

DOI: 10.48612/sbornik-2022-2-15
УДК 575.174.4:639.3.043.2

**ЭВОЛЮЦИОННЫЙ АНАЛИЗ РЕВЕРТАЗЫ АНТИФАГОВЫХ РЕТРОНОВ 2 ТИПА
STREPTOMYCES VENEZUELAE ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ПОДХОДОВ К ВЫБОРУ
ЭФФЕКТИВНЫХ ПРОБИОТИКОВ В АКВАКУЛЬТУРЕ**

Карманова Александра Николаевна^{1,2}

Никулин Никита Алексеевич¹

Осепчук Денис Васильевич^{3,4} д-р с.-х. наук

Зимин Андрей Антонович¹, к. биол. наук

Лу Иньхуа⁵ PhD Biol. Sci.

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушчинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пушино, Российская Федерация,

²Пушчинский государственный естественно-научный институт, г. Пушино, Российская Федерация,

³ФГБНУ "Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии", г. Краснодар, Российская Федерация,

⁴ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина», г. Краснодар, Российская Федерация

⁵College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai, China

Был проведен филогенетический анализ обратной транскриптазы *Streptomyces venezuelae*, антифаговых ретронов 2 типа, для разработки подходов к выбору эффективных и защищенных от бактериофагов пробиотиков в аквакультуре. С помощью проведенного эволюционного анализа показано, что можно использовать один и тот же ретрон II-типа из любого штамма *Streptomyces*, например, из *Streptomyces venezuelae*, для конструирования эффективных пробиотиков для аквакультуры.

Ключевые слова: бактериофаги; обратная транскриптаза; антифаговые ретроны II типа; *Virus*, *Streptomyces Venezuelae*

EVOLUTIONARY ANALYSIS OF *STREPTOMYCES VENEZUELAE* ANTIPHAGE RETRONS TYPE 2 REVERSE TRANSCRIPTASE FOR THE DEVELOPMENT OF APPROACHES TO THE SELECTION OF EFFECTIVE PROBIOTICS IN AQUACULTURE

Karmanova Aleksandra Nikolaevna^{1,2}

Nikulin Nikita Alekseevich¹

Osepchuk Denis Vasilyevich^{3,4}, Dr. Agr. Sci.

Zimin Andrei Antonovich¹, PhD Biol. Sci.

Lu Yinhua⁵, PhD Biol. Sci.

¹Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms named after G. K. Scriabin RAS - a separate subdivision of the Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Pushchino, Russian Federation

²Pushchino State Institute of Natural Science, Pushchino, Russian Federation

³Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russian Federation

⁴Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russian Federation

⁵College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai, China

A phylogenetic analysis of *Streptomyces venezuelae* reverse transcriptases (RTs), type 2 antiphage retrons, was carried out to develop approaches to the selection of effective and bacteriophage-protected probiotics in aquaculture. Using the evolutionary analysis performed, it has been shown that the same type II retron from any strain of *Streptomyces*, for example, from *Streptomyces venezuelae*, can be used to design effective probiotics for aquaculture.

Key words: bacteriophages; reverse transcriptase; type II antiphage retrons; *Virus*; *Streptomyces Venezuelae*

Статистика показала, что мировое производство аквакультуры продолжает быстро расти без признаков достижения своего пика. Между тем, с середины девяностых годов производство в мировом рыболовстве стабилизировалось примерно на 90 миллионов тонн. Согласно докладу Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций (Food and Agriculture Organization, FAO 2014), мировое производство аквакультуры достигло еще одного исторического максимума в 90,4 миллиона тонн, включая 66,6 миллиона тонн пищевой рыбы и 23,8 миллиона тонн водных водорослей в 2012 году в ответ на растущий внутренний и международный спрос на морепродукты. В настоящее время сообщается, что пищевая рыба обеспечивает в среднем одну пятую общего потребления животного белка для населения мира. Тем не менее, крупные вспышки заболеваний были зарегистрированы в секторе аквакультуры во многих частях мира из-за увеличения плотности запаса рыбы, чрезмерной скученности и отсутствия санитарного управления с быстрым ростом аквакультуры. Быстрое распространение инфекций привело к тому, что глобальные оценки потерь от болезней составляют около четверти миллиарда долларов США в год. Бактериальные патогены, такие как *Vibrio sp.* (*Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*), вызывающие светящийся вибриоз на креветочных фермах, приводили к 50-100 %-ной смертности и вибрионным инфекциям у человека [1]. Незабывательное использование антибиотиков в качестве

