DOI: 10.34617/b59w-ns44
УДК 575.113

ЭВОЛЮЦИОННЫЙ АНАЛИЗ АКТИНОФАГА SF1, ПЕРСПЕКТИВНОГО ИНСТРУМЕНТА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИНОБАКТЕРИЙ – ПРОДУЦЕНТОВ АКТУАЛЬНЫХ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРИИ АНТИБИОТИКОВ

Зимин Андрей Антонович[1], канд. биол. наук
Лу Инхуа[2], PhD
[1]Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пущино, Российская Федерация
[2]Педагогический университет Шанхая, г. Шанхай, Китай

Был проведен новый эволюционный анализ фага Streptomices SF1. Анализ эволюционных сходств основного белка капсида бактериофага SF1 показал его наибольшее сходство с соответствующими белками актинофагов. Наиболее близким белком к MCP SF1 является белок другого фага стрептомицет VWB. Последовательности белков этих фагов формируют общую ветвь с MCP актинофагов Gordonia и Tsukamurella. Сравнительное исследование полных геномов методом Maximum Parsimony показало наибольшее сходство генома актинофага SF1 с геномом фага AbbeyMikolon. Геном другого фага, выделенного из почв Египта, SF3 оказался наиболее близким к типовому геному фага VWB. Данные анализы уточнили современное на 2020 год филогенетическое положение фага SF1 в свете расширения баз данных геномных последовательностей.

Ключевые слова: фаг Streptomices SF1; основной белок капсида бактериофага; MCP-анализ; метод Maximum Parsimony; полногеномный филогенетический анализ

EVOLUTIONARY ANALYSIS OF ACTINOPHAGE SF1, A PROMISING INSTRUMENT FOR STUDY OF ACTINOBACTERIAL ANTHIBIOTICS PRODUSERS

Zimin Andrei Antonovich[1], PhD Biol. Sci.
Lu Ynhua[2], PhD
[1]G. K. Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS – a separate subdivision of the Federal Research Center «Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences», Pushchino, Russia
[2]College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai, China

A new evolutionary analysis of the Streptomices SF1 phage was performed. An analysis of the evolutionary similarities of the major capsid protein of bacteriophage SF1 showed its greatest similarity with the corresponding actinophage proteins. The closest protein to MCP SF1 is a protein of another phage Streptomices VWB. The protein sequences of these phages form a common branch with the MCP of the actinophages Gordonia and Tsukamurella. A comparative study of the complete genomes using the Maximum Parsimony method showed the greatest similarity of the actinophage SF1 genome with the AbbeyMikolon phage genome. The genome of another phage isolated from Egyptian soils, SF3, turned out to be closest to the typical genome of the VWB phage. These analyzes clarified the current phylogenetic position of phage SF1 in 2020 in light of the expansion of genomic sequence databases.

Key words: phage Streptomices SF1; bacteriophage capsid protein; MCP analysis; Maximum Parsimony method; genome phylogenetic analysis

