

УДК 579.841:577.113.5

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫРОЖДЕННЫХ И СЛОЖНЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТОВ В ГЕНОМАХ ШТАММОВ *Burkholderia pseudomallei*

© 2019 г. М. Л. Леденева^{а, *}, Г. А. Ткаченко^а, И. М. Шпак^а^аВолгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград, 400131 Россия

*e-mail: volresin@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.02.2018 г.

После доработки 17.07.2018 г.

Принята к публикации 17.07.2018 г.

Эволюция микросателлитов (или простых коротких tandemных повторов, SSRs) – комплексный процесс, в результате которого совершенные повторы превращаются в новые структурные элементы генома с еще мало изученной функциональной ролью, такие как вырожденные и сложные (или компаунды) микросателлиты. В результате анализа *in silico* геномов 10 штаммов *Burkholderia pseudomallei* обнаружено 215683 микросателлита, более 98% из которых оказались вырожденными. Плотность микросателлитов в геноме изменялась в диапазоне от 2922.7/млн.п.н. до 3022.6/млн.п.н. В зависимости от штамма 10.20–10.67% обнаруженных tandemных повторов в каждом геноме входили в состав компаундов. Плотность сложных микросателлитов в геноме варьировала в пределах от 144.7/млн.п.н. до 150.6/млн.п.н. Выявленные межштаммовые различия в количественной представленности микросателлитов были обусловлены сопряженным увеличением плотности SSRs с GC-содержанием и обратной взаимосвязью плотности SSRs с размером генома. Аналогичный характер корреляции наблюдали между плотностью SSRs и структурными особенностями (размер и GC-содержание) каждой из хромосом *B. pseudomallei*; при этом достоверная корреляционная связь плотности SSRs и компаундов выявлена только для хромосомы 2 ($r = 0.93$, $p < 10^{-3}$). Характер ассоциации плотности вырожденных и сложных микросателлитов со структурными особенностями каждой из хромосом, наряду с вырожденностью и малой копийностью мотивов в составе большинства выявленных в геномах *B. pseudomallei* микросателлитов, согласуются с ранее выдвинутой гипотезой о подверженности отрицательному отбору протяженных локусов SSRs. Механизмом такого отбора может быть накопление точечных мутаций, приводящее к прерыванию блока повторов в процессе репликации в результате формирования легко преодолимых вторичных структур, стабилизирующих длину микросателлитного локуса.

Ключевые слова: SSRs, микросателлиты, поиск *in silico*, *Burkholderia pseudomallei*, структурный мотив
DOI: 10.1134/S0026898419010087

ВВЕДЕНИЕ

Микросателлиты, называемые также простыми повторяющимися последовательностями (Simple Sequence Repeats, SSRs), представляют собой tandemно организованные фрагменты ДНК (мотивы, “коровые” единицы), содержащие от 1 до 6 пар нуклеотидов (п.н.) [1]. Доступность полногеномных последовательностей в сочетании с разработанными и программноимплементированными алгоритмами поиска периодических структур в

ДНК позволили выявить микросателлиты в геномах всех известных организмов – от вирусов до эукариот [2–6]. Показано, что SSRs распределены в геномах неслучайно [7, 8] и могут влиять не только на транскрипционную активность генов [9], но и выполнять функциональную роль в эволюции их регуляции [10–12]. Однако в большинстве работ изучались главным образом совершенные (невыврожденные) повторы. Изменение копий мотива при замене исходных нуклеотидов, а

Сокращения: С (complexity) – сложность компаунда, определяемая числом индивидуальных микросателлитов, cSSRs, в его составе; ССМ (counts of compound microsatellites) – число компаундов в каждом геноме/хромосоме; СсSSR (counts of cSSR) – число микросателлитов, входящих в состав компаундов в каждом геноме/хромосоме; СМ (counts of microsatellites) – число микросателлитов в каждом геноме/хромосоме; cSSR% – процентная доля СсSSR от общего числа обнаруженных микросателлитов в каждом геноме/хромосоме ($cSSR\% = CcSSR/CM$); dMAX (maximum threshold) – максимальное расстояние между любыми двумя блоками микросателлитов при поиске компаундов; RA (relative abundance) – плотность микросателлитов или компаундов (число микросателлитов или компаундов/млн.п.н.); SSRs (simple sequence repeats) – простые повторяющиеся последовательности.

Таблица 1. Характеристика исследованных штаммов *B. pseudomallei*

Штамм*	Источник выделения	Страна выделения	Сиквенс-тип (аллельный профиль)	Ссылки на опубликованные работы
K96243 (id11)	Человек	Таиланд	10 (1, 1, 13, 1, 1, 1, 1)	[24, 25]
I710b (id3829)	Кровь человека	Таиланд	177 (1, 1, 4, 3, 1, 3, 1)	[26]
I026b (id208)	Кровь человека	Таиланд	102 (3, 4, 12, 1, 1, 4, 1)	[27]
I106a (id3832)	Человек (внутренний абсцесс)	Таиланд	70 (3, 4, 11, 3, 5, 4, 6)	[26]
BPC006 (id3947)	Кровь человека	Китай	70 (3, 4, 11, 3, 5, 4, 6)	[28]
NAU20B-16 (id3823)	Почва	Австралия	617 (1, 16, 3, 4, 2, 8, 1)	[29]
668 (id244)	Кровь человека	Австралия	129 (1, 15, 13, 2, 1, 22, 1)	[26]
NCTC 13178 (id3825)	Человек	Австралия	286 (15, 2, 13, 2, 20, 19, 1)	[30]
NCTC 13179 (id4002)	Человек (язва кожи)	Австралия	613 (1, 4, 43, 4, 1, 48, 11)	[31]
MSHR305 (id414)	Человек	Австралия	36 (1, 7, 14, 7, 1, 12, 11)	[32]

* В скобках указан номер штамма в базе данных <https://pubmlst.org/bpseudomallei>.

также при вставках и делециях, как единичных, так и нескольких нуклеотидов, ведет к образованию вырожденных и сложных микросателлитов. Вероятно, именно такие, деградировавшие, повторы рекрутируются для различных биологических функций, включая регуляцию транскрипции и репликации, структурные модификации белков и т.д. [13].

Сложные микросателлиты, или компаунды, представляют собой блоки из мотивов одного или разных типов, разделенные не более чем 100 п.н. Компаунды выявлены в геномах человека [14, 15], ряда эукариотических организмов [16, 17], а также некоторых видах бактерий, [18, 19] и вирусов [20–22]. Сложные микросателлиты предположительно участвуют в регуляции экспрессии генов и функциональной активности белков у ряда видов [12, 18]. Компаунды отражают динамичное изменение и свидетельствуют о более сложной эволюции SSRs, чем предложенная некоторыми авторами концепция жизненного цикла микросателлита от его “рождения” до полной деградации (“смерти”) [16].