агентов биологического контроля патогенов рыб привело к появлению бактерий, устойчивых к антибиотикам. Устойчивые формы могут быть опасны не только для рыб, но и для человека, проблема антибиотикорезистентности – она из актуальнейших задач, которая стоит сегодня перед исследователями. Существует несколько путей решения этой проблемы. Одна из таких – использование пробиотиков. Пробиотики – живые микробные добавки, которые оказывают благотворное воздействие на микрофлору кишечника животных. Помимо этого, пробиотические культуры бактерий в следствие развития и могут вытеснить из желудочно-кишечного тракта и патогенов, в том числе антибиотикорезистентных. Было доказано, что пробиотики эффективны в улучшении роста, выживания и состояния здоровья водных животных, к которым относятся как рыбы, так и ракообразные потребительского значения. В качестве пробиотиков, как правило, принято использовать культуры бактерий, которые совпадают с микробиомом кишечника животного. Возможный вариант пробиотика – это *Streptomyces sp.* Представители рода *Streptomyces* представляют собой нитчатые актинобактерии, способные продуцировать вторичные метаболиты и внеклеточные ферменты, такие как амилаза, протеаза и липаза. Эти ферменты полезны для разложения органических и неорганических веществ в природных условиях [5]. *Streptomyces* использовались в качестве пробиотика для борьбы с бактериальными заболеваниями в животноводстве, птицеводстве и аквакультуре [2,

3, 4]. Исследования показали, что корм, дополненный *Streptomyces*, может защитить рыбу и креветок от патогенов, а также увеличить рост водных организмов. Тем не менее, выбор подходящих штаммов *Streptomyces* достаточно ограничен. Необходимо учитывать не только характеристики выбранной бактерии, которые связаны с улучшением функций желудочно-кишечного тракта животного, но и ее устойчивость к бактериофагам, которых достаточно много в водных системах. Устойчивость к фагам может быть обусловлена разными факторами, например, за счет ретронов второго типа или CRISPR Cas-систем.

Бактериальные РНК-зависимые ДНК-полимеразы, обратные транскриптазы (reverse transcriptase, RT), были обнаружены в конце 1980х годов, в ретроэлементе, известном как ретрон, который синтезирует большое количество многокопийных молекул одноцепочечной ДНК (мсДНК). Считается, что ретроны не обладают независимой мобильностью, и их функция остается неизвестной [6]. Наиболее хорошо охарактеризованными мобильными бактериальными ретроэлементами являются каталитические РНК, известные как интроны группы II. Эти мобильные элементы были впервые идентифицированы в митохондриальном и хлоропластном геномах низших эукариот и растений, а затем описаны у бактерий и архей. Интроны группы II состоят из структурированной РНК, которая сворачивается в консервативную трехмерную структуру, организованную в шесть доменов с двойной спиралью, от DI до DVI. Большинство интронов бактериальной группы II имеют открытую рамку считывания (ORF), кодирующую кодируемый интроном белок (IEP) в DIV. Этот IEP состоит из RT, за которым следует предполагаемый РНК-связывающий домен с активностью сплайсинга РНК или матуразы (X-домен) и, в некоторых линиях интронов, С-концевой ДНК-связывающий и эндонуклеазный домен. Считается, что как

ядерные сплайсосомные интроны, так и ретротранспозоны, не являющиеся LTR, произошли от мобильных интронов группы II, которые также могут влиять на эволюцию бактерий. Другой тип бактериального ретроэлемента, DGR (Diversity Generation Retroelement), был впервые описан в 2002 г. DGR состоит из RT, дополнительного белка (кодируемого геном *atd*), матрицы РНК и гена, кодирующего белок-мишень (*mtd*), который содержит С-концевую вариабельную область (VR). DGR не кажутся мобильными, но они продуцируют различные последовательности в области VR, потенциально придавая устойчивость к фагам [6, 7].

У бактерий есть другие механизмы антифагового иммунитета, включая системы CRISPR (кластеры с регулярными интервалами, короткие палиндромные повторы) и Abi (абортивная инфекция бактериофагами). CRISPR и их *cas*-ассоциированные гены кодируют специфический для последовательности механизм защиты от бактериофагов и плазмид, состоящий из массива коротких повторяющихся последовательностей (длиной ~40 п.н.), разделенных одинаково короткими спейсерными последовательностями. Было показано, что два неохарактеризованных класса бактериальных RT связаны с элементами CRISPR/*cas*, а некоторые RT слиты с генами *cas*, но их роль в функции CRISPR неизвестна. Система Abi блокирует фаги на разных стадиях инфекционного цикла и обычно опосредуется одним геном, кодируемым плазмидой. Известно, что системы AbiA, AbiK и Abi-P2 включают RT. Было показано, что мутации гена, кодирующего RT AbiK, блокируют инфекцию, и недавно было показано, что этот фермент обладает подлинной RT-активностью [7].

