

**ПОЛНЫЙ ГЕНОМ *Bifidobacterium angulatum* GT102.
I. ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ГЕНЫ И ГЕННЫЕ КЛАСТЕРЫ,
УЧАСТВУЮЩИЕ ВО ВЗАИМОСВЯЗИ С КЛЕТКАМИ ХОЗЯИНА**

© 2019 г. Н. В. Захаревич^{1, *}, О. В. Аверина¹, В. З. Незаметдинова¹, В. Н. Даниленко¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: zakharevich@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.01.2019 г.

После доработки 16.02.2019 г.

Принята к публикации 18.02.2019 г.

Проведено полногеномное секвенирование и описаны особенности генома штамма *Bifidobacterium angulatum* GT102. Вид *B. angulatum* встречается в кишечной микробиоте человека гораздо реже по сравнению с преобладающими видами *Bifidobacterium longum* и *Bifidobacterium adolescentis*. Вероятно, это связано с различной способностью данных видов к колонизации кишечника и взаимодействию с клетками организма-хозяина. Предметом данного исследования были генные кластеры и отдельные гены, участвующие в коммуникации бифидобактерий с клетками хозяина: гены, кодирующие внеклеточные и поверхностные структурные белки, секретируемые белки, капсульные полисахариды, фимбрии и пили, адгезины и гены, кодирующие moonlighting белки. Все изученные гены имеют важное значение для выживания бактерий в сложной конкурентной среде кишечника человека и определяют их адаптационные преимущества.

Ключевые слова: *Bifidobacterium angulatum*, кишечная микробиота, полногеномное секвенирование, экзополисахариды, фимбрии/пили, адгезины.

DOI: 10.1134/S0016675819070166

В кишечнике человека обитает более 100 триллионов микроорганизмов, что, по оценкам, в 10 раз больше количества клеток человека. На протяжении многих тысячелетий микроорганизмы, колонизирующие желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), развивались вместе с хозяином, формируя сложные и взаимовыгодные отношения [1]. Действие бактерий на клетки хозяина осуществляется через выделяемые метаболиты или поверхностные структуры [2, 3]. А вещества, продуцируемые хозяином, бактерии распознают посредством рецепторов, закрепленных на мембране бактериальной клетки [4]. Такая связь между бактериями и организмом хозяина формируется специфически для различных видов и штаммов.

Сегодня кишечная микробиота (КМ) постулируется как важный орган, определяющий здоровье или патологическое состояние человека. В поддержании здоровья важную роль играют пробиотические бактерии, которые определяют общий гомеостаз организма [5]. Наиболее значимыми представителями пробиотической составляющей КМ являются бифидобактерии [6]. Бифидобактерии играют важную роль в поддержании метаболического, биохимического и иммунологического равновесия. Они являются доминирующей груп-

пой КМ детей, родившихся естественным путем и находящихся на грудном вскармливании (до 90%), и достигают 5% от общей численности КМ у взрослых [7]. В КМ взрослого человека доминирующими видами бифидобактерий являются *Bifidobacterium adolescentis* и *Bifidobacterium longum* (в основном *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*). Намного реже встречаются представители вида *Bifidobacterium angulatum* [7]. Согласно литературным данным, *B. angulatum* относят либо к группе *B. longum*, либо к группе *B. adolescentis* [8–10]. В связи с этим возникает вопрос, что определяет конкурентные преимущества у доминирующих видов бифидобактерий в отличие от редких видов. Целью данной работы была идентификация и сравнительный анализ генов и генных кластеров, участвующих в колонизации кишечника человека и взаимосвязи с клетками организма-хозяина, у редкого вида *B. angulatum* и доминирующих видов *B. longum* и *B. adolescentis*.

В настоящее время сведений о бифидобактериях вида *B. angulatum* опубликовано очень мало. В открытых базах данных присутствуют последовательности геномов всего для двух штаммов этого вида. В этой работе представлены данные анализа полной последовательности генома штамма

B. angulatum GT102, выделенного из фекальных проб здорового взрослого жителя Центрального региона России. Штамм обладает способностью синтезировать и секретировать гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК) в больших количествах [11]. ГАМК является главным тормозным нейротрансмиттером центральной нервной системы, рецепторы которого широко распространены в структурах головного мозга, практически во всех нейрональных группах.

В представленной работе описаны особенности анализируемого штамма и приведены данные сравнительного геномного анализа с двумя штаммами того же вида и со штаммами доминирующих видов *B. adolescentis* и *B. longum*, выделенных из кишечника человека. Предметом сравнительных геномных исследований были генные локусы и отдельные гены, вовлеченные в коммуникацию бифидобактерий с клетками хозяина и отвечающие за синтез следующих структур: внеклеточные и поверхностные структурные белки, к которым относятся секретлируемые белки; капсульные полисахариды; фимбрии/пили; сортаза-зависимые пили; адгезины, в том числе moonlight белки. Все анализируемые гены имеют важное значение для выживания бактерий в очень сложной и конкурентной среде кишечника человека и определяют их адаптационные преимущества.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы, среды и условия культивирования. В работе использовали штамм *Bifidobacterium angulatum* GT102 [11, 12]. Штамм выделен в 2013 г. из фекалий здорового взрослого человека, проживающего на территории Центральной России. Видовая принадлежность штамма определена с помощью секвенирования гена 16S рибосомной РНК. Штамм депонирован в международной коллекции ВКПМ (VKPM) (<http://eng.genetika.ru/service-offer/vkpm/>). Международный номер депонирования: VKPM AC-1973. Бифидобактерии выращивали на MRS-агаре и в MRS-бульоне (HiMedia, Индия) с добавлением цистеина (0.5 г/л). Культивирование проводили в анаэробных условиях (HiAnaerobic System – Mark III, AnaeroHiGas Pack 3,5L; HiMedia, Индия) при температуре 37°C в течение 24–48 ч.

Секвенирование и сборка генома. Геномная ДНК из клеток бифидобактерий была выделена с помощью модифицированной в лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН методики Regnault [13, 14].

Очищенную геномную ДНК секвенировали с помощью метода “дробовика” (англ. shotgun sequencing) на платформе 454 GS Junior (Roche, Швейцария). Сборка отдельных прочтений фрагментов ДНК в контиги проводилась с помо-

щью программного обеспечения 454 GS De Novo Assembler v. 3.0 с параметрами по умолчанию. В результате сборки *de novo* было получено 15 контигов со средним покрытием 34× и со средним размером контига 146171 пн [12].