Изучение вырожденных микросателлитов и компаундов в геномах патогенных микроорганизмов с высоким уровнем SSRs, таких как *Burkholderia pseudomallei*, возбудителя мелиоидоза (опасного и потенциально смертельного заболевания людей и животных), необходимо для понима-

ния механизмов адаптационной пластичности их геномов. Структурно-функциональная неоднородность генома *B. pseudomallei*, включающего две двухцепочечные кольцевые хромосомы, определяет необходимость выявления взаимосвязей между количественной представленностью вырожденных и сложных микросателлитов и особенностями структурной организации каждой из хромосом. Цель представленной работы заключалась в идентификации с последующим изучением строения и локализации вырожденных и сложных микросателлитных повторов в геномах *B. pseudomallei*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследования служили полногеномные последовательности 10 штаммов *B. pseudomallei* из базы данных GenBank Национального центра биотехнологической информации США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). Выбор штаммов определяли с учетом популяционной структуры вида *B. pseudomallei*, состоящей из двух субпопуляций разных географических регионов: Австралии и Юго-Восточной Азии. Различия между субпопуляциями определялись не только географическим распределением, но и частотой рекомбинационных событий. Ранее выявлено, что уровень рекомбинации выше в тайландских штаммах по сравнению с австралийскими изолятами [23].

Результатом высокой скорости рекомбинации может быть гомоплазия, приводящая к единообразию сиквенс-типов изолятов *B. pseudomallei*, несмотря на их генетическую и географическую гетерогенность. В связи с этим в работу были включены австралийские и тайландские штаммы *B. pseudomallei* разных сиквенс-типов, принадлежащие к разным клональным комплексам, а также штамм из Китая с сиквенс-типом, идентичным одному из тайландских штаммов (табл. 1).

Определение аллельного профиля и соответствующего ему сиквенс-типа штамма проводили с использованием базы данных <https://pubmlst.org/bpseudomallei> [33]. Информация о структурных особенностях хромосом каждого из штаммов приведена в табл. 2.

Поиск вырожденных и сложных микросателлитов. Для идентификации SSRs и компаундов использовали модуль Advanced Mode web-версии программы Imperfect Microsatellite Extractor (IMEx) [34]. Входными данными служили нуклеотидные последовательности в формате FASTA и соответствующие им файлы формата .prt, содержащие информацию о белоккодирующих регионах. Поиск проводили при следующих параметрах: минимальное число повторов для мононуклеотидных микросателлитов – 12, для динуклеотидных – 6, для тринуклеотидных – 4, для тетра-/пента-/гексануклеотидных – 3; максимальное расстояние между любыми двумя блоками микросателлитов (dMAX) при поиске компаундов – 10 п.н. Остальные параметры оставляли заданными по умолчанию.

Статистический анализ полученных данных. Для описания и статистического исследования выявленных SSRs и компаундов использовали следующие термины: cSSRs – микросателлиты, входящие в состав компаундов; C – сложность компаунда, определяемая числом cSSRs в его составе; CM – число микросателлитов в каждом геноме/хромосоме; CCM – число компаундов в каждом геноме/хромосоме; CcSSR – число cSSRs в каждом геноме/хромосоме; cSSR% – доля микросателлитов, входящих в состав компаундов, от общего числа всех обнаруженных микросателлитов в каждом геноме/хромосоме ($cSSR\% = CcSSR/CM$).

Взаимосвязь таких параметров как размер и GC-содержание (%) генома/хромосомы с количественной представленностью в их составе вырожденных и сложных микросателлитов оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона (r). С целью обеспечения возможности межштаммового сравнения результатов поиска повторов найденные SSRs и компаунды были стандартизированы относительно их содержания (relative abundance, RA) в каждом геноме/хромосоме: RA_{CM} – число микросателлитов на 1 млн.п.н., или плотность микросателлитов; RA_{CCM} – число компаундов на 1 млн.п.н., или плотность компаундов.

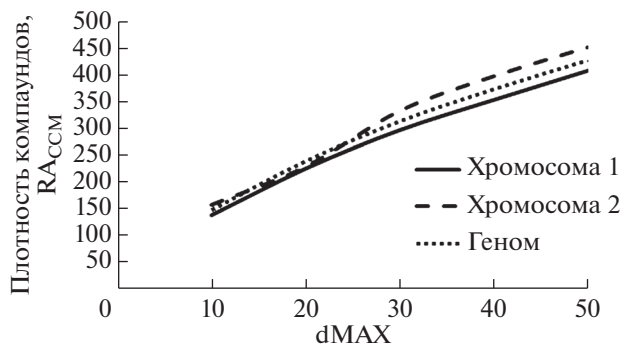


Рис. 1. Влияние различных значений dMAX на величину средней плотности компаундов (RA_{CCM}) в геноме и в каждой из хромосом для 10 штаммов *B. pseudomallei*.

В качестве показателя статистической значимости различий между наблюдаемым (CCM_{obs}) и ожидаемым (CCM_{exp}) числом компаундов в каждом геноме использовали значение Z -критерия, определяемого по формуле: $\frac{O - E}{\sqrt{E}}$, где O – наблюдаемое число компаундов в каждом геноме (CCM_{obs}), а E – ожидаемое число компаундов в каждом геноме (CCM_{exp}). Значение Z -критерия рассчитывали на основании следующих уравнений:

$$\bar{C} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{CcSSR_i}{CCM_i} \right), \quad (1)$$

$$CCM_{exp} = \frac{CcSSR_i}{\bar{C}}, \quad (2)$$

где n – общее число геномов ($n = 10$), i – порядковый номер каждого генома, \bar{C} – средняя сложность n геномов. $CCM_{obs} > CCM_{exp}$ при $Z > 0$ и $CCM_{obs} < CCM_{exp}$ при $Z < 0$; чем больше значение $|Z|$, тем более значима разница между CCM_{obs} и CCM_{exp} [22, 35].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние расстояния между блоками микросателлитов на обнаружение компаундов

Микросателлиты входят в состав компаунда, если расстояние между любыми двумя соседними SSRs не превышает величины dMAX. В связи с этим значение dMAX считается ключевым фактором при поиске сложных микросателлитов [16]. В программе IMEx величина dMAX может принимать значения от 0 до 50 [34]. Оценку влияния этого параметра на выявление компаундов проводили путем измерения среднего значения плотности компаундов (RA_{CCM}) для 10 штаммов *B. pseudomallei* на хромосомном и геномном уровнях с заданным значением dMAX (10, 20, 30, 40 и 50 п.н.). Как и ожидалось, средние значения RA_{CCM} постепенно возрас-

Таблица 2. Количественная представленность вырожденных и сложных микросателлитов в геномах *B. pseudomallei*