Таким образом, если существует необходимость в получении устойчивого к бактериофагам штамма стрептомицет, следует подбирать их исходя из наличия антифагового ретрона. Для подбора антифагового ретрона необходим эволюци-

онный анализ как нуклеотидных последовательностей ретронов, так и аминокислотных последовательностей их обратных транскриптаз. В данной статье будет рассмотрен пример подбора антифаговых ретронов II типа за счет методов биоинформатики для конструирования наиболее эффективных пробиотических штаммов *Streptomyces*.

Методика При помощи алгоритмов BLAST среди базы данных nr (non-redundant protein sequences) были отобраны аминокислотные последовательности являющиеся наиболее близкими гомологами обратной транскриптазы ретронов II типа *Streptomyces venezuelae*. Было проведено сравнение последовательностей и их множественное выравнивание по алгоритмам MUSCLE и в дальнейшем построение дерева методами UPGMA (рис. 1) [8]. Для UPGMA использовалась Jones-Taylor-Thornton (JTT) модель аминокислотных замен, зависящая от контекста. Эволюционные расстояния были выражены в единицах количества аминокислотных замен на сайт [9]. В этом анализе участвовала 21 аминокислотная последовательность. Все позиции, содержащие пробелы и отсутствующие данные, были устранены (опция полного удаления). Всего в финальном наборе данных было 102 позиций. Эволюционный анализ для обоих деревьев проводился в MEGA X [10].

Эволюционная история выводилась с использованием метода UPGMA [8]. Консенсусное дерево начальной загрузки, по-

лученное из 1000 повторов [10], взято для представления эволюционной истории анализируемых таксонов [10]. Ветви, соответствующие разделам, воспроизведенным менее чем в 50 % репликах начальной загрузки, свернуты. Рядом с ветвями показан процент повторяющихся деревьев, в которых связанные таксоны сгруппированы вместе в тесте начальной загрузки (1000 повторов) [10].

Streptomyces venezuelae обозначены черными кружками, остальные *Streptomyces* - белыми кружками, остальные бактерии - белыми треугольниками, археи - белыми ромбами, а представители рода *Escherichia* - черными ромбами.

Результаты исследований и их обсуждение. Неожиданной находкой оказалась большая удаленность обратных транскриптаз бактерий рода *Escherichia* от остальных исследованных ревертаз. Другой отдельной ветвью явились обратные транскриптазы архей и одной из флавобактерий. Ревертазы *Streptomyces* образуют отдельную ветвь. Эта ветвь не включает в себя других представителей актинобактерий или каких-либо других бактерий. Статистическая достоверность ветвлений в области дерева содержащей ферменты из *Streptomyces* достаточно высока. Всё это может говорить о высокой близости ферментов бактерий этого рода и возможности их использования, а, следовательно, и использования ретронов второго типа во всех штаммах *Streptomyces*.