Бактериофаги, естественные хищники бактерий, участвуют в постоянной эволюционной гонке борьбы со своими хозяевами, в том числе с бактериями, вызывающими заболевания у сельскохозяйственных животных и бактериями – продуцентами антибиотиков. Высокая частота генетического обмена между фагами, занимающими сходные экологические ниши, приводит к высокому уровню мозаичности их геномов. Кроме того, бактериофаги могут быть использованы для изучения продукции противовирусных соединений актиномицетами. Скрининг природных продуктов продолжает оставаться важным путем к открытию химических веществ для разработки новых терапевтических агентов. В этом отношении актиномицеты представляют собой группу микроорганизмов, широко используемых в биотехнологии для выработки биологически активных соединений. Наконец, актинофаги выделяют и исследуют, поскольку они могут влиять на выработку антибиотиков у актинобактерий. В последнее время растет интерес к бактериофагам, которые инфицируют бактерии рода Streptomyces, поскольку эти бактериофаги могут оказаться вспомогательными генетическими элементами для конструирования клонирующих векторов. Для многих видов рода Streptomices ещё не выделены бактериофаги. Например, сравнительно недавно было проведено исследований фагов, выделенных из S. flavovirens, важного источника нескольких фармацевтических препаратов, таких как актиномицин, муреидомицин и правастатин [2]. Развитие высокопроизводительных технологий NGS (Next Generation Sequencing) и возможность секвенировать целые геномы или транскриптомы более эффективно и экономично. Этот подход позволяет собирать большие объемы информации и анализировать последовательности из сотен тысяч видов бактериофагов. Последовательности геномов бактериальных вирусов удается собирать в контиги, содержащие полные геномы этих существ с помощью простых приемов секвенирования нового поколения. Эти геномы фагов обычно на порядок меньше по сравнению с размером генома бактерии и секвенирование нового поколения открыло большие возможности по исследованию геномов бактериофагов, инфицирующих самые различные виды бактерий. Базы данных актинофагов (http://phagesdb.org/) в настоящее время включают исследования более 7000 геномов предполагаемых актинофагов, более 200 из которых инфицируют различные виды актинобактерий рода Streptomyces. Но, несмотря на это, в настоящее время нет известных геномов фагов многих видов бактерий рода Streptomyces. На сегодняшний день база данных геномов NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) содержит около 2000 геномов бактериофагов отряда Caudovirales, но количество опубликованных полных геномов бактериофагов растет медленно. Актинобактерии вызывают ряд заболеваний у человека и сельскохозяйственных животных. Одним из таких заболеваний является актиномикоз.

Актиномикоз является инвазивным бактериальным заболеванием, которое отмечается уже более века. Actinomyces spp. являются нитевидными грамположительными бактериями, в основном принадлежащими к комменсальной флоре человека и сельскохозяйственных животных. Развиваются они в глотке, желудочно-кишечном тракте и урогенитальных органах. Актинофаги часто характеризуются поливалентностью. То есть актинофаги, специфичные к одним видам актинобактерий заражают и другие актиномицеты. Актиномикоз в первую очередь вызывают бактерии рода Actinomyces, но в развитии актиномикозных проявлений участвуют и бактерии родов Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia и Propionibacterium. Инфекции

Actinomyces могут быть полимикробными и ассоциироваться с другими бактериями, называемыми «микробами-компаньонами», которые способствуют возникновению и развитию инфекции путем подавления защитных сил хозяина. Использование поливалентных актинофагов является потенциальной перспективой борьбы с актиномикозом.

В данной работе исследованы основные капсидные белки и геномы ряда бактериофагов, родственных актинофагу SF1. Исследование направлено на характеристику подобных ему бактериофагов и поиск возможных претендентов на включение в фаговые антиактиномикозные препараты и получения новых инструментов для синтетической биологии актинобактерий.

Методика исследований.