№ п/п	Номер хромосомы	Номер доступа GenBank	Размер, п.н.	GC (%)	SSRs		Компаунды				Z-критерий
					CM	RA _{CM}	CCM	RA _{CCM}	CcSSR	cSSR%	
<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243											
1	Chr-1	NC_006350.1	4074542	67.7	11692	2869.5	551	135.2	1146	9.8	0.07
	Chr-2	NC_006351.1	3173005	68.5	9926	3128.3	522	164.5	1085	10.93	
	Геном		7247547	68.05	21618	2982.8	1073	148.1	2231	10.32	
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1710b											
2	Chr-1	NC_007434.1	4126292	67.6	11738	2844.7	539	130.6	1124	9.58	-0.08
	Chr-2	NC_007435.1	3181762	68.5	9880	3105.2	519	163.1	1086	10.99	
	Геном		7308054	67.99	21618	2958.1	1058	144.8	2210	10.22	
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1026b											
3	Chr-1	NC_017831.1	4092668	67.9	11823	2888.8	578	141.2	1189	10.06	0.26
	Chr-2	NC_017832.1	3138747	68.5	9781	3116.2	511	162.8	1062	10.86	
	Геном		7231415	68.16	21604	2987.5	1089	150.6	2251	10.42	
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106a											
4	Chr-1	NC_009076.1	3988455	68.0	11625	2914.7	542	135.9	1132	9.74	-0.21
	Chr-2	NC_009078.1	3100794	68.6	9790	3157.3	512	165.1	1078	11.01	
	Геном		7089249	68.26	21415	3020.8	1054	148.7	2210	10.32	
<i>Burkholderia pseudomallei</i> NAU20B-16											
5	Chr-1	CP004003.1	4067895	67.8	11723	2881.8	564	138.6	1161	9.9	-0.01
	Chr-2	CP004004.1	3245956	68.3	9893	3047.8	494	152.2	1044	10.55	
	Геном		7313851	68.02	21616	2955.5	1058	144.7	2205	10.20	
<i>Burkholderia pseudomallei</i> BPC006											
6	Chr-1	NC_018527.1	4001777	68.0	11673	2917.0	538	134.4	1124	9.63	-0.13
	Chr-2	NC_018529.1	3153284	68.5	9829	3117.1	514	163.0	1077	10.96	
	Геном		7155061	68.22	21502	3005.1	1052	147.0	2201	10.24	
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 668											
7	Chr-1	NC_009074.1	3912947	68.0	11457	2928.0	537	137.2	1120	9.78	-0.18
	Chr-2	NC_009075.1	3127456	68.6	9823	3140.9	517	165.3	1088	11.08	
	Геном		7040403	68.27	21280	3022.6	1054	149.7	2208	10.38	
<i>Burkholderia pseudomallei</i> NCTC 13178											
8	Chr-1	CP004001.1	4029450	67.8	11555	2867.6	586	145.4	1208	10.45	0.07
	Chr-2	CP004002.1	3361911	68.1	10130	3013.2	527	156.8	1106	10.92	
	Геном		7391361	67.94	21685	2933.8	1113	150.6	2314	10.67	
<i>Burkholderia pseudomallei</i> NCTC 13179											
9	Chr-1	NC_022659.1	3997084	67.9	11593	2900.4	581	145.4	1194	10.3	0.12
	Chr-2	NC_022658.1	3340066	68.1	10042	3006.5	500	149.7	1050	10.46	
	Геном		7337150	67.99	21635	2948.7	1081	147.3	2244	10.37	

Таблица 2. Окончание

№ п/п	Номер хромосомы	Номер доступа GenBank	Размер, п.н.	GC (%)	SSRs		Компаунды				
					СМ	RA _{СМ}	ССМ	RA _{ССМ}	СсSSR	сSSR%	Z-критерий
10	<i>Burkholderia pseudomallei</i> MSHR305										
	Chr-1	CP006470.1	4054155	67.8	11690	2883.5	576	142.1	1192	10.2	
	Chr-2	CP006469.1	3373916	68.0	10020	2969.8	512	151.8	1068	10.66	
	Геном		7428071	67.89	21710	2922.7	1088	146.5	2260	10.41	0.10

Примечание. СМ – число микросателлитов; RA_{СМ} – плотность микросателлитов; ССМ – число компаундов; RA_{ССМ} – плотность компаундов; СсSSR – число микросателлитов, входящих в состав компаундов; сSSR% – процентная доля СсSSR от общего числа обнаруженных микросателлитов; Z-критерий – показатель статистической значимости различий между наблюдаемым (ССМ_{obs}) и ожидаемым (ССМ_{exp}) числом компаундов в каждом геноме.

тали с увеличением dMAX, но зависимость не удовлетворяла требованиям линейности (рис. 1).

Таким образом, выбор оптимальной величины расстояния между блоками микросателлитов в составе компаундов далеко не тривиальная задача. Для идентификации компаундов мы использовали значение dMAX, равное 10 п.н., что позволяло провести сравнение полученных нами результатов с ранее опубликованными данными, так как пороговое значение 10 п.н. было использовано при изучении сложных микросателлитов в геноме эукариот и ряда прокариот [16, 18, 19].

*Содержание, плотность и расположение
вырожденных и сложных микросателлитов
в геномах B. pseudomallei*

В ходе проведенного компьютерного анализа нуклеотидных последовательностей 10 штаммов *B. pseudomallei* из базы данных GenBank выявлено в общей сложности 215 683 микросателлита. Число повторов на геном варьировало от 21280 для *B. pseudomallei* 668 до 21 710 для *B. pseudomallei* MSHR305 (табл. 2); при этом плотность микросателлитов изменялась в обратном направлении: от 2922.7/млн.п.н. (*B. pseudomallei* MSHR305) до 3022.6/млн.п.н. (*B. pseudomallei* 668).

В результате анализа *in silico* выявлено 10720 компаундов (табл. 2). Их содержание варьировало от 1052 в геноме штамма *B. pseudomallei* BPC006 до 1113 в геноме *B. pseudomallei* NCTC 13178. Величина СсSSR, отражающая число SSRs в составе компаундов, изменялась в диапазоне от 2201 (*B. pseudomallei* BPC006) до 2314 (*B. pseudomallei* NCTC 13178). Плотность компаундов изменялась в пределах от 144.7/млн.п.н. (*B. pseudomallei* NAU20B-16) до 150.6/млн.п.н. (*B. pseudomallei* 1026b и *B. pseudomallei* NCTC 13178). Значения процентной доли СсSSR от общего числа обнаруженных микросателлитов (сSSR%) варьировали в зависимости от штамма в диапазоне от 10.2% (*B. pseudo-*

mallei NAU20B-16) до 10.67% (*B. pseudomallei* NCTC 13178).

Полученные значения Z-критерия не позволили выявить статистически значимых различий между наблюдаемым (ССМ_{obs}) и ожидаемым (ССМ_{exp}) числом компаундов в каждом геноме. Для штаммов *B. pseudomallei* 1710b, 1106a, NAU20B-16, BPC006 и 668 величина ССМ_{obs} оказалась меньше, чем ССМ_{exp}. Напротив, значение ССМ_{obs} превышало ССМ_{exp} в геномах штаммов *B. pseudomallei* K96243, 1026b, NCTC 13178, NCTC 13179 и MSHR305 (табл. 2). Межштаммовые различия в значениях Z-критерия обусловлены использованием усредненной величины сложности компаундов (\bar{C}) в составе проанализированных геномов при расчете ожидаемого числа сложных микросателлитов. Установлена статистически значимая корреляция Z-критерия со сложностью компаундов ($r = -0.99$, $p < 10^{-4}$). Для оценки величины среднего значения сложных микросателлитов в геноме рассчитывали 95%-ный доверительный интервал на основе выборочных данных, пределы которого составили 1057–1086 компаундов.

Необходимо учитывать, что установленные параметры поиска микросателлитов приводят к обнаружению как вырожденных SSRs, так и совершенных повторов. На долю вырожденных микросателлитов приходилось около 98% от всех выявленных в общей сложности 215 683 микросателлитов в геномах 10 штаммов *B. pseudomallei*. Компаунды, в свою очередь, также преимущественно были составлены из вырожденных микросателлитов и лишь около 1% SSRs в их составе представлены совершенными повторами.

