гена *Streptomyces* sp. YN86 кодує фрагмент амінокислотного ланцюжка, який утворює так званий «hotdog fold» – консервативний домен AfsA з ферментативною активністю із AfsA-родини (Hot_dog-суперродина).

Тільки у семи штамів стрептоміцетів із 4 родів виявлено послідовності, гомологічні більш 80 % послідовності *afsA*-гена *S. globisporus* 1912-2 при ступені їхньої ідентичності більшої 75 % (табл. 2). Різні штами одного і того ж виду (наприклад, штами *S. coelicolor* A3(2) і GIM4.0001) можуть мати одні і ті ж показники гомології: ідентичність 76 % та покриття – 80 %. У той час, як штами SANK 60196

Таблиця 2. Подібність нуклеотидної будови послідовностей *afsA*-генів стрептоміцетів аналогічному гену *S. globisporus* 1912-2 (945 п.н.)

Культури стрептоміцетів	Посилання в GenBank	Показники гомології послідовностей <i>afsA</i> -генів		
		покриття, %	ідентичність, %	достовірність
<i>S. griseus</i> NBRC 13350	AP009493.1	100	83	0
SANK 60196	AB462507.1	100	83	0
XylebKG-1	M24250.1	95	83	0
<i>S. fulvissimus</i> DSM 40593	CP005080.1	98	78	0
<i>S. lividans</i> TK24	CP009124.1	80	76	8e-141
<i>S. coelicolor</i> SKKU A3(2)	HM031192.1 AL939127.1	80 80	76 76	8e-141 8e-141

Таблиця 3. Подібність нуклеотидної будови послідовностей ряду стрептоміцетів *afsA*-гена *S. griseus*

Культури стрептоміцетів	Показники гомології послідовностей генів		
	покриття, %	ідентичність, %	достовірність
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	85	72 (2551 ¹ /142 ²)	4e-158
<i>S. globisporus</i> 1912-2	93	84 (175/3)	0
<i>S. griseus</i> XylebKG-1	100	99 (3/0)	0
<i>S. griseus</i> SANK 60196	95	99 (3/0)	0

Примітки. ¹ – кількість негомологічних основ (mismatches); ² – кількість розривів (gaps).

і NBRC 13350 виду *S. griseus* мали різні показники покриття (відповідно 95 % та 100 %) при однаковому показнику ідентичності (83 %).

За даними літератури, додавання екзогенних А-фактороподібних регуляторів багатьох штамів стрептоміцетів здатні відновити споруляцію та синтез стрептоміцину клітинами *S. griseus* 1439. Прикладом може слугувати штам *S. coelicolor* A3(2) [1, 3, 10].

Дослідження *in silico* гомології нуклеотидних послідовностей *scbA*-гена *S. coelicolor* A3(2) та *afsA*-гена *S. globisporus* 1912-2 аналогічному реперному гену *S. griseus* показали, що за нуклеотидною будовою *afsA*-ген *S. globisporus* 1912-2 є більш подібним до *afsA*-гена *S. griseus* NBRC 13350, ніж *scbA* *S. coelicolor* A3(2). Крім того, в послідовності *S. globisporus* 1912-2 наявна менша кількість негомологічних основ та розривів (табл. 3). Необхідно відмітити виявлену неповну ідентичність нуклеотидної будови *afsA*-генів 3 штамів *S. griseus*.

Задомогою ресурсів серверу NCBI «Structure», «Conserved Domain Search Service» було створено попередню модель вірогідного ферменту AfsA *S. globisporus* 1912-2. Відповідно створеній *in silico* моделі, молекула ферменту утворює два домени (з родини AfsA), що належать до Hot_dog-суперродини. До цієї родини належать багато бактеріальних дегідратаз та тіоестераз (рис. 2).

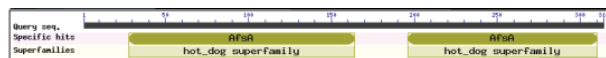


Рис. 2. Модель архітектури молекули вірогідного ферменту AfsA *S. globisporus* 1912-2

Для ферментів AfsA *S. griseus* NBRC 13350 та ScbA *S. coelicolor* A3(2), за допомогою цих же програм, показані ідентичні вторинні будови молекул (наявність двох структур «hotdog fold»); їхня належність до Hot_dog-суперродини та аналогічні ферментативні активності. В усіх створених моде-

лях будови молекул ферментів домени мають аналогічне розташування: 28 – 164 п.н. та 196 – 310 п.н.

