

УДК 575.113:579.841.11:593.4(282.256.431)

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ ПОЛИКЕТИДСИНТАЗ (PKS)
В ГЕНОМЕ ШТАММА *Pseudomonas fluorescens* 28Bb-06
ИЗ ПРЕСНОВОДНОЙ ГУБКИ *Baikalospongia bacillifera***

© 2012 г. И. А. Липко (Теркина)*, О. В. Калюжная, О. С. Кравченко, В. В. Парфенова

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, 664033

Поступила в редакцию 21.11.2011 г.

Принята к печати 19.12.2011 г.

Ключевые слова: гены поликетидсинтаз (PKS), *Pseudomonas*, озеро Байкал.

IDENTIFICATION OF THE POLYKETIDE SYNTHASE GENES (PKS) IN GENOME OF THE STRAIN *Pseudomonas fluorescens* 28Bb-06 FROM THE FRESHWATER SPONGE *Baikalospongia bacillifera*, by I. A. Lipko (Terkina)*, O. V. Kaluzhnaya, O. S. Kravchenko, V. V. Parfenova (Limnological Institute, Siberian Division, Russian Academy of Science, Irkutsk, 664033 Russia; *e-mail: irinalipko@yandex.ru).

Keywords: genes of polyketide synthase (PKS), *Pseudomonas*, Lake Baikal.

Большое количество разнообразных биологически активных веществ (БАВ) бактериального происхождения являются поликетидами и синтезируются мультиферментными комплексами — поликетидсинтазами (PKS) [1]. Поскольку последовательности модулей в мультиферментных PKS системах соответствуют кластерам генов в геноме того или иного микроорганизма, можно выявить эти гены и, вместе с тем, потенциальную способность бактериальных штаммов продуцировать БАВ, с помощью ПЦР-скрининга. Данный метод широко используется для поиска новых биоактивных метаболитов в культурах микроорганизмов, выделенных из разнообразных природных сообществ, в том числе, — сообществ морских губок [2]. Однако для изучения метаболитов бактерий, обитающих в пресноводных губках, этот подход до настоящего время не использовался. Известно, что представители рода *Pseudomonas* доминируют в культивируемом микробном сообществе в озере Байкал и обнаружены во всех видах байкальских губок [3, 4]. Вид *P. fluorescens* выделяют повсеместно по всей акватории озера [3]. Известно также, что бактерии этого рода служат продуцентами ценных антибактериальных, противовирусных и цитотоксических веществ [5], а из почвенных штаммов *P. fluorescens* получают такие известные антибиотические вещества поли-

кетидной природы, как мупироцин и пиолутеорин [6, 7]. В связи с этим, несомненный интерес представляет изучение генетических основ биотехнологического потенциала псевдомонад из сообществ пресноводных водоемов.

Цель данной работы — выяснить, имеются ли в геноме байкальского штамма *P. fluorescens* 28Bb-08 гены PKS, определяющие его потенциальную способность продуцировать биологически активные соединения.

Исследуемый бактериальный штамм выделен из байкальской губки *Baikalospongia bacillifera* (сем. Lubomirskiidae) на агаре R2A (“Vecton Dickinson” США). Губки были собраны в июне 2006 г. в прибрежной зоне района поселка Большие Коты с глубины 3.6 м.

Бактериальную ДНК выделяли с использованием набора “РибоСорб” по инструкции производителя (“АмплиСенс”, Россия). Полноразмерный ген 16S рРНК амплифицировали, используя зубактериальные праймеры 9F и 1525R. ПЦР-фрагмент (около 1500 п.н.) секвенировали с использованием праймеров 9F, 790F, 1093R и 1525R [8, 9]. Продукты амплификации фрагментов генов кетосинтазного домена получали при помощи вырожденных праймеров DK-F-PKS и DK-R-PKS [10]. ПЦР-фрагмент ожидаемого размера (700 п.н.) клонировали в векторе pTZ57R/T (“Fermentas”, Латвия), после чего проводили трансформацию компетентных клеток *E. coli* XL1BL. Двадцать рекомбинантных клонов секвенировали, используя праймеры M13-20 и M13 на автоматическом секвенаторе CEQ 8800 (“Beckman Coulter Inc.”,

Принятые сокращения: PKS (polyketide synthase) — поликетидсинтазы; KS (ketosynthase domain of the PKS cluster) — кетосинтазный домен генного кластера PKS; БАВ — биологически-активные вещества).