С целью выявления распределения вырожденных и сложных микросателлитов в геномах исследуемых штаммов *B. pseudomallei* проанализирована их представленность в кодирующих и некодирующих областях генома. В среднем число SSRs и компаундов в кодирующей области генома

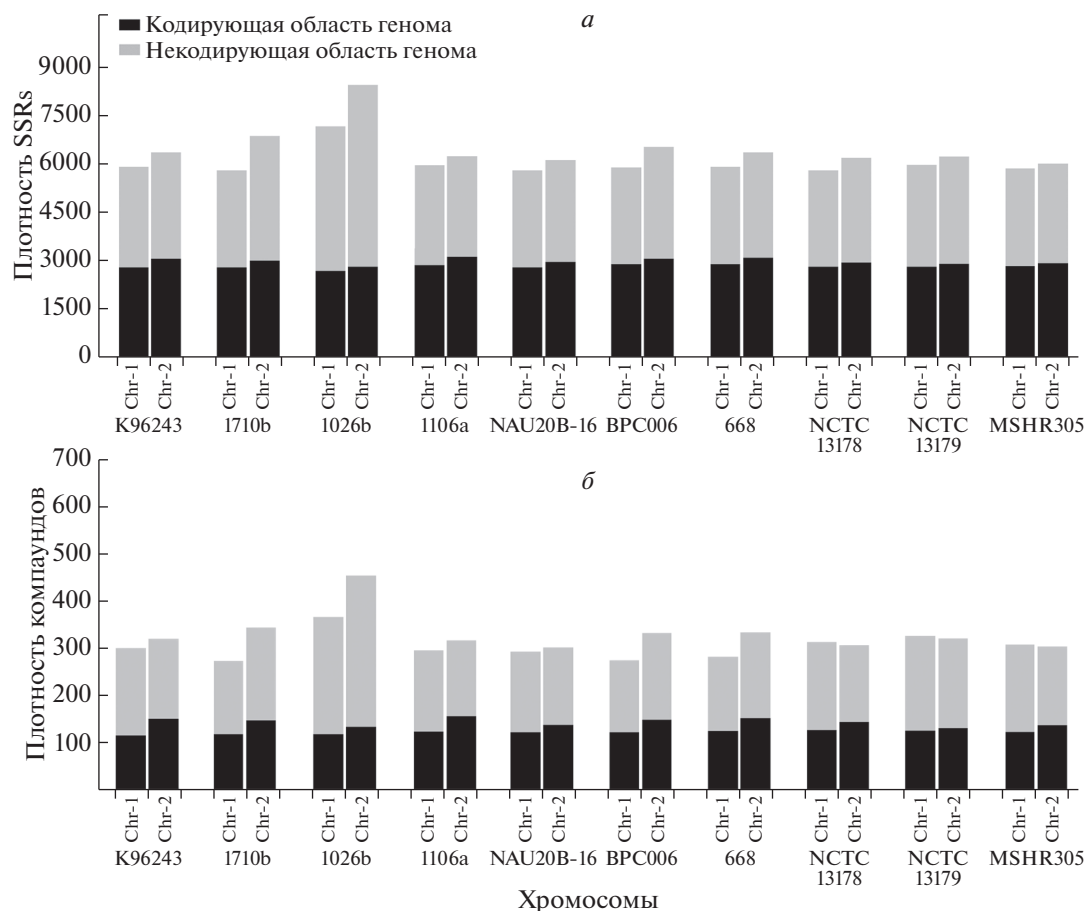


Рис. 2. Распределение вырожденных и сложных микросателлитов в кодирующих и некодирующих областях генома каждой из хромосом 10 штаммов *B. pseudomallei*. (а) – Плотность SSRs (число микросателлитов на 1 млн.п.н.); (б) – плотность компаундов (число компаундов на 1 млн.п.н.).

соответствовало 84.49 и 81.56% от общего числа найденных повторов. Однако при нормировании числа SSRs и сложных микросателлитов на общий размер генома большая обогатенность повторами выявлена для некодирующей области. Средняя плотность SSRs и компаундов составляла соответственно 5859.1/млн.п.н. и 282.8/млн.п.н. в кодирующих регионах и 6759.9/млн.п.н. и 396.3/млн.п.н. в некодирующих областях (рис. 2).

*Линейный корреляционный анализ связей количественной представленности микросателлитов и компаундов со структурными особенностями генома *B. pseudomallei**

Выявление достоверных корреляционных взаимосвязей количества и плотности вырожденных и сложных микросателлитов с такими параметрами генома *B. pseudomallei*, как его размер и GC-содержание, необходимо для понимания факторов, связанных с возникновением и распространением микросателлитов по геному. Результаты прове-

денного корреляционного анализа систематизированы в табл. 3.

При анализе возможных корреляций между размером генома и GC-содержанием исследованных штаммов *B. pseudomallei* с числом и плотностью SSRs выявлен разнонаправленный характер их взаимовлияния: увеличение размера генома коррелировало с увеличением числа ($r = 0.95$, $p < 10^{-4}$) и уменьшением плотности ($r = -0.99$, $p < 10^{-7}$) SSRs, а увеличение GC-содержания, напротив, сопровождалось уменьшением содержания SSRs ($r = -0.89$, $p < 10^{-3}$) и увеличением их плотности в геноме ($r = 0.98$, $p < 10^{-6}$). В то же время не выявлено достоверной корреляционной связи размера генома и GC-содержания с плотностью компаундов.

Аналогичный характер корреляционных взаимосвязей наблюдался между количественной представленностью SSRs и размером каждой из хромосом *B. pseudomallei*. Однако для хромосомы 2 выявлена более значимая корреляция ее размера с числом и плотностью SSRs ($r = 0.93$ при $p < 10^{-4}$ и $r = -0.98$ при $p < 10^{-6}$ соответственно), чем для

Таблица 3. Результаты корреляционного анализа связей количественной представленности микросателлитов и компаундов со структурными особенностями генома *B. pseudomallei*

Число и плотность SSRs и компаундов		Размер генома/хромосомы	GC-содержание генома/хромосомы
Геном	CM	$r = 0.95, p < 10^{-4}$	$r = -0.89, p < 10^{-3}$
	RA _{CM}	$r = -0.99, p < 10^{-7}$	$r = 0.98, p < 10^{-6}$
	CCM	$r = 0.68, p = 0.03$	$r = -0.62, p = 0.06$
	RA _{CCM}	$r = -0.32, p = 0.37$	$r = 0.37, p = 0.29$
Chr-1	CM	$r = 0.86, p < 10^{-2}$	$r = -0.42, p = 0.23$
	RA _{CM}	$r = -0.86, p < 10^{-2}$	$r = 0.96, p < 10^{-5}$
	CCM	$r = 0.24, p = 0.51$	$r = -0.13, p = 0.72$
	RA _{CCM}	$r = -0.19, p = 0.61$	$r = 0.21, p = 0.72$
Chr-2	CM	$r = 0.93, p < 10^{-4}$	$r = -0.88, p < 10^{-3}$
	RA _{CM}	$r = -0.98, p < 10^{-6}$	$r = 0.99, p < 10^{-7}$
	CCM	$r = -0.11, p = 0.76$	$r = 0.2, p = 0.58$
	RA _{CCM}	$r = -0.87, p < 10^{-3}$	$r = 0.91, p = 10^{-3}$

хромосомы 1 ($r = 0.86$ при $p < 10^{-2}$ и $r = -0.86$ при $p < 10^{-2}$ соответственно). Увеличение GC-содержания было сопряжено с увеличением плотности SSRs, как в составе хромосомы 1 ($r = 0.96$ при $p < 10^{-5}$), так и в составе хромосомы 2 ($r = 0.99$ при $p < 10^{-7}$).

