

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Е.А. Абакумова, Ю.В. Сарана, Р.С. Шулинский. Состав микробиома тлей *Aphis pomi* De Geer в Беларуси // сб. науч. ст. по материалам XIV Междунар. науч.-практ. конф. Актуальные проблемы экологии. – Гродно, 2019. – С. 11-13.
2. Li H., Handsaker B., Wysoker A. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools // *Bioinformatics*. 2009. Vol. 25. № 16. P. 2078–2079.
3. Quinlan A. R., Hall I. M. BEDTools: A Flexible Suite of Utilities for Comparing Genomic Features // *Bioinformatics*. 2010. Vol. 26. № 6. P. 841–842.
4. Li H., Durbin R. Fast and Accurate Long-Read Alignment with Burrows-Wheeler Transform // *Bioinformatics*. 2010. Vol. 26. № 5. P. 589–595.
5. Magoc T., Pabinger S., Canzar S. et al. GAGE-B: An Evaluation of Genome Assemblers for Bacterial Organisms // *Bioinformatics*. 2013. Vol. 29. № 14. P. 1718–1725.
6. Nurk S., Bankevich A., Antipov D. et al. Assembling Genomes and Minimetagenomes from Highly Chimeric Reads // *Lecture Notes in Computer Science*. 2013. Vol. 7821. P. 158–170.
7. Jackman S. D., Vandervalk B. P., Mohamadi H. et al. ABySS 2.0: Resource-Efficient Assembly of Large Genomes Using a Bloom Filter // *Genome Research*. 2017. Vol. 27. № 5. P. 768–777.
8. Zerbino D. R., Birney E. Velvet: Algorithms for De Novo Short Read Assembly Using De Bruijn Graphs // *Genome Research*. 2008. Vol. 18. № 5. P. 821–829.
9. Cantarel B. L., Korf I., Robb S. M. C. et al. MAKER: An easy-to-use annotation pipeline designed for emerging model organism genomes // *Genome Research*. 2007. Vol. 18. № 1. P. 188–196.
10. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: A Unified Bioinformatics Toolkit // *Bioinformatics*. 2012. Vol. 28. № 8. P. 1166–1167.
11. Waters N. R., Abram F., Brennan F. et al. riboSeed: leveraging prokaryotic genomic architecture to assemble across ribosomal regions // *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 46. № 11. P. 1–10.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ БАКТЕРИИ *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* SUBSP. *AURANTIACA* ШТАММОВ ДИКОГО ТИПА И МУТАНОВ, СПОСОБНЫХ К СВЕРХСИНТЕЗУ ФЕНАЗИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ

А. И. Левданская, Н. П. Максимова, Е. Г. Веремеенко

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

E-mail: tassigo@gmail.com

Секвенированы геномы бактерий *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* штаммов дикого типа и мутантов, способных к сверхсинтезу феназиновых антибиотиков. Сравнение этих геномов помогло определить мутации в генах, способствующих увеличению синтеза феназинов. Это позволит в дальнейшем получать штаммы-сверхпродуценты данных метаболитов.

Ключевые слова: секвенирование; бактерии рода Pseudomonas; феназиновые антибиотики; мутагенез.

Бактерии рода *Pseudomonas* являются продуцентами большого количества вторичных метаболитов. Одни из них – феназиновые антибиотики. Благодаря своим свойствам они широко применяются в таких отраслях как сельское хозяйство, медицина и биосенсорные технологии [1, 2]. Ввиду необходимости наличия у штаммов-продуцентов сложных многокомпонентных систем защиты от феназиновых антибиотиков, синтез данных соединений возможен только у бактерий определенных родов. Одним из таких родов является род *Pseudomonas*. Наиболее эффективным способом увеличения продукции феназинов в данной ситуации является внесение модификаций в геном исходных бактерий рода.

Ранее на кафедре генетики биологического факультета БГУ на основе штамма дикого типа *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162 путем химического мутагенеза были получены мутантные штаммы B-162/255 и B-162/17, способные к сверхсинтезу феназинов [3, 4]. По сравнению со штаммом дикого типа, уровень продукции феназинов у которого составлял 75 ± 15 мг/л на продукционной среде [5], уровень продукции на той же среде у мутантов составляет 420 ± 30 мг/л и 210 ± 25 мг/л, соответственно. Отдельного внимания заслуживает штамм B-162/17, который способен синтезировать феназины на минимальной среде [6] в том же объеме, что и на продукционной (210 ± 25 мг/л), в отличие от остальных штаммов, у которых синтеза на минимальной среде не наблюдается.