MCP-анализ. Сходства между фагами в пределах одного кластера отчетливо видны на деревьях, и образование пар между кластерами обычно демонстрируют не очень большое сходство последовательностей ДНК. Это не означает, что разные кластеры совершенно не связаны между собой. Дистанционно родственные гомологи некоторых белков кодируются фагами из нескольких кластеров. Например, белки сборки капсида, терминазы, портального белка и основного белка капсида (MCP) являются единственными белками, кодируемыми всеми хвостатыми фагами, которые были до сих пор изучены. Белки репликации ДНК, такие как ДНК-полимеразы, хеликазы, и лизиса: холины и эндолизины, также кодируются фагами во множестве, но присутствуют не во всех кластерах при сравнении геномов. Анализ показывает, что эти гены обычно достаточно расходятся по последовательности, что они обычно не образуют обнаруживаемых на точечных матрицах (дот-матрицах) сравнения ДНК диагональных линий гомологии между кластерами. Одним из основных методов анализа родства бактериофагов в частности и вирусов вообще является сравнительное исследование основных капсидных белков (MCP – анализ). К сожалению, взаимоотношения геномов у бактериофагов сложнее, чем у бактерий. Фагам характерна большая активность горизонтального переноса генов. Вследствие этого, MCP – анализ не может быть полным аналогом эволюционного и таксономического анализа 16S мРНК у бактерий. MCP – анализ родства бактериофагов может быть дополнен анализом других консервативных белков или сравнительным исследованием геномов. Например, крупнейшее исследование Adrianenssens et al. (2011) [1] было проведено таким путем. Авторы сконструировали три филогенетических дерева, каждое с одним продуктом гена всех фагов, родственных T7 (в том числе 24, которые инфицируют бактерий семейства Enterobacteriaceae). Для получения этих деревьев были использованы РНК-полимеразы, ДНК-полимеразы и MCP. При этом, филогенетические деревья РНК и ДНК-полимераз были очень похожие друг на друга. Дерево на основе одного MCP имело отличие от двух предыдущих деревьев [1]. Это несоответствие между деревьями ДНК и РНК-полимераз и деревом MCP показывает сложную природу взаимоотношений геномов фагов внутри суперсемейств. Подобные сложные комбинации генов внутри фаговых геномов являются продуктом активного горизонтального переноса генов у бактериофагов. Пакет программных средств MEGA X [6] позволяет проводить подобные анализы и белков, и геномов.

Результаты исследований и их обсуждение. Основной в мире базой данных геномов является БД Национального Центра биотехнологических исследований (NCBI), Национальной Медицинской библиотеки, Национальных институтов здоровья США (https://www.ncbi.nlm.nih.gov). Бактериофаги представлены в ней 2488 полными геномами. Около 250 геномов принадлежат фагам актиномицет. Геномы актинофагов бактерий рода Streptomices в

БД «Viruses» NCBI представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Выборка фагов Streptomices, полностью аннотированные геномы которых представленных БД NCBI

№пп	Название фага	Размер генома н.п	Белки	Дата в БД
1	Streptomyces phage Aaronocolus	49562	73	05/02/2019
2	Streptomyces phage Amela	49452	75	01/05/2016
3	Streptomyces phage BillNye	127084	217	05/02/2019
4	Streptomyces phage Bing	56341	87	05/02/2019
5	Streptomyces phage Caliburn	49949	72	01/05/2016
6	Streptomyces phage Danzina	50773	76	05/02/2019
7	Streptomyces phage DrGrey	56076	82	05/02/2019
8	Streptomyces phage Hydra	50727	76	05/02/2019
9	Streptomyces phage Izzy	50113	75	01/05/2016
10	Streptomyces phage Jay2Jay	133531	235	02/05/2016
11	Streptomyces phage Lannister	50165	73	01/05/2016
12	Streptomyces phage Lika	51252	75	05/31/2013
13	Streptomyces phage Mildred21	131976	234	05/02/2019
14	Streptomyces phage Nanodon	50082	75	09/23/2016
15	Streptomyces phage NootNoot	131086	221	05/02/2019
16	Streptomyces phage Paradiddles	133486	216	05/02/2019
17	Streptomyces phage Peebs	133047	226	05/02/2019
18	Streptomyces phage R4	51071	86	11/13/2012
19	Streptomyces phage Rima	56168	87	05/02/2019
20	Streptomyces phage SF1	43150	52	01/05/2016
21	Streptomyces phage SF3	60934	90	01/05/2016
22	Streptomyces phage SV1	37612	55	10/15/2012
23	Streptomyces phage Samisti12	133710	226	05/02/2019
24	Streptomyces phage Scap1	43060	56	05/02/2019
25	Streptomyces phage Sujidade	51552	77	05/31/2013
26	Streptomyces phage TP1604	57168	71	01/05/2016
27	Streptomyces phage VWB	49220	61	01/21/2004
28	Streptomyces phage YDN12	56528	70	01/05/2016
29	Streptomyces phage Zemlya	51077	76	06/03/2013
30	Streptomyces phage mu1/6	38194	52	04/20/2006
31	Streptomyces phage phiCAM	50348	72	05/02/2019
32	Streptomyces phage phiELB20	51160	81	05/02/2019
33	Streptomyces phage phiHau3	50255	72	10/15/2012
34	Streptomyces phage phiSAJS1	56451	76	01/05/2016
35	Streptomyces phage phiSASD1	37068	43	06/09/2010
36	Streptomyces virus TG1	40474	54	10/15/2012
37	Streptomyces virus phiBT1	41831	55	03/25/2003
38	Streptomyces virus phiC31	41491	53	11/30/1998