* Эл. почта: irinalipko@yandex.ru

Гомология полученных последовательностей с известными поликетидсинтазами

Последовательность, размер, (номер доступа в GenBank)	Результат анализа BLAST (по базе данных EMBL)	
	ближайшие гомологи	гомология, %
KS1-PF, 677 п.н. (HQ588724)	Ерсиниабактин PKS/NRPS-синтаза <i>P. fluorescens</i> Pf-5 (YP260103)	57
	Ризоксин-PKS-синтаза, белок RhiA <i>B. rhizoxina</i> [14] (CAL69888)	56
KS2-PF, 674 п.н. (HQ588725)	Ризоксин-PKS-синтаза, белок RhiA <i>B. rhizoxina</i> [14] (CAL69888)	58
	Ерсиниабактин-PKS/NRPS-синтаза <i>P. fluorescens</i> Pf-5 (YP260103)	56
KS3-PF, 692 п.н. (HQ588726)	Поликетидсинтаза <i>Mухосoccus issolu</i> DK 1622, (YP632116)	53
	Кетосинтаза типа I, некультивируемая бактерия из почвы (ADD65218)	53
	Кетосинтаза типа I, некультивируемая бактерия – симбионт губки <i>D. dissoluta</i> [15] (AAY00025)	51
KS4-PF, 680 п.н. (HQ588727)	Эпотиолон синтаза, белок EpoE <i>S. cellulorum</i> [16] (ADB12492)	50
	Поликетидсинтаза <i>C. apiculatus</i> [17] (BAG69037)	66
	Дисоразолсинтаза, белок DszA <i>S. cellulorum</i> [18] (AAY32964)	59

США). Последовательности редактировали и виртуально транслировали в белковую последовательность при помощи программы BioEdit [11] и сравнивали с опубликованными данными (программа BLAST сервера NCBI [12]). Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК и KS-генов поликетидсинтаз депонированы в базе GenBank (HQ606463, HQ588724-HQ588727).

На основании последовательности 16S рРНК (длиной около 1500 п.н.) штамм 28Bb-06 был определен как *Pseudomonas fluorescens*. В его геноме идентифицированы четыре последовательности фрагмента гена кетосинтазного домена (KS) генных кластеров PKS. Полученные при виртуальной трансляции аминокислотные последовательности имеют 40–53% гомологии. BLAST-анализ аминокислотных последовательностей выявил их сходство с модульными KS-доменами различных бактерий, среди которых известные продуценты биологически активных метаболитов и не идентифицированные штаммы. Ближайшие гомологи, определенные с помощью анализа BLAST, представлены в таблице. Обнаружено, что последовательности KS1-PF и KS2-PF родственны KS-доменам генных кластеров биосинтеза ерсиниабактина (сидерофор, фактор вирулентности) [13] и ризоксина (цитотоксин, ингибитор митоза) [14]. Последовательность KS1-PF имеет 57% гомологии с кетосинтазным доменом (PKS/NRPS) синтеза ерсиниабактина γ -протеобактерии *P. fluorescens* Pf-5 и 56% – с KS-доменом генного кластера синтеза ризоксина β -протеобактерии *Burkholderia rhizoxina*. Последовательность KS2-PF сходна с указанными последовательностями (кетосинтазным доменам биосинтеза ерсиниабактина и ризоксина) на 56 и 58% соответственно. При этом KS1-PF и KS2-PF гомологичны лишь на 53%. Ближайший гомолог последовательности KS3-PF кетосинтаза типа I некультивируемой почвенной

бактерии. В числе сходных последовательностей обнаружена также кетосинтаза некультивируемого симбионта морской губки *Discodermia dissoluta* [15] и синтаза эпотиолон (цитотоксин, ингибитор митоза), вещества, в настоящее время широко исследуемого, поскольку он обладает антираковыми свойствами [16]. Последовательность KS4-PF на 66% гомологична поликетидсинтазе δ -протеобактерии *Chondromyces apiculatus* [17] и на 59% – с дисоразолсинтазой *Sorangium cellulorum* [18]. Дисоразолы, как и эпотиолон, являются ингибиторами полимеризации тубулина и дестабилизирующими агентами микротубулинов, проявляя цитотоксические свойства.