Порядок расположения контигов определяли путем наложения контигов на два референсных генома: *B. angulatum* штамм JCM7096 (AP012322) и *B. angulatum* штамм LMG11039 (JGYL01000000) с помощью программы Mauve v. 2.3.1 [15], а также с помощью 454ContigGraph (Roche, Швейцария). После установления порядка расположения контигов геном собирали с образованием конечной последовательности. Контиги соединяли следующим образом: на конец каждого контига вручную подбирались праймеры, проводилась ПЦР, и ПЦР-продукты секвенировали по методу Сэнгера.

Полная последовательность генома штамма *B. angulatum* GT102 была депонирована в базе данных GenBank (NCBI) (CP014241). Аннотация генома была проведена автоматически при помощи NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP).

Функциональная аннотация. Классификация генов по функциональным категориям по базе данных COG (Cluster of Orthologous Groups – Кластеры ортологичных групп) [16] была выполнена с помощью алгоритма BLAST v. 2.2.26 (значение $E < 1e-5$; в качестве аннотаций выбирались лучшие совпадения) и скриптов, написанных на языке Perl. Результаты были представлены в виде гистограммы с использованием библиотеки “Highcharts JS” (<http://www.highcharts.com/>).

Филогенетический анализ. Для построения филогенетического дерева использовали последовательности 15 консервативных генов: *clpC*, *dnaB*, *dnaG*, *dnaK*, *groEL*, *groES*, *xfp*, *purF*, *rpoC*, *recA*, *tal*, *tuf*, *atpD*, *whiB2* и *wblE* из 10 полностью секвенированных геномов следующих видов: *B. angulatum*, *B. longum* и *B. adolescentis*. В качестве внешней группы использовали последовательности генов *Bifidobacterium asteroides* PRL2011.

Последовательности ДНК 15 генов для каждого генома были объединены; полученные последовательности были выровнены с использованием программы ClustalW [17]. Филогенетическое дерево было построено с использованием пакета программ MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) v. 7.0.26 [18] методом Neighbor-Joining (NJ) [19]. Статистическую достоверность полученного дерева оценивали методом бутстрепа, используя 1000 бутстрепа-реплик [20].

Анализ геномов. Последовательности геномов бифидобактерий были получены из базы данных GenBank (NCBI). IS-элементы, последовательности профагов и массивы CRISPR были идентифицированы с помощью IS Finder [21], PHAST (PHAge Search Tool) [22] и CRISPRFinder [23] со-

Таблица 1. Основные параметры/характеристики геномов трех штаммов *B. angulatum*

Параметры	<i>B. angulatum</i>		
	штамм GT102	штамм JCM7096*	штамм LMG11039
Размер генома, пн	2064639	2021974	2003806
GC-состав, %	59.3	59.4	59.4
Количество генов	1652	1609	1596
pРНК	4	4	4
tРНК	53	53	48
Тандемные повторы	143	156	139
Количество IS элементов	Нет	Нет	Нет
Количество профагов	5	2	3
Кличество CRISPR	1	1	1
Количество плазмид	Нет	Нет	Нет
Страна выделения штамма	Россия	Япония	Италия
Идентификационный номер GenBank	CP014241	AP012322	JGYL00000000
Статус генома (кол-во контигов)	Полная последовательность	Полная последовательность	Контиги (6)
Литературная ссылка	[12]	[55]	[8, 9]

* *B. angulatum* JCM7096 = DSM20098.

ответственно. Тандемные повторы были идентифицированы с помощью Tandem Repeats Finder v. 4.07b [24].

Поиск и анализ генов и генных кластеров проводили с использованием следующих ресурсов: базы данных NCBI; алгоритма BLAST; программы Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Иллюстратор IBS v. 1.0.1 был использован для визуализации структурной организации кластеров генов [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Секвенирование генома *B. angulatum* GT102

Полный геном *B. angulatum* GT102 состоит из кольцевой хромосомы длиной 2064639 пн, GC-состав генома 59.3%. Всего в геноме был предсказан 1651 ген, из них 1554 (94%) были предсказаны как белок-кодирующие. На настоящий момент секвенировано только два штамма вида *B. angulatum*, не считая *B. angulatum* GT102. Общие характеристики генома штамма *B. angulatum* GT102 в сравнении с другими секвенированными штаммами *B. angulatum* представлены в табл. 1.

Сравнительная характеристика генома *B. angulatum* GT102

В настоящем исследовании мы провели функциональный анализ генов и филогенетический анализ для представителей трех видов бифидо-

бактерий: *B. angulatum*, *B. adolescentis* и *B. longum*. Виды *B. adolescentis* и *B. longum* были выбраны как наиболее тесно связанные с видом *B. angulatum* и представляющие интерес в связи с изучением КМ [8–10, 26].

Функциональные категории генов

Каждый белок-кодирующий ген, идентифицированный в геноме *B. angulatum* GT102, мы сравнивали с базой данных COG, чтобы определить функциональные категории, к которым принадлежит ген (результаты представлены в Приложении, табл. 1).

Из 1554 белок-кодирующих генов, идентифицированных в геноме *B. angulatum* GT102, только 1433 были отнесены к определенным категориям COG. Проведенный анализ показал, что наиболее распространены в штамме GT102 гены, относящиеся к следующим функциональным классам: метаболизм (37.70%), хранение и обработка информации (21.10%), клеточные процессы и передача сигналов (18.03%).

Большинство белок-кодирующих генов (11.18%) попало в категорию COG [E] – транспорт и метаболизм аминокислот. Второй по величине категорией была категория COG [G] – транспорт и обмен углеводов, в нее вошло 9.54% генов. Категория COG [J] – трансляция и рибосомная структура – была третьей по величине категорией (8.88%), главным образом из-за присутствия ри-