Там находится 38 полных геномов фагов, инфицирующих бактерии рода Streptomices. Размеры геномов варьируют от 37 до 133 т.п.н., большая часть геномов принадлежит умеренным фагам семейства Syphoviridae с размерами генома около 50 т.п.н., то есть размерами характерными для фага лямбда. Этот список не содержит геномов фагов, которые пока ещё не классифициhованы и существенно отличается от списка в БД фагов актиномицетов. Самый ранний геном был представлен в этой базе данных в 11/30/1998 – это ставший уже классическим, во мно-

гом благодаря работам профессора Маргарет Смит, бактериофаг Streptomyces virus phiC31. В этой базе нет последовательностей, представленных БД в 2020 году, и база на март 2020 содержит лишь геномы, аннотированные в 2019 году. В том числе в этой БД представлены геномы актинофагов Sf1 и Sf3 на дату 01/05/2016.

Исследование эволюционных связей основного белка капсида - MCP - актинофага SF1.Три актинофага, инфицирующих Streptomyces flavovirens, были выделены из почвы в Египте Sf1, Sf2 и Sf3. Эти Фаги Sf1, Sf2 и Sf3 образовывали четкие круглые одиночные бляшки диаметром 2, 1 и 3 мм соответственно. Были использованы двадцать семь пар селективных праймеров для изучения генетического полиморфизма их геномов. UPGMA-фенограмма сгруппировала изоляты в две группы: первая представляет изолят Sf3, а вторая группа представляет два других изолята [2].

У фагов S. flavovirens (Sf1 и Sf3) оказались более высокие скорости адсорбции (82 и 85 %, соответственно), чем у других актинофагов. Это указывает на сильную специфичность к бактерии-хозяину. Цикл развития был 45 и 30 минут, соответственно. Оба фага были стабильными и показали значительное увеличение их активности после обработок хлоридом натрия (NaCl) и хлоридом магния ($MgCl_2$,$6H_2O$). Добавление хлорида цинка ($ZnCl_2$) ингибировало их развитие. Размеры геномов значительно отличались и были размером 43 150 п.н. и 60 934 п.н. соответственно. Биоинформатический анализ позволил присвоить возможные функции 19-и и 28-и предполагаемым идентифицированным открытым рамкам трансляции. Это были структурные белки фагов, компоненты лизиса и метаболические белки.

Сравнительный геномный анализ выявил значительную гомологию между двумя фагами, показав наибольшие совпадения среди Sf1, Sf3 и самого близкого к ним фага Streptomyces (VWB-фагов) в специфической области длиной 13Kb. Это наблюдение говорит, видимо, о горизонтальном переносе генов для этой области этих двух геномов. Филогенетический анализ с использованием последовательности Major Capsid Protein (MCP) выявил, что выделенные фаги относятся к фаговой группе BG Streptomyces, но четко разделены, представляя новый субкластер [3].

Данный анализ был проведен ранее и опубликован в марте 2017 года. То есть, уже три года назад. Это вызывает необходимость повторения этого анализа спустя 3 года в связи со значительными изменениями в БД за это время. Последовательности гомологичные MCP-белку SF1 были найдены в БД с помощью алгоритма BLASTp. Лимит для отсечения списка был E ≤ 2e-26. Филогенетический анализ методом UPGMA с 1000 кратным статистическим тестом «бутстрап» [4] был проведен в пакете программ MEGA X [6]. Филогенетическое дерево показано на рисунке 1.