Для выяснения причин, по которым мутантные бактерии приобрели способность к сверхпродукции, геномы всех исследуемых штаммов были секвенированы. Пробоподготовку для секвенирования проводили с помощью Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina). Полногеномное секвенирование осуществляли на базе ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» на приборе Illumina MiSeq. Для запуска использовался набор MiSeq Reagent Kit v2 (2 по 150 циклов). Сырые прочтения обрабатывались программой Trimmomatic 0.38 для удаления адаптерных последовательностей и прочтений низкого качества. Сборку генома проводили с использованием программ SPAdes 3.13.1 и A5-miseq (v2016-08-25). Аннотация генома осуществлялась с помощью сервиса RAST (<http://rast.nmpdr.org/>).

Поскольку изучаемые штаммы получены путем последовательного мутагенеза (рис. 1), результаты сравнения их геномов приведены в аналогичном порядке с целью идентифицировать очередность возникновения изменений генетического материала и оценить их вклад в сверхпродукцию.

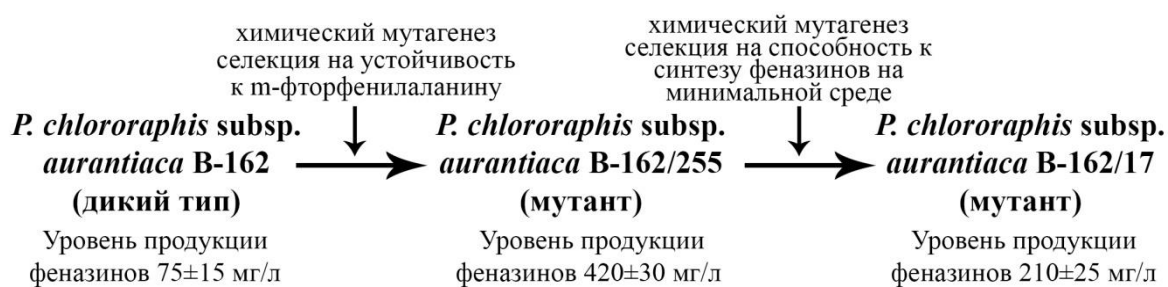


Рис. 1. Схема мутагенеза бактерий *P. chlororaphis subsp. aurantiaca*

При сравнении геномов штаммов B-162 и B-162/255 было обнаружено 32 мутации. Все они являлись однонуклеотидными заменами. Из них 5 замен произошли в межгенных областях, а 11 не вели к замене аминокислоты либо вели к синонимичным заменам. Внимание было сконцентрировано на остальных 16 заменах (Таблица 1).

Таблица 1

Список значимых мутаций, обнаруженных при сравнении геномов штаммов B-162 и B-162/255

Название гена	Координаты мутации	Тип мутации
16s рРНК	29758	G->A (Pro->Ser)
Регулятор транскрипции семейства MerR	823359	G->A (Thr->Ile)
Белок MreC, определяющий палочковидную форму бактерий	1028732	T->C (Ser->Pro)
3-карбокси-цис,цис-муконат циклоизомераза (КФ 5.5.1.2)	1476654	G->A (Gly-> Asp)
Активатор транскрипции фенилаланин гидроксилазы PhhR	1758287	G->A (Met-> Ile)
Сигма-54 зависимый транскрипционный регулятор	2820154	G->A (Gly-> Asp)
АТФаза системы секреции I типа	3633870	C->G (Gly -> Arg)
Гипотетический белок	3790421	G->T (Arg -> Leu)
Регулятор транскрипции MvaT, субъединица P16	3794621	G->A (Gly -> Asp)
Изохинолин 1-оксидоредуктаза β-субъединица (КФ 1.3.99.16)	4327280	G->A (Val -> Met)
Регуляторный белок GacA	4440666	G->T (Ser -> Arg)
Сигма-54 зависимый транскрипционный регулятор	4452736	G->T (Glu -> Lys)
α-субъединица ДНК-зависимой РНК полимеразы (КФ 2.7.7.6)	6398527	T->A (Asn -> Ile)
Гистидин киназа	6714169	G->A (Thr -> Ile)
Тиоредоксин	6876184	G->A (Leu -> Phe)
ДНК-связывающий белок с мотивом «спираль-поворот-спираль»	6971830	G->A (Pro -> Ser)