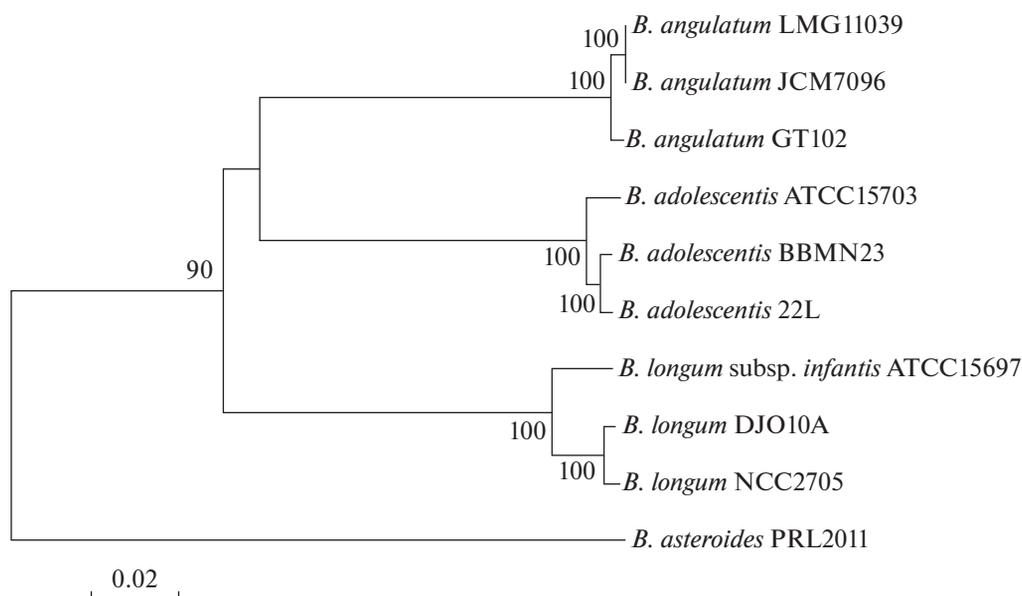


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнения нуклеотидных последовательностей 15 консервативных генов (*clpC*, *dnaB*, *dnaG*, *dnaK*, *groEL*, *groES*, *xfp*, *purF*, *rpoC*, *recA*, *tal*, *tuf*, *atpD*, *whiB2* и *wblE*) с использованием алгоритма Neighbour-Joining. В качестве внешней группы использован *B. asteroides* PRL2011. В узлах дерева указаны бутстреп-оценки. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 2 заменам на каждые 100 нуклеотидов.

босомных белков и тРНК-синтетаз. Приблизительно 7.8% генов не было отнесено ни к одной из категорий COG. В целом гены были отнесены к 21 различным категориям COG (Приложение, табл. 1).

Анализ функциональных категорий генов также был проведен нами для следующих восьми бифидобактериальных штаммов: *B. angulatum* JCM7096, *B. adolescentis* штаммы ATCC15703, BBMN23 и 22L и *B. longum* штаммы NCC2705, DJO10A и ATCC15697 (Приложение, рис. 1). По результатам проведенного анализа были выявлены восемь категорий COG, присутствующие во всех проанализированных штаммах, включая *B. angulatum* GT102, и к которым было отнесено наибольшее количество генов (Приложение, рис. 1; категории COG: [E], [G], [J], [K], [L], [M], [R] и [S]). Большинство генов, входящих в эти категории, участвуют в основных клеточных функциях, таких как метаболизм, трансляция, транскрипция, репликация и др.

Несмотря на то, что распределение по COG-категориям очень сходно у всех восьми проанализированных штаммов, существуют некоторые различия. Например, штаммы *B. longum* ATCC15697 и DJO10A содержат наибольшее количество генов, участвующих в репликации, рекомбинации и репарации (категория COG [L]). При сравнении штаммов *B. angulatum* GT102 и JCM7096 было обнаружено, что процент генов, участвующих в транспорте и метаболизме аминокислот [E] и ме-

ханизмах передачи сигнала [T], несколько выше у штамма GT102, чем у штамма JCM7096.

Филогенетический анализ

Для установления филогенетических взаимоотношений штамма *B. angulatum* GT102 со штаммами видов *B. longum* и *B. adolescentis* мы использовали набор из 15 консервативных генов из 10 секвенированных геномов. Объединение различных консервативных генов (для каждого штамма) было проведено для увеличения дискриминационной способности и создания более надежного филогенетического дерева [27]. Общий GC-состав последовательностей, представляющих из себя последовательно соединенные рассматриваемые консервативные гены, составил 62.4%, что близко к среднему содержанию GC в ДНК у представителей рода *Bifidobacterium*. Вид *B. asteroides* был использован нами в качестве внешней группы, так как он принадлежит к одной из самых древних линий бифидобактерий [10]. Полученное филогенетическое дерево представлено на рис. 1.

На настоящий момент вид *B. angulatum* относят либо к группе *B. longum*, либо к группе *B. adolescentis* [8–10]. На филогенетическом дереве, построенном на основе предложенной нами группы генов, вид *B. angulatum* расположен ближе к группе *B. adolescentis*.

Таблица 2. Белки *B. angulatum* GT102, способные выполнять moonlighting функции

№ п.п.	Moonlighting белок	Locus tag	Moonlighting функции	Литературная ссылка
1	Type I Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Bang102_005060	Связывание с внеклеточным матриксом, модуляция иммунного ответа организма хозяина	[56]
2	Phosphopyruvate hydratase (Enolase)	Bang102_007650	Связывание с плазминогеном человека	[57, 58]
3	Phosphoglycerate mutase	Bang102_005760	»	[59]
4	Glutamine synthetase	Bang102_007860	»	[59]
5	Linear amide C-N hydrolase (Choloyglycine hydrolase, Bile salt hydrolase)	Bang102_006075	»	[59]
6	Molecular chaperone DnaK	Bang102_002220	»	[37]
7	Transaldolase	Bang102_005940	Адгезия на мукоидном слое и агрегация	[60]
8	Elongation factor Tu	Bang102_004650	Связывание с плазминогеном человека	[58]

Гены штамма B. angulatum GT102, участвующие во взаимодействии с клетками хозяина

Внеклеточные белки и поверхностные структурные компоненты считаются важными для взаимодействия бактерий с окружающей средой и коммуникации с хозяином [28, 29]. К ним относятся секретлируемые белки, капсульные полисахариды, фимбрии и пили, сортаза-зависимые пили, адгезины и др.

Секретлируемые белки

В геноме *B. angulatum* GT102 были выявлены гены Bang102_006590 и Bang102_004580, кодирующие секретлируемый белок пуллулазу размерами 755 и 600 а.о. соответственно. Наличие активной пуллулазы у различных штаммов бифидобактерий, способных утилизировать крахмал и пуллулан, было показано в ряде работ [30]. Подобный ген, кодирующий пуллулазу, присутствует в геномах бактерий *B. adolescentis* и *B. longum*. Однако гены для других секретлируемых гликозидаз, которые типичны для бифидобактерий видов *B. adolescentis* и *B. longum*, в геноме *B. angulatum* GT102 не обнаруживаются.