При анализе взаимосвязи плотности компаундов с размером и GC-содержанием каждой хромосомы выявлены статистически значимые корреляции только для хромосомы 2. Важно, что плотность компаундов коррелировала с размером ($r = -0.87$ при $p < 10^{-3}$) и GC-содержанием ($r = 0.91$ при $p < 10^{-3}$) хромосомы 2 – аналогично плотности SSRs, что нашло отражение в прямой очень сильной корреляции между плотностями SSRs и компаундов в составе хромосомы 2 ($r = 0.93, p < 10^{-3}$).

Сложность компаундов. Структура мотивов вырожденных и сложных микросателлитов

Сложность компаунда определяется числом индивидуальных микросателлитов, сSSRs, входящих в его состав. Например, компаунд (GCG)₄-x₃-(CG)₆ содержит 2 сSSRs, а компаунд (CGC)₄-x₅-(GC)₆-x₆-(GCG)₅ включает 3 сSSRs, поэтому их сложности выражаются как $C = 2$ и $C = 3$ соответственно. Первый тип сложных микросателлитов обозначают как 2-SSR-, а второй как 3-SSR-компаунды [22]. Для всех исследованных штаммов *B. pseudomallei* выявлена обогащенность 2-SSR-компаундами как хромосомы 1, так и хромосомы 2, что в среднем составило 93.13% и 91.99% от общего числа найденных в составе каж-

дой хромосомы компаундов. Следующими по частоте встречаемости оказались 3-SSR-компаунды (6.47% для хромосомы 1 и 7.08% для хромосомы 2) и 4-SSR-компаунды (0.38% для хромосомы 1 и 0.70% для хромосомы 2). Сложные микросателлиты со значением $C \geq 5$ представлены единичными вариантами. Компаунды наибольшей сложности обнаружены в составе хромосомы 2 штаммов *B. pseudomallei* NAU20B-16 и *B. pseudomallei* 668 и составили $C = 8$ и $C = 9$ соответственно. В целом, хромосома 2 проанализированных штаммов возбудителя мелиоидоза содержала более сложно организованные компаунды, чем хромосома 1. Показано, что доля компаундов со значением $C \geq 4$ от общего числа сложных микросателлитов составила в среднем 0.4% для хромосомы 1, в то время как для хромосомы 2 этот показатель был равен 0.94%.

Нуклеотидный состав и размер мотива определяют частоту его встречаемости в составе микросателлитного локуса. Полученные результаты анализа вырожденных и сложных микросателлитов в геномах штаммов *B. pseudomallei* продемонстрировали более высокую распространенность ди- и тринуклеотидных последовательностей по сравнению с тетра-, пента- и гексаповторами при общей обогащенности всех мотивов GC-нуклеотидами. Интересно также отметить, что в геноме *B. pseudomallei* мотивы, наиболее часто образующие тандемные повторы, составляли довольно ограниченное множество и имели узкий диапазон копийности в составе микросателлитного локуса (табл. 4). Как видно из табл. 4, самые распространенные мотивы в составе вырожденных и сложных микросателлитов были идентичны для обеих хромосом *B. pseudomallei*. Установлено, что

Таблица 4. Наиболее часто встречающиеся мотивы и их средняя копияность в составе SSRs-локусов и компаундов для каждой из хромосом *B. pseudomallei*

SSRs								Компаунды			
Хромосома 1				Хромосома 2				Хромосома 1		Хромосома 2	
мотив	число повторов	копийность мотива и число SSRs		мотив	число повторов	копийность мотива и число SSRs		мотив	число повторов	мотив	число повторов
		$\times n^a$	N^b			$\times n^a$	N^b				
CG	2453	$\times 6$	1724	CG	2165	$\times 6$	1502	CG	239	CG	221
		$\times 7$	574			$\times 7$	546				
GC	1838	$\times 6$	1329	GC	1588	$\times 6$	1134	GC	184	GC	155
		$\times 7$	382			$\times 7$	355				
CGC	897	$\times 4$	763	CGC	765	$\times 4$	657	GCG	95	CGC	87
GCG	852	$\times 4$	725	GCG	711	$\times 4$	603	CGC	95	GCG	85
TCG	422	$\times 4$	392	CGG	390	$\times 4$	349	CGG	51	GCC	50
CGG	415	$\times 4$	367	GCC	358	$\times 4$	320	GCC	48	CGG	39
GCC	410	$\times 4$	354	TCG	310	$\times 4$	282	TCG	26	TCG	27
CGA	379	$\times 4$	347	CGA	266	$\times 4$	244	CCG	26	CGA	26
CCG	210	$\times 4$	191	CCG	187	$\times 4$	162	CGA	24	CCG	26
GGC	208	$\times 4$	191	GGC	167	$\times 4$	147	GGC	24	GGC	25
CGT	182	$\times 4$	162	CGT	138	$\times 4$	127	ACG	16	CGT	15
ACG	171	$\times 4$	159	ACG	114	$\times 4$	110	CGT	12	GCCG	11
TGC	119	$\times 4$	114	GCA	98	$\times 4$	93	CGGC	11	ACG	11
AGC	119	$\times 4$	105	AGC	95	$\times 4$	87	GCCG	11	CGGC	11
GCT	105	$\times 4$	93	TGC	90	$\times 4$	83	GAC	9	AGC	8
GCA	104	$\times 4$	100	GCT	80	$\times 4$	67	TGC	9	CTG	8
GTC	97	$\times 4$	89	GCCG	74	$\times 4$	67	GTC	9	GCA	8
GAC	88	$\times 4$	81	CGGC	72	$\times 4$	64	AGC	8	TCGC	8
CGGC	82	$\times 3$	76	GAC	69	$\times 3$	64	CCGG	8	GCT	7
GCCG	79	$\times 3$	67	GTC	65	$\times 3$	55	GCCC	7	CCGG	7

^a $\times n$ – копияность мотива в составе SSR-локуса; ^b N – число SSRs с соответствующей копияностью мотива.

около 94% динуклеотидных CG/GC-микросателлитов представлены шести- или семикратной копияностью мотива, в то время как более 85% тринуклеотидных микросателлитов представлены четырехкратным входением “коровой” единицы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Простые повторяющиеся последовательности ДНК, состоящие из тандемных итераций коротких олигонуклеотидов, представляют собой гипермутируемые локусы и способны к обратимому изменению длины [12]. В ряде работ показано [36–38], что в геноме патогенных микроорганизмов сильному положительному отбору подвергаются высоко изменчивые микросателлитные локусы в составе генов, как правило, кодирующих

поверхностные антигены возбудителей. Динамическое изменение числа повторов в структуре таких генов вносит существенный вклад в антигенные вариации бактерий и обеспечивает им ускользание от иммунного надзора организма-хозяина; при этом полиморфизм генов обусловлен протяженными участками SSRs с числом входения “коровой” единицы не менее 8 раз [39, 40]. Согласно существующей гипотезе, изменение числа повторов в составе микросателлитного локуса направляется проскальзыванием полимеразы при репликационных, репарационных и других процессах [41]. Однако мало что известно о механизмах проскальзывания полимеразы при чрезвычайно коротких локусах SSRs, включающих от двух до пяти тандемно повторяющихся мотивов и широко представленных в бактериальных геномах. В по-

добных коротких локусах SSRs некоторых микроорганизмов выявлен высокий уровень мутаций [42, 43]. Накопление точечных мутаций в составе микросателлитного кластера приводит к образованию несовершенных повторов и компаундов, которые могут прерывать рост тандемов и, тем самым, стабилизировать их в результате нарушения процесса проскальзывания полимеразы.