Дослідження штамів стрептоміцетів, які належать до різних видів роду *Streptomyces* виявило, що до 45 % досліджуваних культур продукують А-фактороподібні речовини [1, 3]. За даними літератури, А-фактороподібні регулятори у багатьох штамів стрептоміцетів активують цитодиференціацію у *S. coelicolor* A3(2), *S. cyaneofuscatus*, *S. bikiniensis*, *S. virginiae* та ряду інших [1, 3, 10, 11, 13]. Крім того, метаболіти групи А-фактора індукують синтез антибіотиків: у *S. griseus* ZIMET 43689 – лейкоміцину, у *S. virginiae* – вірджиніоміцину, у *Streptomyces* sp. FRI-5 – шовдоміцину та мініміцину [1, 3, 10, 11]. Bazуючись на вище наведених літературних даних та отриманих результатах дослідження хромосомної ДНК *S. globisporus* 1912-2 можна висловити припущення, що кластер генів, що детермінують синтез штамом *S. globisporus* 1912 антрациклінового антибіотика ландоміцину Е - це частина А-факторозалежного регулону.

Висновки

Виявлено послідовність хромосоми *S. globisporus* 1912-2, що вірогідно детермінує фермент (AfsA), який забезпечує синтез А-фактороподібної речовини (Contig 70 (5134–6078 п.н.). Нуклеотидна будова згаданої послідовності є ідентичною на 84 % *afsA*-гена *S. griseus* NBRC 13350. Вірогідний AfsA-фермент *S. globisporus* 1912-2, має типову для ферментів Hot_dog-суперродини архітектуру: наявні 2 «hotdog fold» домени з AfsA-родини.

Перелік літератури

1. Хохлов А.С. Низкомолекулярные микробные ауторегуляторы. – М.: Наука, 1988. – 270 с.
2. Takano E. Gamma-butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation // Curr. Opin. Microbiol. – 2006. – Vol.9. – № 3. – P. 287–294.

3. Ефременкова О.В., Анисова Л.Н., Бартошевич Ю.Э. Регуляторы дифференциации актиномицетов (обзор) // Антибиотики и медицинская биотехнология. – 1985. – № 9. – С. 687–707.
4. Ohnishi Y., Kameyama S., Onaka H., Horinouchi S. The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor // Mol. Microbiol. – 1999. – Vol. 34. – № 1. – P. 102–111.
5. Ohnishi Y., Seo J.W., Horinouchi S. Deprogrammed sporulation in *Streptomyces* // FEMS Microbiol Lett. – 2002. – Vol. 216. – № 1. – P. 1–7.
6. Kato J.Y., Funa N., Watanabe H., Ohnishi Y., Horinouchi S. Biosynthesis of gamma-butyrolactone autoregulators that switch on secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – Vol. 104, № 7. – P. 2378–2383.
7. Ефременкова О.В., Грузина В.Д., Сумарокова И.П., Кузнецов В.Д. Поиск А-фактор-зависимых вариантов в популяциях актиномицетов // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 6. – С. 766–769.
8. Ефременкова О.В., Анисова Л.Н., Камзолкина О.В., Дмитриева С.В., Горин С.Е., Бартошевич Ю.Э. Образование регуляторов типа А-фактора представителями рода *Micromonospora* // Антибиотики и медицинская биотехнология. – 1987. – Т. 32, № 9. – С. 643–648.
9. Козлов Д.Г., Соيفер В.С., Маланичева И.А., Ефременкова О.В. Поиск предшественников биосинтеза регуляторов группы А-фактора – эндогенных регуляторов развития актиномицетов // Микробиология. – 2008. – Т. 77. – № 5. – С. 716–719.
10. Анисова Л.Н., Блинова И.Н., Ефременкова О.В., Козьмин Ю.П., Оноприенко В.В., Смирнова Г.Н., Хохлов А.С. Регуляторы развития *Streptomyces coelicolor* A3(2) // Изв. АН СССР. Сер. Биол. – 1984. – С. 98–108.
11. Анисова Л.Н., Блинова И.Н., Ефременкова О.В., Смирнова Г.Н., Хохлов А.С. Регуляторы дифференцировки *Streptomyces saepeofuscatus* // Микробиология. – 1984. – Т. 53. – С. 890–895.
12. Табаков В.Ю., Воейкова Т.А. Элементы систем регуляции биосинтеза антибиотиков у *Streptomyces* // Генетика. – 1997. – Т. 33, № 1. – С. 1461–1477.
13. 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.