Производство бактериоцинов очень выгодно бактериям для конкуренции и выживания в КМ. В геноме *B. angulatum* GT102 были выявлены гены, кодирующие белки, участвующие в продукции бактериоцина – лантибиотика. Это ген Bang102_007925, кодирующий белок размером 68 а.о., ген Bang102_007910, кодирующий белок LanM (1030 а.о.), ген Bang102_007250, кодирующий

АТФ-связывающий белок ABC транспортера лантибиотика (242 а.о.). Эти белки имеют ортологи в геномах других штаммов *B. angulatum* – JCM7096 и LMG11039, с идентичностью 100 и 99% соответственно (Приложение, табл. 2). Генный кластер для продукции и транспорта лантибиотика был также выявлен у штамма *B. longum* DJO10A [31]. Данные сравнительного анализа ортологов из *B. angulatum* и *B. longum* представлены в Приложении, табл. 2.

Геном *B. angulatum* GT102 содержит ген Bang102_004230, кодирующий гомолог ингибитора сериновой протеазы – секретлируемый белок, известный как серпин. Интересно, что этот ген не имеет ортологов в других штаммах *B. angulatum*. Выравнивание аминокислотной последовательности серпина *B. angulatum* GT102 продемонстрировало 79% идентичности с ортологом WP_051872059.1 штамма *B. adolescentis* 22L.

Генный локус генома B. angulatum GT102, участвующий в формировании поверхностных экзополисахаридов

Известно, что капсульные экзополисахариды (ЭПС) бифидобактерий несут защитную функцию от стрессовых факторов, проявляют иммуномодулирующую активность и адгезивные свойства [32, 33]. В геноме *B. angulatum* GT102 были найдены два предполагаемых *eps*-кластера. Анализ кластеров начинался с поиска priming-GTF гена, который катализирует начальный этап синтеза ЭПС единицы и должен присутствовать во

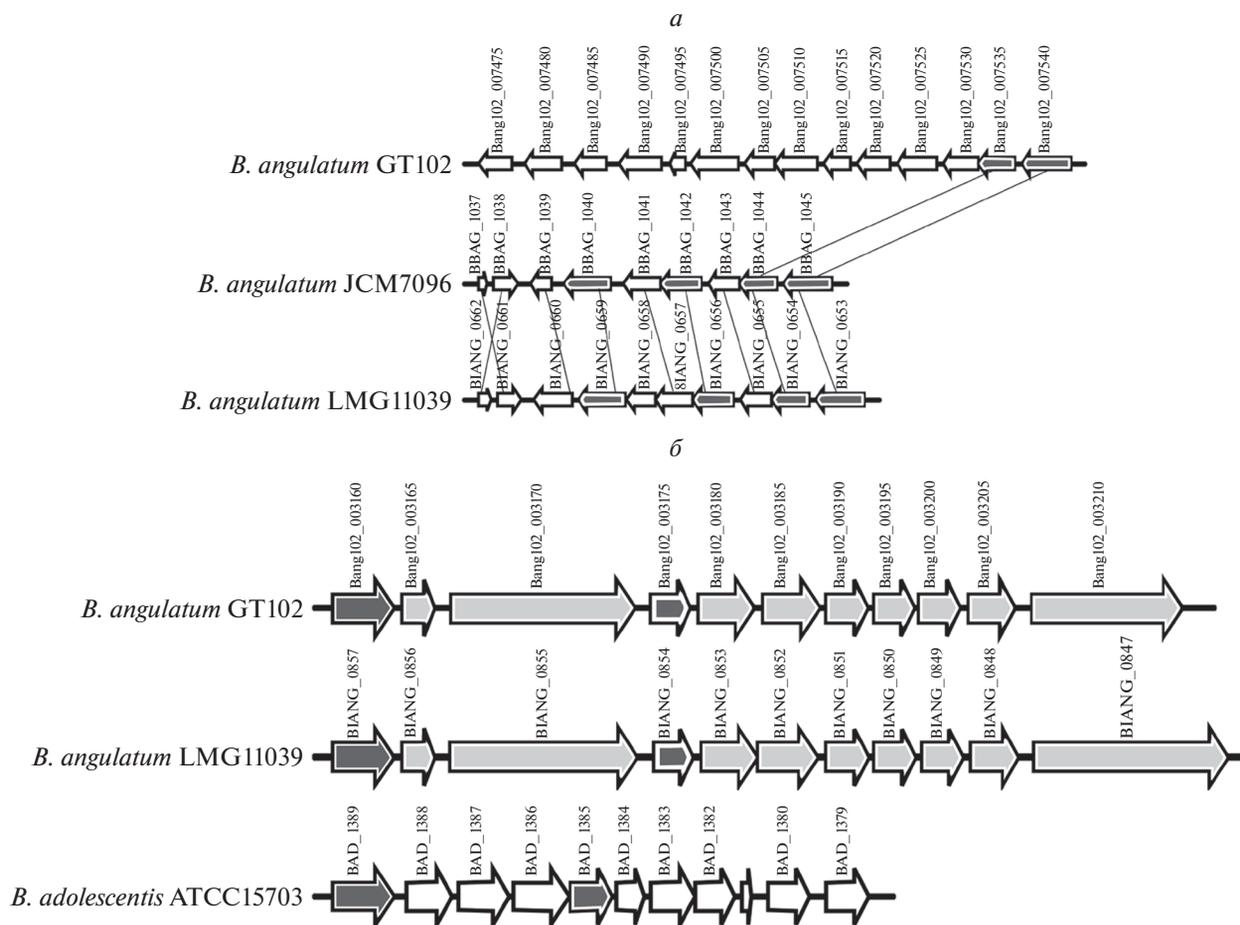


Рис. 2. Организация генного кластера, вовлеченного в образование экзополисахаридов у штамма *B. angulatum* GT102. (а) сравнение *cpsD* кластеров из различных штаммов *B. angulatum*, (б) сравнение *rfbP* кластера *B. angulatum* GT102 с кластерами штаммов *B. angulatum* LMG11039 и *B. adolescentis* ATCC15703.

всех *eps*-кластерах [34]. Было выявлено два priming-GTF гена: ген *rfbP* (Bang102_003160) для ундекапренилфосфат глюкозофосфотрансферазы и ген *cpsD* (Bang102_007540) для галактозил-трансферазы, размеры продуктов этих генов 512 и 508 а.о. соответственно. Процент идентичности между белками составил 69%. Ген *cpsD* дает начало кластеру из 14 предсказанных генов: от Bang102_007540 по Bang102_007475, вовлеченных в биосинтез ЭПС единицы. Из всех генов этого кластера только два ортолога (*cpsD* и следующий ген – Bang102_007535) были обнаружены в двух других штаммах *B. angulatum* (Приложение, табл. 3), но было выявлено несколько ортологов в геномах *B. adolescentis* (6 ортологов с идентичностью 54–85% на уровне аминокислотной последовательности (а. п.) и в геномах *B. longum* (12 ортологов с идентичностью 50–84% на уровне а. п.) (Приложение, табл. 3). Интересно, что большинство штаммов *B. longum*, содержащих ортологи генов *cpsD*-кластера, имеют российское происхождение (Приложение, табл. 3).