Среди данных мутаций наибольшее влияние на синтез феназинов могла оказать мутация в гене, кодирующем регулятор транскрипции MvaT, поскольку он является негативным регулятором генного кластера, ответственного за формирование биопленки, которое в свою очередь влияет на синтез феназиновых соединений [7, 8]. Мутация, затронувшая один из мотивов гена, кодирующего регуляторный белок GacA, также требует внимания, так как данный белок является частью регуляторной системы GacS/GacA, контролирующей вторичный метаболизм и синтез веществ с антифунгальной и антибиотической активностью, включая феназины [9, 10]. Есть вероятность, что на повышенный синтез феназинов также могла повлиять замена в гене, кодирующем гистидин киназу – мультифункциональный трансмембранный белок, задействованный в переносе веществ через плазмалемму.

Мутантный штамм В-162/17 был получен непосредственно из мутантного штамма В-162/255 в результате повторного мутагенеза и селекции на способность к синтезу феназиновых антибиотиков на минимальной среде. При сравнении геномов данных мутантов было обнаружено 19 мутаций. В межгенных областях обнаружено 2 замены, 2 инсерции и 1 делеция. Из остальных 13 замен 8 не вели к изменению аминокислоты или вели к синонимичным заменам. Значимые замены и делеции представлены в Таблице 2.

Таблица 2

Список значимых мутаций, обнаруженных при сравнении геномов штаммов В-162/255 и В-162/17

Название гена	Координаты мутации	Тип мутации
Цитохром с оксидаза I (КФ 1.9.3.1)	68730-68741	Делеция участка «ccatgatgctga»
Наружный домен мембранного белка-транспортера	1649557 1649565	C->T (Asp->Asn) T->A (Gln-> Leu)
Активатор транскрипции фенилаланин-гидроксилазы PhhR	1758287	A -> G (Ile -> Met)
АТФаза системы секреции I типа	3633870	G -> C (Arg ->Gly)
α -субъединица аргинин-N-сукцинилтрансферазы (КФ 2.3.1.109)	5392805- 5392824	Делеция участка «ttcgccgacgcccagggctt»
Глюкозоспецифичный компонент ПА фосфотрансферазной системы (КФ 2.7.1.199)	5753338	G->T (Leu -> Met)

Мутации, произошедшие в генах, кодирующих активатор транскрипции фенилаланин-гидроксилазы PhhR и α -субъединицу аргинин-N-сукцинилтрансферазы являются реверсиями и вряд ли способствует появлению способности к синтезу феназинов на минимальной среде.

Среди остальных мутаций наиболее интересными являются делеция в гене, кодирующим цитохром с оксидазу I, которая участвует в переносе протонов и электронов в бактериальной мембране [11]. А также замена в гене, кодирующем глюкозоспецифичный компонент ПА фосфотрансферазной системы, который принимает участие в идентификации и поглощении углеводов бактериями, а также способствует образованию биопленок [12].