Представлено Ф.І. Товкачем
Надійшла 28.05.2015

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ХРОМОСОМЫ *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-2, ГОМОЛОГИЧНАЯ ГЕНУ *AFSA* *S. GRISEUS* NBRC 13350

Л.В. Полищук

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины
Украина, МСП, ДО3680, Киев, ул. Акад. Заболотного, 154
e-mail: LVPolishchuk@ukr.net

Цель – выявить последовательность хромосомной *S. globisporus* 1912-2, гомологичной *arpA*-гена *S. griseus* NBRC 13350 и определить *in silico* степени сходства первичного строения данной последовательности и *arpA*-генов

других микроорганизмов. **Методы.** Использовались ресурсы сервера NCBI (BLAST: blastx, discontinuous megablast) для *in silico* анализа библиотеки контигов *S. globisporus* 1912-2 и Интернет баз данных. **Результаты.** Выявлено нуклеотидную последовательность *arpA*-гена *S. globisporus* 1912-2, детерминирующую фермент *AfsA*, которая расположена на Contig 70 (5134 – 6078 п.н.). Нуклеотидное строение упомянутой последовательности идентично на 84 % *afsA*-гену *S. griseus* NBRC 13350. Только у семи штаммов стрептомицетив из 4 родов обнаружено последовательности, гомологичные более чем на 80 % последовательности *afsA*-гена *S. globisporus* 1912-2 при степени их идентичности большей 75 %. **Выводы.** Установлено наличие в хромосоме *S. globisporus* 1912-2 *afsA*-гена, детерминирующего фермент (*AfsA*), который обеспечивает синтез А-факторподобного вещества. Фермент *AfsA* *S. globisporus* 1912-2 имеет типичную для ферментов Hot_dog-суперсемейства архитектуру: образуются два «hotdog fold» домены из *AfsA*-семьи.

Ключевые слова: стрептомицет, нуклеотидная последовательность, гомология, ген, фермент.

CHROMOSOMAL FRAGMENT FROM *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-2 HOMOLOGOUS TO *AFSA*-GENE OF *S. GRISEUS* NBRC 13350

L.V. Polishchuk

Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine
Ukraine, SMEs, DO3680, Kyiv, Acad. Zabolotny str., 154
e-mail: LVPolishchuk@ukr.net

Aim. To identify the chromosomal fragment of *S. globisporus* 1912-2 homologous to *S. griseus* NBRC 13350 *arpA* gene and to assess the similarity of primary structure of the fragment and *arpA* genes of other microorganisms *in silico*. **Methods.** NCBI Web BLAST Service (blastx, discontinuous megablast) was used for *in silico* analysis of the contigs of *S. globisporus* 1912-2 and Internet databases. **Results.** The nucleotide sequence of *S. globisporus* 1912-2 with *afsA* gene, which coded the enzyme *AfsA*, was located on Contig 70 (5134 – 6078 bp). It was shown the significant homology (84 %) of primary structure of *afsA* gene for *S. globisporus* 1912-2 and *S. griseus* NBRC 13350. Only seven strains from four genera of streptomycetes showed homology of *afsA*-gene sequence to *S. globisporus* 1912-2 higher than 80 % with the degree of identity of 75 %. **Conclusions.** The *afsA* gene coding the enzyme (*AfsA*), which provides the synthesis of A-factor like substance, is located on the chromosome of *S. globisporus* 1912-2 (Contig 70, 5134–6078 bp). The *AfsA* enzyme of *S. globisporus* 1912-2 has a structure typical of enzymes of hot dog superfamily with two hot-dog fold domains from *AfsA*-family.

Keywords: *Streptomycetes*, nucleotide sequence, homology, gene, enzyme.