Отличие в составе *cpsD*-кластера было обнаружено у геномов других штаммов *B. angulatum*: LMG11039 и JCM7096, которые содержали семь генов: все они, за исключением одного гена, кодировали идентичные (100%) белки. Эти *eps*-кластеры окружены генами, кодирующими транспозазы (рис. 2,а). Второй *eps*-подобный кластер, связанный с геном *rfbP*, в геноме *B. angulatum* GT102 содержит 11 генов от Bang102_003160 по Bang102_003210. Подобный генный кластер обнаружен и в геноме *B. angulatum* LMG11039 (от BIAN_0857 по BIAN_0847), и в геноме *B. angulatum* JCM7096 (от BBAG_0214 по BBAG_0224) (рис. 2,б). Мы сравнили *eps*-кластеры *B. angulatum* с кластерами других видов – *B. adolescentis* и *B. longum*. С *eps*-кластерами *B. longum* сходства обнаружено не было; для этого вида характерны очень длинные и многогенные *eps*-кластеры. Однако с *eps*-кластерами *B. adolescentis* было обнаружено небольшое сходство (рис. 2,б).

Поверхностные структуры фимбрии/пили

Генные кластеры, участвующие в образовании поверхностных структур фимбрий/пилей у бифидобактерий, представляют особый интерес, поскольку они могут участвовать во взаимосвязи бактерий с клетками хозяина [35, 36]. Один генный кластер, кодирующий белки сортаза-зависимых пилей/фимбрий, был выявлен в геноме *B. angulatum* GT102. Этот кластер включает ген Bang102_001155, кодирующий фимбриальную субъединицу FimA, ген Bang102_001160 для фимбриального белка и ген Bang102_001165 для сортазы, который граничит с геном Bang102_001170, кодирующим транспозазу. Все эти гены имеют ортологи в других штаммах *B. angulatum* с идентичностью 82–100% (на уровне а. п.) (Приложение, табл. 3). Структура генного кластера *B. angulatum* оказалась схожей с кластерами штаммов вида *B. adolescentis* (Приложение, рис. 2). Ортологи были обнаружены у штамма *B. adolescentis* с идентичностью 67% для Bang102_001155, 71–75% для Bang102_001160, 77–78% для Bang102_001165, 60% для Bang102_001170 на уровне а. п.

В геноме штамма *B. angulatum* GT102 также был идентифицирован генный кластер, участвующий в образовании фимбрий типа IVa (от Bang102_004920 по Bang102_004865). Аналогичные кластеры были обнаружены в геномах других штаммов *B. angulatum* с высокой степенью идентичности генов (97–99% на уровне а. п.), за исключением гена, кодирующего белок PilA (с идентичностью 66%) (Приложение, рис. 3). Гены кластера *B. angulatum* GT102 имели высокое сходство с ортологами из генома *B. adolescentis* BVMN23 (от 41 до 92% на уровне а. п.) (Приложение, табл. 3 и рис. 3) с консервативным порядком расположения генов в кластерах.

Гены адгезии

Кроме более сложных соединений, таких как пили и фимбрии, существуют единичные белки, которые, как показано, обеспечивают адгезию бактерии к поверхностным структурам различных клеток хозяина [37, 38]. Kankainen и соавторы [39] опубликовали список белковых доменов, участвующих в адгезии. В геноме *B. angulatum* GT102 мы выявили ряд генов, кодирующих белки, возможно, участвующие в адгезии. Это ген Bang102_001355, кодирующий белок размером 327 а.о. с коллаген-связывающим доменом, ген Bang102_000210, кодирующий белок размером 1956 а.о. с фибронектин-связывающим доменом, ген Bang102_000220, кодирующий белок размером 438 а.о. с иммуноглобулин (Ig)-связывающим доменом, ген Bang102_000465, кодирующий пептидазу P60 (252 а.о.) с доменом для инвазии, ген Bang102_001440, кодирующий белок разме-

ром 167 а.о. с доменом для связывания с эластином поверхностных структур клеток, гены Bang102_001435 и Bang102_001430, кодирующие белки размерами 360 и 354 а.о. с доменами фактора фон Виллебранда типа А, два гена — Bang102_001950 и Bang102_000400, кодирующие белки 509 и 334 а.о. с G5-доменами.

Гены, кодирующие moonlighting белки

В геноме *B. angulatum* GT102 идентифицированы восемь генов, кодирующих белки, которые могут быть связаны с выполнением moonlighting функций (табл. 2). Из литературных источников известно, что ортологи этих белков выполняют moonlighting функции у различных видов бифидобактерий.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании мы представили анализ генома российского штамма *Bifidobacterium angulatum* GT102. Штамм *B. angulatum* GT102 имеет большую длину хромосомы (примерно на 40000 нуклеотидов длиннее), чем у представленных в открытом доступе геномов *B. angulatum*. Наличие такого более протяженного генома ранее уже отмечалось в литературе для вновь выделенных природных штаммов по сравнению со старыми лабораторными штаммами [31].

Поскольку вид *B. angulatum* встречается в КМ гораздо реже по сравнению с такими доминирующими видами, как *B. longum* и *B. adolescentis*, предметом наших сравнительных геномных исследований были гены и кластеры генов, вовлеченные во взаимодействие бактерий с клетками хозяина. Большой интерес представляли внеклеточные бактериальные структуры, такие как капсульные экзополисахариды и фимбрии/пили, которые непосредственно участвуют во взаимодействии бактерий с клетками хозяина, приводя к хозяйской иммунной толерантности к комменсалу [40]. В геноме *B. angulatum* GT102 были обнаружены два предполагаемых генных кластера, участвующих в образовании ЭПС, с priming-GTF генами *cpsD* и *rfbP*. Интересно, что среди 14 генов *cpsD*-кластера было выявлено только два гена, кодирующих белки, имеющие ортологи в других штаммах *B. angulatum*. Однако в этом кластере было больше генов, имеющих ортологи в штаммах *B. adolescentis* и *B. longum*, большинство из которых имели российское происхождение. Предполагается, что *cpsD*-кластер был получен *B. angulatum* GT102 путем горизонтального переноса генов [34], подобно ЭПС-генам *B. longum* GT15 [41]. Сортаза-зависимые пили/фимбрии бактерий в основном ответственны за адгезию к поверхностным структурам кишечника [42]. *In silico* анализ генома *B. angulatum* GT102 выявил наличие всего одного генного