Наиболее близким белком к MCP SF1 является белок другого фага стрептомицет VWB. Последовательности белков этих фагов формируют общую ветвь с MCP актинофагов Gordonia и Tsukamurella. На ветви ограниченной положением последовательности MCP другого фага стрептомицет, ZL12, находятся белки исключительно фагов бактерий Gordonia и Arthrobacter. Более удаленные оказались белки фагов бактерий рода Corynebacterium, Rodococcus и серии актинофагов Fury актинобактерий рода Gordonia. Взятые в анализ гомологи основного белка капсида бактериофага SF1 фагов не актинобактерий, а бактерий других таксономических групп, образуют отдельную ветвь. В эту ветвь вклиниваются лишь две аминокислотные последовательности из актинофагов бактерий рода Arthrobacter.

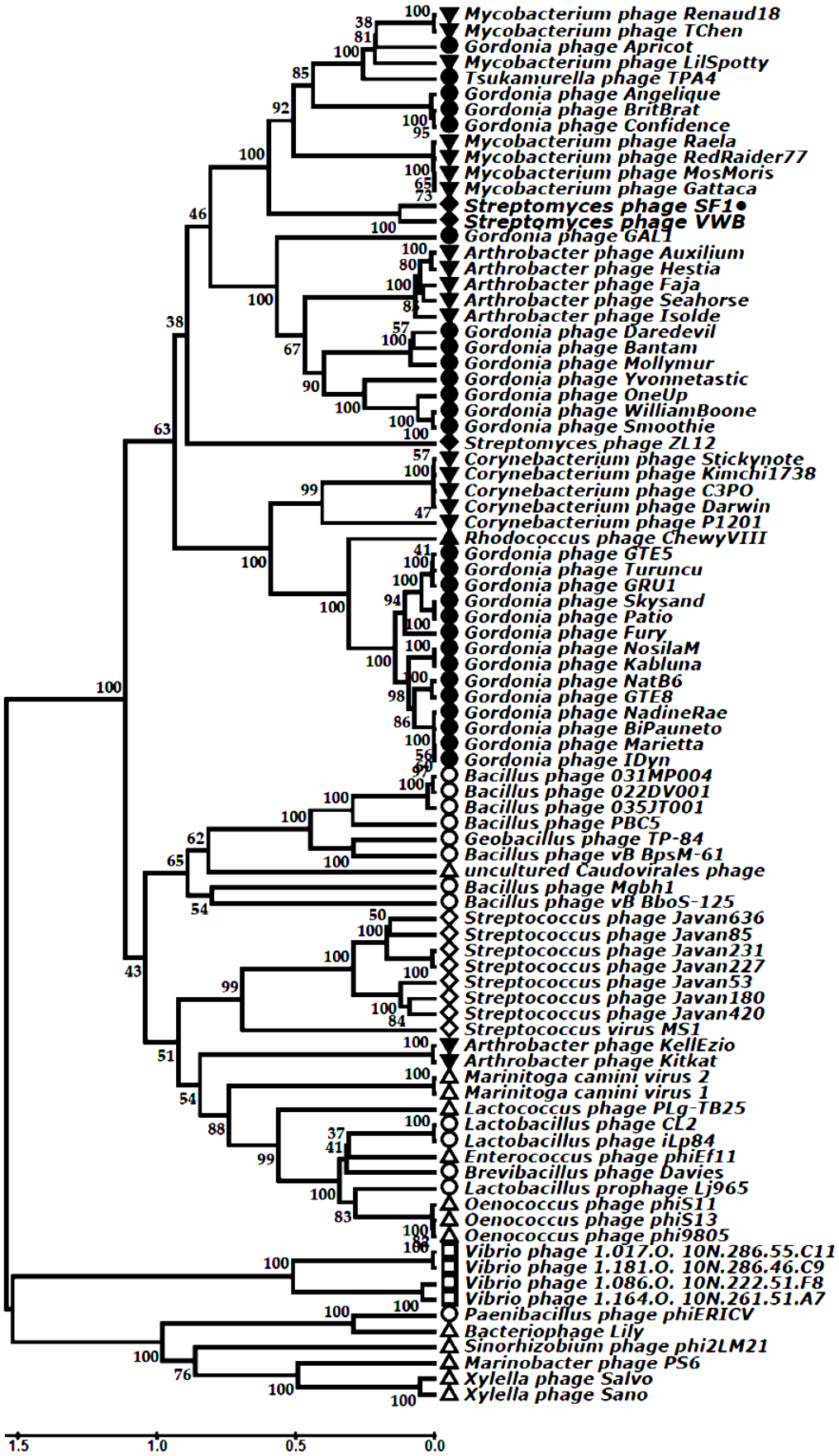

Рисунок 1 – UPGMA-филогенетическое дерево эволюционного сходства белков – гомологов MCP-белка фага Streptomices SF1. SF1 – отмечен черной точкой и более

крупным шрифтом вместе с фагом Streptomices VWB. Актинофаги отмечены черными фигурами. Фаги актинобактерий рода Streptomices – ромбами, родов Gordonia и Tsukamurella – кружками, треугольниками вершиной вниз – Arthrobacter, Corynebacterium и Mycobacterium, а Rodococcus – вершиной вверх. Фаги других бактерий обозначены белыми фигурами. Фаги бацилл родов Bacillus, Geobacillus, Lactobacillus и Paenibacillus – кружками, Streptococcus – ромбами, Vibrio – квадратами, остальных родов: Marinitoga, Oenococcus, Marinobacter, Xylella, Enterococcus и Sinorhizobium и некультивируемый фаг – uncultured_Caudovirales – треугольниками вершиной вниз.

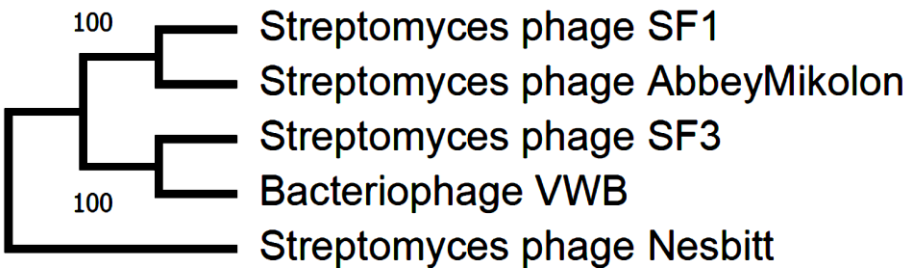

Рисунок 2 – Анализ геномов бактериофагов близких к SF1 методом Maximum Parsimony

Эволюционная история этих геномов была выведена с использованием метода максимальной экономии. Показано наиболее экономное дерево с длиной ветвей 82452. Индекс согласованности составляет (0,750272), индекс удержания – 0,475487, а составной индекс – 0,418603 (0,356744) для всех сайтов и сайтов с ограниченным доступом (в скобках). Процент дублирующих деревьев, в которых ассоциированные таксоны сгруппированы вместе в тесте начальной загрузки (1000 повторов), показаны рядом с ветвями [3]. Дерево MP было получено с использованием алгоритма Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) (стр. 126 в [5]) с уровнем поиска 1, на котором начальные деревья были получены путем случайного добавления последовательностей (10 повторов). Этот анализ включал 5 геномных последовательностей. Все позиции, содержащие пропуски и пропущенные данные, были удалены (опция полного удаления). Всего в итоговом наборе данных было 42446 позиций. Эволюционный анализ был проведен в пакете программ MEGA X [6].