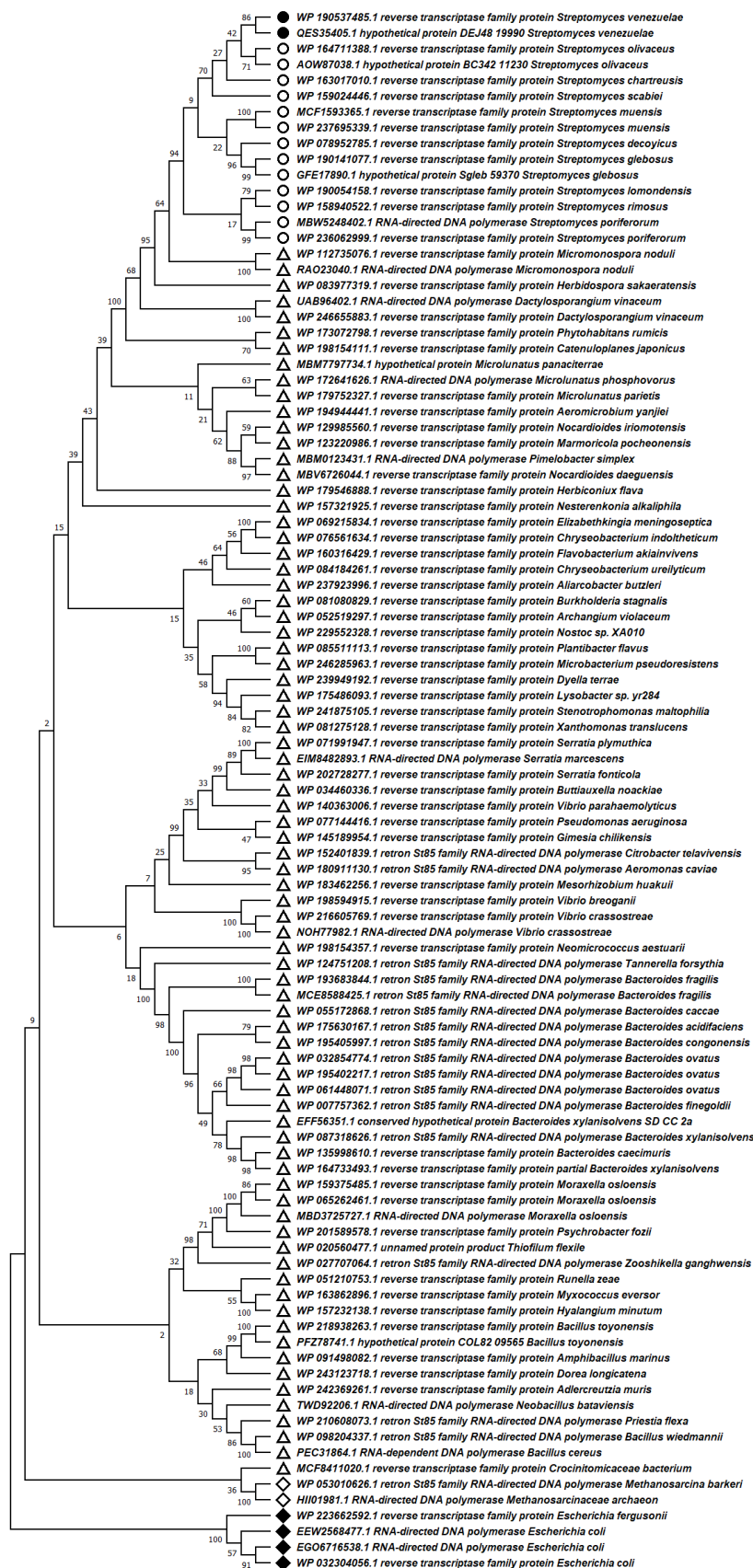


Рисунок 1 – UPGMA-анализ 99 аминокислотных последовательностей обратных транскриптаз бактерий и архей близких к обратной транскриптазе ретронов II-типа *Streptomyces venezuelae*

Выводы. Таким образом, вероятно, можно использовать один и тот же ретрон II-типа из любого штамма *Streptomyces*, например, из *Streptomyces venezuelae*, для конструирования эффективных и защищенных от бактериофагов пробиотиков для аквакультуры.

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00669, <https://rscf.ru/project/22-25-00669/>

Список литературы

1. Зимин А.А., Никулин Н.А., Цунги Я., Кононенко С.И., Скобликов Н.Э., Осепчук Д.В. Экономика аквакультуры гигантских креветок и роль бактериальных инфекций / А. А. Зимин, Н. А. Никулин, Я. Цунги [и др.] // Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. – 2019. – Т. 8. – № 2. – С. 187-192. – DOI 10.34617/8qzb-aa89. – EDN OPJPTI.
2. Das S., Lyla P.S. and Ajmal-Khan S., Application of *Streptomyces* as a probiotic in the laboratory culture of *Penaeus monodon* (Fabricius) / S. Das, P.S Lyla. and Ajmal-Khan S. // IJA- Bamidgeh, 2006; 58: 198-204.
3. Das S., Ward L.R. and Burke C., Screening of marine *Streptomyces* spp. for potential use as probiotics in aquaculture // S. Das, L.R. Ward and C. Burke, Aquaculture, 2010; 305(1-4): 32-41.
4. Defoirdt T., Sorgeloos P. and Bossier P., Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture / T. Defoirdt, P. Sorgeloos and P. Bossier // Curr. Opin. Microbiol., 2011; 14: 251-258.
5. Kesarcodi-Watson A., Kaspar H., Lategan M.J. and Gibson L., Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes / A. Kesarcodi-Watson, H. Kaspar, M.J. Lategan and L. Gibson // Aquaculture, 2008; 274: 1-14.
6. Dawn M. Simon, Steven Zimmerly, A diversity of uncharacterized reverse transcriptases in bacteria / D. Simon, S. Zimmerly // Nucleic Acids Research, Volume 36, Issue 22, 1 December 2008, Pages 7219–7229, <https://doi.org/10.1093/nar/gkn867>
7. Alejandro González-Delgado, Mario Rodríguez Mestre, Francisco Martínez-Abarca, Nicolás Toro, Prokaryotic reverse transcriptases: from retroelements to specialized defense systems / A. González-Delgado, M. R. Mestre, F. Martínez-Abarca, N. Toro // FEMS Microbiology Reviews, Volume 45, Issue 6, November 2021, fuab025, <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab025>
8. Sneath P.H.A. and Sokal R.R. Numerical Taxonomy / P.H.A. Sneath and R.R. Sokal // Freeman, San Francisco 1973.
9. J Jones D.T., Taylor W.R., and Thornton J.M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences / Jones D.T., Taylor W.R., and Thornton J.M. // Computer Applications in the Biosciences. 1992. 8: 275-282.
10. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms / S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura //Molecular Biology and Evolution 2018. 35:1547-1549.