На широком круге разнообразных видов прокариотических организмов было показано, что протяженные SSR-локусы характерны для бактерий, адаптированных к экологической нише своего хозяина; причем для большинства таких бактерий размер генома и GC-содержание не превышали соответственно 2 млн.п.н. и 40%. По-видимому, подобная взаимосвязь между уникальными условиями средовой ниши и структурными особенностями генома поддерживается отбором и обеспечивает антигенную вариативность как часть защитных реакций бактерий, узко адаптированных к биотопам организма хозяина [3]. Однако для бактериальных видов с крупными геномами, в качестве среды обитания которых характерны разнообразные и сложные по структуре экосистемы с широким диапазоном условий, выявлена низкая представленность протяженных SSR-локусов. К числу таких видов относится возбудитель мелиоидоза, адаптировавшийся к возможностям как сапрофитного, так и паразитического существования. Геном *B. pseudomallei* представлен двумя хромосомами с размерами около 4 млн.п.н. и 3 млн.п.н., каждая из которых несет гены рибосомальных и транспортных РНК. Нуклеотидный состав генома обогащен GC-парами, доля которых в среднем составляет около 68%, а плотность белоккодирующих генов превышает 90%. С целью прояснить возможную функциональную роль SSRs в механизмах адаптационной пластичности возбудителя мелиоидоза мы проанализировали вырожденные и сложные микросателлиты в геномах 10 штаммов *B. pseudomallei*.

Проведен сравнительный анализ полученных результатов с опубликованными данными исследований SSRs и компаундов в геномах видов *Lactobacillus* spp. [19] и *Escherichia coli* [18]. В качестве общей характеристики, присущей геномам *B. pseudomallei*, *Lactobacillus* spp. и *E. coli*, нужно отметить экологическую пластичность, что позволяет этим патогенам существовать в различных экологических нишах, включая объекты окружающей среды и различные биотопы организма человека и животных. Вместе с тем, структурная организация геномов *Lactobacillus* spp. и *E. coli* заметно отличается от генома *B. pseudomallei* — прежде всего, это меньший размер их геномов и более низкое содержание GC-пар (2 млн.п.н. и 42% для *Lactobacillus* spp. и 5 млн.п.н. и 50% для *E. coli*).

При количественном сопоставлении результатов оказалось, что диапазон плотности микросателлитов (2922.7–3022.6/млн.п.н.) и компаундов (144.7–150.6/млн.п.н.) в геномах проанализированных штаммов *B. pseudomallei* значительно превосходил соответствующие показатели для *Lactobacillus* spp. (506.7–1040.9 микросателлитов/млн.п.н.; 3.3–16.4 компаундов/млн.п.н.) и *E. coli* (644.6–675.7 микросателлитов/млн.п.н.; 5.5–9.4 компаундов/млн.п.н.). Различную плотность SSRs и компаундов в геномах *B. pseudomallei*, *Lactobacillus* spp. и *E. coli* нельзя объяснить исключительно вариативностью размеров их геномов. При анализе представленности вырожденных и сложных микросателлитов в каждой из хромосом *B. pseudomallei* обнаружен сходный с полногеномным диапазон плотности: 2844.7–2928 микросателлитов/млн.п.н. и 130.6–145.4 компаундов/млн.п.н. для хромосомы 1; 2969.8–3157.3 микросателлитов/млн.п.н. и 149.7–165.3 компаундов/млн.п.н. для хромосомы 2. Размер каждой из хромосом *B. pseudomallei* не превосходит размера генома сравниваемых штаммов *E. coli*, что может свидетельствовать о вероятной видоспецифичности плотности микросателлитов, определяемой структурными особенностями генома.

Для установления характера структуры взаимосвязей между показателями количественного содержания SSRs и компаундов с такими параметрами генома *B. pseudomallei*, как его размер и GC-содержание, был проведен корреляционный анализ. Нами выявлено сопряженное увеличение плотности SSRs с GC-содержанием, а также обратная взаимосвязь плотности SSRs с размером, как для генома в целом, так и для каждой из хромосом. Однако в случае сложных микросателлитов достоверную корреляционную связь между плотностью компаундов и структурными особенностями генома удалось установить только для хромосомы 2.

Определение закономерностей взаимосвязи плотности вырожденных и сложных микросателлитов позволяет предполагать возможный механизм образования компаундов. Так, Kofler с соавт. [16], при исследовании кластеризации микросателлитов в геномах 8 разных эукариотических видов, в качестве возможного механизма образования компаундов предложили процесс замещения нуклеотидов в концевых мотивах микросателлитного тракта с последующей экспансией таких несовершенных повторов. Подобный механизм формирования сложных микросателлитов должен приводить к тесной прямой корреляционной связи между плотностями SSRs и компаундов, что и было показано авторами [16]. Однако Chen и др. [18] при исследовании содержания сложных микросателлитов в геномах штаммов *E. coli* выявили очень слабую корреляцию между плотностями SSRs и компаундов, а разный характер ассоциации плотностей микросателлитов и компаундов в эу-

кариотических и прокариотических геномах объяснили функционированием различных ДНК-полимераз и механизмов репликации. В дальнейшем Basharat & Yasmin [19] при анализе представленности компаундов в геномах *Lactobacillus* spp. пришли к заключению о зависимости ассоциации плотностей SSRs и компаундов у прокариот от видовой принадлежности и рекомбинационного потенциала. При анализе штаммов *B. pseudomallei* мы выявили статистически значимую взаимосвязь между плотностью вырожденных и сложных микросателлитов только для хромосомы 2. Эти результаты вполне согласуются с выводами Basharat & Yasmin [19] о видоспецифичности и структурных особенностях генома как факторов, определяющих плотности SSRs и компаундов. Более того, нами показано, что даже в рамках одного вида структурная организация каждой из хромосом может быть ассоциирована с разной плотностью SSRs и компаундов.

В результате анализа размера и нуклеотидного состава мотивов в структуре выявленных SSRs обнаружено преобладание GC-богатых ди- и тринуклеотидных повторов в геноме *B. pseudomallei*. Показано почти полное отсутствие мононуклеотидных треков и AT/TA-микросателлитов. Особенно интересным оказалось обнаружение перепредставленности определенной копияности мотива для ди- и тринуклеотидных микросателлитных последовательностей. Так, выявлено преимущественное шести- и семикратное вхождение “коровой” единицы в состав динуклеотидных микросателлитных локусов, в то время как размер тринуклеотидных повторов соответствовал в основном четырехкратной копияности мотива. Именно возможность формирования стабильных шпилечных структур некоторыми тринуклеотидными повторами: (CGG)_n, (CTG)_n, (CAG)_n, (CCG)_n и др., – которые способствуют проскальзыванию ДНК-полимеразы в ходе репликации, считается основой для исключительной нестабильности микросателлитов, что проявляется в изменении числа “коровых” единиц в их составе [44]. Однако при анализе геномов штаммов *B. pseudomallei* нами выявлена широкая представленность тринуклеотидных микросателлитных повторов и малая копияность мотивов в их составе, что свидетельствует скорее о низком уровне проскальзывания полимеразой этих участков генома в процессе репликации. Согласно существующей теории [41], при возникновении микросателлиты не содержат ошибок (замен, делеций и вставок), но появляющиеся в процессе биологической эволюции точечные мутации приводят к их накоплению, что становится препятствием для проскальзывания полимеразы и для дальнейшей экспансии повторов в составе микросателлитного локуса. Возможно, именно вырожденность большинства SSRs, составившая около 98% от всех об-

наруженных микросателлитов в геномах *B. pseudomallei*, способствовала дестабилизации образующих ими шпилечных структур и ограничивала увеличение длины блока микросателлитов.