кластера, кодирующего белки сортаза-зависимых пилей/фимбрий, в отличие от генома *B. adolescentis* 22L, который содержит пять аналогичных локусов [43]. В геноме *B. angulatum* GT102, как и в других секвенированных геномах *B. angulatum*, также был найден генный кластер, предположительно участвующий в образовании фимбрий типа IVa. Такой кластер был обнаружен ранее в геноме *B. adolescentis* 22L [43] и *B. pseudocatenulatum* IPLA 36007 [44]. Сообщалось, что фимбрии/пили типа IVa вовлечены в различные клеточные процессы, такие как подвижность, конъюгация, адгезия и введение ДНК [45]. В геноме *B. angulatum* GT102 не было обнаружено генного локуса Tad для пилей типа IVb (Tad пилей для прочной адгезии). Однако этот локус присутствует во многих геномах *B. adolescentis* и *B. longum* [33]. При анализе генома *B. angulatum* GT102 были выявлены гены, кодирующие единичные белки, которые опосредуют адгезию бактерий к поверхностным структурам различных клеток хозяина [37, 38]. Эти белки возможно увеличивают адгезивные способности штамма *B. angulatum* GT102, но присутствуют у представителей и других видов бифидобактерий.

При анализе генома *B. angulatum* GT102 были выявлены гены секретируемых белков: пуллулазазы, бактериоцина лантибиотика и серпина. Активная пуллулазаза обнаруживается у различных штаммов бифидобактерий, способных утилизировать крахмал и пуллулан [30]. В пан-геноме бифидобактерий 10.9% составляют гены для секретируемых гликозил-гидролаз, 32.9% из которых аннотированы как пуллулазазы и α -амилазы [46]. Однако гены других секретируемых гликозидаз, которые типичны для бифидобактерий видов *B. adolescentis* и *B. longum*, в геноме *B. angulatum* GT102, как и в других штаммах *B. angulatum*, не обнаруживаются, что указывает на более низкую гидролазную активность представителей этого вида. Продукция бактериоцина очень выгодна при микробной конкуренции и выживании в кишечнике. Но в геномах *B. angulatum* выявляются только гены синтеза лантибиотика. Тогда как у представителей *B. longum* были обнаружены и другие бактериоцины и антимикробные молекулы [47]. Бифидобактерии, продуцирующие серпины, могут использовать их для защиты от протеаз хозяина, что дает им преимущества для выживания в очень сложной и конкурентной среде. Способность продуцировать серпины была показана в основном у представителей вида *B. longum* [28, 41]. Гомолог серпина, найденный в геноме *B. angulatum* GT102 и имеющий высокую степень идентичности с ортологом из штамма *B. adolescentis* 22L, представляет интерес и в дальнейшем будет исследован более подробно.

В геноме *B. angulatum* GT102 идентифицированы восемь moonlighting белков. Moonlighting бел-

ки — это высококонсервативные белки, которые обнаруживаются снаружи на бактериальной клеточной стенке и имеют вторую moonlighting функцию, отличающуюся от их функций в клетке [37, 48]. Механизм такой двойственной функции неизвестен, но не исключено влияние посттрансляционных модификаций белков [49]. Основные идентифицированные moonlighting функции этих белков у бактерий — адгезия и участие в колонизации соответствующей ниши хозяина, а также модуляция иммунного ответа хозяина [50, 51]. Данные адгезины есть у всех видов бифидобактерий, и они способны связываться с муцинами и различными компонентами внеклеточного матрикса клеток кишечного эпителия хозяина (фибронектин и коллаген) [50], а также связываться с плазминогеном [52] и белками иммунной системы [53]. Moonlighting белки являются важнейшим фактором колонизации бактериями кишечного эпителия хозяина [54].

Таким образом, сравнительный анализ геномов, отдельных генов и генных кластеров штаммов различных видов указывает, что *B. angulatum* с большей вероятностью относится к группе *B. adolescentis*. Также сравнительный анализ генов, дающих бактерии конкурентные преимущества и участвующих во взаимосвязи бифидобактерий с клетками хозяина, указывает на меньшие возможности у *B. angulatum* для успешной колонизации кишечника по сравнению с доминирующими видами бифидобактерий *B. adolescentis* и *B. longum*.

Работа выполнена в рамках Государственного задания по теме 0112-2019-0002 “Генетические технологии в биологии, медицине, сельскохозяйственной и природохозяйственной деятельности”.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объектов животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объектов людей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thursby E., Juge N. Introduction to the human gut microbiota // *Biochem. J.* 2017. V. 474. № 11. P. 1823–1836. doi 10.1042/BCJ20160510
2. Martin C.R., Osadchiy V., Kalani A., Mayer E.A. The brain-gut-microbiome axis // *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2018. V. 6. № 2. P. 133–148. doi 10.1016/j.jcmgh.2018.04.003
3. Averina O.V., Danilenko V.N. Human intestinal microbiota: Role in development and functioning of the nervous system // *Микробиология.* 2017. V. 86. № 1. P. 5–24.
4. Moriel D.G., Heras B., Paxman J.J. et al. Molecular and structural characterization of a novel *Escherichia coli*