Сравнительный анализ геномов. Ранее было показано, что геномы бактериофагов Sf1 и Sf3 имеют существенное сходство с геномом бактериофага VWB Streptomyces. Для того чтобы прояснить эволюционное положение этих фагов внутри группы VWB-фагов мы предприняли филогенетический анализ полных геномов. Построение множественного выравнивания мы провели программным средством MUSKUL, а филогенетический анализ и построение дерева с помощью алгоритма максимальной экономии [5]. Полученное дерево показано на рисунке 2.

Заключение. В последнее время большие успехи произошли в геномике фагов; тем не менее, полное разнообразие фагового разнообразия и эволюционные пути его изменения пока неизвестны. С появлением технологий NGS стал доступен гораздо больший объем последовательностей геномов, и поэтому мы можем ожидать увеличения потока новых данных в ближайшие годы. Имеющиеся последовательности показывают, что большинство проанализированных фагов представляют собой хвостатые фаги, принадлежащих к семейству Siphoviridae, но о степени их генетического разнообразия известно пока не много. Геномная характеристика фагов необходима для оценки их экологической роли. Несмотря на их

повсеместное распространение, фаги еще не были охарактеризованы для многих бактериальных родов. В настоящем исследовании представлены данные о биоинформатическим анализе геномов двух актинофагов Streptomyces, потенциально интересных для генетического конструирования и контроля актинобактерий в сельском хозяйстве.

Выводы. 1.Анализ эволюционных сходств основного белка капсида бактериофага SF1 показал его наибольшее сходство с соответствующими белками актинофагов показал, что наиболее близким белком к MCP SF1 является белок другого фага стрептомицет VWB. Последовательности белков этих фагов формируют общую ветвь с MCP актинофагов Gordonia и Tsukamurella. на ветви ограниченной положение последовательности MCP другого фага стрептомицет ZL12 находятся белки исключительно фагов Gordonia и Arthrobacter.

2.Взятые в анализ гомологи основного белка капсида бактериофага SF1 фагов не актинобактерий, а бактерий других таксономических групп образуют отдельную ветвь. В эту ветвь вклиниваются лишь две аминокислотные последовательности из актинофагов бактерий рода Arthrobacter.

3.Сравнительное исследование полных геномов методом максимальной экономии показало наибольшее сходство генома актинофага SF1 с геномом фага AbbeyMikolon. Остальные фаги группы фага VWB распределяются по другим ветвям.

4.Геном другого фага, выделенного из почв Египта, SF3, оказался наиболее близким к типовому геному фага VWB.

Работа была частично поддержана средствами гранта РФФИ (проект № 20-54-53018 ГФЕН_а) и выполнялась в рамках данного проекта.

Список литературы

1.Adriaenssens E.M. Bacteriophages LIMElight and LIMEzero of Pantoea agglomerans, belonging to the «phiKMV-like viruses» / E.M. Adriaenssens, P.J. Ceyssens, V. Dunon, H.W. Ackermann, J. Van Vaerenbergh, Maes M., M. De Proft, R. Lavigne // Appl Environ Microbiol. 2011. May. 77(10): 3443-50. doi: 10.1128/AEM.00128-11.

2.Marei E.M. Molecular characterization of some Streptomyces flavovirens actinophages / E.M. Marei, A. Sharaf // 6th Euro Virology Congress and Expo. March 10-12. 2016. Madrid, Spain. Posters and Accepted Abstracts: Virol-mycol.

3.Sharaf A. Functional and comparative genome analysis of novel virulent actinophages belonging to Streptomyces flavovirens / A. Sharaf, F. Mercati, I. Elmaghraby, R.M. Elbaz, E.M. Marei // BMC Microbiol. 2017.Mar 3; 17(1): 51. doi:10.1186/s12866-017-0940-7.

4. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 1985. 39: 783791.

5. Nei M., Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York. 2000. P. 347-364.

6. Kumar S. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms / S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, K.Tamura // Molecular Biology and Evolution 2018 -35:1547-1549.