При исследовании сложности компаундов, выявленных в геномах *B. pseudomallei*, продемонстрирована преимущественная представленность 2-SSR- и 3-SSR-компаундов в обеих хромосомах; лишь незначительная часть сложных микросателлитов оказалась представленной 4-SSR-компаундами. За исключением штамма *B. pseudomallei* MSHR305, компаунды со сложностью $C \geq 5$ в исследованных штаммах возбудителя мелиоидоза представлены исключительно в составе хромосомы 2. Такой характер распределения сложноструктурированных компаундов в геноме *B. pseudomallei* может быть обусловлен более высокой плотностью SSRs в составе хромосомы 2, что повышает вероятность их вовлечения в формирование сложных микросателлитов. Оказалось, что большинство сложных микросателлитов составлено из разных мотивов, отличающихся как по размеру, так и по нуклеотидному составу, и это вполне согласуется с данными по структуре компаундов в геноме *E. coli* [18] и у видов рода *Lactobacillus* [19]. В то же время у эукариот, по меньшей мере в 90% всех обнаруженных 2-SSR-компаундов, выявленные мотивы имели очень схожую структуру [16]. Подобные различия в структурной организации сложных микросателлитов прокариот и эукариот, возможно, определяются разными механизмами их возникновения: фиксация полиморфизмов в составе разных SSR-локусов с последующим их вовлечением в формирование сложных микросателлитов у прокариот и последовательная экспансия вырожденных повторов в составе одного SSR-локуса у эукариот.

Таким образом, нами обнаружена вырожденность и малая копияность мотивов в составе большинства выявленных в геномах *B. pseudomallei* микросателлитов. Эти результаты можно рассматривать как подтверждение гипотезы, согласно которой протяженные локусы SSRs подвержены отрицательному отбору в геномах большинства прокариот, способных выживать как в организме хозяина, так и во внешней среде, наряду с увеличением размера и GC-обогащенностью их геномов [3]. Несмотря на значительный диапазон вариативности размера и GC-содержания геномов *B. pseudomallei*, *Lactobacillus* spp. и *E. coli*, единый характер направленности изменений в содержании микросателлитов может быть отражением экологических особенностей этих бактерий. Возможно, в основе выявленных тенденций, вырожденности и низкой копияности мотивов в составе микросателлитов, лежит механизм накопления точечных мутаций в локусах SSRs, что приводит к прерыванию блока повторов в результате формирования легко преодолимых в процессе репликации вто-

ричных структур, стабилизирующих длину микросателлитного локуса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tautz D. (1993) Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. *EXS.* **67**, 21–28.
2. Zhao X., Tan Z., Feng H., Yang R., Li M., Jiang J., Shen G., Yu R. (2011) Microsatellites in different *Potyvirus* genomes: survey and analysis. *Gene.* **488**(1–2), 52–56.
3. Mrazek J., Guo X., Shah A. (2007) Simple sequence repeats in prokaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**(20), 8472–8477.
4. Saeed A.F., Wang R., Wang S. (2016) Microsatellites in pursuit of microbial genome evolution. *Front. Microbiol.* **6**, 1462.
5. Toth G., Gaspari Z., Jurka J. (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.* **10**(7), 967–981.
6. Dieringer D., Schlotterer C. (2003) Two distinct modes of microsatellite mutation processes: evidence from the complete genomic sequences of nine species. *Genome Res.* **13**(10), 2242–2251.
7. Hong C.P., Piao Z.Y., Kang T.W. (2007) Genomic distribution of simple sequence repeats in *Brassica rapa*. *Mol. Cells.* **23**(3), 349–356.
8. Rajendrakumar P., Biswal A.K., Balachandran S.M., Srinivasarao K., Sundaram R.M. (2007) Simple sequence repeats in organellar genomes of rice: frequency and distribution in genic and intergenic regions. *Bioinformatics.* **23**(1), 1–4.
9. Kashi Y., King D., Soller M. (1997) Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends Genet.* **13**(2), 74–78.
10. Gur-Arie R., Cohen C.J., Eitan Y., Shelef L., Hallerman E.M., Kashi Y. (2000) Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: abundance, distribution, composition, and polymorphism. *Genome Res.* **10**(1), 62–71.
11. Huang T.S., Lee C.C., Chang A.C., Lin S., Chao C.C., Jou Y.S., Chu Y.W., Wu C.W., Whang-Peng J. (2003) Shortening of microsatellite deoxy (CA) repeats involved in GL331-induced down-regulation of matrix metalloproteinase-9 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**(4), 901–907.
12. Kashi Y., King D.G. (2006) Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *Trends Genet.* **22**(5), 253–259.
13. Boeva V., Regnier M., Papatsenko D., Makeev V. (2006) Short fuzzy tandem repeats in genomic sequences, identification, and possible role in regulation of gene expression. *Bioinformatics.* **22**(6), 676–684.
14. Bull L.N., Pabon-Pena C.R., Freimer N.B. (1999) Compound microsatellite repeats: practical and theoretical features. *Genome Res.* **9**(9), 830–838.
15. Weber J.L. (1990) Informativeness of human (dC-dA)n.(dG-dT)n polymorphisms. *Genomics.* **7**(4), 524–530.
16. Kofler R., Schlotterer C., Luschnitzky E., Lelley T. (2008) Survey of microsatellite clustering in eight fully sequenced species sheds light on the origin of compound microsatellites. *BMC Genomics.* **9**, 612.
17. Jia D. (2016) Survey and analysis of simple sequence repeats (SSRs) in three genomes of *Candida* species. *Gene.* **584**(2), 129–135.
18. Chen M., Zeng G., Tan Z., Jiang M., Zhang J., Zhang C., Lu L., Lin Y., Peng J. (2011) Compound microsatellites in complete *Escherichia coli* genomes. *FEBS Lett.* **585**(7), 1072–1076.
19. Basharat Z., Yasmin A. (2015) Survey of compound microsatellites in multiple *Lactobacillus* genomes. *Can. J. Microbiol.* **61**(12), 898–902.
20. Alam C.M., Singh A.K., Sharfuddin C., Ali S. (2014) Genome-wide scan for analysis of simple and imperfect microsatellites in diverse carlaviruses. *Infect. Genet. Evol.* **21**, 287–294.
21. Alam C.M., Singh A.K., Sharfuddin C., Ali S. (2014) Incidence, complexity and diversity of simple sequence repeats across potyvirus genomes. *Gene.* **537**(2), 189–196.
22. Wu X., Zhou L., Zhao X., Tan Z. (2014) The analysis of microsatellites and compound microsatellites in 56 complete genomes of *Herpesvirales*. *Gene.* **551**(1), 103–109.
23. Liguori A.P., Warrington S.D., Ginther J.L., Pearson T., Bowers J., Glass M.B., Mayo M., Wuthiekanun V., Engelthaler D., Peacock S.J., Currie B.J., Wagner D.M., Keim P., Tuanyok A. (2011) Diversity of 16S–23S rDNA Internal Transcribed Spacer (ITS) reveals phylogenetic relationships in *Burkholderia pseudomallei* and its near-neighbors. *PLoS One.* **6**(12), e29323.
24. Godoy D., Randle G., Simpson A.J., Aanensen D.M., Pitt T.L., Kinoshita R., Spratt B.G. (2003) Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *J. Clin. Microbiol.* **41**(5), 2068–2079.
25. Holden M.T., Titball R.W., Peacock S.J., Cerdeño-Tárraga A.M., Atkins T., Crossman L.C., Pitt T., Churcher C., Mungall K., Bentley S.D., Sebahia M., Thomson N.R., Bason N., Beacham I.R., Brooks K., Brown K.A., Brown N.F., Challis G.L., Cherevach I., Chillingworth T., Cronin A., Crossett B., Davis P., De-Shazer D., Feltwell T., Fraser A., Hance Z., Hauser H., Holroyd S., Jagels K., Keith K.E., Maddison M., Moule S., Price C., Quail M.A., Rabinowitz E., Rutherford K., Sanders M., Simmonds M., Songvilai S., Stevens K., Tumapa S., Vesaratchavest M., Whitehead S., Yeats C., Barrell B.G., Oyston P.C., Parkhill J. (2004) Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**(39), 14240–14245.
26. Nandi T., Ong C., Singh A.P., Boddey J., Atkins T., Sarkar-Tyson M., Essex-Lopresti A.E., Chua H.H., Pearson T., Kreisberg J.F., Nilsson C., Ariyaratne P., Ronning C., Losada L., Ruan Y., Sung W.K., Woods D., Titball R.W., Beacham I., Peak I., Keim P., Nierman W.C., Tan P. (2010) A genomic survey of positive selection in *Burkholderia pseudomallei* provides insights into the evolution of accidental virulence. *PLoS Pathog.* **6**(4), e1000845.
27. DeShazer D. (2004) Genomic diversity of *Burkholderia pseudomallei* clinical isolates: subtractive hybridization reveals a *Burkholderia mallei*-specific prophage in *B. pseudomallei* 1026b. *J. Bacteriol.* **186**(12), 3938–3950.
28. Fang Y., Huang Y., Li Q., Chen H., Yao Z., Pan J., Gu J., Tang B., Wang H.G., Yu B., Tong Y.G., Zou Q.M., Mao X.H. (2012) First genome sequence of a *Burk-*