Таким образом, впервые в геноме *P. fluorescens* 28Bb-06, выделенного из байкальской пресноводной губки, с помощью молекулярных методов, идентифицировано четыре гена KS-домена PKS. Невысокая гомология виртуально транслированных аминокислотных последовательностей с последовательностями синтаз известных метаболитов может свидетельствовать о потенциальной способности исследуемого штамма продуцировать ряд новых, до настоящего времени не охарактеризованных биоактивных веществ. Для подтверждения этой способности необходимо выделить метаболиты, продуцируемые этой бактерией, и изучить их биологическую активность и химическую природу. Подход, использованный в данной работе, можно успешно применять в дальнейшем для поиска генов БАВ в геномах бактерий пресноводных сообществ и исследования их биотехнологического потенциала.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (05-05-97271 и 11-04-00323-а) и междисциплинарного проекта Сибирского отделения РАН (96).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jenke-Kodama H., Sandmann A., Müller R., Dittmann E. 2005. Evolutionary implications of bacterial polyketide synthases. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 2027–2039.
2. Zhang W., Zhang F., Li Z., Miao X., Meng Q., Zhang X. 2009. Investigation of bacteria with polyketide synthase genes and antimicrobial activity isolated from South China Sea sponges. *Appl. Microbiol.* **107**, 567–575.
3. Павлова О.Н., Дрюккер В.В., Косторнова Т.Я., Никулина И.Г. 2003. Особенности распространения бактерий рода *Pseudomonas* в озере Байкал. *Сиб. экол. Журнал.* **3**, 267–272.
4. Парфенова В.В., Теркина И.А., Косторнова Т.Я., Никулина И.Г., Черных В.И., Максимова Э.А. 2008. Микробное сообщество пресноводных губок озера Байкал. *Известия РАН. Сер. биол.* **4**, 435–441.
5. Isnansetyo A., Kamei Y. 2009. Bioactive substances produced by marine isolates of *Pseudomonas*. *Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 1239–1248.
6. Gurney R., Thomas C.M. 2011. Mupirocin: biosynthesis, special features and applications of an antibiotic from a gram-negative bacterium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90**, 11–21.
7. Kidarsa T.A., Goebel N.C., Zabriskie T.M., Loper J.E. 2011. Phloroglucinol mediates cross-talk between the pyoluteorin and 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic pathways in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Mol. Microbiol.* **81**, 395–414.
8. Bano N., Hollibaugh J.T. 2002. Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. *Appl. Environ. Microb.* **68**, 505–518.
9. Wawrik B., Kerkhof L., Zylstra G.J., Kukor J.J. 2005. Identification of unique type II polyketide synthase genes in soil. *Appl. Environ. Microb.* **71**, 2232–2238.
10. Ehrenreich I.M., Waterbur J.B., Webb E.A. 2005. Distribution and diversity of natural product genes in marine and freshwater cyanobacterial cultures and genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7401–7413.
11. Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **41**, 95–98.
12. Altschul S.F., Warren G., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Mol. Biol.* **215**, 403–410.
13. Bultreys A., Gheysen I., Hoffmann E. 2006. Yersiniabactin production by *Pseudomonas syringae* and *Escherichia coli*, and description of a second yersiniabactin locus evolutionary group. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3814–3825.
14. Partida-Martinez L.P., Hertweck C. 2007. A gene cluster encoding rhizoxin biosynthesis in *Burkholderia rhizoxina*, the bacterial endosymbiont of the fungus *Rhizopus microsporus*. *Chembiochem.* **8**, 41–45.
15. Schirmer A., Gadkari R., Reeves C.D., Ibrahim F., DeLong E.F. 2005. Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4840–4849.
16. Tang L., Shah S., Chung L., Carney J., Katz L., Khosla C., Julien B. 2000. Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster. *Science.* **287**, 640–642.
17. Komaki H., Fudou R., Iizuka T., Nakajima D., Okazaki K., Shibata D., Ojika M., Harayama S. 2008. PCR detection of type I polyketide synthase genes in myxobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 5571–5574.
18. Carvalho R., Reid R., Viswanathan N., Gramajo H., Julien B. 2005. The biosynthetic genes for disorazoles, potent cytotoxic compounds that disrupt microtubule formation. *Gene.* **359**, 91–98.