Таким образом, обнаруженные мутации способствовали изменению как белков, напрямую связанных с биосинтезом феназинов (GacA и MvaT у штамма B-162/255), так и белков, которые лишь гипотетически могут повлиять на изменение уровня синтеза феназинов (компонент фосфотрансферазной системы у штамма B-162/17). Анализ влияния обнаруженных мутаций на уровень продукции феназиновых антибиотиков будет проведен в ходе дальнейшей экспериментальной работы по направленному выключению генов-мишеней в геноме штаммов дикого типа.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Pierson III L. S., Pierson E. A. Metabolism and Function of Phenazines in Bacteria: Impacts on the Behavior of Bacteria in the Environment and Biotechnological Processes // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. Vol. 86. № 6. P. 1659–1670.
2. Pauliukaite R., Ghica M. E., Barsan M. M., Brett C. M. A. Phenazines and Polyphenazines in Electrochemical Sensors and Biosensors // Analytical Letters. 2010. Vol. 43. № 10-11, P. 1588–1608.
3. Веремеенко Е. Г., Федорович М. Н., Феклистова И. Н., Максимова Н. П. Получение и характеристика мутантов *Pseudomonas* – продуцентов антибиотиков феназинового ряда // Вестник Белорусского государственного университета. 2009. Сер. 2. № 2. С. 44–48.
4. Веремеенко Е. Г., Лысак В. В., Максимова Н. П. Получение и характеристика мутантов *Pseudomonas aurantiaca*, способных к сверхсинтезу феназиновых антибиотиков при культивировании в минимальной среде // Вестник Белорусского государственного университета. 2010. Сер. 2. № 2. С. 47–53.
5. Haynes W. C., Stodola F. H., Locke J. M. et al. *Pseudomonas aureofaciens* Kluyver and Phenazine Alpha-Carboxylic Acid, Its Characteristic Pigment // J. Bacteriol. 1956. Vol. 72. № 3. P. 412–417.
6. Maniatis T., Fritsch E. E., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual. First edition. New York: Cold Spring Harbour University. 1982.
7. Vallet I., Diggle S. P., Stacey R. E. et al. Biofilm Formation in *Pseudomonas Aeruginosa*: Fimbrial Cup Gene Clusters Are Controlled by the Transcriptional Regulator MvaT // J. Bacteriology. 2004. Vol. 186. № 9. P. 2880–2890.
8. Schiessl K. T., Hu F., Jo J. et al. Phenazine production promotes antibiotic tolerance and metabolic heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. // Nature Communications. 2019. Vol. 10. № 762. P. 1–10.

9. McMackin E. A. W., Marsden A. E., Yahr T. L. H-NS Family Members MvaT and MvaU Regulate the *Pseudomonas Aeruginosa* Type III Secretion System // J. Bacteriol. 2019. Vol. 201. № 14. P. 1–15.
10. Chambonnier G., Roux L., Redelberger D. et al. The Hybrid Histidine Kinase LadS Forms a Multicomponent Signal Transduction System with the GacS/GacA Two-Component System in *Pseudomonas Aeruginosa* // PLoS Genet. 2016. Vol. 12. № 5. P. 1–30.
11. Cooper C. E., Nicholls P., Freedman J. A. Cytochrome c oxidase: structure, function, and membrane topology of the polypeptide subunits // Biochem. Cell Biol. 1991. Vol. 69. № 9. P. 586–607.
12. Cabeen M. T., Leiman S. A., Losick R. Colony-morphology screening uncovers a role for the *Pseudomonas aeruginosa* nitrogen-related phosphotransferase system in bio-film formation // Mol. Microbiol. 2016. Vol. 99. № 3. P. 557–570.

НЕОБХОДИМОСТЬ РУЧНОЙ ВАЛИДАЦИИ ДАННЫХ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СБОРКИ И АННОТАЦИИ ГЕНОМОВ НА ПРИМЕРЕ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОМОВ НАСЕКОМЫХ

С. С. Левыкина, Н. В. Воронова

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

E-mail: s.lewykina@yandex.by

Рассмотрена необходимость ручной валидации полученных данных автоматической сборки и аннотации геномов. Ручная валидация применима при анализе небольших геномов, таких, как митохондриальные геномы. Необходимо совершенствовать методы биоинформатики, чтобы необходимость ручной валидации отсутствовала.

Ключевые слова: методы биоинформатики; митохондриальный геном; тли.

На сегодняшний день для реализации таких процессов, как сборка и аннотация геномов, разработано множество доступных программных пакетов, позволивших автоматизировать выполнение такого рода задач [1–2]. Однако, при всём многообразии информационных технологий для обработки данных секвенирования, а также анализа нуклеотидных последовательностей, полученные результаты часто нуждаются в ручном пересмотре со стороны эксперта в данной конкретной области исследования.

В данной работе необходимость ручной валидации данных рассматривается на примере митогеномов насекомых, в частности тлей (Aphidoidea) [3].

Митохондриальный геном тлей представляет собой двуцепочечную ДНК-молекулу, размером обычно не превышающую 15–20 Кб. Структура генома обычно включает в себя 37 генов, среди которых 22 – гены