- holderia pseudomallei* isolate in China, strain BPC006, obtained from a melioidosis patient in Hainan. *J. Bacteriol.* **194**(23), 6604–6605.
29. Challacombe J.F., Stubben C.J., Klimko C.P., Welkos S.L., Kern S.J., Bozue J.A., Worsham P.L., Cote C.K., Wolfe D.N. (2014) Interrogation of the *Burkholderia pseudomallei* genome to address differential virulence among isolates. *PLoS One.* **9**(12), e115951.
 30. Spring-Pearson S.M., Stone J.K., Doyle A., Allender C.J., Okinaka R.T., Mayo M., Broomall S.M., Hill J.M., Karavis M.A., Hubbard K.S., Insalaco J.M., McNew L.A., Rosenzweig C.N., Gibbons H.S., Currie B.J., Wagner D.M., Keim P., Tuanyok A. (2015) Pangenome analysis of *Burkholderia pseudomallei*: genome evolution preserves gene order despite high recombination rates. *PLoS One.* **10**(10), e0140274.
 31. Johnson S.L., Bishop-Lilly K.A., Ladner J.T., Daligault H.E., Davenport K.W., Jaissle J., Frey K.G., Koroleva G.I., Bruce D.C., Coyne S.R., Broomall S.M., Li P.E., Teshima H., Gibbons H.S., Palacios G.F., Rosenzweig C.N., Redden C.L., Xu Y., Minogue T.D., Chain P.S. (2015) Complete genome sequences for 59 *Burkholderia* isolates, both pathogenic and near neighbor. *Genome Announc.* **3**(2), e00159–15.
 32. Stone J.K., Johnson S.L., Bruce D.C., Detter J.C., Mayo M., Currie B.J., Gelhaus H.C., Keim P., Tuanyok A. (2013) Complete genome sequence of the encephalomyelitic *Burkholderia pseudomallei* strain MSHR305. *Genome Announc.* **1**(4), e00656–13.
 33. Jolley K.A., Maiden M.C. (2010) BIGSdb: scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics.* **11**, 595.
 34. Mudunuri S.B., Nagarajaram H.A. (2007) IMEx: Imperfect Microsatellite Extractor. *Bioinformatics.* **23**(10), 1181–1187.
 35. Mrazek J. (2006) Analysis of distribution indicates diverse functions of simple sequence repeats in *Mycoplasma* genomes. *Mol. Biol. Evol.* **23**(7), 1370–1385.
 36. Moxon E.R. (1994) Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Curr. Biol.* **4**(1), 24–33.
 37. Deitsch K.W. (2009) Common strategies for antigenic variation by bacterial, fungal and protozoan pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**(7), 493–503.
 38. Jordan P.W. (2005) Strain-specific differences in *Neisseria gonorrhoeae* associated with the phase variable gene repertoire. *BMC Microbiol.* **5**, 21.
 39. Потагуркина-Нестерова Н.И., Немова И.С., Магомедова А.М., Нестеров А.С. (2012) Патогенный потенциал микоплазм, эпидемиологически ассоциированных с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта. *Фундаментальные исследования.* **1**, 89–92.
 40. Groisman E.A., Casadesus J. (2005) The origin and evolution of human pathogens. *Mol. Microbiol.* **56**(1), 1–7.
 41. Schlotterer C. (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma.* **109**(6), 365–371.
 42. Field D., Eggert L., Metzgar D., Rose R., Wills C. (1996) Use of polymorphic short and clustered coding-region microsatellites to distinguish strains of *Candida albicans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **15**(2–3), 73–79.
 43. Field D., Wills C. (1998) Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**(4), 1647–1652.
 44. Paiva A.M., Sheardy R.D. (2004) Influence of sequence context and length on the structure and stability of triplet repeat DNA oligomers. *Biochemistry.* **43**(44), 14218–14227.

IMPERFECT AND COMPOUND MICROSATELLITES IN STRAINS OF *Burkholderia pseudomallei*

M. L. Ledenyova¹*, G. A. Tkachenko¹, I. M. Shpak¹

¹ Volgograd Anti-Plague Institute of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Volgograd, 400131 Russia

*e-mail: volresin@yandex.ru

The evolution of microsatellites (or simple sequence repeats, SSRs) involves the conversion of perfect repeats into novel structural elements comprised of imperfect and compound microsatellites. Here we present *in silico* analysis of 10 genomes of *Burkholderia pseudomallei* with a mapping of 215,683 microsatellites, more than 98% of them imperfect. The density of microsatellites in studied genomes was in the range of 2,922.7 to 3,022.6 per Mbp. About 10.20–10.67% of detected tandem repeats were included in the compound microsatellites. The density of compound microsatellites varied from 144.7 to 150.6 per Mbp. Inter-strain differences in the distributions of microsatellites may be explained by a correlation of SSRs density with GC content and the inverse relationship between the density of SSRs and the size of the genome. For each chromosome of *B. pseudomallei*, the density of SSRs was correlated with its size and GC-content. For chromosome 2, a significant correlation between the density of SSRs and compound microsatellites was observed ($r = 0.93$, $p < 10^{-3}$). These observations are in agreement with previously stated hypothesis concerning long SSRs being a subject of negative selection. Accumulation of point mutations and resultant interruption in the blocks of repeats which arise in course of replication may lead to the formation of secondary structures which stabilize the length of the microsatellite loci.

Keywords: SSRs, microsatellites, *in silico* search, *Burkholderia pseudomallei*, structural motif