- interleukin receptor mimic protein // *mBio*. 2016. V. 7. № 2. e02046-15. doi 10.1128/mBio.02046-15
5. *Vandenplas Y., Huys G., Daube G.* Probiotics: an update // *J. Pediatr. (Rio J.)*. 2015. V. 91. № 1. P. 6–21. doi 10.1016/j.jpeds.2014.08.005
 6. *O'Callaghan A., van Sinderen D.* Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota // *Front. Microbio.* 2016. V. 7. P. 925. doi 10.3389/fmicb.2016.00925
 7. *Turroni F., Peano C., Pass D.A. et al.* Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 5. e36957. doi 10.1371/journal.pone.0036957
 8. *Lugli G.A., Milani C., Turroni F. et al.* Investigation of the evolutionary development of the genus *Bifidobacterium* by comparative genomics // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. № 20. P. 6383–6394. doi 10.1128/AEM.02004-14
 9. *Milani C., Lugli G.A., Duranti S. et al.* Genomic encyclopedia of type strains of the genus *Bifidobacterium* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. № 20. P. 6290–6302. doi 10.1128/AEM.02308-14
 10. *Sun Z., Zhang W., Guo C. et al.* Comparative genomic analysis of 45 type strains of the genus *Bifidobacterium*: a snapshot of its genetic diversity and evolution // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 2. e0117912. doi 10.1371/journal.pone.0117912
 11. *Yunes R.A., Poluektova E.U., Dyachkova M.S. et al.* GABA production and structure of *gadB/gadC* genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from human microbiota // *Anaerobe*. 2016. V. 42. P. 197–204. doi 10.1016/j.anaerobe.2016.10.011
 12. *Dyachkova M.S., Klimina K.M., Kovtun A.S. et al.* Draft genome sequences of *Bifidobacterium angulatum* GT102 and *Bifidobacterium adolescentis* 150: focusing on the genes potentially involved in the gut-brain axis // *Genome Announc.* 2015. V. 3. № 4. e00709-15. doi 10.1128/genomeA.00709-15
 13. *Regnault B., Grimont F., Grimont P.A.D.* Universal ribotyping method using a chemically labeled oligonucleotide probe mixture // *Res. Microbiol.* 1997. V. 148. № 8. P. 649–659. doi 10.1016/S0923-2508(99)80064-3
 14. *Аверина О.В., Незаметдинова В.З., Алексеева М.Г., Даниленко В.Н.* Генетическая нестабильность пробиотических признаков у штамма *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* В379М в процессе культивирования и поддержания // *Генетика*. 2012. Т. 48. № 11. С. 1287–1296.
 15. *Darling A.E., Mau B., Perna N.T.* ProgressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 6. e11147. doi 10.1371/journal.pone.0011147
 16. *Tatusov R.L., Koonin E.V., Lipman D.J.* A genomic perspective on protein families // *Science*. 1997. V. 278. № 5338. P. 631–637. doi 10.1126/science.278.5338.631
 17. *Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.* CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 4673–4680. doi 10.1093/nar/22.22.4673
 18. *Kumar S., Stecher G., Tamura K.* MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. № 7. P. 1870–1874. doi 10.1093/molbev/msw054
 19. *Saitou N., Nei M.* The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* 1987. V. 4. № 4. P. 406–425.
 20. *Felsenstein J.* Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // *Evolution*. 1985. V. 39. № 4. P. 783–791. doi 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x
 21. *Siguier P., Perochon J., Lestrade L. et al.* ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34. P. D32–D36. doi 10.1093/nar/gkj014
 22. *Zhou Y., Liang Y., Lynch K. et al.* PHAST: A Fast Phage Search Tool // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. P. W347–W352. doi 10.1093/nar/gkr485
 23. *Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C.* The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats // *BMC Bioinformatics*. 2007. V. 8. P. 172. doi 10.1186/1471-2105-8-172
 24. *Benson G.* Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. № 2. P. 573–580. doi 10.1093/nar/27.2.573
 25. *Liu W., Xie Y., Ma J. et al.* IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences // *Bioinformatics*. 2015. V. 31. № 20. P. 3359–3361. doi 10.1093/bioinformatics/btv362
 26. *Bottacini F., Ventura M., van Sinderen D., O'Connell Motherway M.* Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria // *Microb. Cell Fact.* 2014. V. 13. (Suppl. 1) S4. doi 10.1186/1475-2859-13-S1-S4
 27. *Teichmann S.A., Mitchison G.* Making family trees from gene families // *Nat. Genet.* 1999. V. 21. № 1. P. 66–67. doi 10.1038/5001
 28. *Ventura M., Turroni F., O'Connell Motherway M. et al.* Host-microbe interactions that facilitate gut colonization by commensal bifidobacteria // *Trends Microbiol.* 2012. V. 20. № 10. P. 467–476. doi 10.1016/j.tim.2012.07.002
 29. *Ruiz L., Hevia A., Bernardo D. et al.* Extracellular molecular effectors mediating probiotic attributes // *FEMS Microbiol. Lett.* 2014. V. 359. № 1. P. 1–11. doi 10.1111/1574-6968.12576
 30. *Ryan S.M., Fitzgerald G.F., van Sinderen D.* Screening for and identification of starch-, amylopectin-, and pullulan-degrading activities in bifidobacterial strains // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. № 8. P. 5289–5296. doi 10.1128/AEM.00257-06
 31. *Lee J.H., Karamychev V.N., Kozyavkin S.A. et al.* Comparative genomic analysis of the gut bacterium *Bifidobacterium longum* reveals loci susceptible to deletion during pure culture growth // *BMC Genomics*. 2008. V. 9. P. 247. doi 10.1186/1471-2164-9-247
 32. *Ruas-Madiedo P., Salazar N., de los Reyes-Gavilán C.G.* Biosynthesis and chemical composition of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria // *Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends*. Norfolk, UK: Caister Acad. Press, 2009. P. 279–310.
 33. *O'Connell Motherway M., Zomer A., Leahy S.C. et al.* Functional genome analysis of *Bifidobacterium breve* UCC2003 reveals type IVb tight adherence (Tad) pili as an essential and conserved host-colonization factor //

- Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. № 27. P. 11217–11222. doi 10.1073/pnas.1105380108
34. *Hidalgo-Cantabrana C., Sánchez B., Milani C. et al.* Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium* spp. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. № 1. P. 9–18. doi 10.1128/AEM.02977-13
35. *Proft T., Baker E.N.* Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria – structure, assembly and their role in disease // *Cell. Mol. Life Sci.* 2009. V. 66. № 4. P. 613–635. doi 10.1007/s00018-008-8477-4
36. *Kline K.A., Dodson K.W., Caparon M.G., Hultgren S.J.* A tale of two pili: Assembly and function of pili in bacteria // *Trends Microbiol.* 2010. V. 18. № 5. P. 224–232. doi 10.1016/j.tim.2010.03.002
37. *Candela M., Centanni M., Fiori J. et al.* DnaK from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* is a surface-exposed human plasminogen receptor upregulated in response to bile salts // *Microbiology.* 2010. V. 156. № 6. P. 1609–1618. doi 10.1099/mic.0.038307-0
38. *Gleinser M., Grimm V., Zhurina D. et al.* Improved adhesive properties of recombinant bifidobacteria expressing the *Bifidobacterium bifidum*-specific lipoprotein BopA // *Microb. Cell Fact.* 2012. V. 11. P. 80. doi 10.1186/1475-2859-11-80
39. *Kankainen M., Paulin L., Tynkkynen S. et al.* Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 40. P. 17193–17198. doi 10.1073/pnas.0908876106
40. *Fanning S., Hall L.J., Cronin M. et al.* Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 6. P. 2108–2113. doi 10.1073/pnas.1115621109
41. *Zakharevich N.V., Averina O.V., Klimina K.M. et al.* complete genome sequence of *Bifidobacterium longum* GT15: Identification and characterization of unique and global regulatory genes // *Microb. Ecol.* 2015. V. 70. № 3. P. 819–834. doi 10.1007/s00248-015-0603-x
42. *Turroni F., Serafini F., Mangifesta M. et al.* Expression of sortase-dependent pili of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in response to environmental gut conditions // *FEMS Microbiol. Lett.* 2014. V. 357. № 1. P. 23–33. doi 10.1111/1574-6968.12509
43. *Duranti S., Turroni F., Lugli G.A. et al.* Genomic characterization and transcriptional studies of the starch-utilizing strain *B. adolescentis* 22L // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. № 19. P. 6080–6090. doi 10.1128/AEM.01993-14
44. *Alegria Á., Delgado S., Guadamuro L. et al.* The genome of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* IPLA 36007, a human intestinal strain with isoflavone-activation activity // *Gut Pathog.* 2014. V. 6. P. 31. doi 10.1186/1757-4749-6-31
45. *Imam S., Chen Z., Roos D.S., Pohlschroder M.* Identification of surprisingly diverse type IV pili, across a broad range of gram-positive bacteria // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 12. e28919. doi 10.1371/journal.pone.0028919
46. *Milani C., Lugli G.A., Duranti S. et al.* Bifidobacteria exhibit social behavior through carbohydrate resource sharing in the gut // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 15782. doi 10.1038/srep15782
47. *Martinez F.A.C., Balciunas E.M., Converti A. et al.* Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review // *Biotechnol. Adv.* 2013. V. 31. № 4. P. 482–488. doi 10.1016/j.biotechadv.2013.01.010
48. *Jeffery C.* Intracellular proteins moonlighting as bacterial adhesion factors // *AIMS Microbiol.* 2018. V. 4. № 2. P. 362–376. doi 10.3934/microbiol.2018.2.362
49. *Siciliano R.A., Mazzeo M.F.* Molecular mechanisms of probiotic action: a proteomic perspective // *Curr. Opin. Microbiol.* 2012. V. 15. № 3. P. 390–396. doi 10.1016/j.mib.2012.03.006
50. *Gonzalez-Rodriguez I., Ruiz L., Gueimonde M. et al.* Factors involved in the colonization and survival of bifidobacteria in the gastrointestinal tract // *FEMS Microbiol. Lett.* 2013. V. 340. № 1. P. 1–10. doi 10.1111/1574-6968.12056
51. *Kinoshita H., Ohuchi S., Arakawa K. et al.* Isolation of lactic acid bacteria bound to the porcine intestinal mucosa and an analysis of their moonlighting adhesions // *Biosci. Microbiota Food Health.* 2016. V. 35. № 4. P. 185–196. doi 10.12938/bmfh.16-012
52. *Kainulainen V., Loimaranta V., Pekkala A. et al.* Glutamine synthetase and glucose-6-phosphate isomerase are adhesive moonlighting proteins of *Lactobacillus crispatus* released by epithelial cathelicidin LL-37 // *J. Bacteriol.* 2012. V. 194. № 10. P. 2509–2519. doi 10.1128/JB.06704-11
53. *Kainulainen V., Korhonen T.K.* Dancing to another tune-adhesive moonlighting proteins in bacteria // *Biology (Basel).* 2014. V. 3. № 1. P. 178–204. doi 10.3390/biology3010178
54. *Wang G., Xia Y., Cuil J. et al.* The roles of moonlighting proteins in bacteria // *Curr. Issues Mol. Biol.* 2014. V. 16. P. 15–22.
55. *Morita H., Toh H., Oshima K. et al.* Complete genome sequence of *Bifidobacterium angulatum* JCM 7096(T) isolated from human feces // *J. Biotechnol.* 2015. V. 211. P. 10–11. doi 10.1016/j.jbiotec.2015.06.412
56. *Górska S., Dylus E., Rudawska A. et al.* Immunoreactive proteins of *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCM 7952 and *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCDM 372 identified by gnotobiotic mono-colonized mice sera, immune rabbit sera and non-immune human sera // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 1537. doi 10.3389/fmicb.2016.01537
57. *Candela M., Biagi E., Centanni M. et al.* Bifidobacterial enolase, a cell surface receptor for human plasminogen involved in the interaction with the host // *Microbiology.* 2009. V. 155. № 10. P. 3294–3303. doi 10.1099/mic.0.028795-0
58. *Wei X., Yan X., Chen X. et al.* Proteomic analysis of the interaction of *Bifidobacterium longum* NCC2705 with the intestine cells Caco-2 and identification of plasminogen receptors // *J. Proteomics.* 2014. V. 108. P. 89–98. doi 10.1016/j.jpro.2014.04.038
59. *Candela M., Bergmann S., Vici M. et al.* Binding of human plasminogen to *Bifidobacterium* // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. № 16. P. 5929–5936. doi 10.1128/JB.00159-07
60. *González-Rodríguez I., Sanchez B., Ruiz L. et al.* Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation // *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. V. 78. № 11. P. 3992–3998. doi 10.1128/AEM.08024-11

**Complete Genome Sequence of *Bifidobacterium angulatum* GT102.
I. Potential Genes and Gene Clusters to Interaction with Host Cells**

N. V. Zakharevich^{a,*}, O. V. Averina^a, V. Z. Nezametdinova^a, and V. N. Danilenko^a

^a*Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: zakharevich@yandex.ru*

We carried out the full genome sequencing of *Bifidobacterium angulatum* GT102. *B. angulatum* is rare species in the human gut microbiota, compared to the *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium adolescentis*. In this regard, we investigated the genes of *B. angulatum* GT102 that are supposedly involved in the interaction with the host. Our analysis revealed an interesting histidine kinase HIG 0 belonging to the family of kinases, which can be bacterial adrenergic receptors. We discovered the PFNA cluster comprising a gene encoding fibronectin type III domain-containing protein having cytokine receptor motifs. The products of this cluster are possibly capable of interacting with human cytokines. Moreover genome of *B. angulatum* GT102 contains gene cluster, involved in the production of cell surface-associated capsular exopolysaccharides, that has unique genetic structure. The obtained results provided information regarding some undescribed characteristics of *B. angulatum* species and also help to better understand in a comparative aspect its communication characteristics.

Keywords: *Bifidobacterium angulatum*, microbe-host communication, gut microbiota, histidine and serine/threonine protein kinases, genome sequencing.